

Modalidade do trabalho: Ensaio teórico
Evento: XXII Seminário de Iniciação Científica

MÉTODO DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS), E SUA IMPORTÂNCIA PARA A AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM DIVERSAS APLICAÇÕES¹

Ana Laura Arnhold², Thiago Gomes Heck³.

¹ Trabalho realizado no componente curricular Estágio I do curso de Ciências Biológicas – Bacharelado, UNIJUI.

² Acadêmica do curso de Ciências Biológicas – Bacharelado, UNIJUI.

Grupo de Pesquisa em Fisiologia – GPeF.

analaura_arnhold@hotmail.com

³ Professor no Departamento de Ciências da Vida (DCVida)

Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF

Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde (PPGAIS)

Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul - UNIJUI

thiago.heck@unijui.edu.br

Introdução

As células são unidades estruturais e funcionais naturalmente sensíveis à ação de diversos fatores danosos que podem interferir no seu metabolismo. (Novikoff, et al. 1977). Entre essas possíveis agressões à célula, estão presentes as espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais podem danificar todos os componentes celulares.

Considerando Halliwell (1991), as EROs ocorrem quando, em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o O₂ sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H₂O. Durante esse processo são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido (O₂⁻), hidroperoxila (HO₂) e hidroxila (OH), e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Oxigênio (O₂ -) e o peróxido de hidrogênio não oxidantes dos radicais (2H₂O) e ácido hipocloroso (HOCl) também são formados nesse processo. Porém, a produção excessiva de O₂⁻ e H₂O₂ pode resultar em danos nos tecidos, o que muitas vezes envolve o radical hidroxila (OH⁻).

Estas espécies reativas estão também envolvidas em várias doenças crônicas não transmissíveis associadas ao envelhecimento, como doenças cardiovasculares, diabetes, hipertensão, síndrome metabólica, artrite reumatoide e doenças neurodegenerativas (doença de Alzheimer, doença de Parkinson). (Silva, W. et al. 2011).

Todas as organelas celulares podem sofrer alterações quando interagem com as EROs, porém, a membrana celular é a estrutura que, se atingida, desencadeia um problema à célula mais significativo, pois resulta na peroxidação lipídica, processo que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares, comprometendo todo o metabolismo celular. (Ferreira et al., 1997).

Modalidade do trabalho: Ensaio teórico

Evento: XXII Seminário de Iniciação Científica

Ainda de acordo com Ferreira et al. (1997), quando a peroxidação lipídica acontece, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos, e formação de produtos citotóxicos, como por exemplo, o malonaldeído (MDA), resultando na morte celular.

Em estudos que visam avaliar o dano celular pelo estresse oxidativo através da quantificação do MDA produzido na peroxidação lipídica de determinado tecido, sob um fator oxidante específico, pode ser analisado através do método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), procedimento introduzido por Buege e Aust (1978), e amplamente utilizado nos dias de hoje.

O presente trabalho deteve-se em revisar ensaios os quais utilizaram o TBARS como método fundamental na avaliação do estresse oxidativo, para que sua importância seja mais bem compreendida no meio científico atual.

Metodologia

A realização desta pesquisa baseia-se na análise de revisão teórica – prática referente à utilização do TBA (ácido tiobarbitúrico) na avaliação da concentração de MDA (malondialdeído), através da leitura espectrofotométrica, em aplicações distintas. Foi desenvolvida e orientada nas dependências da Universidade Regional do noroeste do estado do Rio Grande do Sul, mais precisamente no laboratório de ensaios biológicos, no decorrer do componente curricular Estágio I do curso de Ciências Biológicas – Bacharelado, juntamente com o auxílio do Grupo de Pesquisa em Fisiologia – GPeF.

A revisão bibliográfica foi feita de forma concisa a fim de sistematizar informações significativas a respeito do método TBARS em artigos científicos e livros os quais abordam de forma expressiva sua importância na avaliação do estresse oxidativo e diferentes aplicações.

Resultados e discussão

O estudo pioneiro na utilização do TBARS, realizado por John A. Buege e Steven D. Aust, teve como intuito principal avaliar os produtos da peroxidação lipídica em membrana microsomal, entre eles, o malondialdeído (MDA). O malondialdeído é um aldeído reativo (baixa estabilidade) amplamente utilizado como biomarcador na avaliação do estresse oxidativo. (Pilz et al. 2000).

Quando o MDA reage com o ácido tiobarbitúrico, forma uma solução de cor avermelhada, que de acordo com os conceitos de bioquímica experimental de Cisternas, J. et al. (1999), tem sua absorbância ideal a 535 nm no espectrofotômetro.

Alguns fatores podem alterar na absorbância da cor da amostra, como por exemplo, as hemoproteínas e metais de transição que, quando associados a membranas celulares, podem melhorar a formação da cor avermelhada no ensaio do TBARS pela formação de oxirradicais e peróxidos provenientes do aquecimento da membrana com o reagente padrão TCA-TBA (Tricloroacético e ácido tiobarbitúrico). (Buege e Aust, 1978). A porcentagem de TCA normalmente utilizado nos ensaios padronizados é de 10 %, enquanto a porcentagem do reagente principal (TBA) pode variar entre 60 e 70%.

