



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO ACADÊMICO EM NUTRIÇÃO E SAÚDE

LUÍS SÉRGIO FONTELES DUARTE

Avaliação da atividade antioxidante do gama-orizanol *in vitro* e o seu efeito associado ao alfa-tocoferol *in vivo* no estresse oxidativo dos tecidos hepático e cerebral induzido por etanol em ratos

Fortaleza

2013

Luís Sérgio Fonteles Duarte

Avaliação da atividade antioxidante do gama-orizanol *in vitro* e o seu efeito associado ao alfa-tocoferol *in vivo* no estresse oxidativo dos tecidos hepático e cerebral induzido por etanol em ratos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde da Universidade Estadual do Ceará, para obtenção do Título de Mestre em Nutrição e Saúde

Orientadora: Profa. Dra. Maria Izabel Florindo Guedes

Fortaleza

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Estadual do Ceará
Biblioteca Central Prof. Antônio Martins Filho
Bibliotecário Responsável – Francisco Welton Silva Rios – CRB-3/919

D812a Duarte, Luís Sérgio Fonteles
Avaliação da atividade antioxidante do gama-orizanol *in vitro* e o seu efeito associado do alfa-tocoferol *in vivo* no estresse oxidativo dos tecidos hepático e cerebral induzido por etanol em ratos / Luís Sérgio Fonteles Duarte. – 2013.
CD-ROM. 134 f. ; il. (algumas color.) : 4 ¾ pol.

“CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico, acondicionado em caixa de DVD Slim (19 x 14 cm x 7 mm)”.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Curso de Mestrado Acadêmico em Nutrição e Saúde, Fortaleza, 2013.
Área de Concentração: Nutrição Humana e Saúde.
Orientação: Profa. Dra. Maria Izabel Florindo Guedes.

1. Gama-orizanol. 2. Alfa-tocoferol. 3. Estresse oxidativo. 4. Etanol. I. Título.

CDD: 616.334

LUIS SÉRGIO FONTELES DUARTE

“Avaliação da atividade antioxidante do gama-oryzanol in vitro e o seu efeito associado ao alfa-tocoferol in vivo no estresse oxidativo dos tecidos hepático e cerebral induzido por etanol em ratos”.


Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Nutrição e Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual do Ceará, requisito para obtenção do Título de Mestre.

Aprovada em: 27/02/2013.

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Maria Izabel Florindo Guedes (Orientadora)
Universidade Estadual do Ceará – UECE



Profa. Dra. Patrícia Araújo Rodrigues
Universidade Federal do Ceará - UFC



Prof. Dr. Ícaro Gusmão Pinto Vieira
Universidade Federal do Ceará - UFC

DEDICATÓRIA

À minha querida esposa Érica, que me incentivou a realizar mais esta conquista e esteve ao meu lado em todos os momentos com muita dedicação e compreensão mesmo nas horas que o desânimo e cansaço me inundavam.

A minha pequena Bruna, que por sua tenra idade foi quem mais sofreu com minha ausência, meu cansaço e meus momentos de estresse. Prometo a ti minha pequena, que papai jamais te negará novamente o colo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Professora Dra., Maria Izabel Florindo Guedes, pelo incentivo, amizade, confiança e pela oportunidade de trabalhar sob sua orientação.

Aos meus pais, Maria Olinda Fonteles e Sérgio Soares Duarte, pelo amor, carinho e incentivo para a realização deste sonho.

Aos dois amores da minha vida, minha esposa Érica Barroso de Amorim e minha filha Bruna de Amorim Fonteles, por todo amor a mim dedicado.

Aos bolsistas, Deusdedit Capistrano e Ismênia Marques, pela dedicação, paciência e auxílio para a realização deste trabalho, pessoas maravilhosas que se tornaram grandes amigos.

Aos bolsistas e professores do Laboratório de Bioquímica Humana da Universidade Estadual do Ceará, que contribuíram para a realização deste trabalho.

“...Se, ao fim de meus dias,
Continuar
Sem escutar, sem entender, sem atender,
Sem realizar o Cristo, que,
Dentro de mim,
Eu Sou,
Terei me perdido na multidão abortada
Dos perdulários dos divinos talentos, Os talentos que a Vida
A todos confia,
E serei um fraco a mais,
Um traidor da própria vida,
Da Vida que investe em mim,
Que de mim espera
E que se vê frustrada
Diante de meu fim.

Se tudo isto acontecer
Terei parasitado a Vida
E inutilmente ocupado
O tempo
E o espaço
De Deus.
Terei meramente sido vencido
Pelo fim,
Sem ter atingido a Meta”.

Hermógenes

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Pág
Figura 1	Representação da formação de radicais a partir de um não radical, extraído de Halliwell e Gutteridge, 2007 22
Figura 2	Representação da formação de radicais a partir de fissão homolítica, extraído de Halliwell e Gutteridge, 2007 23
Figura 3	Representação da fissão heterolítica, extraído de Halliwell e Gutteridge, 2007 23
Figura 4	Representação da formação da molécula de água a partir da redução do oxigênio, extraído de Halliwell e Gutteridge, 2007 24
Figura 5	Representação do ânion superóxido como fator redutor para formação da molécula de oxigênio, ou como agente oxidante para formação do peróxido de hidrogênio, extraído de Halliwell e Gutteridge, 2007 27
Figura 6	Representação da reação e Haber-Weiss onde ocorre a produção do radical hidroxila a partir o ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, Liochev e Fridovich, 1999) 27
Figura 7	Determinantes do balanço redox, adaptado de Leopold e Loscalzo, 2008..... 29
Figura 8	Esquema representativo da formação de EROS e consequências nas biomoléculas celulares, extraído de Chen <i>et al.</i> (2012) 30
Figura 9	Efeitos constantes do estresse oxidativo por EROS podem desencadear apoptose, extraído de Ott <i>et al.</i> (2007) 32
Figura 10	Efeitos celulares e clínicos das EROS a partir de fontes endógenas e exógenas, extraído de Ott <i>et al.</i> (2007) 35
Figura 11	EROS e a patogênese da aterosclerose, extraído de Leopold e Loscalzo, 2008 ... 38
Figura 12	Processos celulares evolutivos da carcinogênese, extraído de Klaunig e Kamendulis, 2004 41
Figura 13	Atividade das enzimas antioxidantes nas células de mamíferos, extraído de Lima, 2008..... 50
Figura 14	Desmutação do ânion superóxido pela superóxido desmutase (VASCONCELOS, <i>et al.</i> , 2008) 51

Figura 15	Recuperação da GSH por Glutamina Redutase, extraído de Lima, 2008	53
Figura 16	Representação das estruturas dos principais carotenoides encontrados na dieta humana (LINDSAY; ASTLEY, 2002).....	59
Figura 17	Representação da estrutura molecular do ácido ascórbico	61
Figura 18	Representação da estrutura molecular do α -tocoferol	62
Figura 19	Representação da estrutura molecular do ferulato de cicloartenila	65
Figura 20	Desenvolvimento de doença hepática por consumo crônico de álcool (SEITZ; STICKEL, 2006)	71
Figura 21	Representação da estrutura molecular do DPPH	76
Figura 22	Representação da estrutura molecular do ABTS	77
Figura 23	Representação da formação de Blue Formazan a partir da foto redução do nitro blue tetrazolium	83

LISTA DE GRÁFICOS

	Pág
Gráfico 1	Resposta do percentual de remoção do α -tocoferol frente ao DPPH [•] 86
Gráfico 2	Resposta do percentual de remoção do γ -orizanol frente ao DPPH [•] 86
Gráfico 3	EC ₅₀ do γ -orizanol e α -tocoferol frente ao DPPH [•] 87
Gráfico 4	Curva dose-resposta do γ -orizanol e α -tocoferol frente ao DPPH [•] 87
Gráfico 5	Resposta do percentual de remoção do α -tocoferol frente ao ABTS ^{•+} 88
Gráfico 6	Resposta do percentual de remoção do γ -orizanol frente ao ABTS ^{•+} 88
Gráfico 7	EC ₅₀ do γ -orizanol e α -tocoferol frente ao ABTS ^{•+} 89
Gráfico 8	Curva dose-resposta do γ -orizanol e α -tocoferol frente ao ABTS ^{•+} 89
Gráfico 9	Curva padrão de sulfato ferroso 90
Gráfico 10	Curva dose-resposta da absorbância em relação a concentração de γ -orizanol ... 90
Gráfico 11	Curva dose-resposta da absorbância em relação a concentração de α -tocoferol .. 91
Gráfico 12	Valores da atividade redutora em equivalentes de sulfato ferroso para o α -tocoferol e γ -orizanol 91
Gráfico 13	Representação do ganho de peso dos grupos controle e experimentais 94
Gráfico 14	Representação do coeficiente de eficácia alimentar (CEA) dos grupos controle e experimentais 94
Gráfico 15	Representação do peso relativo do fígado entre os grupos experimentais 95
Gráfico 16	Representação do peso relativo do cérebro entre os grupos experimentais 96
Gráfico 17	Representação da concentração de SOD no tecido hepático dos grupos controle e experimentais 98
Gráfico 18	Representação da concentração de SOD no tecido cerebral dos grupos controle e experimentais 99
Gráfico 19	Representação da concentração de GSH no tecido hepático dos grupos controle e experimentais 100

Gráfico 20	Representação da concentração de GSH no tecido cerebral dos grupos controle e experimentais	101
------------	---	-----

LISTA DE TABELAS

		Pág
Tabela 1	Nomenclatura de EROS	25
Tabela 2	Nomenclatura de espécies reativas não derivadas do O ₂	25
Tabela 3	Ganho de peso e coeficiente de eficácia alimentar (CEA) dos grupos controle e experimentais	93
Tabela 4	Atividade da SOD (U/mg de tecido) dos grupos controle e experimentais	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

–OH	Hidroxila
8-OHG	8-Hidroxi guanina
ABTS^{•+}	Radical 2,2-azobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
AD	Doença de Alzheimer
Ala	Alanina
ALS	Esclerose amiotrófica lateral
AMP	Monofosfato de adenosina
Asp	Aspartato
ATP	Trifosfato de adenosina
Bcl-2	Linfoma de células B2
CAT	Catalase
CTE	Cadeia transportadora de elétrons
DCV	Doença cardiovascular
DISC	Complexo sinalizador de indução de morte
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAmt	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
ER	Retículo endoplasmático
EROS	Espécies reativas do oxigênio
Gpx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona na forma reduzida (tiol)

GSSG	Glutathiona dissulfeto
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
His	Histidina
HNE	4-Hidroxi-nonenal
HOCl	Ácido hipocloroso
HPNE	4-hidroxiperoxi-2-nonenal
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
Lys	Lisina
MDA	Malondialdeído
MnSOD	Manganêsio superóxido desmutase
MPO	Mieloperoxidase
NADPH	Complexo nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
O₂	Molécula de oxigênio
O₂⁻	Ânion superóxido
O₃	Ozônio
OH[•]	Radical hidroxila
ONE	4-oxo-2-nonenal
ONOO⁻	Peroxinitrito
oxLDL	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
PD	Doença de Parkinson
ppm	Partes por milhão
PUFAs	Ácidos graxos poli-insaturados
RCS	Espécies reativas de cloro

RNA	Ácido ribonucleico
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
RO₂[•]	Radical peroxila
RSS	Espécies reativas de enxofre
TNF	Fator de necrose tumoral
UV	Ultravioleta
VLDL-C	Lipoproteína de densidade muito baixa ligada ao colesterol
VSMC	Célula muscular lisa vascular

RESUMO

O potencial antioxidante do γ -orizanol foi avaliado por métodos analíticos *in vitro* e *in vivo*. Os métodos *in vitro* utilizados foram o modelo de redução do radical DPPH, ABTS, redução do complexo fosfomolibdênio e o método de redução do ferro, denominado ensaio FRAP. Para efeito de comparação dos ensaios *in vitro* foi utilizado o antioxidante dietético α -tocoferol. No método DPPH o γ -orizanol apresentou uma capacidade 6,88 vezes menor do que o α -tocoferol em reduzir 50% do DPPH $^{\bullet}$. No ensaio do radical ABTS o α -tocoferol apresentou uma capacidade 1,27 vezes menor do que o α -tocoferol em reduzir 50% do ABTS $^{\bullet+}$ com um resultado similar ao α -tocoferol. No ensaio FRAP o γ -orizanol apresentou uma capacidade 68 vezes maior de reduzir o Fe $^{3+}$ comparado ao α -tocoferol. No entanto, no ensaio de redução do complexo fosfomolibdênio o γ -orizanol não apresentou atividade antioxidante significativa. Os resultados dos ensaios *in vitro* propostos neste estudo demonstraram que o γ -orizanol possui atividade antioxidante quando comparado a um reconhecido antioxidante dietético. Nos ensaios *in vivo* o γ -orizanol agiu positivamente no estado nutricional dos animais. No ensaio da superóxido desmutase do tecido hepático, o γ -orizanol e o α -tocoferol exerceram sinérgico pró-oxidante tanto de forma isolada quanto associados. No tecido cerebral o γ -orizanol e o α -tocoferol exerceram efeito protetor em relação à concentração de SOD somente quando administrados na presença de etanol. No ensaio da glutatona reduzida o γ -orizanol e o α -tocoferol no tecido hepático e cerebral exerceram um efeito protetor em relação aos grupos controle, porém um efeito pró-oxidante quando associados sem a presença de etanol. No tecido cerebral somente o γ -orizanol na presença de etanol foi capaz de exercer efeito positivo na glutatona reduzida.

Palavras-chaves: gama-orizanol, alfa-tocoferol, etanol e estresse oxidativo

ABSTRACT

The antioxidant potential of γ -oryzanol was evaluated by *in vitro* and *in vivo* analytical methods. The *in vitro* methods utilized were the reduction model of the DPPH radical, ABTS, reduction of the phosphomolybdenum, and the iron reduction method, denominated FRAP test. As a comparison effect for the *in vitro* tests was utilized the dietetic antioxidant α -tocopherol. On the DPPH method, γ -oryzanol developed a 6,88 times smaller capacity in reducing 50% of the DPPH than the α -tocopherol. On the ABTS radical test, α -tocopherol developed a 1,27 times smaller capacity in reducing 50% of the ABTS than the α -tocopherol but with a similar result to the α -tocopherol. On the FRAP test the α -tocopherol developed a 68 times higher capacity in reducing the Fe^{3+} compared to the α -tocopherol. However, on the phosphomolybdenum complex reduction test the α -tocopherol did not developed a significant antioxidant activity. The results of the *in vitro* test proposed on this study have demonstrated that the γ -oryzanol has an antioxidant activity compared to an acknowledged dietetic antioxidant. On the *in vivo* tests the γ -oryzanol behaved positively in the nutritional state of animals. On the test of superoxide dismutase from the hepatic tissue, the γ -oryzanol and the α -tocopherol performed synergic pro-oxidant in an isolated form as well as associated. On the cerebral tissue the γ -oryzanol and the α -tocopherol performed a protection effect in comparison to the SOD concentration only when administered in the presence of ethanol. On the test of reduced glutathione the γ -oryzanol e o α -tocopherol on the hepatic and cerebral tissue performed a protection effect in comparison to control groups, however a pro-oxidant effect when associated without the presence of ethanol. On the cerebral tissue only the γ -oryzanol in the presence of ethanol was able to perform a positive effect on the reduced glutathione.

Keywords: gamma-oryzanol, alpha-tocopherol, etanol and oxidative stress

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1. Radicais livres e estresse oxidativo	22
2.1.1. Peroxidação lipídica	28
2.2. Estresse oxidativo, morte celular e doenças relacionadas	31
2.2.1. Doenças cardiovasculares	35
2.2.2. Carcinogênese	41
2.2.3. Doenças neurodegenerativas	44
2.3. Antioxidantes no combate aos radicais livres	47
2.4. Antioxidantes endógenos	49
2.4.1. Antioxidantes enzimáticos	50
2.4.2. Antioxidantes não-enzimáticos	53
2.5. Antioxidantes alimentares.....	56
2.5.1. Carotenóides	57
2.5.2. Ácido ascórbico.....	60
2.5.3. Vitamina E	62
2.5.4. Compostos fenólicos.....	63
2.6. γ -orizanol	64
2.7. Etanol e estresse oxidativo	71
3. OBJETIVOS	74
3.1. Objetivo geral	74
3.2. Objetivos específicos	74
4. MATERIAL E MÉTODOS	75
4.1. Material	75
4.1.1. Amostras	75
4.2. Análises <i>in vitro</i>	75
4.2.1. Método do radical DPPH	75
4.2.2. Método do radical ABTS	77
4.2.3. Método de redução do complexo fosfomolibdênio	78
4.2.4. Método FRAP	79
4.3. Análises <i>in vivo</i>	80

4.3.1. Amostragem e amostra	80
4.3.2. Avaliação do ganho de peso e o coeficiente de eficácia alimentar (CEA)	81
4.3.3. Coleta do cérebro e fígado	81
4.3.4. Preparação dos homogeneizados dos tecidos cerebral e hepático	81
4.3.5. Atividade da superóxido desmutase	81
4.3.6. Determinação de grupos sulfidrílicos não-protéicos (GSH)	83
4.4. Comitê de ética	84
4.5. Estatística	84
5. RESULTADOS	85
5.1. Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	85
5.1.1. Atividade antioxidante utilizando o radical DPPH	85
5.1.2. Atividade antioxidante utilizando o radical ABTS	87
5.1.3. Atividade antioxidante utilizando o método FRAP	89
5.1.4. Atividade antioxidante utilizando o complexo fosfomolibdênio ...	91
5.2. Avaliação da atividade antioxidante <i>in vivo</i>	92
5.2.1. Avaliação da superóxido desmutase	96
5.2.2. Avaliação da glutatona reduzida	99
6. DISCUSSÃO	102
7. CONCLUSÕES	109
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
ANEXO I	130
ANEXO II	133

1 INTRODUÇÃO

As Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) são produzidas naturalmente em nosso organismo através de processos metabólicos oxidativos, possuindo um papel importante, como nas situações de ativação do sistema imunológico. Um claro exemplo é a utilização do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pelos macrófagos na fagocitose de bactérias, na desintoxicação de drogas, ou ainda na produção de óxido nítrico, importante nos processo de relaxamento dos vasos sanguíneos (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

As espécies reativas podem estar associadas a uma série de doenças degenerativas, inclusive mutagenicidade decorrentes de alterações no DNA, entre outras patologias (FIAMONCINI, 2002). Para retardar ou inibir a oxidação destes radicais livres, os organismos produzem antioxidantes classificados em enzimáticos e não enzimáticos (VASCONCELOS *et al.*, 2007; HALLIWEL; GUTTERIDGE, 2007).

Hábitos e estilo de vida assumida pelo homem moderno podem ser responsáveis por danos no balanço redox, especialmente hábitos alimentares errôneos e o consumo de álcool estão entre as principais causas. Estudos reportados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) demonstram que 3,2% da mortalidade global está relacionada ao consumo de álcool. No Brasil, o alcoolismo é um dos principais problemas de saúde pública, sendo um fator determinante em cerca de 10% de toda a morbidade e mortalidade ocorrida no país (MELONI; LARANJEIRA, 2004). Além da indução de neoplasias, doenças cardiovasculares e danos hepáticos, sabidamente o consumo crônico de etanol pode causar dano oxidativo hepático e cerebral (TIRAPELLI *et al.*, 2011; YOU *et al.*, 2010; SRIVASTAVA; SHIVANADAPPA, 2010; AUGUSTYNIAK; SKRZYDLEWSKA, 2009; FAREMI *et al.*, 2008; ZHONG *et al.*, 2012). Diante esta premissa alguns trabalhos sugerem a necessidade de uma suplementação com antioxidantes (SEIFRIED, *et al.*, 2006) preferencialmente os contidos em fontes naturais (KRISHNAIAH, *et al.*, 2010). Neste contexto, pesquisas que buscam fontes alternativas com poder antioxidante vêm sendo desenvolvidas. Dentre essas fontes, o γ -orizanol encontrado principalmente no farelo de arroz (*Oryzae sativa L.*) vem demonstrando em várias pesquisas uma relevante atividade antioxidante (HUANG, 2003).

Estudos com γ -orizanol revelam várias ações desse composto, tais como efeitos no crescimento, combate a doenças cefálicas e cervicais, minimização dos sintomas da menopausa, combate à anemia, tratamento de úlceras do estresse e como coadjuvante no tratamento de distúrbios circulatórios, doenças cardiovasculares, esteatose hepática, hipercalciúria, hiperlipidemia, litíase renal e neoplasias (JARIWALLA, 2001) Ao γ -orizanol também são relatados os efeitos hipocolesterolêmico, hipolipoprotéico e efeitos antioxidantes, este último lhe conferindo propriedades de conservação em alimentos e bebidas, bem como em cosméticos (SCARAVIELLO; ARELLANO, 1998).

Pelos efeitos deletérios às biomoléculas causados por EROS, este trabalho cria a perspectiva de se reconhecer no γ -orizanol um nutracêutico com potencial antioxidante no estresse oxidativo induzido por etanol.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Radicais livres e estresse oxidativo

O termo “radical livre” é geralmente utilizado para designar qualquer átomo, molécula ou íon contendo um ou mais elétrons livres na sua órbita externa, ou seja, não pareados. Esta configuração eletrônica transforma as estruturas em compostos muito instáveis, com meia vida curta, mas altamente reativos, sendo capazes de reagir com compostos situados próximo à sua órbita externa, passando a ter uma função oxidante ou redutora (FANG *et al.*, 2002; HALLIWEL; GUTTERIDGE, 2007). Um ponto sobrescrito após a fórmula química é usado para denotar um radical livre. Os radicais livres são capazes de produzir reações em cadeia, e cada passo desta cascata de reações gera um novo radical que desencadeia um novo passo (BUONOCORE *et al.*, 2010). O radical livre mais simples é o hidrogênio atômico, desde que o átomo de hidrogênio possui um único elétron.

Muitos radicais livres existem nos sistemas vivos, embora a maioria das moléculas *in vivo* sejam não radicalares. Radicais podem ser formados pela perda ou ganho de um único elétron a partir de um não radical (Figura 1):

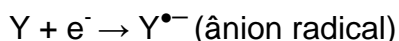
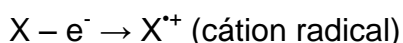


Figura 1. Representação da formação de radicais a partir de um não radical (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 2007)

Radicalis também podem ser formados quando uma ligação covalente é quebrada permanecendo o elétron da ligação em cada um dos átomos. Este processo é conhecido como fissão homolítica (Figura 2).

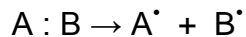


Figura 2. Representação da formação de radicais a partir de fissão homolítica (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 2007)

Contrário à fissão homolítica é a fissão heterolítica (Figura 3), na qual um átomo recebe ambos os elétrons quando a ligação covalente é quebrada. Na fissão heterolítica não é formado um radical livre, como demonstrado abaixo:

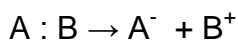


Figura 3. Representação da fissão heterolítica (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 2007)

Essas reações anteriormente descritas podem ocorrer no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana celular, tendo como alvo proteínas, lipídios, carboidratos e o DNA, dependendo do local de formação (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 2007).

Na atmosfera terrestre, as moléculas de oxigênio diatômico são as maiores promotoras de reações nos sistemas biológicos (KEHRER, 2000). Excetuando-se os organismos anaeróbios, todos os animais e vegetais necessitam de oxigênio para obtenção de energia (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). O oxigênio possui um papel central na evolução da complexa vida na terra devido a sua bioquímica simétrica na fotossíntese e respiração aeróbia que pode manter a homeostase na biosfera de nosso planeta (BUONOCORE *et al.*, 2010).

Grande parte do O₂ absorvido (95%) pelos organismos aeróbicos é reduzido, formando água na cadeia respiratória. Isto ocorre através do transporte de elétrons na membrana das mitocôndrias, bem como no retículo endoplasmático, onde o sistema enzimático do processo de fosforilação oxidativa reduz o O₂ pelo sistema da citocromo oxidase, liberando-o na forma de água (Figura 4).

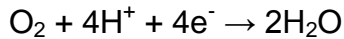


Figura 4. Representação da formação da molécula de água a partir da redução do oxigênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007)

Uma pequena parte de O_2 é reduzida de forma univalente, onde um elétron passa a ocupar um dos orbitais externos, ao mesmo tempo em que outro elétron continua desemparelhado, produzindo intermediários reativos conhecidos como radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (EROS) (KEHRER, 2000; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Desta forma, um radical livre é qualquer espécie capaz de existência independente que contém um ou mais elétrons desemparelhados (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007), e que a formação destas substâncias é uma ação contínua e fisiológica. Vale ressaltar que espécies reativas também podem ser formadas a partir de nitrogênio (ERN), cloro (ERC), enxofre (ERE) e metais (VASCONCELOS *et al.*, 2007). Esta peculiaridade química aumenta sua reatividade para as biomoléculas, e, em geral, altera o tamanho e a forma dos compostos com os quais ele interage, formando a base de sua toxicidade e importância biológica das espécies reativas..

EROS é um termo coletivo que inclui não somente os radicais de oxigênio, mas alguns não radicais derivados do O_2 que são facilmente convertidos em radicais, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl), e ozônio (O_3) (Tabela 1) (BUONOCORE *et al.*, 2010). Por isso, todos os radicais de oxigênio são EROS, mas nem todas as espécies reativas são radicais de oxigênio (Tabela 2).

