

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA  
TOXICOLÓGICA**

**AVALIAÇÃO DO ESTADO MICRONUTRICIONAL  
E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM IDOSOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Clóvis Paniz**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2007**

# **AVALIAÇÃO DO ESTADO MICRONUTRICIONAL E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM IDOSOS**

por

**Clóvis Paniz**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Área de Concentração em Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Bioquímica Toxicológica.**

**Orientador: Profa. Dra. Solange Cristina Garcia**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2007**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DO ESTADO MICRONUTRICIONAL E DE ESTRESSE  
OXIDATIVO EM IDOSOS**

elaborada por  
**Clóvis Paniz**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Bioquímica Toxicológica**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Solange Cristina Garcia, Dra.**  
(Presidente/Orientador)

---

**Simone Gonçalves Cardoso, Dra. (UFSM)**

---

**Tatiana Emanuelli, Dra. (UFSM)**

Santa Maria, 19 de março de 2007.

*Dedico este trabalho aos meus queridos **Catiane** e **Luan** por fazerem a minha vida especial e encherem de paz os meus dias. Obrigado por todo o amor, carinho, compreensão, esforços, paciência, sacrifícios e renúncias. Amo muito vocês!*

*Dedico também, a todos aqueles que acreditam na possibilidade de construirmos um mundo mais fraterno, justo, equânime, mais sustentável e, portanto, mais humano para nós e para as gerações vindouras.*

## **Agradecimento especial**

A professora **Dr<sup>a</sup> Solange Cristina Garcia** pela oportunidade de aprendizado, pela dedicação, paciência e orientação deste trabalho. Também pelo exemplo de perseverança, determinação e garra, sempre estimulando o crescimento profissional, mostrando caminhos, dando apoio e tornando-se uma grande amiga.

## **Agradecimentos**

A Deus pela vida, pelas oportunidades que colocou em meu caminho e, principalmente, por ter povoado minha existência com tantas pessoas maravilhosas.

Aos meus pais, pelo amor, incentivo, apoio e exemplo.

A toda a família, pelo constante apoio emocional, amizade, carinho e por ser um grupo maravilhoso, que serve de estrutura e segurança para alçar vôos maiores.

Aos grandes amigos Cristiano e José, pela parceria insubstituível, pelo incentivo constante, grande presenças nos momentos de angústia e de alegrias. Os meus consultores para qualquer assunto, dos mais profundos aos aleatórios e divagatórios.

Aos colegas do LATOX: Ângela Maria, André, Gabriela, Mariele, Silvana, Rachel, Juliana Va, Juliana Vi, Denise, Miguel, Raquelzinha, Fernanda, Natália, Sílvia, Lucas e Juniara pelo carinho, o convívio amigo, a disponibilidade, o esforço e a aprendizagem que me proporcionaram. Além de todo o suporte técnico na realização de todo o projeto, na coleta das amostras, nas entrevistas e na realização de todas as análises. A participação de todos vocês foi fundamental.

À Renata e Nélia, pela amizade, paciência, parceria profissional e por toda a cobertura funcional nas minhas ausências da hematologia durante este trabalho.

Ao diretor do LAC-HUSM, Elehú de Oliveira pelo apoio e por gentilmente permitir o uso de alguns equipamentos para a realização deste trabalho.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Análises Clínicas do HUSM pela amizade, apoio emocional, pela vasta contribuição na minha formação técnica e humana e por serem um prolongamento da minha família.

À Carmencita pela amizade e por toda a boa energia que sempre emana.

À psicóloga Faltemara Forsin Tessele, pela parceria na aplicação dos questionários psicológicos aos pacientes.

Ao Lar das Vovozinhas, em especial à enfermeira Ilaine e à Irmã Noêmia, pela receptividade, atenção dispensada e colaboração com este trabalho.

À Associação Vila Itagiba, em especial à Irmã Cleonice e à Irmã Circe, pela receptividade, atenção dispensada e colaboração com este trabalho.

Ao Abrigo Espírita Oscar Pithan, em especial ao Seu João Dias e à enfermeira Suzane, pela receptividade, atenção dispensada e colaboração com este trabalho.

A todos os idosos que participaram deste estudo, pelo carinho e disposição com que nos receberam e pela fundamental contribuição em nosso estudo.

Ao grupo de terceira idade da comunidade Santos Dumont, pela colaboração, carinho e disposição de participar deste estudo.

Às professoras Tatiana Emanuelli, Simone Gonçalves Cardoso e Lissandra Dal Lago, por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta dissertação.

À direção do Hospital Universitário de Santa Maria pelo apoio.

Aos amigos do DACT pelo apoio e incentivo.

A todos os amigos e demais pessoas que não foram citados, mas que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

*“Sê humilde se queres adquirir a Sabedoria...  
Sê mais humilde ainda, quando tiveres  
te assenhoreado da Sabedoria.”*

*Blavatsky*

*“Desde os seis anos que eu tinha a mania de desenhar a forma das coisas. Quando estava com 50 anos, havia publicado uma infinidade de desenhos; mas tudo que produzi antes dos 70 anos não é digno de ser levado em conta. Aos 73 aprendi um pouco sobre a verdadeira estrutura da natureza, dos animais, plantas, pássaros, peixes e insetos. Em conseqüência, quando estiver com 80 anos, terei realizado mais progressos. Aos 90 penetrarei no mistério das coisas. Aos 100, por certo, terei atingido uma fase maravilhosa. E, quando fizer 110 anos, qualquer coisa que eu fizer, seja um ponto ou uma linha, terá vida”.*

*Hokusai, famoso pintor japonês*



## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação Bioquímica Toxicológica  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### **AVALIAÇÃO DO ESTADO MICRONUTRICIONAL E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM IDOSOS.**

AUTOR: CLÓVIS PANIZ

ORIENTADORA: SOLANGE CRISTINA GARCIA

Data e Local de defesa: Santa Maria, 19 de março de 2007

O aumento da expectativa de vida tornou o envelhecimento populacional um fenômeno global. O rápido crescimento da população idosa, principalmente em países em desenvolvimento, tem se tornado um problema de saúde pública. Apesar de o envelhecimento ser um fenômeno complexo, o estresse oxidativo parece desempenhar um papel importante sobre este processo. Por outro lado, existem poucos estudos avaliando os níveis de antioxidantes da dieta, bem como, os marcadores do estresse oxidativo em idosos saudáveis. Estas informações podem ser úteis para entender o envolvimento do estresse oxidativo nas mudanças fisiopatológicas associadas ao envelhecimento humano, tanto em idosos institucionalizados como em idosos não institucionalizados. Neste estudo foram analisados marcadores do estresse oxidativo, como glutatona reduzida (GSH), malondialdeído (MDA), proteínas carboniladas (PCO),  $\delta$ -aminolevulinato desidratase (ALA-D) e alguns micronutrientes da dieta como vitaminas C, E, B12 e folatos no sangue de idosas institucionalizadas (n= 45; 71  $\pm$  6 anos), em asilos públicos de Santa Maria, e idosas não institucionalizadas (n=22; 68  $\pm$  6 anos), pertencentes a grupos de terceira idade. Além disso, foi avaliado o estado nutricional, através das determinações de albumina, hemoglobina e do índice de massa corporal (IMC); o perfil lipídico; e o estado mental, verificado através do Mini-Exame do Estado Mental (MEEM). Os níveis de vitamina C foram significativamente menores nas institucionalizadas, enquanto os níveis de vitamina E foram significativamente maiores neste grupo. Os níveis de folatos e vitamina B12 não mostraram diferenças significativas entre os grupos e uma baixa incidência de deficiência de ambas foi encontrada. Todas as vitaminas determinadas estavam dentro dos valores estabelecidos como de referência para adultos. GSH e PCO, não mostraram diferenças significativas entre os grupos, enquanto MDA e ALA-D foram significativamente aumentadas nas idosas não institucionalizadas. As idosas institucionalizadas tiveram pior desempenho cognitivo avaliado pelo MEEM, mostrando escores significativamente menores. Além disso, foi encontrada uma correlação positiva entre vitamina C com ALA-D; com albumina; com hemoglobina; e com MEEM; e entre folatos e MEEM. Foi encontrada correlação negativa entre vitamina E com PCO e com MDA; PCO com ALA-D e ALA-D com idade. Através dos resultados obtidos, sugere-se que os níveis de micronutrientes encontrados em nosso estudo, embora considerados normais para adultos, poderiam ser insuficientes para idosos. A vitamina C parece proteger algumas proteínas sanguíneas com grupos tiólicos como ALA-D e albumina, enquanto a vitamina E parece proteger estruturas lipídicas do ataque oxidativo. Em adição, as vitaminas C e os folatos parecem proteger contra perdas cognitivas em idosos. A atividade da ALA-D sanguínea mostrou ser um marcador útil para avaliação de estresse oxidativo em idosos.

*Palavras-chave:* idosos, estresse oxidativo, avaliação micronutricional, vitaminas, envelhecimento.

## **ABSTRACT**

Master dissertation  
Post Graduate Course on Toxicological Biochemistry  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### **EVALUATION OF MICRONUTRITIONAL STATUS AND OF OXIDATIVE STRESS IN ELDERLY.**

AUTHOR: CLÓVIS PANIZ

ADVISER: SOLANGE CRISTINA GARCIA

Date and place of the defense: Santa Maria, march 19, 2007

The increase in life expectancy has made the aging of the population a global phenomenon. Projections point to a growth of greater than 300% in the number of elderly people over the next 50 years. The rapid growth of the elderly population, mainly in developing countries has become a public health problem. In this age group, non transmissible chronic diseases are very common, mainly those of a nutritional origin. Although aging is a complex phenomenon, oxidative stress seems to play an important role in this process. On the other hand, there are few studies evaluating the levels of antioxidants in the diet and oxidative stress biomarkers in healthy elderly. These data could be useful to understand the role of oxidative stress in physiopathological changes associated with human aging, both in institutionalized elderly and in non-institutionalized elderly. In the this study, an analysis was made of oxidative stress biomarkers such as reduced glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), protein carbonyls (PCO) and  $\delta$ -aminolevulinatase dehydratase (ALA-D) as well as, some antioxidants from the diet such as vitamin C, E, B12 and folate; of in institutionalized elderly women (n= 45; 71  $\pm$  6 years old) from a public retirement home and non-institutionalized elderly women (n= 22; 68  $\pm$  6 years old). Moreover, the nutritional status was evaluated through a determination of serum albumin, hemoglobin and the body mass index (BMI) as well as a lipidic profile. The mental state was assessed through the Mini Mental State Examination (MEEM). In the institutionalized group, vitamin C levels were significantly decreased and vitamin E levels were significantly increased. The levels of folate and vitamin B12 did not show significant differences between the groups and a low deficiency incidence was found for both vitamins. However, both vitamins were within the normal range established for adults. GSH and PCO did not present significant differences between the groups, while MDA and ALA-D were significantly increased in the non-institutionalized group. The institutionalized group had a lower cognitive performance, showing scores significantly decreased. Moreover, positive correlations were found between vitamin C and ALA-D, vitamin C and albumin, vitamin C and hemoglobin, vitamin C and the mental state and between folate and MEEM. Moreover, a negative correlation was found between vitamin E and both PCO and MDA, between PCO and ALA-D and between ALA-D and age. Thus, through the results found in the institutionalized elderly women, it can be suggested that the evaluated micronutrient levels, considered normal for adults, could be insufficient for the elderly. Vitamin C may protect some blood proteins from oxidative effects, especially those with thiol groups. Vitamin E levels may have an effect on MDA levels, protecting the lipid membrane from lipoperoxidation, and also, the carbonylation of proteins. In addition, both vitamin C and folate demonstrated protection against cognitive impairment in elderly women. The ALA-D was presented as a possible oxidative stress biomarker to evaluate oxidative stress in elderly.

*Key-words:* elderly; oxidative stress; micronutritional evaluation; vitamins; aging.

## LISTA DE TABELAS

### DISSERTAÇÃO

<b>TABELA 1</b> Espécies reativas de oxigênio e suas meias-vidas, em segundos (Adaptado de Jordão Jr. et al, 1998).....	22
<b>TABELA 2</b> Distribuição da população idosa em nível nacional, estadual e municipal.....	36

### MANUSCRITO I

<b>TABELA 1</b> - Results of the vitamin C, E and folate levels, represented as mean values $\pm$ SEM.....	62
<b>TABELA 2</b> - Results of the GSH, PCO, MDA and ALA-D, represented as mean values $\pm$ SEM.....	62
<b>TABELA 3</b> - Results obtained of nutritional status evaluation represented as median values $\pm$ SEM.....	63
<b>TABELA 4</b> - Results expressed in mg/dl of lipid profile of the aged women and reference values following age and gender, represented as mean values $\pm$ SEM.....	63

### MANUSCRITO II

<b>TABELA 1</b> - Resultados das dosagens de vitaminas, apresentados como média $\pm$ EP e, valores considerados de referência segundo a literatura.....	86
<b>TABELA 2</b> - Frequência de idosas com deficiência de vitaminas, resultados expressos em porcentagem.....	86

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### DISSERTAÇÃO

- FIGURA 1** - Possíveis efeitos da carbonilação de proteínas. Ela é geralmente associada com perda permanente de função e pode levar à eliminação ou acúmulo de proteínas carboniladas, com freqüente produção de injúria tecidual, e eventualmente morte da célula (Adaptado de Dalle-Donne, 2006). .....27
- FIGURA 2** - Condensação assimétrica de duas moléculas do ALA, catalisada pela enzima  $\delta$ -aminolevulinato desidratase, formando o porfobilinogênio (PBG).....28
- FIGURA 3** - Sistema antioxidante da glutathiona e suas enzimas envolvidas (Sies et al, 1972). .....30
- FIGURA 4** - Proporção de idosos na população brasileira entre 1920 e 2100 (adaptada de Machado, 1993 apud Chaimowics e Greco, 1999).....38

### MANUSCRITO I

- FIGURA 1** - Pearson correlations between vitamin C vs albumin (A); vitamin C vs hemoglobin (B); and vitamin C vs ALA-D (C).....64
- FIGURA 2** - Pearson correlation between vitamin E vs MDA (A) and vitamin E vs PCO (B).....65
- FIGURA 3** - Pearson correlation between ALA-D vs PCO (A) and ALA-D vs age (B).....65

## LISTA DE ANEXOS

- ANEXO A** – Comprovante da submissão do manuscrito “**Blood evaluation of micronutrient and oxidative stress levels in elderly**” à Revista *The Journal of Nutritional Biochemistry*.....106
- ANEXO B** – Comprovante da submissão do manuscrito “**Avaliação micronutricional e sua relação com o mini-exame do estado mental em idosos**” à Revista *Revista de Saúde Pública*.....107
- ANEXO C** – Questionário Mini-Exame do Estado Mental.....108
- ANEXO D** – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....110

## LISTA DE ABREVIATURAS

ALA – ÁCIDO  $\delta$ -aminolevulínico  
ALA-D –  $\delta$ -Aminolevulinato desidratase  
CAT – Catalase  
DNA – Ácido desoxirribonucléico  
EDTA – Ethylene diamine tetracetic acid  
EROs – Espécies reativas de oxigênio  
ERNs – Espécies reativas de nitrogênio  
GSH – Glutathione  
GSHPx – Glutathione peroxidase  
GSSG – Glutathione disulfide  
Hcy – Homocysteine  
HDL – Lipoproteína de alta densidade  
HHcy – Hiperhomocysteinemia  
HPLC – High performance liquid chromatography  
IMC – Índice de massa corporal  
LDL – Lipoproteína de baixa densidade  
MDA – Malondialdehyde  
MEEM – Mini-Exame do Estado Mental  
NADPH – Nicotinamide adenine dinucleotide  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
ONU – Organização das Nações Unidas  
RBC – Red blood cells  
RLs – Radicais Livres  
ROS – Reactive oxygen species

PCO – Proteínas carboniladas

-SH – Grupos sulfidrílicos

SOD – Superóxido dismutase

TCA – Tricloroacetic acid

UN – United Nations

WHO – World Health Organization

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>06</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>07</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>08</b>
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE ANEXOS.....</b>	<b>11</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>12</b>
<b>APRESENTAÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Envelhecimento populacional.....</b>	<b>20</b>
<b>2.2 O processo de envelhecimento humano.....</b>	<b>20</b>
<b>2.3 Radicais livres e espécies reativas.....</b>	<b>21</b>
<b>2.4 Estresse Oxidativo.....</b>	<b>22</b>
<b>2.5 Peroxidação lipídica.....</b>	<b>23</b>
<b>2.6 Oxidação de proteínas.....</b>	<b>25</b>
2.6.1 Carbonilação de proteínas.....	25
2.6.2 Inibição da $\delta$ -aminolevulinato desidratase (ALA-D).....	27
<b>2.7 Antioxidantes.....</b>	<b>28</b>
2.7.1 Glutathiona reduzida (GSH).....	29
2.7.2 Vitamina C.....	30
2.7.3 Vitamina E.....	31
<b>2.8 Carência nutricional, envelhecimento e doenças crônicas.....</b>	<b>32</b>
2.8.1 Deficiência de vitamina B12 e folatos e sua influência nos níveis de homocisteína.....	32
2.8.2 Anemia no idoso.....	34



2.8.3 Avaliação nutricional no idoso.....	35
<b>2.9 O envelhecimento em nosso meio.....</b>	<b>36</b>
<b>2.10 O idoso institucionalizado.....</b>	<b>36</b>
<b>3 ARTIGOS CIENTÍFICOS.....</b>	<b>39</b>
<b>3.1 Manuscrito I.....</b>	<b>39</b>
Abstract.....	41
Introduction.....	42
Material and methods.....	43
Results.....	48
Discussion.....	50
References.....	57
<b>3.2 Manuscrito II.....</b>	<b>66</b>
Resumo.....	68
Abstract.....	70
Introdução.....	71
Materiais e métodos.....	74
Resultados.....	77
Discussão.....	78
Conclusão.....	81
Bibliografia.....	82
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>87</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>92</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>93</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>106</b>

## APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigos, os quais se encontram no item Manuscritos. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios artigos e representam a íntegra deste estudo.

Os itens Discussão e Conclusões, encontrados no final desta dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre os artigos científicos contidos neste trabalho.

As Referências Bibliográficas referem-se somente às citações que aparecem nos itens Introdução, Revisão Bibliográfica, Discussão e Conclusões desta dissertação.

Os artigos estão estruturados de acordo com as normas das revistas científicas para as quais foram submetidos:

Manuscrito I – *The Journal of Nutritional Biochemistry*;

Manuscrito II – *Revista de Saúde Pública*.

Os manuscritos acima citados encontram-se em fase de avaliação nas respectivas revistas.

## 1 INTRODUÇÃO

Na última década, o envelhecimento populacional tem se tornado objeto de discussões e estudos, devido ao aumento progressivo de indivíduos nesta faixa etária. O rápido crescimento da população idosa, principalmente em países em desenvolvimento, tem se tornado um problema de saúde pública (Huerta et al., 2006). Embora exista preocupação com o envelhecimento da população (Rodrigues et al., 2000; Rosa et al., 2003), há um número reduzido de estudos com este grupo etário, especialmente no Brasil (Garrido e Menezes, 2002).

O envelhecimento humano é um fenômeno complexo, com o acúmulo de mudanças fisiológicas ocasionadas pelo tempo que conduzem o indivíduo a uma maior vulnerabilidade a doenças, principalmente às doenças crônicas não transmissíveis e, com isso, o desenvolvimento de incapacidades associadas a este processo (Gil et al., 2006).

Muitas teorias foram sugeridas para explicar este processo. Entre as mais aceitas, está a teoria baseada no estresse oxidativo, um desequilíbrio causado quando as defesas antioxidantes estão quantitativamente ou qualitativamente impossibilitadas de neutralizar a produção e os efeitos de moléculas oxidantes. O estresse oxidativo teria influência decisiva sobre o envelhecimento humano, ocasionando danos em biomoléculas como lipídios, proteínas e DNA, que vão acumulando ao longo dos anos produzindo injúrias celulares e teciduais e, assim, levando ao envelhecimento do organismo (Beal, 1995; Finkel e Holbrook, 2000; Gutteridge e Halliwell, 2000).

Por outro lado, os idosos constituem um dos grupos populacionais mais suscetíveis a problemas nutricionais (Holleland et al., 1999). As mudanças anatómicas e funcionais próprias do envelhecimento levam a uma maior suscetibilidade deste grupo a estados de desnutrição e deficiências específicas de nutrientes (Gillham et al., 1997; Clarke et al., 2003; Hoffer, 2004). Deficiências de vitaminas C, E, e principalmente B12 e folatos exercem grande influência sobre a saúde e bem-estar do idoso. O estresse oxidativo e estas deficiências nutricionais podem promover o aparecimento de diversas doenças crônicas associadas com o avanço da idade, como doença de Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose, perdas cognitivas, além de doenças cardiovasculares.

Isto se torna particularmente importante em grupos de idosos institucionalizados em asilos ou abrigos públicos, que constituem, geralmente, um grupo privado de seus projetos, pois se encontram afastados da família, da casa, dos amigos, das relações nas quais sua história de vida foi construída. Nestes, as doenças crônicas não transmissíveis são, com raras exceções, os motivos principais de suas internações em Instituições de Longa Permanência (Freire Jr. e Tavares, 2004/2005).

Deste modo, as doenças crônicas não transmissíveis, especialmente em idosos, representam um grande problema de saúde pública, pois são responsáveis por patologias cérebro e cardiovasculares. Neste sentido, conhecer o perfil micro nutricional e do estresse oxidativo em idosos é necessário para compreender melhor alguns aspectos do processo de envelhecimento, visando fornecer dados que possam servir na adoção de medidas de prevenção que permitam um envelhecimento saudável e ativo, diminuindo os números e períodos de internações hospitalares e minimizando os gastos com saúde do idoso, resultantes destas doenças.

Assim, os objetivos deste estudo foram: determinar os níveis de estresse oxidativo através dos marcadores glutathiona reduzida (GSH) eritrocitária, malondialdeído (MDA), proteínas carbonil (PCO) e  $\delta$ -aminolevulinato desidratase (ALA-D) e de alguns micronutrientes da dieta como vitamina C, E, B12 e folatos em idosos institucionalizadas (n=45) em asilos públicos da cidade de Santa Maria e idosos não institucionalizadas (n=22), pertencentes a grupos de terceira idade. Além disso, foram avaliados o estado nutricional, através das determinações de albumina, hemoglobina e do índice de massa corporal (IMC); o perfil lipídico; e o estado mental, verificado através do Mini-Exame de Estado Mental (MEEM).

