

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO
DE MALONDIALDEÍDO PLASMÁTICO POR
CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA
COM DETECÇÃO VISÍVEL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Denise Grotto

Santa Maria, RS, Brasil.

2007

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DE
MALONDIALDEÍDO PLASMÁTICO POR CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO VISÍVEL**

por

Denise Grotto

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Solange Cristina Garcia

Santa Maria, RS, Brasil.

2007

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

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

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DE
MALONDIALDEÍDO PLASMÁTICO POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA
DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO VISÍVEL**

elaborada por
Denise Grotto

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Solange Cristina Garcia, Prof.^a Dr.^a
(Presidente/Orientadora)

Renata Pereira Limberger, Prof.^a Dr.^a (UFRGS)

Leandro M. De Carvalho, Prof. Dr. (UFSM)

Santa Maria, 06 de Março de 2007.

DEDICO

Aos meus pais, Delcio e Vitalina,
que me ensinaram mais do que eu
jamais pude aprender.

AGRADECIMENTOS

Não quero simplesmente agradecer, e sim trazer para dentro do meu texto aqueles que já o percorreram nas entrelinhas. E não só aos que ajudaram efetivamente na construção desta dissertação, mas aos amigos e colegas que compartilharam comigo idéias e que fomentaram discussões. Àqueles que me ajudaram no meu percurso de dois anos a seguir adiante, sem perder o que pulsa, o que vibra, agradeço imensamente.

A Deus, pelo dom da vida.

Aos meus pais, Delcio e Vita, pelo estímulo e apoio incondicional, pela paciência e grande amizade com que sempre me ouviram, dando asas aos meus sonhos, sem perder a sensatez que a vida real requer.

À Gabriela Chiochetta, ou melhor, Gueib's, pela amiga que foi, como foi e que é. Obrigada por ser minha quase irmã, confidente, sincera, verdadeira, agüentando minhas “crises” durante o mestrado, sendo paciente, oferecendo sempre palavras de incentivo ou simplesmente um momento de silêncio. Amigos como você ficam para sempre dentro do coração!

À Grasiela Tranqüilo, a grande “amica mia” Grasi, tentando sempre minimizar meus momentos de desânimo ou tristeza com boas e longas conversas, aturando meu mau humor e minhas fases, e sem esquecer, é claro, dos momentos de relax e das festinhas!!! Seu apoio e parceria foram indispensáveis para a conclusão de mais esta etapa.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Solange Cristina Garcia, pelo constante incentivo, indicando a direção a ser tomada nos momentos de maior dificuldade, e principalmente pela confiança no meu trabalho.

Aos colegas de laboratório, que ao longo deste tempo se tornaram grandes amigos; o trabalho de vocês foi crucial para o bom andamento desta dissertação. Agradeço pela disponibilidade e interesse: Silvana – meu braço direito, Angela (Angel Mix), Mariele (Pimpim), Clóvis, Rachel, Raquel, André, Fernanda (Ferdinanda), Miguel, Patrícia e, em especial, minhas grandes amigas “Jus”, Ju Va e

Ju Vi (Little), e àqueles que não mais estão no Latox, Gabi (Chen), Lucas, Juniara, Pietro, Karen, Cris, Nati, Silvia, Marcos e Carmem.

Aos amigos Daniel, Marina, Lelê, Aline, Lica, Ana Raquel, Silvinha, Alemoa, Lisi, Frã, Sari, Maris, Rosi e aos demais que por esquecimento – mas não por serem menos importantes, não estão presentes nestas linhas, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta dissertação, dando-me força e incentivo, meu muito obrigado.

Aos familiares que, apesar de não terem um convívio direto comigo nesta etapa de minha vida, sempre me apoiaram e torceram pelo meu sucesso. Em especial, agradeço à tia Eliane pelo notebook; sem ele essa dissertação teria demorado um pouco mais para ficar pronta!

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade em realizar o mestrado, fortalecendo a importância do curso de pós-graduação para nossa melhor formação.

Aos professores Renata P. Limberger e Leandro M. de Carvalho por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta dissertação.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas pelo suporte e auxílio durante a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade oferecida de realizar o curso de graduação e mestrado.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos, que garantiu o sustento financeiro necessário à realização deste mestrado.

Ao DAAD por fornecer o equipamento de CLAE-UV.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS.....	13
1. APRESENTAÇÃO.....	15
2. INTRODUÇÃO.....	16
3. MANUSCRITOS.....	19
3.1. Manuscrito I.....	19
3.2. Manuscrito II.....	41
3.3. Manuscrito III.....	64
4. DISCUSSÃO.....	82
5. CONCLUSÃO.....	86
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DE MALONDIALDEÍDO PLASMÁTICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO VISÍVEL

AUTORA: DENISE GROTTO

ORIENTADORA: Solange Cristina Garcia

Local e Data da defesa: Santa Maria, 06 de Março de 2007.

A superprodução de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio ou a redução na capacidade antioxidante resulta no estresse oxidativo. A peroxidação lipídica envolve a degradação oxidativa de ácidos graxos polinsaturados e este processo está envolvido na patogênese de doenças como câncer, diabetes, aterosclerose e doenças neurodegenerativas.

Já que a quantificação direta de radicais livres *in vivo* é complexa, torna-se necessário realizar a medida de seus produtos de reação, e o malondialdeído (MDA) é um dos produtos secundários da peroxidação lipídica mais conhecidos utilizado como indicador de injúria da membrana celular.

O MDA tem sido medido através de sua reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA), o qual produz o complexo MDA-TBA₂, detectado por espectrofotometria – método conhecido como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Porém, o maior problema neste método é a falta de especificidade, uma vez que o TBA reage com uma variedade de compostos, superestimando os valores reais de MDA. Assim, métodos envolvendo cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) têm sido descritos, sendo mais específicos e sensíveis.

Neste estudo, um método rápido e confiável para quantificar MDA plasmático por CLAE, com detecção visível, foi otimizado e validado. Os parâmetros analíticos avaliados foram: linearidade, precisão, exatidão, recuperação, sensibilidade, robustez e estabilidade. O método otimizado foi aplicado em pessoas de um asilo da cidade de Santa Maria.

As amostras de plasma sofreram hidrólise alcalina com NaOH, para uma liberação completa das proteínas ligadas ao MDA, seguida por desproteinização

ácida com H_3PO_4 e derivatização com TBA. Para remoção de interferentes, realizou-se extração da amostra com n-butanol antes da injeção no cromatógrafo. A análise de MDA foi feita em coluna C18, integrada a uma pré-coluna. A fase móvel constituía de KH_2PO_4 2,5 mM e metanol (50:50), com eluição isocrática e detecção a 532 nm.

A análise foi linear de 0,28 a 6,6 μM . As precisões intra e inter-dia foram obtidas com $\text{CV}\% < 4\%$ a $< 11\%$, respectivamente. A exatidão (bias%) variou de -4,1 a 2% e a recuperação variou de 95,9 a 102,7%. O limite de detecção foi de 0,05 μM e o limite de quantificação foi de 0,17 μM .

Para os testes de estabilidade, observou-se que as soluções padrões de MDA foram estáveis por, no mínimo, 18 meses a -20°C . O plasma foi estável por 24h quando estocado a -20°C e instável a 4°C . Armazenado a -20°C após hidrólise alcalina, o MDA plasmático não permaneceu estável; por outro lado, as amostras continuaram estáveis por 30 dias quando armazenadas após derivatização com TBA, a -20°C . Depois da extração com n-butanol, os níveis de MDA foram estáveis por 3 dias armazenados a -20°C .

O método foi aplicado em amostras de plasma de indivíduos saudáveis entre 60 e 80 anos. Os idosos apresentaram níveis plasmáticos de MDA de $4,45 \pm 0,81 \mu\text{M}$ para mulheres e $4,60 \pm 0,95 \mu\text{M}$ para homens, sem diferença significativa. Estes valores foram considerados como valores de referência para esta faixa etária em nosso laboratório.

Assim sendo, os resultados demonstraram que uma técnica simples, rápida e específica foi otimizada e validada. O método mostrou ser confiável em todos os parâmetros analíticos, e pode ser usado em rotinas nos laboratórios clínicos.

Palavras chave: MDA; CLAE-VIS; validação metodológica; estresse oxidativo.

ABSTRACT

Master Dissertation
Post-Graduated Course of Pharmaceutical Sciences
Federal University of Santa Maria

OPTIMIZATION AND VALIDATION OF THE PLASMATIC MALONDIALDEHYDE QUANTIFICATION BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH VISIBLE DETECTION

AUTHOR: DENISE GROTTTO

Adviser: Solange Cristina Garcia

Place and date of the defense: Santa Maria, March 06th, 2007.

The overproduction of reactive oxygen and nitrogen species or the reduction in the antioxidant capacity results in the oxidative stress. The lipid peroxidation involves the oxidative deterioration of polyunsaturated fatty acids and its process is involved in the pathogenesis of diseases such as cancer, diabetes, atherosclerosis and neurodegenerative diseases.

Since it is complex to carry out the free radical quantification directly *in vivo*, it is necessary to do the measure of their reaction products and the malondialdehyde (MDA) is one of the most known secondary products of the lipid peroxidation used as an indicator of cell membrane injury.

The MDA has been measured by its reaction with the thiobarbituric acid (TBA), which produces the MDA-TBA₂ complex that can be detected by spectrophotometry – method known such thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). However, the major problem in this method is the lack of specificity, once TBA reacts with a variety of compounds, overestimating the real levels of MDA. Thus, methods involving high performance liquid chromatography (HPLC) have been reported, which are specific and sensitive.

In this study, a rapid and reliable method was optimized and validated to quantify plasmatic MDA by HPLC, using visible detection. The analytical parameters evaluated were: linearity, precision, accuracy, recovery, sensibility, robustness, and stability. The optimized method was applied in subjects from a retirement home in Santa Maria.

The plasma sample underwent alkaline hydrolysis with NaOH, to a complete release of protein bound to the MDA, followed to acid deproteinization with H₃PO₄

and derivatization with TBA. To removal of interferents, a sample extraction with n-butanol before the chromatographic injection was carried out. The MDA analysis was performed in a C18 column, integrated with a guard-column. The mobile phase was constituted by KH_2PO_4 2.5 mM and methanol (50:50), with isocratic elution and detection at 532 nm.

The assay was linear from 0.28 to 6.6 μM . The precisions intra and inter-day were obtained with $\text{CV}\% < 4\%$ and $< 11\%$, respectively. The accuracy (bias%) ranged from -4.1 to 2% and the recovery ranged from 95.9 to 102.7%. The limit of detection was 0.05 μM and the limit of quantification was 0.17 μM .

For the stability test, it was observed that the MDA standard solutions were stable for, at least, 18 months at -20°C . The plasma sample was stable for 24h when it was stored at -20°C , but it was not stable at 4°C . After alkaline hydrolysis storage at -20°C , plasmatic MDA was not stable; on the other hand, the sample remained stable for 30 days after TBA reaction storage at -20°C . After n-butanol extraction storage, the MDA levels were stable for 3 days at -20°C .

The method was applied in plasma samples in healthy subjects from 60 to 80 years. The elderly subjects had MDA plasma levels of $4.45 \pm 0.81 \mu\text{M}$ for women and $4.60 \pm 0.95 \mu\text{M}$ for men, without a significant difference. These levels were considered such as reference values to this age in our laboratory.

Thus, the results demonstrated that a simple, rapid and specific technique was optimized and validated. The method showed to be consistent in all analytical parameters and can be used in the routines in clinical laboratories.

Keywords: MDA; HPLC-VIS; methodology validation; oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

MANUSCRITO I

- Fig. 1 – Schematic steps of MDA formation from unsaturated fatty acid.....38
 Fig. 2 – Reaction between MDA and TBA to form the MDA-TBA₂ pigment.....39

MANUSCRITO II

- Fig. 1 – It shows a typical MDA chromatogram. In (A) aqueous blank; in (B) plasma spiked with MDA 1.7 µM, both extracted with n-butanol.....61
 Fig. 2 – Parameters analyzed to verify the best chromatographic conditions. (A) Change in KH₂PO₄ concentration. Peak areas did not show important difference, thus the best concentration to the chromatographic system is with water. (B) Variation of methanol percentage in mobile phase; 50% was the option. (C) Temperature was tested from 25 to 45 °C and the best peak area and column efficiency was obtained with 40°C.....62
 Fig. 3 – Stability of the sample stored at -20°C. Day 0 represents the MDA measured on time of the draw. In (A) MDA was measured after alkaline hydrolysis step in 24 and 48 h of storage. In (B) samples were stored after TBA derivatization. In (C) there were extraction of the sample with n-butanol; after this, aliquots were stored and analyzed in 4 days.....63

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO I

Table 1 – HPLC methods with different detectors.....	40
--	----

MANUSCRITO II

Table 1 – Validation data precision and accuracy for plasma spiked with MDA (n=5).....	59
--	----

MANUSCRITO III

Tab. 1. Estabilidade do MDA com e sem o antioxidante BHT.....	78
Tab. 2. Estabilidade das amostras plasmáticas ao longo do processo de quantificação de MDA.....	79
Tab. 3. Comparação metodológica da estabilidade das amostras armazenadas logo após coleta e após derivatização com TBA.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS

4-HNE – 4-hidroxinonenal

BHT – Hidroxitolueno butilado

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CV – Coeficiente de variação

DNA – Ácido desoxirribonucléico

EDTA – Ácido etileno diamino tertracético

EROs – Espécies reativas de oxigênio

ERNS – Espécies reativas de nitrogênio

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

LOD – Limite de detecção

LOQ – Limite de quantificação

mAU – miliunidade de absorbância

MDA – Malondialdeído

MeOH – Metanol

SDS – Dodecil sulfato de sódio

TBA – Ácido tiobarbitúrico

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

UV – Ultravioleta

VIS – Visível

1. APRESENTAÇÃO

A Revisão Bibliográfica que faz parte desta dissertação está apresentada sob a forma de artigo de revisão – Manuscrito I, bem como as seções Materiais e Métodos e Resultados – Manuscritos II e III. Todos se encontram no item Manuscrito.

Os itens Discussão, Conclusão e Referências Bibliográficas encontram-se no final desta dissertação.

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

Os manuscritos estão estruturados de acordo com as normas da revista científica para as quais foram submetidos: Manuscritos I e III – Química Nova; Manuscrito II – Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.

O Manuscrito II foi publicado em 2007 na revista Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, volume 43, páginas 619-624, e encontra-se disponível online em www.sciencedirect.com.

Os Manuscritos I e III estão sendo avaliados na revista Química Nova.

2. INTRODUÇÃO

Radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) são produzidos continuamente pelas células como parte de seus processos metabólicos (Urso & Clarkson, 2003) pela quebra de duplas ligações, pela adição de elétrons em moléculas ou ainda pela remoção de hidrogênios por outros radicais. São espécies químicas altamente reativas, instáveis, que contêm um ou mais elétrons não pareados na sua órbita. Estas espécies podem perder ou ganhar um elétron quando atuam como agentes redutores ou agentes oxidantes, respectivamente.

Os radicais ou moléculas pró-oxidantes mais importantes envolvidas em processos patológicos são o radical superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), o radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e alguns óxidos de nitrogênio, como o óxido nítrico (NO) e o radical peroxinitrito (ONOO^-) (Gillham et al., 1997).

Uma excessiva produção de radicais derivados de oxigênio e nitrogênio ou ainda a depleção das defesas antioxidantes do organismo resulta no estresse oxidativo, causando um desequilíbrio que pode resultar no ataque destes radicais a componentes celulares, como lipídios e proteínas. O ataque aos lipídios das membranas, conhecidos como peroxidação lipídica, leva ao dano tecidual e está envolvido na patogênese de várias doenças, entre elas diabetes (Kesavulu et al., 2001), câncer (Cerutti, 1994), aterosclerose (Halliwell, 1993; Kesavulu et al., 2001), doença de Parkinson (Gotz et al., 1990) e Alzheimer (Cecchi et al., 2002).