Tabela 1. Nomenclatura das Espécies Reativas de Oxigênio

Radicalares	Não Radicalares
Superóxido, $O_2^{\cdot-}$	Peróxido de Hidrogênio, H_2O_2
Hidroperoxila, HO_2^{\cdot}	Peroxinitrito, $ONOO^-$
Hidroxila, OH^{\cdot}	Ácido peroxinitroso, $ONOOH$
Peroxila, RO_2^{\cdot}	Peroxicarbonato nitroso, $ONOOCO_2^-$
Alcoxila, RO^{\cdot}	Ácido hipobromoso, $HOBr$
Carbonato, $CO_3^{\cdot-}$	Ozônio, O_3
Dióxido de Carbono, $CO_2^{\cdot-}$	Oxigênio Singlete, 1O_2

Fonte: HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007

Tabela 2. Nomenclatura de espécies reativas não derivadas do O_2

Espécies Reativas de cloro	
Ácido hipocloroso, $HOCl$	Cloro atômico, Cl^{\cdot}
Cloreto de nitrila, NO_2Cl	Dióxido de cloro, ClO_2
Cloreto de bromo, $BrCl$	
Espécies Reativas de nitrogênio	
Ácido nitroso, HNO_2	Dióxido de nitrogênio, NO_2^{\cdot}
Ácido peroxinitroso, $ONOOH$	Nitrato de peroxiacetila, $CH_3C(O)OONO_2$
Alquila peroxinitrato, RO_2ONO	Nitrato, NO_3^{\cdot}
Alquila peroxinitrito, $ROONO$	Óxido nítrico, NO^{\cdot}
Ânion nitroxila, NO^-	Peroxinitrato, O_2NOO^-
Cátion nitrônio (nitrila), NO_2^+	Peroxinitrito, $ONOO^-$
Cátion nitrosila, NO^+	Tetróxido de dinitrogênio, N_2O_4
Cloreto de nitrila, NO_2Cl	Trióxido de dinitrogênio, N_2O_3

Espécies Reativas de bromo

Ácido hipobromoso, HOBr

Cloreto de bromo, BrCl

Bromo atômico, Br[•]

Espécies Reativas de enxofre
Radical tiíla, RS[•]

 Fonte: HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; VASCONCELOS *et al.*, 2007

As EROS são produzidas naturalmente em nosso organismo através de processos metabólicos oxidativos (KEHRER, 2000; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004). Assim as EROS podem ser formadas de fontes endógenas, tais como: mitocôndrias, metabolismo da citocromo P450, peroxissomos, microsossomos, ativação inflamatória da célula, sistema monooxigenase, óxido nítrico sintase e várias outras enzimas envolvidas no processo inflamatório. A carga de EROS também pode ser amplificada pela presença de metais “livres”, como o ferro, cobre e manganês, que são liberados a partir de complexos de metaloproteínas. Outro exemplo de fonte celular de radicais livres é a xantina oxidase, que é um membro de um grupo de enzimas conhecidas como molibdênio-ferro-enxofre flavina hidroxilases que catalisa a hidroxilação de purinas. Fontes endógenas adicionais de EROS são os neutrófilos, eosinófilos e macrófagos (BUONOCORE *et al.*, 2010). Um claro exemplo é a utilização do H₂O₂ pelos macrófagos na fagocitose de bactérias, na desintoxicação de drogas, ou ainda na produção de óxido nítrico, importante nos processo de relaxamento dos vasos sanguíneos (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004)

Os radicais livres também podem ser produzidos por uma série de processos exógenos como agentes ambientais e xenobióticos (íons metálicos, radiação e barbituratos) (KEHRER, 2000; BUONOCORE *et al.*, 2010).

Três produtos intermediários são formados a partir da redução do oxigênio: ânion superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radical hidroxila (OH[•]). Entre eles, o peróxido de hidrogênio é o mais estável e pode ser acumulado em grande quantidade (BUONOCORE *et al.*, 2010).

O ânion superóxido é considerado uma EROS primária. Ele pode interagir com outras moléculas para gerar EROS secundário, e pode ser um fator redutor ou

oxidante (Figura 5). A partir da reação de redução, oxigênio molecular é produzido. No entanto, se a reação é de oxidação, o peróxido de hidrogênio é gerado:

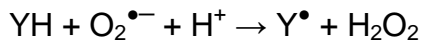
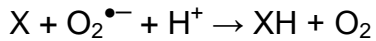


Figura 5. Representação do ânion superóxido como fator redutor para formação da molécula de oxigênio, ou como agente oxidante para formação do peróxido de hidrogênio (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 2007)

Nos mamíferos, uma pequena fração do oxigênio total é utilizada para a criação do $O_2^{\bullet-}$, tendo como rota mais importante a cadeia respiratória mitocondrial e a oxidação heme. O ferro do heme é reduzido ao estado ferroso na deoxihemoglobina, mas quando ele se liga ao oxigênio, uma estrutura intermediária na qual um elétron é deslocado entre o íon ferroso e o oxigênio é criada. O resultado é um intermediário entre o Fe (II) ligado ao oxigênio e o Fe (III) ligado ao superóxido. Algumas vezes a molécula de oxihemoglobina entra em decomposição e libera ânion superóxido.

O radical $\bullet OH$ possui um alto poder oxidante que o torna provavelmente o mais reativo deles. Este possui uma meia vida *in vivo* muito curta, cerca de 10^{-9} s. Assim, quando produzido *in vivo* o $\bullet OH$ reage próximo ao local de formação. Devido a esta característica de extrema reatividade eles são eliminados no mesmo local de formação por interagirem com a primeira molécula que encontram. O $\bullet OH$ é produzido principalmente quando há um excesso na produção de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 na reação de Haber-Weiss (LIOCHEV; FRIDOVICH, 1999) (Figura 6):

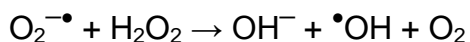


Figura 6. Representação da reação e Haber-Weiss onde ocorre a produção do radical hidroxila a partir o ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (LIOCHEV; FRIDOVICH, 1999)

O $\cdot\text{OH}$ também pode ser gerado por outros mecanismos: decomposição da água por radiação ionizante e decomposição fotolítica de alquila hidroperóxidos. *In vivo*, uma grande parte de $\cdot\text{OH}$ advêm da quebra do H_2O_2 catalisada por metais, denominada reação de Fenton. *In vivo*, de acordo com a reação de Fenton, isto ocorre quando o metal de transição é o ferro. Em situações onde há um acúmulo de ferro no organismo, por exemplo na hemocromatose, uma grande quantidade disponível de ferro livre pode causar efeitos deletérios (BUONOCORE *et al.*, 2010).

2.1.1. Peroxidação lipídica

Um aumento na produção de EROS nas células e/ou declínio na defesa antioxidante causando uma descompensação no equilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes em favor dos pró-oxidantes (CHEN *et al.*, 1995) (Figura 7), pode ser um importante mediador de dano das estruturas celulares, incluindo lipídios e membranas, proteínas e DNA (BUONOCORE *et al.*, 2010) (Figura 8). O estresse oxidativo é caracterizado pelo aumento da peroxidação lipídica.

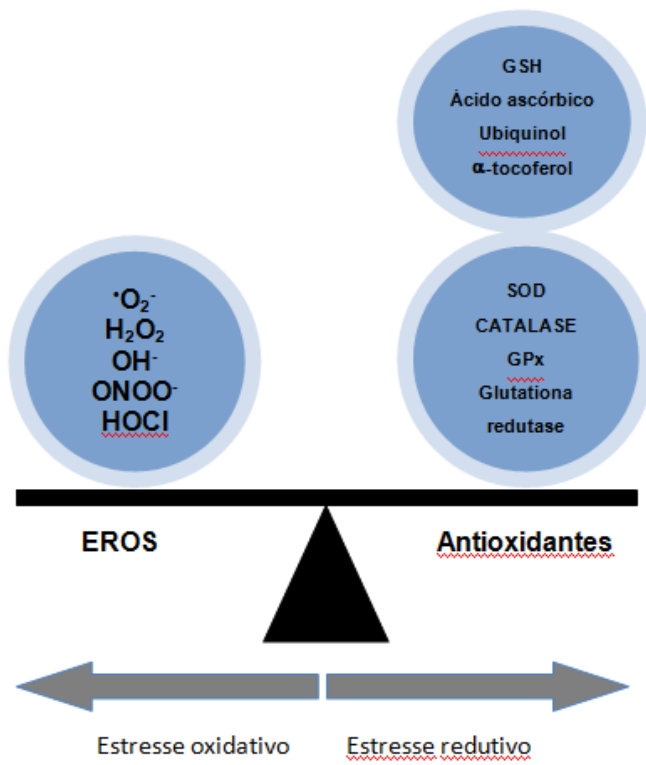


Figura 7. Determinantes do balanço redox (LEOPOLD; LOSCALZO, 2008)

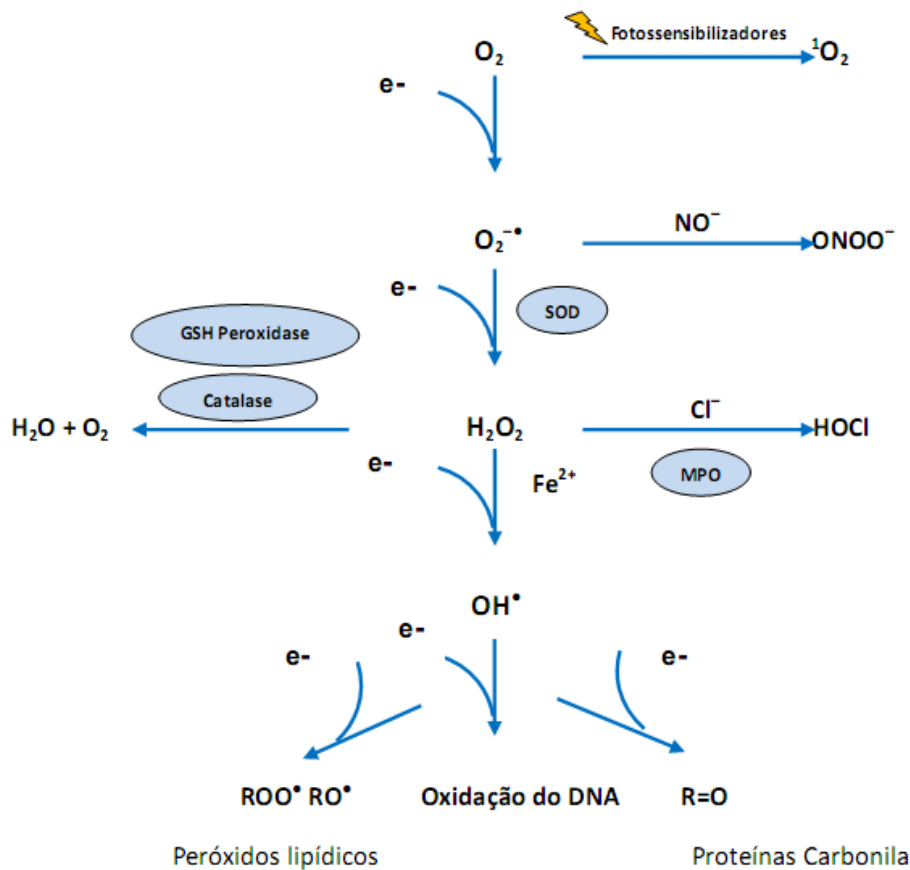


Figura 8. Esquema representativo da formação de EROS e consequências nas biomoléculas celulares (CHEN *et al.*, 2012)

A peroxidação lipídica tem início na abstração de um átomo de hidrogênio a partir de uma ligação C-H de um hidrocarboneto na cadeia lateral de um resíduo de ácido graxo poliinsaturado ω -3 ou ω -6. O elétron desemparelhado do H^\bullet permanece no carbono. Então, o carbono central pode reagir com o O_2 para formar o radical peróxil propagando a reação em cadeia e deflagrando a peroxidação lipídica (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 2007). Os ácidos graxos poliinsaturados são constituintes de glicerofosfolipídios e outros lipídios no plasma e membrana de organelas, e são os maiores alvos intracelulares dos agentes oxidantes. A peroxidação lipídica gera números produtos hidroperóxidos lipídicos, tais como: malondialdeído (MDA), 4-hidroxi-peroxi-2-nonenal (HPNE), 4-oxo-2-nonenal (ONE) e 4-hidroxi-2-nonenal. Estes aldeídos podem reagir com nucleotídeos individuais e aminoácidos nucleofílicos, induzindo efeitos de sinalização severos (FRANCO *et al.*, 2009).

2.2. Estresse oxidativo, morte celular e doenças relacionadas

A produção excessiva de EROS na célula e/ou uma insuficiência no sistema de defesa celular antioxidante para neutralizá-los resulta em estresse oxidativo que se não for apropriadamente controlado pode causar danos severos a macromoléculas celulares, incluindo proteínas mitocondriais, lipídios e membranas celulares e em especial ao DNA, levando a danos oxidativos que contribuem para o surgimento de doenças. Estima-se que ocorra diariamente em todas as células do corpo humano danos ao DNA na ordem de 2×10^4 . Onde uma significativa parte do dano é causada por EROS. Estudos demonstram que aumento na pressão de oxigênio celular pode levar ao acúmulo de aberrações cromossômicas (BUONOCORE; PERRONE; TATARANNO, 2010; BARZILAI; YAMAMOTO, 2004; LEOPOLD; LOSCALZO, 2008; KLAUNIG; KAMENDULIS, 2004).

A toxicidade das EROS provém da habilidade para reagir com todos os componentes da molécula do DNA, causando danos tanto nas bases de purina quanto nas de pirimidina e também na estrutura da desoxirribose (BUONOCORE; PERRONE; TATARANNO, 2010). Um aumento do estresse oxidativo no nível de DNA, RNA e proteínas “adutas” oxidadas podem contribuir para progressão de mutagenicidade. As proteínas e DNA adutos são o resultado da interação de um metabólito ativo, geralmente um produto carcinógeno com uma proteína ou DNA (FARMER, 2004).

A oxidação de nucleotídeos possui um grande potencial fisiopatológico em longo prazo, podendo incorrer em síntese defeituosa repetida de inúmeras proteínas ao longo da vida da célula. A 8-hidroxiguanina (8-OHG) é uma modificação de base abundante em DNA de mamíferos cujos níveis se encontram aumentados no estresse oxidativo (CHENG *et al.*, 1992), e pode formar um par de bases incorreto com adenina induzindo mutações durante a síntese do DNA. A 8-OHG é largamente utilizada na literatura como biomarcador de dano nuclear por radicais livres de oxigênio (BARZILAI; YAMAMOTO, 2004; BUTTKE; SANDSTROM, 1994).

Os efeitos do estresse oxidativo em relação DNA recebem mais atenção do que ao RNA, embora o RNA seja mais susceptível ao dano oxidativo que o DNA devido à estrutura de fita única e acessibilidade aos oxidantes produzidos na mitocôndria. Diferente do DNA nuclear, o DNAm não é codificado com proteínas histona, podendo ser mais susceptível a dano oxidativo. Além disso, mutações no

DNAmt, acumulados nos tecidos mais velhos, podem contribuir para o envelhecimento precoce (WEIDNER *et al.*, 2011).

Os vários tipos de lesões que resultam a partir do dano sofrido pelo DNA são rapidamente detectadas, e envolvem a ativação de uma intrincada teia de vias de sinalização, conhecidas como “*resposta ao dano do DNA*”. Esta resposta resulta em vias de reparação do DNA, a partir da ativação de pontos de inspeção do ciclo celular, ou na programação de apoptose celular (BARZILAI; YAMAMOTO, 2004).

O constante desequilíbrio no balanço redox causando o estresse oxidativo é um denominador comum da “síndrome da instabilidade genética” – desordens que refletem um defeito na resposta ao dano do DNA (BARZILAI; YAMAMOTO, 2004)

No caso da incapacidade de reparo a célula pode desencadear uma forma morfológicamente distinta de morte celular denominada morte celular programada ou apoptose (Figura 9). A apoptose é o resultado final de um programa de desenvolvimento extremamente organizado caracterizado pela ativação progressiva de vias precisas, que envolve vários processos fisiológicos e patológicos (FRANCO *et al.*, 2009) que incluem: ativação das caspases, alterações no potencial redox celular, encolhimento e condensamento celular, o citoesqueleto sofre colapso, o envelope nuclear é desmontado, e o DNA nuclear é fragmentado.

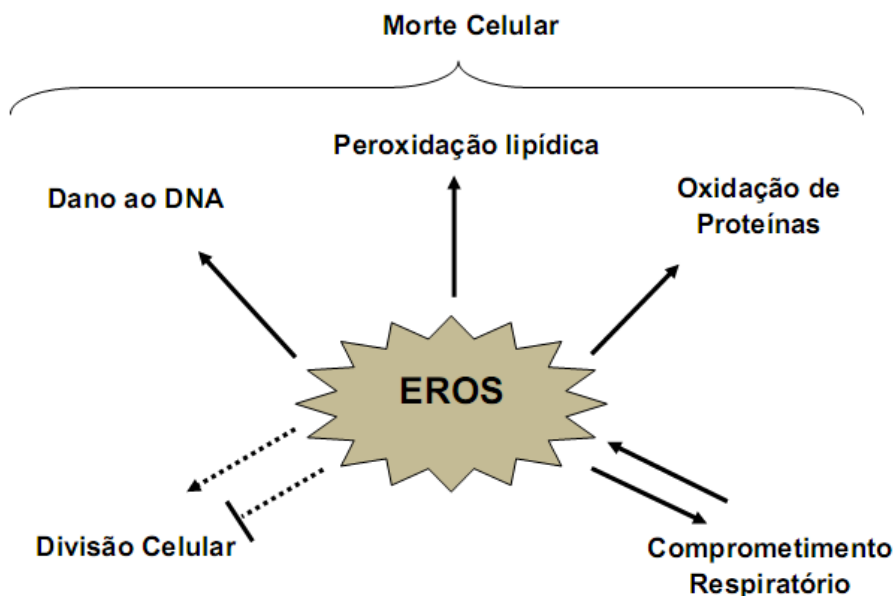


Figura 9. Efeitos constantes do estresse oxidativo por ROS podem desencadear apoptose (Ott *et al.*, 2007)

O estágio inicial da apoptose é dependente de uma família de proteases, denominadas caspases que apresentam uma cisteína no sítio ativo e cliva suas proteínas-alvo em ácido aspártico específico. As caspases são sintetizadas na célula com um precursor inativo – procaspases, que geralmente são ativados pela clivagem do ácido aspártico por outras caspases. Uma vez ativada, as caspases clivam e ativam outras procaspases, resultando em uma cascata de amplificação proteolítica. Para iniciar a cascata de caspases as procaspases são ativadas por proteínas adaptadoras que fazem com que múltiplas cópias de caspases específicas, denominadas procaspases iniciadoras se complexem. Quando entram no complexo, sua proximidade faz com que haja clivagem mútua, desencadeando a ativação, ou ainda, a própria agregação causa alteração conformacional que ativa as procaspases (ALBERTS *et al.*, 2004). A ativação da apoptose pode ser de forma intrínseca ou extrínseca.

A indução via extrínseca é desencadeada pela ativação de receptores de morte como aqueles ativados pela proteína ligante Fas (FasL (CD95/Apo-1), pelo ligante indutor de apoptose relacionado a TNF (TRAIL DRA/DR5) e pelo fator de necrose tumoral (TNFR1) (ALBERTS *et al.*, 2004; FRANCO *et al.*, 2009).

A via intrínseca da apoptose, também chamada de via mitocondrial, é ativada por uma variedade de estímulos citotóxicos ou estressores ambientais. Estes estímulos liberam proteínas pró apoptóticas a partir da mitocôndria, incluindo a citocromo c, a partir da abertura de poros de transição da permeabilidade mitocondrial (MPTP) (composto do canal ânion voltáico dependente, translocador adenina nucleotídeo (ANT), e ciclofilina D) e perda do potencial de membrana mitocondrial (MMP). A via intrínseca também é regulada pela família de proteínas Bcl-2 que promovem a ativação das procaspases e a morte celular (ALBERTS *et al.*, 2004; FRANCO *et al.*, 2009).

Embora exista uma considerável variação nos sinais e eventos metabólicos celulares necessários para induzir apoptose em diversos tipos de células, as características morfológicas associadas com esta necessidade se encontram altamente conservadas nas células. Isto pode significar a coexistência de múltiplas vias de sinalização que convergem a partir de uma sequência comum de eventos que resulta na apoptose. A hipótese do estresse oxidativo como um mediador de apoptose é baseado na premissa de que isto pode ter sido uma vantagem

evolucionária para mecanismos multicelulares para conservar o estado pré-existente de cerco oxidativo com a finalidade de mediar algumas formas de morte celular programada (BUTTKE; SANDSTROM, 1994). Esta hipótese é baseada em alguns achados: a adição de EROS ou uma depleção de antioxidantes celulares podem resultar em apoptose; pode estar associada com a indução de EROS; e finalmente, a apoptose pode ser bloqueada pela adição de compostos antioxidantes (BUTTKE; SANDSTROM, 1994).

A apoptose induzida por estresse oxidativo tem sido amplamente associada com a ativação das vias intrínsecas de apoptose ao nível da mitocôndria (FEARON; FAUX, 2009). Uma vez que a cadeia respiratória é a principal fonte de formação de EROS em células aeróbicas (OTT *et al.*, 2007). O DNAm é um importante alvo das EROS devido a sua proximidade à cadeia transportadora de elétrons e a ausência de proteção das histonas. O dano ao DNAm por EROS leva a uma injúria letal da célula, instabilidade genômica mitocondrial, causando disfunção respiratória através da interrupção do transporte de elétrons, alteração do potencial da membrana mitocondrial, e geração de ATP. Embora EROS na mitocôndria afetem claramente o DNAm, as alterações também podem ser observada em proteínas. Proteínas modificadas oxidativamente geralmente são não funcionais, perdendo a integridade estrutural e catalítica. Uma das proteínas oxidadas e inativadas pelas EROS é a aconitase mitocondrial. Esta proteína, uma enzima no ciclo do ácido cítrico, catalisa a interconversão de citrato e isocitrato, uma reação essencial para o funcionamento metabólico normal (YAN *et al.*, 1997; FRANCO *et al.*, 2009).

Assim, como sumarizado acima as EROS podem impactar na complexa rede de proteínas desafiando a célula a reparar o dano causado, ou se isto não é possível, mediando a indução e execução do programa de morte celular.

As espécies reativas podem estar associadas a uma série de doenças, tais como: lesões teciduais, processos inflamatórios crônicos, dano causado por isquemia/reperfusão, aterosclerose, artrite reumática, envelhecimento, doenças circulatórias, diabetes tipo II, e doenças neurodegenerativas, tais como mal de Alzheimer e Parkinson. As EROS também podem formar vários tipos de câncer, decorrentes de alterações no DNA, entre outras patologias (FIAMONCINI, 2002; OTT; GOGVADZE; ORRENIUS, 2007) (Figura 10).

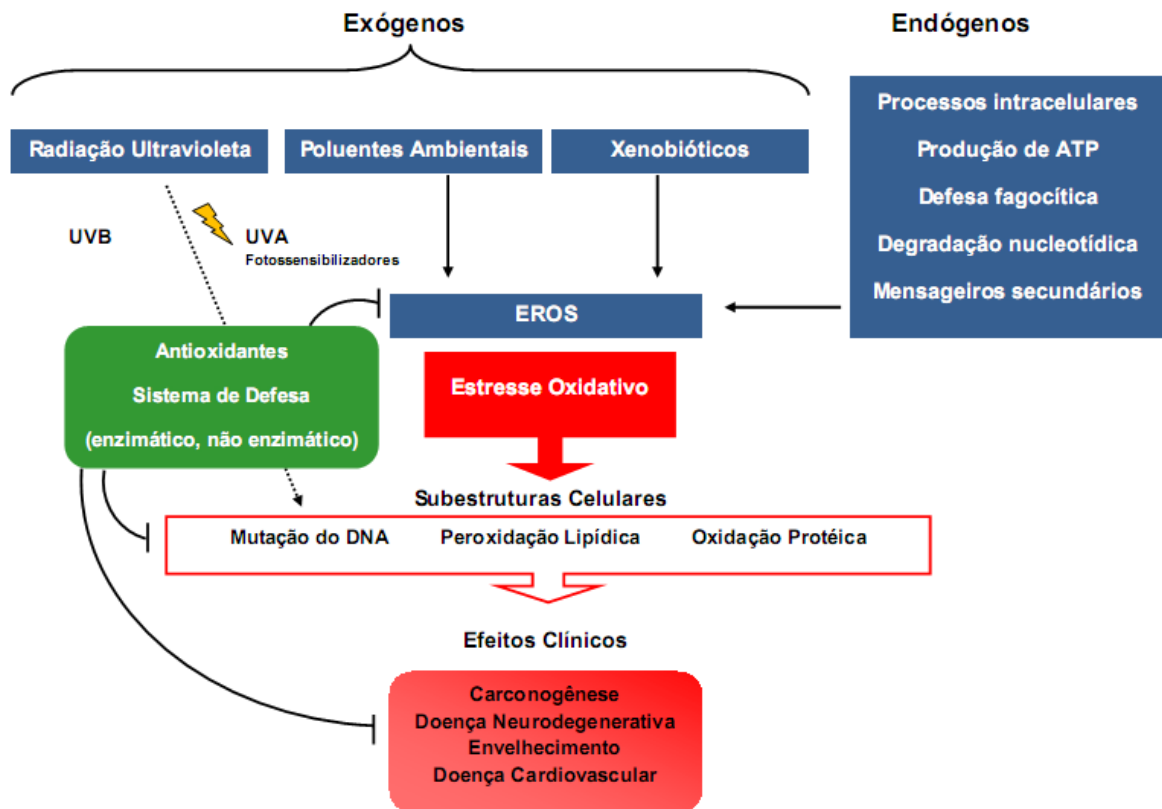


Figura 10. Efeitos celulares e clínicos das EROS a partir de fontes endógenas e exógenas (Chen *et al.*, 2012)

2.2.1. Doenças cardiovasculares

A doença cardiovascular é a maior causa de mortalidade no mundo ocidental e em desenvolvimento, sendo que uma grande proporção de mortes ocorre antes da expectativa média de vida. Em um largo espectro a doença cardiovascular (DCV) pode ser classificada em doença cardíaca coronariana, cerebrovascular e vascular periférica. A formação de placas ateroscleróticas e ateromas são comuns em ambos os casos, que pode levar à oclusão de pequenos vasos sanguíneos e interrupção do fluxo sanguíneo. Isto pode levar a manifestações agudas como o infarto do miocárdio ou acidente vascular cerebral, comprometendo de forma severa o fornecimento de oxigênio e nutrientes aos tecidos (FEARON; FAUX, 2009). A DCV aterosclerótica é uma doença inflamatória arterial crônica caracterizada pelo acúmulo de lipídios, células inflamatórias, células musculares lisas, e matriz

extracelular na íntima arterial (BLANC *et al.*, 2003), e representa uma significativa causa de morbidade e mortalidade nas nações desenvolvidas, respondendo por cerca de 16,7 milhões de mortes (LEOPOLD; LOSCALZO, 2008).

Vários fatores de risco estão associados com doenças cardiovasculares podendo ser classificados em dois grandes grupos: invariáveis e variáveis. Os fatores de risco invariáveis incluem composição genética, idade, climatério e gênero. Os fatores variáveis incluem os estímulos ambientais e estilo de vida, incluindo dieta, tabagismo, estado de doenças concorrentes, consumo de etanol e exercício físico. Os fatores de risco podem contribuir de forma significativa para a progressão da DCV (FEARON; FAUX, 2009).

O processo de formação da aterosclerose envolve uma cascata de processos inflamatórios, iniciando com dano ao endotélio que é o principal regulador da função vascular por manutenção do tônus e fluxo sanguíneo. O passo inicial da doença cardiovascular é a disfunção progressiva do endotélio desencadeado por um processo inflamatório crônico na parede dos vasos (BLANC *et al.*, 2003). Disto, resulta uma indução de moléculas de adesão no endotélio celular que leva a ligação de monócitos, aprisionando-os e facilitando a sua transmigração da camada endotelial para a íntima. Posteriormente há uma conversão dos monócitos em macrófagos, posteriormente a absorção de lipídios modificados oxidativamente faz com que esses macrófagos se transformem em células esponjosas. As células do músculo liso vascular também contribuem para o crescimento da lesão aterosclerótica, pois o seu processo migratório da camada íntima para a camada medial estimula o crescimento plaquetário. As alterações na reatividade do vaso e aumento para a propensão de formar coágulos contribuem para a formação e progressão da doença (FEARON; FAUX, 2009).