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Envelhecimento populacional**

O envelhecimento populacional é um fenômeno global e tem sido muito discutido na última década. Estima-se que, mundialmente, o número de pessoas com 60 anos ou mais irá crescer mais de 300% nos próximos 50 anos (Scazufca et al., 2002), passando de 609 milhões em 2000 para mais de 2 bilhões em 2050. Se considerarmos a América do Sul e mais especificamente o Brasil, a população idosa, neste mesmo período crescerá mais de 400%. No Brasil a população de idosos passará de 14 milhões em 2000 para mais de 63 milhões em 2050 (ONU, 2006). Além disso, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2025, entre os dez países com maior número de idosos, cinco serão dos chamados países em desenvolvimento (WHO, 1998).

O envelhecimento populacional tem se tornado um importante e pertinente problema de saúde pública (Huerta et al., 2006). Embora exista preocupação com o envelhecimento populacional, o rápido processo de senescência, observado nos países em desenvolvimento, como o Brasil, ainda não tem sido suficientemente estudado (Garrido e Menezes, 2002) e raros são os trabalhos que abordam níveis sanguíneos de micronutrientes em idosos.

### **2.2 O processo de envelhecimento humano**

O processo de envelhecimento inclui o acúmulo de mudanças ocasionadas pelo tempo e um declínio da resposta do organismo a estas mudanças. Uma característica geral do processo de envelhecimento é uma progressiva deterioração fisiológica que, com o tempo, leva a uma quebra da homeostase, aumento da vulnerabilidade às doenças e, finalmente a morte do organismo (Gil et al., 2006). Existem numerosas teorias que tentam explicar o processo de envelhecimento, levando em consideração alterações fisiológicas complexas do organismo como as mudanças mitocondriais, acúmulo de proteínas aberrantes no citosol, danos químicos em macromoléculas e mutações somáticas. Porém, nenhuma delas tem sido consensual (Hughes e Reynolds, 2005).

Atualmente, um grande número de evidências experimentais, clínicas e epidemiológicas, sugerem que a oxidação celular, causada por metabólitos do oxigênio, é um fator mediador importante no processo de perda funcional que acompanha o envelhecimento, podendo explicar a fisiopatologia de muitas doenças degenerativas que acometem o idoso (Junqueira e Ramos, 2005). Esta teoria foi inicialmente introduzida por Denham Harman, na década de 50, que propôs o conceito de radicais livres como protagonistas do processo de envelhecimento (Harman, 1956). Assim, este processo é o resultado dos danos causados por radicais livres em moléculas e tecidos, os quais vão acumulando com o avanço da idade e causam uma exponencial perda das funções celulares, provocando um aumento das chances de aparecimento de doenças e da morte (Huerta et al., 2006).

### **2.3 Radicais livres e espécies reativas**

Os radicais livres (RLs) são agentes oxidantes caracterizados como espécies atômicas ou moleculares que possuem um ou mais elétrons desemparelhados na sua órbita externa, tornando-as espécies altamente reativas que agem como eletrófilos (Gilhan et al., 1997).

Dentre os oxidantes mais importantes envolvidos em processos patológicos estão as espécies reativas de oxigênio (EROS) e as de nitrogênio (ERNS). As principais EROS distribuem-se em dois grupos, as radicalares: superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) peroxila ( $ROO^{\cdot}$ ) e alcóxila ( $RO^{\cdot}$ ); e as não-radicalares: oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o ácido hipocloroso. Dentre as ERNS incluem-se o óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ), o óxido nitroso e o peroxinitrito ( $HNOO^{\cdot}$ ), dentre outros (Gillham et al., 1997; Sies, 1997). A maioria destes compostos apresenta tempo de vida médio bastante curto, como pode ser observado na tabela 1.

Eles podem ser formados no organismo de diversos modos. Durante a fosforilação oxidativa, mecanismo usado pelas células para produzir energia química (ATP), parte dos elétrons é transferida para o oxigênio, dando origem ao radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) (Junqueira e Ramos, 2005). Eles podem ainda serem produzidos durante a oxidação de ácidos graxos, reações do citocromo  $P_{450}$  e de células fagocíticas, entre outros. Algumas enzimas também são capazes de gerar RLs, sob condições normais ou patológicas. Fontes exógenas como tabaco,

radiações, luz ultravioleta, solventes e alguns fármacos, dentre outros, também geram RLs (Biesalski, 2002).

Em condições fisiológicas normais as EROS podem desempenhar importante papel fisiológico na regulação da resposta imunológica, participando do processo fagocítico de defesa contra infecções e atuando como fatores de transcrição na sinalização intracelular, induzindo a apoptose (Halliwell, 1994; Biesalski, 2002). No entanto, o aumento na sua produção e/ou a redução na sua eliminação gera um desequilíbrio fisiológico, caracterizando o estresse oxidativo (Beal, 1995; Finkel e Holbrook, 2000; Gutteridge e Halliwell, 2000; Junqueira e Ramos, 2005).

**Tabela 1.** Espécies reativas de oxigênio e suas meias-vidas, em segundos.

<i>Espécie Reativa de Oxigênio</i>		<i>Meia-vida (segundos)</i>
HO <sup>•</sup>	Radical Hidroxila	10 <sup>-9</sup>
HOO <sup>•</sup>	Radical Hidroperoxila	10 <sup>-8</sup>
RO <sup>•</sup>	Radical Alcoxila	10 <sup>-6</sup>
ROO <sup>•</sup>	Radical Peroxila	7
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito	0,05 – 1
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio	Variável
O <sub>2</sub> <sup>-•</sup>	Radical Superóxido	Variável
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxigênio Singleto	10 <sup>-5</sup>
NO <sup>•</sup>	Radical Oxido Nítrico	1 – 10
HOCl	Ácido Hipocloroso	Estável

Adaptado de Jordão Jr. et al., 1998. Obs: R é um lipídio, por exemplo, o linoleato.

## 2.4 Estresse oxidativo e doenças

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre os níveis de oxidantes e antioxidantes no organismo, causado pela excessiva produção de oxidantes ou depleção dos níveis de antioxidantes (McGrath et al., 1995; Morena et al., 2002). O somatório de danos oxidativos relacionados ao desequilíbrio antioxidante/pró-oxidante pode levar a diversos danos celulares, desencadeando alterações progressivas em proteínas, lipídios, açúcares e DNA reduzindo a capacidade funcional e aumentando os riscos de doenças (Berr, 1998; Finkel e Holbrook, 2000).

Com o envelhecimento orgânico, há um aumento da liberação de oxigênio e peróxido de hidrogênio pela mitocôndria, fato que parece ser responsável pelo desequilíbrio entre substâncias oxidantes e antioxidantes em nível celular. A existência desta situação, denominada estresse oxidativo, foi sugerida a partir do acúmulo observado de lesão oxidativa na estrutura e na função da mitocôndria isolada de animais velhos (Almada Filho, 2002).

Deste modo, o estresse oxidativo sistêmico encontra-se relacionado ao processo de envelhecimento e a mecanismos presentes em diversas doenças degenerativas.

O sistema nervoso é particularmente vulnerável aos efeitos deletérios do estresse oxidativo, devido ao seu alto conteúdo lipídico, incluindo ácidos graxos polinsaturados, alvos principais das espécies reativas de oxigênio (Butterfield e Castegna, 2003). Colabora para isso, o fato de utilizar altas taxas de oxigênio quando comparado a outros tecidos e, além disso, ser relativamente deficiente em sistemas antioxidantes quando comparado a outros órgãos (Kedar, 2003). Desta forma, acredita-se que o estresse oxidativo seja um importante fator no declínio das funções neurológicas observado com o envelhecimento (Meydani et al., 2001; Mariani et al., 2005), propiciando o aparecimento de patologias neurodegenerativas como doença de Alzheimer, doença de Parkinson e alguns tipos de esclerose (Mariani et al., 2005).

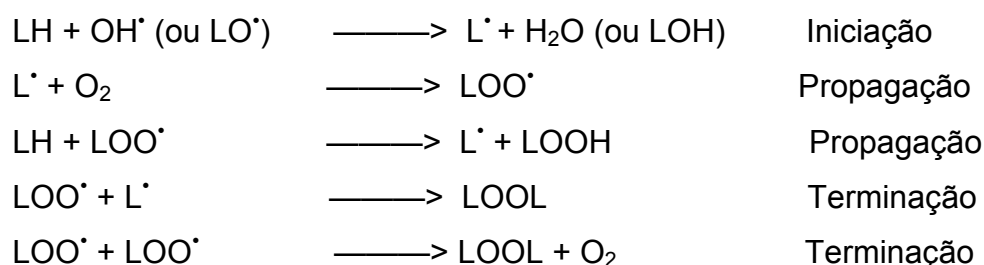
O estresse oxidativo está envolvido também na oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e tem sido hipotetizado como um importante fator no desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Mayne, 2003), além de doenças pulmonares (Macnee e Rahman, 1999), catarata, diabetes e uma diversidade de outras patologias (Junqueira e Ramos, 2005).

## **2.5 Peroxidação lipídica**

O ataque de espécies reativas aos lipídios das membranas desencadeia um processo chamado peroxidação lipídica (Urso e Clarkson, 2003), formando muitos produtos secundários. Estes produtos são principalmente aldeídos, com habilidade para aumentar o dano oxidativo (Uchida, 2000) entre eles, o malondialdeído (MDA) é considerado o principal e o mais estudado.



A peroxidação lipídica é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. Estas etapas estão apresentadas nas reações seguintes, onde L representa o lipídio:



A reação acima se inicia com o seqüestro do hidrogênio do ácido graxo polinsaturado (LH) da membrana celular. Tal seqüestro pode ser realizado pelo  $OH^\bullet$  ou pelo  $LO^\bullet$  (radical alcóxila), com conseqüente formação do  $L^\bullet$  (radical lipídico). Na primeira equação de propagação, o  $L^\bullet$  reage rapidamente com o  $O_2$ , resultando em  $LOO^\bullet$  (radical peróxila), que, por sua vez, seqüestra novo hidrogênio do ácido graxo polinsaturado, formando novamente o  $L^\bullet$  na segunda equação de propagação. O término da lipoperoxidação ocorre quando os radicais ( $L^\bullet$  e  $LOO^\bullet$ ) produzidos nas etapas anteriores propagam-se até destruírem-se a si próprios (Gardès-Albert, 1991 *apud* Ferreira e Matsubara, 1997).

A formação de MDA ocorre pela decomposição dos hidroperóxidos lipídicos e sua concentração tem sido utilizada para estimar a intensidade da peroxidação lipídica em sistemas biológicos, em células e tecidos (Bonnes e Guérin, 1992).

O tempo de vida longo e a alta reatividade permitem a estas moléculas agir tanto dentro quanto fora das células, interagindo com outras biomoléculas como ácidos nucleicos e proteínas, freqüentemente levando a danos irreversíveis sobre o delicado mecanismo de funcionamento da célula (Del Rio, 2005). O contínuo dano oxidativo leva a destruição de membranas, ricas em ácidos graxos poliinsaturados, diminuindo a sua fluidez e contribuindo para a injúria celular (Hershko, 1989). Ocorre perda da seletividade na troca iônica, inativação de enzimas e proteínas de transporte da membrana e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos. Adicionalmente, a oxidação de lipídios no sangue agride as paredes das artérias e veias, facilitando o acúmulo destes lipídios, com conseqüente aterosclerose, podendo causar trombose, infarto ou acidente vascular cerebral (Barreiros, 2006).

Apesar disto, como na formação de RLs e espécies reativas, a peroxidação lipídica pode ser um processo fisiológico nem sempre prejudicial. Pois participa da resposta inflamatória liberando ácido araquidônico e, subseqüentemente, prostaglandinas e distintos endoperóxidos (Jamieson, 1989). Todavia, a excessiva liberação destes produtos durante o dano oxidativo pode causar edema celular, modificações na permeabilidade vascular, quimiotaxia e danos teciduais (Blake et al., 1987), implicando, por exemplo, na patogênese da aterosclerose (Vagimigli et al., 2003).

## **2.6 Oxidação de proteínas**

O alvo celular primário do estresse oxidativo pode variar dependendo do tipo celular, dos níveis absolutos de oxidantes produzidos, das EROS geradas, do sítio de geração (intra ou extracelular) e da proximidade do oxidante à estrutura celular. A extensão do dano também dependerá de múltiplos fatores.

Geralmente, as proteínas são um dos principais alvos celulares dos EROS e de produtos do estresse oxidativo, por constituírem-se importantes componentes de muitos sistemas biológicos e por combaterem de 50 a 75% de EROS como o  $\text{OH}^{\bullet}$  (Davies, 1999). Elas são modificadas por um vasto número de reações envolvendo EROS (Nyström, 2005).

### **2.6.1 Carbonilação de proteínas**

Algumas modificações protéicas podem não ocasionar perda de função ou alterações estruturais em proteínas e são, muitas vezes, uma maneira de o organismo defender-se do ataque oxidativo. Neste caso, proteínas com ação antioxidante sofrem oxidação reversível (Levine et al., 2000; Dalle-Donne et al., 2005a, Dalle-Donne et al., 2005b). Por outro lado, modificações irreversíveis de proteínas podem levar a danos estruturais com inativação e perdas funcionais das mesmas.

Embora a biologia das modificações oxidativas de proteínas permaneça complexa e mal definida, a carbonilação de proteínas é bem caracterizada. Carbonilação é uma modificação protéica irreversível e não enzimática (Stadtman e Berlett, 1991; Stadtman e Levine, 2003). Grupos carbonil são introduzidos nas

proteínas por uma variedade de rotas oxidativas. Modificações de proteínas podem ser induzidas diretamente por EROS ou indiretamente pelo ataque de produtos secundários do estresse oxidativo. A oxidação direta de proteínas por EROS produz derivados carbonilados altamente reativos, resultando na oxidação das cadeias laterais de diversos aminoácidos (Dalle-Donne et al., 2006). Os aminoácidos tiólicos cisteína e metionina são particularmente propensos ao ataque oxidativo de quase todos as EROS (Dalle-Donne et al., 2003b).

Proteínas moderadamente carboniladas são degradadas por um sistema proteosomal, enquanto que, proteínas fortemente carboniladas tendem a formar agregados de alto peso molecular que são resistentes à degradação e acumulam como proteínas danificadas. Tais agregados de proteínas carboniladas podem inibir a atividade das proteases.

O aumento na carbonilação de proteínas durante o envelhecimento e em resposta ao estresse oxidativo não é ao acaso. Algumas proteínas são mais suscetíveis que outras para a oxidação e variam de espécie para espécie. Em humanos, a enzima superóxido dismutase cobre-zinco dependente cerebral é o principal alvo do estresse oxidativo em cérebros de sujeitos afetados com doença de Alzheimer e de Parkinson (Dalle-Donne et al., 2006).

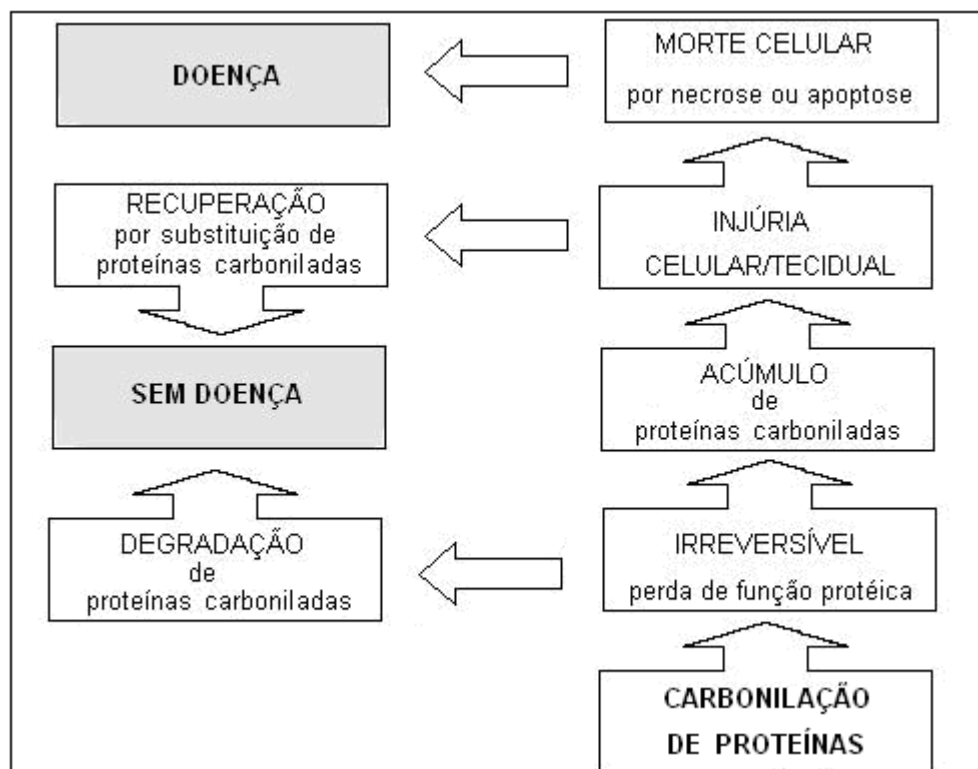
A figura 1 mostra que as proteínas carboniladas resultantes do processo oxidativo podem ser degradadas ou recuperadas resultando em não aparecimento de patologias ou, em casos mais acentuados, conduzir à morte celular resultando em processos patológicos.

Além disso, um grande número de doenças neurodegenerativas são diretamente associadas ao acúmulo de agregados de proteínas carboniladas resistentes à proteólise nos tecidos.

Em adição, estudos demonstraram que a carbonilação de proteínas está envolvida no diabetes, catarata, sepse e câncer (Dalle-Donne et al., 2003a; Nyström, 2005).

A carbonilação de proteínas é um biomarcador muito usado para avaliar dano oxidativo em proteínas, e reflete danos celulares ocasionados por múltiplas formas de EROS (Standtman e Levine, 2003; Dalle-Donne et al., 2003; Butterfield e Castegna, 2003; Dalle-Donne et al., 2005b).

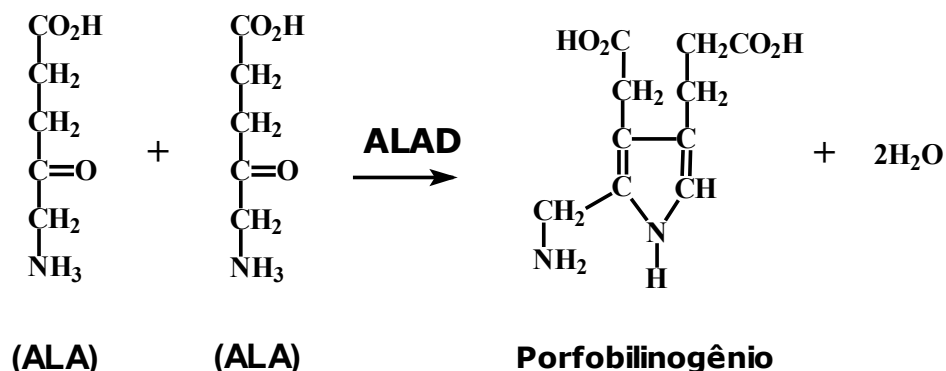
A quantificação de proteínas carboniladas (PCO) apresenta uma vantagem sobre os produtos da peroxidação lipídica como marcador de estresse oxidativo, pois as proteínas oxidadas geralmente são mais estáveis (Dalle-Donne et al., 2003b).



**Figura 1** Possíveis efeitos da carbonilação de proteínas. Ela é geralmente associada com perda permanente de função e pode levar à eliminação ou acúmulo de proteínas carboniladas, com freqüente produção de injúria tecidual, e eventualmente morte da célula. Adaptado de Dalle-Donne et al., 2006.

### 2.6.2 Inibição da $\delta$ -aminolevulinato desidratase (ALA-D)

A ALA-D é uma enzima essencial em muitos organismos, como um componente da rota de biossíntese do heme, catalisando a condensação de duas moléculas de ácido  $\delta$ -aminolevulínico (ALA) para formar o composto monopirrólico porfobilinogênio (Figura 2). Assim, por participar na biossíntese de moléculas tetrapirrólicas, tem ação na constituição de grupos prostéticos de importantes proteínas fisiológicas como a hemoglobina e citocromos (Sassa, 1998). É uma enzima que apresenta grupamentos sulfidrila na sua constituição e sua atividade é altamente sensível a presença de elementos pró-oxidantes, os quais podem oxidar seus grupamentos  $-SH$  (Bolzan et al., 2002).



**Figura 2** Condensação assimétrica de 2 moléculas do ALA, catalisada pela enzima  $\delta$ -aminolevulinato desidratase, formando o porfobilinogênio (PBG).

A inibição da ALA-D pode prejudicar a rota biossintética do heme, resultando em conseqüências patológicas, tais como anemia (Goering, 1993). Além da redução na síntese do heme, a inibição desta enzima pode resultar no acúmulo do substrato ALA no sangue, com conseqüente aumento na excreção urinária do mesmo. O acúmulo de ALA pode estar relacionado com a superprodução de espécies reativas de oxigênio (Pereira et al., 1992; Bechara et al., 1993).

Em patologias humanas, tais como câncer (Gonçalves et al, 2005); diabetes (Fernandez-Cuartero et al, 1999) e insuficiência renal crônica (Fontanellas et al, 2002) são relatadas diminuições de atividade da ALA-D, ao mesmo tempo em que ocorrem danos oxidativos.

## 2.7 Antioxidantes

Para se proteger dos danos oxidativos causados pelo estresse oxidativo, o organismo dispõe de um elaborado sistema de defesa antioxidante constituído por enzimas como catalase, superóxido dismutase, glutatona peroxidase, e numerosos antioxidantes não enzimáticos endógenos como a GSH e ubiquinona e micronutrientes como as vitaminas A, C, E, e flavonóides (Mayne, 2003; Urso e Clarkson, 2003).

Por definição, uma substância antioxidante é aquela capaz de diminuir ou inibir a oxidação. Mesmo presente em baixas concentrações em relação a seu substrato. Desta forma, estes compostos protegem os sistemas biológicos contra os efeitos deletérios dos processos ou das reações que levam à oxidação de

macromoléculas ou estruturas celulares. Isto implica que os diferentes antioxidantes podem atuar em níveis e com modo de ação distintos. Os antioxidantes podem, teoricamente, prolongar a fase de iniciação ou então inibir a fase de propagação, mas não podem prevenir completamente a oxidação (Jordão Jr. et al., 1998).