O estresse oxidativo é um desequilíbrio bioquímico no qual a produção de EROs excede a capacidade antioxidante natural. Este desequilíbrio pode ocorrer quando o organismo é exposto a

Modalidade do trabalho: Ensaio teórico

Evento: XXII Seminário de Iniciação Científica

pró-oxidantes (Delfino et al., 2010), como por exemplo, poluentes atmosféricos. O método de TBARS para a avaliação de MDA é muito utilizado em pesquisas referentes ao efeito da poluição no organismo.

O método TBARS também é aplicado em estudos que visam avaliar a lipoperoxidação em determinado tecido sob exposição a um poluente específico, como por exemplo, a avaliação do dano cerebral em camundongos expostos a material particulado (MP) (classe de poluentes). De acordo com a pesquisa de Basso, E. et al. (2013), a determinação da lipoperoxidação nas amostras de cérebro dos camundongos expostos a MP foi realizada por espectrofotometria através da reação com o ácido tiobarbitúrico TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico). A concentração de TBARS formada foi expressa em nmol MDA/mg Proteína.

Também é possível empregar este método na avaliação do dano oxidativo em modelos experimentais de determinada doença e introduzir um possível tratamento, como por exemplo, na pesquisa em desenvolvimento de Sulzbacher, et al., 2012, o qual utiliza a sepse como modelo experimental, e a suplementação de glutamina como tratamento, avaliando não só o estresse oxidativo, mas também o conteúdo de proteínas de estresse (HSP70).

Uma grande variedade de métodos está disponível para mensurar o estresse oxidativo, sendo que a melhor opção do uso de biomarcadores para estudos epidemiológicos ou experimentais dependerá dos objetivos da investigação. (Goettems, et al. 2013). Sendo assim, é possível afirmar que, através de um levantamento bibliográfico prévio, é possível entender a importância da escolha correta do método a ser utilizado para fazer esta avaliação, e o TBARS é um método de grande versatilidade, podendo ser usado para avaliar a lipoperoxidação em modelos de diversas doenças, com ou sem tratamento, ou até mesmo, em modelos de exercício físico.

Conclusão

Com base nas informações abstraídas através da revisão de ensaios o quais o método TBARS foi utilizado para quantificar MDA, e assim, avaliar a lipoperoxidação, percebe-se a importância de seu uso no meio científico. A partir dele é possível elaborar propostas e pesquisas de alto impacto, principalmente na área da saúde. Isso é refletido no avanço científico atual, que busca alternativas para melhorar a qualidade de vida, tanto humana como animal.

É importante salientar que, o método TBARS se torna muito mais específico e de maior impacto científico, quando associado a outros métodos que avaliam o estresse, ou outro fator que seja expresso na mesma pesquisa, mas que acrescente credibilidade ao resultado final.

Palavras-chave: Revisão, método, ácido tiobarbitúrico, malondialdeído.

Referências bibliográficas

BASSO, Eloisa Gabriela De Pelegrin, SALAMONI, Bethânia, GOETTEMS, Pauline Brendler, BALDISSERA, Fernanda Giesel, RHODEN, Cláudia Ramos, HECK, Thiago Gomes. Avaliação do dano no cérebro de camundongos adultos expostos a material particulado. Salão do Conhecimento, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, 2013.

CISTERNAS, José Raul, VARGA, José, MONTE, Osmar. Fundamentos de Bioquímica Experimental. Editora Atheneu, 2ª edição; 1999. p. 7-19.

Modalidade do trabalho: Ensaio teórico

Evento: XXII Seminário de Iniciação Científica

FERREIRA, A.L.A., MATSUBARA, L.S.. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Assoc. Med. Bras. 1997, vol. 43, n.1, p. 61-68.

GOETTEMS, Pauline Brendler, SALAMONI, Bethânia, BALDISSERA, Fernanda Giesel, LUDWIG, Mirna Stela, HECK, Thiago Gomes. Poluição atmosférica: Biomarcadores dos efeitos nocivos à saúde. Salão do conhecimento, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, 2013.

HALLIWELL, Barry. Reactive Oxygen Species in Living Systems: Source, Biochemistry, and Role Human Disease. September 30, 1991. The American Journal of Medicine. Volume 91.

NOVIKOFF, Alex B., HOLTZMAN, Eric. Células e estrutura celular. Editora Interamericana, 1977, segunda edição, p. 5-15.

PILZ, Jorgen, MEINEKE, Ingolf, GLEITER, Christoph H. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. Journal of Chromatography B, 742 (2000) 315–325.

SILVA, Wallison Junio Martins e KUSANO, FERRARI, Carlos Kusano Bucalen. Metabolismo Mitocondrial, Radicais Livres e Envelhecimento. Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia; 2011; 14(3);441-451.

SULZBACHER, Maicon Machad, SANTOS, Analú Bender dos, HECK, Thiago Gomes, LUDWIG, Mirna Stela. Desenvolvimento experimental de sepse para a avaliação dos efeitos da suplementação com glutamina sobre HSP70 e o estresse oxidativo. Revista Contexto & Saúde, 2012, v.12, n.23.