Várias evidências ligam as EROS, principalmente $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 (PAPAHARALAMBUS; GRIENGLING, 2007) na injúria endotelial, progressão da doença e disfunção cardiovascular. Muitos tipos de EROS têm sido implicadas na migração e proliferação de células musculares lisas para a camada íntima. Isto pode facilitar alterações dependentes de EROS na expressão e ativação de matriz de metaloproteinases, as quais degradam as matrizes extracelulares da íntima e promovem a migração do músculo liso. Monócitos e macrófagos, conforme descrito anteriormente, também possuem habilidade para produzir EROS, que exercem atividade na progressão da lesão e inflamação, e demonstram causar modificações

oxidativas nas lipoproteínas de baixa densidade. Plaquetas também podem ser ativadas por $O_2^{\bullet-}$ e outros radicais, promovendo agregação e trombogênese (FEARON; FAUX, 2009).

As EROS geradas na mitocôndria são importantes para muitas vias de sinalização que contribuem para a doença cardiovascular. O agente vasoativo angiotensina II, o fator de crescimento epidermal (EGF), fator- β de crescimento e transformação (TGF- β) e a citocina fator- α de necrose tumoral (TNF- α) são capazes de modular a produção de EROS mitocondriais. A contribuição mitocondrial para a resposta de sinalização ao fator de crescimento parece envolver a transativação de receptores ao fator de crescimento e está associada com a proteção contra o estresse oxidativo. Estudos sustentam a hipótese de que EROS induzidos pela mitocôndria exercem função nos sinais de sobrevivência e morte celular, conforme descrito anteriormente. A proteção contra o estresse oxidativo pode ser proporcionada por vários mecanismos incluindo o aumento na regulação das defesas antioxidantes (FEARON; FAUX, 2009).

Alterações no DNA mitocondrial devido à aterosclerose também foram relatadas. O estresse oxidativo e dano ao DNA são gerados por lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (oxLDL), induzidas por dieta com potencial hipercolesterolêmico, o que contribui potencialmente para disfunção de células endoteliais, VSMC, linfócitos T e macrófagos (FEARON; FAUX, 2009; LEOPOLD; LOSCALZO, 2008) (Figura 11). Camundongos *knockouts* para apoE que foram projetados para serem deficientes na enzima mitocondrial manganês superóxido desmutase (MnSOD) as lesões ateroscleróticas se manifestarem de forma precoce (20 semanas), em uma dieta contendo 4% de lipídios, o que foi relacionado com aumento precoce no dano ao DNAm. Isto leva a crer, que a disfunção mitocondrial acentua a aterosclerose por modular o fenótipo das células vasculares, e a avaliação de dano ao DNAm reflete o risco de aterosclerose mediada por EROS (BALLINGER *et al.*, 2002).

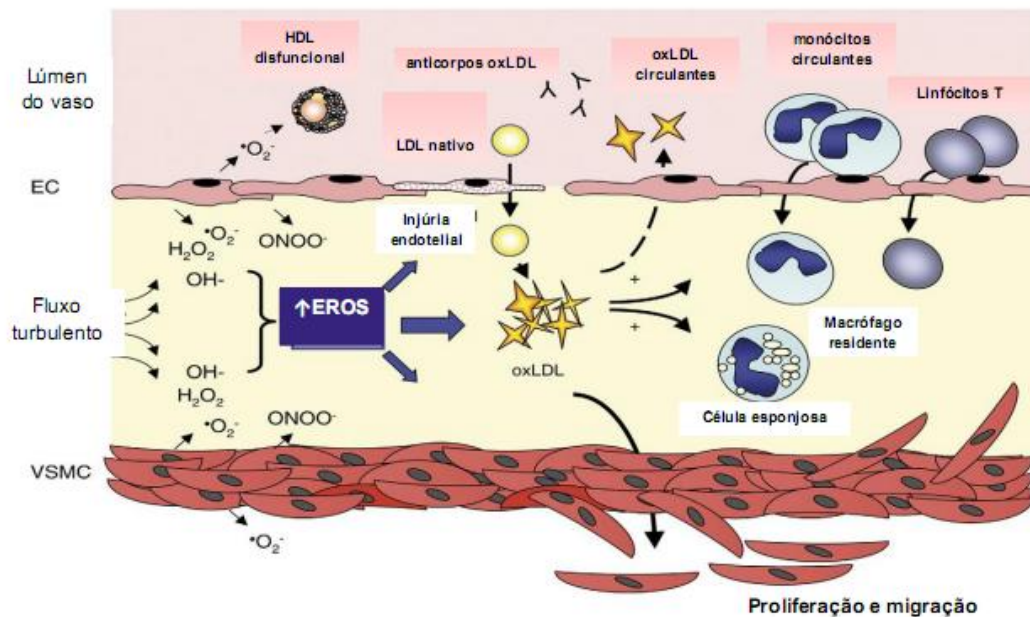


Figura 11. EROS e a patogênese da aterosclerose (LEOPOLD; LOSCALZO, 2008)

Estudos sugerem que provavelmente a maior fonte de EROS na doença cardiovascular é produzida pelo complexo nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase. Esta oxidase foi descrita inicialmente em fagócitos no sistema imune onde há um alto nível de produção de EROS no vacúolo dos fagócitos que fazem parte do sistema de defesa do hospedeiro, mediando a eliminação dos patógenos ingeridos. Durante o processo de fagocitose pelos macrófagos e neutrófilos este complexo enzimático gera uma grande explosão de $O_2^{\bullet-}$ no lado extracelular da membrana interna pela redução de um elétron do oxigênio, usando a NADPH como uma doadora de elétron. Entretanto, tem sido observada a geração de EROS dependente de NADPH em numerosas células não fagocitárias, embora em quantidade menores que as fagocitárias. No sistema cardiovascular, isto inclui as VSMC, células endoteliais, fibroblastos cardíacos e adventícios e cardiomiócitos (SUGAMURA; KEANEY JR., 2011). O aumento da atividade da NADPH oxidase contribui fortemente para a patogênese em modelos experimentais de doença vascular, incluindo aterosclerose induzida por colesterol. O aumento da produção de $O_2^{\bullet-}$ pela NADPH oxidase tem sido ligada a perda de função de NO^{\bullet} endotelial em pacientes com doença cardíaca coronariana. Vale

lembrar, que não somente a NADPH oxidase, mas também a oxidase fagocitária exerce um importante papel na produção de $O_2^{\bullet-}$ como monócitos e linfócitos que podem se infiltrar no tecido cardiovascular e facilitar alterações funcionais e estruturais (FEARON; FAUX, 2009).

O NO^{\bullet} possui um papel bem definido na sinalização e homeostase celular, mantendo o tônus e reatividade vascular. No entanto, o NO^{\bullet} também pode contribuir para a patologia cardiovascular. Sob certas condições, como no caso de disponibilidade reduzida do cofator BH_4 ou de L-arginina, a isoforma endotelial da óxido nítrico sintase (eNOS) diminui a síntese de NO^{\bullet} e aumenta a produção de $O_2^{\bullet-}$. O $O_2^{\bullet-}$ produzido pode interagir com o NO^{\bullet} para produzir o não radical $ONOO^-$ (peroxinitrito) com potencial para alterar a função cardiovascular (PAPAHARALAMBUS; GRIENGLING, 2007).

A adição de $ONOO^-$ às células, leva a uma rápida protonação, seguida por depleção de grupos $-SH$ e outros antioxidantes, oxidação e nitração de lipídios, quebra da fita de DNA, nitração e deaminação de bases de DNA, nitração de resíduos de aminoácidos aromáticos em proteínas, bem como uma oxidação de cisteína, metionina e outros resíduos (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 2007).

Outras enzimas celulares também podem produzir EROS para contribuir com DCV, tais como a xantina oxidase, encontrada no plasma e endotélio, que metaboliza xantina, hipoxantina e NADH para produzir $O_2^{\bullet-}$ que pode ser desmutada para H_2O_2 .

Lipoxigenases também pode contribuir para a produção de EROS na aterosclerose por catalisar a modificação oxidativa de ácidos graxos poliinsaturados e a produção de leucotrienos pró-inflamatórios via linear a partir do araquidonato (FEARON; FAUX, 2009; NELSON; COX, 2002).

A mieloperoxidase, um membro da família de enzimas peroxidase heme produz ácido hipocloroso que se dissocia para formar o ânion hipoclorito, um poderoso agente oxidante, é uma enzima catalisadora para a peroxidação lipídica quando secretada a partir de macrófagos ativados, direcionando a oxidação da HDL e dando suporte à captação de lipídios e a formação de carreadores lipídicos de células esponjosas. Os macrófagos em células ateroscleróticas humanas são ricos em mieloperoxidase enzimaticamente ativa (FEARON; FAUX, 2009).

O desequilíbrio redox em direção ao estresse oxidativo, pode promover e facilitar a oxidação da LDL nativa. A oxLDL é quimiotática para monócitos e linfócitos

T circulantes, sendo absorvida por macrófagos residentes para formar células esponjosas que estimulam a proliferação e migração de VSMC para servir como um ninho para a formação da lesão aterosclerótica. Além disso, o excesso de ROS aumenta estes efeitos tornando o HDL disfuncional, reagindo com NO^\bullet disponível para gerar ONOO^- e promover a disfunção endotelial, estimulando diretamente o crescimento de VSMC (LEOPOLD; LOSCALZO, 2008).

Diante o exposto, a ideia que a aterosclerose é uma doença inflamatória centrada em torno da LDL oxidada como o principal efector não é inteiramente verdadeira. O estresse oxidativo exerce um papel mais amplo na patogênese da doença. Os modelos animais para gênese da aterosclerose têm demonstrado que EROS são produzidos por muitos constituintes da placa. Em modelos animais para aterosclerose precoce no qual a hipercolesterolemia foi secundária para um defeito no receptor de LDL, a produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ direcionada por NADPH foi duas vezes maior comparado aos animais controle. Nas VSMC de lesão aterosclerótica mais avançada, as EROS derivadas da NADPH oxidase podem ter uma importante função na progressão da doença. Angiotensina II, fator de crescimento derivados das plaquetas (PDGF) e $\text{TNF-}\alpha$ podem aumentar as EROS na lesão aterosclerótica por estimulação dos miócitos vasculares locais a produzirem radicais livres. Estas EROS podem contribuir para a oxidação da LDL, produção de proteína quimioatrativa de monócitos 1 (MCP-1), aumento de moléculas de adesão e recrutamento de macrófagos, disfunção endotelial e remodelamento da matriz extracelular por meio da degradação de colágeno e ruptura de plaquetas (FEARON; FAUX, 2009). A expressão da MCP-1 é redox sensível e envolve a ativação mediada por ROS das cinases extracelulares sinal ativadas (ERK 1/2). Além de promover a migração a MCP-1 também pode aumentar a resposta pró-inflamatória, levando a um ciclo vicioso de produção de ROS, migração de VSMC e ativação de ERK 1/2 (PAPAHARALAMBUS; GRIENDLING, 2007).

Assim, pode-se concluir que a DCV tem origem na injúria sofrida na parede dos vasos sanguíneos devido a ruptura da homeostase por alterações na arquitetura original e responsividade biológica, contribuindo para situações agudas ou crônicas como acidente vascular, hipertensão e aterosclerose. Nessas alterações a produção de EROS por vários componentes das paredes dos vasos sanguíneos exerce um papel fundamental para a iniciação e progressão da doença.

2.2.2. Espécies Reativas de Oxigênio e Carcinogênese

A carcinogênese segue um processo de várias etapas envolvendo mutação e aumento da proliferação celular. Pelo menos três estágios distintos têm sido definidos, a citar: iniciação, promoção e progressão (Figura 12). A iniciação é o passo onde uma célula normal sofre dano irreparável do DNA e envolve a formação de uma célula alterada (pré-neoplásica). A iniciação da célula alterada pode ocorrer através da interação com carcinogênicos físicos (por exemplo, raios UV) ou carcinogênicos químicos que possuem propriedades mutagênicas ou danosas ao DNA (agentes genotóxicos). O estágio de promoção é caracterizado pela expansão clonal das células iniciadas pela indução da proliferação celular e/ou inibição da apoptose, resultando na formação de uma lesão focal identificável. Este estágio requer a presença contínua do estímulo de promoção, assim sendo um processo reversível. O estágio final da carcinogênese é a progressão. Este estágio é considerado pelo acúmulo de dano genético adicional, levando as células de um fenótipo benigno para maligno, sendo este processo de caráter irreversível, envolvendo instabilidade genética, mudanças na ploidia nuclear, e ruptura da integridade cromossômica (KLAUNIG; KAMENDULIS, 2004; KLAUNIG *et al.*, 2011).

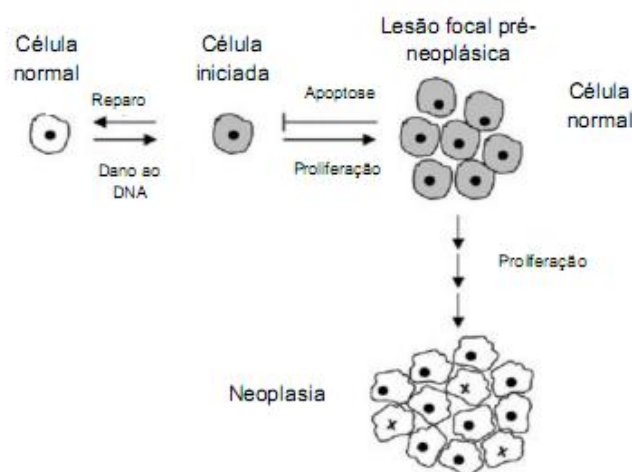


Figura 12. Processos celulares evolutivos da carcinogênese (KLAUNIG; KAMENDULIS, 2004)

Dois possíveis mecanismos têm sido propostos para a indução de câncer. Primeiro, um aumento na síntese de DNA e mitose por um carcinógeno não genotóxico pode induzir mutações na divisão celular por falta de reparo. Com a continuidade da divisão celular, mutações irão resultar em uma célula pré-neoplásica iniciada que pode se expandir por clonagem para uma neoplasia. Segundo, agentes genotóxicos podem servir para estimular o crescimento clonal seletivo das células já iniciadas (KLAUNIG; KAMENDULIS, 2004).

As células do corpo humano sofrem constante exposição a ataques de natureza oxidativa que influenciam no dano ao DNA, no crescimento e morte celular que contribuem para a carcinogênese. Esses ataques podem ser divididos em duas categorias: fatores endógenos e exógenos. As fontes endógenas incluem mitocôndria, peroxissomas, e ativação inflamatória celular, enquanto as fontes exógenas incluem agentes ambientais, radiação (por exemplo, raios γ , X, ou cósmicos e luz solar UV), agentes terapêuticos, exposição crônica a agentes virais (hepatite B), tabagismo (KLAUNIG *et al.*, 2011; KRYSTON, *et al.*, 2011) e álcool (SEITZ; STICKEL, 2006). Evidências experimentais sustentam um importante papel para as EROS no processo do câncer. Aumento de espécies reativas na célula seja através de modificações fisiológicas ou através da exposição a carcinogênicos químicos, contribuem para esse processo. Isto pode ocorrer através de efeitos genotóxicos resultando em DNA aduto oxidativo ou através de modificação da expressão gênica (KLAUNIG; KAMENDULIS, 2004).

Muitas formas de EROS são capazes de formar bases oxidadas. O $\bullet\text{OH}$ em particular tem demonstrado produzir um número de lesões oxidativas no DNA. Devido a sua migração limitada na célula o $\bullet\text{OH}$ reage rapidamente com componentes celulares, assim o $\bullet\text{OH}$ deve ser gerado adjacente ao ácido nucleico. O H_2O_2 é eletricamente neutro, menos reativo e mais rapidamente difuso e assim mais provável estar envolvido na formação de bases oxidadas de purinas e pirimidinas. Modificações permanentes do material genético resultante deste dano oxidativo representam o primeiro passo envolvido na mutagênese e carcinogênese. O ONOO^- também é difundido entre as células e é absorvido por mecanismo de transporte ativo (KRYSTON, *et al.*, 2011).

EROS/ERNS podem produzir diretamente quebra na fita de DNA, modificações nas bases de purina, pirimidina e desoxirribose, ou ainda ligações cruzadas no DNA. Danos persistentes ao DNA podem resultar em repressão ou

indução da transcrição, vias de indução de transdução de sinal, replicação de erros, e instabilidade genômica, todas que são vistas na carcinogênese (KLAUNIG; KAMENDULIS, 2004; KRYSTON, *et al.*, 2011).

O estado de metilação do DNA nuclear é considerado um mecanismo epigenético que influencia a expressão do DNA. Alterações na metilação não envolvem uma mudança ou codificação errada da sequência de bases do DNA, e sim a expressão de um gene anômalo, afetando a habilidade de proteínas ligadas ao DNA metilado interagir com elementos *cis*. As EROS estão entre os agentes e situações que podem resultar em decréscimo do estado de metilação do DNA. Vários carcinogênicos químicos podem modificar a metilação do DNA, a atividade da metil-transferase, e estrutura cromossomal (KLAUNIG; KAMENDULIS, 2004).

Há evidências que envolvem dano oxidativo mitocondrial no processo de carcinogênese (KRYSTON, *et al.*, 2011). Fragmentos de DNA mitocondrial foram encontrados inseridos no DNA nuclear, o que pode sugerir um mecanismo para ativação da oncogênese. As EROS são implicadas na ativação de genes nucleares que estão envolvidos na biogênese mitocondrial, transcrição, e replicação do gene mitocondrial. A estimulação da biogênese mitocondrial pode ser uma resposta celular para compensar a fosforilação oxidativa disfuncional associada com um DNA mitocondrial mutante. O dano oxidativo e a indução de mutação no DNA mitocondrial podem participar de múltiplos estágios no processo de carcinogênese, envolvendo EROS derivados da mitocôndria, indução e mutação de genes mitocondriais, e talvez a inserção de genes mitocondriais no DNA nuclear (KLAUNIG; KAMENDULIS, 2004).

Outro ponto de interesse na carcinogênese é o papel do estresse oxidativo na modificação do espaço juncional (*gap junctional*) entre as células. O espaço de junção é formado de placas de canais transmembrana composto por hexâmeros de conexina que formam canais hexaméricos ou hemicanais. Os hemicanais de uma célula se conectam aos hemicanais da célula vizinha para formar um canal transmembrana entre as duas células adjacentes formando o espaço juncional de comunicação intercelular (*gap junction intercellular communication* – GJIC) que permite a troca de íons e materiais hidrossolúveis de baixo peso molecular entre as células. Substâncias transdutoras de sinal e reguladoras de crescimento, incluindo moléculas que estão envolvidas na regulação do ciclo celular, crescimento celular, e morte celular, são capazes de atravessar o espaço juncional (PICCOLI, *et al.*, 2012).

O GJIC pode ser modulado durante o processo de câncer, havendo um decréscimo nessa comunicação.

O bloqueio da comunicação célula a célula tem sido associado como um mecanismo de ação do estágio de promoção tumoral de carcinogênicos químicos. A indução do estresse oxidativo também modula esta comunicação. Por exemplo, o H_2O_2 inibe a comunicação celular, que é reversível, e envolve uma via de transdução de sinal dependente de glutathione. Além disso, alterações no estado do estresse oxidativo parecem afetar a montagem dos espaços juncionais nos nódulos neoplásicos. O bloqueio do GJIC em células normais e pré-neoplásicas cria um ambiente no qual estas células são isoladas dos fatores que controlam o crescimento das células normais circundantes. Este processo diminui a regulação homeostática permitindo à célula pré-neoplásica escapar do controle de crescimento, resultando em expansão clonal. O reforço da hipótese do envolvimento de EROS na inibição do GJIC promovida por promotores de tumor hepático vêm de estudos que examinaram composto antitumorais e/ou agentes quimiopreventivos para câncer que funcionam como antioxidantes. Estes agentes, tais como vitamina E e catequina oriunda do chá verde, anularam a inibição da comunicação intercelular em hepatócitos de camundongos que foram tratados com phenobarbital e DDT. Assim, os antioxidantes podem manter a expressão dos espaços juncionais nas células. (KLAUNIG; KAMENDULIS, 2004; PICCOLI, et al., 2011).

2.2.3. Doenças neurodegenerativas

O sistema nervoso central (SNC) pode ser visto como um integrador que analisa sinais a partir de vias sensoriais, e usa estas informações para gerar sinais de comando ao longo das vias motoras para os músculos e outros efetores. Os mecanismos envolvidos nestes eventos são variados, e a maioria destas vias de sinalização intracelulares, tais como concentração de cálcio intracelular, peroxidação do araquidonato, ativação de proteínas quinases e etc., está associada com o estado redox no tecido nervoso central e periférico (ROMERO, 1996).

Doenças neurodegenerativas compõem um grupo heterogêneo caracterizado por desordens graduais e progressivas, seletiva perda anatômica ou fisiológica relacionada ao sistema neural. Os exemplos típicos incluem: Doença de Alzheimer

(AD), Doença de Parkinson (PD), esclerose amiotrófica lateral (ALS) e Doença de Huntington (HD) (SIMONIAN; COYLE, 1996).

Alterações na função mitocondrial decorrente do estresse oxidativo parecem possuir uma forte relação com a patogênese das doenças neurodegenerativas. Por ser a maior fonte de produção de EROS, como já relatado anteriormente, mutações no mtDNA são conhecidos por causar uma variedade de doenças, a maioria afetando os músculos e cérebro. Uma hipótese que tem sido proposta é que mutações somáticas do mtDNA adquiridas durante o envelhecimento contribuam para o declínio fisiológico e neurodegeneração (LIN; BEAL, 2006). Mutações acumuladas ao longo da vida criam deleções em larga escala e pontos de mutação que alteram a funcionalidade mitocondrial, por exemplo, aumentos nos níveis de pontos de mutação no gene da citocromo oxidase diminuem a funcionalidade desta enzima (LIN; BEAL, 2006).

Evidências consistentes indicam claramente que o estresse oxidativo está aumentado em pacientes com AD. Estudos sugerem que a peroxidação lipídica é um evento inicial da AD com aumento de marcadores isoprostanos (PRATICÒ *et al.*, 2002).

A AD é caracterizada por deposição de placas amilóides, onde o maior constituinte é o amilóide- β -peptídeo ($A\beta$) que é clivado a partir da proteína precursora de amilóide ligado à membrana (APP). Barnham *et al.* (2004) sugerem que a maior causa de perda de células neurais na AD esteja relacionada à excessiva produção de EROS, propondo que a maior fonte de estresse oxidativo e radicais livres seja a interação de metais de transição Zn^{2+} , Cu^{2+} e Fe^{3+} ao $A\beta$. O $A\beta$ coordena os íons metálicos que induzem agregação, no caso do Cu^{2+} e Fe^{3+} a geração de H_2O_2 . O H_2O_2 pode iniciar diversos eventos para formar $\bullet OH$ e desregular o Cálcio (Ca^{2+}). O Ca^{2+} é essencial na transdução de sinal, e pode induzir uma maior produção de EROS e provocar uma resposta de “excitotoxicidade” (BARNHAM *et al.*, 2004).

A excitotoxicidade se refere à ativação excessiva de receptores glutamato que resultam em morte neuronal. O glutamato é o maior neurotransmissor excitatório no cérebro (BARNHAM *et al.*, 2004). Existem três subtipos de receptores ionotrópicos glutamatérgicos e são nomeados por seu agonismo farmacológico em: *N*-metil-D-aspartato (NMDA), e o agonista não NMDA - ácido quisqualato/ α -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazolepropiónico (AMPA) e ácido caínico (KA). A excitotoxicidade é

importante na degeneração neuronal após insultos agudos, tais como a hipóxia, isquemia e trauma. Evidências existem que a excitotoxicidade desempenha um papel nas doenças neurodegenerativas anteriormente citadas. Dados crescentes implicam o estresse oxidativo como um mediador da morte celular por excitotoxicidade. Seguindo da ativação de NMDA e receptores KA, o número de EROS aumenta, ocorre dano oxidativo aos lipídios, e proteção antioxidante contra a morte celular. Estes achados sugerem que os processos ligados a receptores de glutamato podem induzir vias intracelulares que produzem EROS; desacoplam o transporte de elétrons mitocondriais; e deprimem o sistema de defesa celular. As EROS produzidas podem aumentar a liberação e diminuir a reabsorção de glutamato, aumentando-o na fenda sináptica. Isto pode levar a uma auto-perpetuação do ciclo no qual a ativação dos receptores de glutamato aumentam as EROS, que podem levar a uma maior ativação de receptores (SIMONIAN; COYLE, 1996).

Na PD o estresse oxidativo também é proposto no mecanismo da patogênese. A PD é caracterizada pela perda de neurônios da substância negra e deposição de corpos de inclusão intracelular. A principal proteína destes depósitos é a α -sinucleína, que é extensivamente expressa no cérebro, mutações na α -sinucleína contribuem para forma familiar da doença. A dopamina necessária para a sinalização neuronal é redox inerte e ligada às vesículas sinápticas; quando a dopamina é liberada da vesícula para o citoplasma ela é capaz de coordenar o Fe^{2+} e sofrer reações redox que resultam na formação de neuromelanina e EROS. A neuromelanina também irá coordenar o Fe^{2+} a produzir EROS. A α -sinucleína regula o equilíbrio entre a dopamina ligada à vesícula sináptica e a dopamina citoplasmática. Mutações nesta proteína deslocam o equilíbrio em favor da dopamina citoplasmática que na presença do Fe^{2+} e sob condições de estresse oxidativo formam depósito de α -sinucleína por agregação (BARNHAM *et al.*, 2004).

Nos indivíduos com PD foram encontrados níveis suprimidos de GSH na substância negra, provavelmente como consequência da detoxificação de H_2O_2 (SIMONIAN; COYLE, 1996).

Em pacientes portadores de ALS foram encontradas alterações mutagênicas na SOD Cu/Zn citosólica (SOD-1) levando a um aumento de EROS/ERNS. Múltiplas

mutações *missense* na SOD-1 foram identificadas em um subgrupo de ALS familiar (SIMONIAN; COYLE, 1996).

2.3. Antioxidantes no combate aos radicais livres

Pode-se definir de uma forma ampla como antioxidante qualquer substância que estando presente em pequenas concentrações comparados com aquele do substrato oxidável, reduz significativamente ou previne a oxidação do substrato (HALLIWELL, 1995). Quando o mecanismo de ação do antioxidante for através de sua reação com o radical livre, o novo radical formado deve ser estável e incapaz de propagar a reação (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Um antioxidante pode agir diretamente por remoção da EROS ou inibindo sua formação, que são as formas mais comuns, ou indiretamente aumentando a defesa antioxidante endógena.