Uma vez que a medida direta de radicais livres *in vivo* é complexa, torna-se necessária a quantificação de produtos formados pela reação das espécies reativas com os componentes celulares, tais como proteínas (Halliwell & Chirico, 1993), DNA (Marnett, 1999) e principalmente lipídios (Esterbauer & Cheeseman, 1990).

Os peróxidos lipídicos tendem a se degradar em uma variedade de subprodutos, entre eles malondialdeído (MDA) e 4-hidroxinonenal (4-HNE) (Esterbauer & Cheeseman, 1990). O MDA é um dos produtos secundários da

peroxidação lipídica mais conhecidos, podendo ser utilizado como um indicador do dano da membrana celular (Esterbauer et al., 1991).

Outras avaliações da peroxidação lipídica incluem a medida de dienos conjugados (Dormandy & Wickens, 1987), de isoprostanos (Morrow et al., 1995), de gases etano e pentano (Frank et al., 1980) e de modificações em proteínas (Levine et al., 1994) e no DNA (Marnett, 1999). No entanto, o MDA é o indicador do dano oxidativo de células e tecidos mais utilizado.

Na literatura, muitos métodos são descritos para a determinação de MDA em diferentes amostras biológicas. O método mais conhecido é aquele que utiliza o ácido tiobarbitúrico (TBA) como derivatizante, o qual reage com o MDA formando um complexo de cor rosada, quantificado através de diferentes técnicas, tais como espectrofotométricas ou fluorimétricas, técnicas imunológicas, ou ainda técnicas utilizando separação cromatográfica, acopladas a diferentes detectores.

O uso de técnicas espectrofotométricas através da medida de MDA por substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Ohkawa & Ohishi, 1979), apesar de serem fáceis e baratas, vem recebendo muitas críticas nos últimos anos. O grande problema é a falta de especificidade do método, já que o TBA reage com outros aldeídos e compostos (Sinnhuber & Yu, 1977; Kosugi et al., 1987; Knight et al., 1988) produzindo valores de peroxidação lipídica falsamente aumentados.

Diante disso, técnicas como a CLAE, que empregam a separação do MDA das substâncias interferentes, estão sendo bastante utilizadas (Bird et al., 1983; Lepage et al., 1991; Templar et al., 1999; Hong et al., 2000), uma vez que são específicas e sensíveis, gerando resultados confiáveis. As técnicas existentes, porém, apresentam variações metodológicas tais como altas concentrações de fosfato na fase móvel, medida de MDA livre ou ligado a proteínas, além de variações quanto aos valores de referência de MDA presente nas amostras biológicas.

Assim, neste trabalho, um método para a quantificação de MDA plasmático como um indicador do estresse oxidativo foi desenvolvido, e parâmetros da validação metodológica como linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação, robustez e estabilidade foram estabelecidos.

A aplicação da metodologia foi realizada quantificando-se os níveis de MDA em amostras plasmáticas de indivíduos idosos saudáveis de dois lares institucionais da cidade de Santa Maria. Estes idosos tinham sua dieta controlada por nutricionista, não bebiam e não fumavam. A coleta foi realizada nos próprios lares. Sabe-se que

em indivíduos com 60 anos ou mais há maior probabilidade de ocorrência de doenças crônicas não transmissíveis e, com isso, o desenvolvimento de incapacidades associadas ao envelhecimento, tais como patologias neurodegenerativas e cardiovasculares, o que representa um grande problema de saúde pública. O MDA pode, dessa forma, desempenhar um papel importante como marcador da peroxidação lipídica na avaliação clínico-laboratorial do estresse oxidativo nesta faixa etária e em diferentes patologias relacionadas.

3. MANUSCRITOS

3.1. Manuscrito I

IMPORTANCE OF THE LIPID PEROXIDATION BIOMARKERS AND METHODOLOGICAL ASPECTS TO THE MALONDIALDEHYDE QUANTIFICATION

Denise Grotto^I, Gabriela Schmitt^I, Clóvis Paniz^I, Juliana Valentini^I, Lucas Santa Maria^I, Silvana Boeira^I, Solange Cristina Garcia^{I*}

^IDepartment of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Santa Maria, CP 5061, 97110-970, Santa Maria, RS, Brazil.

Valdeci Juarez Pomblum^{II}

^{II}Department of Medical Clinic, Federal University of Santa Maria, RS, Brazil.

João Batista T. Rocha^{III}

^{III}Department of Toxicology Biochemistry, Federal University of Santa Maria, RS, Brazil.

Marcelo Farina^{IV}

^{IV}Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

*Corresponding author:
PhD Solange Cristina Garcia (sgarpom@smail.ufsm.br)

IMPORTANCE OF THE LIPID PEROXIDATION BIOMARKERS AND METHODOLOGICAL ASPECTS TO THE MALONDIALDEHYDE QUANTIFICATION

ABSTRACT

Free radicals induce lipid peroxidation, which plays important role in pathological processes and pollutant exposition. The measure of the injury mediated by free radicals can be done by conjugated dienes, malondialdehyde (MDA), 4-hydroxynonenal (4-HNE), exhalation of pentane and ethane gases, protein and DNA modifications. However, MDA has been pointed as the main product to evaluate the lipid peroxidation. Most assays determine MDA by its reaction with thiobarbituric acid (TBA). The MDA-TBA complex can be measured by spectrophotometer, espectrofluorimeter or chromatography, but there are controversies among methodologies.

This review describes briefly significant aspects about MDA determination, its importance in pathologies and biological samples treatment.

Keywords: oxidative stress, TBARS, MDA.

INTRODUCTION

Cells continuously produce free radicals and reactive oxygen species (ROS) as part of their metabolic processes¹. ROS can be produced by either breakage of covalent bond, addition of electrons to a molecule or removal of hydrogen by other radicals. They are generally highly reactive species and typically act as electrophilic species or oxidant agents. The most important radicals or pro-oxidant molecules involved in disease processes are superoxide ($\bullet\text{O}_2^-$), hydroxyl radical ($\bullet\text{OH}$), hydrogen peroxide (H_2O_2) and certain oxides of nitrogen, like nitric oxide (NO) and peroxynitrite (ONOO^-)².

The overproduction of reactive species results in oxidative stress. In other words, it can be a combination of an increased formation of oxygen-nitrogen derived radicals and reduced antioxidant capacity, causing an imbalance that can result in the attack of cellular components, especially lipids. It has been implicated in the pathogenesis of various diseases including diabetes³, cancer⁴ and atherosclerosis^{3,5}.

Since it is complex to measure free radicals directly *in vivo*, it is necessary to carry out the quantification of their reaction products with cellular components such as proteins⁶, DNA⁷ and mainly lipids⁸. Once lipid peroxides are unstable compounds, they tend to degrade rapidly to a variety of sub products. MDA is one of the most known secondary products of lipid peroxidation, and it can be used as a marker of cell membrane injury⁹. Lipid peroxidation can also be assessed by measurement of conjugated dienes¹⁰, ethane and pentane gases¹¹, isoprostanes¹², 4-HNE⁹ and by protein¹³ and DNA modifications⁷. Nevertheless, MDA is by far the most popular indicator of oxidative damage to cells and tissues.

Since the 1960s, several methods have been developed to assess MDA, including quantitative methods using spectrophotometry or fluorimetric detection, high performance liquid chromatography (HPLC) and immunological techniques^{14,15}.

In this review, we will discuss the validity, advantages and disadvantages of using MDA as an indicator of oxidative stress and the methods for its determination, including determination by HPLC with different detectors and colorimetric techniques, which have been widely criticized.

Lipid peroxidation and MDA – What is this?

Lipid peroxidation is a free-radical-mediated chain of reactions that, once initiated, results in an oxidative deterioration of polyunsaturated lipids. The most common targets are components of biological membranes. When propagated in biological membranes, these reactions can be initiated or enhanced by a number of toxic products, including endoperoxides and aldehydes¹⁶.

MDA is a three-carbon, low-molecular weight aldehyde that can be produced by different mechanisms. Dahle *et al.*¹⁷, postulated a mechanism of MDA formation based on the fact that only peroxides that possessed α or β unsaturations to the peroxide group could be capable of undergoing cyclization to finally form MDA. However, the best mechanism that explains the attack is described in Fig. 1^{2,18}. The target of reactive species is the carbon-carbon double bond of polyunsaturated fatty acids (I). This double bond weakens the carbon-hydrogen bond, allowing easy abstraction of the hydrogen by a free radical. Then, a free radical can abstract the hydrogen atom and a lipid free radical is formed (II), which suffers oxidation generating a peroxy radical (III). The peroxy radical can react with other polyunsaturated fatty acids, abstracting an electron and producing a lipid

hydroperoxide (IV) and another lipid free radical. This process can be propagated continually in a chain reaction. The lipid hydroperoxide is unstable and its fragmentation yields products such as malondialdehyde (V) and 4-hydroxy-2-nonenal.

Studies have showed that considerable amount of MDA can potentially be derived from the following sources:

a) Fatty acids with less than three double bonds^{19,20}. In this case, MDA production is partially due to the secondary oxidation of primary carbonyl compounds^{18,21}.

b) Endoperoxides involved in the synthesis of prostaglandins¹⁹.

c) Iron-dependent oxidative degradation of amino acids, carbohydrates, pentoses and hexoses and from free radical products produced by gamma irradiation²².

In physiological conditions, oxy-radicals are part of the normal regulatory course of the organism and the cellular redox state is closely controlled by antioxidants. When the levels of free radicals increase and the enzymatic systems and low molecular antioxidants are not sufficient to protect the organism, these radicals attack membranes and cells. This process is particularly important in the vascular system, where they can damage the endothelium by peroxidation and initiate the atherosclerotic lesion²³.

NO is known to control vascular smooth muscle tone, inhibit platelet activation, modulate apoptosis and inflammatory cell aggregation and activation at low concentrations. On the other hand, NO can react with superoxide anion (O_2^-) to form peroxynitrite ($ONOO^-$), which is highly cytotoxic. The damage of the vascular endothelium is always followed by vasoconstriction, platelet aggregation and inflammatory cell adhesion, which lead to an increased production of NO and,

consequently, ONOO⁻. Associated with others factors, the over production of NO is one of the most important issue involved in the development of lipid atherosclerotic plaques²³.

In the last 20 years, MDA has been recognized as an important lipid peroxidation indicator since subjects affected by several diseases have the MDA levels increased^{3,4,5,24}.

The involvement of lipid peroxidation in cancer is a good example; cancer results from the accumulation of the multiple mutations in key growth regulatory genes. These genetic changes are a consequence of the instability of DNA and errors by DNA replication as a result of exposure to exogenous genotoxins^{25,26} and reactive oxygen species²⁷. MDA is a potentially important contributor to DNA damage and mutation that is produced endogenously via lipid peroxidation. Cirak *et al.*²⁸, suggest that oxidative stress is increased in malignant brain tumors, with higher levels of serum and tissue MDA when compared to healthy controls. Thus, MDA can be used as one of the markers for diagnosis and follow-up of malign tumors.

In diabetes, persistent hyperglycemia may cause high production of free radical attributed to protein glycation or glucose auto-oxidation²⁹. MDA levels were found higher in Type 2 diabetics than in healthy controls in a study carried out by Kesavulu *et al.*³. The research group also observed that diabetic patients with coronary heart disease had higher levels of MDA than those diabetics without this disease. It shows that cardiovascular diseases have also been related to free radical-mediated mechanisms and to lipid peroxidation and they are a major cause of mortality and morbidity in hemodialysis patients. Study reported by Scott *et al.*³⁰, demonstrated that plasma MDA values were elevated in hemodialysis patients and higher in hemodialysis patients with cardiovascular complications.

Finally, MDA is increased in Alzheimer's diseases. The central nervous system is vulnerable to lipid peroxidation owing to high brain oxygen consumption, its rich polyunsaturated fatty acid content and it is relatively deficient in antioxidant enzymes³¹. Marchasson *et al.*³² found plasma MDA levels higher in Alzheimer's diseases patients than healthy controls.

In fact, MDA measurement is very important in pathological states, but it has also a large significance on the toxicological effects of pollutants such as metals, solvents and xenobiotics in humans and animals. MDA quantification has been widely used in studies involving the toxicity mechanism of several substances, as Paraquat³³, carbon tetrachloride³⁴ and metal exposition, as cadmium³⁵, aluminum³⁶. Moreover, the effects of mixture of substances from petroleum industry on the activity of enzymes and the biochemical parameters have been studied³⁷. However, the exact role played by lipid peroxidation on cellular toxicity has not yet been clearly identified whether lipid peroxidation is the cause or is a secondary out come of cellular injury. Thus, the elucidation of this question will have to wait additional experimental and clinical studies.

Besides MDA as an index of lipid peroxidation, 4-hydroxynonenal (4-HNE) has an important role in oxidative stress. 4-HNE is an aldehyde formed by peroxidation of ω -6 fatty acid⁹. Millimolar concentrations of 4-HNE take to depletion of glutathione, inhibition of DNA, RNA and protein synthesis and they are acutely cytotoxic^{9,38}. This aldehyde may be measured by highly specific and sensitive gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) methods⁶, which are expensive techniques and they are not common in laboratories.

The peroxidation of unsaturated fatty acids is accompanied by the formation of conjugated dienes that reflecting an early stage in oxidative stress³⁹. Further

limitations of this technique are that production of dienes continues to occur *ex vivo*, and absorption of these compounds at 230-235 nm is not specific for lipid peroxidation products¹⁰.

A non-invasive measure of lipid peroxidation is the measurement of a group of volatile hydrocarbons, the alkanes, including ethane, pentane and isoprene¹¹ that are formed by polyunsaturated fatty acids oxidation. The methodology used is GC, which besides being expensive has difficulty to separated pentane and isoprene, because of similar boiling points⁴⁰. Additionally, hydrocarbon gases are produced by bacteria and are susceptible to varying rates of *in vivo* metabolism⁴¹.

Another measure that has been used to detect the extent of lipid peroxidation is F2-isoprostanes, isomers of prostaglandins produced by non-cyclooxygenase dependent peroxidation of arachidonic acid⁴². Although isoprostanes are not a major product of lipid peroxidation, they can be easily detected by GC/MS⁴³, but it is a time-consuming and expensive technique.

Various reactive electrophilic compounds from lipid peroxidation, in particular MDA, have been showed to be mutagenic and genotoxic⁴, which can lead to cancer formation. MDA is able to interact with nucleic acid basis (deoxyguanosine, deoxyadenosine and deoxycytidine) to form several different adducts⁷. The main product of this reaction is 8-hydroxy-deoxyguanosine, which can be measured by HPLC, GC/MS, and enzymatic assays⁴⁴. Another probable toxic action of MDA is its cross-linking with collagen, which may contribute to the stiffening of cardiovascular tissue⁴⁵.

An increased in blood proteins carbonyls has been reported in oxidative stress. When reactive oxygen and nitrogen species attack amino acids, lipids and carbohydrates, carbonyls groups are produced and these are measured by HPLC or

immune assay techniques⁴⁴. Though, these techniques have been criticized as being non-specific and unreliable.

Although others biomarkers can be used to measure the lipid peroxidation, the MDA quantification in pathologies and toxicology is the most utilized, and different chemical methods have been described for its measurement. The techniques widely used are determination of MDA-TBA complex by direct spectrophotometry or fluorimetry and by HPLC with different detectors.

METHODS FOR MDA QUANTIFICATION

BIOLOGICAL SAMPLES

The measurement of MDA values can be made in a variety of biological samples. The use of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay has been carried out in plasma^{30,46,47,48,49,50,51}, serum⁵², different tissues^{28,47,48,53}, and occasionally in urine⁵⁴.