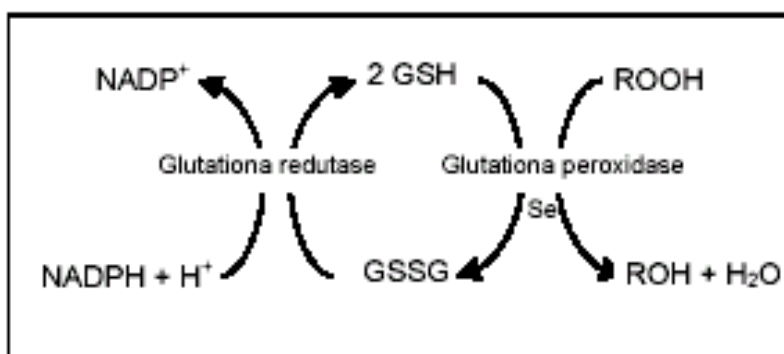
Durante o envelhecimento, e em casos de doenças associadas ao estresse oxidativo, os antioxidantes, principalmente os exógenos são consumidos e podem se apresentar abaixo dos níveis normais (Polidori, 2003). Isto constitui uma preocupação, visto que, antioxidantes podem prevenir a perda de memória e o déficit cognitivo associado com a idade. Isto é confirmado por dados experimentais e clínicos que sugerem um possível papel dos antioxidantes no retardo de desordens cognitivas como demência vascular e doença de Alzheimer (Meydani, 2001).

### 2.7.1 Glutathiona reduzida (GSH)

A glutathiona é um tripeptídeo, L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinil-glicina. Além de ser o principal tiol não-protéico intracelular livre, encontrado em vários tecidos biológicos, é também, o principal antioxidante endógeno (Nozal et al., 1997) sendo considerada um antioxidante multifatorial (Cecconi et al., 1988). Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento -SH, presente em sua molécula. Dentre outras funções fisiológicas, ela é seqüestradora de radicais livres (Nozal et al., 1997), detoxificando metabólitos eletrofílicos, não somente como doador imediato de elétrons para neutralizar o  $H_2O_2$  e lipoperóxidos, mas também como um seqüestrador de RLs de oxigênio e nitrogênio (Leichtweis e Ji, 2001).

No sangue, 99,5% da glutathiona se encontra no interior dos eritrócitos e uma pequena quantidade está associada às membranas destes (Mills e Lang, 1996). Embora presente em várias formas: reduzida (GSH), oxidada (GSSG) e ligada às proteínas (PSSG), a GSH é a forma mais abundante (Nozal et al, 1997).

A figura 3 mostra o sistema glutathiona e a interconversão nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), e o papel das enzimas glutathiona peroxidase (GSHPx) e glutathiona redutase (GR).



**Figura 3** Sistema antioxidante da glutatona e suas enzimas envolvidas (Sies et al., 1972).

O núcleo do resíduo cistenilglicina da glutatona está envolvido na sua função como antioxidante, mais especificamente como um redutor intracelular, sendo capaz, por exemplo, de reagir com um elétron não pareado de um radical livre, formando um radical GS<sup>•</sup>, que produz, por dimerização, o GSSG (glutatona oxidada). A redução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e peróxidos orgânicos a seus álcoois correspondentes com a conversão de GSH em GSSG é catalisada pela enzima GSHPx dependendo essencialmente da presença de selênio. A GSSG é, então, reduzida pela GR, regenerando a GSH, num processo à custa de NADPH (Shan et al, 1990; Jordão Jr. et al., 1998).

### 2.7.2 Vitamina C

A vitamina C (ascorbato) é um nutriente hidrossolúvel encontrado primariamente em frutas e vegetais (Mayne, 2003) e exerce ação protetora sobre componentes hidrossolúveis do organismo (Benzie e Strain, 1999),

Age diretamente sobre os RLs de oxigênio e do óxido nítrico e está envolvida na regeneração de  $\alpha$ -tocoferil em  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) (Chan, 1993). Também possui habilidade de eliminar o ácido hipocloroso, um agente igualmente envolvido em processos de estresse (Fumeron et al.; 2005). A vitamina C interage com as EROS na fase aquosa do plasma antes que eles possam agir oxidativamente sobre os lipídios e lipoproteínas.

Alguns autores enfatizam a importância da vitamina C como antioxidante em situações de estresse oxidativo vinculado a danos neurológicos (Polidori, 2003). Estudos clássicos mostram que em condições de estresse oxidativo, até que toda a

vitamina C seja consumida, não ocorrem perdas significantes de outros antioxidantes, nem aumento da lipoperoxidação em plasma humano (Frei et al, 1988).

A atividade biológica da vitamina C não se restringe apenas ao seu efeito antioxidante, já que ela participa em reações de hidroxilação e está envolvida com a síntese de colágeno, podendo desempenhar um importante papel na prevenção de úlceras de pressão em idosos (Yu et al, 1998).

### 2.7.3 Vitamina E

Vitamina E é uma descrição genérica para quatro diferentes tocoferóis e quatro diferentes tocotrienóis. A forma predominante no plasma e que apresenta atividade biológica é o  $\alpha$ -tocoferol (Mayne, 2003).

A vitamina E apresenta ação antioxidante, convertendo radicais hidroxila e superóxido em formas menos ativas, e pode ser regenerada por mecanismos não enzimáticos, pela vitamina C, e por mecanismos enzimáticos, pela GSH. Como possui alta lipossolubilidade, distribui-se pelas membranas lipídicas, constituindo-se na principal defesa das mesmas contra as lesões oxidativas (Chan, 1993).

Estudos apontam a vitamina E como o mais importante antioxidante endógeno para a lipoproteína de baixa densidade (LDL) (Stampfer e Rimm, 1995; Bonithon-Kopp et al., 1997) e, quando há depleção de antioxidantes na molécula de colesterol LDL, ocorre peroxidação lipídica em cadeia, de modo que, a presença de antioxidantes nessa lipoproteína retarda o início deste processo (Mosca et al., 1997). Sua deficiência tem sido associada a um aumento da viscosidade das plaquetas do sangue, predispondo à formação de coágulos potencialmente fatais (Stampfer e Rimm, 1995; Bonithon-Kopp et al., 1997).

Assim, a vitamina E previne doenças ateroscleróticas não somente por seu efeito antioxidante, mas também por seu efeito inibidor sobre a proliferação de células de músculo liso e sobre a adesão e agregação plaquetária (Harris et al., 2002). Além disso, ela tem efeito modulador sobre as respostas inflamatória e imune. Em geral, sua deficiência aumenta os componentes da resposta inflamatória e prejudica a imunidade celular e humoral (Chan, 1993). Experimentos com animais mostraram que a suplementação com vitamina E aumenta a resistência contra infecções e recentes experiências clínicas também sugerem que a vitamina E reduz



o risco de infecções respiratórias, particularmente comuns em idosos (Meydani, 2005).

## **2.8 Carência nutricional, envelhecimento e doenças crônicas**

Os idosos constituem um dos grupos populacionais mais suscetíveis a problemas nutricionais entre eles, as deficiências vitamínicas (Stabler et al, 1997).

As mudanças anatômicas e funcionais próprias do envelhecimento levam a uma maior suscetibilidade deste grupo a estados de carência nutricional (Selhub et al, 2000; Kwan et al, 2002).

### **2.8.1 Deficiência de vitamina B12 e folatos**

À medida que a idade avança ocorrem modificações de apetite e aumentam os casos de gastrite atrófica. Estima-se que esta atrofia gástrica afete de 10 a 30% dos indivíduos com mais de 65 anos de idade, cursando com quadros de hipocloridria/acloridria, processos estes que diminuem a biodisponibilidade de vitamina B12 e limitam a absorção intestinal de ácido fólico (Selhub et al., 2000; Kwan et al., 2002). Além disso, devem-se considerar os malefícios do uso de grandes quantidades de medicamentos nesta faixa etária (Wolters et al., 2004).

A carência de nutrientes tem sido apontada como causa contribuinte de diversas doenças crônicas degenerativas. Estudos mostram uma prevalência elevada da deficiência de folatos e de vitamina B12 em idosos, sendo mais frequentes naqueles institucionalizados (Essama-Tjani et al., 2000).

A deficiência assintomática de vitamina B12 pode ocorrer por longos períodos antes do aparecimento de qualquer sinal ou sintoma clínico (Carmel, 2002), desencadeando uma deficiência crônica dessa vitamina que, uma vez mantida durante anos, pode levar a manifestações neuropsiquiátricas irreversíveis (Andres et al., 2004).

As manifestações neurológicas devem-se a danos progressivos do sistema nervoso central e periférico (Ulleland et al., 2002) e, tipicamente, manifestam-se com polineurites, principalmente sensoriais nas extremidades distais, ataxia e reflexo de Babinski (Andrés et al., 2004). Além disso, são comuns relatos de déficit de memó-

ria, disfunções cognitivas, demência (Savage e Lindenbaum, 1995; Carmel et al., 2003) e transtornos depressivos (Penninx et al., 2000).

A deficiência de folatos é a principal causa de anemia megaloblástica (Chandra et al., 2002) e, além disto, esta vitamina é muito importante para o sistema nervoso em todas as idades. No idoso, a deficiência contribui para processos de envelhecimento do cérebro, aumento do risco de doença da Alzheimer e demência vascular (Reynolds, 2002; Quadri et al., 2004) com aparecimento de déficit cognitivo (Reynolds, 2002).

Ambas as vitaminas, quando em baixos níveis, podem ocasionar transtornos hematológicos, neurológicos e cardiovasculares (Andrés et al., 2004) por serem necessárias às reações de metilação do organismo e devido as suas influências no metabolismo da homocisteína (Hcy) (Venâncio et al., 2004), um aminoácido formado exclusivamente a partir da desmetilação da metionina proveniente da dieta ou de seu catabolismo (Neves et al, 2001). A Hcy requer folatos como doador de grupamentos metil, tendo a vitamina B12 como cofator para que possa ser remetilada à metionina e não se acumule. Assim, a deficiência destas duas vitaminas levará a uma hiperhomocisteinemia (HHcy), que está associada com a doença vascular prematura em adultos (Venâncio et al., 2004). A HHcy é ainda proposta como a explicação metabólica para a freqüente coexistência de HHcy e dano vascular e degenerativo cerebral (Gallucci et al., 2004) e, é considerada como um fator de risco para demência (Herrmann e Geisel, 2002) e transtornos depressivos (Coppen e Bolander-Gouaille, 2005). Estudos *in vitro* e em animais sugerem que a HHcy não apenas lesa o endotélio vascular, levando à aterosclerose e ao tromboembolismo (Welch e Loscalzo, 1998), mas também promove a síntese de várias citocinas pró-inflamatórias na parede arterial (Hofmann et al., 2001), sendo desta forma, considerada por muitos como um fator independente de risco cardiovascular (Herrmann e Geisel, 2002; Carmel et al, 2003) e de danos neuronais (Carmel et al., 2003; Gallucci et al., 2004).

A HHcy tem sido considerada como um fator de risco para disfunções cognitivas, incluindo doença de Alzheimer, demência e infartos cerebrais (Quadri et al., 2004) e está associada também com o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio, da peroxidação lipídica e do dano tecidual do endotélio vascular (Splaver et al., 2004). O sistema nervoso central é particularmente vulnerável a

peroxidação lipídica, devido ao seu alto conteúdo lipídico incluindo ácidos graxos polinsaturados, alvos principais das espécies reativas de oxigênio (Grundman, 2000). Além disso, a Hcy também pode ativar receptores glutamatérgicos (Lazarewicz et al, 2003) e promover apoptose através de rupturas no DNA devido à interferência nas reações de transmetilação (Sachdev, 2005), acelerando a neurodegeneração (Nourhashemi, 2000).

### 2.8.2 A anemia no idoso

De acordo com critérios da OMS, anemia ocorre quando a concentração de hemoglobina está abaixo de 12 g/dl para mulheres e abaixo de 13 g/dl para homens.

Mesmo não sendo consequência do processo de envelhecimento, a anemia é um achado freqüente na população idosa. Deve-se ter em mente que, devido à perda gradativa das reservas orgânicas, a hematopoiese se mantém inalterada desde que o indivíduo não apresente qualquer distúrbio ou doença concomitante. Deste modo, a anemia no idoso, assim como em qualquer idade é consequência de algum distúrbio subjacente (Macedo, 2002). No entanto, em idosos é mais freqüente a anemia de doença crônica, como parte de reações de fase aguda/crônica que organismo desencadeia frente a estados inflamatórios, infecciosos, entre outros (Olivares et al., 2000). Embora não seja resultado do envelhecimento *per se*, segundo Penninx et al. (2006), a anemia é significativamente associada com maior risco de morte e de hospitalização entre idosos.

A anemia também pode estar relacionada ao estresse oxidativo, pois o ambiente mais oxidante favorece a formação de pontes dissulfeto (-SS-) nas proteínas contendo grupamentos tióis (-SH). As pontes dissulfeto oxidam estas proteínas, com prejuízo de suas funções. Esta oxidação é reversível à custa da ação de compostos antioxidantes, como a GSH. A membrana do eritrócito contém grande número de grupos -SH que podem ser oxidados a dissulfetos (de R-SH a R-SSG), levando à desnaturação das proteínas da membrana (Gilbert e Mc Lean., 1990). Neste processo pode ocorrer lesão intracelular, com oxidação da hemoglobina a metemoglobina, que precipita e forma os corpúsculos de Heinz. O componente

lipídico da membrana eritrocitária também está sujeito à agressão oxidativa (Winterbourn, 1990).

### 2.8.3 Avaliação nutricional no idoso

A população idosa é particularmente propensa a problemas nutricionais devido a fatores relacionados com as alterações fisiológicas e sociais, ocorrência de doença crônica, uso de várias medicações, problemas na alimentação (comprometendo a mastigação e deglutição), depressão e alterações da mobilidade com dependência funcional (Beck et al., 1999; Jensen et al., 2001). Existem evidências que cerca de 70% dos idosos institucionalizados ingerem dieta deficiente em energia e fibras (Stiles et al., 1996).

Alguns autores consideram que a desnutrição pode ser difícil de distinguir das alterações resultantes do processo natural do envelhecimento (Beck et al., 1999; Sacks et al., 2000), porém se não for detectada, pode resultar em agravamento de condições clínicas e aumento da mortalidade (Beck et al., 1999). Pode-se afirmar que a má nutrição do idoso se correlaciona, positivamente e independentemente, com períodos de internações mais longos e maior mortalidade (Incalzi et al., 1996), além de estar relacionada com queda nas defesas imunológicas e pior qualidade de vida e comprometimento do estado geral do idoso (Sacks et al., 2000).

A determinação do diagnóstico nutricional e a identificação dos fatores que contribuem para tal diagnóstico no indivíduo idoso são processos fundamentais, mas complexos (Sampaio, 2004).

Dentre os diversos métodos usados para a avaliação nutricional, o Índice de Massa Corporal (IMC) é o método mais usado para rastreamento de alterações do estado nutricional entre idosos (Campos et al., 2006). Em idosos, o IMC, além de prever mortalidade e morbidade, está associado com capacidade para viver de forma independente, com mobilidade e preservação do estado mental (WHO, 1995).

Além disso, vários exames bioquímicos são usados como medidas mais objetivas do estado nutricional, usados para detectar deficiências subclínicas e para confirmação diagnóstica entre os quais se destacam as dosagens de proteínas séricas, principalmente a albumina. Os níveis séricos de albumina são fortemente relacionados com aumentos na morbidade (tempo de internação prolongado, cicatrização deficiente de feridas) e da mortalidade (Acuña e Cruz, 2004).

## 2.9 O envelhecimento em nosso meio

O envelhecimento populacional foi inicialmente observado em países desenvolvidos, mas, mais recentemente, é nos países em desenvolvimento que a população idosa tem aumentado de forma mais rápida (Costa et al, 2000).

Diferentemente da velocidade com que os países desenvolvidos adaptaram-se a esta mudança demográfica, no Brasil a população tornou-se idosa repentinamente à custa de avanços na medicina (Suzuki, 2003). Toda essa modificação no perfil populacional está fazendo com que o sistema de saúde brasileiro precise sofrer adaptações num período de tempo muito menor do que o disposto pelo sistema de saúde de outros países (Chaimowics, 1997).

No Rio Grande do Sul, o envelhecimento populacional é mais evidente devido às melhores condições sociais, sanitárias e econômicas. Estima-se que, atualmente, o Rio Grande do Sul ocupe a segunda posição no país em proporção de idosos. Em Santa Maria, a proporção é ainda maior, conforme a tabela 2.

Além disso, a existência de importantes desigualdades regionais e sociais tem acarretado uma maior complexidade na atenção que deve ser prestada a essa nova estrutura etária populacional, ainda não existindo um apoio adequado do sistema de saúde e previdência.

**Tabela 2** – Distribuição da população idosa em nível nacional, estadual e municipal

	<b>População Total</b>	<b>População de idosos</b>	<b>% de idosos</b>
<b>Brasil</b>	189.335.187	15.955.579	8,43
<b>RS</b>	11.080.322	1.147.481	10,35
<b>Santa Maria</b>	274.070	29.726	10,80

Fonte: [www.datasus.gov.br](http://www.datasus.gov.br), acessado em 28/02/07.

## 2.10 O idoso institucionalizado

É relevante destacar que com o processo de envelhecimento vão se acentuando algumas perdas físicas, psicológicas e sociais, que às vezes podem ser profundas e irreversíveis. Nessa situação, o idoso inicia a transição dos limites da autonomia e começa a tomar-se dependente. É escasso o suporte social oferecido

às pessoas com perda de saúde física e psíquica. A proposta que a sociedade apresenta para esses idosos restringe-se, quase que exclusivamente, à institucionalização. Nesse contexto, o idoso choca-se com uma realidade nova e ambígua à qual ele se submete, com expectativas, medos e ansiedades, devido a suas perdas, o que o torna cada dia mais dependente de cuidados.

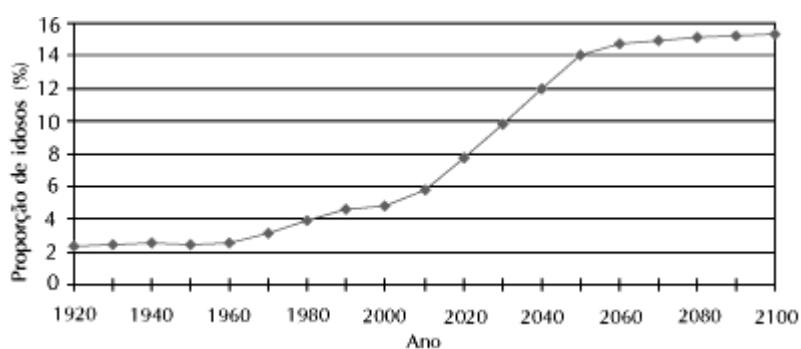
A internação do idoso em uma instituição de longa permanência é uma alternativa em certas situações: necessidade de reabilitação intensiva no período entre a alta hospitalar e o retorno ao domicílio, ausência temporária do cuidador domiciliar, estágios terminais de doenças e níveis de dependência muito elevados. Tal subjetividade transforma a decisão de internar numa função da disponibilidade da assistência domiciliar provida pelo tripé família-Estado-sociedade. A internação definitiva de idosos com baixos níveis de dependência é o paradigma de um modelo anacrônico de assistência já abandonado em diversos países, e em muito similar ao tratamento psiquiátrico baseado no modelo manicomial (Chaimowics e Greco, 1999).

A transferência do próprio lar para uma instituição de longa permanência (ILP) é sempre um grande desafio para os idosos, pois se deparam com uma transformação, muitas vezes, radical do seu estilo de vida, sendo desviados de todo seu projeto existencial. Muitos idosos encaram o processo de institucionalização como perda de liberdade, abandono pelos filhos, aproximação da morte, além da ansiedade quanto à condução do tratamento pelos funcionários. Contudo, não devemos esquecer que, muitas vezes, essa ILP cumpre papel de abrigo para o idoso excluído da sociedade e da família, abandonado e sem um lar fixo, podendo se tornar o único ponto de referência para uma vida e um envelhecimento dignos (Bulla et al., 2007).

No Brasil, não há uma estimativa precisa sobre a quantidade de idosos residentes em instituições asilares. No entanto, as estimativas apontam para uma demanda ainda maior por asilos no futuro próximo; a fase de crescimento rápido da proporção de idosos no Brasil deverá se iniciar por volta de 2010 (Figura 4). Como em outros países, o crescimento maior deverá ser o do grupo etário com 75 anos ou mais (Chaimowics e Greco, 1999). Nos Estados Unidos, cerca de 5% dos idosos residem em abrigos que oferecem serviços de saúde, lazer e assistência social. Na Inglaterra, a frequência de institucionalizações é minimizada por meio do atendimento em hospitais-dia, com assistência multidisciplinar à saúde, oferecida a essa população, principalmente na área da reabilitação, e elas prestam-se, em

grande parte, para "aliviar" o trabalho extra dos familiares de idosos dependentes (Chaimowicz, 1998 apud Davin et al, 2004).

Entretanto, no Brasil, pensadas como cenários de cuidados, as ILP ainda constituem um desafio, principalmente se contrastadas com a proposta de direito à individualidade, muitas vezes interdito neste contexto (Freire Jr. e Tavares, 2004/2005). No entanto, muitas instituições vêm se adequando, com a inserção de profissionais multidisciplinares, oferecendo melhor suporte aos cuidados de saúde para os idosos institucionalizados.



**Figura 4** Proporção de idosos na população brasileira entre 1920 e 2100 (adaptada de Machado, 1993 apud Chaimowics e Greco, 1999).

### **3 ARTIGO CIENTÍFICO**

#### **3.1 Manuscrito I**

##### **Blood evaluation of micronutrient and oxidative stress levels in institutionalized elderly**

Manuscrito submetido à Revista *“The Journal of Nutritional Biochemistry”*

#### ***Objetivos***

Verificar os níveis de alguns micronutrientes antioxidantes e de marcadores do estresse oxidativo em idosas institucionalizadas em asilos públicos da cidade de Santa Maria – RS, comparadas com idosas não institucionalizadas.

Verificar o estado nutricional através do Índice de Massa Corporal e albumina; o perfil lipídico e anemia em idosas institucionalizadas comparadas às não-institucionalizadas.

Verificar as possíveis correlações entre os marcadores do estresse oxidativo e os níveis sanguíneos de micronutrientes.



**Blood evaluation of micronutrient and oxidative stress levels in  
institutionalized elderly**

Clóvis Paniz<sup>1</sup>, Juliana Valentini<sup>2</sup>, Denise Grotto<sup>2</sup>, Rachel Bulcão<sup>3</sup>, Angela Moro<sup>3</sup>, Marieli  
Charão<sup>3</sup>, Silvana Boeira<sup>3</sup>, Tilman Grune<sup>4</sup>, Solange Cristina Garcia<sup>3\*</sup>

\*Direct correspondence to PhD Solange Cristina Garcia.

Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário

Caixa Postal 5061, CEP 97110-970, Santa Maria (RS), Brazil.

Tel.: +55 55 3220 8941; fax +55 55 3220 8018.

*E-mail adress:* sgarpom@smail.ufsm.br (S.C. Garcia).