As características de um bom antioxidante são: presença de substituintes doadores de elétrons ou de hidrogênio ao radical, em função do seu potencial de redução; capacidade de deslocamento do radical formado em sua estrutura; capacidade de quelar metais de transição no processo oxidativo; e acesso ao local de ação, dependendo de sua hidrofília ou lipofília e de seu coeficiente de partição (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; MANACH *et al.*, 2004).

Quando EROS são geradas *in vivo*, muitos antioxidantes podem ter um papel de destaque. A sua importância vai depender de quais, como e onde as EROS são geradas, e qual lugar do dano é avaliado. Por exemplo, o ácido úrico exerce proteção plasmática contra o $\bullet\text{NO}_2$ ou ozônio (O_3). No entanto, o ácido úrico fornece pouca proteção contra dano plasmático causado pelo HOCl. Já o ascorbato é eficiente contra a peroxidação lipídica plasmática causada pelo cigarro, porém não é efetivo contra o dano causado pelo cigarro a proteínas plasmáticas. Resultados diferentes podem ser encontrados para o mesmo estresse oxidativo se o local do dano é diferente. Um composto que exerce uma fraca atividade *in vitro* é improvável ser melhor *in vivo* (HALLIWELL, 1995).

Quanto ao mecanismo de combate aos radicais livres, os antioxidantes podem ser divididos em primários e secundários.

Os antioxidantes primários atuam como doadores de prótons, impedindo o processo de iniciação desencadeado pelos radicais livres. Nesta classe de antioxidantes são encontrados os compostos fenólicos, tocoferol, aminoácidos, carotenoides e os antioxidantes sintéticos (BRAVO, 1998).

Os antioxidantes secundários reduzem o processo de iniciação, pois atuam no bloqueio da decomposição dos peróxidos e hidroperóxidos, convertendo-os na forma inativa, por ação de agentes redutores, bloqueando a reação em cadeia através da captação de intermediários reativos, como os radicais peroxila e alcoxila. Nesta classe estão os antioxidantes sintéticos, os compostos fenólicos, o retinol, ascorbato e α -tocoferol (LIMA, 2008).

Os antioxidantes também podem ser divididos em sintéticos e naturais. Os antioxidantes sintéticos são comumente utilizados na indústria alimentícia para aumentar o tempo de vida útil do produto, retardando, por exemplo, a peroxidação lipídica. São exemplos de antioxidantes sintéticos: butilhidroxitolueno (BHT), butilhidroxianisol (BHA), propilgalato (PG) e terciobutilhidroxinona (TBHQ) (BARREIROS; DAVID, 2006). No entanto, há evidências que esses tipos de antioxidantes favoreçam o surgimento de neoplasias em modelos animais (GUNDUC *et al.*, 2003; SVILAAS, *et al.*, 2004).

Os antioxidantes naturais são encontrados particularmente em frutas e vegetais, e vêm conquistando o interesse tanto da sociedade científica. Estudos epidemiológicos indicam que o consumo frequente de antioxidantes naturais está associado com a redução do risco de doenças cardiovasculares e câncer (TEMPLE, 2000), por estimular as defesas celulares e ajudar a prevenir os componentes celulares contra danos oxidativos (EVANS; HALLIWELL, 2001). O consumo de frutas e vegetais tem um importante papel como fator protetor da saúde, devido, principalmente, à atividade antioxidante das vitaminas e dos compostos fenólicos presentes nas frutas e vegetais, atuando como agentes redutores, doando hidrogênio e extinguindo ROS/RNS entre outras. Estudos para determinar relevantes fontes dietéticas de antioxidantes fenólicos têm sido desenvolvidos.

2.4. Antioxidantes endógenos

Os organismos desenvolveram diferentes mecanismos para combaterem os radicais livres, denominados antioxidantes endógenos, classificados em: enzimáticos e não enzimáticos (VASCONCELOS *et al.*, 2007; HALLIWEL; GUTTERIDGE, 2007; BUONOCORE *et al.*, 2010). Alguns antioxidantes são proteínas e enzimas, enquanto outros são moléculas pequenas (NIKI, 2010).

Os antioxidantes endógenos podem ser classificados de acordo com o mecanismo de ação em: primários, secundários e terciários (NIKI, 2010).

Antioxidantes primários

São constituintes da primeira linha de defesa, por suprimirem a formação de radicais livres, por exemplo, reduzindo o H_2O_2 e LOOH para água e hidróxidos lipídicos, ou através da quelação dos íons metálicos implicados nos processos oxidativos, tais como: ceruloplasmina, melationeína e albumina (Cu^+); transferrina (Fe^{2+}) e ferritina (Fe^{3+}) (NIKI, 2010; VASCONCELOS *et al.*, 2007; LIMA, 2008).

Antioxidantes secundários

São constituintes da segunda linha de defesa, eliminando rapidamente os radicais livres formados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, antes que eles ataquem moléculas biológicas essenciais gerando reações em cadeia, que aumentam o dano oxidativo e levem a formação de novos radicais livres. Assim impedem o ataque sobre os lipídios, os aminoácidos das proteínas, a dupla ligação dos PUFAS e as bases nucleotídicas. Este grupo é composto por enzimas antioxidantes e compostos de baixo peso molecular: SOD, CAT, Gpx e GR (NIKI, 2010; LIMA, 2008; BIANCHI; ANTUNES, 1999; ROMERO, 1996).

Antioxidantes terciários

Constituem a terceira linha de defesa por repararem ou eliminarem as estruturas celulares que sofreram injúria pelos radicais, tais como enzimas de

reparação do DNA. Incluem-se as enzimas de reparo por excisão de bases ou nucleotídeos: DNA glicosilases, endonuclease e ligases (NIKI, 2010; LIMA, 2008; BIANCHI; ANTUNES, 1999, ROMERO, 1996) (Figura 13).

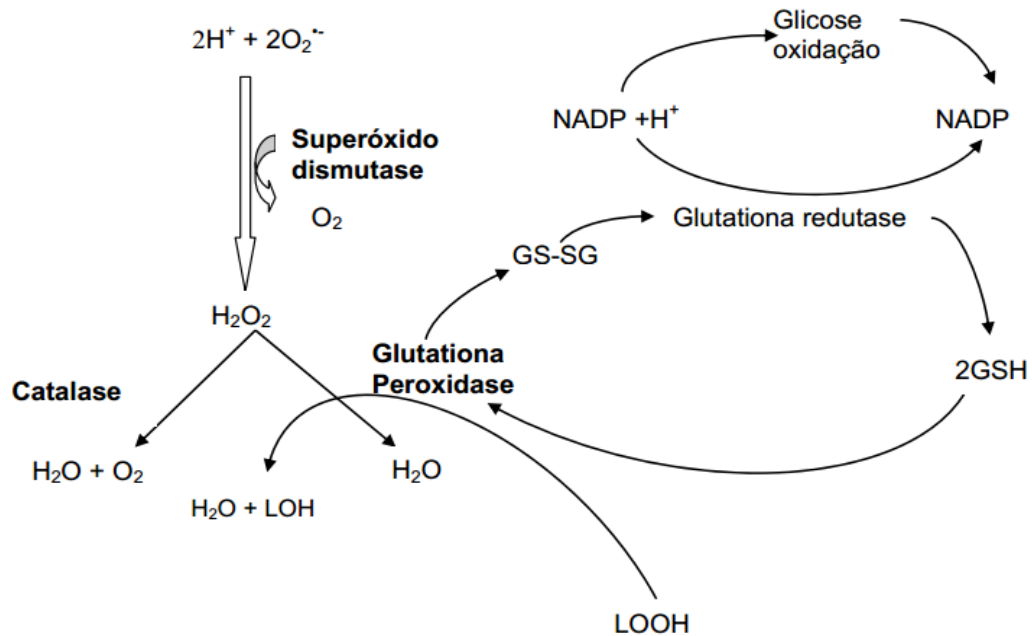


Figura 13. Atividade das enzimas antioxidantes nas células de mamíferos (LIMA, 2008)

Quanto à capacidade antioxidante específica os antioxidantes endógenos podem se classificados em enzimáticos e não enzimáticos (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

2.4.1. Antioxidantes enzimáticos

1. Superóxido desmutase (SOD)

A SOD catalisa a desmutação do ânion $O_2^{\bullet-}$ para a espécie menos reativa H_2O_2 (Figura 14). Em humanos existem três isoformas de SOD: a SOD-1 citosólica (Cu/Zn – SOD), a SOD-2 mitocondrial (Mn-SOD), e a SOD-3 extracelular (EC-SOD). A SOD destrói o $O_2^{\bullet-}$ por sucessivas oxidações e reduções no sítio ativo do íon metálico de transição em um mecanismo de *ping-pong* com elevada velocidade de reação (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

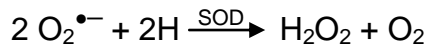


Figura 14. Desmutação do ânion superóxido pela superóxido desmutase (VASCONCELOS, *et al.*, 2008)

A SOD-1 possui duas subunidades idênticas de 32 kDa, embora sua estrutura monomérica possa ser encontrada na *E. coli*. Cada subunidade contém um metal agrupado, sítio ativo, constituído por um átomo de cobre e um átomo de zinco. Acredita-se que a SOD-1 tenha um papel importante na primeira linha de defesa antioxidante (MATÉS *et al.*, 1999). Mutações na SOD-1 podem ter um efeito na patogênese da ALS familiar (ZELKO, *et al.*, 2002).

A SOD-2 é um homotetrâmero (96 kDa) contendo um átomo de manganês por subunidade que cicla o Mn (III) para Mn (II) e retorna a Mn (III) durante os dois passos de desmutação do $\text{O}_2^{\bullet-}$ (MATÉS *et al.*, 1999). A importância da função da SOD-2 em mamíferos está ligada ao seu polimorfismo e a evolução de doenças neurodegenerativas e dano cardíaco. Variações genéticas da SOD-2, por exemplo, a substituição de Ala-9 por Val no sequenciamento mitocondrial causa envelhecimento precoce e progeria, e está associada com doença neuromotora e com cardiopatia idiopática não familiar. Também tem sido associada com aumento de risco em câncer de mama. Outra substituição, a do aminoácido isoleucina 58 por treonina, está relacionada à redução da atividade da SOD-2 (3x) e reduzida atividade na enzima na supressão tumoral (ZELKO, *et al.*, 2002).

A SOD-3 é encontrada no espaço intersticial dos tecidos e também nos fluidos extracelulares contribuindo para a principal atividade plasmática da SOD. A SOD-3 não é induzida por seu substrato ou por outros oxidantes, e sua regulação nos mamíferos é primariamente coordenada por citocinas (MATÉS *et al.*, 1999). Em estudo desenvolvido por Laurila *et al.* (2009), provocando lesão isquêmica dos membros posteriores e peritonite em ratos, demonstraram que houve uma super expressão da SOD-3 que inibiu a migração de citocinas (TNF α , IL1a, IL6, MIP2 e MCP-1), leucócitos e expressão de moléculas de adesão celular vascular e intercelular (VCAM, ICAM, P-selectina e E-selectina).

2. *Catalase* (CAT)

É uma enzima tetramérica consistindo de subunidades idênticas (60 kDa), onde o sítio ativo contém um grupo porfirina por subunidade (MATÉS *et al.*, 1999). A CAT está localizada no peroxissoma, a principal organela responsável pela desintoxicação celular e pela oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, e mitocôndria de células cardíacas, salvo nos eritrócitos, onde é encontrada no plasma. Sua atividade varia de acordo com o órgão ou tecido em que se localiza, sendo mais elevada no fígado e nos rins, e mais baixa nos tecidos conjuntivo e epitelial (LIMA, 2008).

A CAT protege as células reagindo de forma eficiente com o H_2O_2 para formar água e O_2 molecular, e com doadores de H (metanol, etanol, ácido fórmico ou fenóis) agindo com atividade peroxidase. Embora a CAT não seja essencial para alguns tipos de células sob condições normais, ela têm uma importante função na aquisição de tolerância ao estresse oxidativo na resposta adaptativa das células (MATÉS *et al.*, 1999).

3. *Glutathione peroxidase* (GPx)

A família GPx é uma selenoenzima que reduz H_2O_2 e outros peróxidos a água ou álcool às custas de glutathione, ou seja, pode ser responsável pela captação de água, catalisando a peroxidação da GSH, obtendo como produto a glutathione na forma dissulfeto oxidada (GSSG). Apresenta-se sob quatro isoformas: GPx 1, encontrada no citosol de todas as células do corpo; GPx 2 ou gastrointestinal; GPx 3 extracelular e GPx 4 que atua sobre peróxidos de resíduos de ácidos graxos nas membranas e lipoproteínas, reduzindo também o hidroperóxido da timina formado sob ataque dos radicais livres à base de timina do DNA. A GPx é a maior fonte de proteção contra baixos níveis de estresse oxidativo (VASCONCELOS *et al.*, 2007; LIMA, 2008; MATÉS *et al.*, 1999).

4. Glutathione redutase (GR)

A glutathione redutase é uma flavoproteína contendo duas subunidades contendo FAD no seu sítio ativo (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 2007) dependente de NADPH e da integridade da via das pentoses. A GR catalisa a redução da GSSG para a forma tiol da glutathione (GSH), e possivelmente para controlar o estado redox de NADP em tecidos onde GSSG está disponível. A recuperação de GSH por GR é uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular, pois baixas concentrações de GSH estão associadas ao estresse oxidativo (Figura 15). Vale ressaltar que as células utilizam a GSH na redução do H_2O_2 e de outros substratos oxidantes num ciclo catalítico acoplado a NADPH (VASCONCELOS *et al.*, 2007; LIMA, 2008).



Figura 15. Recuperação da GSH por GR (LIMA, 2008)

O ciclo redutivo da GSSG à GSH se inicia pelo ataque da ligação S-S por um dos grupos sulfidril de um dos resíduos de cisteína presentes no sítio ativo da GR (I). Este ataque libera uma molécula de GSH e um dissulfeto misto GSSGR (II). Um novo ataque intramolecular do grupo sulfidril do segundo resíduo de cisteína libera a segunda molécula de GSH, formando o dissulfeto cíclico (III), que retorna ao estado de GR à custa da conversão de NADPH para NADP⁺, podendo ser iniciado um novo ciclo redutivo (HUBER *et al.*, 2008).

2.4.2. Antioxidantes não-enzimáticos

Relaciona-se a um grupo de antioxidantes de baixo peso molecular produzidos *in vivo*, tais como: glutathione, ubiquinona, ácido úrico, bilirrubina e albumina (VASCONCELOS *et al.*, 2007; LIMA, 2008).

1. *Glutathione* (GSH)

A glutathione (L- γ -glutamyl-L-cysteinyl-glycine, GSH, pm. 307) é um tripeptídeo composto de cisteína, ácido glutâmico e glicina, e o grupo ativo é representado pelo resíduo tiol da cisteína (PASTORE et al., 2003; HUBER *et al.*, 2008). É o principal composto tiol não proteico com atividade antioxidante intracelular em maior abundância nas células das plantas e animais, nos mamíferos, principalmente no fígado (10mM). A GSH age como um tampão redox para manter um dado potencial redox tiol/dissulfeto. Exerce ação moduladora no ambiente redox celular, por possuir um papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos na defesa das células contra o estresse oxidativo (SIES, 1999).

A GSH protege contra o dano oxidativo por vários mecanismos: reagindo com radicais livres, restauração de moléculas que sofreram injúria por doação de H⁺, estabilização de estruturas de membranas; e por eliminação de peróxidos formados mantendo os grupos proteicos em sua forma reduzida (tiolizadas) (LIMA, 2008). A glutathione dissulfeto (GSSG) é um dos produtos formados a partir da oxidação da GSH (SIES, 1999).

As propriedades multifuncionais da glutathione estão refletidas no interesse desta molécula como parte integrante de investigações que incluem: mecanismos enzimáticos de regulação antioxidante, biossíntese de macromoléculas, carcinogênese, detoxificação e lesões oxidativas ao DNA (ROVER JÚNIOR et al., 2001). A maioria dos aldeídos reativos é inativada pela conjugação com a GSH, oxidação por aldeído desidrogenases e a redução por aldocetoreduases (FRANCO *et al.*, 2009).

2. *Ubiquinone* (Coenzima Q, CoQ₁₀)

A ubiquinone é um composto natural amplamente distribuído nos organismos vivos composto por benzoquinone e uma cadeia lateral isoprenóide. A ubiquinone na forma CoQ₁₀ é biossintetizada somente em humanos (KAWAMUKAI, 2002). Encontra-se nas membranas mitocondriais é o único lipídio sintetizado endogenamente através da via do mevalonato que apresenta função redox.

Desempenha papel central na cadeia respiratória, na CTE, participa da regulação da permeabilidade, diminui a oxidação de proteínas de membrana, previne a oxidação do DNA e impede a disfunção endotelial, supostamente por aumentar a disponibilidade de $\bullet\text{NO}$. Sua forma antioxidante o ubiquinol (CoQH_2), inibe a iniciação e propagação da peroxidação lipídica. A CoQ_{10} desempenha atividade sinérgica com o α -tocoferol vitamina E por regenerá-lo a partir do radical tocoferila (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

3. Ácido úrico

O ácido úrico (UrH_3) deriva do metabolismo das purinas e é produzido pela oxidação de hipoxantina e xantina pela xantina oxidase (VASCONCELOS *et al.*, 2007) atuando como antioxidante hidrossolúvel (LIMA, 2008). O AMP, por exemplo, é degradado à base livre xantina por desaminação e clivagem hidrolítica da ligação glicosídica. A xantina oxidase, uma flavoproteína contendo quatro centros ferro-enxofre e molibdênio, oxida a hipoxantina a xantina, e então a ácido úrico (NELSON; COX, 2002). O ácido úrico em pH fisiológico perde um próton formando urato. Oxidantes fortes, tais como $\bullet\text{OH}$, podem oxidar o ânion urato (UrH_2) ao radical urato, que é dissociado (pK_a 3,1), ao estável ânion radical urato ($\text{UrH}\bullet^-$). Este pode reagir com o ascorbato para regenerar urato. O urato também reage com radicais $\text{ROO}\bullet$ evitando o dano oxidativo, com o dióxido de nitrogênio ($\text{NO}_2\bullet$) para formar o ânion nitroxila (NO_2^-), e também atua com antioxidante quelando metais de transição como o Fe e Cu (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

4. Bilirrubina

É produzida pelo catabolismo do grupo heme. Atua protegendo as células e LDL contra a peroxidação dos ácidos graxos ligados à albumina e contribui para a capacidade antioxidante de recém-nascidos icterícos. As hipóteses levantadas para a atividade antioxidante da bilirrubina na peroxidação lipídica são: transferência de um átomo H a partir do metileno na posição C-10 para o radical peroxil; transferência do oxigênio singlet; e adicionando radical peroxil para os pirróis (MACLEAN *et al.*, 2007).

5. Albumina

A albumina é uma proteína altamente solúvel no plasma humano, e possui inúmeras funções fisiológicas e farmacológicas: transporte de metais, ácidos graxos, colesterol, pigmentos da bile e drogas; na regulação da pressão osmótica e distribuição de fluidos entre diferentes compartimentos. De uma forma geral a albumina representa o mais importante antioxidante presente no plasma, um compartimento exposto a contínuo estresse oxidativo (ROCHE, *et al.*, 2008).

Uma grande parte das propriedades antioxidantes séricas pode ser atribuída à albumina. A flexibilidade da estrutura da albumina se adapta rapidamente ao ligante, e seus três domínios fornecem uma variedade de sítios de ligação. Entre os ligantes catiônicos, o Cu_2^+ e Fe_2^+ merecem destaque, pois são metais de transição e potentes geradores de ROS. Esses íons metálicos também podem interagir com o H_2O_2 resultando na formação de OH via reação de Fenton (KOUOH *et al.*, 1999; ROCHE, *et al.*, 2008).

Os quatro aminoácidos (Asp, Ala, His e Lys) formam o N-terminal da albumina sérica humana, que formam um sítio de forte ligação para o íon Cu_2^+ . Esses aminoácidos complexados ao Cu_2^+ demonstraram em estudos exercer atividade preventiva na formação de ROS idêntica à SOD. A albumina é hábil para inibir a peroxidação estimulada por Cu_2^+ e hemólise da membrana dos eritrócitos (KOUOH *et al.*, 1999). Além disso, esses tetrapeptídeos demonstraram prevenir a morte neuronal em cultura de células corticais murínicas expostas ao estresse oxidativo gerado por H_2O_2 e por uma mistura de Cu_2^+ e ácido ascórbico (ROCHE, *et al.*, 2008).

2.5. Antioxidantes alimentares

A dieta exerce um importante papel no desenvolvimento de doenças crônicas, tais como câncer, doença cardíaca coronariana, obesidade, diabetes tipo II, hipertensão e doenças neurodegenerativas. Um denominador comum na patogênese da maioria das doenças crônicas é o envolvimento do estresse oxidativo iniciando reações bioquímicas danosas ao organismo.

Existem evidências contundentes, a partir de estudos observacionais controlados, *in vitro* e *ex vivo*, que vários constituintes dietéticos agem como

antioxidantes (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 2007; KALIORA *et al.*, 2006). Estes constituintes podem ser: vitaminas antioxidantes, compostos bioativos originários de plantas, plantas e extratos de algas, concentrados de frutas e vegetais, enzimas, e minerais, polissacarídeos, compostos organosulfurados, etc. Estão presentes principalmente em frutas, vegetais, grãos integrais e bebidas originárias de plantas ricas em antioxidantes (ALMEIDA *et al.*, 2011). Ao mesmo tempo a dieta fornece substratos oxidáveis como PUFA's e metais catalíticos como o Cu_2^+ e Fe_2^+ . Assim, a alimentação pode exercer efeito modulatório antioxidante ou pró-oxidante. No entanto, a complexidade da bioquímica corporal aliada a resultados contraditórios nos estudos quanto a eficácia de vários compostos mantêm algumas questões em aberto, tais como: a real capacidade antioxidante dos alimentos; efeitos sinérgicos entre compostos; recomendação de dosagens; e possíveis efeitos tóxicos desses alimentos/compostos bioativos (LIMA, 2008; HALVORSEN *et al.*, 2002).

A atividade antioxidante de qualquer alimento nos dará uma ideia relativa, visto que cada alimento representa uma soma de antioxidantes com ação específica. Desta forma, a ação orquestrada de um número de antioxidantes dietéticos pode ser esperada, a partir da complexidade estrutural que compõe o organismo (HALVORSEN *et al.*, 2002).

Os carotenoides, especialmente o β -caroteno (VASCONCELOS *et al.*, 2007), vitaminas E e C estão entre os nutrientes com reconhecidas propriedades antioxidantes; entre os não nutrientes estão os compostos fenólicos (LIMA, 2008; HALLIWEL; GUTTERIDGE, 2007; KALIORA *et al.*, 2006).

2.5.1. Carotenoides

Existem pelo menos 700 carotenoides presentes em frutas, vegetais, óleos, ovos e laticínios consumidos por humanos. Ao lado dos carotenoides pró-vitamina A, α e β -caroteno, β -criptoxantina, licopeno e os hidroxi-carotenoides (xantofilas) luteína e zeaxantina são os principais carotenoides presentes na alimentação humana (LINDSAY; ASTLEY, 2002; GARCÍA *et al.*, 2012) (Figura 11). Entretanto, somente cerca de 40 carotenoides podem ser absorvidos, metabolizados, e/ou usados por humanos (GARCÍA *et al.*, 2012).

Os carotenoides são pigmentos intensamente coloridos, responsáveis pela cor vermelha e amarela, lipossolúveis, sintetizados por plantas e microrganismos (VASCONCELOS *et al.*, 2007; GARCÍA *et al.*, 2012).

As propriedades antioxidantes dos carotenoides estão associadas com sua capacidade de capturar EROS, em baixas concentrações e pressão de O_2^+ , com eficiente inativação do oxigênio singlete. Atua por duas vias: física – transferindo energia das moléculas do oxigênio singlete aos carotenoides; e química – representando somente 0,5% da inativação do oxigênio singlete. Também sequestram radicais peroxila por interação química (VASCONCELOS *et al.*, 2007; LIMA, 2008).

Em animais, os pigmentos carotenoides apresentam várias atividades de importância biológica do ponto de vista nutricional e fisiológico. Aproximadamente 10% dos carotenoides possuem a estrutura necessária para agirem como precursores de vitamina A, sendo o β -caroteno e β -criptoxantina os mais representativos (GARCÍA *et al.*, 2012). A figura 16 representa a estrutura dos carotenoides mais encontrados na dieta humana.