Urinary MDA is excreted mainly in form of adducts with lysine and its N-acetylated derivative, indicating an association with proteins⁵⁴. Therefore, urinalysis for aldehydic products of lipid peroxidation can be done, but this technique has not proved to be a reliable method to indicate the general state of oxidative stress. Urinary excretion of MDA is prejudiced by ingestion of lipids and exercises⁵⁴. Thus, as pointed out above, the quantification of MDA in urine has low clinical significance.

Tissues used in measurement of MDA, brain, liver, lung, kidney, heart, may be homogenized with phosphate-buffered saline and kept on ice. Brain is more sensitive to *in vitro* oxidation than other organs because of its higher contents of

polyunsaturated fatty acids⁴⁸. In fact, the tissue auto-oxidation *in vitro* can be used to assess its susceptibility to oxidative stress^{53,55}.

Although the MDA quantification to be carried out in different biological samples, plasma sample is the most used.

SAMPLE PREPARATION FOR MDA QUANTIFICATION:

Literature data also indicate what type of anticoagulant can be used in MDA assay: sodium heparin^{49,56}, sodium citrate⁴⁹ and tripotassium EDTA^{46,49,51}. EDTA seems to be preferable over citrate and heparin, once lower MDA-TBA₂ concentrations was observed in EDTA-treated plasma, probably related to iron chelation by EDTA in the TBARS assay as well as due to its weak activity such antioxidant⁴⁹.

Blood samples may be kept at 4-5 °C until centrifugation^{49,50} to prevent transformation of MDA in other compound or its reaction with other cellular components, resulting in erroneous results.

Researches showed that samples were stable at -20°C for a month and for periods longer than this, it is recommended storage the samples at -80/-85°C^{49,56,57}.

To prevent further formation of MDA during the assay, an antioxidant can be used; butylated hydroxy-toluene (BHT) is one of the most widely used compound^{47,50,56,58}, and it is prepared by dilution of BHT in methanol or ethanol. However, Karatas *et al.*⁵², did not find difference between the amounts of MDA-TBA adduct with and without BHT. On the other hand, a study by Pilz *et al.*⁵⁹ demonstrated clearly that the reduced MDA levels is merely the effect of ethanol alone, probably by the protein precipitation, and not of the BHT, once the BHT is dissolved in ethanol or methanol. Using Ohkawa's method⁶⁰ we observe that the

presence of SDS reduces autoxidation of tissues during the preparation of the sample or during the heating step.

Usually, biological sample is mixed with an acid to precipitate proteins. It can be used different acids and concentrations: 0.33 mol L^{-1} of H_2SO_4 ⁴⁷, 0.1 mol L^{-1} of HClO_4 ⁵², 0.44 mol L^{-1} , 1% or 6% of (orto) phosphoric acid (v/v)^{49,51,56}, respectively, 7.2% of TCA (w/v)⁵⁶. After centrifugation, TBA is added to supernatant⁸ and the reaction is effectuated by heating at around 95°C during about 60 minutes⁶⁰.

TBARS ASSAY:

In 1968, Yagi *et al.*⁶¹ applied the reaction of TBA with MDA and linked chromogens to lipoperoxides in biomaterials; this reaction carried out at 95°C and in acid conditions, resulting thus in the well-know method “thiobarbituric acid reactive substances” (TBARS). Its product can be detected by colorimetry (532-535 nm) or fluorimetry (excitation at 532 nm and emission at 553 nm)⁶².

Formation of MDA-TBA₂ adduct occurs by a nucleophilic attack involving carbon-5 of TBA and carbon-1 of MDA, followed by dehydration and similar reaction with a second molecule of TBA (Fig. 2), producing a red pigment⁶³. The intensity of the pink pigment formed from MDA-TBA condensation indicates the extent of lipid peroxidation.

The reaction velocity depends of the temperature, pH and concentration of TBA. The maximum intensity of the pigment is obtained in 60 minutes in boiling water bath²⁰; the reaction rate is faster in acid conditions⁶⁰, and when the concentration of TBA solution increased from 20 to 80 mM, the reaction time decreased from 30 min to approximately 5 min⁶⁴.

Although this method to be easy and inexpensive, the use of TBARS test has received wide criticism over the years. The main problem is the lack of sensitivity and specificity, since TBA reacts with a variety of compounds such as sugars, amino acids and bilirubin, producing interference with colorimetric and fluorimetric measurement of MDA⁶².

One of these interferences is the presence of a yellow chromagen (max 450-460 nm) formed by a variety of aldehydic compounds reacting with TBA and overlapping the pink peak of the MDA-TBA₂^{21,62}. Other interference is a product of sucrose pyrolysis, that reacts with TBA to form a pink chromogen absorbing at 532 nm and which is formed in total absence of lipid peroxidation⁶². In addition, MDA is not exclusively produced by polyunsaturated fatty acids. Radiation and iron-dependent damage to amino acids, carbohydrates, peptides, proteins and nucleic acids can also release intermediates which form an MDA-TBA adduct^{22,65}.

Proteins play a problematical aspect once albumin, for example, interacts with MDA-TBA adducts and this interaction may lead to an inappropriate and strong increase in natural MDA-TBA fluorescence, overestimating the authentic result in fluorimetric assay⁴⁶. TBA derivatization procedure itself leads to the formation of several unrelated fluorescent species showing the low specificity of this technique⁵⁸. Thus, the wide reactivity of TBA with others substances makes this technique nonspecific and inappropriate for measurement of MDA, producing a false overestimated result of lipid peroxidation.

Furthermore, an additional important limitation is that MDA is unstable for a long period of time, because its oxidation yields organic alcohols and acid, not determined by the TBARS test^{20,66,67}.

Thus, it could suppose that the use of colorimetric or fluorimetric techniques can give prejudiced results, particularly in situations such as initial stages of human diseases, where lipid peroxidation can be smaller when compared to the non-specific background reaction between TBA and products not derived from lipid peroxidation⁵³.

HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY ASSAY:

The need for a more specific, reliable and reproducible technique for measurement of MDA has prompted modifications of currently available methods.

Bird *et al.*¹⁵, described high performance liquid chromatographic (HPLC) techniques for determining MDA. HPLC assay for MDA is a useful method for measure lipid peroxidation, since there is the separation of the MDA-TBA₂ adduct from others interfering compounds by reverse phase HPLC techniques. Several researches have adapted these HPLC techniques^{47,49,50,56}, so that the procedure offers some advantages in terms of specificity, recovery and reproducibility.

The initial analytical procedure to sample treatment is basically the same from TBA test. Some steps, though, can be added to improve the method. Extraction of the sample with n-butanol before its injection into chromatographer^{56,68} is one of these, which avoid interference formation and extend the lifetime of the column by removing contaminants from incubation mixture.

Some researches discuss the difference between detection of free and total plasma MDA⁶⁹. Free MDA is unbound to proteins while total MDA is bound. Only low amount of free MDA are present in biological samples and alkaline hydrolysis step with NaOH is necessary to more complete and uniformed release of protein-bound MDA^{51,56}, resulting in a higher MDA value, once total MDA is being considered.

Detectors more used are visible (at 532 or 535 nm)^{28,49,50,56} and fluorescent^{56,58,68}. There was a research that carried out MDA determination with a UV absorbance detector⁵². The Table 1 shows methodologies with the different detectors, over there to presenting some MDA levels in different samples. It is possible to notice that there is not an agreement among the techniques.

Both visible and fluorescent detector are good at specificity and sensibility, and respect analytical performances, including baseline noise level, baseline drift, signal-to-noise ratio, sensitivity and specificity¹⁵.

In relation to UV detector, it becomes difficult to take a precise conclusion because there is only one research about it. Furthermore, the methodology offered in this work⁵² is based on direct MDA measurement and authors did not provide data about the MDA-TBA complex formation.

Mobile phase is, in the majority of studies, methanol: potassium phosphate buffer in concentrations from 10 to 50 mM^{49,50,52,56,58}. Grotto *et al.*⁵¹ did an important modification in mobile phase, employing water instead of potassium phosphate buffer, preventing the damage of the chromatographic system. Fukunaga *et al.*⁶⁸ used acetonitrile: water.

Examination of research data clearly indicates that MDA-TBA levels quantification by spectrophotometer or spectrofluorimeter methods are higher than MDA-TBA obtained from HPLC techniques (Table 1). These results are certainly related to the fact that colorimetric and fluorimetric techniques are not as specific as the HPLC techniques. Thus, HPLC methods are more adequate for accurate detection of lipid peroxidation products.

CONCLUSION

Estimating the extent of lipid peroxidation has a high significance in pathologies and in toxicology associated with oxidative stress. MDA is a good marker, but the most common methods to MDA detection, TBARS reaction by spectrophotometer or fluorescent detection, are insufficient sensitive and specific, and widely once TBA can react with several cellular constituents other than those derived from lipid peroxidation. Fortunately, with fast development in analytical techniques, TBARS assay can be used in association with others indices of lipid peroxidation, such as 4-hydroxynnenal, conjugated dienes, ethane and pentane gases, and isoprostanes. Unluckily, these methods have limitations because they are too expensive, too time consuming or because their application need specialized personnel. Therefore, HPLC techniques are preferred methods to determine the true amount of MDA in biological materials, once they are reliable and specific, without the presence of artifacts or methodological pitfalls, helping in determine more precisely how oxidative injury derived from lipid peroxidation participates in the pathogenesis of many diseases that afflict million of human subjects as well as the toxicological effects of pollutants such as metals, solvents and xenobiotics in humans and animals.

Acknowledgements:

The authors would like to thank DAAD (Deutscher Akademischer Austauschdienst), Wissenschaftliche Gerätebau Dr. Ing. Herbert Knauer GmbH for HPLC apparatus support and to CNPq for providing fellowships.

REFERENCES

- [1] Urso, M.L., Clarkson, P.M. *Toxicology*. **2003**, 189, 41.
- [2] Gillham, B., Papachristodoulou, D.K., Thomas, J.H. *Will's: Biochemical basis of medicine*. 3th ed., Butterworth- Heinemann: Oxford, **1997**.
- [3] Kesavulu, M.M., Rao, B.K., Giri, R., Vijaya, J., Subramanyam, G., Apparao, C. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2001**, 53, 33.
- [4] Cerutti, P.A. *The Lancet*. **1994**, 344, 862.
- [5] Halliwell, B. *Br. Med. J.* **1993**, 307, 885.
- [6] Halliwell, B., Chirico, S. *Am. J. Clin. Nutri.* **1993**. 57, 715.
- [7] Marnett, L.J. *Mutat. Res.* **1999**, 424, 83.
- [8] Esterbauer, H., Cheeseman, K.H. *Meth. Enzymol.* **1990**, 186, 407.
- [9] Esterbauer, H., Schaur, R.J., Zollner, H. *Free Rad. Biol. Med.* **1991**, 11, 81.
- [10] Dormandy, T.L., Wickens, D.G. *Chem. Phys. Lipids.* **1987**, 45, 356.
- [11] Frank, H., Hintze, T., Bimboes, D., Remmer, H. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1980**, 56, 337.
- [12] Morrow, J.D., Frei, B., Longmire, A.W., Gaziano, J.M., Lynch, S.M., Shyr, Y., Strauss, W.E., Oates, J.A., Roberts, L.J. *N. Engl. J. Med.* **1995**, 332, 1198.
- [13] Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.R., Shacter, E. *Methods Enzymol.* **1994**, 233, 346.
- [14] Marcuse, R., Johansson, L. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1973**, 50, 387.
- [15] Bird, R.P., Hung, S.S.O., Hadley, M., Draper, H.H. *Anal. Biochem.* **1983**, 128, 240.
- [16] Rosenblum, E.R., Gavaler, J.S., Van Thiel, D.H. *Free Rad. Biol. Med.* **1989**, 7, 569.
- [17] Dahle, L.K., Hill, E.G., Holman, R.T. *Arch. Biochem. Biophys.* **1962**, 98, 253.

- [18] Alessio, H.M. In: Hanninen, O., Packer, L., Sen, C.K. (Eds.), *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*. Elsevier, Amsterdam, **2000**.
- [19] Pryor, W.A., Stanley, J., Blair, E. *Lipids*. **1976**, 11, 370.
- [20] Tarladgis, B.G., Watts, B.M. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1960**, 37, 403.
- [21] Sinnhuber, R.O., Yu, T.C. *J. Jap. Oil Chem. Soc.* **1977**, 26, 259.
- [22] Bird, R.P., Draper, H.H. *Meth. Enzymol.* **1984**, 105, 299.
- [23] Shaw, C.A., Taylor, E.L., Megson, I.L., Rossi, A.G. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. **2005**, 100, 67.
- [24] Joosten, E. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2001**, 39, 717.
- [25] Singer, B., Kusmierck, J.T. *Annu. Rev. Biochem.* **1982**, 51, 655.
- [26] Parsons, R., Li, G.M., Longley, M.J., Fang, W.H., Papadopoulos, N., Jen, J., de la Chapelle, A., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Modrich, P. *Cell*. **1993**, 75, 1227.
- [27] Lee, Y.S., Wurster, R.D. *Cancer Lett.* **1994**, 1, 19.
- [28] Cirak, B., Inci, S., Palaoglu, S., Bertan, V. *Clin. Chim. Acta*. **2003**, 327, 103.
- [29] Wolff, S.P., Dean, R.T. *Biochem. J.* **1987**, 245, 243.
- [30] Scott, B., Deman, A., Peeters, P., Van den Branden, C., Stolear, J.C., Van Camp, G., Verbruggen, D. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2003**, 18, 737.
- [31] Coyle, J.T., Puttfarcken P. *Science*. **1993**, 262, 689.
- [32] Marchasson, I.B., Beauvieux, M.C.D., Peuchant, E., Harston, S.R., Decamps, A., Reignier, B., Emeriau, J.P., Rainfray, M. *Age and Ageing*. **2001**, 30, 235.
- [33] Sato, N., Fujii, K., Yuge, O., Morio, M. *J. Appl. Toxicol.* **1992**, 12, 365.
- [34] De Zwart, L.L., Meerman, J.H.N., Commandeur, J.N.M, Vermeulen, N.P.E. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, 26, 202.
- [35] Gupta, R.S., Gupta, E.S., Dhakal, B.K., Thakur, A.R., Ahn, J. *Molecules and Cells*. **2003**, 17, 132.

- [36] Abd-Elghaffar, S.Kh., El-Sokkary, G.H., Sharkawy, A.A. *Neuro. Endocrinol. Lett.* **2005**, 26, 609.
- [37] Sidorov, V.S., Nomova, N.N., Vysotskaia, R.U., Feklov, Iu.A. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* **2002**, 38, 345.
- [38] Poot, M., Verkerk, A., Koster, J.F., Esterbauer, H., Jongkind, J.F. *Mech. Ageing Dev.* **1988**, 43, 1.
- [39] Corongiu, F.P., Poli, G., Dianzani, M.U. *Chem. Biol. Interact.* **1986**, 59, 147.
- [40] Mendis, S., Sobotka, P.A., Euler, D.E. *Clin. Chem.* **1994**, 40, 1485.
- [41] Allerheiligen, S.R.B., Ludden, T.M. *Drug Metab. Dispos.* **1987**, 15, 794.
- [42] Lawson, J.A., Rokach, J., FitzGerald, G.A. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 24441.
- [43] Roberts, L.J., Morrow, J.D. *Ann. NY Acad. Sci.* **1994**, 744, 237.
- [44] Han, D., Loukianoff, S., McLaughlin, L. In: Hanninem, O., Packer, L., Sen, C.K. (Eds.), *Handbook of oxidants and antioxidants in exercise*. Elsevier, Amsterdam, **2000**.
- [45] Slatter, D.A. Bolton, C.H., Bailey, A.I. *Diabetologia.* **2000**, 43, 550.
- [46] Del Rio, D., Pellegrini, N., Colombi, B., Bianchi, M., Serafini, M., Torta, F., Tegoni, M., Musci, M., Brighenti, F. *Clin. Chem.* **2003**, 49, 690.
- [47] Lepage, G., Munoz, G., Champagne, J., Roy, C.C. *Anal. Biochem.* **1991**, 197, 277.
- [48] Liu, J., Yeo, H.C., Doniger, S.J., Ames, B.N. *Anal. Biochem.* **1997**, 245, 161.
- [49] Nielsen, F., Mikkelsen, B.B., Nielsen, J.B., Andersen, H.R., Grandjean, P. *Clin. Chem.* **1997**, 43, 1209.
- [50] Templar, J., Kon, S.P., Milligan, T.P., Newman, D.J., Raftery, M.J. *Transplantation.* **1999**, 14, 946.