<sup>1</sup>Post-graduate Program on Biochemical Toxicology, Center of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil;

<sup>2</sup>Post-graduate Program on Pharmaceutical Sciences, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>3</sup>Laboratory of Toxicology (LATOX), Department of Clinical and Toxicology Analysis, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>4</sup>Institute of Biological Chemistry and Nutrition, University of Hohenheim, Garbenstraße, Stuttgart, Germany.

Micronutritional and oxidative stress in elderly

Work supported by CNPq (grant 402243/2005-6 to S.C. Garcia)

Key-words: Healthy elderly; vitamin C; vitamin E; albumin; MDA; ALA-D.

## ABSTRACT

The average life expectancy is continually increasing and it is important to investigate and understand the inevitable physiological changes accompanying the aging process. There is little information, however, about how are the oxidative stress parameters in healthy elderly. Understanding the profile of antioxidants and oxidative markers in biological fluids may be helpful in assessing oxidative stress in elderly humans, especially in those who are institutionalised. In this study, the following parameters were analyzed in women either non-institutionalized (n= 22) or from a public retirement home (n= 45): vitamin C, E, reduced glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), protein carbonyls (PCO),  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase (ALA-D), albumin and hemoglobin. The results of vitamin C and E were similar to the others reported, but in non-institutionalized women vitamin C levels were found to be better than those of vitamin E. GSH and PCO did not show significant differences while MDA and ALA-D were increased significantly in non-institutionalized women. Moreover, positive correlations were found between vitamin C and ALA-D, albumin and hemoglobin. A negative correlation was found between vitamin E and both PCO and MDA as well as between PCO and ALA-D and between ALA-D and age. Considering these results, could be suggested that vitamin C levels tend to protect blood proteins such as the thiol ALA-D enzyme while decreased levels of vitamin E tend to increase the PCO and MDA levels. Moreover, in this study, a blood ALA-D activity may be helpful for oxidative stress evaluation as an additional marker of oxidation.

## 1. Introduction

The aging population is a global concern and has been the root of much discussion in the last decade. The estimation, considering the world-wide population, is that the number of people with 60 years old or more will increase by more than 300% in the next 50 years, from 609 million in the year 2000 to almost two billion in 2050. Therefore, aging has become an important social issue and public health concern [1].

In South America, and more specifically in Brazil, the increase in the elderly population, between 2000 and 2050, will be greater than 400%. According to United Nations (UN) data, it will increase from 14 million in 2000 to more than 63 million in 2050 [2].

In the elderly, the occurrence of chronic diseases, such as neurological and cardiovascular diseases, is one of the main causes in the development of incapacity associated with the aging process [3].

There is evidence indicating oxidative stress as an important factor in the development of the human aging process and of age-associated pathological changes, especially chronic ones [4,5,6].

The imbalance between reactive oxygen species (ROS) production and antioxidant defenses determines the degree of oxidative stress [4]. When there is an increase in ROS production or a decrease of antioxidant defenses, this systemic antioxidant/pro-oxidant imbalance will lead to the accumulation of oxidative damage, which in turn may lead to a modification of cellular proteins, lipids and DNA, reduce functional capacity and increase the risk of disease [4,7].

However, to protect the human organism from oxidative damage caused by free radicals and reactive species, the organism possesses an elaborate antioxidant defense system consisting of enzymes such as catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and

numerous non-enzymatic antioxidants, including glutathione, vitamins A, E and C, ubiquinone, and flavonoids [8].

Although there is evidence of the effects of oxidative stress on the aging process, such as in the development of chronic pathologies, there are few studies that delineate oxidative stress and micronutritional biomarker levels in healthy elderly people.

For these reasons, in this study, we measured levels of some of the most important components of the antioxidant defense system of the organism, such as serum vitamin C, E and folate, as well as, GSH in red blood cells. Moreover, biomarkers of the oxidant status in lipids and protein such as MDA, PCO and, also a possible marker, ALA-D, were analyzed. Finally, the elderly institutionalized women were compared with the non-institutionalized women and oxidative stress and micronutritional status was performed in the healthy elderly women.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1 Group selection*

A total of 45 women institutionalized in public retirement home (mean  $71 \pm 6$  years) and 22 non-institutionalized women ( $68 \pm 6$  years) participated in this study. All were from Santa Maria, in Brazil.

Patients with congenital neurological or psychiatric pathologies were excluded, as well as those that presented acquired serious neurological or psychiatric pathologies, metabolic diseases, acute diseases or serious chronic diseases. None of the subjects studied was taking antioxidant supplementations (vitamins or minerals) and all participants were non smokers.

The study was approved by the committee of ethics in research of the Federal University of Santa Maria – RS and informed consent was required from all participants, according to the guidelines of the local ethics committee (131/06).

## 2.2 Sample collection

From all subjects, 10 ml blood sample was collected with and without anticoagulant and stored on ice. After the collections, the blood was centrifuged at 1500 g for 10 min at 4°C, the plasma was used to determine MDA and the erythrocytes were used for GSH measurement. For ALA-D activity, whole blood was used. For vitamins C and E, folate, PCO and the lipid profile, the blood was collected without anticoagulant and centrifuged at 1500 g for 10 min at room temperature. The serum was separately stored in eppendorf tubes and kept at – 20°C until analysis. Plasma MDA, serum vitamin C and GSH in RBC were all processed immediately.

## 2.3 Plasmatic vitamin C quantification

Vitamin C analysis it followed the method described by Lloyd et al, with modifications [9]. The samples were desproteinized with trichloroacetic acid (TCA) 15%, using 400 µl of sample and 800 µl of TCA 15%, vortex-mixed for 15 s and centrifuged at 1800 g for 15 min. Then, it was removed 400 µl of supernatant for other tube and added 120 µl of DTC (solution of 5 ml of 2,4 dinitrophenylhydrazine 20mg/ml or 0,1 mol/l in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4.5 M; 0.25 ml of thiourea 50 mg/ml or 0.66 mol/l; 0.25 ml of cupric sulfate 6 mg/ml or 0.027 mol/l), vortex-mixed for 10 s, closed the tube with filmed paper and was lead to the bath 60°C for 60 min. After, put in ice bath for 10 min. Finished this time, it was added 600 µl of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 12 M. Vortex-mixed for 10 s. Then, the samples were determined in spectrophotometer in 520 nm. All samples were measurement in duplicate. It was used calibration curves with L(+)-ascorbic acid (Vetec Química Fina Ltda) to determine the concentration, following the same procedure of the samples.

#### *2.4 Serum vitamin E quantification*

The serum vitamin E was determined by technique from Hansen & Warwick, modified [10]. In a tube with cover was added 140  $\mu$ l of Milli-Q water (Millipore, Bedford, MA, USA), 20  $\mu$ L of butylated hydroxytoluene 10 mM (BHT), 140  $\mu$ l of sample and 2100  $\mu$ l of ethanol solution 66%. After this, it was vortex-mixed for 10 s and added 3500  $\mu$ l of n-hexane and vortex-mixed for 1 min. After, it was centrifuged at 1800 g for 10 min. Then, it was transferred 3 ml of superior phase to fluorimeter cuvettes and the vitamin E was measured in fluorimeter: excitement: 295 nm; emission: 340 nm. All samples were analyzed in duplicate. It was used calibration curves with  $\alpha$ -tocopherol (Sigma-Aldrich Inc.) to determine the concentration, following the same procedure of the samples.

#### *2.5 Serum folate quantification*

Serum folate levels were measured by chemiluminescent immunometric assay, using commercial kits (Roche Diagnostics Co).

#### *2.6 Erythrocytes reduced glutathione quantification*

The levels of reduced glutathione in RBC were measured by high performance liquid chromatography (HPLC), a method development by our laboratory. The chromatographic equipment consisted of a gradient chromatography system Knauer® apparatus, WellChrom model, equipped with a quaternary pump, reservoir for solvents, dynamic mixer, an online vacuum solvent degasser with four canals, manual injector with loop of 20  $\mu$ l and UV-VIS detector. Chromatographic control, data collection and processing were carried out using EUROCHROM 2000 SOFTWARE®, basic edition, 2.05 for Windows.

The separation was achieved using a reverse-phase column: Eurospher-100 150 x 4 mm with 5 µm particle size and a guard column Eurospher-100 5 x 4 mm with 5 µm particle size.

The mobile phase was a mixture of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 3.8, 2.5 mM) and methanol with gradient elution. The absorbance of the eluent was monitored at 330 nm and the total run time was 25 min. The column was thermostated at 40°C in a thermostatisation system for chromatographic columns (Chromacon®).

After centrifugation, the erythrocytes had been separate and 100 µl of it was added to 40 µl of EDTA solution. Then, the erythrocytes were hemolysated with 100 µl of Triton X-100 20% and after this, desproteinized with 100 µl of TCA 15%. The samples were kept in rest for 20 min and centrifuged for 30 min. After, 130 µl of acid supernatant was added to 500 µl of Tris-HCl buffer, pH 8.9, 350 µl of DTNB and 100 µl of Phosphoric Acid. After these procedures, the tubes were centrifuged for 10 min, and before the injection on chromatographic equipment each sample was filtered. The GSH levels in erythrocytes were calculated:  $\text{GSH levels} = \text{GSH mM} \times \text{hematocrite}$ . Thus, the natural effect of the hematocrite was considered.

### *2.7 Plasmatic MDA levels quantification*

Quantification of lipid peroxidation was realized through of the MDA measure by HPLC with Vis-detection by Grotto et al. [11]. This method analyzes the MDA levels with alkaline hydrolysis.

### *2.8 Serum carbonylation of proteins*

The carbonylation of serum proteins was determined by modifications of the Levine's method [12]. The serum total protein was determined and adjusted in 10 mg/ml with

destilated/deionized water. After, from 500  $\mu$ l of serum solution, the protein were precipitated using 250  $\mu$ l of 10% trichloroacetic acid (TCA) and centrifuged at 1500 g for 5 min, discarding the supernatant. Following, 250  $\mu$ l of 2,4-dinitrophenylhydrazine (10 mmol/l in 2 mol/l HCl) was put on this precipitated protein, vortex-mixed until being homogeneous and incubated at room temperature for 30 min. During the incubation time the samples were mixed vigorously every 15 min. After the incubation time, 0.5 ml of 10% TCA was added to the protein precipitated and centrifuged at 1500 g for 5 min. After discarding the supernatant, precipitates were washed twice with 1 ml of ethanol/ethylacetate (1:1), each time centrifuging out the supernatant in order to remove the free DNPH. The precipitate was dissolved in 1.5 ml of protein dissolving solution (2 g SDS and 50 mg EDTA in 100 ml 80 mmol/l phosphate buffer, pH 8.0) and incubated at 37°C water bath for 10 min. The color intensity of the supernatant was measured using spectrophotometer at 370 nm against 2 mol/l HCl. Carbonyl content was calculated by using molar extinction coefficient ( $21 \times 10^3$  l/mol cm) and results were expressed as nanomoles per milligram protein.

### *2.9 $\delta$ -aminolevulinate dehydratase activity*

The  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase activity was assayed in the total blood by the method of Sassa [13] with minor modifications by measuring the rate of porphobilinogen (PBG) formation in 1h at 37°C, in the presence and absence of the redactor agent dithiothreitol (DTT- 2 Mm final concentration). The enzyme reaction was initiated after 10 min of pre-incubation. The reaction was started by adding  $\delta$ -aminulevulinic acid (ALA) to a final concentration of 4 Mm in phosphate buffered solution at Ph 6.8, and incubation was carried out for 1h a 37°C and the reaction product was measured at 555 nm.



### 2.10 Nutritional status

The nutritional status was assessed from anthropometric, hematological and biochemical data. Measurements of the body mass index (BMI) calculated as weight divided by height squared ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) were utilized.

Also, the hemoglobin level was measured using an automatic Coulter STKS (Coulter Co, Miami, Florida) and serum albumin was determined by standard methods with commercial kits. Moreover, a questionnaire on physical activity was carried out.

### 2.11 Lipid profile

Serum total cholesterol and triglycerides were determined by standard methods with commercial kits.

### 2.12 Statistical analysis

The analysis of the data was performed using software SPSS v. 8.0 for *Windows* (SPSS Inc., Chicago, IL). *Student's t-test* was used to check significant differences by groups with variables normally distributed; when not, a non-parametrical *Mann-Whitney U-test* was performance. Correlation test were realized by the *Pearson* or *Spearman* correlation coefficient following the distribution of the variables. Values of  $p < 0.05$  were considered significant. All results were expressed as mean  $\pm$  standard error mean (SEM).

## 3. Results

The results for vitamin C, E and folate levels are shown in table 1. The reference values for vitamin C, considering the dinitrophenylhydrazine method, ranged from 23 to 85  $\mu\text{mol}/\text{l}$  for adults. Serum levels of less than 11  $\mu\text{mol}/\text{l}$  were considered deficient. For vitamin E, the adult reference values were from 11.6 to 41.8  $\mu\text{mol}/\text{l}$  [14]. Both parameters analyzed

presented levels at the normal range for adults. However, serum vitamin C levels were significantly increased in the non-institutionalized individuals when compared with the institutionalized individuals ( $p=0.002$ ), whereas the vitamin E levels were significantly decreased in the non-institutionalized subjects ( $p=0.014$ ).

Folate levels presented values within normal range (reference values 7.0-39.7 nmol/l) [15] in both groups, and did not present significant differences.

For GSH levels and PCO content, the groups did not present statistically significant differences. On the other hand, plasmatic MDA levels, such as the lipid peroxidation biomarker, were significantly increased in the non-institutionalized women ( $p=0.029$ ). The results are shown in table 2.

Table 3 shows the parameters obtained from the nutritional status. The BMI, the most used indicator to determine both the individual and collective nutritional status, was used to determine malnourished and overweight individuals [16]. Using the criterion from the World Health Organization [17], the subjects were considered malnourished if their BMI was less than 18.5, normal from 18.5 to 24.9 and overweight if the BMI was higher than 25. Thus, we found malnourishment only in 4.4% of the institutionalized subjects while none of the non-institutionalized subjects presented malnourishment. On the other hand, 42% and 81.8%, respectively, were overweight. The BMI was significantly decreased in the institutionalized women ( $p=0.005$ ). Serum albumin levels were found significantly increased in the non-institutionalized women ( $p<0.01$ ), in accordance with table 2.

Considering the definition of the WHO, normal values of hemoglobin are higher than 12 g/dl [18]. The results showed that 13.3% ( $n=6$ ) of the institutionalized women were anemic, whereas all of the non-institutionalized women were in the normal range. The hemoglobin levels were significantly decreased in the institutionalized women ( $p<0.04$ ) as is demonstrated in table 2.

The lipid profile showed non significant differences between the two groups studied, except for HDL, which presented significantly increased values in the non-institutionalized group when compared with the institutionalized group (table 3).

Another aspect verified was the possible correlation among the parameters analyzed. A positive correlation was found between vitamin C and albumin, between vitamin C and hemoglobin and between vitamin C and ALA-D activity, all of which are presented in figure 1. A negative correlation was found between Vitamin E and PCO and between vitamin E and MDA, as pointed out in figure 2 and between ALA-D and PCO and ALA-D and age, which are shown in figure 3.

#### **4. Discussion**

Since the fraction of elderly people within the population is constantly rising, it is important to investigate and understand the inevitable physiological changes that accompany the aging process. It is known that oxidative stress is considered to play a critical role in changes associated with senescence, especially with the pathogenesis of several age-related diseases; it is recognized that antioxidants are important anti-aging agents. In order to evaluate some important parameters of oxidative stress in healthy elderly, we measured biomarkers including nutritional antioxidants in aged women with different physical routines and diets. For this reason we chose both elderly from a public retirement home and those who are not institutionalized. In addition, a lipid profile was established.

Results of the micronutritional evaluation obtained through the quantification of vitamin C and E demonstrated that all the elderly women were within the normal range established for adults.

In another study with elderly subjects (age of 71.5 years), vitamin C and E levels were found to be  $52.9 \pm 3.0$  and  $46.7 \pm 1.4$   $\mu\text{mol/l}$ , respectively [19]. These results for vitamin C

levels were very similar to the institutionalized group in this study. Nevertheless, the non-institutionalized group presented higher levels. Results from the previous study for vitamin E levels presented relatively decreased levels for both groups when compared with the present study. On the other hand, vitamin E quantified by Huerta et al. in 123 elderly presented a mean value of 21.8  $\mu\text{mol/l}$  [1]. In this study, a strong and significant inverse association was found between vitamin E and mortality. Thus, antioxidant reference values for adults could not be considered as normal or ideal levels for elderly, as it is possible that these levels do not guarantee adequate antioxidants for this age group, being that the oxidative products may also be increased. Thus, an imbalance between the concentrations of oxidative products and antioxidant defences may be generated, which would contribute to pathological conditions as a response to the aging process.

Previous studies have shown that vitamin C and vitamin E are key antioxidants which, in humans, are obtained exclusively from the diet [20,21]. Vitamin C protects water-soluble components of the body, while vitamin E protects lipid components. There is evidence that these antioxidants interact *in vivo* [22], with vitamin C in the aqueous phase, sparing or recycling lipid-bound vitamin E [23].

The measurement of folate was carried out because homocysteine levels (a sulfur-containing amino acid derived from the demethylation of methionine) were especially dependent on this nutritional component, presenting an inverse relation [24]. Furthermore, an increase in the plasmatic homocysteine levels may lead to the production of powerful ROS and LDL oxidation [25]. Moreover, supplementation with folate also has an effect on intracellular GSH and plasmatic MDA and may be considered an effective antioxidant [26]. However, we found folate levels within the normal range in both groups.

In the last two years, the public retirement homes, it started to count with professional nutritionists; thus a control of the diet was established, increasing the amount of fruits and

vegetables in meals, which may have contributed to the normality of vitamin levels in the institutionalized group, especially the levels of vitamins C, E and folate. On the other hand, the non-institutionalized subjects are individuals with satisfactory financial conditions and a free diet.

GSH in its reduced form is accepted as the most important and representative intracellular antioxidant [27]. It can react with electrophilic or oxidizing species before the latter interacts with more critical cellular constituents such as nucleic acids and proteins [28]. Reduced GSH is usually located within the red blood cells while its concentration is low in extra cellular fluids [27]. On the other hand, MDA is a major product of the free radical attack on polyunsaturated fatty acids and it is widely used as a biomarker of lipid peroxidation [29] indicating the extent of cell membrane injury [30]. In addition, PCO is the most used biomarker for protein oxidative damage, and reflects the cellular damage induced by multiple forms of ROS [31,32].

The differences in the erythrocyte GSH concentration and in serum PCO content were not significant between the groups. However, MDA plasmatic levels of the institutionalized group showed a significant increase in relation to the non-institutionalized group.

ALA-D activity was significantly higher in the non-institutionalized women. ALA-D is an enzyme of the heme biosynthesis pathway, essential for all aerobic organisms. It is a zinc metalloenzyme that requires reduced thiol groups for its activity [33]. ALA-D has been suggested as a marker for oxidative stress because it is highly sensitive to –SH oxidation by pro-oxidant elements [34,35] leading to reduced enzyme activity [36]. ALA-D inhibition impairs heme biosynthesis and leads to the accumulation of its intermediates. One of them,  $\delta$ -aminolevulinic acid (ALA), has been shown to induce pro-oxidant events [37,38]. Nevertheless, this is the first time that ALA-D activity was evaluated in healthy elderly. The results

showed two interesting aspects: a positive correlation with serum vitamin C levels and a negative correlation with age and PCO.

It was observed that, in the non-institutionalized group, higher levels of vitamin C occurred as ALA-D activity increased. Thus, vitamin C, due to its hydrophilic character, may protect some circulating proteins in the blood. The vitamin C levels may have an influence on the albumin levels and ALA-D activity, probably preventing the oxidation of its thiol groups.

On the other hand, the increase of PCO was correlated with a decrease of ALA-D activity (figure 3A), showing that this enzyme could be utilized as an additional protein oxidation marker.

The two groups did not present a significant age difference. However, with aging there is a decrease of ALA-D activity, and this was demonstrated through the negative correlation between ALA-D and age (figure 3B). In opposition, GSH status did not present a correlation with age. Although it is known that GSH decreases with aging, this was not found in our study, probably due to the small age variation between both groups. Therefore, these results could suggest that ALA-D is more sensitive than GSH for evaluating the relation with aging.

The non-institutionalized group presented lower vitamin E levels and higher MDA levels, which may indicate a correlation, since vitamin E is a lipid-content vitamin with higher affinity for membrane lipids and could offer protection against the peroxidation attack, thus preventing an increase in MDA levels.

According to the nutritional status assessment, these values are in accordance with Penninx et al, whose study on anemia in the elderly population found 12.5% to be anemic [18]. Izaks et al., in a study with the elderly found that the mortality risk increased with lower hemoglobin concentrations. In the same study, anemia was also associated with a poor health status [39]. The low levels of hemoglobin were statistically significant in the institutionalized women in our study ( $p < 0.038$ ), as shown in table 3.

In relation to serum albumin, which is the main extra cellular antioxidant molecule acting via its thiol groups [40], the association between its plasma concentration or modification and mortality has been observed [41]. In our study, all subjects were within the normal range, but albumin levels were significantly decreased in the institutionalized women ( $p < 0.001$ ). Besides the possibility of malnourishment, this could also be due to undetected chronic disease, as previous reports have implied that hypoalbuminemia in the elderly may be attributed to acute or chronic disease rather than to age or malnutrition [42,43]. In addition, although the BMI was significantly increased in the non-institutionalized group ( $p < 0.001$ ), both groups were within the normal range, as pointed out in table 3.

The lipid profile showed that all the women presented levels within the reference level. Cholesterol levels presented a moderate risk for heart disease, although other parameters were considered normal. On the other hand, HDL was significantly increased in the non-institutionalized group. This could be explained because the non-institutionalized group practice regular physical exercise, such as walking, in their routine as compared to the sedentary women from the retirement home. This is in accordance with longitudinal data that support the hypothesis that low HDL-C levels might be considered as a marker for “ongoing” disability in basic activities of daily living [44].

Thus, the institutionalized group showed an inferior nutritional status, as well as decreased HDL levels when compared with the non-institutionalized group.

The results of the correlations demonstrated that vitamin C levels were associated with blood protein levels, particularly, with albumin and ALA-D, which may be associated with the protection of thiol groups. In this aspect, the non-institutionalized group demonstrated better results. As albumin, via its thiol groups, is the main extra cellular antioxidant molecule [40] and ALA-D is a thiol-dependent enzyme, these can better represent the circulating

oxidative status. Vitamin C, because it is a water-soluble vitamin, ends up playing a protective role against the oxidation of –SH groups in these proteins.