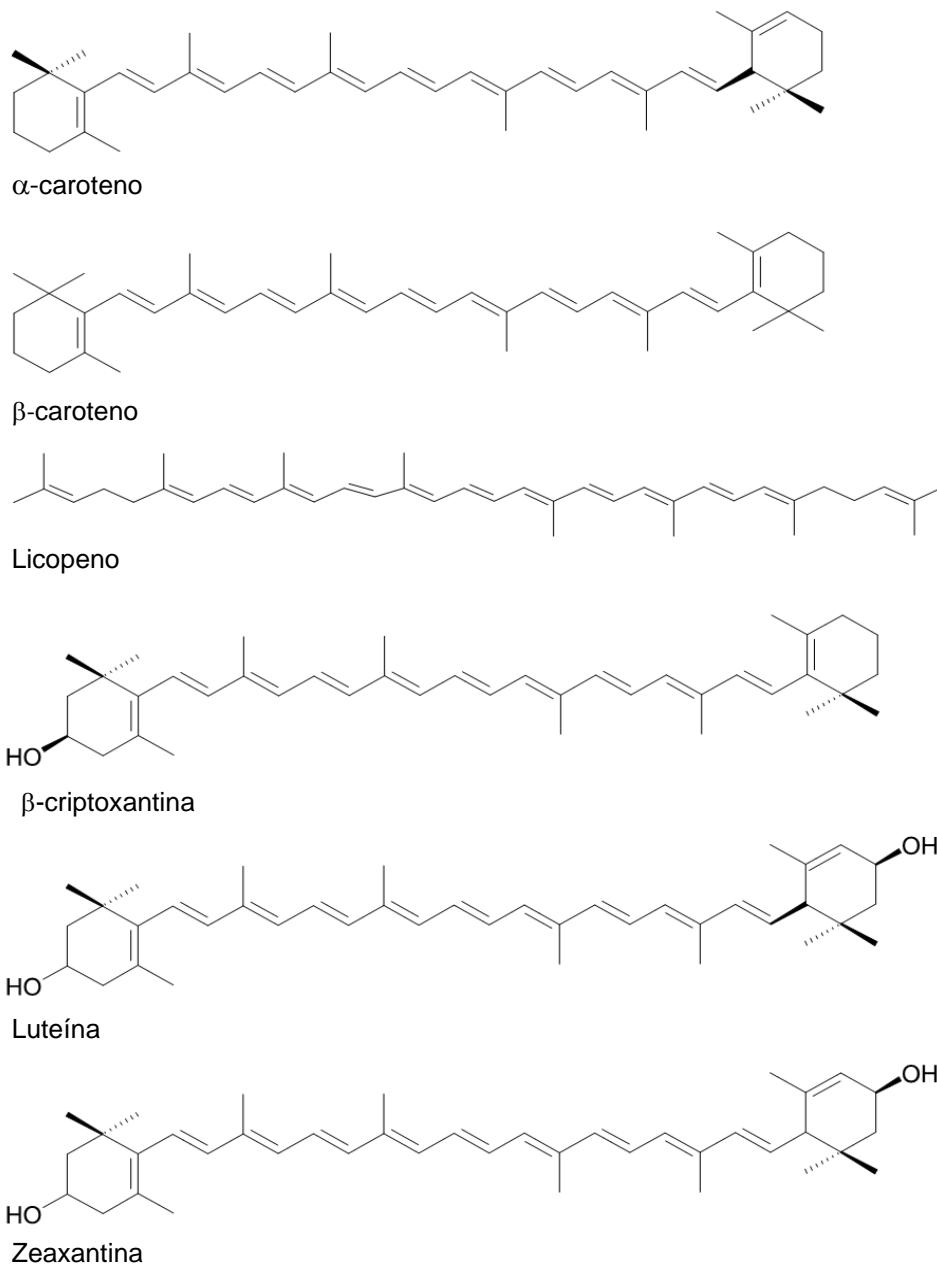


Figura 16. Representação estrutural dos principais carotenoides encontrados na dieta humana (LINDSAY; ASTLEY, 2002)

Os testes clínicos que demonstram a efetividade dos carotenoides para inibirem a oxidabilidade do LDL são controversos. Em um estudo desenvolvido por Carroll *et al.* (2000), uma suplementação com uma mistura de carotenos não demonstrou efeito na modificação do LDL *in vitro* mesmo com aumento com aumento significativo de concentrações plasmáticas de LDL licopeno, α -caroteno e β -caroteno. Hininger *et al.* (2001), demonstraram que a suplementação com β -caroteno, licopeno e luteína não aumentou a resistência do LDL à oxidação ou para

modificar a razão de ácidos graxos poliinsaturados e saturados do LDL. Já em outro estudo o licopeno demonstrou reduzir de forma significativa a oxidação do LDL (AGARWAL; RAO, 1998). Em paciente com diabetes mellitus o aumento da susceptibilidade oxidativa do LDL foi normalizado pela suplementação dietética natural de β -caroteno ou licopeno, sendo o licopeno tão eficaz quanto o α -tocoferol (LEVY et al., 2000).

São importantes fontes dietéticas de carotenoides (luteína, zeaxantina, b-criptoxantina, a e β -caroteno e licopeno): abacate, abacaxi, abóbora, alface, alho-porró, ameixa, azeite de oliva, banana, berinjela, brócolis, cenoura, couve, damasco, endívia, endro, ervilha, espinafre, feijão verde, figo, flocos de milho, goiaba, kiwi, mamão, manga, manjeriço, melancia, nectarina, pepino, pêsego, pimentão e pimentas, repolho, salsa, sálvia, tangerina, tomate e uva vermelha (MAIANI *et al.*, 2009).

2.5.2. Ácido ascórbico

O ácido ascórbico não pode ser sintetizado pelo homem tendo a glicose como precursora como ocorre na maioria das plantas e animais, daí a importância do seu consumo a partir de fontes dietéticas, sendo absorvida de forma rápida e eficiente por um processo dependente de energia (Figura 17). Em sistemas biológicos, 99,95% da vitamina C (AsCH) se encontra na forma de ascorbato (Asc^-), que é a forma que atua como antioxidante ao doar um H^\bullet ou $[\text{H}^+ + \text{e}^-]$ para um radical. O Asc^- é um antioxidante hidrossolúvel que atua na fase aquosa sobre várias espécies reativas ($\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , ClO^- , $\bullet\text{OH}$ e $\bullet\text{OOH}$) formando o radical ascorbilo ($\text{Asc}^{\bullet-}$) de baixa reatividade. O Asc^- pode atuar diretamente nas membranas celulares, por inibir a iniciação da peroxidação lipídica ou indiretamente por regenerar a vitamina E, e o urato (VASCONCELOS *et al.*, 2007; BIANCHI; ANTUNES, 1999).

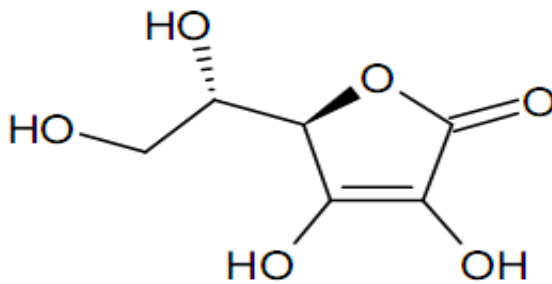


Figura 17. Representação da estrutura molecular do ácido ascórbico

Os benefícios obtidos na utilização terapêutica da vitamina C em ensaios biológicos com animais incluem o efeito protetor contra os danos causados pela exposição à radiação, medicamentos, e por ser inibidora do desenvolvimento tumoral (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

O Asc^- atua como co-fator para pelo menos oito enzimas, das quais a mais conhecida são a prolil e lisil hidroxilases envolvidas na biosíntese do colágeno e asparaginil hidroxilases que contribuem para a detecção de O_2 . Todas contêm ferro no seu sítio ativo. O Asc^- também é necessário para uma enzima contendo Cu_2^+ , a dopamina- β -hidroxilase que converte a dopamina em noradrenalina. Também é um co-fator na biosíntese da carnitina, essencial no metabolismo dos lipídios, e requerido por enzimas envolvidas no metabolismo da tirosina (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 2007).

Como antioxidante o Asc^- é eficiente em inibir fortemente a oxidação da LDL, tanto por eliminar os radicais, quanto por evitar sua interação com a LDL. Esta interação faz com que o Asc^- seja removido. Também exerce função antioxidante por mediar modificações diminuindo a capacidade de ligação do Cu_2^+ a LDL. Isto se deve a capacidade de produtos da decomposição do Asc^- reagirem resíduos específicos de aminoácidos na ApoB, a qual normalmente se liga ao Cu_2^+ (KALIORA *et al.*, 2006).

No entanto o Asc^- sob certas condições (baixa concentração *in vitro*, presença de íons metálicos) pode exercer um efeito pró-oxidante, aumentando o dano oxidativo a lipídios, DNA e proteínas (GRIFFITHS; LUNEC, 2001)

São importantes fontes dietéticas de vitamina C: brócolis, frutas cítricas, goiaba e manga (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 2007). Atenção especial enquanto

fonte dietética deve ser dada à acerola (973 a 4000 mg/100g de polpa) e ao camu-camu (*Myrciaria dubia*) (845 a 3133 mg/100g de polpa) (YUYAMA *et al.*, 2002).

2.5.3. Vitamina E

Vitamina E é um termo genérico para uma série de quatro tocoferóis e quatro tocotrienóis que ocorrem na natureza na forma α -, β -, γ -, δ -. Entre eles, o α -tocoferol, amplamente distribuído nos tecidos e no plasma de animais, demonstra a maior atividade biológica in vivo, a qual não é necessariamente relacionada ao seu poder antioxidante (Figura 18). A vitamina E é um antioxidante lipossolúvel primário no ser humano (BIANCHI; ANTUNES, 1999; LINDSAY; ASTLEY, 2002).

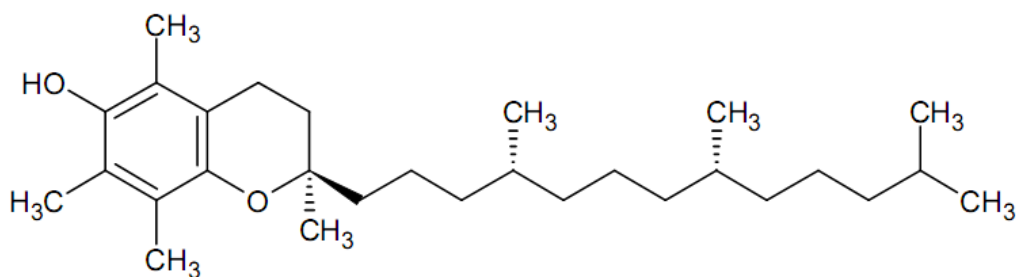


Figura 18. Representação da estrutura molecular do α -tocoferol

A vitamina E tem a capacidade de impedir a propagação da peroxidação lipídica dos PUFA's induzida pelos radicais livres nas membranas biológicas e lipoproteínas, interceptando o radical peroxila (RO_2^\bullet). Os danos oxidativos podem ser inibidos pela ação antioxidante dessa vitamina em sinergismo com a GSH, Asc^- e os carotenoides, constituindo um dos principais mecanismos da defesa endógena do organismo, por regeneração do radical tocoferil, resultante da redução do radical RO_2^\bullet a tocoferol (BIANCHI; ANTUNES, 1999; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Estudos têm sido focados na atuação do α - e γ -tocoferol (o γ -tocoferol é a forma predominante de vitamina E consumida na dieta dos norte-americanos) na redução de doenças cardiovasculares. Estudos também demonstram que o γ -tocoferol é mais eficaz em retardar a formação de trombos arteriais e reduzir a oxidação da LDL, gerar superóxidos e peroxidação lipídica (NADEEM *et al.*, 2012).

Vários estudos em humanos e animais demonstram que o uso tópico da vitamina E reduz na peroxidação lipídica, foto envelhecimento, imunossupressão e foto carcinogênese. No nível molecular, o uso tópico de α -tocoferol diminui os níveis de transcrição de MMP-1 e inibe a formação do dímero timina. Portanto, retardando o processo de quebra do colágeno e mutagênese respectivamente (CHEN *et al.*, 2012).

Atividade neuroprotetora também tem sido atribuída à vitamina E. Em modelos para a Doença de Alzheimer (AD), a vitamina E previne o acúmulo de metabólitos oxidativos por A β peptídeos β amilóide (A β) por sua característica de bloquear a reação em cadeia da peroxidação lipídica (BEHL; MOOSMAN, 2002).

As fontes dietéticas de vitamina E incluem: gérmen de trigo, grãos, óleos vegetais e alimentos que os contém, tais como castanhas e avelãs, e ainda vegetais verde-folhosos (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 2007).

2.5.4. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos possuem um anel aromático ligado a um ou mais grupos hidroxilas, podendo variar de uma simples molécula fenólica até um polímero de alto peso molecular. Apesar da diversidade estrutural, estes compostos são frequentemente denominados “polifenóis” (BALASUNDRAM *et al.*, 2006). Vale ressaltar que os tocoferóis e tocotrienóis são monofenóis (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 2007).

Os compostos fenólicos possuem um importante papel na fisiologia e morfologia das plantas. Exercendo funções no crescimento, reprodução, proteção contra patógenos e predadores, e contribuindo para a cor e características sensoriais de frutas e vegetais (BALASUNDRAM *et al.*, 2006). Estão amplamente distribuídos nas plantas, perfazendo uma parte essencial da dieta humana.

Existem mais de 8.000 estruturas fenólicas, podendo ser divididas em pelo menos 10 diferentes classes baseadas na estrutura química (ROSS; KASUM, 2002). Lima (2008) divide os polifenóis em dois grandes grupos, os flavonóides e não flavonóides (ácidos fenólicos).

Os flavonóides possuem uma estrutura comum de difenilpropano (C₆C₃C₆), consistindo de dois anéis aromáticos ligados através de três carbonos. Estes podem ser divididos em seis subclasses principais, baseadas na variação do anel

heterociclíco C: flavonas, flavonóis, flavononas, catequinas (flavanóis), antocianidinas e isoflavonas (ROSS; KASUM, 2002). Os flavonoides estão entre os mais potentes antioxidantes das plantas por possuírem um ou mais dos seus elementos estruturais envolvidos na atividade antirradical (BRAVO, 1998).

Os não flavonoides ou ácidos fenólicos, são compostos benzóicos e cinâmicos que contêm um anel aromático com pelo menos um grupo –OH e com diferentes grupos funcionais: aldeídos, alcoóis ou ácidos; que podem formar ésteres com os ácidos orgânicos ou unir-se a açúcares (LIMA, 2008).

A função antioxidante dos polifenóis ocorre pela capacidade de eliminar radicais livres e quelar íons metálicos. Sendo assim, capazes de interferir com a oxidação de lipídios e outras moléculas por doar um H⁺ ao radical. O radical fenoxil resultante é relativamente estável impedindo uma nova reação em cadeia, e também pode reagir com outros radicais impedindo a rota de propagação (BRAVO, 1998):

Os polifenóis apresentam uma vasta gama de propriedades fisiológicas, tais como: antialérgica, antiaterogênica, anticarcinogênica, anti-inflamatória, antitrombótica, cardioprotetora e antioxidante (BALASUNDRAM *et al.*, 2006). O efeito cardioprotetor e anticarcinogênico resultante do consumo elevado de vegetais e frutas estão associados aos compostos fenólicos. O consumo moderado de vinho, o qual é rico em polifenóis, está associado a risco diminuído de doença coronariana cardíaca. Os compostos fenólicos podem ser os maiores determinantes do potencial antioxidante dos alimentos.

2.6. γ -orizanol

O γ -orizanol (C₄₀H₅₈O₄, pm 602,89) é um importante componente na fração insaponificável do óleo de farelo de arroz. Foi assim denominado por ter sido descoberto primeiro em óleo de farelo de arroz (*Oryzae sativa L.*) (HUANG, 2003), posteriormente os principais componentes do orizanol foram encontrados na parte interna do pericarpo de alguns grãos, como o milho, trigo e centeio e triticale. O γ -orizanol é definido como uma mistura de ésteres de ácido ferúlico, esteróis e alcoóis triterpênicos (SCARAVIELLO; ARELLANO, 1998) (Figura 15).

O orizanol foi considerado inicialmente uma substância simples, mas posteriormente foi determinado como um composto (HUANG, 2003). Chamado de α -, β - e γ -orizanol, sendo por este último usualmente mencionado. Os principais esteróis componentes do γ -orizanol são o campesterila e sitosterol, e os álcoois triterpênicos componentes são o cicloartenol e o 24-metileno cicloartanol (HUANG, 2003).

O γ -orizanol é composto por 10 substâncias, a citar: ferulato de Δ^7 -stigmastenila, ferulato de estigmasterila, ferulato de cicloartenila, ferulato de 24-metileno cicloartanila, ferulato de Δ^7 -campestenila, ferulato de campesterila, ferulato de Δ^7 -sitostenila, ferulato de sitosterol, ferulato de campestanila e ferulato de sitostanila (HUANG, 2003). A figura 19 representa a estrutura molecular do ferulato de cicloartenila, um dos principais constituintes do γ -orizanol.

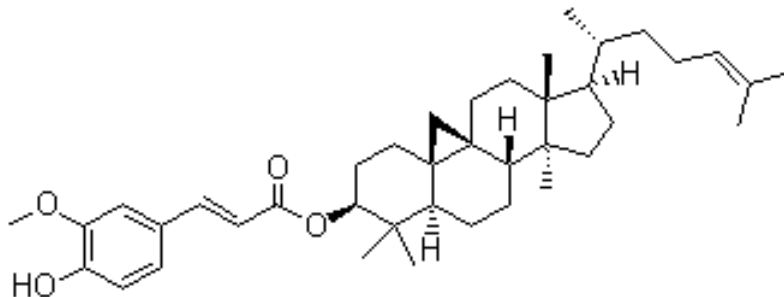


Figura 19. Representação da estrutura molecular do ferulato de cicloartenila

O farelo de arroz é uma das maiores fontes de γ -orizanol, no óleo de farelo de arroz a concentração varia de 1 a 3%, dependendo da variedade do arroz e do método de análise (SEETHARAMAIAH; PRABHAKAR, 1986).

Em relação às propriedades físico-químicas o γ -orizanol se apresenta na forma de um pó branco ou ligeiramente amarelado, cristalino, insípido, com pouco ou nenhum odor. Apresenta um ponto de fusão em torno de 135° a 137° C (SCARAVIELLO; ARELLANO, 1998).

Várias são as indicações de uso do γ -orizanol pelas indústrias que realizam a manufatura da substância isolada. As principais indicações de uso são: ação

antioxidante, redução da hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, e o suposto efeito de ganho ponderal.

O γ -orizanol também é utilizado na indústria de cosméticos devido ao seu potencial antioxidante, bem como na indústria de alimentos, como estabilizador de alimentos. No Japão, por exemplo, tem sido usado para conservar azeites, bebidas, seja de forma isolada ou em combinação com vitamina E (SCARAVIELLO; ARELLANO, 1998).

Na indústria de medicamentos, o γ -orizanol em associação a lisina e a vitamina E, tem sido indicado para uso veterinário em equinos com dificuldade de crescimento muscular e/ou para animais em treinamento (BIOFARMAB, 2012). Há também a utilização em medicamentos para a redução de colesterol sérico associado a outros compostos. Um exemplo disto é um composto com o nome comercial de LipiControl[®] (VITAMIN RESEARCH PRODUCTS, 2003).

Na indústria da suplementação alimentar para desportistas/atletas, o γ -orizanol tem sido indicado para hipertrofia muscular, ou seja, possuindo um suposto efeito anabólico (KREIDER, 2003).

Um dos principais componentes esteroidais do γ -orizanol é o β -sitosterol, que está presente em mais plantas que qualquer outro fitoesterol. Vários estudos clínicos relatam a administração de β -sitosterol com atividade hipocolesterolêmica (POLLAK, 1995).

O efeito hipocolesterolêmico foi relatado em ratos alimentados com uma dieta normal contendo 7% de óleo de farelo de arroz, ou uma dieta hipercolesterolêmica contendo 1% de colesterol e 7% de óleo de farelo de arroz por quatro a sete semanas onde houve um decréscimo significativo nos níveis séricos e hepáticos de colesterol total e LDL-C e um ligeiro aumento nos níveis de HDL-C em ambos, tanto na dieta normal quanto na dieta rica em colesterol (SUNITHA *et al.*, 1997).

Entretanto, outros estudos atribuíram o efeito redutor do colesterol às frações insaponificáveis no óleo de arroz (KIRIBUCHI *et al.*, 1983; IKEDA *et al.*, 1988). Foi relatado que ratos alimentados com dieta enriquecida de colesterol (0,5%) com 0,05-1% de cicloartenila, 24-metileno cicloartanila e/ou β -sitosterol reduziu grandemente o colesterol plasmático e aumentou a excreção fecal de colesterol, sendo suposto que

o γ -orizanol tenha sido o responsável pelo efeito (SEETHARAMAIAH; CHANDRASEKHARA, 1989).

Rong *et al.* (1997), alimentaram hamsters com uma dieta contendo 0,1% de colesterol, com ou sem 1% de γ -orizanol por sete semanas. Os animais alimentados com a dieta contendo γ -orizanol obtiveram uma redução de 28% no colesterol total plasmático e 34% de redução de LDL-C e VLDL-C combinados, bem como um decréscimo de 25% na absorção de colesterol. O γ -orizanol não mostrou efeitos na síntese do colesterol endógeno, conforme medido pelas atividades da β -hidroxi- β -metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, que é uma importante indicação que o decréscimo dos níveis de colesterol no plasma pode ser resultado da baixa absorção de colesterol, e que a síntese de colesterol pela HMG-CoA redutase pode não aumentar para ajustar o nível de colesterol em resposta a diminuição do colesterol (HUANG, 2003).

Os estudos sugerem, que diferente dos tocotrienóis, o γ -orizanol não inibe a síntese de colesterol por supressão da HMG-CoA redutase. Os tocotrienóis limitam essa enzima, que tem papel fundamental na catálise da síntese de mevalonato, que é a etapa limitante na biossíntese do colesterol (QURESH *et al.*, 2002; BERG *et al.*, 2004). Algumas pesquisas recentes sugerem que desde que os fitoesteróis são análogos estruturalmente ao colesterol, eles competem com o colesterol durante algum aspecto do processo de absorção (WHEELER; GARLEB, 1991). Animais foram mantidos por sete semanas em uma dieta hipercolesterolêmica de 5% de óleo de coco e 0,1% de colesterol, e para um determinado grupo foi acrescido 1% de γ -orizanol. Comparado ao grupo controle, os animais alimentados com γ -orizanol experimentaram uma redução de 25% no percentual de absorção de colesterol em alteração na HMG-CoA redutase intestinal e hepática para ambos os grupos, sugerindo não haver diferença na síntese de colesterol endógeno (GILLESPIE, 2003).

Sasaki *et al.* (1990) estudaram os efeitos do γ -orizanol nos lipídios séricos de vinte pacientes esquizofrênicos crônicos com dislipidemia. Cada paciente recebeu 100 mg de γ -orizanol três vezes ao dia por 16 semanas. Os resultados mostraram que os níveis de colesterol total e LDL-C reduziram significativamente sem efeitos

colaterais relatados, sugerindo que o γ -orizanol é seguro e efetivo no tratamento da dislipidemia.

A hipercolesterolemia está freqüentemente associada como fator de risco de muitas doenças cardíacas associada com agregação plaquetária e aterosclerose, o potencial hipocolesterolêmico do γ -orizanol pode ter, também, um papel importante na prevenção dessas doenças. Além disso, a influência do γ -orizanol na agregação plaquetária induzida por ADP e colágeno também foi relatada em ratos alimentados com uma dieta de 1% de colesterol e contendo γ -orizanol. (HUANG, 2003).

A atividade antioxidante do γ -orizanol foi avaliada pelo ensaio de oxidação do colesterol por 2,2 – azobi (2-metilpropionamida) dihidroclorido (AAPH), o qual foi estabelecido para comparar a capacidade inibitória do γ -orizanol e vitamina E na produção de colesterol oxidado. A atividade antioxidante foi determinada em termos de grau da produção de sete produtos resultantes da oxidação de colesterol: 7- α - e - β -hidroperoxicolesterol, 5, 6- α - e - β -epoxicolesterol, 7- α - e - β -hidroxicoolesterol e 7-cetocolesterol. A formação destes produtos resultantes da oxidação do colesterol foi prevenida na presença dos três maiores componentes do γ -orizanol (ferulato de cicloartenila, ferulato de 24-metileno cicloartanila e campesterila) ou na presença de vitamina E. Os resultados sugeriram que o ferulato de 24-metileno cicloartanila possui a maior atividade antioxidante dos três maiores compostos do γ -orizanol, e maior atividade antioxidante que os compostos da vitamina E (HUANG, 2003).

Outra avaliação antioxidante do γ -orizanol foi usando AAPH como formador de radical peroxil. Este ensaio usou oligossacarídeos cíclicos (α -1,4) unidos de α -D-glucopiranoose, que possui regiões hidrofílicas e hidrofóbicas. Para o preparo de antioxidantes lipofílicos foi utilizado isômeros de vitamina E e γ -orizanol, e fluorecina como o alvo do ataque de radicais livres. A atividade antioxidante foi determinada com o grau de diminuição de fluorescência da fluorecina causada por AAPH, que esteve inibida por todo o ensaio. Similarmente os resultados mostraram que o γ -orizanol possui grande atividade antioxidante comparado com outros antioxidantes incluindo, γ -tocoferol, δ -tocoferol e tocotrienóis, enquanto o α -tocoferol acetato não apresentou nenhum efeito. Assim, o γ -orizanol apresentou a maior atividade antioxidante para a formação de radicais peroxil por AAPH, sendo proposto que o

mecanismo antioxidante do γ -orizanol pode ser devido a sua habilidade de receptor hidrogênio dos metoxifenóis intramoleculares, onde a doação de hidrogênio ocorre de forma mais imediata (HUANG, 2003).

Também foi postulado que o grupo fenol é a chave para a atividade antioxidante, e que a barreira éster em torno do grupo fenol diminui a atividade antioxidante. A teoria proposta se aproximou de uma revisão da química antioxidante do ácido ferúlico (GRAF, 1992). Nesta foi explicada que a atividade antioxidante do ácido ferúlico é devido ao grupo -OH que tem a propriedade de doar um hidrogênio para o radical reativo formando um radical fenoxi, exercendo função eliminadora de radicais livres (HUANG, 2003; FIAMONCINI, 2002). Este radical é então estabilizado de modo ressonante porque o elétron desemparelhado pode ser deslocado para o lado contrário da molécula. O segundo grupo -OH, pode aumentar a propriedade *scavenger* do radical, promovendo estabilização de ressonância adicional formando quinona (HUANG, 2003).

A atividade antioxidante dos três maiores componentes do γ -orizanol também foi próxima em um modelo com ácido linoléico. A atividade antioxidante foi determinada com o grau de inibição da formação de hidroperóxido, isso resultou do ácido linoléico incubado com uma corrente de ar a 37° C por 40 a 200 minutos. Os resultados demonstram que o γ -orizanol incubado com ácido linoléico a uma relação molar de 1:100 e 1:250 diminuíram significativamente a formação de hidroperóxidos, a qual foi similar a atividade antioxidante do ácido ferúlico. O α -tocoferol também foi testado e demonstrou significativa atividade antioxidante, porém foi mais efetivo na prevenção da formação de *trans, trans* hidroperóxidos, que pode indicar um mecanismo antioxidante diferente do γ -orizanol ou ácido ferúlico (HUANG, 2003).

O γ -orizanol apresentou efeito de inibição inflamatória em pele de ratos induzidos por 12-*o*-tetradecanoilforbol-13-acetato (YASUKAWA *et al.*, 1998).

Comparando a atividade antioxidante e estrutura química, todos os componentes do γ -orizanol têm o grupo -OH fenólico na porção ferulato, que pode ser um removedor do radical peroxil. Além disso, o ferulato de 24-metileno cicloartenil possui um grupo metileno na posição C-24 ligado a dois grupos alquila, enquanto o ferulato de cicloartenil tem um alqueno no C-24. A presença e a posição

da dupla ligação no lado da cadeia do álcool terpeno podem estar relacionadas à atividade antioxidante (HUANG, 2003).

Huang (2003) desenvolveu um modelo de cultura de células *in vitro* com um meio fisiológico aproximado ao do corpo humano e usou-o para comparar a atividade antioxidante do γ -orizanol, e seus três maiores componentes ao α -tocoferol. A linhagem de célula usada para desenvolver o modelo de cultura foram células de transformação endotelial SV40 dos dutos de nodos linfáticos axilares. A atividade antioxidante do γ -orizanol foi determinada ao grau que este preservou a atividade mitocondrial celular e preveniu a peroxidação lipídica do dano oxidativo do terc-butil hidroperóxido.