- [51] Grotto, D., Santa Maria, L.D., Boeira, S., Valentini, J., Charão, M.F., Moro, A.M., Pomblum, V.J, Nascimento P.C., Garcia, S.C. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, 43, 619.
- [52] Karatas, F., Karatepe, M., Baysar, A. *Anal. Biochem.* **2002**, 311, 76.
- [53] Folmer, V., Santos, F.W., Savegnago, L., Brito, V.B., Nogueira, C.V., Rocha, J.B. *Toxicol. Lett.* **2004**, 153, 333.
- [54] Draper, H.H., Csallany, A.S., Hadley, M. *Free Rad. Biol. Med.* **2000**, 29, 1071.
- [55] Oter, S., Korkmaz, A., Topal, T., Ozcan, O., Sadir, S., Ozler, M., Ogur, R., Bilgic, H. *Clin. Biochem.* **2005**, 38, 706.
- [56] Hong, Y., Yeh, S., Chang, C., Hu, M. *Clin. Biochem.* **2000**, 33, 619.
- [57] Gonçalves, T.L., Erthal, F., Corte, C.L.D., Muller, L.G., Piovezan, C.M., Nogueira, C.W., Rocha, J.B,T. *Clin. Biochem.* **2005**, 38, 1071.
- [58] Lykkesfeldt, J. *Clin. Chem.* **2001**, 47, 1725.
- [59] Pilz, J., Meineke, I., Gleiter, H.C. *J. Chromatogr. B.* **2000**, 742, 315.
- [60] Ohkawa, H., Ohishi, N. *Anal. Biochem.* **1979**, 95, 351.
- [61] Yagi, K., Nishigaki, I., Ohama, H. *Vitamins.* **1968**, 37, 105.
- [62] Knight, J.A., Pieper, R.K., Mc Clellan, L. *Clin. Chem.* **1988**, 34, 2433.
- [63] Janero, D.R. *Free Rad. Biol. Med.* **1990**, 9, 515.
- [64] Raharjo, S., Sofos, J.N., Schmidt, G.R. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, 40, 2182.
- [65] Duran, L., Tappel, A.L. *Radiat. Res.* **1958**, 9, 498.
- [66] Almandos, M.E., Giannini, D.H., Ciarlo, A.S., Boery, R.L. *J. Sci. Food Agric.* **1986**, 37, 54.
- [67] Seo, C.W. *J. Food Sci.* **1976**, 41, 594.
- [68] Fukunaga, K., Takama, K., Suzuki, T. *Anal. Biochem.* **1995**, 230, 20.
- [69] Lee, S.H., Csallany, A.S. *Lipids.* **1987**, 22, 104.

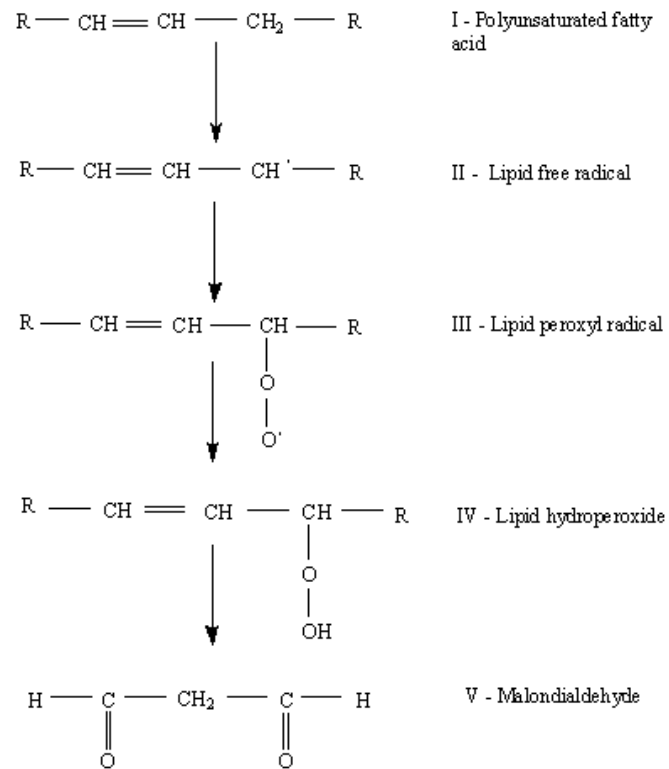


Fig 1. Schematic steps of MDA formation from polyunsaturated fatty acid (Alessio *et al.*, 2000).

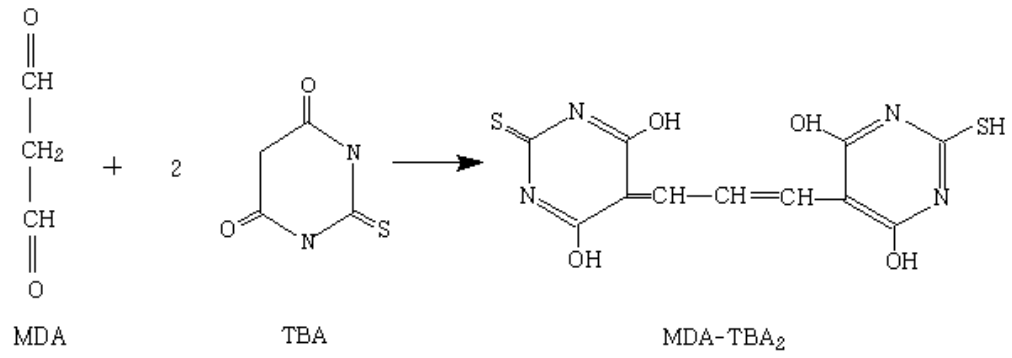


Fig 2. Reaction between MDA and TBA to form the MDA-TBA₂ pigment.

Table 1: HPLC methods with different detectors

Method	RL* μ M	Recovery	RT**(min)	Sample	Reference
HPLC-F ^a	0.47	NS***	3.75	Guinea pig plasma	58
HPLC- UV ^b	0.5	98.8%	1.6	Human serum	52
HPLC- VIS	0.11	101%	7.0	Human plasma	50
HPLC-F ^a	0.2 pmol	NS	2.0	Rat plasma	68
HLPC – UV ^c	2.16	93.6%	7.0	Human plasma	59
HPLC - VIS	4.45	99.14%	1.85	Human plasma	51

* RL = reference level

** TR = retention time

*** NS = not specified

HPLC – F^a = this technique used fluorescent detector.

HPLC-UV^b = direct MDA measurement, without TBA derivatization.

HPLC-UV^c = this method used 2, 4-dinitrophenylhydrazine as derivative

3.2. Manuscrito II

RAPID QUANTIFICATION OF MALONDIALDEHYDE IN PLASMA BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY – VISIBLE DETECTION

¹Grotto, D., ¹Santa Maria, L.D., ¹Boeira, S., ¹Valentini, J., ¹Charão, M.F., ¹Moro, A.M.,
Nascimento P.C., ³Pomblum, V.J, ^{1*}Garcia, S.C.

*¹Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Santa
Maria, RS, Brazil*

²Department of Chemistry, Federal University of Santa Maria, RS, Brazil.

³Department of Medical Clinic, Federal University of Santa Maria, RS, Brazil.

Direct correspondence to PhD Garcia, S.C. (☐ HYPERLINK

"mailto:sgarpom@smail.ufsm.br" sgarpom@smail.ufsm.br).

Solange Cristina Garcia

Universidade Federal de Santa Maria

C.P. 5061 – Campus Universitário

Santa Maria – RS – Brasil

CEP.: 97110-970

Tel.: + 55 55 3220-8941

Fax: + 55 55 3220-8018

ABSTRACT

Background: Malondialdehyde (MDA) is one of the better-known secondary products of lipid peroxidation, and it is widely used as an indicator of cellular injury. The employment of the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) technique to measure MDA has received criticism over the years because of its lack of specificity. Thus, a specific and reliable method for MDA determination in plasma by HPLC-VIS was validated; alkaline hydrolysis, n-butanol extraction steps and MDA stability were established.

Methods: The plasma underwent alkaline hydrolysis, acid deproteinization, derivatization with TBA and n-butanol extraction. After this, MDA was determined at 532 nm by HPLC-VIS. The method was applied to 65-year-old subjects from a retirement home.

Results: The assay was linear from 0.28 to 6.6 μM . The reproducibility of intra-run was obtained with $\text{CV}\% < 4\%$ and the inter run with $\text{CV}\% < 11\%$. The accuracy (bias) ranged from 2 to -4.1% , and the recovery was greater than 95%. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were 0.05 μM and 0.17 μM , respectively. For the stability test, every sample was stored at -20°C . The plasma MDA was not stable when stored after the alkaline hydrolysis step, remained stable for thirty days after TBA derivatization storage and was stable for three days when stored after n-butanol extraction. The elderly subjects had MDA plasma levels of $4.45 \pm 0.81 \mu\text{M}$ for women and $4.60 \pm 0.95 \mu\text{M}$ for men.

Conclusion: The method is reproducible, accurate, stable, sensitive, and can be used in the routines in clinical laboratories. Besides, this technique presents advantages such as the complete release of protein bound MDA with the alkaline hydrolysis step,

the removal of interferences with n-butanol extraction, mobile phase without phosphate buffer and rapid analytical processes and run times.

Keywords: MDA; HPLC-VIS; human plasma; alkaline hydrolysis; n-butanol extraction.

1. Introduction

Free radicals and reactive oxygen species (ROS) are continuously produced by cells as part of their metabolic processes [1]. The overproduction of reactive species results in oxidative stress, a combination of an increased formation of oxygen-nitrogen derived radicals and reduced antioxidant capacity, causing an imbalance that always results in the attack of cellular components, especially lipids [2].

Malondialdehyde (MDA) is one of the better-known secondary products of lipid peroxidation, and it can be used in biomaterials as an indicator of cell membrane injury [3], being that oxidative stress has been implicated in the pathogenesis of various diseases, including diabetes [4], cancer [5], atherosclerosis [6,4], renal [7] and Alzheimer diseases [8].

A variety of methods described in the literature allow the detection and determination of MDA in biological matrices. The main method utilized is the reaction of MDA with thiobarbituric acid (TBA). In 1968, Yagi *et al.* [9] applied the reaction of TBA with MDA and linked chromogens to lipoperoxides in biomaterials, resulting in the well-know method, "thiobarbituric acid reactive substances" (TBARS). Its product can be detected by colorimetry (532-535 nm) or fluorimetry (excitation at 532 nm and emission at 553 nm) [10]. Although this method is easy and inexpensive, the use of the TBARS test has received wide criticism over the years. The major problem with this method is the lack of specificity, since TBA reacts with a variety of compounds, such as sugars, amino acids, a variety of aldehydes and bilirubin, producing interference with colorimetric and fluorimetric measurements of MDA [10,11].

Therefore, several high performance liquid chromatographic (HPLC) methods have been reported for the determination of MDA, with colorimetric and fluorimetric

detection [12-16]. This technique is more specific, reliable and reproducible, as MDA is separated from other interfering substances.

In recent years, several innovations have been introduced to improve the specificity of the old procedures. One of these is the difference between detection of free MDA and total plasma MDA [13]. Free MDA is unbound to plasma proteins and it can be detected without any hydrolytic sample treatment. On the other hand, a significant amount of MDA may be bound to matrix molecules, and therefore undetectable without an adequate step to liberate it [17].

In this work, a rapid method with a plasma alkaline hydrolysis step is presented to quantify MDA by a chromatographic procedure based on an isocratic elution without phosphate in the mobile phase. Furthermore, sample and reaction stability were evaluated, time-dependent analysis conditions were established and a sample extraction step with n-butanol was added to improve the method.

2. Material and methods

2.1. Chemicals and reagents

HPLC grade methanol and n-butanol were purchased from Tedia Company (Fairfield, USA). Thiobarbituric acid and malondialdehyde bis (dimethylacetal) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All the other chemicals used were of analytical grade. Aqueous solutions were prepared in Milli-Q water (Millipore, Bedford, MA, USA).

2.2. Instrumentation and chromatographic conditions

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 µl 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 Milli-Q water and methanol (50:50 v/v).

The flow rate was maintained isocratically at 0.6 ml/min, the absorbance of the eluent was monitored at 532 nm and the total run time was 8 min. The column was thermostated at 40°C in a thermostatisation system for chromatographic columns (Chromacon®).

2.3. Sample preparation

2.3.1. Standard solutions

Malondialdehyde bis (dimethylacetal) – MDA was used as standard. After water dilution, 3 mM MDA stock solution was stored in aliquots of 200 µl at -20°C and remained stable for at least 18 months. To prepare MDA working standard solutions, 3 mM solution was diluted in water obtaining concentrations ranging from 0.28 to 6.6 µM. These solutions were prepared daily.

2.3.2. Blood samples

The Ethics Committee of the Center of Health Sciences approved the study and all participants gave informed consent.

Blood samples (5 ml) from humans were drawn by venipuncture into 7 ml evacuated tubes containing an EDTA solution as anticoagulant. Blood samples were maintained at 0 to 4°C until centrifugation.

2.3.3 Sample procedure

The blood samples were centrifuged at 1500 x *g* for 10 min in refrigerated centrifuge (4°C) and supernatant plasma was removed with care to avoid contamination with platelets.

A volume of 75 µl of plasma was added to 25 µl of standard or water and 25 µl of NaOH 3N and incubated at 60°C for 30 min in a shaking water bath system. After this, 125 µl of H₃PO₄ 6% and 125 µl of TBA 0.8% were added and the mixture was heated at 90°C for 45 min. Then, the mixture was cooled, 50 µl of 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) was added and extraction with 300 µl of n-butanol was carried out by vortex-mixed for 1 min and centrifuged at 3000 *g* for 10 min. 20 µl of the butanol layer was injected into HPLC with a visible detector, using a reverse-phase column and eluted as described previously.

2.4. Assay validation

2.4.1. Linearity, precision, accuracy, recovery and sensitivity

Linearity is the ability to show that the results are directly proportional to the analyte concentrations in samples within a given range. This was determined by 5 analytical curves with 0.28, 0.56, 1.7, 3.4, and 6.6 µM of MDA spiked in plasma.

Plasma without spiked MDA was considered to be a basal level. The curves were prepared on five different days, with five different plasma samples, and the linear regression was evaluated.

The precision of a method is determined by the extent to which the test results of multiple injections of standards agree. It can be subdivided into repeatability or intra-run precision and intermediate precision or inter-run. Accuracy is the extent to which the results generated approached the real value. The intra- and inter-run precisions and accuracy of the method were evaluated on five separated days, with five different plasma samples. Three standard concentrations (0.28, 1.7 and 6.6 μM) were carried out in replicate and injected into HPLC in triplicates. The intra- and inter-run precisions were calculated by variation coefficient, in percentage. The accuracy was expressed as a percentage of bias.