On the other hand, MDA levels were inversely correlated with vitamin E levels. Huerta et al., in a longitudinal study, found high MDA and low vitamin E levels associated with a significantly lower probability of survival compared with those with the inverse profile [1]. Utilizing the MDA/vitamin E relation, the criterion used in the above-mentioned study, to define a lower probability of survival, it was found in our study that the institutionalized group presented a better index, suggesting a lower risk of developing pathologies associated with oxidative stress and a possibly longer life expectancy. However, in accordance with our study, this parameter alone may be insufficient, because the non-institutionalized group presented better vitamin C, hemoglobin, albumin, ALA-D and HDL levels.

During aging and in oxidative stress-related disease states, antioxidant micronutrient levels may fall below normal ranges [45,46] or the levels established for adults may be insufficient for the necessities of the elderly. Thus, based on the results of the present study and others reported here, there is a need to utilize differentiated reference levels for elderly people for the evaluation of oxidative stress and micronutritional status, regardless of where they live.

In conclusion, the nutritional antioxidants such as vitamin C and E presented levels within the normal range for adults. Moreover, vitamin C levels presented correlation with the ALA-D activity, similar to the correlation obtained with albumin. Thus, vitamin C could protect some blood proteins from oxidation effects, especially those with thiol groups. Vitamin E levels may have an effect on MDA levels, protecting the lipid membrane from lipoperoxidation, and yet, on the carbonylation of the proteins. ALA-D was presented as a possible oxidative stress biomarker in elderly because it demonstrated correlation with PCO



and might be considered more specific than GSH for physiological alterations related to the aging process.

### **Acknowledgements**

Work supported by CNPq (grant 402243/2005-6 to S.C. Garcia) and DAAD (grant to S.C. Garcia). A. Moro and M. Charão are recipients of the CNPq and PIBIC Fellowships. S. Boeira is the recipient of the Fapergs Fellowship. D. Grotto is the recipient of Capes Master degree fellowship. S.C. Garcia is the recipient of CNPq Research Fellowship.

## References

- [1] Huerta JM, Gonzalez S, Fernández S, Patterson AM, Lasheras C. Lipid peroxidation, antioxidant status and survival in institutionalised elderly: A five-years longitudinal study. *Free Radic Res* 2006;40:571-78.
- [2] World Population Prospects: The 2004 Revision Population Database. UN home. Available in: <http://esa.un.org/unpp/index.asp?panel=2>. Access in: 20 dec 2006.
- [3] Rosa TEC, Benício MHD, Latorre MRDO, Ramos LR. Determinant factors of functional status among the elderly. *Rev Saúde Pública* 2003;37:40-8. Portuguese.
- [4] Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000;408:239-47.
- [5] Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci* 2000;899:136-47.
- [6] Beal MF. Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann Neurol* 1995;38:357-66.
- [7] Berr C, Richard MJ, Roussel AM, Bonithon-Kopp C. Systemic oxidative stress and cognitive performance in the population-based EVA study. *Free Radic Biol Med* 1998;24:1202-08.
- [8] Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology* 2003;189:41-54.
- [9] Lloyd B, Sinclair HM, Webster GR. The estimation of ascorbic acid for clinical purposes by the hydrazine method. *Biochem J* 1945;39:xvii.
- [10] Hansen LG, Warwick WJ. A fluorometric micromethod for serum vitamins A and E. *Am J Clin Pathol* 1969;51:538-41.

- [11] Grotto D, Santa Maria LD, Boeira S, Valentini J, Charão MF, Moro AM, et al. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. *J Pharm Biomed Anal* 2007;43:619-24.
- [12] Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990;186:464-78.
- [13] Sassa S.  $\delta$ -Aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme* 1982;28:133-45.
- [14] Burtis CA, Ashwood ER. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders; 1996 [p 801].
- [15] Kratz A, Lewandrowski KB. Normal Reference Laboratory Values. *New Eng J Med* 1998;339:1063-72.
- [16] Keller HH, Ostbye T. Body Mass Index (BMI), BMI change and mortality in community-dwelling seniors without dementia. *J Nutr Health Aging* 2005;9:316–20.
- [17] World Health Organization. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. *Expert. World Health Organ Tech Rep Ser* 1995;854:1-452.
- [18] Penninx BW, Pahor M, Woodman RC, Guralnik JM. Anemia in old age is associated with increased mortality and hospitalization. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2006;61:474-9.
- [19] Mecocci P, Polidori MC, Troiano L, Cherubini A, Cecchetti R, Pini G.. Plasma antioxidants and longevity: a study on healthy centenarians. *Free Radic Biol Med* 2000;28:1243-48.
- [20] Benzie IFF. Evolution of dietary antioxidants. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2003;136:113-26.
- [21] Levine M, Wang Y, Padayatty SJ, Morrow J. A new recommended dietary allowance of vitamin C for healthy young women. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9842-46.

- [22] Kagan VE, Serbinova EA, Forte T, Scita G, Packer L. Recycling of vitamin E in human low density lipoproteins. *J Lipid Res* 1992;33:385-97.
- [23] Benzie IFF, Strain JJ. Effect of vitamin C supplementation on plasma vitamin C and E levels. *Asian Pac J Clin Nutr* 1999;8:207-10.
- [24] Bunout D, Garrido A, Suazo M, Kauffman R, Venegas P, de la Maza P, et al. Effects of supplementation with folic acid and antioxidant vitamins on homocysteine levels and LDL oxidation in coronary patients. *Nutrition* 2000;16:107-10.
- [25] McCully KS. Chemical pathology of homocysteine. I. Atherogenesis. *Ann Clin Lab Sci* 1993;23:477-93.
- [26] Racek J, Rusnakova H, Trefil L, Siala KK. The influence of folate and antioxidants on homocysteine levels and oxidative stress in patients with hyperlipidemia and hyperhomocysteinemia. *Physiol Res* 2005;54:87-95.
- [27] Gil L, Siems W, Mazurek B, Gross J, Schroeder P, Voss P, et al. Age-associated analysis of oxidative stress parameters in human plasma and erythrocytes. *Free Radic Res* 2006;40:495-505.
- [28] Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, Casini AF. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol* 2003;66:1499-503.
- [29] Lasheras C, Huerta JM, Gonzalez S, Brana AF, Patterson AM, Fernandez S. Independent and interactive association of blood antioxidants and oxidative damage in elderly people. *Free Radic Res* 2002;36:875-82.
- [30] Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991;11:81-128.
- [31] Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med* 2006;10: 389-406.

- [32] Grune T, Shringarpure R, Sitte N, Davies KJA. Age related changes in protein oxidation and proteolysis in mammalian cells. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2001;56:B459-B467.
- [33] Fukuda H, Paredes S, Batlle AM. Active site histidine in pig liver aminolevulinic acid dehydratase modified by diethylpyrocarbonate and protected by  $Zn^{2+}$  ions. *Comp Biochem Physiol* 1998;1B:285-91.
- [34] Folmer V, Soares JCM, Rocha JBT. Oxidative stress in mice is dependent on the free glucose content in the diet. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34:1279-85.
- [35] Soares JCM, Folmer V, Rocha JBT. Influence of dietary selenium supplementation and exercise on thiol-containing enzymes in mice. *Nutrition* 2002;19:627-32.
- [36] Rocha JBT, Tuerlinckx SM, Schetinger MRC, Folmer V. Effects of group 13 metals on porphobilinogen synthase in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;200:169-76.
- [37] Bechara EJH, Medeiros MHG, Monteiro HP, Hermes-Lima M, Pereira B, Demasi M, et al. A free radical hypothesis of lead poisoning and inborn porphyries associated with 5-aminolevulinic acid overload. *Quim Nova* 1993;16:385-92.
- [38] Pereira B, Curi R, Kokubun E, Bechara EJ. 5-Aminolevulinic acid-induced alterations of oxidative metabolism in sedentary and exercise-trained rats. *J Appl Physiol* 1992;72:226-30.
- [39] Izaks GJ, Westendorp RGJ, Knook DL. The definition of anemia in older persons. *JAMA* 1999;281:1714-17.
- [40] Faure P, Troncy L, Lecomte M, Wiernsperger N, Lagarde M, Ruggiero D, et al. Albumin antioxidant capacity is modified by methylglyoxal. *Diabetes Metab* 2005;31:169-77.
- [41] Philips A, Shaper AG, Whincup PH. Association between serum albumin and mortality from cardiovascular disease, cancer and other causes. *Lancet* 1989;16:1434-6.
- [42] Fuhrman MP. The albumin-nutrition connection: separating myth from fact. *Nutrition* 2002;18:199-200.

- [43] Romagnoni F, Zuliani G, Bollini C, Leoci V, Soattin L, Dotto S, et al. Disability is associated with malnutrition in institutionalized elderly people. The I.R.A. study. Istituto di Riposo per Anziani. *Aging (Milano)* 1999;11:194-9.
- [44] Zuliani G, Romagnoni F, Bollini C, Leoci V, Soattin L, Fellin R. Low levels of high-density lipoprotein cholesterol are a marker of disability in the elderly. *Gerontology* 1999;45:317-22.
- [45] Meydani, M. Nutrition Interventions in Aging and Age-Associated Disease. *Ann N Y Acad Sci* 2001;928:226-35.
- [46] Richard MJ, Roussel AM. Micronutrients and ageing: intakes and requirements. *Proc Nutr Soc* 1999;58:573-8.

## Tables

Table 1. Results of the vitamin C, E and folate levels, represented as mean values  $\pm$  SEM.

Vitamine	Institutionalized	Not-Institutionalized
Vitamin C ( $\mu\text{mol/l}$ )	$53.86 \pm 3.90$	$75.69 \pm 6.22^{**}$
Vitamin E ( $\mu\text{mol/l}$ )	$29.87 \pm 1.27$	$23.75 \pm 1.99^{**}$
Folate (nmol/l)	$28.47 \pm 1.18$	$26.21 \pm 1.74$

\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

Table 2. Results of the GSH, PCO, MDA and ALA-D, represented as mean values  $\pm$  SEM.

Parameter	Institutionalized	Not-Institutionalized
GSH (mM)	$0.75 \pm 0.02$	$0.76 \pm 0.04$
PCO (nmol/l)	$0.75 \pm 0.03$	$0.73 \pm 0.06$
MDA ( $\mu\text{M}$ )	$4.43 \pm 0.12$	$4.89 \pm 0.17^*$
ALA-D ( $\text{U/l}^{-1}$ )	$11.32 \pm 0.48$	$14.4 \pm 0.94^*$

\* $p < 0.05$ .

Table 3. Results obtained of nutritional status evaluation represented as median values  $\pm$  SEM.

Parameter	Institutionalized	Not-Institutionalized	Reference interval
BMI ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	$25.7 \pm 0.98$	$27.8 \pm 0.67^{**}$	18.5-24.9
Hemoglobin (g/dl)	$13.0 \pm 0.23$	$13.7 \pm 0.19^{**}$	> 12
Albumin (g/dl)	$3.87 \pm 0.05$	$4.25 \pm 0.05^{**}$	3.2-4.6

\*\*p<0.01.

Table 4. Results expressed in mg/dl of lipid profile of the aged women and reference values following age and gender [14], represented as mean values  $\pm$  SEM.

Parameter	Institutionalized	Not-Institutionalized	Reference interval
Total cholesterol	$202.9 \pm 6.65$	$200.6 \pm 9.46$	171-303
HDL	$52.7 \pm 1.81$	$62.7 \pm 2.75^*$	35-96
LDL	$123.0 \pm 6.53$	$112.2 \pm 8.34$	92-221
Triglycerides	$135.9 \pm 10.00$	$128.5 \pm 10.68$	52-262

\*p<0.05.



## Figures

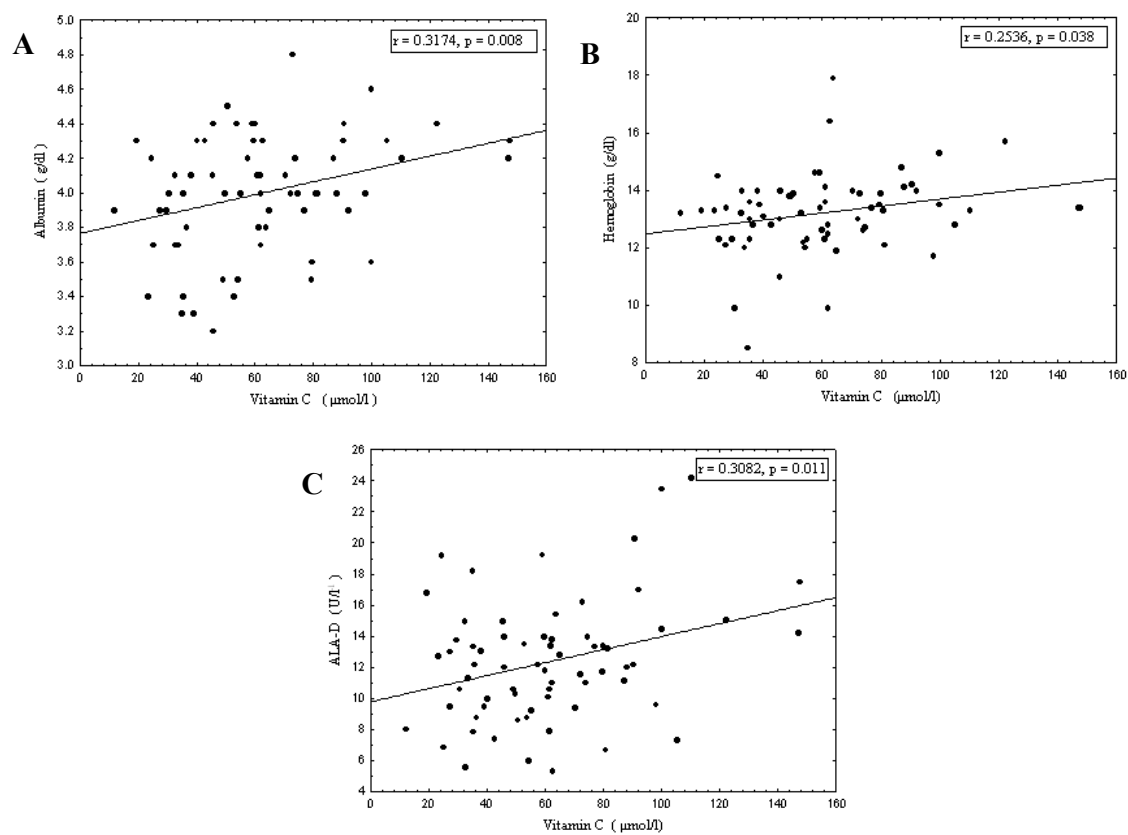


Figure 1. Pearson correlations between vitamin C vs albumin (A); vitamin C vs haemoglobin (B); and vitamin C vs ALA-D (C).

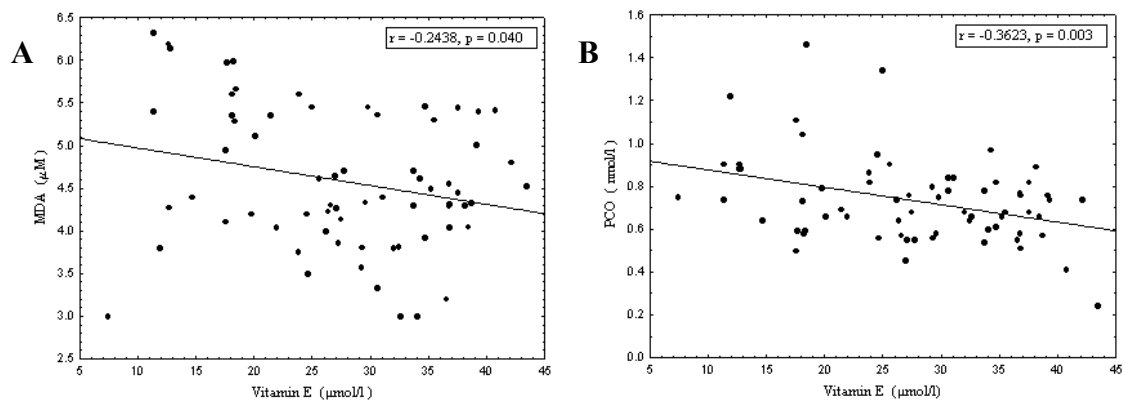


Figure 2. Pearson correlation between vitamin E vs MDA (A) and vitamin E vs PCO (B).

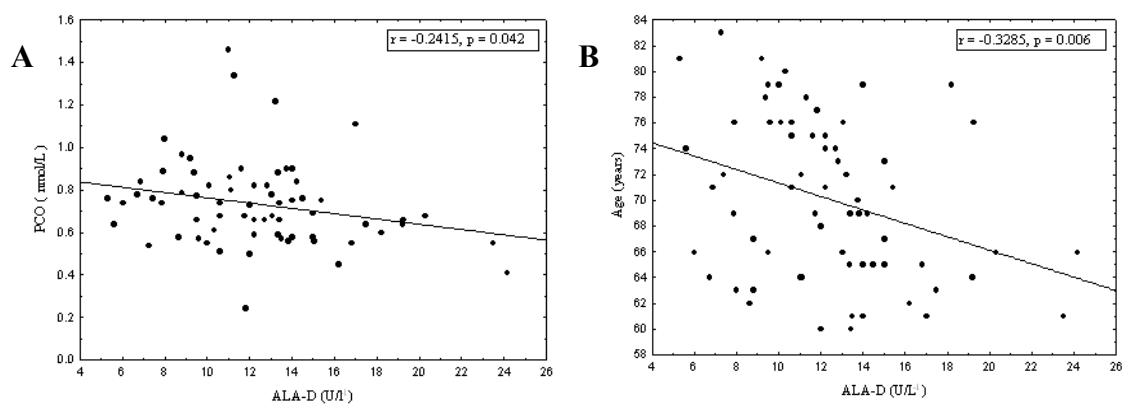


Figure 3. Pearson correlation between ALA-D vs PCO (A) and ALA-D vs age (B).

## **Avaliação micronutricional e sua relação com o Mini-Exame do estado Mental em idosas**

Manuscrito submetido à Revista *“Revista de Saúde Pública”*

### **Objetivos**

Avaliação do déficit cognitivo através do Mini-Exame do Estado Mental em Idosas institucionalizadas comparadas com as não institucionalizadas.

Avaliação dos níveis de vitaminas especialmente importantes para o idoso, como a vitamina B12 e folatos e dos níveis de vitaminas antioxidantes em idosas institucionalizadas comparadas com as não institucionalizadas.

Verificação de possíveis associações entre os níveis séricos de vitaminas C, E, B12 e folatos com perdas cognitivas, avaliadas através do Mini-Exame do Estado Mental.

## **Mini-Exame do Estado Mental em idosas**

### **Micronutritional evaluation and its correlation with Mini Mental States Examination**

Clóvis Paniz<sup>I</sup>, Faltemara F. Tessele<sup>II</sup>, André V. Bairros<sup>II</sup>, Juliana Vicentini<sup>II</sup>, Raquel Tonello<sup>II</sup>, Solange C. Garcia<sup>II\*</sup>

<sup>I</sup>Programa de Pós-Graduação em Bioquímica-Toxicológica. Centro de Ciências Naturais e Exatas. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>II</sup>Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Laboratório de Toxicologia (LATOX). Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS, Brasil.

#### **Correspondência / Correspondence**

Solange Cristina Garcia

Caixa Postal 5061 Campus Universitário

97110-970, Santa Maria, RS, Brasil

e-mail: [sgarpom@smail.ufsm.br](mailto:sgarpom@smail.ufsm.br)

Telefone: (+55 55 3220 8941)

Avaliação micronutricional em idosas

## RESUMO

**OBJETIVO:** A diminuição de micronutrientes em idosos, devido a pouca ingestão ou a redução da absorção, pode estar associada a perdas cognitivas. Neste estudo, foram dosadas algumas vitaminas sanguíneas, e verificadas as suas correlações com o Mini-Exame do Estado Mental.

**MÉTODOS:** Idosas institucionalizadas (n=45; idade média 71 anos) e não institucionalizadas (n=22; idade média 68 anos) foram avaliadas quanto aos níveis séricos de vitamina C, E, B12 e folatos. Além disso, foi aplicado o Mini-Exame do Estado Mental (escores > 24 pontos foram considerados sem indícios de alterações mentais). Teste de *Pearson* ou *Spearman* foram utilizados para verificar as correlações, de acordo com a distribuição das variáveis.

**RESULTADOS:** Foram encontradas deficiências para vitaminas C, E, B12 e folatos em 2,2; 6,6; 8,9 e 0,0 % das idosas institucionalizadas e em 4,5; 0,0; 4,5 e 9,1 % das não-institucionalizadas, respectivamente. No entanto, as institucionalizadas apresentaram vitamina C significativamente reduzidas ( $p=0,002$ ) e vitamina E significativamente aumentadas ( $p=0,014$ ) comparadas com as não-institucionalizadas. O Mini-Exame do Estado Mental mostrou escores diminuídos em 77% e 9% das institucionalizadas e não-institucionalizadas, respectivamente, mostrando-se significativamente diminuídos no primeiro grupo ( $p<0,001$ ). Além disso, uma correlação positiva foi encontrada entre os escores do Mini-Exame do Estado Mental e níveis de vitamina C ( $r=0,473$ ;  $p<0,001$ ); e também, entre o primeiro e níveis de folatos ( $r=0,266$ ;  $p<0,050$ ).

**CONCLUSÕES:** Os níveis de vitamina C e folato parecem estar relacionados com a cognição, podendo ser, um indicativo que os idosos necessitam de níveis mais elevados destes micronutrientes para um envelhecimento cognitivo saudável.

**DESCRITORES:** Níveis de Vitaminas. Idoso. Estado Mental. Deficiência.

**ABSTRACT**

**OBJECTIVE:** The decrease of micronutrients in the elderly either by lowered ingestion or absorption may be associated with cognitive deficits. In this study, some vitamins in the blood were measured and a correlation between vitamin levels and the Mini Mental States Examination was verified.

**METHODS:** Institutionalized women (n=45; mean 71 years) and non-institutionalized women (n=22; mean 68 years) were evaluated by measuring vitamins C, E, B12 and folate. The Mini Mental States Examination was utilized (scores > 24 points were considered not to present mental alterations). The *Pearson* or *Spearman* test were used to verify correlations, in accordance with the distribution of the variables.

**RESULTS:** A vitamin deficit was found for C, E, B12 and folate in 2.2; 6.6; 8.9 and 0.0% of the institutionalized women and in 4.5; 0.0; 4.5 and 9.1% of the non-institutionalized women, respectively. Serum vitamin C levels were significantly decreased (p=0.002) and vitamin E levels were significantly increased (p=0.014) in the institutionalized women when compared with the non institutionalized women. The Mini Mental States Examination showed that 77% of the institutionalized women and 9% of the non-institutionalized women presented scores of < than 24 points. The first group presented significantly decreased scores (p<0.01). Moreover, a positive correlation was found between the Mini Mental States Examination and both vitamin C levels (r=0.473; p=0.000) and folate levels (r=0.266; p=0.050).