Algumas pesquisas questionam uma possível atividade carcinogênica de vários antioxidantes, entre eles o γ -orizanol. O estudo de Hirose *et al.* (1991) investigou a atividade carcinogênica de alguns antioxidantes em ratos, entre eles o γ -orizanol. Neste estudo foi utilizado um modelo carcinogênico de largo espectro com algumas drogas (2,2'-diidroxidi-n-propilnitrosamina, N-etil-N-hidroxietilnitrosamina e 3,2'-dimetil-4-aminobifenil). Uma semana após o uso da última droga foram iniciadas dietas contendo os vários antioxidantes em concentrações específicas. Um determinado grupo de animais recebeu uma dieta a 1% de γ -orizanol por 32 semanas. Após autópsia dos animais, foram formações tumorais em exame histológico e sugeriram na conclusão do estudo que o grupo alimentado com dieta contendo a concentração de 1% de γ -orizanol apresentou aumento de carcinogênese pulmonar. Entretanto, Tsushimoto *et al.* (1991), não detectou atividade genotóxica ou iniciação carcinogênica do γ -orizanol em três testes: teste de reparo de DNA bacteriano (Rec-assay), teste de mutação bacteriana reversa (Ames test) e teste de aberração cromossômica da medula óssea. O γ -orizanol se mostrou negativo para todos os testes.

Assim, em vários estudos o γ -orizanol, tem demonstrado exercer atividade antioxidante, o que pode ser representativo tanto na estabilização oxidativa de alimentos e demais produtos industrializados, inclusive apresentando sinergismo nas defesas orgânicas em situações de estresse oxidativo.

2.7. Etanol e estresse oxidativo

Existem evidências demonstrando que a toxicidade hepática causada pelo etanol está associada com estresse oxidativo causado por radicais livres, tais como: EROS, radicais 1-hidroxietil, $\bullet\text{NO}$; intermediados por vários tipos de células, incluindo células de Kupfer, células endoteliais e infiltração inflamatória por leucócitos (CHEN *et al.*, 1995; ALBANO *et al.*, 1996).

A ingestão crônica de etanol em ratos aumenta os níveis de peroxidação lipídica hepática, demonstrada por um aumento significativo nos dienos conjugados, 4-hidroxinonenal, F2-isoprostanos e na formação de malondialdeído (MDA). O $\bullet\text{NO}$ assume importância no desenvolvimento da injúria hepática, pois catalisa a NO sintase em suas três isoformas: endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e induzível (iNOS). Esta última também envolvida na patogênese da injúria hepática induzida por etanol (TIRAPELLI *et al.*, 2011). Desta forma, estabelecendo a relação entre dano oxidativo e desenvolvimento de dano hepático (Figura 20).

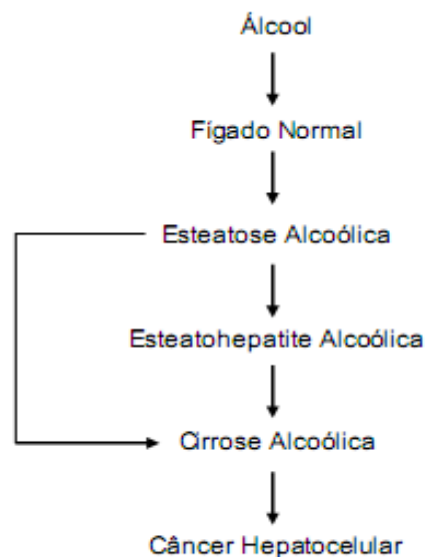


Figura 20. Desenvolvimento de doença hepática por consumo crônico de álcool (SEITZ; STICKEL, 2006)

O consumo abusivo de álcool também pode ser associado à carcinogênese por vários mecanismos ligados a um aumento da produção de EROS/ERNS, tais como: inflamação crônica, aumento na produção de CYP2E1, peroxidação lipídica e

dano ao DNA, redução no sistema de defesa antioxidante e sobrecarga de ferro (SEITZ; STICKEL, 2006).

Estudos demonstram que a ingestão crônica de etanol reduz os níveis de GSH, seguido pelo aumento da concentração biliar de glutathiona dissulfido e aumento da glutathiona transferase, sugerindo que o decréscimo nos níveis de GSH é exercido pelo estresse oxidativo causado pelo etanol (CHEN *et al.*, 1995; AUGUSTYNIAK; SKRZYDLEWSKA, 2009).

A ingestão crônica de etanol também reduz a atividade da SOD (Mn-SOD e Cu/Zn-SOD) no fígado. Esta redução pode estar associada com o aumento na produção de H₂O₂, uma vez que este é um efetivo inibidor da SOD (CHEN *et al.*, 1995; FAREMI *et al.*, 2008).

Também é observado que o uso de etanol em modelos experimentais estimula a produção microsomal de ROS como resultado da indução da citocromo P4502E1 (CYP2E1) e desacoplamento entre CYP2E1 e a NADPH citocromo c redutase. A elevação da atividade da CYP2E1 é sugerida como sendo a mais importante fonte de produção do estado de estresse oxidativo que resulta na hepatotoxicidade (YOU, *et al.*, 2010). Isto é corroborado pela relação direta entre a atividade da CYP2E1 e a peroxidação lipídica (ALBANO *et al.*, 1996). Estudos prévios têm demonstrado que o radical livre hidroxietil é formado durante a oxidação do etanol e que a CYP2E1 está envolvida na formação do radical. O radical hidroxietil se liga covalentemente a proteínas microsomais e estas agora adutas possuem propriedades imunológicas conduzindo a produção de anticorpos específicos reagindo com epítopes derivados de hidroxietil em proteínas. Anticorpos similares têm sido detectados no sangue de pacientes com cirrose alcoólica. Isto indica que o abuso de álcool leva ao desenvolvimento de reações imunológicas (ALBANO *et al.*, 1996). A atividade da monooxigenase dependente de CYP2E1 aumentou de 10 a 20 vezes em animais tratados com etanol (ALBANO *et al.*, 1996)

Inúmeros estudos experimentais utilizam o etanol para gerar estresse oxidativo em modelos murínicos, seja para a para avaliar atividade protetora de substâncias com potencial antioxidante, ou ainda para observar alterações histopatológicas, fisiológicas, imunológicas e mecanismos de ação (TIRAPELLI *et al.*, 2011; YOU *et al.*, 2010; SRIVASTAVA; SHIVANADAPPA, 2010; AUGUSTYNIAK; SKRZYDLEWSKA, 2009; FAREMI *et al.*, 2008).

Vários estudos têm demonstrado que as suplementações com diferentes antioxidantes e removedores de radicais livres reduzem o dano hepático em roedores alimentados com álcool (ALBANO *et al.*, 1996; AUGUSTYNIAK; SKRZYDLEWSKA, 2009; CHOTIMARKORN; USHIO, 2008).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a atividade antioxidante do γ -orizanol *in vitro* e o seu efeito associado ao alfa-tocoferol *in vivo* no estresse oxidativo no tecido hepático e cerebral em ratos.

3.2. Objetivos específicos

- 1- Induzir estresse oxidativo por meio de administração de etanol de forma crônica nos modelos murínicos;
- 2- Comparar a resposta antioxidante do γ -orizanol em vários métodos de análise *in vitro* em relação ao α -tocoferol;
- 3- Avaliar a resposta protetora do γ -orizanol e α -tocoferol em modelos experimentais ao estresse oxidativo por meio de administração crônica de etanol;
- 4- Comparar a atividade antioxidante do γ -orizanol *in vivo* em relação ao α -tocoferol;
- 5- Verificar potencial sinérgico antioxidante em modelos experimentais entre o γ -orizanol e α -tocoferol;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Material

Os materiais utilizados para os ensaios *in vitro* e *in vivo* se encontram no anexo I

4.1.1. Amostras

O γ -orizanol foi adquirido da Ziyen Chemical, China (CAS 11042-64-1). O α -tocoferol (CAS 10191-41-0) foi adquirido da Sigma-Aldrich, Brasil.

4.2. Análises *in vitro*

Vários métodos foram desenvolvidos para mensurar a capacidade antioxidante total de alimentos, bebidas e substâncias isoladas. Estes ensaios diferem na sua química e determinação do ponto de mensuração. Devido aos compostos antioxidantes agirem através de mecanismos diferenciados um único método não é capaz de ser usado para avaliar a capacidade antioxidante total dos compostos (PELLEGRINI *et al.*, 2003).

Os métodos que determinam a atividade antioxidante de alimentos são classificados em dois grandes grupos: o primeiro se baseia na captura de radicais livres; o segundo na determinação da oxidação de uma molécula alvo (LIMA, 2008).

4.2.1. Método do radical DPPH

O ensaio de captura de radicais DPPH[•] (2, 2 difenil-1-picril-hidrazila) (Figura 21) foi inicialmente desenvolvido por Blois (1958), e com posterior adaptação por Brand-Williams *et al.*(1995). Este ensaio tem por base a redução do radical DPPH[•] por extratos ou composto específicos diluídos em etanol ou metanol, que ao fixar um H[•] (removido do antioxidante em estudo), leva a uma diminuição da absorbância, o que permite calcular, após o estabelecimento do equilíbrio da reação, a quantidade de um antioxidante necessária para reduzir em 50% o radical DPPH[•].

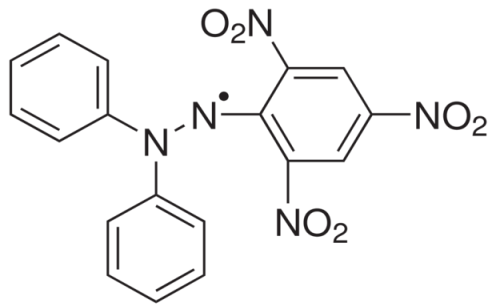


Figura 21. Representação da estrutura molecular do DPPH

Esse método apresenta a vantagem da estabilidade do DPPH[•] e de fácil utilização (LIMA, 2008).

Para a avaliação da atividade antioxidante, o γ -orizanol e α -tocoferol foram diluídos em várias concentrações (0,1 mL) a partir de uma concentração de 10.000 ppm, com posteriores diluições em triplicata. Estas alíquotas foram adicionadas a 3,9 mL da solução metanólica contendo o radical DPPH[•] ($6,5 \times 10^{-5}$ mol/L) Yepez *et al.* (2002). A redução do radical DPPH[•] foi mensurada pelo decréscimo da absorção a 515 nm após 01 hora do início da reação. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UltrospecTM 2100 *pro* (Amersham Biosciences). O percentual de remoção do radical DPPH[•] foi calculado de acordo com a fórmula a seguir:

$$\% \text{ de remoção} = 100 \times [(A_{DPPH^{\bullet}} - A_s)/A_{DPPH^{\bullet}}]$$

Onde A_s é a absorbância da solução contendo a amostra em uma determinada concentração, e $A_{DPPH^{\bullet}}$ é a absorbância da solução do DPPH[•].

A partir das leituras obtidas foi realizado o cálculo do EC50, ou seja, a concentração da amostra necessária para realizar a varredura de 50% do radical contido na solução reagente.

O α -tocoferol foi utilizado como o padrão antioxidante dietético neste ensaio.

4.2.2. Método do Radical ABTS

Um dos métodos espectrofotométricos mais utilizados para medir a atividade antioxidante é através da captura do radical ABTS ($\text{ABTS}^{\bullet+}$). Este ensaio consiste na produção do $\text{ABTS}^{\bullet+}$ a partir do seu precursor, o ácido (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico). O $\text{ABTS}^{\bullet+}$ é um radical cromóforo estável. Pode ser utilizado tanto para amostras hidrossolúveis quanto lipossolúveis (Re *et al.*, 1999).

O ensaio $\text{ABTS}^{\bullet+}$ originalmente foi baseado na ativação da metimioglobina com H_2O_2 na presença de ABTS para gerar o radical cátion, na presença ou ausência de antioxidantes. O método foi criticado baseado no fato que a rápida reação antioxidante pode contribuir para a redução do radical ferril mioglobina. A técnica melhorada para a formação do $\text{ABTS}^{\bullet+}$ envolve a produção direta do radical azul-esverdeado através da reação entre o ABTS (Figura 22) e o persulfato de potássio. Possui uma absorção máxima a um comprimento de onda a 645, 734 e 815 nm, sendo a 415nm o mais comumente usado (Re *et al.*, 1999).

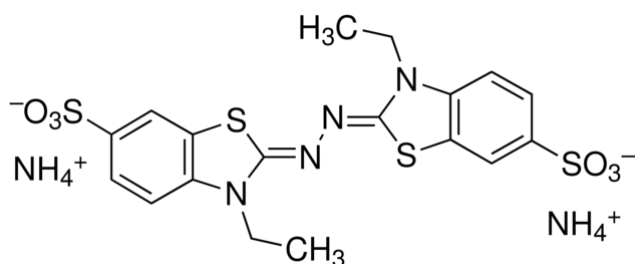


Figura 22. Representação da estrutura molecular do ABTS

A adição de antioxidantes reduz o $\text{ABTS}^{\bullet+}$ em uma quantidade e escala de tempo dependentes da atividade antioxidante, concentração e duração da reação. Assim, quanto maior a atividade antioxidante do composto testado maior será o decréscimo na absorbância.

Inicialmente, formou-se o radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$, a partir da reação de 7 mM de ABTS com 2,45 mM de persulfato de potássio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), sendo posteriormente incubada 16 horas de reação em temperatura ambiente ($\pm 25^\circ \text{C}$) e na ausência de luz por 12 horas. Transcorrido esse tempo, a solução foi diluída em etanol até se obter uma solução com absorbância de 0,70 a 0,734 nm. As amostras de γ -orizanól e α -tocoferol foram diluídos em etanol em várias concentrações a partir de uma

contração de 10.000 ppm, com posteriores diluições em triplicata. Alíquotas (30 μ L) das soluções contendo a amostra em várias diluições foram adicionadas a 3,0 mL da solução etanólica contendo o radical ABTS^{•+}. Após 06 minutos do início da reação foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 734 nm (RE *et al.*, 1999). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro Ultrospec™ 2100 *pro* (Amersham Biosciences). O índice de varredura do radical ABTS^{•+} foi calculado de acordo com a fórmula a seguir:

$$\% \text{ de remoção} = 100 \times [(A_{ABTS^{•+}} - A_s)/A_{ABTS^{•+}}]$$

Onde A_s é a absorbância da solução contendo a amostra em uma determinada concentração, e $A_{ABTS^{•+}}$ é a absorbância da solução do ABTS^{•+}.

A partir das leituras obtidas foi realizado o cálculo do EC50, ou seja, a concentração da amostra necessária para realizar a varredura de 50% do radical contido na solução reagente.

O α -tocoferol foi utilizado como o padrão antioxidante dietético neste ensaio.

4.2.3. Ensaio de redução do complexo fosfomolibdênio

O ensaio de redução do complexo de fosfomolibdênio é sistematicamente usado na pesquisa de fontes naturais de potenciais antioxidantes. A determinação da capacidade antioxidante de uma substância no referido ensaio é baseado na redução do molibdênio VI a molibdênio V e subsequente formação de um complexo verde entre fosfato/molibdênio V em pH ácido à medida que se reduz, o qual é determinado espectrofotometricamente a 695 nm (PRIETO; PINEDA & AGUILAR, 1999).

A partir de diluições das amostras de γ -orizanol e α -tocoferol em solução metanólica, foram adicionadas alíquotas (0,1 mL) de cada diluição realizada em triplicata com 1 mL da solução reagente: 0,6 M de ácido sulfúrico (H₂SO₄), 28 mM de fosfato de sódio (Na₃PO₄) e 4 mM de molibdato de amônio ((NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O). As amostras foram mantidas em banho-maria por 90 minutos à temperatura de 95°C. Após este passo, as amostras foram resfriadas em temperatura ambiente (\pm

25° C) para posterior leitura em espectrofotômetro Ultrospec™ 2100 *pro* (Amersham Biosciences) em um comprimento de onda de 695 nm.

Este ensaio utiliza o ácido ascórbico como padrão comparativo. Desta forma o cálculo da atividade antioxidante utiliza a seguinte fórmula:

$$\% \text{ atividade antioxidante} = 100 \times (As / A_{\text{ácido ascórbico}})$$

4.2.4. Ensaio FRAP

Este método é bastante utilizado para determinar a redução do ferro em fluídos biológicos e soluções aquosas de compostos puros. O método pode ser aplicado não somente para estudos da atividade antioxidante em extratos de alimentos e bebidas, mas, também, para o estudo da eficiência antioxidante de substâncias puras com resultados comparáveis aos obtidos com metodologias mais complexas.

Este método foi desenvolvido inicialmente por Benzie e Strain (1996) e modificado por Pulido et al. (2000) para determinar a redução sofrida pelo complexo férrico (Fe^{3+} - 2,4,6-trispiridiltriazina), a partir da doação de elétron pelo antioxidante, para formar o complexo ferroso (Fe^{2+} - 2,4,6-trispiridiltriazina). Esta reação faz com que a solução adquira uma cor azulada que pode ser monitorada por espectrofotometria a 593 nm. O ensaio é expresso em ácido ascórbico equivalente.

O ensaio FRAP é uma alternativa desenvolvida para determinar a redução do ferro em fluídos biológicos que pode ser aplicado para o estudo da atividade antioxidante em extratos de alimentos e bebidas, como também para o estudo da atividade antioxidante de substâncias puras (Re *et al.*, 1999).

A partir de diluições das amostras em soluções metanólicas em triplicata, alíquotas de 90 μ L foram adicionadas a 270 μ L de água destilada e, posteriormente homogeneizado 2,7 mL do reagente FRAP: 2,5 mL de 2,4,6 – tris (2-piridil)-s-triazina (TPTZ) a 10 mM; 2,5 mL de cloreto férrico hexahidratado ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$); e 25 mL de tampão acetato a 0,3 M com pH 3,6 (BENZIE E STRAIN, 1996). Após 30 minutos em banho-maria as leituras foram realizadas no espectrofotômetro Ultrospec™ 2100 *pro* (Amersham Biosciences) em um comprimento de onda de 595 nm.

A curva padrão foi preparada usando várias concentrações de cloreto férrico heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), sendo a concentração de 1mM/L usada como padrão. O resultado da atividade antioxidante foi expresso como a concentração de antioxidante contendo habilidade de redução férrica equivalente a 1mM/L de cloreto férrico heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

4.3. Análises *in vivo*

4.3.1 Amostragem e amostra

Foram utilizados ratos machos adultos jovens (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*) da linhagem “Wistar” provenientes do biotério da Universidade Estadual do Ceará, a partir da 12^a semana de vida, pesando 200 g (\pm 50 g). Os animais foram mantidos em gaiolas divididos em grupo de 10 animais, mantidos em um ambiente controlado à temperatura de \pm 25°C, em ciclo claro/escuro de 12 h, alimentados com ração comercial e água *ad libitum*. No modelo experimental foram utilizados um total de 80 animais para formação de 08 grupos com n= 10.

O estresse oxidativo foi induzido com etanol em doses iniciais de 2 g/kg/dia com incremento gradual de 0,5 g/kg/dia a cada três (03) dias, finalizando o período experimental de 4 semanas com 6 g/kg/dia (AUGUSTYNIAK, A.; SKRZYDLEWSKA, E., 2009). Os grupos foram assim distribuídos:

Grupo G1 (Controle): grupo que recebeu o tratamento crônico com água;

Grupo G2: grupo que recebeu o tratamento crônico com etanol;

Grupo G3: grupo que recebeu o tratamento crônico com γ -orizanol (200mg/kg/dia);

Grupo G4: grupo que recebeu o tratamento crônico com D- α -tocoferol (200mg/kg/dia);

Grupo G5: grupo que recebeu o tratamento crônico com etanol + γ -orizanol (200 mg/kg/dia);

Grupo G6: grupo que recebeu o tratamento crônico com etanol + D- α -tocoferol (200 mg/kg/dia);

Grupo G7: grupo que recebeu o tratamento crônico com γ -orizanol (200 mg/kg/dia) + D- α - tocoferol (200 mg/kg/dia);

Grupo G8: grupo que recebeu o tratamento crônico com etanol + γ -orizanol (200 mg/kg/dia) + D- α - tocoferol (200 mg/kg/dia)

Os animais receberam durante o experimento uma gavagem orogástrica com a substância de defesa (γ -orizanol e/ou α - tocoferol) e após quatro horas receberam a substância de ataque (etanol). Nos grupos que não possuíam a substância de defesa ou etanol, ambos foram substituídos por água. Isto garantiu que todos os grupos recebessem duas gavagens para ajustar o mesmo nível de estresse físico entre os grupos.

4.3.2. Avaliação do ganho de peso e o coeficiente de eficácia alimentar (CEA)

A ingestão alimentar e o peso dos animais foram controlados durante todo o experimento, com a finalidade de verificar o ganho de peso e o coeficiente de eficácia alimentar (CEA), foi obtido de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{CEA} = \frac{\text{Ganho de peso do animal (g)}}{\text{Consumo de ração (g)}}$$

4.3.3. Coleta do cérebro e fígado

Decorridos 28 dias do experimento, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical para retirada dos tecidos cerebral e hepático para posterior análise da Superóxido Desmutase (SOD) e Glutathiona reduzida (GSH). Os animais foram mantidos em jejum de oito horas antes de serem sacrificados, com acesso *ad libitum* à água.

Para a retirada do tecido hepático, o abdômen foi aberto por uma incisão na linha média. O cérebro foi retirado após remoção da calota craniana.

Após ser retirado, o cérebro foi pesado, lavado em solução de NaCl 0,9% e separado em seus dois hemisférios. O hemisfério esquerdo foi seccionado em pequenos fragmentos e acondicionado em tubos ependorf, seguindo imediatamente para armazenagem em biofreezer (Revco – Elite Series) a temperatura de $\pm 80^{\circ}$ C. Estas amostras posteriormente foram utilizadas nos ensaios de SOD e GSH.

O fígado sofreu o mesmo processo de pesagem e lavagem. Os lobos foram separados e seccionados em pequenos fragmentos e acondicionados e tubos ependorf, seguindo imediatamente para armazenagem no biofreezer (Revco – Elite Series) em temperatura de $\pm 80^{\circ}$ C para posterior análise nos ensaios de SOD e GSH.

4.3.4. Preparo dos homogeneizados dos tecidos cerebral e hepático

As amostras de fígado e cérebro foram cortadas em pequenos pedaços e então homogeneizadas em uma solução tampão fosfato gelada a uma concentração de 50 mM e pH 7,4, resultando em um homogenato a 10% (mg/mL). Do homogenato foram feitas alíquotas usadas para avaliação dos parâmetros antioxidantes.

4.3.5. Atividade da superóxido desmutase

A atividade da SOD no fígado e cérebro foi realizada de acordo com o método de Beuachamp e Fridovich (1971) através da medição da capacidade da enzima para a inibição fotoquímica do nitro blue tetrazolium (NBT).

Foi observado que flavinas reduzidas fotoquimicamente geram O_2^- em consequência de reoxidação no ar e que O_2^- reduzia o NBT, sugeriram um ensaio para a SOD que poderia ser aplicada tanto em soluções livres quanto em géis de poliacrilamida, e que poderia ser realizada independente de outras enzimas ou proteínas. O ensaio desenvolvido utilizou eventos fotoquímicos para gerar O_2^- e usou o NBT para detectar este radical. A iluminação de soluções contendo riboflavina, metionina e NBT resultaram em uma acumulação linear de Blue Formazan, tanto na presença quanto na ausência de oxigênio. A SOD não gerou influência em meio anaeróbio, no entanto, em condições aeróbias a redução do NBT foi inibida pela SOD. Assim, os autores concluíram que a riboflavina fotorreduzida pode interagir diretamente com o NBT, ou alternativamente pode reduzi-lo por uma

via que utiliza o O_2^- como um carreador de elétron intermediário, sendo esta via a predominante na presença de oxigênio (Figura 23). Pelo menos 90% da redução do NBT verificada nas condições do ensaio padrão descritas foi mediada pelo O_2^- . Outro aspecto relevante é que a via redutora de NBT sem o envolvimento de O_2^- não interfere no ensaio proposto, sendo que a soma total desta via de reação não é significativamente diferente da via dependente de O_2^- . Assim, uma unidade de SOD é definida como aquela que causa a inibição máxima de 50% na redução do NBT (BEAUCHAMP E FRIDOVICH, 1971). Desta forma a foto redução aeróbia do NBT com a redução do Blue Formazan, constitui uma reação sensível à SOD, e como tal pode ser explorada e quantificada neste ensaio.

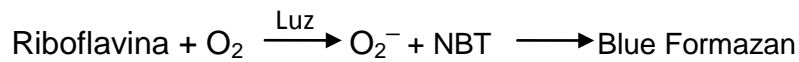


Figura 23. Representação da formação de Blue Formazan a partir da foto redução do nitro blue tetrazolium

Para a realização do ensaio anteriormente descrito, alíquotas do tecido homogeneizado foram centrifugados a 15000 rpm por 20 min (MPW med. instruments, 350R) a 4° C. Em uma sala escura 50 μ L do tampão fosfato ou sobrenadante foram adicionados aos tubos de ensaio contendo 1 mL da solução reagente (tampão fosfato a 50 mM, EDTA a 100 mM e L- metionina 19,5 mM pH 7,8). Então 150 μ L de NBT 750 μ M e 300 μ L de riboflavina 10 mM foram adicionados, respectivamente. Os tubos foram agitados para homogeneização e expostos à luz (20 W) em uma caixa fechada com o interior revestido por superfície refletora por 15 min. A leitura da absorbância foi realizada a 560 nm. Os resultados foram expressos em unidades de SOD. A atividade enzimática foi expressa como U/mg de tecido (RODRIGUES, *et al.*, 2010).

4.3.6. Determinação de grupos sulfidrílicos não proteicos (GSH)

A glutathiona reduzida (GSH) foi determinada de acordo com o método descrito por Sedlak e Lindsay (1968). É um método espectrofotométrico utilizado para determinação concomitante de grupos sulfidrílicos ligados ou não a proteínas em vários tecidos. Este procedimento é baseado no método de Ellman, que demonstra que o 5,5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzóico) é reduzido pelo grupo sulfidrílico (thiol) para formar 01 mol de 2-nitro-5-ácido mercaptobenzóico por mol de SH.

O ânion ácido nitromercaptobenzóico possui uma intensa cor amarela, e pode ser usado para medir grupo sulfidrílicos.

Para a execução do método, alíquotas (2 mL) de homogenato (10% mg/ml) de tecido cerebral e hepático foram adicionados juntos com 1,6 mL de água destilada e 0,4 mL de ácido tricloroacético (TCA) 50% (w/v) em tubos ependorf e centrifugados a 15000 rpm por 15 min (MPW med. instruments, 350R) a 4° C. Os sobrenadantes (2 mL) foram então solubilizados com 4 mL de tampão tris (40 mM, pH 8,9) e foi adicionado 5,5'-dithiobis-(2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) a 10 mM. Posteriormente, a absorbância foi medida a 412 nm após 5 minutos da adição de DTNB contra o "branco" sem homogenato. A concentração de GSH ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido fresco) foi medida a partir de uma curva padrão construída usando diferentes concentrações do padrão GSH (RODRIGUES, *et al.*, 2010).