Recovery is reported as the extraction efficiency of an analytical process, reported in percentage. Recovery was conducted by comparing peak areas of replicates from plasma spiked with MDA (0.28 to 6.6 μM) with those of aqueous standards. It was prepared on five different days, with five different biological samples.

The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were calculated on the basis of a signal-to-noise ratio of 3:1 and 10:1, respectively [15].

2.4.2. Stability

For the assessment of MDA stability in plasma after storage, a fresh sample was drawn and separated in aliquots. A replicate was analyzed at the time of collection. Part of the sample underwent alkaline hydrolysis, was stored at -20°C and was analyzed after 24 h. For yet another part of the plasma, the reaction progressed

until reaching TBA derivatization, was stored at -20°C and was analyzed over a 30-day period. Finally, all reaction steps were developed, stored at -20°C and MDA plasma stability after extraction with n-butanol was evaluated at 1, 2, 3 and 4 days.

The MDA working standard solution stability was also tested. Solutions of 80.0, 20.6 and 3.4 μM were prepared at the time of the analyses and their peak areas were measured at the time of the test and after 6 h.

2.4.3. Ruggedness

The ruggedness of the method was tested in plasma samples by varying several chromatographic parameters, such as mobile phase pH, mobile phase composition, flow rate, temperature, chromatographic columns, and analysts.

2.4.4. Application

Blood samples were collected from 45 women and 20 men from two retirement homes in Santa Maria. All subjects were 70 ± 10 years and they did not smoke or drink, and did not practice exercise. Moreover, a nutritionist controlled their diets.

2.4.4. Statistical methods

The analysis of the data was carried out using software SPSS 10.0 for windows with Student's t-test for independent samples. All results were expressed as mean \pm standard deviation. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results and discussion

3.1. Chromatographic separation

The chromatographic separation of plasma MDA was satisfactory with a mobile phase of Milli-Q water:methanol (50:50). Typical chromatograms of extracted aqueous blanks and plasma spiked with MDA (concentration of 1.7 μM) are shown in Fig. 1. The relative retention time for MDA was 1.8 min and the total chromatographic run time was 8 min, demonstrating that the method is quick and a large number of analyses can be done during one day.

It is well-known that high concentrations of phosphate salts in mobile phase, such as 50 mM [16,18,19] can precipitate on the chromatographic system or chromatographic column and increase chromatographic pressure or damage the system. Therefore, this problem was not observed because it was not used KH_2PO_4 in this methodology.

To confirm the best chromatographic conditions, several parameters were tested, including different KH_2PO_4 concentration, methanol percentage and temperature of the column (Fig. 2). It was observed that there was not difference in the peak area without KH_2PO_4 . Furthermore, the methanol percentage variation was tested, from 35 to 50%, and the best peak area was found with 50% of methanol. The temperature of the column was checked between 25 and 45°C. The peak area was notably increased when the temperature increased. This occurred up to 40°C; above this, the peak area decreased and the efficiency of the column was altered.

3.2. Validation

3.2.1. Linearity, precision, accuracy, recovery and sensitivity

After choosing the pre-treatment procedure and establishing the chromatographic conditions for the analysis, the method was validated [20,21]. Biological samples were collected and analytical plasmatic curves were prepared with pooled human plasma in duplicate, on five different days by different analysts. The concentration of plasma not spiked with MDA was determined as the basal level. The pooled human plasma was spiked with 0.28, 0.56, 1.7, 3.4 and 6.6 μM of MDA. Analytical aqueous curves were obtained with the same concentrations as for MDA.

Linearity and reproducibility were evaluated by linear regression. The equations obtained by the least squared regression were $y = 4.7412x + 2.0451$ for plasma curves and $y = 4.9665x - 0.0387$ for aqueous curves, and the values to r^2 were 0.9984 and 0.9995 for plasma and aqueous curves, respectively. Analytical curves (i.e., peak area of each concentration from spiked plasma against area from aqueous MDA standards) showed excellent linearity and parallelism between MDA aqueous standard solutions over the concentration range of 0.28 – 6.6 μM with a correlation coefficient > 0.995 .

The intra-and inter-run precision (expressed in percentage by variation coefficient) and the accuracy (expressed as percentage of bias) based on peak area ratios are presented in Table 1. The overall intra-run precision was less than 4% and the inter-run precision for all concentrations was less than 15%. The assay bias ranged from 2.0% to – 4.1%.

The analytical plasma recovery was calculated in plasma spiked with 0.28, 0.56, 1.7, 3.4 and 6.6 μM of MDA, which had recoveries of 97.5, 98.9, 100.7, 95.9

and 102.7 %, respectively. This demonstrated that MDA was preserved during all pre-treatment procedures.

LOD and LOQ were determined evaluating the signal-to-noise, resulting in 0.05 μM for LOD and 0.17 μM for LOQ.

3.2.2. *Stability*

For the stability of plasma samples stored at -20°C after the different reaction steps, the results are shown in Fig. 3. Samples stored after alkaline hydrolysis were found to be unstable. There was a high loss of MDA when the plasma was stored after this step (about 50%). However, when the sample was stored after TBA derivatization, it was stable for 30 days. After extraction with n-butanol, the sample remained stable only for 3 days. All the samples above were stored at -20°C .

In relation to the MDA working standard solution stability, the solutions did not prove to be stable. It was only possible to use these solutions at the time of their preparation. MDA was degraded after 6 h, even though the solutions were stored at -20°C .

3.2.3. *Ruggedness*

Methodological robustness was considered satisfactory under different chromatographic conditions, such as chromatographic columns and mobile phase constituents of different production lots. Samples of different subjects were provided on different days and separate analysts carried out the procedure. The temperature ranged from 38 to 42°C and the flow rate from 0.5 to 0.7, with satisfactory results. The results found during the validation showed that this method could be used suitably for plasma MDA quantification.

3.3. MDA quantification and application

Although the determination of MDA is one of the most commonly used methods for monitoring lipid peroxidation in biological samples and various HPLC-based TBA methods exist, the results often vary with the method used. By using a modified HPLC-based TBA test including an alkaline hydrolysis of the plasma, the present study provided an MDA plasma level of $4.45 \pm 0.81 \mu\text{M}$ for women and $4.60 \pm 0.95 \mu\text{M}$ for men, considering the plasma dilution.

To ensure that no lipid oxidation occurs during the assay, it is common to add BHT, an antioxidant, to the plasma before TBA incubation. However, the study by Pilz et al. [17] demonstrated clearly that the reduced MDA level is merely the effect of ethanol alone and not of the BHT. In this work, it was tested a plasma aliquot with ethanol and others with and without BHT. The results obtained were $6.0 \mu\text{M}$ for samples without BHT, $2.8 \mu\text{M}$ for sample with BHT and $2.8 \mu\text{M}$ with ethanol, showing that the reduction in the level of MDA is due to the effect of ethanol, probably by the deproteinization effect. Therefore, it was not include BHT in this study.

Alkaline hydrolysis is a critical step, being that MDA can be both free and bound to proteins, and the majority of the research has measured only free MDA. In a recent study, it was found that the alkaline hydrolysis of plasma with NaOH led to a nearly twofold increase in the MDA-TBA level [13]. Here, both free and bound MDA were analyzed, and the results obtained were $2.2 \mu\text{M}$ and $5.5 \mu\text{M}$ to free and bound MDA, respectively, showing that the bound MDA level is actually twofold bigger than the free MDA level. The concentration of NaOH and the hydrolysis time were also tested. For the NaOH concentration, there was no significant difference in 3 and 6N, therefore 3N was chosen. The hydrolysis time ranged from 30 to 60 min, without a difference in the MDA level.

3.4. Advantages of the method

In the present method, MDA measure can be carried out thirty days after derivatization with TBA if the samples are kept at adequate temperature (-20°C). Stability is an important methodological aspect in human disease and oxidative stress studies, as it is possible to carry out posterior analyses, without false results.

In addition, the alkaline hydrolysis step was important because it led to a more complete and uniform release of protein bound MDA and it gave the real value of MDA in the subjects.

The method was improved with the n-butanol extraction step before injection into the chromatographic system. The extraction removed the interferences and extended the lifetime of the column by removing contaminants from the incubation mixture.

An important modification of the method was the mobile phase without using the KH_2PO_4 . The employ of water and methanol in mobile phase prevented the damage of the chromatographic system.

Plasma MDA quantification is of interest because the alteration of their levels may reflect similar variations in less accessible tissues, and it is well-known that MDA is a good marker of oxidative stress in a large number of diseases.

4. Conclusion

An analytical method for plasmatic MDA quantification by HPLC-VIS was optimized and validated using TBA derivatization. TBA is not expensive, and visible spectrophotometric detection is widely utilized. Moreover, the optimized method is very simple. The results obtained for elderly subjects were considered to be reference values for this age band.

The method presented advantages such as the complete release of protein bound MDA with the alkaline hydrolysis step, extraction with n-butanol, which extracted interferences, and the optimization of chromatographic conditions, including no salt concentrations in the mobile phase. Moreover, the stability of plasmatic MDA was studied at different steps of the methodology, showing that the plasma sample after derivatization with TBA is stable for 30 days, which is important for studies on oxidative stress for posterior analyses with real values.

The analytical process is rapid and the run time of each sample is just 8 min. The method is stable, accurate, reproducible, sensitive and can be used in routines in clinical laboratories.

Acknowledgements:

The authors would like to thank DAAD (Deutscher Akademischer Austauschdienst), Wissenschaftliche Gerätebau Dr. Ing. Herbert Knauer GmbH for HPLC apparatus support and to CNPq for providing fellowships.

References

- [1] Urso, M.L., Clarkson, P.M. Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation. *Toxicology* 189 (2003) 41-54.
- [2] Gillham, B., Papachristodoulou, D.K., Thomas, J.H. *Will's: Biochemical basis of medicine*. Butterworth- Heinemann, Chapter 33 (1997) 343-354.
- [3] Esterbauer, H., Schaur, R.J., Zollner, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynoneal malondialdehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* 11 (1991) 81-128.
- [4] Kesavulu, M.M., Rao, B.K., Giri, R., Vijaya, J., Subramanyam, G., Apparao, C. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme status in type 2 diabetics with coronary heart disease. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 53 (2001) 33-39.
- [5] Cerutti, P.A. Oxy-radicals and cancer. *The Lancet* 344 (1994) 862-863.
- [6] Halliwell, B. Free radicals and vascular disease: how much do we know? *B. M. J.* 307 (1993) 885-886.
- [7] Scott, B., Deman, A., Peeters, P., Van den Branden, C., Stolear, J.C., Van Camp, G., Verbrillen, D. Cardiac troponin T and malondialdehyde modified plasma lipids in haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 18 (2003) 737-742.
- [8] Joosten, E. Homocysteine, vascular dementia and Alzheimer's disease. *Clin. Chem. Lab. Med.* 39 (2001) 717-720.
- [9] Yagi, K., Nishigaki, I., Ohama, H. Measurement of serum thiobarbituric acid-value. *Vitamins* 37 (1968) 105-112.
- [10] Knight, J.A., Pieper, R.K., Mc Clellan, L. Specificity of the thiobarbituric acid reaction: its use in studies of lipid peroxidation. *Clin. Chem.* 34 (1988) 2433-2438.

- [11] Sinnhuber, R.O., Yu, T.C. The 2-thiobarbituric acid reaction, an objective measure of the oxidative deterioration occurring in fats and oils. *J. Jap. Oil Chem. Soc.* 26 (1977) 259-267.
- [12] Bird, R.P., Hung, S.S., Hadley, M., Draper, H.H. Determination of malondialdehyde in biological materials by high pressure liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 128 (1983) 240-244.
- [13] Hong, Y.L., Yeh, S.L., Chang, C.Y., Hu, M.L. Total plasma malondialdehyde levels in 16 Taiwanese college students determined by various thiobarbituric acid test and an improved high performance liquid chromatography-based method. *Clin. Biochem.* 33 (2000) 619-625.
- [14] Lepage, G., Munoz, G., Champagne, J., Roy, C.C. Preparative steps necessary for the accurate measurement of malondialdehyde by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 197(1991) 277-283.
- [15] Nielsen, F., Mikkelsen, B.B., Nielsen, J.B., Andersen, H.R., Grandjean, P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clin. Chem.* 43 (1997) 1209-1214.
- [16] Templar, J., Kon, S., Milligan, T., Newman, D., Raftery, M. Increased plasma malondialdehyde levels in glomerular disease as determined by a fully validated high performance liquid chromatography. *Nephrol. Dial. Transplant.* 14 (1999) 946-951.
- [17] Pilz, J., Meineke, I., Gleiter, C.H. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. *J. Chromatogr. B* 742 (2000) 315-325.
- [18] Wong S.H., Knight J.A., Hopfer S.M., Zaharia, O., Leach, C.N., Sunderman, F.W. Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of MDA-TBA adduct. *Clin. Chem.* 33 (1987) 214-220.

- [19] Lykkesfeldt J., Determination of malondialdehyde as dithiobarbituric acid adduct in biological samples by HPLC with fluorescence detection: comparison with ultraviolet-visible spectrophotometry. *Clin. Chem.* 47 (2001) 1725-1727.
- [20] Causon, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: viewpoint and discussion. *J. Chromatogr. B* 689 (1997) 175-180.
- [21] Bakshi, M., Singh, S. Development of validated stability-indicating assay methods- critical review. *J. Pharm. Biomed. Analysis* 28 (2002) 1011-1040.

Table 1

Validation data precision and accuracy for plasma spiked with MDA (n = 5).

Concentration (μM)	Intra-run precision (%)	Inter-run precision (%)	Accuracy (% bias)
0.28	2.80	10.4	-3.2
0.56	3.74	7.7	-1.1
1.7	0.9	10.9	0.7
3.4	3.9	11.0	-4.1
6.6	3.64	9.8	1.8

List of Legends:

Fig. 1: It shows a typical MDA chromatogram. In A, aqueous blank; in B, plasma spiked with MDA 1.7 μ M, both extracted with n-butanol.

Fig. 2: Parameters analyzed to verify the best chromatographic conditions. A) Change in KH_2PO_4 concentration. Peak areas did not show important difference, thus the best concentration to the chromatographic system is with water. B) Variation of methanol percentage in mobile phase; 50% was the option. C) Temperature was tested from 25 to 45°C and the best peak area and column efficiency was obtained with 40°C.

Fig. 3: Stability of the samples stored at -20°C . Day 0 represents the MDA measured on time of the draw. In A, MDA was measured after alkaline hydrolysis step, in 24 and 48 h of storage. In B, samples were stored after TBA derivatization. In C, there were extraction of the sample with n-butanol; after this, aliquots were stored and analyzed in four days.