**CONCLUSION:** Vitamin C and folate levels may be associated with cognitive deficits, suggesting that the elderly need higher levels of micronutrients to guarantee a healthy ageing process.

**DESCRIPTORS:** Vitamin levels. Elderly. Mental state. Deficiency.

## INTRODUÇÃO

O envelhecimento populacional é um fenômeno global e tem sido muito discutido na última década. Estima-se que, mundialmente, o número de pessoas com 60 anos ou mais irá crescer mais de 300% nos próximos 50 anos<sup>30</sup>. Embora exista preocupação com o envelhecimento populacional<sup>29</sup>, o rápido processo de envelhecimento observado nos países em desenvolvimento, como o Brasil, ainda não tem sido suficientemente estudado.

Neste segmento etário, há uma maior probabilidade de ocorrência de doenças crônicas não transmissíveis e, com isso, o desenvolvimento de incapacidades associadas ao envelhecimento. Dentre elas, as patologias neurodegenerativas e cardiovasculares<sup>29</sup>. Isto se torna particularmente importante em grupos de idosos institucionalizados, nos quais as doenças crônicas não transmissíveis são, com raras exceções, os motivos principais de suas internações em Instituições de Longa Permanência<sup>9</sup>.

Além disso, os idosos constituem um dos grupos populacionais mais suscetíveis a problemas nutricionais entre eles, as deficiências de nutrientes específicos como o ácido fólico e a vitamina B12<sup>32</sup>. As mudanças anatômicas e funcionais próprias do envelhecimento levam a uma maior suscetibilidade deste grupo a estados de carência nutricional. Além do mais, devem-se considerar os malefícios do uso de grandes quantidades de medicamentos nesta faixa etária<sup>35</sup>.

A carência de nutrientes tem sido apontada como causa contribuinte de diversas doenças crônicas degenerativas. Estudos mostram uma prevalência elevada da deficiência de folatos e de vitamina B12 em idosos, sendo mais freqüentes naqueles institucionalizados<sup>7,15</sup>.



A deficiência assintomática de vitamina B12 pode ocorrer por longos períodos antes do aparecimento de qualquer sinal ou sintoma clínico<sup>3</sup>, desencadeando uma deficiência crônica que, uma vez mantida durante anos, pode levar a manifestações neuropsiquiátricas irreversíveis<sup>1</sup>. São comuns relatos de déficit de memória, disfunções cognitivas, demência<sup>4</sup> e transtornos depressivos<sup>33</sup>.

Os folatos são muito importantes para o sistema nervoso em todas as idades. Desta forma, sua deficiência contribui para processos de envelhecimento do cérebro, aumento do risco de doença da Alzheimer e demência vascular<sup>26,28</sup> com aparecimento de déficit cognitivo<sup>28</sup>. Além disso, a deficiência de folatos é a principal causa de anemia megaloblástica<sup>5</sup>.

Ambas as vitaminas, quando em baixos níveis, podem ocasionar transtornos hematológicos, neurológicos e cardiovasculares<sup>1</sup>. Isto pode ser explicado, em parte, pelo papel que estes dois nutrientes desempenham no metabolismo da homocisteína (Hcy)<sup>34</sup>, um aminoácido formado exclusivamente a partir da desmetilação da metionina proveniente da dieta ou de seu catabolismo<sup>23</sup>. A Hcy requer folatos como doador de grupamentos metil, tendo a vitamina B12 como cofator para que possa ser remetilada à metionina e não se acumule. Assim, a deficiência destas duas vitaminas levará a uma hiperhomocisteinemia (HHcy), que tem sido considerada como um fator de risco para disfunções cognitivas, incluindo doença de Alzheimer, demência, infartos cerebrais<sup>26</sup>, e transtornos depressivos<sup>6</sup>. É ainda proposta como a explicação metabólica para a freqüente coexistência de HHcy e dano vascular e degenerativo cerebral<sup>10</sup>. Está associada também com o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio, da peroxidação lipídica e do dano tecidual do endotélio vascular<sup>13</sup>. A Hcy também pode ativar receptores glutamatérgicos e promover apoptose através de rupturas no DNA acelerando a neurodegeneração<sup>6</sup>.

Além disso, a deficiência destas duas vitaminas diminui as concentrações de S-adenosilmetionina o principal doador de grupos metil do sistema nervoso, comprometendo as reações de metilação que levarão ao desenvolvimento de patologias principalmente cérebro e cardiovasculares de diferentes graus de severidade, podendo, até mesmo, tornarem-se irreversíveis<sup>31</sup>.

Por outro lado, acredita-se que o estresse oxidativo seja um importante fator no declínio das funções neurológicas observadas com o envelhecimento<sup>18,20</sup>. E, micronutrientes antioxidantes podem prevenir a perda de memória e o déficit cognitivo associado com a idade. Isto é confirmado por dados experimentais e clínicos que sugerem um possível papel dos antioxidantes no retardamento de distúrbios cognitivos como demência vascular e doença de Alzheimer<sup>20</sup>. Alguns autores enfatizam a importância da vitamina C como antioxidante em situações de estresse oxidativo vinculado a danos neurológicos<sup>25</sup>.

Além do mais, outros estudos apontam a vitamina E como o mais importante antioxidante endógeno para a lipoproteína de baixa densidade (LDL) e, sua deficiência tem sido associada a um aumento da viscosidade das plaquetas do sangue, predispondo à formação de coágulos potencialmente fatais<sup>2</sup> o que poderia ser relevante no surgimento de patologias em pessoas idosas. Como as outras citadas anteriormente, a deficiência de vitamina E também pode causar anormalidades neurológicas<sup>22</sup>.

Diante destes dados, neste estudo, foram verificados os níveis de algumas importantes vitaminas em idosos, como as vitaminas C, E, B12 e folatos em idosos institucionalizados, de asilos públicos, e idosos não-institucionalizados, ambas da cidade de Santa Maria – RS, focando assim, para a realidade brasileira. Além disso, foi realizada uma avaliação do estado mental (avaliação cognitiva), através da

aplicação do questionário do Mini-Exame do Estado Mental (MEEM) e, foram verificadas possíveis correlações entre os níveis dos micronutrientes e os escores obtidos através do MEEM.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Seleção do grupo**

Um total de 67 idosas foram avaliadas, sendo 45 idosas institucionalizadas em asilos públicos ( $71 \pm 6$  anos) e 22 idosas não institucionalizadas ( $68 \pm 6$  anos). Todas as participantes eram de Santa Maria – RS.

Foram excluídas do estudo: idosas com doenças neurológicas ou psiquiátricas congênitas; aquelas que apresentavam patologias neurológicas ou psiquiátricas adquiridas graves; doenças metabólicas; doenças agudas ou crônicas graves; fumantes; etilistas; usuárias de suplementação vitamínica ou com antioxidantes.

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria (131/06) e as participantes ou responsáveis preencheram um termo de consentimento livre e esclarecido.

### **2.2 Coleta das amostras**

De todas as participantes, foi coletado sangue sem anticoagulante. Após a coleta, o sangue foi centrifugado a 1500 g por 10 minutos. O soro foi separado em eppendorfs e mantido a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises para as vitaminas C, E, B12 e folatos. A vitamina C foi dosada no mesmo dia da coleta.

### 2.3 Dosagem sérica de vitamina C

A determinação de vitamina C seguiu o método descrito por Lloyd et al<sup>16</sup>, com modificações. Em 400 µl de soro foram adicionados 800 µl de TCA 15%, homogeneizados em vórtex (20 segundos) e centrifugados por 15 min com uma rotação de 6000 rpm. Alíquotas de 400 µl do sobrenadante foram misturados com 120 µl de DTC (solução de 5 ml de 2,4 dinitrofenilhidrazina 0,1 mol/l em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4,5 M; 0,25 ml de tiouréia 0,66 mol/l; 0,25 ml de sulfato de cobre 0,027 mol/l) e homogeneizados em vórtex por 10 segundos. As amostras foram, então, incubadas a 60°C por 1 hora, resfriadas em banho de gelo por 10 minutos, e após 600 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 65% foram adicionados aos tubos, os quais foram homogeneizados em vórtex por 10 segundos. Posteriormente, realizou-se a leitura espectrofotométrica, no comprimento de onda 520 nm. Foram utilizadas curvas de calibração para o cálculo das respectivas concentrações.

### 2.4 Dosagem sérica de vitamina E

A vitamina E foi determinada através de modificações na técnica descrita por Hansen e Warwick<sup>11</sup>. Em um volume de 140 µl de soro foi adicionado 140 µl de água milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA), 20 µl de hidroxitolueno butilado (BHT) e 2100 µl de solução etanólica 66%, seguido por homogeneização em vórtex (10 segundos), para que ocorresse a desproteinização e, conseqüentemente, a liberação da vitamina E. Para a extração, adicionaram-se às amostras 3,5 ml de hexano, as quais foram agitadas por 1 minuto em vórtex e, posteriormente, centrifugadas por 10 minutos em centrífuga refrigerada (3000g). A leitura do sobrenadante, que continha somente hexano e vitamina E, foi realizada por fluorescência, na emissão de 295 nm

e excitação de 340 nm. Foram utilizadas curvas de calibração para determinação das concentrações.

## **2.5 Dosagem sérica de vitamina B12 e de folatos**

A determinação sérica de vitamina B12 e de folatos foi realizada através de imunoensaio de eletroquimioluminescência, usando kits comerciais (Roche Diagnostics Co).

## **2.6 Avaliação cognitiva**

A avaliação cognitiva foi realizada através da aplicação do questionário MEEM<sup>8</sup>. As escalas geriátricas obtidas foram utilizadas como resultados das respectivas capacidades dos idosos. De acordo com esta avaliação, escore de 30 pontos foi considerado como a pontuação máxima. As idosas que atingiram mais de 24 pontos foram consideradas sem indícios de alteração mental, enquanto que as que obtiveram menos de 24 pontos foram consideradas com reduzida capacidade mental.

## **2.7 Análise estatística**

A análise dos dados foi realizada através do uso de *software* SPSS v. 8.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL). Para verificar diferenças significativas entre os grupos, foram utilizados *teste t de Student* para dados com distribuição normal e o teste não paramétrico *Mann-Whitney* para dados com distribuição não-normal. Os testes de correlações foram realizados pelo coeficiente de *Pearson* para variáveis paramétricas ou *Spearman* para variáveis não paramétricas ou com distribuição não-

normal. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão (EP).

### 3. RESULTADOS

Os resultados de vitamina C, E, B12 e folatos nas idosas estudadas, bem como, seus valores de referência estão apresentados na tabela 1. Verificou-se que os níveis de vitamina C encontrados foram significativamente maiores nas idosas não institucionalizadas comparados com as institucionalizadas ( $p=0,002$ ). Os níveis séricos de vitamina E foram significativamente menores nas não institucionalizadas ( $p=0,014$ ). Embora as institucionalizadas apresentassem valores um pouco maiores para vitamina B12 e folatos, não houve diferença significativa entre os grupos. O percentual de idosas com deficiência vitamínica, de acordo com os valores de referência estabelecidos para adultos, é mostrado na tabela 2.

Em relação ao MEEM, as idosas institucionalizadas apresentaram escores significativamente menores em comparação com as não institucionalizadas ( $p < 0,001$ , dados não mostrados). Entre as idosas institucionalizadas 77% apresentaram escores inferiores a 24 pontos. Já entre as não institucionalizadas, somente 9% apresentaram escores menores que 24 pontos.

Outro aspecto verificado foi a correlação entre os parâmetros medidos. Uma correlação positiva foi encontrada entre MEEM e vitamina C ( $r=0,473$ ;  $p=0,000$ ) e entre MEEM e folatos ( $r=0,266$ ;  $p=0,048$ ).

#### 4. DISCUSSÃO

Uma vez que a proporção de idosos na população está em constante crescimento torna-se muito importante investigar e entender as inevitáveis mudanças fisiológicas que acompanham o processo de envelhecimento.

Está bem caracterizado que a população idosa é um grupo muito suscetível a patologias crônicas e que estas, muitas vezes, estão ligadas a estados nutricionais deficientes.

Evidências epidemiológicas associam baixos níveis de vitaminas ou baixa ingestão destas com declínio nas funções neurocognitivas em idosos<sup>31</sup>. Além disso, estudos com populações de idosos apontam uma associação entre bons estados nutricionais e melhores performances em testes cognitivos<sup>24</sup>.

Os resultados da avaliação micronutricional para vitamina C, E, B12 e folatos, mostraram que as idosas estudadas apresentaram valores médios dentro dos intervalos de referência para adultos.

Para as vitaminas C e E, foi encontrada deficiência de ambas em menos de 7% das idosas institucionalizadas e, deficiência somente de vitamina C em 4,5 % das não institucionalizadas.

Mecocci et al.<sup>19</sup>, em estudo com um grupo de idosos com média de idade de 71,5 anos, encontrou resultados de vitamina C e E, respectivamente  $52,9 \pm 3,0$  e  $46,7 \pm 1,4$   $\mu\text{mol/l}$ , valores estes, superiores aos limites mínimos estabelecidos como de referência (23 e 11,6  $\mu\text{mol/l}$ , respectivamente). Os resultados de vitamina C encontrados por este autor foram muito similares aos encontrados no presente estudo nas idosas institucionalizadas.

Na avaliação da vitamina E, mesmo tendo encontrado valores médios dentro do intervalo de referência para adultos, ambos os grupos pertencentes ao nosso estudo, apresentaram valores médios até 60% menores que os encontrados no trabalho de Mecocci et al.<sup>19</sup>. Em estudo realizado com idosas alemãs entre 65 e 90 anos, a média foi de 34,8  $\mu\text{mol/l}$ <sup>12</sup>, porém a idade destas idosas era mais avançada comparada com o presente estudo e, mesmo assim, a média foi superior as idosas estudadas neste trabalho. Em outro estudo com 123 idosos, Huerta et al.<sup>14</sup> encontrou valores médios de vitamina E de 21,8  $\mu\text{mol/l}$ , no entanto, este autor encontrou uma forte correlação entre a mortalidade e os níveis de vitamina E. Desta forma, apesar dos níveis de vitamina E se apresentarem dentro dos valores de referência, podem não ser adequados para as necessidades dos idosos.

Por outro lado, as idosas não institucionalizadas apresentaram valores significativamente mais elevados para a vitamina C, muito próximos dos valores máximos de referência. Além disso, as idosas não institucionalizadas apresentaram, na sua maioria, escores para o MEEM, superiores a 24 pontos. Diferentemente, do encontrado para as institucionalizadas que na sua maioria, 77%, apresentaram escores inferiores a 24 pontos. Adicionalmente, foi encontrada uma correlação significativa entre os níveis de vitamina C e os escores do MEEM, sugerindo através destes resultados, que níveis mais elevados deste micronutriente podem ser importantes para a manutenção da capacidade mental em idosos. Assim, pode-se hipotetizar que níveis de vitamina C dentro dos valores de referência estabelecidos para adultos, poderiam ser insuficientes para atender as necessidades, muitas vezes maiores, na população idosa, exigindo assim, níveis mais elevados para garantir a integridade da capacidade cognitiva do idoso.



Em relação à vitamina B12 e folatos, um estudo realizado com idosos não institucionalizados da cidade do México mostrou que homens idosos apresentam níveis de vitamina B12 significativamente menor que as mulheres da mesma faixa etária<sup>27</sup>. O fato de nosso estudo estar restrito a mulheres idosas poderia explicar, em parte, a baixa prevalência de deficientes em vitamina B12 encontrada, inferior a 9% nas institucionalizadas e 4,5% nas não institucionalizadas. Além disto, para alguns autores a dosagem de vitamina B12 sérica apresenta limitações de sensibilidade e muitas controvérsias sobre sua especificidade<sup>4,32</sup>. Por sofrer influência direta das concentrações de proteínas ligantes (transcobalaminas), ela pode não representar os níveis de vitamina B12 realmente disponíveis para a célula<sup>32</sup>.

Existem informações controversas na literatura em relação aos efeitos destas vitaminas sobre o desempenho cognitivo em idosos. No entanto, Malouf et al.<sup>17</sup>, mostraram uma alta prevalência de deficiência de vitamina B12, e outros indicadores de deficiência desta vitamina entre pessoas com doença de Alzheimer.

Em relação aos níveis de folatos, não foi encontrada diferença significativa nos grupos estudados e, as idosas apresentaram níveis médios dentro da normalidade para as vitaminas dosadas, sendo somente 9% das não institucionalizadas consideradas deficientes para folatos. Por outro lado, foi encontrada uma correlação positiva entre os níveis de folatos e os escores do MEEM. Em recente estudo, realizados em idosos americanos, foi mostrado que os indivíduos que apresentavam níveis normais de vitamina B12, mas altos níveis de folatos exibiam uma proteção da função cognitiva<sup>21</sup>. Desta forma, pode-se sugerir que níveis mais elevados de folatos podem ser importantes para manter a cognição em idosos.

## **5. CONCLUSÃO**

Níveis de micronutrientes como as vitaminas antioxidantes C e E, mesmo estando dentro dos valores de referência estabelecidos para adultos, podem não ser adequados para idosos, sugerindo-se assim, o estabelecimento de novos valores de referência para esta faixa etária.

A cognição, avaliada através dos escores obtidos com a aplicação do MEEM, não apresentou correlação com os níveis das vitaminas B12 e E, porém, mostrou-se diretamente correlacionada com os níveis séricos dos micronutrientes vitamínicos C e folatos, demonstrando assim, que níveis mais elevados destes micronutrientes podem proteger os idosos contra perdas cognitivas.

### **AGRADECIMENTOS:**

Ao CNPq pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste trabalho (Processo N°402243/2005-6, concedido para S.C.Garcia). S.C. Garcia recebe bolsa de pesquisadora do CNPq.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Andres E. et al. Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients. *CMAJ* 2004; 171(3): 251-259.
2. Bonithon-Kopp C. et al. Combined effects of lipid peroxidation and antioxidant status on Carotid atherosclerosis in a population aged 59-71 y: The EVA Study. Etude sur le Vieillissement Arteriel. *Am J Clin Nutr* 1997; 65:121-7.
3. Carmel R. Measuring and interpreting holo-transcobalamin (holo-transcobalamin II). *Clin Chem* 2002; 48(n): 407-409.
4. Carmel R, Green R, Rosenblatt DS, Watkins D. et al. Update on cobalamin, folate, and homocysteine. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2003: 62-81.
5. Chandra J. et al. Folate and cobalamin deficiency in megaloblastic anemia in children. *Indian Pediatrics* 2002; 39(5): 453-457.
6. Coppen A, Bolander-Gouaille C. Treatment of depression: time to consider folic acid and vitamin B12. *J Psychopharmacol* 2005; 19(1): 59-65.
7. Essama-Tjani, JC, Guilland JC, Potier de Courcy G, Fuchs F, Richard D. Folate status worsens in recently institutionalized elderly people without evidence of functional deterioration. *J Am College Nutr* 2000; 19(3): 392-404.
8. Folstein ME, Folstein SE, McHugh PR. Mini-mental state: a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatric Res* 1975, 12: 189-198.
9. Freire Jr RC, Tavares MFL. La salud desde el punto de vista del anciano institucionalizado: conociendo y valorizando su opinión. *Interface – Comunic., Saúde, Educ* 2004/2005; 9(16): 147-158.
10. Gallucci M, Zanardo A, De Valentin L, Vianello A. Homocysteine in Alzheimer disease and vascular dementia. *Arch Gerontol Geriatr Suppl* 2004; (9):195-200.

11. Hansen, LG, Warwick WJ. A fluorometric micromethod for serum vitamins A and E. *Am J Clin Pathol* 1969;51:538-541.
12. Hesecker H, Kübler W, Westenhofer J, Pudel V. Physiologische Veränderungen als Frühzeichen einer suboptimalen Vitaminversorgung. *Ernähr.-Umsch* 1990; 37:87-94.
13. Hofmann MA. et al. Hyperhomocysteinemia enhances vascular inflammation and accelerates atherosclerosis in a murine model. *J Clin Invest* 2001; 107(6): 675-683.
14. Huerta JM, Gonzalez S, Fernández S, Patterson AM, Lasheras C. Lipid peroxidation, antioxidant status and survival in institutionalised elderly: A five-years longitudinal study. *Free Radic Res* 2006; 40:571-78.
15. La Rue A, Koehler KM, Waynes SJ, Chiulli SJ, Haaland KY, Garry PJ. Nutritional status and cognitive functioning in a normally aging sample: a 6-y reassessment. *Am J Clin Nutr* 1997; 65: 20-29.
16. Lloyd B, Sinclair HM, Webster GR. The estimation of ascorbic acid for clinical purposes by the hydrazine method. *Biochem J* 1945; 39:xvii.
17. Malouf R, Areosa SA. Vitamin B12 for cognition. *Cochrane Database Syst Rev* 2003;(3):CD004326.
18. Mariani E, Polidore MC, Cherubini A, Mecocci P. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005; 827(1): 65-75.
19. Mecocci, P. et al. Plasma antioxidants and longevity: a study on healthy centenarians. *Free Radic Biol Med* 2000; 28(8): 1243-8.
20. Meydani M. Antioxidants e cognitive function. *Nutr Rev* 2001; 59(8): 75S-80S.

21. Morris MS, Jacques PF, Rosenberg IH, Selhub J. Folate and vitamin B-12 status in relation to anemia, macrocytosis, and cognitive impairment in older Americans in the age of folic acid fortification. *Am J Clin Nutr* 2007; 85(1): 193-200.
22. Motta, VT. Bioquímica clínica para o laboratório: princípios e interpretações. 4 ed. Porto Alegre: Editora Médica Missau; 1993. p 386.
23. Neves LB, Macedo DM, Lopes AC. Homocisteína. *J Bras Patol Med Lab* 2001; 40(5): 311-320.
24. Paulionis L, Kane SL, Meckling KA. Vitamin status and cognitive function in a long-term care population. *BMC Geriatr* 2005;13: 5:16.
25. Polidori MC. Antioxidant micronutrients in the prevention of age-related diseases. *J Postgrad Med* 2003; 49(3): 229-235.
26. Quadri P. et al. Homocysteine, folate, and vitamin B-12 in mild cognitive impairment, Alzheimer disease, and vascular dementia. *Am J Clin Nutr* 2004; 80(1):114-122.
27. Ramirez PA, Pacheco BI, Astiazaran-Garcia H, Esparza-Romero J, Aleman-Mateo H. Vitamin B12 and folate in non-institutionalized urban older people. *Arch Latinoam Nutr* 2006; 56(2):135-40.
28. Reynolds EH. Folic acid, ageing, depression and dementia. *BMJ* 2002; 324(7352): 1512-1515.
29. Rosa TEC, Benício, MHD, Latorre MRDO, Ramos LR. Fatores determinantes da capacidade funcional entre idosos. *Rev Saúde Pública* 2003; 37: 40-8.
30. Scazufca M. et al. Investigações epidemiológicas sobre demência nos países em desenvolvimento. *Rev Saúde Pública* 2002; 36(6): 773-778.
31. Selhub J, Bagley LC, Millar J, Rosenberg IH. B vitamins, homocysteine, and neurocognitive function in the elderly. *Am J Clin Nutr* 2000; 71(suppl): 614S–20S.