4.4. Comitê de ética

Este estudo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal Adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) sendo aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA da Universidade Federal do Ceará sob o protocolo de nº 90/10 (Anexo II)

4.5. Estatística

Neste estudo os resultados são expressos como média \pm desvio-padrão. Para comparação das medidas aritméticas, foi empregada a análise de variância (ANOVA) e o teste de comparação múltipla de Newman-keuls, usando o software Graphpad Prisma 5.0. Foi adotado o nível de significância de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

5.1.1. Atividade antioxidante utilizando o radical DPPH[•]

Neste estudo, avaliou-se a capacidade do γ -orizanol e do α -tocoferol em sequestrar os radicais DPPH[•] em diversas concentrações, variando essas concentrações de acordo com a capacidade antioxidante de cada extrato, de forma a obter uma relação entre a concentração do antioxidante e o sequestro do radical.

Através do método de redução do DPPH[•], pode-se traçar os gráficos de percentual de remoção do radical pela concentração da amostra, permitindo-se chegar à equação de correlação entre as duas variáveis (Gráficos – 1, 2, 3 e 4). Utilizando-se o EC₅₀, o α -tocoferol apresentou EC₅₀= 282,51 (\pm 11,26) ppm enquanto o γ -orizanol apresentou EC₅₀= 1944,91 (\pm 18,37) ppm, o que significa que o γ -orizanol apresentou uma capacidade 6,88 vezes menor do que o α -tocoferol em reduzir 50% do DPPH[•].

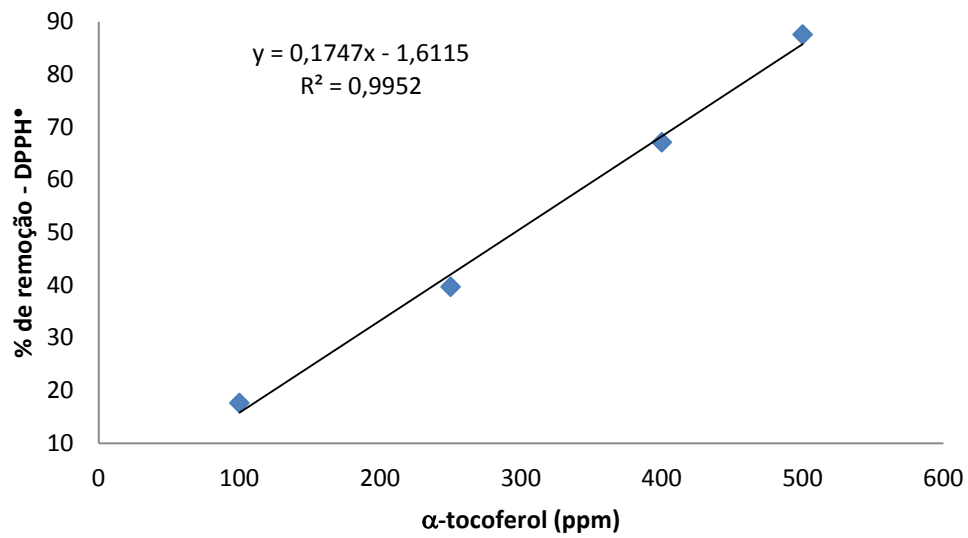


Gráfico 1. Resposta do percentual de remoção do α -tocoferol frente ao DPPH•

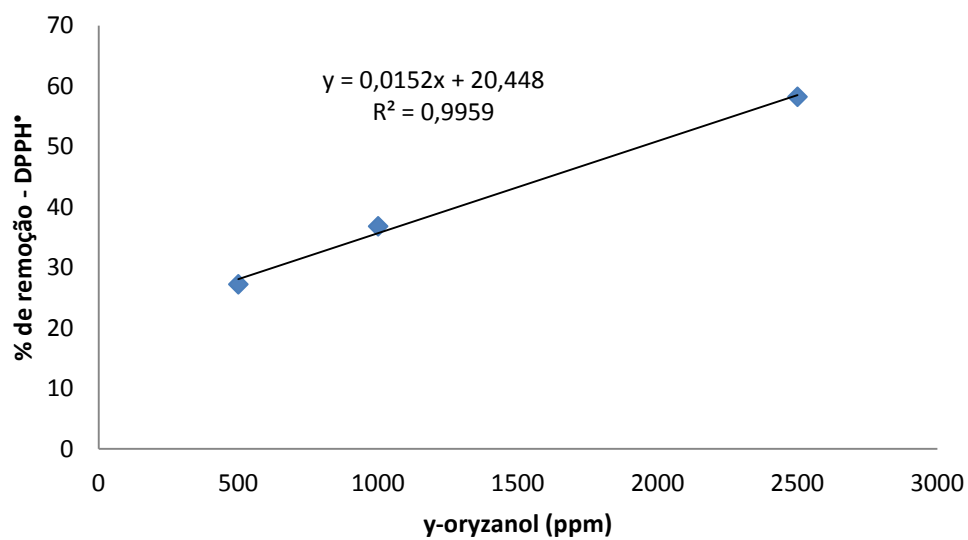


Gráfico 2. Resposta do percentual de remoção do γ -oryzanol frente ao DPPH•

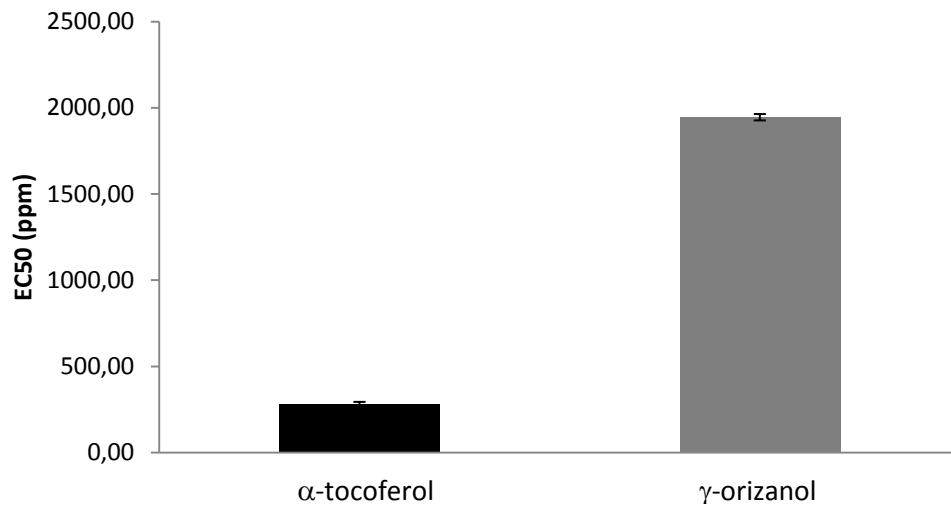


Gráfico 3. EC₅₀ do γ-oryzanol e α-tocoferol frente ao DPPH•

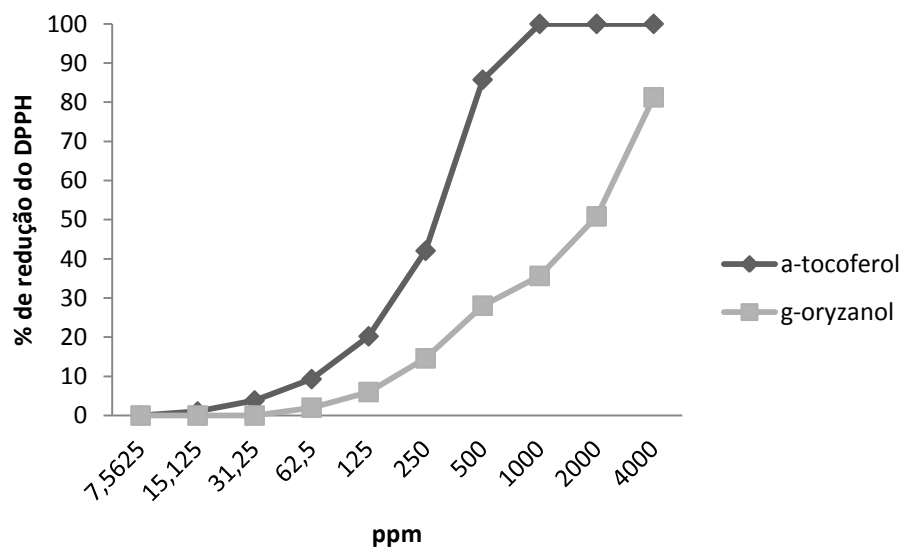


Gráfico 4. Curva dose-resposta do γ-oryzanol e α-tocoferol frente ao DPPH•

5.1.2. Atividade antioxidante utilizando o radical ABTS

A partir das leituras obtidas foi realizado o cálculo do EC₅₀, ou seja, a concentração da amostra necessária para realizar a varredura de 50% do ABTS^{•+} contido na solução reagente.

Os resultados obtidos da atividade antioxidante, determinadas pelo método ABTS, estão expressos pela correlação do percentual de remoção do ABTS^{•+} com a

concentração das amostras (Gráficos – 5, 6, 7 e 8). O ensaio foi realizado utilizando como composto antioxidante de referência o α -tocoferol (ACEVEDO *et al.*, 2007). Dessa forma, comparando os EC_{50} dos compostos estudados, o α -tocoferol apresentou $EC_{50} = 625,17 (\pm 20,96)$ ppm enquanto o γ -orizanol apresentou $EC_{50} = 795,89 (\pm 78,59)$ ppm.

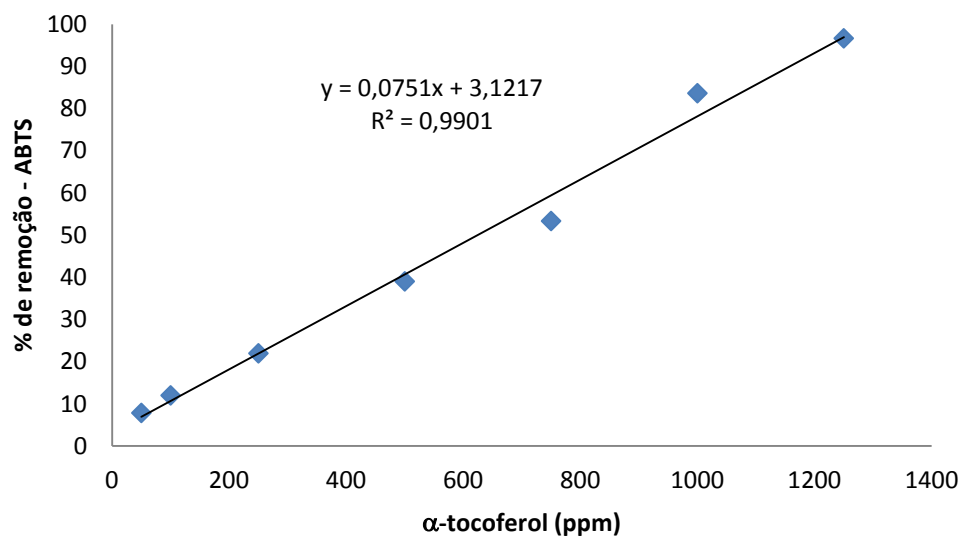


Gráfico 5. Resposta do percentual de remoção do α -tocoferol frente ao $ABTS^{\bullet+}$

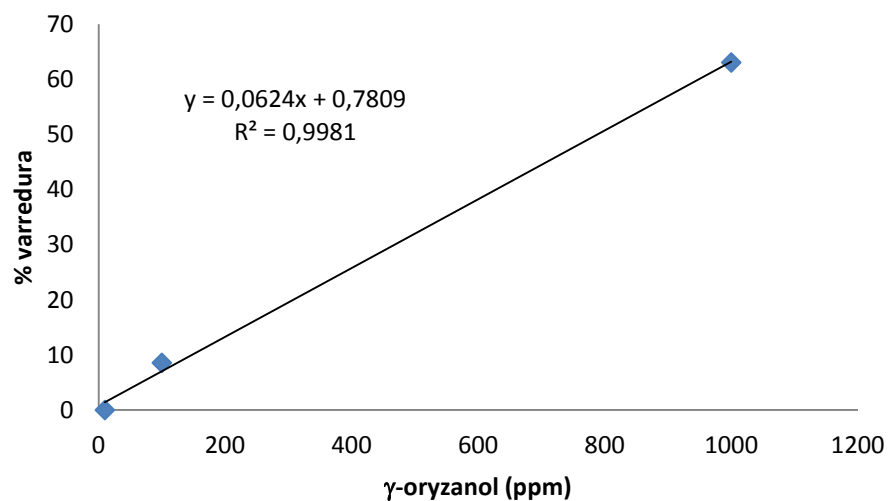


Gráfico 6. Resposta do percentual de remoção do γ -orizanol frente ao $ABTS^{\bullet+}$

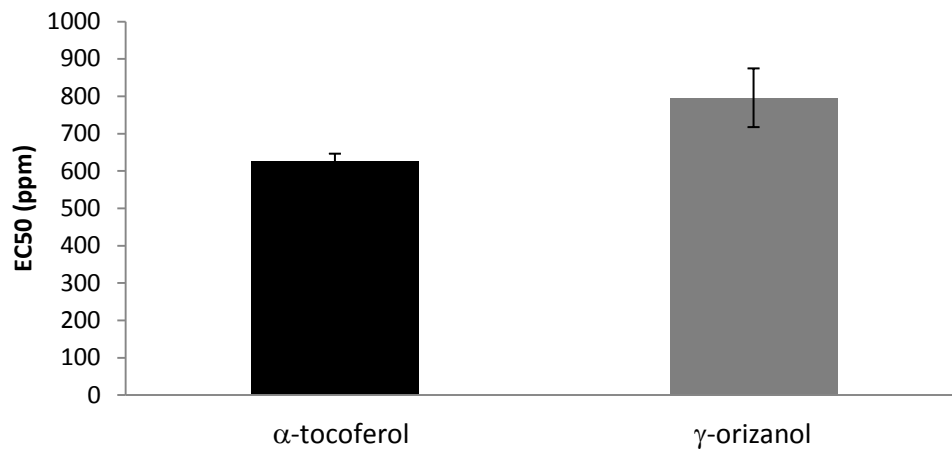


Gráfico 7. EC₅₀ do γ-oryzanol e α-tocoferol frente ao ABTS^{•+}

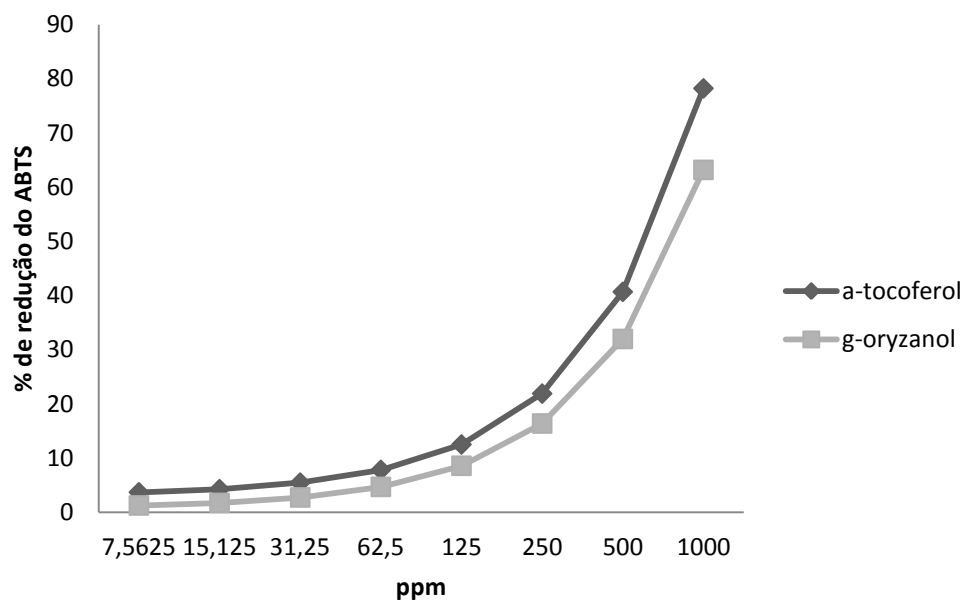


Gráfico 8. Curva dose-resposta do γ-oryzanol e α-tocoferol frente ao ABTS^{•+}

5.1.3. Atividade antioxidante utilizando o ensaio FRAP

Quanto ao ensaio FRAP, para avaliar a atividade antioxidante, foi calculado, por regressão linear, a absorbância do sulfato ferroso (padrão) a 1mM (Gráfico 9). A absorbância encontrada do padrão foi substituída pelo eixo y na fórmula da equação da linha de tendência dos compostos pesquisados (representada pela palavra

absorbância na equação de cada gráfico) (Gráficos 25 e 26). A partir dos dados encontrados, foi possível determinar a atividade antioxidante total dos compostos, expressa na forma de μM sulfato ferroso/g da amostra (Gráficos – 10 e 11). O γ -orizanol apresentou uma concentração de $4281,36 (\pm 30,01)$ μM sulfato ferroso/g da amostra, enquanto o α -tocoferol apresentou uma concentração de $625,17 (\pm 20,96)$ μM sulfato ferroso/g da amostra. Neste ensaio o γ -orizanol apresentou uma capacidade 68 vezes maior de reduzir o Fe^{3+} comparado ao α -tocoferol.

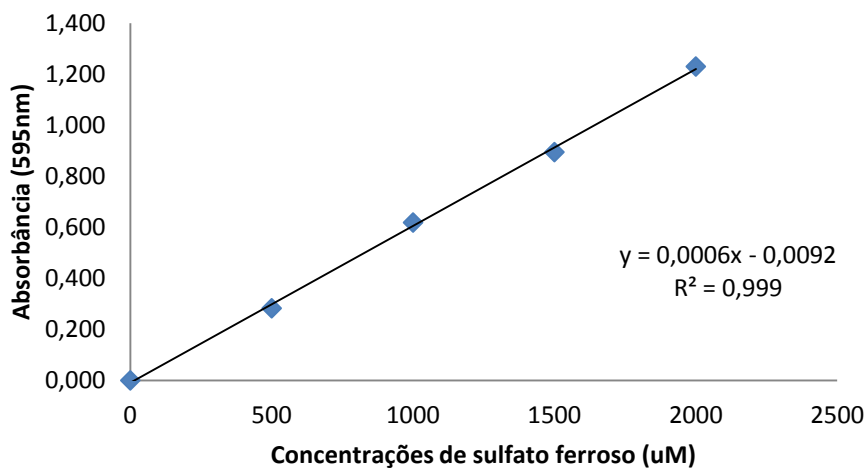


Gráfico 9. Curva padrão de sulfato ferroso

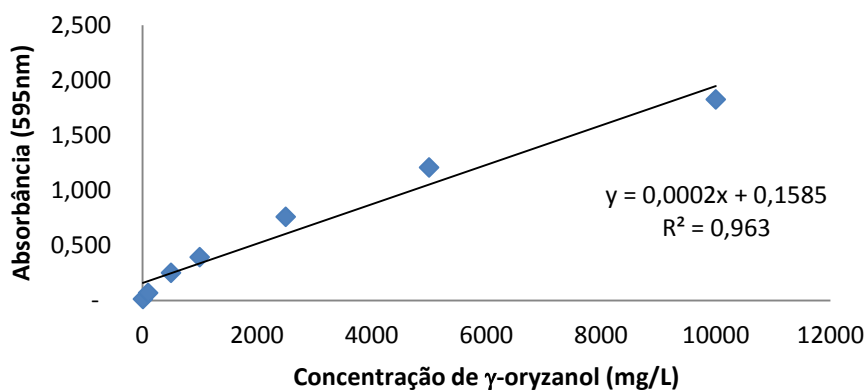


Gráfico 10. Curva dose-resposta da absorbância em relação a concentração de γ -orizanol

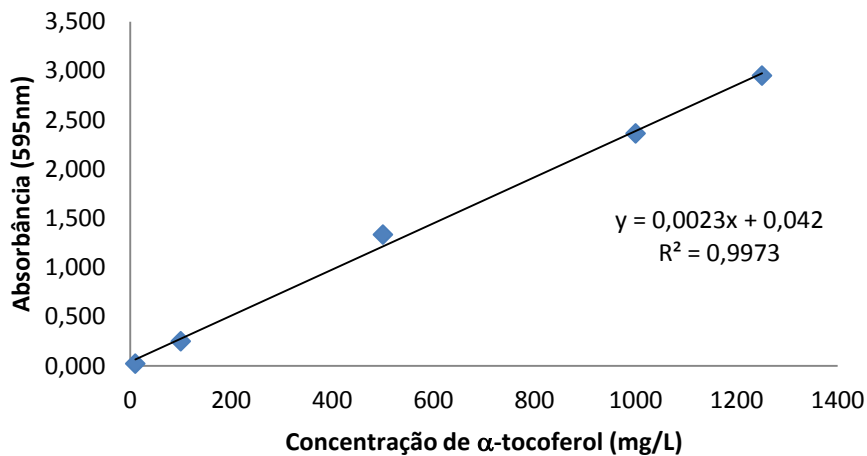


Gráfico 11. Curva dose-resposta da absorbância em relação a concentração de α -tocoferol

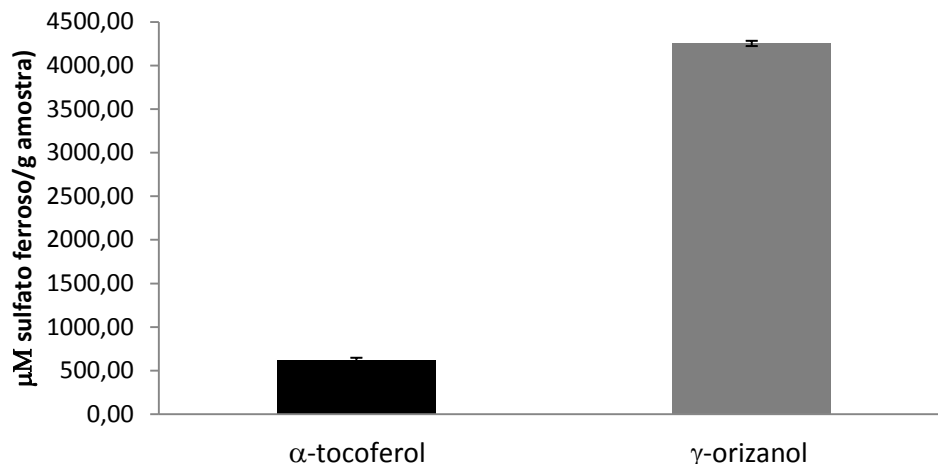


Gráfico 12. Valores da atividade redutora em equivalentes de sulfato ferroso para o α -tocoferol e γ -orizanol

5.1.4. Atividade antioxidante utilizando o ensaio de redução do complexo fosfomolibdênio

A atividade antioxidante do γ -orizanol em relação ao α -tocoferol, segundo a metodologia do complexo fosfomolibdênio, foi calculado em relação ao ácido ascórbico, cuja atividade foi considerada 100%. Neste ensaio, o γ -orizanol não apresentou atividade antioxidante significativa.

5.2. Avaliação da atividade antioxidante *in vivo*

A segunda etapa desta pesquisa avaliou a atividade antioxidante *in vivo*, por um período de 28 dias, utilizando ratos adultos jovens da linhagem Wistar na 12ª semana de vida, fundamentando-se na etapa anterior em que o γ -orizanol apresentou significativa atividade antioxidante quando comparado ao α -tocoferol nos métodos utilizados, com exceção do método de redução do complexo fosfomolibdênio.

Para esta etapa foram formados oito grupos de dez animais (G1 a G8) onde o γ -orizanol foi utilizado para avaliar sua atividade antioxidante frente ao etanol, ou ainda em associação ao α -tocoferol na presença ou não de etanol para avaliar possível sinergismo na atividade antioxidante. Ao grupo controle – G1 foi fornecida água potável (0,5 mL/100g do peso do animal); ao grupo G2 tratamento com etanol em uma concentração inicial de 2g/kg de peso/dia com incremento gradual de 0,5g/kg de peso/dia até a concentração de 6g/kg de peso/dia ao final do experimento; ao grupo G3 tratamento com γ -orizanol (200mg/kg de peso/dia); ao grupo G4 tratamento com α -tocoferol (200mg/kg de peso/dia); ao grupo G5 tratamento crônico de etanol nos mesmos parâmetros adotados no grupo G2 com acréscimo de γ -orizanol (200mg/kg de peso/dia); ao grupo G6 tratamento crônico de etanol nos mesmos parâmetros adotados no grupo G2 com acréscimo de α -tocoferol (200mg/kg de peso/dia); ao grupo G7 foram administrados tanto o γ -orizanol quanto o α -tocoferol (200mg/kg de peso/dia) de forma concomitante; ao grupo G8 foi adotado mesmo procedimento estabelecido no grupo G7, no entanto acrescido do etanol conforme descrito anteriormente.

Os procedimentos com os animais foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA da Universidade Federal do Ceará sob o protocolo de nº 90/10.

Durante a realização do experimento, foram monitorados o ganho de peso e o Coeficiente de Eficácia Alimentar (CEA). Os resultados obtidos estão dispostos na tabela 3. Nos gráficos 13 e 14 estão representados o ganho de peso entre os grupos e o CEA, respectivamente.

Tabela 3. Ganho de peso e coeficiente de eficácia alimentar (CEA) dos grupos controle e experimentais

Parâmetros / Grupos	Ganho de Peso (g)*	CEA*
Controle -	74,11 ± 12,52	0,13 ± 0,02
Controle +	53,57 ± 9,2 ^a	0,11 ± 0,04 ^a
Orizanol	259,7 ± 3,97 ^{a b}	0,45 ± 0,05 ^{a b}
Tocoferol	121,4 ± 16,4 ^{a b}	0,22 ± 0,03 ^b
EtOH + ory	111 ± 9,83 ^{a b}	0,18 ± 0,03 ^b
EtOH + toco	114 ± 20,64 ^{a b}	0,19 ± 0,03 ^b
Toco + ory	121,63 ± 9,89 ^{a b}	0,2 ± 0,02 ^b
EtOH + toco + ory	96,18 ± 12,28 ^{a b}	0,16 ± 0,03 ^b

* Valores expressos como média ± desvio padrão

a = média difere estatisticamente do controle negativo

b = média difere estatisticamente do controle positivo

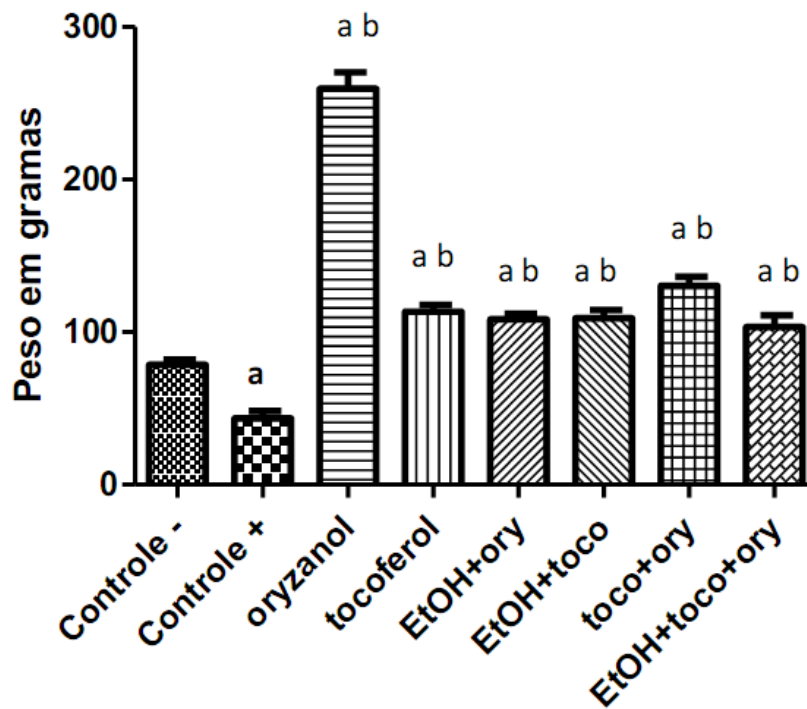


Gráfico 13. Representação do ganho de peso dos grupos controle e experimentais. a= diferente estatisticamente ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo; b= diferente estatisticamente ($p < 0,05$) em relação ao controle positivo.