Fig. 1

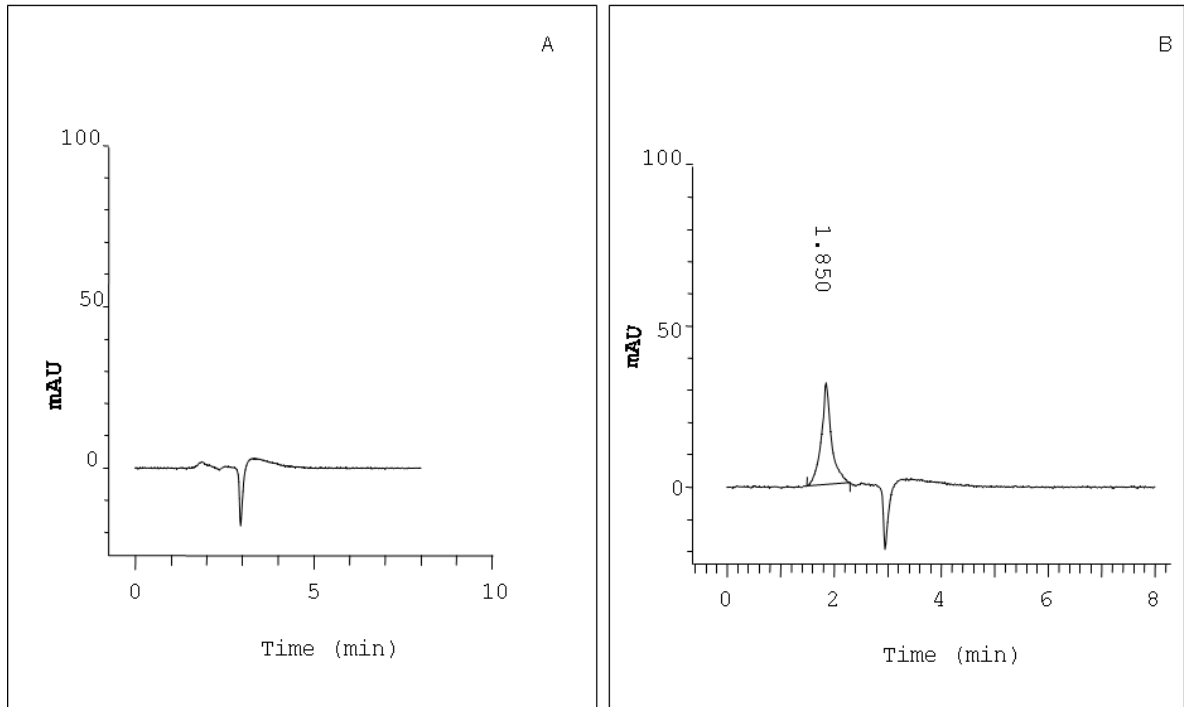


Fig. 2

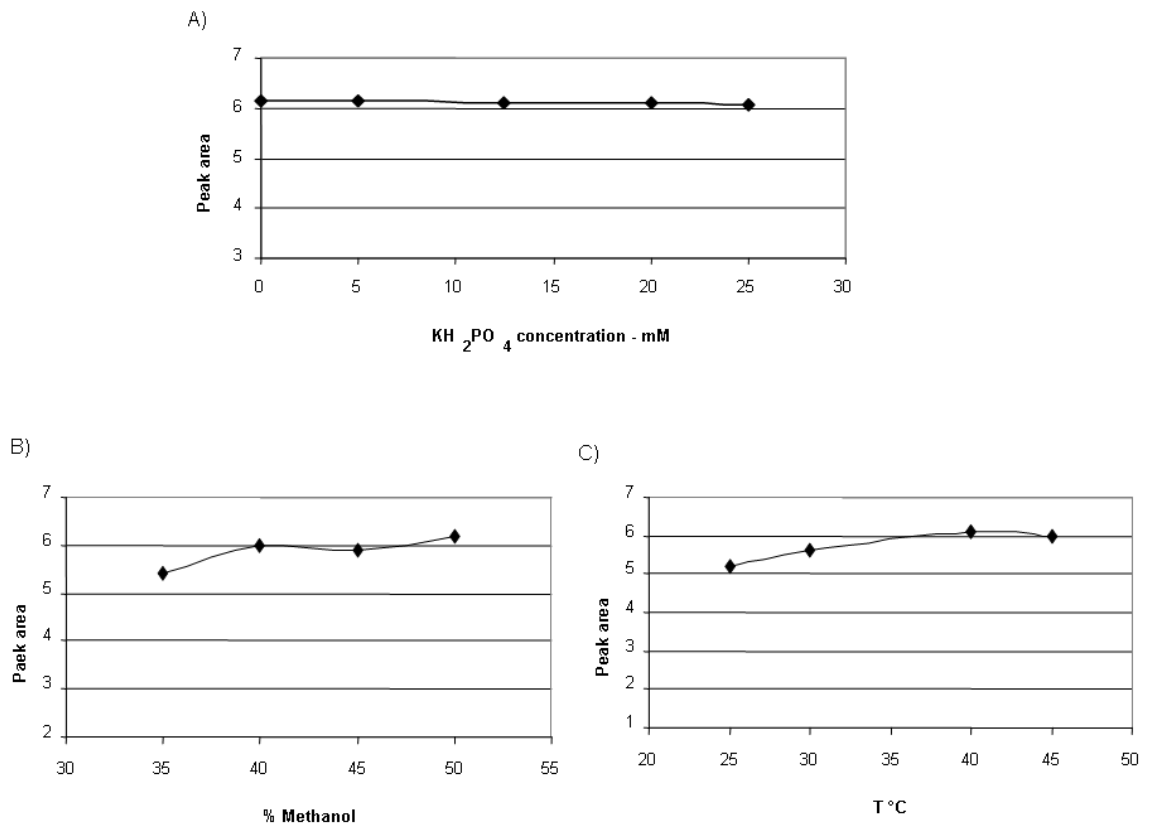
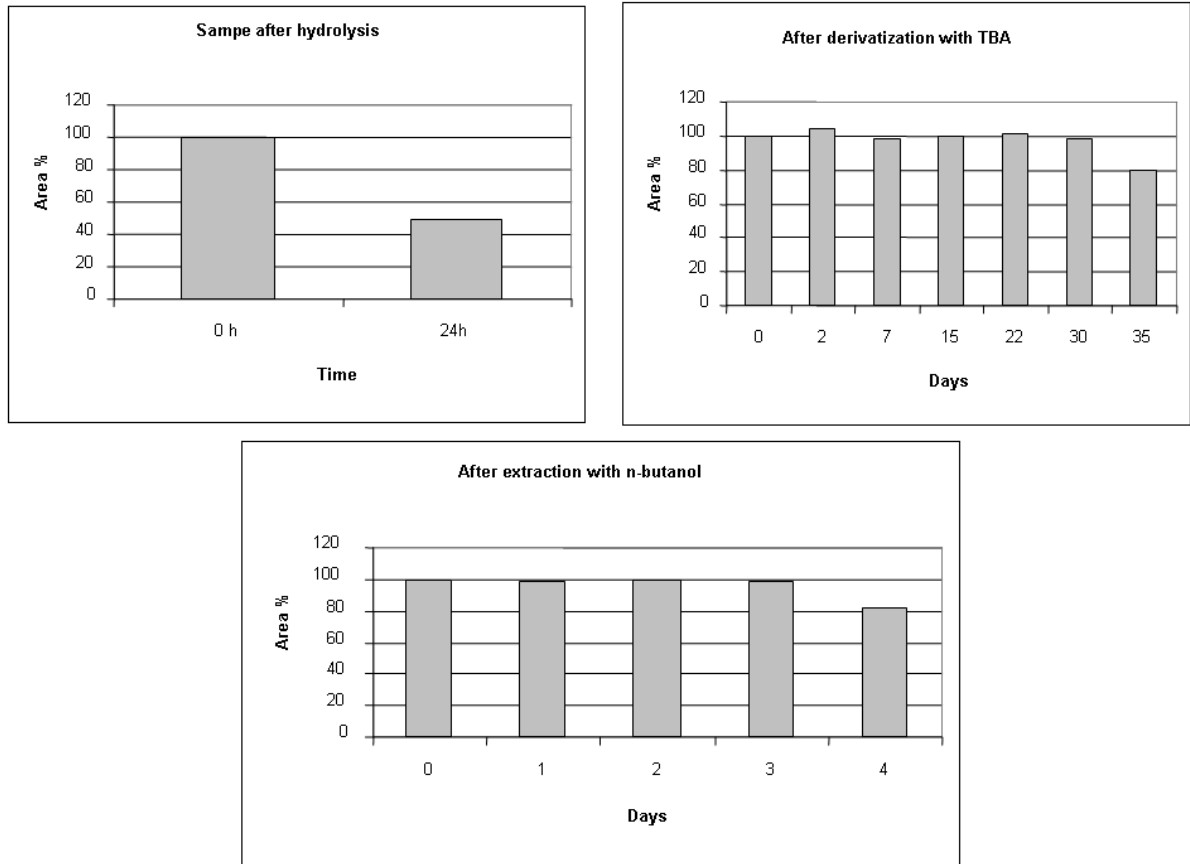


Fig. 3



3.3. Manuscrito III

AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO MARCADOR PLASMÁTICO DO ESTRESSE OXIDATIVO - MALONDIALDEÍDO

Denise Grotto¹, Juliana Valentini¹, Silvana Boeira¹, Juliana Vicentini¹, Lucas Santa Maria¹, Angela Moro¹, Mariele Charão¹ e Solange Cristina Garcia^{1*}

¹Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal de Santa Maria, CP 5061, 97110-970 Santa Maria - RS, Brasil.

Simone Gonçalves Cardoso^{II}

^{II}Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria, CP 5061, 97110-970 Santa Maria - RS, Brasil.

*Corresponding author:

PhD Solange Cristina Garcia (sgarpom@smail.ufsm.br)

EVALUATION OF THE STABILITY OF THE OXIDATIVE STRESS PLASMATIC BIOMARKER - MALONDIALDEHYDE

ABSTRACT

Malondialdehyde (MDA) is one of the lipid peroxidation products widely used as indicator of cellular injury. However, the short-term and the long-term stability of this biomarker remain unclear. The objective of this work was to evaluate the stability of plasmatic MDA at -20°C , utilizing thiobarbituric acid (TBA) as derivative in spectrophotometric and chromatographic analysis. The results showed that MDA was stable for 24 hours after the blood collection, was not stable when stored after alkaline hydrolysis step, remained stable for 30 days after TBA derivatization and was stable for 3 days when stored after n-butanol extraction, all at -20°C .

Keywords: oxidative stress, malondialdehyde, stability.

INTRODUÇÃO

As espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio são produzidas de forma contínua pelas células como parte de seus processos metabólicos¹. O desequilíbrio entre a formação e a remoção destas espécies, incluindo os radicais livres, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos, devido à menor formação ou maior consumo, ou ainda do aumento da geração de espécies oxidantes, gera um estado pró-oxidante. Este processo favorece a ocorrência de ataques dessas espécies reativas a componentes celulares, especialmente lipídeos². Assim, a peroxidação lipídica provoca dano tecidual, o qual está relacionado com a patogênese de várias doenças, entre elas aterosclerose^{3,4}, diabetes⁴, doenças renais⁵ e Alzheimer⁶.

Muitos biomarcadores vêm sendo utilizados para avaliar o estresse oxidativo, dentre eles malondialdeído (MDA)⁷, dienos conjugados⁸, gases etano e pentano⁹, isoprostanos¹⁰, 4-hidroxi-nonenal (4-HNE)¹¹, modificações de proteínas¹² e modificações no DNA¹³. O MDA, porém, é um dos biomarcadores mais utilizados por ser um dos produtos secundários da peroxidação lipídica mais conhecidos¹¹.

No entanto, os biomarcadores do estresse oxidativo são, geralmente, muito reativos e instáveis. Dessa forma, sua análise em amostras biológicas é muito importante, uma vez que resultados falsamente alterados possam ser gerados se as análises não forem realizadas sob condições analíticas adequadas. A influência do tempo de processamento das amostras, por exemplo, sobre a estabilidade do MDA não é muito conhecida, e precisa ser muito bem estabelecida antes da sua aplicação na análise de amostras sanguíneas humanas, pois objetiva-se resultados confiáveis e reprodutíveis na rotina laboratorial.

Neste trabalho, usando a metodologia validada por Grotto *et al.*¹⁴, as estabilidades do MDA plasmático e do padrão aquoso foram avaliadas. Diferentes etapas do processamento para análise do MDA por HPLC-VIS, bem como a investigação da estabilidade do MDA pela técnica de TBARS¹⁵ (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) foram realizadas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes

Metanol e n-butanol grau HPLC foram comprados da Tedia Company (Fairfield USA). Ácido tiobarbitúrico, bis-malonildialdeído-dimetil-acetal e 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT) foram comprados de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Todos os outros reagentes usados eram de grau analítico. Soluções aquosas foram preparadas em água Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

Metodologia

A medida de MDA plasmático foi realizada através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), com detecção visível (VIS), segundo Grotto *et al.*¹⁴. A estabilidade do MDA pela técnica de TBARS – VIS foi verificada segundo a metodologia de Ohkawa *et al.*¹⁵ modificada.

Instrumentação e condições cromatográficas

O equipamento consistiu de um sistema cromatográfico Knauer®, modelo WellChrom, com bomba quaternária, reservatório de solventes, misturador, degasser para solventes, injetor manual com alça de amostragem de 20 µl e detector UV-VIS.

O controle cromatográfico, a coleta e o processamento dos dados foram realizados usando o programa EUROCHROM 2000 SOFTWARE®, edição básica 2.05 para Windows.

A separação cromatográfica foi feita utilizando coluna fase reversa C18 Eurospher-100 150 x 4 mm com poro de 5 µm de tamanho e pré-coluna Eurospher-100 5 x 4 mm com poro de 5 µm de tamanho.

A fase móvel consistiu de uma mistura de 2,5 mM de KH_2PO_4 – pH 7,0 e Metanol (50:50 v/v), eluição isocrática com fluxo de 0,6 ml/min. A absorbância do eluente foi monitorada a 532 nm, e o tempo total de análise foi 8 minutos. A coluna foi aquecida a 40 °C pelo sistema termostaticado Chromacon®.

Para TBARS, o equipamento utilizado foi espectrofotômetro Hitachi U-1800.

Preparação das amostras

Soluções padrão

Como padrão, utilizou-se bis-malonildialdeído-dimetil-acetal. Após diluição, alíquotas de 200 µl de solução de MDA na concentração de 3 mM foram armazenadas em tubos plásticos tipo “ependorfs” a –20°C. Estas foram as soluções estoque, e tiveram sua estabilidade verificada durante 18 meses.

As soluções de trabalho foram obtidas por diluição da solução estoque 3 mM, preparada diariamente, com estabilidade verificada ao longo de 1 dia, nas concentrações de 0,28; 0,56; 1,7; 3,4 e 6,6 µM.

Coleta de sangue

As amostras de sangue foram coletadas, após consentimento dos participantes e após aceite, por venopunção, de seis indivíduos saudáveis, com idade entre 20 e 25 anos, em tubos contendo EDTA como anticoagulante. As amostras foram mantidas em banho de gelo até centrifugação, a qual foi feita em centrífuga refrigerada (0-4 °C) a 1500g por 10 min, logo após coleta.

Procedimento para análise de MDA

Por Cromatografia Líquida (CLAE – VIS)

Após centrifugação, o plasma foi separado e um volume de 75 µl foi adicionado a 25 µl de água e 25 µl de NaOH 3N, e incubados a 60 °C por 30 minutos em sistema de agitação horizontal. Depois disto, 125 µl de H₃PO₄ 6% e 125 µl de TBA 0,8% foram adicionados à amostra e a mistura foi aquecida a 90 °C por 45 minutos. Após, 50 µl de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% foram adicionados às amostras, as quais foram homogeneizadas, extraídas com 300 µl de n-butanol após 1 minuto de vórtex, e centrifugadas a 3000g por 10 minutos. 20 µl da fase orgânica foram injetados no cromatógrafo.

Por espectrofotometria – TBARS

200 µl de plasma foram adicionados a 1100 µl de H₃PO₄ 1,4%, 20 µl de BHT 10 mM (diluído em etanol) e 500 µl de TBA 0,6%. A mistura foi aquecida a 90 °C por 45 minutos. Após, 200 µl de SDS 8,7% foram adicionados às amostras, as quais foram homogeneizadas, centrifugadas a 3000g por 10 minutos e lidas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 532 nm.