32. Stabler S, Lindenbaum J, Allen R. Vitamin B12 in the elderly: current dilemmas. *Am J Clin Nutr* 1997; 66( 4): 791-799.
33. Tiemeir H, Van Tuijl HR, Hofman A, Meijer J, Kiliaan AJ, Breteler MM. Vitamin B<sub>12</sub>, folate, and homocysteine in depression: the Rotterdam Study. *Am J Psychiatry* 2002; 159(12): 2099-2101.
34. Venâncio LS, Burini RC, Yoshida WB. Hiper-homocisteinemia na doença arterial periférica. *J Vasc Br* 2004; 3(1): 31-37.
35. Wolters M, Ströhle A, Hahn A. Cobalamin: a critical vitamin in the elderly. *Prev Med* 2004; 39(n): 1256-1266.

## 7. TABELAS

**Tabela 1.** Resultados das dosagens de vitaminas no soro de mulheres idosas, apresentados como média  $\pm$  EP e, valores considerados de referência segundo a literatura

<b>Vitaminas</b>	<b>Institucionalizadas</b>	<b>Não-institucionalizadas</b>	<b>Referência</b>
Vitamina C ( $\mu\text{mol/l}$ )	53,86 $\pm$ 3,90	75,69 $\pm$ 6,22*	23,0 – 85,0
Vitamina E ( $\mu\text{mol/l}$ )	29,87 $\pm$ 1,27	23,75 $\pm$ 1,99*	11,6 – 41,8
Vitamina B12 (pmol/l)	512 $\pm$ 42,56	447,1 $\pm$ 40,37	148 - 616
Folato (nmol/l)	28,47 $\pm$ 1,18	26,21 $\pm$ 1,74	7,0 – 39,7

\*p<0.01.

**Tabela 2.** Frequência de idosas com deficiência de vitaminas, resultados expressos em porcentagem.

<b>Vitaminas</b>	<b>Institucionalizadas</b>	<b>Não institucionalizadas</b>
Vitamina C	2,2	4,5
Vitamina E	6,6	-
Vitamina B12	8,9	4,5
Folato	-	9,1

## 4 DISCUSSÃO

Sabe-se que o estresse oxidativo desempenha um papel crítico nas alterações resultantes do envelhecimento, especialmente em relação à patogênese de diversas doenças associadas à idade. De acordo com esta proposta, os antioxidantes são considerados importantes agentes antienvhecimento.

Desta forma, neste trabalho foram avaliados os níveis de alguns micronutrientes e alguns importantes parâmetros do estresse oxidativo, em idosas institucionalizadas em asilos públicos de Santa Maria e idosas não institucionalizadas pertencentes a grupos de terceira idade. Adicionalmente, foi realizada uma avaliação nutricional, através da determinação de albumina, hemoglobina e IMC; bem como, foi traçado o perfil lipídico para ambos os grupos. Além disso, foi verificada a possível relação entre os níveis de vitaminas C, E, B12 e folatos e o MEEM.

Com relação ao primeiro trabalho, os níveis séricos das vitaminas C e E, nutrientes antioxidantes obtidos da dieta, mostraram-se dentro dos valores considerados normais para adultos. Em um estudo desenvolvido por Mecocci et al. (2000) com idosos (idade média de 71,5 anos), foram encontrados valores de vitaminas C e E, respectivamente,  $52,9 \pm 3,0$  e  $46,7 \pm 1,4$   $\mu\text{mol/l}$ . Estes resultados para vitamina C foram muito similares aos encontrados em nosso estudo no grupo de idosas institucionalizadas. Entretanto, as não institucionalizadas apresentaram valores mais elevados. Considerando-se a vitamina E, ambos os grupos apresentaram valores relativamente menores quando comparados ao estudo de Mecocci et al. (2000). Por outro lado, Huerta et al. (2006), em um estudo com 123 idosos, encontrou níveis médios de vitamina E de  $21,8$   $\mu\text{mol/l}$ . Neste mesmo estudo, foi encontrada uma associação inversa muito significativa entre níveis de vitamina E e a mortalidade em idosos. Por outro lado, sabe-se que todos os níveis encontrados estão dentro da normalidade para adultos e, talvez, estes níveis poderiam não ser suficientes ou ideais para idosos.

Uma vez que, em idosos, os níveis de oxidantes também poderiam estar aumentados (Junqueira e Ramos, 2005), uma maior quantidade de antioxidantes poderia ser requerida para impedir o aumento de estresse oxidativo. Estudos mostram que durante o envelhecimento há um declínio progressivo na biodisponibilidade dos antioxidantes moleculares, seja por um gasto aumentado para contraba-



lançar a ação deletéria de EROS/ERNS, seja por sua menor absorção pelo sistema digestório. Por outro lado, alguns autores referem um aumento compensatório na atividade das enzimas antioxidantes, em vista da menor biodisponibilidade daqueles antioxidantes moleculares. É claro que, nestas condições, a eficiência do processo de antioxidação não pode ser a mesma. Como resultado, muitas macromoléculas com funções importantes deixam de funcionar adequadamente, alterando a fisiologia da célula, resultando em várias patologias degenerativas associadas ao envelhecimento (Junqueira e Ramos, 2005).

Os resultados das correlações demonstraram que os níveis de vitamina C estavam associados com níveis de algumas proteínas sanguíneas, como hemoglobina e, particularmente, com albumina e ALA-D, o que pode estar associado com a proteção de grupamentos tiólicos. Neste aspecto, as idosas não institucionalizadas mostraram melhores resultados. Como a albumina, através de seus grupamentos tiólicos, é a principal molécula antioxidante extracelular (Faure et al., 2005) e a ALA-D é uma enzima tiol-dependente, elas podem representar melhor o estado oxidativo circulante. A vitamina C, desempenharia um papel protetor sobre a oxidação de grupamentos tiólicos nestas proteínas sanguíneas, pois sabe-se que, a vitamina C interage com as EROS na fase aquosa do plasma antes que elas possam agir oxidativamente sobre os lipídios e lipoproteínas. Além disso, os níveis de vitamina C mostraram uma correlação positiva com os escores do MEEM. Alguns autores enfatizam a importância da vitamina C como antioxidante em situações de estresse oxidativo vinculado a danos neurológicos (Polidori, 2003).

Já os níveis de vitamina E foram inversamente correlacionados com MDA. A vitamina E por ser uma vitamina com alta afinidade por lipídios de membrana pode oferecer uma proteção contra o ataque peroxidativo, evitando desta forma, aumentos nos níveis de MDA. Assim, o grupo não institucionalizado apresentou ao mesmo tempo níveis significativamente menores de vitamina E e maiores de MDA. Sabe-se que o tempo de vida longo e a alta reatividade dos produtos da lipoperoxidação, permitem a estas moléculas agir tanto dentro quanto fora das células, interagindo com outras biomoléculas como ácidos nucleicos e proteínas (Del Rio, 2005). Deste modo, os níveis de vitamina E, impedindo a peroxidação lipídica, poderiam estar prevenindo também, a oxidação de proteínas, justificando a correlação negativa também, entre os níveis de vitamina E e PCO.

A PCO é o mais usado biomarcador de dano oxidativo em proteínas e reflete os danos celulares induzidos por múltiplas formas de EROS (Grune et al., 2001; Dalle-Donne et al., 2006). Neste trabalho, foi encontrada uma correlação negativa entre os níveis de PCO e a atividade de ALA-D (figura 3A, manuscrito I), mostrando que esta enzima poderia ser utilizada como mais um marcador de oxidação protéica.

A atividade da ALA-D mostrou-se significativamente aumentada nas idosas não institucionalizadas. Esta enzima está envolvida em rotas de biossíntese do heme e exerce um papel essencial para todos os organismos aeróbicos. É uma enzima que requer grupamentos tiólicos para sua atividade (Fukuda et al., 1998) e, tem sido sugerida como um marcador do estresse oxidativo devido a sua alta sensibilidade à oxidação de seus grupamentos -SH por agentes pró-oxidantes (Folmer et al., 2002; Soares et al., 2002), levando assim, a uma redução da atividade enzimática (Rocha et al., 2004). A inibição da ALA-D prejudica a biossíntese do heme e leva ao acúmulo de seus intermediários, entre eles o ALA, que têm sido apontado como um indutor de eventos pró-oxidantes (Pereira et al., 1992; Bechara et al., 1993). Deste modo, os resultados encontrados mostraram dois aspectos interessantes: a correlação positiva com os níveis séricos de vitamina C e a correlação negativa com PCO e com idade (figuras 1C, 3A e 3B, manuscrito I).

Os grupos não apresentaram diferenças significativas entre si em relação à média de idade. Contudo, a idade mostrou uma correlação negativa com a atividade de ALA-D (figura 3B, manuscrito I). Em oposição, embora seja conhecido que os níveis de GSH eritrocitária decrescem com o avanço da idade, não foi verificada correlação no nosso grupo de estudo, provavelmente devido à pequena variação etária na população estudada. Então, estes resultados sugerem que a atividade da ALA-D poderia ser mais sensível do que GSH para variações de idade.

Em relação à avaliação cognitiva, através do MEEM, as idosas institucionalizadas tiveram pior desempenho, mostrando escores significativamente menores em relação àquelas não institucionalizadas. Da mesma forma, os níveis de vitamina C também foram significativamente diminuídos. Porém, outros fatores como sedentarismo, falta de atividades laborais ou domésticas e, possivelmente depressão, poderiam justificar a diferença encontrada nas idosas institucionalizadas quanto aos escores do MEEM.

A correlação positiva entre MEEM e folatos, mostrou que este nutriente pode desempenhar uma proteção contra perdas cognitivas. Em recente estudo, realizado em idosos americanos, foi mostrado que os indivíduos que apresentavam níveis normais de vitamina B12, mas altos níveis de folato exibiam uma proteção da função cognitiva (Morris et al., 2007). Desta forma, pode-se sugerir que níveis mais elevados de folato podem ser importantes para manter a cognição em idosos. Não foram encontradas correlações entre os níveis de vitamina B12 e o MEEM. Deve-se ressaltar, no entanto, que as idosas apresentaram em média níveis satisfatórios desta vitamina, sendo que menos de 9% das institucionalizadas e 4,5% das não institucionalizadas apresentaram deficiência deste nutriente.

Quanto à avaliação nutricional, os resultados mostraram-se em concordância com aqueles encontrados por Penninx et al. (2006), que estudando anemia em uma população idosa encontraram 12,5% de anêmicos. Entretanto, os níveis de hemoglobina estavam significativamente menores em idosas institucionalizadas ( $p < 0,038$ ).

Em relação à albumina sérica todos os indivíduos estudados apresentaram valores médios dentro do intervalo de referência, porém nas idosas institucionalizadas os valores estavam significativamente menores ( $p < 0,001$ ). A albumina é a principal molécula antioxidante extracelular agindo através de seus grupos tiólicos (Faure et al., 2005) e uma associação com mortalidade em idosos tem sido relatada para esta proteína (Philips et al., 1989). Quanto ao IMC, este foi significativamente diminuído entre as institucionalizadas, porém, ainda dentro do intervalo de referência para os dois grupos. Em acordo com Campos et al. (2006), o perfil nutricional dos idosos é caracterizado pela alta prevalência de eutrofia e sobrepeso e pequena prevalência de baixo peso e obesidade, sendo que há um maior risco para sobrepeso e obesidade no gênero feminino.

O perfil lipídico mostrou que todas as idosas estudadas apresentaram níveis médios dentro dos intervalos de referência ou desejáveis. Por outro lado, o HDL estava significativamente aumentado nas não institucionalizadas. Isso poderia ser explicado pelo fato de que as idosas não institucionalizadas praticarem exercícios físicos em suas rotinas, como caminhadas. As institucionalizadas, de outro modo, apresentavam um estilo de vida bastante sedentário.

As institucionalizadas mostraram pior estado nutricional quando comparadas as não institucionalizadas, bem como, níveis mais baixos de HDL.

Apesar disso, as institucionalizadas apresentaram um perfil lipídico e micronutricional (vitaminas C, E, B12 e folatos) satisfatório, provavelmente, em virtude de nos dois últimos anos, os asilos públicos passarem a contar com o apoio de nutricionistas; assim um controle sobre a dieta foi estabelecido, aumentando a oferta de frutas e verduras nas refeições e, diminuindo o aporte de alimentos hipercalóricos, comuns nas doações a estas instituições. Isso pode ter contribuído para os níveis de antioxidantes encontrados.

## 5 CONCLUSÕES

- A vitamina C parece proteger algumas proteínas sanguíneas de danos oxidativos, especialmente aquelas com grupamentos tiólicos, enquanto a vitamina E parece ter um efeito protetor sobre as estruturas lipídicas celulares evidenciado pelas reduções nos níveis de MDA plasmático.

- A vitamina C e os folatos tiveram correlação positiva com o Mini-Exame do Estado Mental, demonstrando assim, que estes micronutrientes podem proteger os idosos contra as perdas cognitivas.

- Os níveis de vitamina B12 não mostraram correlação com a avaliação cognitiva. Deve-se ressaltar, no entanto, que as idosas apresentaram em média níveis satisfatórios desta vitamina. Um novo estudo apenas com idosas deficientes em vitamina B12 poderia elucidar melhor sua relação com o déficit cognitivo.

- A atividade da enzima ALA-D sanguínea mostrou-se um possível biomarcador do estresse oxidativo em idosos e poderia ser considerada mais sensível que a GSH para alterações fisiológicas relacionadas ao processo de envelhecimento.

- As idosas institucionalizadas mostraram um estado nutricional pior que as não institucionalizadas, considerando-se os níveis de albumina, de hemoglobina bem como os valores de IMC. No entanto, em linhas gerais, pode-se perceber que o fato de ser institucionalizada não afetou consideravelmente, em termos nutricionais e oxidativos, as idosas.

- As idosas institucionalizadas apresentaram pior desempenho cognitivo na avaliação do MEEM.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACUÑA, K.; CRUZ, T. Avaliação do estado nutricional de adultos e idosos e situação nutricional da população brasileira. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.48, p. 345-361, 2004.

ALMADA FILHO, C. M. Antioxidantes e radicais livres. In: FREITAS, E. V.; PY, L.; NERI, A. L.; CANÇADO, F. A. X.; GORZONI, M. L.; ROCHA, S. M. **Tratado de geriatria e gerontologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 2002. Cap. 89, p. 744-748.

ANDRES, E. et al. Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients. **Canadian Medical Association Journal**, v. 171, n. 3, p. 251-259, 2004.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-126, 2006.

BEAL, M. F. Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Annals of Neurology**, v. 38, p. 357-366, 1995.

BECHARA, E. J. H. et al. A free radical hypothesis of lead poisoning and inborn porphyries associated with 5-aminolevulinic acid overload. **Química Nova**, v. 16, p. 385-392, 1993.

BECK, A. M.; OVESEN, L.; OSLER, M. The mini nutritional assessment (MNA) and the "determine your nutritional health" checklist (NSI checklist) as predictor of morbidity and mortality in an elderly Danish population. **The British Journal of Nutrition**, v. 81, p. 31-6, 1999.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. Effect of vitamin C supplementation on plasma vitamin C and E levels. **Asian Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 8, p. 207-210, 1999.

BERR, C. et al. Systemic oxidative stress and cognitive performance in the population-based EVA study. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 24, p. 1202-1208, 1998.

BIESALSKI, H. K. Free radical theory of aging. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 5, n. 1, p. 5-10, 2002.

BLAKE, D. R.; RALLEN, R. E.; LUNEC, J. Free radicals in biological systems – a review oriented to inflammatory processes. **British Medical Bulletin**, v. 43, n. 2, p. 371-385, 1987.

BOLZAN, R. C. et al. Delta-aminolevulinatase inhibition by phenyl selenoacetylene: effect of reaction with hydrogen peroxide. **Pharmacology & Toxicology**, v.90, n. 4, p. 214-9, 2002.

BONITHON-KOPP, C. et al. Combined effects of lipid peroxidation and antioxidant status on Carotid atherosclerosis in a population aged 59-71 y: The EVA Study. Etude sur le Vieillissement Arteriel. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 65, p. 121-7, 1997.

BONNES, T.; GUÉRIN, T. Is malonaldehyde a valuable of peroxidation? **Biochemical Pharmacology**, v. 44, n. 5, p. 985-988, 1992.

BULLA, L. C.; CLOSS, T. T.; VENTURA, T. A. **A vida cotidiana do idoso institucionalizado**. Faculdade de serviço social. Núcleo de pesquisas em demandas e políticas sociais – NEDEPS PUC/RS. Disponível em: <<http://www.pucrs.br/eventos/sbpc/pucrs/relato/005.doc>>. Acesso em: 25 fev. 2007.

BUNOUT, D. et al. Effects of supplementation with folic acid and antioxidant vitamins on homocysteine levels and LDL oxidation in coronary patients. **Nutrition**, v. 16, p. 107-110, 2000.

BUTTERFIELD, D. A.; CASTEGNA, A. Proteomic analysis of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain: insights into neurodegeneration. **Cellular and Molecular Biology**, v. 49, p. 747-751, 2003.

CAMPOS, M. A. G. et al. Estado nutricional e fatores associados em idosos. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 52, n. 4, p. 214-221, 2006.

CARMEL, R. et al. Update on cobalamin, folate, and homocysteine. **Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)**, p. 62-81, 2003.

CARMEL, R. Measuring and interpreting holo-transcobalamin (holo-transcobalamin II). **Clinical Chemistry**, v.48, n. 3, p. 407-409, 2002.

CECCONI, C. et al. The role of glutathione status in the protection against ischemic and reperfusion damage, effects of N-acetylcysteine. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 20, p. 5-13, 1988.

CHAIMOWICS, F. A saúde dos idosos brasileiros às vésperas do século XXI: problemas, projeções e alternativas. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, p. 184-200, 1997.

CHAIMOWICS, F.; GRECO, D. B. Dinâmica da institucionalização de idosos em Belo Horizonte, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 33, p. 454-460, 1999.

CHAN, A. C. Partners in defense, vitamin E and vitamin C. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 71, n. 9, p. 725-731, 1993.

CHANDRA, J. et al. Folate and cobalamin deficiency in megaloblastic anemia in children. **Indian Pediatrics**, v. 39, n. 5, p. 453-457, 2002.

CLARKE, R. et al. Screening for vitamin B-12 and folate deficiency in older persons. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77, n. 5, p. 1241-1247, 2003.

COPPEN, A.; BOLANDER-GOUAILLE, C. Treatment of depression: time to consider folic acid and vitamin B12. **Journal of Psychopharmacology**, v. 19, n. 1, p. 59-65, 2005.

COSTA, M. F. F. L. et al. Diagnóstico da situação de saúde da população idosa brasileira: um estudo da mortalidade e das internações hospitalares públicas. **Informes Epidemiológicos do SUS**, v. 9, p. 23-41, 2000.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 10, n. 2, p. 389-406, 2006.

DALLE-DONNE, I. et al. S-glutathionylation in human platelets by a thioldisulfide exchange-independent mechanism. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 38, p. 1501-1510, 2005a.

DALLE-DONNE, I. et al. Proteins as biological markers of oxidative/nitrosative stress in diseases. The contribution of redox-proteomics. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 24, p. 55-99, 2005b.



DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, v. 329, p. 23-38, 2003a.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonylation in human diseases. **TRENDS in Molecular Medicine**, v. 9, n. 4, p.169-176, 2003b.

DAVIES, M. J. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in study of human disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, p. 1151-61, 1999.

DEL RIO, D.; STEWART, A. J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 15, n. 4, p. 316-328, 2005.

ESSAMA-TJANI, J. et al. Folate status worsens in recently institutionalized elderly people without evidence of functional deterioration. **Journal of the American College Nutrition**, v. 19, n. 3, p. 392-404, 2000.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R. J.; ZOLLNER, H.. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 11, p.81-128, 1991.

FAURE, P. et al. Albumin antioxidant capacity is modified by methylglyoxal. **Diabetes & Metabolism**, v. 31, p. 169-177, 2005.

FERNANDEZ-CUARTERO. B. et al. Delta aminolevulinate dehydratase (ALA-D) activity in human and experimental diabetes mellitus. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. V. 31, n <sup>3</sup>/<sub>4</sub>, p. 479-88, 1999.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

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

FOLMER, V.; SOARES, J. C. M.; ROCHA, J. B. T. Oxidative stress in mice is dependent on the free glucose content in the diet. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 34, p. 1279-1285, 2002.

FONTANELLAS, A. et al. Erythrocyte aminolevulinic acid dehydratase activity as a lead marker in patients with chronic renal failure. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 40, n. 1, p. 43-50, 2002.

FREI, B.; STOCKER, R.; AMES, B. N. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 24, p. 9748-9752, 1988.

FREIRE Jr, R. C.; TAVARES, M. F. L. A saúde sob o olhar do idoso institucionalizado: conhecendo e valorizando sua opinião. **Interface – Comunicação, Saúde, Educação**, v. 9, n. 16, p. 147-158, 2004/2005.

FUKUDA, H.; PAREDES, S.; BATLLE, A. M.; Active site histidine in pig liver aminolevulinic acid dehydratase modified by diethylpyrocarbonate and protected by Zn<sup>2+</sup> ions. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v. 1B, p.285-291, 1998.

FUMERON, C. et al. Effects of oral vitamin C supplementation on oxidative stress and inflammation status in haemodialysis patients. **Nephrology Dialysis and Transplantation**, v. 20, n. 9, p. 1874-1879, 2005.

GALLUCCI, M. et al. Homocysteine in Alzheimer disease and vascular dementia. **Archives of Gerontology and Geriatrics Supplements**, v. 9, p. 195-200, 2004.

GARRIDO, R; MENEZES, P. R. O Brasil está envelhecendo: boas e más notícias por uma perspectiva epidemiológica. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 24, (Supl I), p. 3-6, 2002.

GIL, L. et al. Age-associated analysis of oxidative stress parameters in human plasma and erythrocytes. **Free Radical Research**, v. 40, p. 495-505, 2006.

GILBERT, H. F.; Mc LEAN, V. M. Molecular and cellular aspects of thiol-dissulfide exchange. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v. 63, p. 69-172, 1990.

GILLHAM, B.; PAPACHRISTODOULOU, D. K.; THOMAS, J. H. **Wills' biochemical basis of medicine**. 3. ed. Oxford: Reed Educational and Professional Publishing Ltd, 1997. p. 196-202.

GOERING, P.L. Lead-protein interactions as a basis for lead toxicity. **Neurotoxicology**, v. 14, p. 45-60, 1993.