Protocolo elaborado para a análise de estabilidade

A medida de estabilidade do MDA por CLAE – VIS em diferentes etapas de processamento seguiu-se da seguinte maneira:

- Uma amostra de plasma foi processada em duplicata e quantificada, imediatamente após coleta.
- Alíquotas de plasma foram separadas em ependorffs, armazenadas a 4°C, e analisadas nos tempos zero e 24 horas após coleta.
- Alíquotas de plasma foram separadas em ependorffs, armazenadas a –20°C e analisadas nos tempos zero, 1, 2, 3 e 4 dias após coleta, com e sem o antioxidante BHT.
- Alíquotas de plasma sofreram hidrólise alcalina e foram imediatamente armazenadas a –20°C. Após os tempos zero, 24 e 48 horas, o protocolo foi seguido até as análises cromatográficas.
- Alíquotas de plasma, após hidrólise alcalina, foram derivatizadas com TBA e, logo após, estocadas a –20 °C. Após os tempos zero, 5, 10, 20, 30 e 35 dias, as amostras derivatizadas foram extraídas e quantificadas por cromatografia.
- Finalmente, a reação foi desenvolvida por completo, e a fase orgânica, contendo o MDA, foi armazenada a –20°C. A estabilidade foi avaliada nos tempos zero, 1, 2, 3 e 4 dias.

Além disso, para a verificação da estabilidade das amostras pela técnica de TBARS, uma alíquota de plasma foi analisada no momento da coleta, enquanto que outras foram armazenadas e avaliadas 24 e 48 horas após estocagem a -20°C. Também se investigou a estabilidade do MDA por TBARS após a derivatização da amostra com TBA nos tempos zero, 1, 2, 4 e 10 dias após armazenamento a –20°C.

Análise estatística

Para cada alíquota, a análise estatística foi feita com base na área inicial do pico cromatográfico do MDA, ou seja, tomando-se a área do pico no tempo zero como o máximo de área (100%), e no restante dos tempos como percentagem de área comparada ao tempo inicial. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.

RESULTADOS

Com o presente estudo, pôde-se observar que a solução estoque de MDA 3 mM mostrou-se estável a -20°C ao longo dos 18 meses em que foi analisada. Já com relação à estabilidade das soluções de trabalho de MDA, estas não se mostraram estáveis ao longo do dia. Seu uso foi verossímil somente até 6 horas após diluição, mesmo quando estocada a -20°C , tendo uma perda de mais de 50% após este período. Se armazenada em banho de gelo, a solução de trabalho de MDA mantém sua estabilidade por no máximo 2 horas.

Para a estabilidade do MDA plasmático com e sem o antioxidante BHT, os resultados obtidos estão apresentados na tabela 1. Verificou-se que as amostras de plasma armazenadas a -20°C com BHT são estáveis por 3 dias, contrário às amostras armazenadas sem BHT, que se mostraram estáveis por somente 24 horas, já que no segundo dia houve uma diminuição de 18% na área do pico. Porém, devido a estudos contestando o uso do BHT, testes foram realizados com amostras de plasma com BHT, sem BHT e com etanol, principal diluente do BHT. Os resultados obtidos foram de $2,55 \pm 0,18 \mu\text{M}$ de MDA para as amostras com BHT, $4,60 \pm 0,20 \mu\text{M}$ de MDA para as amostras sem BHT e $2,60 \pm 0,16 \mu\text{M}$ de MDA para as amostras com etanol.

As amostras plasmáticas armazenadas a 4°C apresentaram um grande aumento nos níveis de MDA logo nas primeiras 24 horas. O valor inicial encontrado foi de $4,60 \pm 0,15 \mu\text{M}$, enquanto que após 24 horas este nível passou para $8,74 \pm 0,5 \mu\text{M}$, demonstrando que as amostras, nesta condição de armazenamento, não são estáveis.

Os resultados da concentração de MDA nas outras etapas de processamento são mostrados na tabela 2. Quando as amostras foram estocadas após sofrerem hidrólise alcalina, observou-se uma perda de cerca de 50% logo nas primeiras 24 horas após o armazenamento. Quando, porém, as amostras foram armazenadas a -20°C após sua derivatização com TBA, estas se mostraram estáveis ao longo de 30 dias, perdendo a estabilidade depois deste período (cerca de 20% da concentração de MDA foi perdida). Já após a extração com n-butanol, as amostras permaneceram estáveis por 3 dias quando armazenadas a -20°C. Além disso, um fato importante observado ao longo deste estudo foi que, entre o período de extração com n-butanol e injeção no cromatógrafo, as amostras deveriam permanecer em banho de gelo, pois a temperatura ambiente a coloração mudava visivelmente.

Na tabela 3 observam-se os resultados comparativos entre as duas técnicas – CLAE–VIS e TBARS. Com relação às alíquotas estocadas logo após a coleta, ambas as técnicas demonstraram a mesma estabilidade, sendo estáveis por 24 horas a -20°C. Na etapa de derivatização, o MDA medido por CLAE – VIS mostrou-se estável por 30 dias e o MDA por TBARS por 20 dias. É importante observar a diferença no percentual dos valores da estabilidade do MDA por CLAE e por TBARS. Já no décimo dia de teste, foi possível observar um aumento de cerca de 10% nos valores de TBARS, enquanto que os valores de MDA por CLAE permaneceram praticamente os mesmos (mudança de cerca de 1%).

DISCUSSÃO

O objetivo do estudo foi determinar a estabilidade do MDA em amostras plasmáticas humanas, antes e durante diferentes etapas de reação com TBA, realizadas por CLAE e por TBARS. Além disso, a estabilidade dos padrões aquosos também foi verificada.

Observando-se os resultados, é possível perceber a baixa estabilidade das soluções de trabalho de MDA. Estáveis por no máximo 2 horas em banho de gelo, estas soluções devem ser manipuladas logo após sua diluição, evitando assim valores errôneos, principalmente quando curvas de calibração são feitas. Por outro lado, a solução estoque de MDA mostrou ter um bom tempo de estabilidade a -20°C , podendo ser utilizada por até 18 meses, sem qualquer perda.

O uso do BHT como antioxidante poderia prevenir a peroxidação lipídica durante os procedimentos⁷. Ele, porém é dissolvido em etanol e metanol, solventes que podem ser utilizados como desproteinizantes, e Pilz²¹ e colaboradores verificaram que a solução etanólica por si só reduzia os valores de MDA por provocar uma desproteíntização antes que ocorresse a hidrólise das proteínas, levando assim a uma perda por co-precipitação. Este fato foi verificado também neste estudo, realizando-se testes com amostras plasmáticas com o antioxidante BHT, sem o BHT e com o etanol, diluente do BHT. Os valores encontrados foram realmente os mesmos tanto para amostras com BHT quanto para amostras com etanol, além de se mostrarem diminuídos quando comparados aos resultados de amostras sem BHT. Assim, este procedimento pode contribuir para obtenção de resultados falsamente diminuídos, e, dessa forma, o BHT não foi empregado no protocolo de preparação da amostra. O volume de amostra utilizado por Grotto *et al*¹⁴ é apenas 75 μl de plasma e uma adição de 25 μl de BHT etanólico pode

desproteínizar a amostra antes que todo o MDA seja hidrolisado, alterando de maneira ilusória os valores reais deste biomarcador.

Com relação às amostras plasmáticas, os resultados encontrados neste estudo servem como referência, uma vez que são raros os estudos abordando este importante parâmetro¹⁶. Assim, as amostras plasmáticas estocadas a -20°C , logo após a coleta, mostraram-se estáveis somente nas primeiras 24 horas, indicando o cuidado que se deve ter em estudos epidemiológicos para que não haja uma falsa alteração dos níveis de MDA, causada pela demora no processamento da amostra. Em contraste, Wu *et al.*¹⁶ observaram que o MDA não se mostrou estável em 24 e 36 horas após armazenamento em gelo; porém, os níveis de MDA aumentaram ao longo deste tempo. Além disso, há vários trabalhos que estocam o plasma logo após sua separação dos eritrócitos, contudo, o tempo de armazenagem não é constatado^{17, 18,19}. Wong *et al.*²⁰ diz que as amostras não devem ser estocadas por mais de 24 horas quando armazenadas a 4°C . Neste estudo, também se pôde verificar que as amostras plasmáticas, quando armazenadas a 4°C , não se mostraram estáveis ao longo de 24 horas.

No que diz respeito, à estocagem do plasma, não foram encontrados dados para possíveis comparações, em relação aos outros passos de reação.

Na etapa de hidrólise alcalina, as amostras não devem ser utilizadas após armazenamento, pois o MDA não se mantém estável e os valores chegam a diminuir 50% do valor real já no primeiro dia após armazenamento.

Por outro lado, após derivatização com o TBA, as análises podem ser realizadas por até 30 dias após armazenamento. Este fato é de grande importância para estudos envolvendo grande número de indivíduos, já que as amostras podem ser processadas no momento da coleta, mas tem-se um período relativamente longo

para se realizar as análises cromatográficas com a segurança de que os valores encontrados representarão os valores reais. Já os valores de TBARS permaneceram estáveis por 20 dias, observando-se ainda um aumento de seus níveis, fato explicado provavelmente pela presença de grande quantidade de interferentes, uma vez que a metodologia de Ohkawa *et al.*¹⁵ modificada não emprega hidrólise alcalina, que pode influenciar no aumento da presença de interferentes.

CONCLUSÃO

Sabendo-se da relação da peroxidação lipídica com diferentes doenças, a dosagem laboratorial confiável do biomarcador malondialdeído como indicador do estresse oxidativo é de grande importância. Além disso, tendo em vista o pequeno número de trabalhos que relacionam a estabilidade deste biomarcador, uma padronização da estabilidade do MDA plasmático em diferentes etapas de sua reação com TBA foi obtida com o presente estudo.

Mais ainda, foi possível comparar a estabilidade do MDA entre duas metodologias: a cromatografia de alta eficiência e a técnica espectrofotométrica de TBARS. Observou-se que, utilizando a cromatografia, que é a técnica mais confiável e indicada, as amostras devem ser processadas no máximo 24 horas após a coleta de sangue; porém, depois de derivatizada com TBA, as amostras podem ser analisadas com segurança por até 1 mês se armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Quando se faz a medida de MDA pelo método de TBARS, as amostras também devem ser processadas no máximo 24 horas após a coleta de sangue, e após derivatização com TBA as amostras podem ser analisadas por até 20 dias, sem prejuízo ao diagnóstico clínico.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq e a Fapergs pelo auxílio financeiro; a KNAUER® pelo suporte do aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, e à CAPES, CNPq e Fapergs pelas bolsas concedidas.

REFERÊNCIAS

- [1] Urso, M.L.; Clarkson, P.M.; *Toxicology*. **2003**, 189, 41.
- [2] Gillham, B.; Papachristodoulou, D.K.; Thomas, J.H.; *Wills': Biochemical basis of medicine*, 3th ed., Butterworth- Heinemann: Oxford, **1997**.
- [3] Halliwell, B.; *British Medical Journal*. **1993**, 307, 885.
- [4] Kesavulu, M.M.; Rao, B.K.; Giri, R.; Vijaya, J.; Subramanyam, G.; Apparao, C.; *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2001**, 53, 33.
- [5] Scott, B.; Deman, A.; Peeters, P.; Van den Branden, C.; Stolear, J.C.; Van Camp, G.; Verbrillen, D.; *Nephro. Dial. Transplant* .**2003**, 18, 737.
- [6] Joosten, E.; *Clin. Chem. Lab. Med.* **2001**, 39, 717.
- [7] Esterbauer, H.; Cheeseman, K.H.; *Meth. Enzymo.* **1990**, 186, 407.
- [8] Dormandy, T.L.; Wickens, D.G.; *Chem. Phys. Lipids*. **1987**, 45, 356.
- [9] Frank, H.; Hintze, T.; Bimboes, D.; Remmer, H.; *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1980**, 56, 337.
- [10] Morrow, J.D.; Frei, B.; Longmire, A.W.; Gaziano, J.M.; Lynch, S.M.; Shyr, Y.; Strauss, W.E.; Oates, J.A.; Roberts, L.J.; *N. Engl. J. Med.* **1995**, 332, 1198.
- [11] Esterbauer, H.; Schaur, R.J.; Zollner, H.; *Free Rad. Biol. Med.* **1991**, 11, 81.
- [12] Levine, R.L.; Williams, J.A.; Stadtman, E.R.; Shacter, E.; *Meth. Enzymol.* **1994**, 233, 346.
- [13] Marnett, L.J.; *Mutat. Res.* **1999**, 424, 83.
- [14] Grotto, D.; Santa Maria, L.D.; Boeira, S.; Valentini, J.; Charão, M.F.; Moro, A.M.; Nascimento, P.C.; Pomblum, V.J.; Garcia, S.C.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, 43, 619.
- [15] Ohkawa, H.; Ohishi, N.; *Anal. Biochem.* **1979**, 95, 351.

- [16] Wu, T.; Rifai, N.; Roberts II, L.J.; Willett, W.C.; Rimm E.B.; *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2004**, 13, 1399.
- [17] Lykkesfeldt, J.; *Clin. Chem.* **2001**, 47, 1725.
- [18] Sim, A.S.; Salonikas, C.; Naidoo, D.; Wilcken, D.E.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2003**, 785, 337.
- [19] Hong, Y.; Yeh, S.; Chang, C.; Hu, M.; *Clin. Biochem.* **2000**, 33, 619.
- [20] Wong S.H.; Knight J.A.; Hopfer S.M.; Zaharia, O.; Leach, C.N.; Sunderman, F.W.; *Clin. Chem.* **1987**, 33, 214.
- [21] Pilz, J.; Meineke, I.; Gleiter, H.C.; *J. Chromatogr., B.: Biomed. Sci. Appl.* **2000**, 742, 315.

Tabela 1. Análise da estabilidade dos níveis de MDA em amostras plasmáticas, com e sem o antioxidante BHT, realizado por CLAE – VIS e armazenados a - 20°C.

Tratamento da amostra	Tempo (dias)	MDA (μM)
Com BHT	0	2,55 \pm 0,13
	1	2,53 \pm 0,13
	2	2,56 \pm 0,11
	3	2,46 \pm 0,17
	4	2,01 \pm 0,20
Sem BHT	0	4,60 \pm 0,15
	1	4,55 \pm 0,11
	2	3,77 \pm 0,18

Tabela 2. Análise da estabilidade dos níveis de MDA em amostras plasmáticas, armazenadas a -20°C, ao longo do processo de quantificação do MDA, por CLAE – VIS.

Amostra após hidrólise	Concentração de MDA (μM)
Dia zero	4,60 \pm 0,15
Dia 1	2,38 \pm 0,20
Após derivatização com TBA	
Dia zero	4,60 \pm 0,15
Dia 5	4,63 \pm 0,12
Dia 10	4,61 \pm 0,18
Dia 20	4,56 \pm 0,12
Dia 30	4,66 \pm 0,13
Dia 35	3,75 \pm 0,15
Após extração com n-butanol	
Dia zero	4,60 \pm 0,15
Dia 1	4,60 \pm 0,18
Dia 2	4,56 \pm 0,12
Dia3	4,53 \pm 0,18
Dia 4	3,80 \pm 0,13

Tabela 3. Comparação da estabilidade dos níveis de MDA em amostras de plasma armazenadas a -20°C logo após coleta e após derivatização com TBA, realizadas pelas técnicas de CLAE – VIS e TBARS.

Tratamento	Tempo (dias)	CLAE - VIS	TBARS – VIS
Armazenamento logo após coleta	0	4,60 ± 0,15	6,90 ± 0,31
	1	4,55 ± 0,11	7,10 ± 0,26
	2	3,91 ± 0,18	7,50 ± 0,25
Armazenamento após derivatização com TBA	0	4,60 ± 0,15	6,80 ± 0,71
	1	4,61 ± 0,14	6,90 ± 0,58
	5	4,61 ± 0,12	7,20 ± 0,44
	10	4,64 ± 0,18	7,55 ± 0,85
	20	4,70 ± 0,2	7,50 ± 0,60
	30	4,62 ± 0,13	8,10 ± 0,83
	35	3,75 ± 0,15	

4. DISCUSSÃO

Observando-se os resultados apresentados nos manuscritos, um método eficiente para determinação de MDA plasmático por CLAE foi padronizado e validado.

O uso do TBA na reação com o MDA, formando o complexo MDA-TBA, é amplamente utilizado desde muito tempo. Em 1960, um teste foi sugerido para verificar a decomposição de hidroperóxidos de ácidos graxos em alimentos (Mehlenbacher, 1960) utilizando TBA. Ao longo dos anos, as técnicas foram evoluindo, e metodologias utilizando a separação cromatográfica são as mais indicadas.

Neste trabalho, uma importante modificação metodológica realizada, comparada a outras técnicas, foi a considerável diminuição na concentração de KH_2PO_4 da fase móvel. É sabido que altas concentrações de sais de fosfato podem precipitar sobre a coluna e o sistema cromatográfico, danificando e aumentando a pressão do cromatógrafo. Em outros trabalhos, foram encontradas concentrações de KH_2PO_4 de 10 a 50 mM (Nielsen et al., 1997; Hong et al., 2000; Lykkesfeldt, 2001; Karatas et al., 2002), enquanto que neste foi possível estabelecer uma separação cromatográfica eficiente com 2,5 mM de KH_2PO_4 e metanol (MeOH) (50:50, v/v). A princípio, obteve-se uma separação cromatográfica boa sem a presença de fosfato, sendo a fase móvel constituída somente por água e MeOH. Porém, ao longo das análises, observou-se que somente os padrões aquosos mantinham a boa resolução de seus picos, enquanto que os picos das amostras biológicas alargavam-se, com perdas significativas de suas áreas, confirmando, assim, a necessidade de KH_2PO_4 na fase móvel. O KH_2PO_4 aumenta a força iônica da fase móvel, (Boecker, 1997), permitindo uma melhor resolução e separação do pico.

No pré-tratamento da amostra biológica, outra modificação encontrada em poucos artigos na literatura e empregada neste trabalho foi a utilização de hidrólise das proteínas com NaOH (Lee & Csallany, 1987; Hong et al., 2000; Pilz et al., 2000). O MDA pode ser quantificado na sua forma livre – baixas concentrações – e também ligado a proteínas; por isso a necessidade de hidrólise alcalina, uma vez que os

níveis de MDA total são cerca de duas vezes maiores do que os níveis de MDA livre (Hong et al., 2000). Assim, com o emprego da hidrólise, obtém-se um valor real da quantidade de MDA presente nos indivíduos analisados.

Outra modificação importante foi a adição do passo de extração da amostra com solvente orgânico após a reação com o TBA. O uso de n-butanol (Hong et al., 2000; Fukunaga et al., 1993) como agente extrator antes da amostra ser injetada no cromatógrafo remove interferentes e contaminantes, estendendo assim o tempo de vida útil da coluna cromatográfica.

Com relação ao uso do BHT, antioxidante muito utilizado em dosagens de MDA (Lepage et al., 1991; Fykunaga et al., 1995; Lykkesfeldt, 2001), este não foi aconselhado nesta metodologia. Testes foram realizados, baseados em estudos feitos por Pilz et al., 2000, e observou-se que a redução nos níveis de MDA utilizando BHT não se devia ao fato de este prevenir a oxidação *in vitro*, e sim à presença do seu diluente – etanol ou metanol, que sozinho causa redução nos níveis de MDA pela provável precipitação de proteínas.

Quando um método é validado, ele assegura a credibilidade das análises realizadas durante a rotina laboratorial, sendo algumas vezes mencionado como “o processo que fornece uma evidência documentada de que a metodologia realiza aquilo para o qual é indicada a fazer” (ICH, 1994). O método otimizado apresentou-se apropriado para a determinação quantitativa de MDA plasmático, respeitando todos os parâmetros de desempenho analítico: linearidade, precisão, exatidão, recuperação, sensibilidade, robustez e estabilidade (Causon, 1997; Bakshi & Singh, 2002; ANVISA, 2003).

A avaliação da linearidade foi feita através de curvas de calibração com adição de matriz e aquosa, as quais demonstraram excelente linearidade e paralelismo. A precisão (intra e inter-dia) foi calculada como o coeficiente de variação (CV%) numa série de medidas repetidas e a exatidão por viés %. Ambos os parâmetros mostraram-se satisfatórios tratando-se de validação cromatográfica para a análise de amostras biológicas (Causon, 1997).

A recuperação metodológica aceitável (R%) encontrou-se dentro de $\pm 15\%$ da concentração esperada para o analito, enquanto que a sensibilidade foi avaliada através dos limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ). Neste trabalho, demonstrou-se que o MDA foi preservado durante todo o pré-tratamento da amostra,

apresentando índices de recuperação dentro do esperado, e que o método foi sensível para baixas concentrações de MDA.

Para a avaliação da robustez do método, durante a validação ocorreram variações das condições analíticas, tais como utilização de diferentes lotes de colunas cromatográficas, diferentes marcas de reagentes, fase móvel com pequenas variações no pH; amostras provenientes de diferentes indivíduos e pequenas variações na temperatura. Diante dos resultados encontrados, o método mostrou-se robusto e confiável para a quantificação de MDA.

Sabendo-se da relação entre a peroxidação lipídica e as patologias humanas, a dosagem confiável do MDA é de grande significância. Por isso, o parâmetro analítico da estabilidade é de grande importância para que se possa realizar uma quantificação real de MDA nos indivíduos analisados, sem perdas por armazenamento inadequado da amostra.

Assim, a verificação da estabilidade da amostra plasmática foi realizada em diferentes etapas de seu pré-tratamento. A instabilidade dos marcadores do estresse oxidativo associada a não observação do tempo transcorrido desde a coleta da amostra até seu processamento dificulta estabelecer valores de referência e de comparação entre os trabalhos científicos, pois tempo e temperatura de armazenamento podem modificar os resultados finais. A determinação da estabilidade é de fundamental importância para futuras interpretações clínico-laboratoriais relacionando os marcadores do estresse oxidativo, como o MDA, com patologias.

Os principais pontos a serem observados no Manuscrito III relacionam a baixa estabilidade do plasma antes de sua derivatização com o TBA, já que o TBA estabiliza a amostra biológica. Quando a amostra plasmática é mantida em banho de gelo, logo nas primeiras 24 horas os níveis de MDA quase duplicam, provavelmente pela produção *in vitro* de hidroperóxidos; já quando o plasma é armazenado a -20°C, este se mostra estável por 1 dia, indicando o cuidado que se deve ter em estudos epidemiológicos para que não haja uma falsa alteração dos níveis de MDA, causada pela demora no processamento da amostra.

Por outro lado, verificou-se que a amostra plasmática torna-se estável após sua derivatização com o TBA. Após a reação de cor e armazenamento a -20°C, as amostras podem ser analisadas por até 30 dias, fato este de grande valia quando se tem estudo envolvendo grande número de pessoas, uma vez que o plasma deve ser processado em, no máximo 24 horas. Comparando-se os níveis de MDA com os de

TBARS, os valores de TBARS permaneceram estáveis por 20 dias quando armazenados a -20°C , observando-se ainda um aumento de seus níveis, fato explicado provavelmente pela presença de grande quantidade de interferentes, tais como açúcares e a própria presença de proteínas, que não sofreram hidrólise, uma vez que a leitura é realizada por espectrometria.

Após a extração com o solvente orgânico n-butanol, verificou-se que, armazenadas a -20°C , as amostras permaneceram estáveis por 3 dias. Além disso, quando as amostras extraídas permaneciam à temperatura ambiente até injeção no cromatógrafo, estas perdiam sua estabilidade facilmente, observando-se, dessa forma, a necessidade de as amostras permanecerem sempre em banho de gelo.

Sabendo-se que o estresse oxidativo está diretamente implicado com algumas patologias e que as doenças relacionadas ao envelhecimento populacional são problemas de saúde pública, a aplicação desta metodologia foi feita em amostras de plasma de idosos de casas institucionais de Santa Maria.

Apesar de o envelhecimento ser um processo multifatorial, há muitas evidências indicando a geração de ERONs e a resposta do organismo ao estresse oxidativo como fatores importantes determinantes da longevidade (Harman, 1957; Ku, et al., 1993). Dessa forma, levando-se em conta o fato de os indivíduos destas instituições terem sua alimentação controlada por nutricionista, não fumarem e não beberem pôde-se estabelecer valores de referência de MDA para esta faixa etária utilizando a metodologia validada. Como um bom indicador da peroxidação lipídica, o MDA pode ser de grande importância na avaliação do estresse oxidativo e de patologias relacionadas, tais como as cardiovasculares e neurodegenerativas.

5. CONCLUSÃO

Um método analítico para a quantificação de MDA plasmático por CLAE-VIS foi otimizado e validado, utilizando TBA como derivatizante. O TBA é de baixo custo, a detecção visível é amplamente utilizada e o método otimizado é muito simples de ser realizado.

Condições para o tratamento adequado da amostra biológica tais como o emprego da hidrólise alcalina para a completa liberação do MDA ligado às proteínas e a extração da amostra derivatizada com n-butanol representam vantagens desta metodologia.

O processo analítico é rápido, utilizando coluna C18 e eluição isocrática, com tempo de corrida de apenas 8 minutos. Outra importante vantagem da metodologia é a baixa concentração de fosfato (2,5 mM KH_2PO_4) utilizada na fase móvel, prevenindo possíveis precipitações de sais que causam danos ao sistema cromatográfico.

A avaliação da estabilidade do MDA plasmático mostrou que o plasma armazenado a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ logo após a coleta é estável por somente um dia, enquanto que a amostra armazenada a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ após derivatização mantém seus níveis de MDA estáveis por até 30 dias. Sabendo-se que a estabilidade da amostra biológica é de grande importância na dosagem laboratorial do MDA, este estudo permitiu a obtenção de valores reais confiáveis para este biomarcador.

Os parâmetros da validação mostraram que o método foi validado e permite a análise do MDA em amostras plasmáticas na rotina laboratorial de forma exeqüível e garantida, mostrando-se útil para posteriores estudos experimentais e ambulatoriais envolvidos no estresse oxidativo.

A aplicação do método em indivíduos idosos saudáveis, institucionalizados em asilos de Santa Maria, serviu para estabelecer valores de referência para MDA nesta faixa etária, facilitando futuramente o diagnóstico precoce de doenças relacionadas ao estresse oxidativo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods-critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, p. 1011-1040, 2002.

BIRD, R.P., et al. Determination of malondialdehyde in biological materials by high pressure liquid chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 128, p. 240-244, 1983.

BOECKER, J. Chromatographie: instrumentelle analytik mit chromatographie und kapillarelektrophorese. Wurzburg, ed. Vogel, 1997.

BRASIL – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Brasil. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 02 de junho de 2003. Disponível em < http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: viewpoint and discussion. **Journal of Chromatography B**, v. 689, p. 175-180, 1997.

CECCHI, C., et al. Oxidative stress and reduced antioxidant defenses in peripheral cells from familial Alzheimer's patients. **Free Radicals in Biology and Medicine**, v. 33, n.10 p. 1372-1379, 2002.

CERUTTI, P.A. Oxy-radicals and cancer. **The Lancet**, v. 344, p. 862-863, 1994.

DORMANDY, T.L.; WICKENS, D.G. The experimental and clinical pathology of diene conjugation. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 45, p. 356-364, 1987.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 407-421, 1990.

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

FRANK, H., et al. Monitoring lipis peroxidation by breath analysis: endogenous hydrocarbons and their metabolic elimination. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 56, p. 337-344, 1980.

FUKUNAGA, K.; SUZUKI, T.; TAKAMA, K. Highly sensitive high-performance liquid chromatography for the measurement of malondialdehyde in biological samples. **Journal of Chromatography**, v. 621, p. 77-81, 1993.

FUKUNAGA, K.; TAKAMA, K.; SUZUKI, T. High performance liquid chromatographic determination of plasma malondialdehyde level without a solvent extraction procedure. **Analytical Biochemistry**, v. 230, p. 20-23, 1995.

GILLHAM, B., PAPACHRISTODOULOU, D.K., THOMAS, J.H. Will's: Biochemical basis of medicine. Butterworth- Heinemann, Chapter 33, p. 343-354, 1997.

GOTZ, M.E.; FREYBERGER, A.; RIEDERER, P. Oxidative stress- A role in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission**, v. S29, p. 241-249, 1990.

HALLIWELL, B. Free radicals and vascular disease: how much do we know? **British Medical Journal**, v. 307, p. 885, 1993.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 57, p. 715-725, 1993.

HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **Journal of Gerontology**, v. 2, p. 298-300, 1957.

HONG, Y.L., et al. Total plasma malondialdehyde levels in 16 Taiwanese college students determined by various thiobarbituric acid test and an improved high performance liquid chromatography-based method. **Clinical Biochemistry**, v. 33, p. 619-625, 2000.

ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requeriments for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Validation of Analytical Procedures: methodology. **ICH Steering Committee**, 1996.

ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Text on Validation of Analytical Procedures. **ICH Steering Committee**, 1994.

KARATAS, F.; KARATEPE, M.; BAYSAR, A. Determination of free malondialdehyde in human serum by high performance liquid chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 311, p. 76-79, 2002.

KESAVULU, M.M., et al. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme status in type 2 diabetics with coronary heart disease. **Diabetes Researches and Clinical Practice**, v. 53, p. 33-39, 2001.

KNIGHT, J.A.; PIEPER, R.K.; MC CLELLAN, L. Specificity of the thiobarbituric acid reaction: its use in studies of lipid peroxidation. **Clinical Chemistry**, v. 34, p. 2433-2438, 1988.

KOSUGI, H.; KATO, T.; KIKUGAWA, K. Formation of yellow, orange and red pigments in the reaction of alk-2-enals with 2-thiobarbituric acid. **Analytical Biochemistry**, v. 165, p. 456-464, 1987.

KU, H.H.; BRUNK, U.T.; SOHAL, R.S. Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. **Free Radicals in Biology and Medicine**, v. 15, p. 621-627, 1993.

LEE, S.H.; CSALLANY, A.S. Measurement of free and bound malondialdehyde in vitamin E-deficient and -supplemented rat liver tissues. **Lipids**, v. 22, p. 104-107, 1987.

LEPAGE, G., et al. Preparative steps necessary for the accurate measurement of malondialdehyde by high-performance liquid chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 197, p. 277-283, 1991.

LEVINE, R.L., et al. Carbonyl assays for determinations of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 233, p. 346-363, 1994.

LYKKESFELDT, J. Determination of malondialdehyde as dithiobarbituric acid adduct in biological samples by HPLC with fluorescence detection: comparison with ultraviolet-visible spectrophotometry. **Clinical Chemistry**, v. 47, p. 1725-1727, 2001.

MARNETT, L.J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. **Mutation Research**, v. 424, p. 83-95, 1999.

MEHLENBACHER, V. C. The Analysis of Fats and Oils. **The Garrad Press: Illinois**, 1960.

MORROW, J.D., et al. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F₂-isoprostanes) in smokers. **The New England Journal of Medicine**, v. 332, p. 1198-1203, 1995.

NIELSEN, F., et al. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. **Clinical Chemistry**, v. 43, p. 1209-1214, 1997.

OHKAWA, H.; OHISHI, N. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358, 1979.

PILZ, J.; MEINEKE, I.; GLEITER, C.H. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. **Journal of Chromatography B**, v. 742, p. 315-325, 2000.

SINNHUBER, R.O.; YU, T.C. The 2-thiobarbituric acid reaction, an objective measure of the oxidative deterioration occurring in fats and oils. **Journal of Japanese Oil Chemical Society**, v. 26, p. 259-267, 1977.

TEMPLAR, J., et al. Increased plasma malondialdehyde levels in glomerular disease as determined by a fully validated high performance liquid chromatography. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 14, p. 946-951, 1999.

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