GONÇALVES, T. L. et al. Involvement of oxidative stress in the pre-malignant and malignant states of cervical cancer in women. **Clinical Biochemistry**, v. 38, p. 1071-1075, 2005.

GRUNDMAN, M. Vitamin E and Alzheimer disease: the basis for additional clinical trials. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 2, p. 630S-636S, 2000.

GRUNE, T. et al. Age related changes in protein oxidation and proteolysis in mammalian cells. **The Journal of Gerontology. A, Biological Science and Medical Science**, v. 56, p. B459-B467, 2001.

GUTTERIDGE, J. M.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 899, p. 136-47, 2000.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human diseases: curiosity, cause or consequence? **The Lancet**, v. 344, p. 721-724, 1994.

HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **Journal of Gerontology**, v. 11, p. 298-300, 1956.

HARRIS, A.; DEVARAJ, S.; JIALAL, I. Oxidative stress, alpha-tocopherol therapy, and atherosclerosis. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 4, p. 373-80, 2002.

HERRMANN, W.; GEISEL, J. Vegetarian lifestyle and monitoring of vitamin B-12 status. **Clinica Chimica Acta**, v. 326, n. 1-2, p. 47-59, 2002.

HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Seminars in Hematology**, v. 26, n. 4, p. 277-285, 1989.

HOFFER, L. J. Homocysteine remethylation and trans-sulfuration. **Metabolism**, v. 53, n. 11, p. 1480-1483, 2004.

HOFMANN, M. A. et al. Hyperhomocysteinemia enhances vascular inflammation and accelerates atherosclerosis in a murine model. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 6, p. 675-683, 2001.

HOLLELAND, G. et al. Cobalamin deficiency in general practice. Assessment of the diagnostic utility and cost-benefit analysis of methylmalonic acid determination in

relation to current diagnostic strategies. **Clinical Chemistry**, v. 45, n. 2, p. 189-198, 1999.

HUERTA, J. M. et al. Lipid peroxidation, antioxidant status and survival in institutionalised elderly: A five-years longitudinal study. **Free Radical Research**, v. 40, p. 571-78, 2006.

HUGHES, K. A.; REYNOLDS, R. M. Evolutionary and mechanistic theories of aging. **Annual Review of Entomology**, v. 50, p. 421-425, 2005.

INCALZI, R. A. et al. Malnutrition in the acute care hospital: a very common problem. **Annali Italiani di Medicina Interna**, v.10, p. 222-226, 1995.

JAMIESON, D. Oxygen toxicity and reactive oxygen metabolites in mammals. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 7, n. 1, p. 87-108, 1989.

JENSEN, G. L. et al. Screening for hospitalization and nutritional risks among community-dwelling older persons. **The American Journal of Clinical Nutrition**, V. 74, P. 201-205, 2001.

JORDÃO Jr, A. A. et al. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. **Medicina Ribeirão Preto**, v. 31, p. 434-449, 1998.

JUNQUEIRA, V. B. C.; RAMOS, L. R. Estresse Oxidativo. In: RAMOS, L. R.; NETO, J. T. **Geriatrics e gerontologia**. Barueri : Manole Ltda, 2005. Cap. 24, p. 315-324.

KAGAN, V. E. et al. Recycling of vitamin E in human low density lipoproteins. **Journal of Lipid Research**, v. 33, p. 385-97, 1992.

KEDAR, N. P. Can we prevent Parkinson's and Alzheimer's disease?. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 49, n. 3, p. 236-245, 2003.

KWAN, L.; BERMÚDEZ, O.; TUCKER, K. Low vitamin B12 intake and status are more prevalent in hispanic older adults of Caribbean origin in neighborhood-matched non-hispanic whites. **Journal of Nutrition**, v. 132, n. 7, p. 2059-2064, 2002.

LASHERAS, C. et al. Independent and interactive association of blood antioxidants and oxidative damage in elderly people. **Free Radical Research**, v. 36, p. 875-882, 2002.

LAZAREWICZ, J. W. et al. Homocysteine-evoked  $^{45}\text{Ca}$  release in the rabbit hippocampus is mediated by both NMDA and group I metabotropic glutamate receptors: in vivo microdialysis study. **Neurochemical Research**, v. 28, n. 2, p. 259-269, 2003.

LEICHTWEIS, S.; JI, L. L. Glutathione deficiency intensifies ischaemia-reperfusion induced cardiac dysfunction and oxidative stress. **Acta Physiology Scandinavian**, v. 179, p. 1-10, 2001.

LEVINE, M. et al. A new recommended dietary allowance of vitamin C for healthy young women. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 98, n. 9842-9846, 2001.

LEVINE, R. L.; MOSKOVITZ, J.; STADTMAN, E. R. Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation. **IUBMB Life**, v. 50, p. 301-307, 2000.

McCULLY, K. S. Chemical pathology of homocysteine. I. Atherogenesis. **Annals of Clinical Laboratory Sciences**, v. 23, p. 477-493, 1993.

McGRATH, L. T. et al. Oxidative stress in erythrocyte membrane fluidity in patients undergoing regular dialysis. **Clinica Chimica Acta**, v. 235, p. 179-188, 1995.

MACNEE, W.; RAHAMAN, I. Oxidants and antioxidants as therapeutic targets in chronic obstructive pulmonary disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 160, n. 58S-65S, 1999

MAYNE, S. T. Antioxidants nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. **The Journal of Nutrition**, v. 133, p. 933S-940S, 2003.

MARIANI, E. et al. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. **Journal Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 827, n. 1, p. 65-75, 2005.

MECOCCI, P. et al. Plasma antioxidants and longevity: a study on healthy centenarians. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, p. 1243-1248, 2000.

MEYDANI, S. N.; HAN, S. N.; WU, D. Vitamin E and immune response in the aged: molecular mechanisms and clinical implications. **Immunological Reviews**, v. 205, p. 269-284, 2005.

MEYDANI, M. Nutrition interventions in aging and age-associated disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 928, p. 226-235, 2001.

MILLS, B. J.; LANG, C. A. Differential distribution of free and bound glutathione and cyst(e)ine in human blood. **Biochemical Pharmacology**, v. 52, p. 401-406, 1996.

MORENA, M. et al. Convective and diffusive losses of vitamin C during haemodiafiltration session: a contributive factor to oxidative stress in haemodialysis patients. **Nephrology Dialysis and Transplantation**, v. 17, p. 422-427, 2002.

MORRIS, M. S. et al. Folate and vitamin B-12 status in relation to anemia, macrocytosis, and cognitive impairment in older Americans in the age of folic acid fortification. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, p. 193-200, 2007.

MOSCA, M. et al. Antioxidant nutrient supplementation reduces the susceptibility of low density lipoprotein to oxidation in patients with coronary artery disease. **Journal of American College of Cardiology**, v.30, n.2, p. 392-9, 1997.

NOURHASHEMI, F. et al. Alzheimer disease: protective factors. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 2, p. 643S-649S, 2000.

NOZAL, M. J. et al. Determination of glutathione, cysteine and N-acetylcysteine in rabbit eye tissues using high-performance liquid chromatography and post-column derivatization with 5-5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). **Journal of Chromatography A**, v. 778, n. 1-2, p. 347-353, 1997.

NYSTRÖM, T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. **The EMBO Journal**, v. 24, n. 1311-1317, 2005.

ONU. World Population Prospects: The 2004 Revision Population Database. UN home. Disponível em: <http://esa.un.org/unpp/index.asp?panel=2>. Acessado em: 20 dez 2006.

PENNINX, B. W. et al. Vitamin B(12) deficiency and depression in physically disabled older women: epidemiologic evidence from the women's health and aging study. **American Journal of Psychiatry**, v. 157, n. 5, p. 715-721, 2000.

PENNIX, B. W. et al. Anemia in old age is associated with increased mortality and hospitalization. **The Journal of Gerontology. A, Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 61, n. 5, p. 474-9, 2006.

PEREIRA, B. et al. 5-Aminolevulinic acid-induced alterations of oxidative metabolism in sedentary and exercise-trained rats. **Journal of Applied Physiology**, V. 72, P. 226-230, 1992.

PHILIPS, A.; SHARPER, A. G.; WHINCUIO, P. H. Association between serum albumin and mortality from cardiovascular disease, cancer and other causes. **The Lancet**, v. 16, p. 1434-1436, 1989.

POLIDORI, M. C. Antioxidant micronutrients in the prevention of age-related diseases. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 49, n. 3, p. 229-235, 2003

POMPELLA, A. Et al. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 1499-1503, 2003.

QUADRI, P. et al. Homocysteine, folate, and vitamin B-12 in mild cognitive impairment, Alzheimer disease, and vascular dementia. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, n. 1, p. 114-122, 2004.

RACEK, J. et al. The influence of folate and antioxidants on homocysteine levels and oxidative stress in patients with hyperlipidemia and hyperhomocysteinemia. **Physiology Research**, v. 54, p. 87-95, 2005.

REYNOLDS, E. H. Folic acid, ageing, depression and dementia. **BMJ**, v. 324, n. 7352, p. 1512-1515, 2002.

ROCHA, J. B. T. et al. Effects of group 13 metals on porphobilinogen synthase in vitro. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 200, p. 169-176, 2004.

RODRIGUES, R. A. P.; MARQUES, S.; FABRÍCIO, S. C. C. Envelhecimento, saúde e doença. **Arquivos de Geriatria e Gerontologia.**, v. 4, n. 1, p. 15-20, 2000.

ROSA T. E. C. et al. Fatores determinantes da capacidade funcional entre idosos. **Revista Saúde Pública**, v. 37, p. 40-8, 2003.

SACHDEV, P. S. Homocysteine and brain atrophy. **Progress in Neuro-psychopharmacology & Biolical Psychiatry**, v. 29, n. 7, p. 1152-1161, 2005.

SACKS, G. S. et al. Use of subjective global assessment to identify nutrition-associated complications and death in geriatric long-term care facility residents. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 19, p. 570-7, 2000.

SAMPAIO, L. R. Avaliação nutricional e envelhecimento. **Revista de Nutrição, Campinas**, v. 17, n. 4, p. 507-514, 2004.

SASSA, S. ALA-D Porphyria. **Seminars in Liver Disease**, v.18, p. 95–101, 1998.

SAVAGE, D.G.; LINDENBAUM, J. Neurological complications of acquired cobalamin deficiency: clinical aspects. **Baillieres Clinical Haematology**, v. 8, n. 3, p.657-678, 1995.

SCAZUFCA, M. et al. Investigações epidemiológicas sobre demência nos países em desenvolvimento. **Revista Saúde Pública**, v. 36, n. 6, p. 773-778, 2002.

SELHUB, J. et al. B vitamins, homocysteine and neurocognitive function in the elderly. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 2, p. 614S-620S, 2000.

SHAN, X.; AW, T. Y.; JONES, D. P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 47, n. 1, p. 61-71, 1990.

SIES, H. et al. Oxidation in the NADP system and release of GSSG from hemoglobin-free perfused rat liver during peroxidatic oxidation of glutathione by hydroperoxides. **FEBS Letters**, v. 27, n. 1, p. 171-175, 1972.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v. 82, n. 2, p. 291-295, 1997.

SOARES, J. C. M.; FOLMER, V.; ROCHA, J. B. T. Influence of dietary selenium supplementation and exercise on thiol-containing enzymes in mice. **Nutrition**, v. 19, p. 627-632, 2002.



SPLAVER, A. et al. Homocysteine and cardiovascular disease: biological mechanisms, observational epidemiology, and the need for randomized trials. **American Heart Journal**, v. 148, n. 1, p. 34-40, 2004.

STABLER, S.; LINDENBAUM, J.; ALLEN, R. Vitamin B12 in the elderly: current dilemmas. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 66, n. 4, p. 791-799, 1997.

STADTMAN, E. R.; BERLETT, B. S. Fenton chemistry. Amino acid oxidation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 17201-17211, 1991.

STADTMAN, E. R.; LEVINE, R. L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. **Amino Acids**, v. 25, p. 207-218, 2003.

STAMPFER, M.J.; RIMM, E. B. Epidemiologic evidence for vitamin E in prevention of cardiovascular disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.62 (suppl)1365S-69S, 1995.

STILES, N. J.; BOOSALIS, M. G.; BOWEN, J. A geriatric nutrition clinic: addressing the nutritional needs of the elderly through an interdisciplinary team. **Journal of Nutricional for the Elderly**, v. 15, p. 33-42, 1996.

SUZUKY, H. S. (Org.). **Conhecimentos essenciais para atender bem o pacientes idoso**. São José dos Campos: Pulso, 2003.

UCHIDA, K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, p. 1685-96, 2000.

ULLELAND, M. et al. Direct assay for cobalamin bound to transcobalamin (holo-transcobalamin) in serum. **Clinical Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 526-532, 2002.

URSO, M. L.; CLARKSON, P. M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**, v. 189, p. 41-54, 2003.

VAGIMIGLI, M. et al. Endothelial dysfunction in acute and chronic coronary syndromes: evidence for a pathogenetic role of oxidative stress. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 40, p. 255-261, 2003.

VENÂNCIO, L. S.; BURINI, R. C.; YOSHIDA, W. B. Hiper-homocisteinemia na doença arterial periférica. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 3, n. 1, p. 31-37, 2004.

WELCH, G. N.; LOSCALZO, J. Homocysteine and atherothrombosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 15, p. 1042-1050, 1998.

WINTERBOURN, C. C. Oxidative reactions of hemoglobin. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 264-272, 1990.

WOLTERS, M.; STRÖHLE, A.; HAHN, A. Cobalamin: a critical vitamin in the elderly. **Preventive Medicine**, v. 39, n. 6, p. 1256-1266, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Population aging: a public health challenge. Geneva: WHO Press Office, 1998.

World Health Organization. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. Expert. **World Health Organ Tech Rep Ser**, v. 854, p. 1-452, 1995.

YU, B. P. et al. Can antioxidant supplementation slow the aging process? **Biofactors**, v. 8, p. 93-6, 1998.

## ANEXOS

### Anexo A

# THE JOURNAL OF NUTRITIONAL BIOCHEMISTRY

Ms. No.: JNB-07-83

Title: Blood evaluation of micronutrient and oxidative stress levels in institutionalized elderly

Corresponding Author: Doctor Solange Cristina Garcia

Authors: Clóvis Paniz; Juliana Valentini; Denise Grotto; Rachel Bulcão; Angela Moro; Marieli Charão; Silvana Boeira; Tilman Grune;

Dear Doctor Garcia,

Your submission, referenced above, has been assigned the following manuscript number: JNB-07-83. Please refer to this number when communicating with the Journal office.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author:

<http://ees.elsevier.com/jnb/>

Thank you for submitting your work to the Journal of Nutritional Biochemistry.

Sincerely,

Joseph R. Richardson  
Editorial Manager

The Journal of Nutritional Biochemistry  
Bernhard Hennig, Editor-in-Chief

[www.elsevier.com/locate/jnutbio/](http://www.elsevier.com/locate/jnutbio/)

University of Kentucky  
900 Limestone Street  
Rm. 599 Wethington Building  
Lexington, KY 40536-0200  
Tel: (859) 257-1811  
Fax: (859) 257-1811  
E-mail: [jnb@uky.edu](mailto:jnb@uky.edu)

## Anexo B



RSP/  
2007

02 de março de

Ilma. Sra.  
Profa. Dra. Solange C. Garcia  
sgarpom@smail.ufsm.br

Senhora Colaboradora

Acusamos o recebimento do seu manuscrito submetido à publicação nesta Revista, o qual atendeu a todos os itens exigidos para esta finalidade.

**“Avaliação micronutricional e sua relação com o Mini-exame do estado mental em idosas”**

Nº de Registro: .- **07/6418 - Este número é a chave para obter informações e acompanhar o processo de julgamento. Portanto, mencione-o em toda correspondência vinculada ao manuscrito.**

Seu manuscrito será encaminhado à nossa assessoria para a primeira fase de avaliação, destinada a verificar se o trabalho atende à política da Revista, sobretudo quanto às questões ligadas ao conteúdo, além de forma.

Agradecemos sua colaboração.

**Nota:** Favor informar-nos se há interesse em receber por e-mail as próximas correspondências referentes ao seu manuscrito.

Atenciosamente

*Maria Teresinha Dias de Andrade*

Profa. Dra. Maria Teresinha Dias de Andrade  
Editora Executiva

## Anexo C

### MINI-EXAME DO ESTADO MENTAL

**Orientação temporal (5 pontos):** \_\_\_\_\_

- Que dia é hoje?
- Em que mês nós estamos?
- Em que ano nós estamos?
- Em que dia da semana estamos?
- Qual é a hora aproximada? (considerar a variação de + ou - 1h)

OBS: Sugestão de abordagem individual

Avaliação: 1 ponto para cada resposta correta

**Orientação espacial (5 pontos):** \_\_\_\_\_

Em que local nós estamos? (apontando para o chão: consultório, dormitório, sala).

Em que local é este aqui? (apontando ao redor, num sentido mais amplo: hospital, casa de repouso, residência própria).

Em que bairro nós estamos ou qual o nome de uma rua próxima?

Em que cidade nós estamos?

Em que estado nós estamos?

OBS: Sugestão de abordagem individual

Avaliação: 1 ponto para cada resposta correta

**Memória imediata (3 pontos):** \_\_\_\_\_

- Repetir palavras: carro, vaso, tijolo

OBS: Sugestão de abordagem individual: vou dizer três palavras e você irá repeti-las.

Avaliação: 1 ponto para cada resposta correta na 1ª vez, embora possa repeti-la até três vezes para o aprendizado, se houver erros. Usar palavras não relacionadas.

**Cálculo (5 pontos):** \_\_\_\_\_

- Subtração de sete seriadamente (100 - 7, 93 - 7, 86 - 7, 79 - 7, 72 - 7, 65).

OBS: Considerar 1 ponto para cada resposta correta. Se houver erro, corrigir e prosseguir. Considerar correto se o examinado se auto-corrigir espontaneamente.

**Evocar palavras (3 pontos):** \_\_\_\_\_

- Perguntar quais palavras o sujeito acabara de repetir (carro, vaso, tijolo).

Avaliação: 1 ponto para cada resposta correta

**Nomear (2 pontos):** \_\_\_\_\_

- Nomear objetos apresentados (relógio, caneta).

Avaliação: 1 ponto para cada resposta correta

**Repetir (1 ponto):** \_\_\_\_\_

- “Nem aqui, nem ali, nem lá”.

OBS: Sugestão de abordagem individual: Preste atenção: vou dizer uma frase e quero que você repita depois de mim.

Avaliação: Considerar somente se a repetição for perfeita.

**Comando (3 pontos):** \_\_\_\_\_

- Pegar este papel com a mão direita, dobrar ao meio e colocar no chão.

OBS: Mesmo que o avaliado solicite auxílio no decorrer do teste, o avaliador não deve dar dicas.

Avaliação: 1 ponto para cada ação executada corretamente.

**Leitura (1 ponto):** \_\_\_\_\_

- Mostrar a frase escrita: “Feche os olhos”

OBS: Mesmo que o avaliado solicite auxílio complementar no decorrer do teste, o avaliador deve apenas repetir a leitura do comando.

Avaliação: 1 ponto para cada ação executada corretamente.

**Frase (1 ponto):** \_\_\_\_\_

- Solicitar ao indivíduo para fazer uma frase completa.

OBS: Se o avaliado não compreender o significado, pode-se ajudar com alguma frase que tenha começo. Meio e fim, como exemplo: algum fato ocorrido no dia.

Avaliação: 1 ponto para cada ação executada corretamente, sendo que não são considerados erros gramaticais ou ortográficos.

**Cópia do desenho (1 ponto):** \_\_\_\_\_

- Copiar o desenho o mais perfeito possível.



OBS: Mostrar o modelo e solicitar cópia melhor possível.

Avaliação: considerar apenas se houver 2 pentágonos interseccionados: 1 ponto para a ação executada corretamente.

**Avaliação final** \_\_\_\_\_

**Pontuação total: 30 pontos**

**Acima de 24 pontos: ausência de alteração mental**

**Menos ou igual a 24 pontos: reduzida capacidade mental**

## Anexo D

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, ....., data de nascimento .../.../....., sexo ....., fui convidado(a) pela profa. Dra. Solange Cristina Garcia Pomblum a fazer parte de um trabalho científico intitulado “**Avaliação da deficiência micronutricional em idosos, seus riscos patológicos e prevenção**”.

Neste trabalho será verificada a quantidade de algumas vitaminas importantes no sangue que podem levar ao aumento do risco de derrames, perdas de memória e problemas no coração. Serão realizados também hemograma (exame pra detectar anemias e infecções), dosagens de colesterol e triglicerídios e outros marcadores que quando aumentados podem levar ao aparecimento de doenças cerebrais e cardíacas. Além destes exames serão realizadas entrevistas com médico, farmacêutico-bioquímico e psicóloga que vão fazer algumas perguntas sobre o estado de saúde e sobre a alimentação. Fui esclarecido que minha participação é de livre e espontânea vontade e que caso aceite, será realizada uma coleta de 10 mL de sangue venoso, com o mínimo de risco já conhecido para esta técnica sem custo para o doador. Fui informado que, caso as vitaminas estejam baixas serei convidado a fazer um tratamento por seis meses com complexo vitamínico, sob orientação médica do projeto sem nenhum custo. Para isso, serão coletados mais 10 mL de sangue aos três meses e outra aos seis meses de tratamento. Depois de decorridos os seis meses, caso ainda seja necessário tratamento, serei encaminhado para cuidados médicos em ambulatório de geriatria do Hospital Universitário de Santa Maria ou de minha escolha com completa isenção do grupo de pesquisa.

Estou ciente de que receberei os resultados dos exames sem custo, mas não receberei nenhuma outra forma de pagamento e que poderei desistir de fazer parte do trabalho a qualquer momento, sem qualquer tipo de constrangimento, restrições ou consequências.

Eu terei garantia de não identificação e de caráter confidencial dos resultados. Terei garantia de acesso, em qualquer etapa da pesquisa, aos profissionais responsáveis pela mesma para esclarecimento de eventuais dúvidas acerca de procedimentos, riscos, benefícios, etc, contatando a professora Dra. Solange Cristina Garcia Pomblum, em sua casa na Rua Antônio Botega, 346, Apto 302, Bairro Camobi, Santa Maria, RS, CEP 97095-030, telefone (55) 9614-0553 ou no Laboratório de Toxicologia no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Maria, localizado na Av. Roraima s/n, Prédio 26, CEP 97110-970, sala 1404 ou pelo fone (55) 3220-8941.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas por mim, descrevendo o estudo.

Concordo, voluntariamente, em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer hora, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Santa Maria, Fevereiro de 2006.

---

Assinatura do paciente ou responsável

---

Assinatura do responsável pela pesquisa