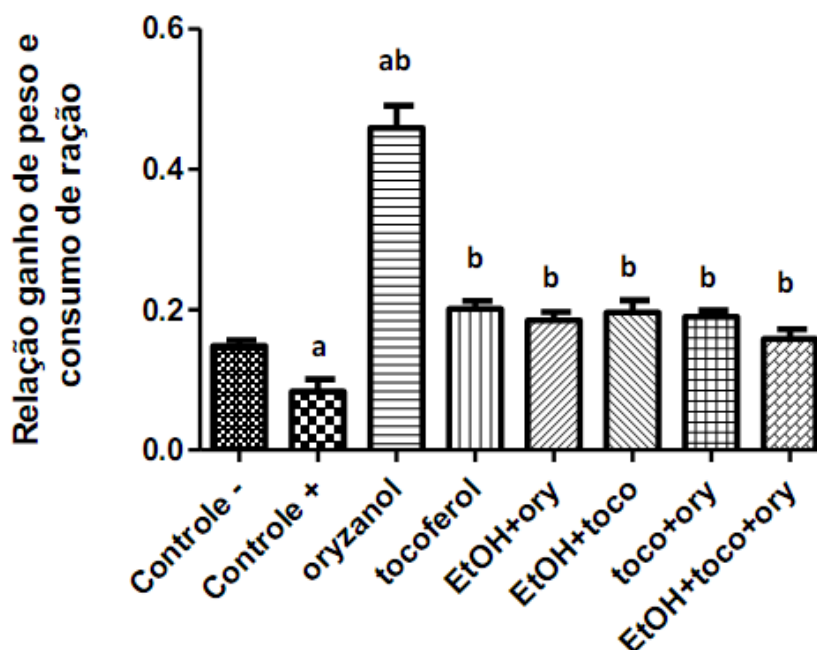


Gráfico 14. Representação do coeficiente de eficácia alimentar (CEA) dos grupos controle e experimentais. a= diferente estatisticamente ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo; b= diferente estatisticamente ($p < 0,05$) em relação ao controle positivo.

Nos gráficos 15 e 16 estão dispostos os pesos relativos dos órgãos (fígado e cérebro) analisados entre os grupos experimentais.

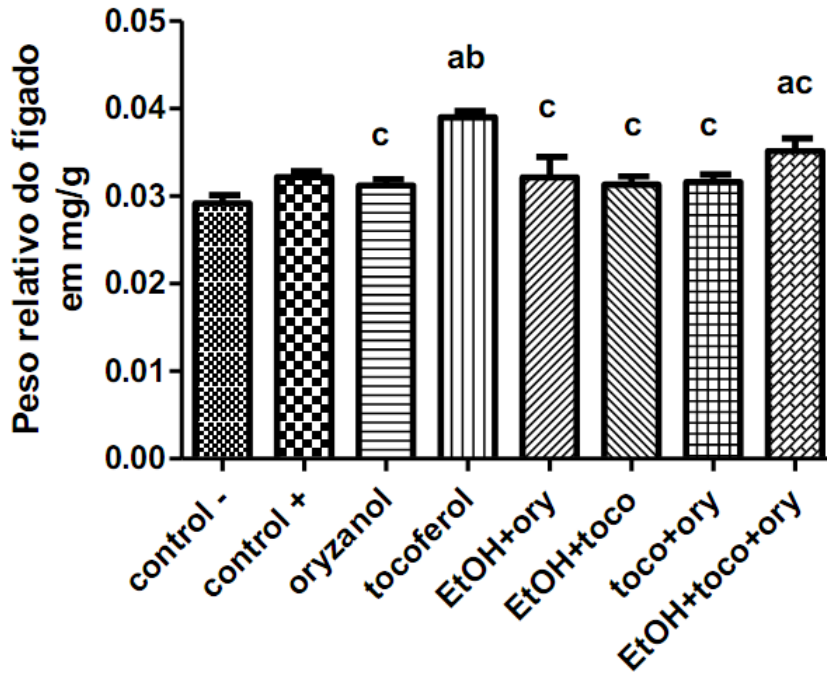


Gráfico 15. Representação do peso relativo do fígado entre os grupos experimentais. a= diferente estatisticamente ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo; b= diferente estatisticamente ($p < 0,05$) em relação ao controle positivo. c= diferente estatisticamente ($p < 0,05$) em relação ao grupo tratado com α -tocoferol.

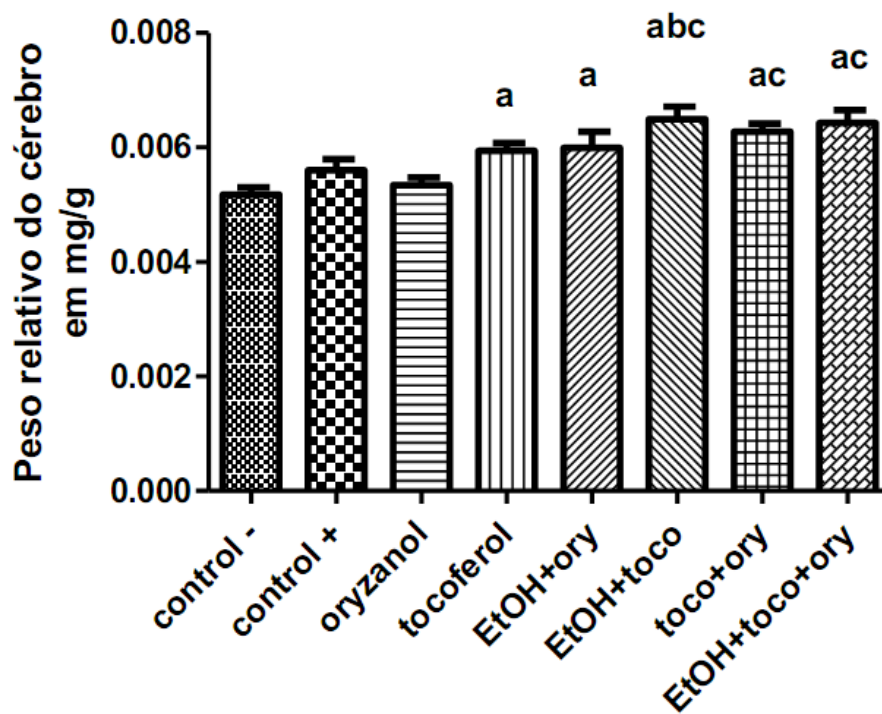


Gráfico 16. Representação do peso relativo do cérebro entre os grupos experimentais. a= diferente estatisticamente ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo; b= diferente estatisticamente ($p < 0,05$) em relação ao controle positivo. c= diferente estatisticamente ($p < 0,05$) em relação ao grupo tratado com γ -oryzanol.

5.2.1. Avaliação da Superóxido Desmutase

Na tabela 4 estão dispostos os valores de SOD no tecido hepático e cerebral dos grupos experimentais expressos em unidade de SOD por miligrama de tecido (U/mg de tecido). O gráfico 17 representa a comparação da atividade da SOD no tecido hepático entre os grupos.

No tecido hepático foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre o G1 (controle negativo) e o G2 (controle positivo), apresentando uma atividade de SOD de $36,18 \pm 0,83$ e $27,0 \pm 2,10$ U/mg de tecido respectivamente.

Tabela 4. Atividade da SOD (U/mg de tecido) dos grupos controle e experimentais

Parâmetro / Grupos	U/mg de tecido hepático*	U/mg de tecido cerebral*
Controle -	36,18 ± 0,83	37,5 ± 0,81
Controle +	27,0 ± 2,1 ^a	6,25 ± 2,41
Orizanol	28,9 ± 1,83 ^a	15,72 ± 1,57
Tocoferol	29,42 ± 2,24 ^{a b}	10,12 ± 1,9
EtOH + ory	21,0 ± 3,38 ^{a b}	13,76 ± 1,74
EtOH + toco	21,52 ± 2,94 ^{a b}	18,05 ± 1,26
Toco + ory	22,7 ± 2,14 ^{a b}	18,53 ± 2,92
EtOH + toco + ory	20,03 ± 3,6 ^{a b}	15,72 ± 0,88

* Valores expressos como média ± desvio padrão

a = média difere estatisticamente (p<0,05) do controle negativo

b = média difere estatisticamente (p<0,05) do controle positivo

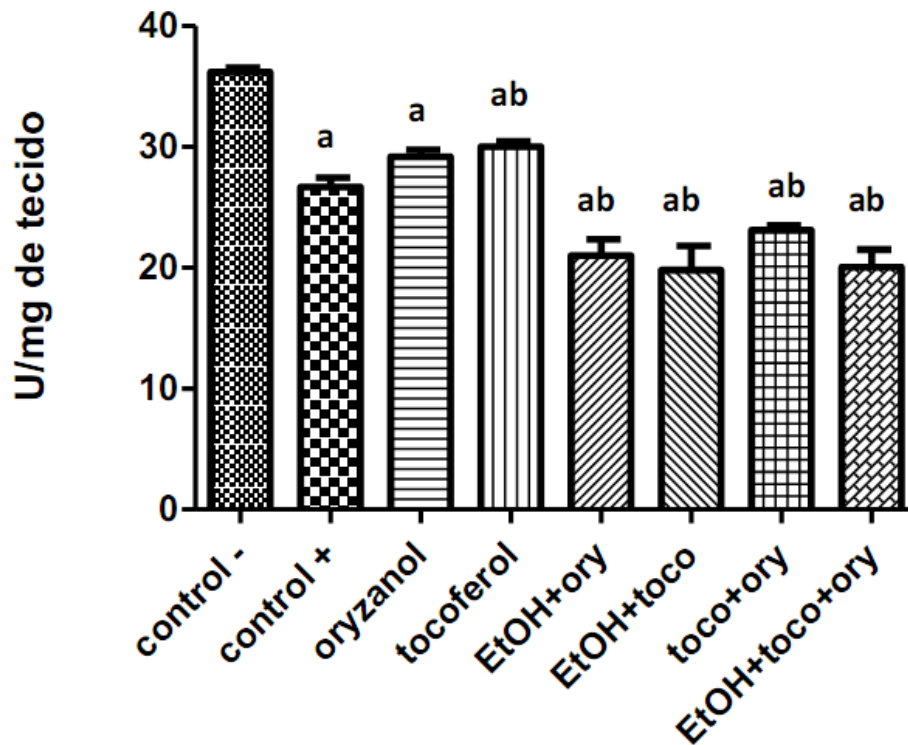


Gráfico 17. Representação da concentração de SOD no tecido hepático dos grupos controle e experimentais. a= diferente estatisticamente ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo; b= diferente estatisticamente ($p < 0,05$) em relação ao controle positivo.

O resultado da concentração SOD no tecido cerebral entre os grupos experimentais está representada no gráfico 18.

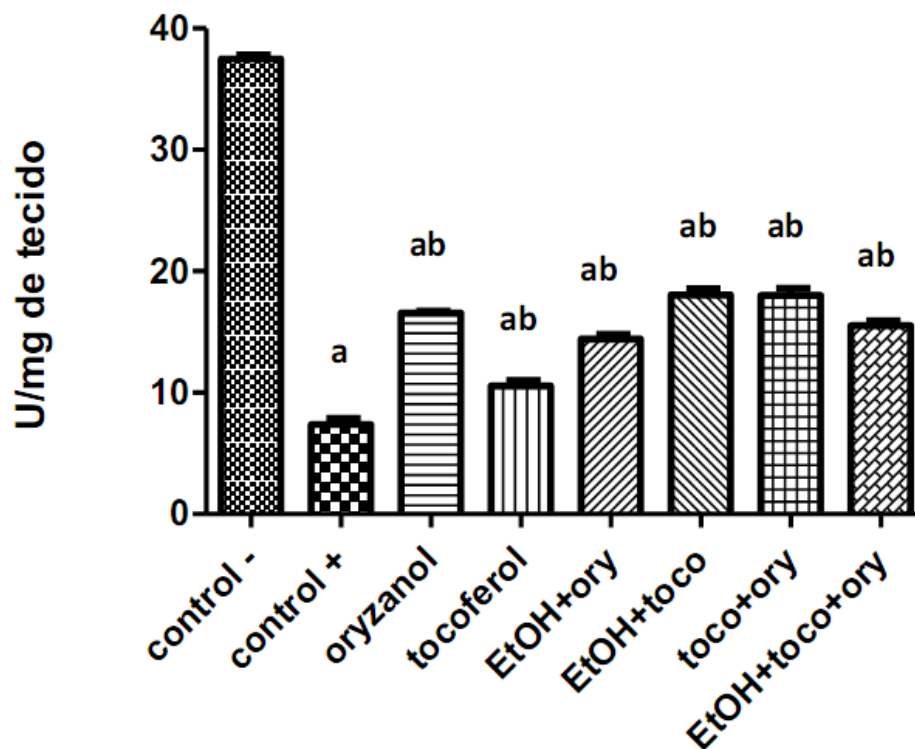


Gráfico 18. Representação da concentração de SOD no tecido cerebral dos grupos controle e experimentais. a= diferente estatisticamente ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo; b= diferente estatisticamente ($p < 0,05$) em relação ao controle positivo.

5.2.2. Avaliação de grupos sulfidrílicos não proteicos (GSH)

A concentração de GSH no tecido hepático não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos controle negativo e positivo, apesar de haver uma tendência a uma concentração maior no grupo controle negativo. O gráfico 19 representa os resultados encontrados quanto a concentração de $\mu\text{g GSH/ mg}$ de tecido hepático entre os grupos experimentais.

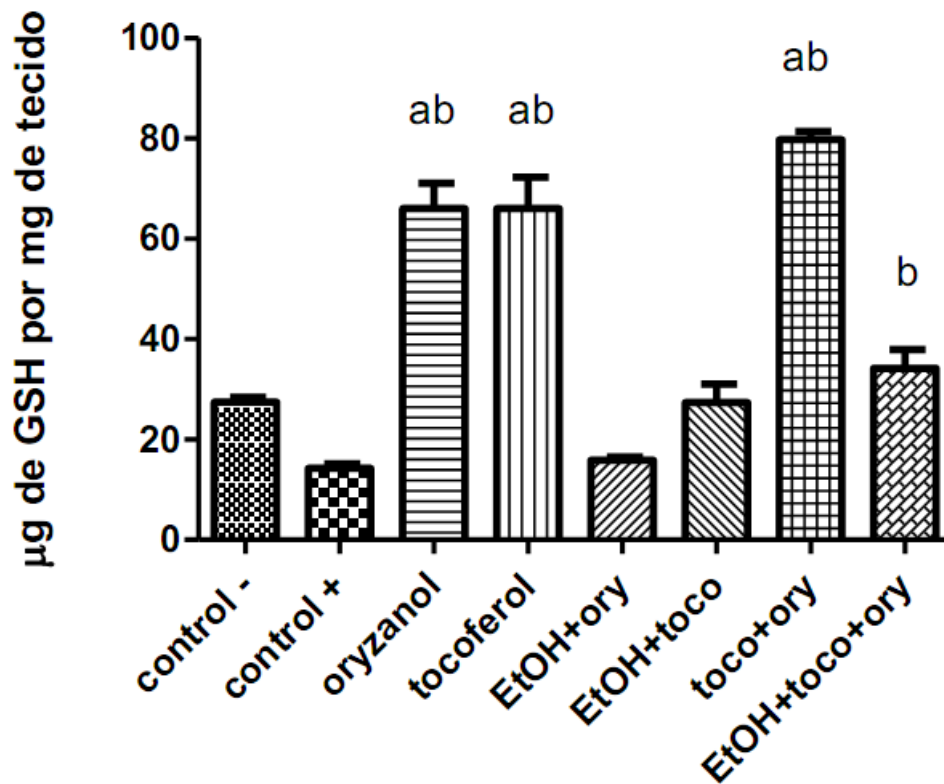


Gráfico 19. Representação da concentração de GSH no tecido hepático dos grupos controle e experimentais. a= diferente estatisticamente ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo; b= diferente estatisticamente ($p < 0,05$) em relação ao controle positivo.

No tecido cerebral houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle, sendo que no grupo que recebeu etanol houve uma redução acentuada na concentração de GSH quando comparado ao controle negativo. Os resultados estão representados no gráfico 20.

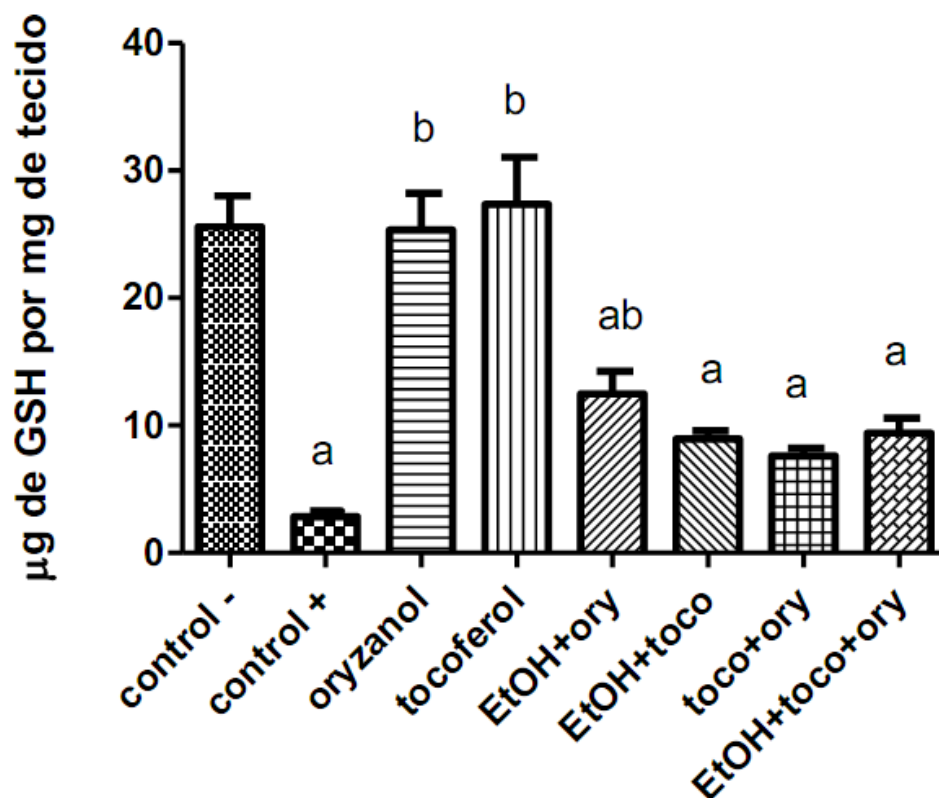


Gráfico 20. Representação da concentração de GSH no tecido cerebral dos grupos controle e experimentais. a= diferente estatisticamente ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo; b= diferente estatisticamente ($p < 0,05$) em relação ao controle positivo.

6. DISCUSSÃO

Algumas evidências na literatura apontam o γ -orizanol como um nutracêutico com várias possibilidades terapêuticas, dentre estas possibilidades está a atividade antioxidante. Este potencial antioxidante do γ -orizanol vem sendo explorado principalmente na indústria de cosméticos.

Neste estudo, foi verificado o potencial antioxidante do γ -orizanol tanto em ensaios *in vitro*, quanto em ensaios *in vivo*. Para efeito de comparação, foi utilizado o α -tocoferol, visto este ser um antioxidante reconhecido presente na dieta humana.

Para o estudo da atividade antioxidante *in vitro* foram utilizados quatro ensaios: DPPH \bullet , ABTS \bullet^+ , FRAP e Redução do Complexo Fosfomolibdênio. Na avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH \bullet , o radical reage com o antioxidante, convertendo-o à sua forma reduzida. Nessa reação, a solução metanólica de DPPH, inicialmente de coloração violeta, torna-se amarela. O descoramento, medido pelo espectrofotômetro, indica a habilidade do antioxidante em sequestrar o radical livre. Uma forma usual de expressar os resultados nesse ensaio é calcular a quantidade do antioxidante capaz de sequestrar metade dos radicais livres DPPH \bullet presentes na solução. Esse índice denomina-se EC₅₀. Quanto menor o valor do EC₅₀ apresentado, menor a quantidade necessária da substância pra reduzir 50% do radical livre DPPH \bullet , e por conseguinte maior a atividade antioxidante. No ensaio de redução do radical DPPH \bullet , onde se utilizou o EC₅₀, o α -tocoferol apresentou EC₅₀= 282,51 (\pm 11,26) ppm enquanto o γ -orizanol apresentou EC₅₀= 1944,91 (\pm 18,37) ppm, o que significa que o γ -orizanol apresentou uma capacidade 6,88 vezes menor do que o α -tocoferol em o DPPH \bullet . Isto pode estar relacionado à capacidade que o α -tocoferol tem de doar hidrogênios de forma rápida para

estabilizar o DPPH• quando comparado ao γ -orizanol (DI MAMBRO *et al.*, 2003). A atividade do γ -orizanol e do α -tocoferol encontrados neste estudo corroboram os dados apresentados por Juliano *et al.*, (2005). Akiyama *et al.* (2001) obteve resultado para o γ -orizanol em remover radicais através do ensaio DPPH• orizanol similar ao ácido ferúlico No estudo de Soares *et al.* (2003), o α -tocoferol não apresentava atividade antioxidante para esse método por não se diluir em água. No entanto, neste estudo foram utilizadas soluções metanólicas para diluir todas as amostras como descrito por Kuskoski *et al.* (2005), além das amostras de α -tocoferol e γ -orizanol serem emulsificadas em Tween 20, permitindo a diluição. Desta forma, de acordo com os achados na literatura, e encontrados nesta pesquisa, confirmam a habilidade do γ -orizanol em remover o radical lipossolúvel DPPH•.

No ensaio de redução do radical ABTS•⁺ o γ -orizanol apresentou uma capacidade 1,27 vezes menor do que o α -tocoferol em reduzir 50% do ABTS•⁺. Os resultados nesta pesquisa diferem dos achados de Saenjum *et al.* (2012) que avaliaram a atividade antioxidante do γ -orizanol no óleo do farelo de arroz de vários cultivares. Os autores encontraram uma moderada atividade antioxidante do γ -orizanol frente ao ABTS•⁺. Segundo os autores este achado pode ser atribuído ao fato que o grupo –OH no anel aromático do γ -orizanol não doa facilmente o átomo de hidrogênio devido ao impedimento estérico da complexa estrutura éster. No entanto, neste ensaio o γ -orizanol apresentou uma atividade antioxidante similar ao α -tocoferol. Xu e Godber (2001) em ensaio antioxidante do γ -orizanol pelo método AAPH (2,2'-diazobis(2-amidinopropano)diidroclorido) encontraram que os componentes do γ -orizanol apresentaram atividade antioxidante maior que os componentes da vitamina E. Os autores relatam que a função antioxidante dos

componentes do γ -orizanol pode depender do grupo hidroxila fenólico na porção ferulato da sua estrutura.

No ensaio FRAP γ -orizanol demonstrou uma capacidade 68 vezes maior de reduzir o Fe^{3+} comparado ao α -tocoferol. Isto demonstra a boa capacidade do γ -orizanol em transferir elétrons, o que corrobora os achados de Aguilar-Garcia *et al.*, (2007) onde o conteúdo de γ -orizanol em diversos cultivares de arroz sensibilizou o ensaio FRAP.

No ensaio de redução do complexo fosfomolibdênio o γ -orizanol não demonstrou atividade antioxidante significativa. Vários estudos como o de Revilla *et al.*, (2009) e Biswas *et al.*, (2011) que encontraram atividade antioxidante neste ensaio não utilizaram o γ -orizanol isolado, e sim extratos de farelo de arroz, que possuem em sua composição tocóis e compostos fenólicos. Desta forma, mais estudos usando esta metodologia tendo como amostra o γ -orizanol isolado são necessários.

A segunda parte desta pesquisa, que utilizou modelos murínicos, se observou que houve diferença estatística no ganho de peso e entre o Coeficiente de Eficácia Alimentar entre os grupos. O grupo tratado com etanol foi o que apresentou o menor ganho de peso. Os resultados demonstram que houve diferença estatística entre estes grupos, sugerindo que o etanol exerceu efeito negativo no estado nutricional comprometendo o crescimento dos animais. Ao contrário o grupo que recebeu tratamento com γ -orizanol apresentou um ganho de peso 3,5 vezes maior em relação ao controle negativo e 4,84 vezes superior ao controle positivo. O ganho de peso em animais tratados com óleo de arroz semi-refinado rico em γ -orizanol já foi relatado na literatura (GONZAGA, 2008). Os resultados desta pesquisa corroboram estes achados. O grupo que recebeu α -tocoferol também apresentou um ganho de peso superior ao controle negativo e positivo, 1,63 e 2,26 vezes, respectivamente. Curiosamente os grupos tratados com α -tocoferol apresentaram um maior peso dos órgãos analisados. Isto sugere que o ganho de peso dos grupos tratados com γ -orizanol pode envolver os tecidos musculares e/ou tecido adiposo. Rosenbloom *et al.*, (1992) e Grunewald e Bailey (1993) relatam o efeito anabólico do γ -orizanol em

atletas de fisiculturismo. A hipótese para tal fato seria a capacidade de aumentar a produção e liberação de testosterona e aumento da liberação de hormônio de crescimento pelo γ -orizanol (CICERO e GADDI, 2001). Por outro lado, estudos indicam a administração subcutânea ou intravenosa em ratos tem demonstrado suprimir a liberação do hormônio luteinizante, redução e síntese do hormônio de crescimento, bem como, aumento da liberação de catecolaminas, dopamina e norepinefria no cérebro. Para Wheeler e Garlep (1991) (CICERO e GADDI, 2001), este cenário pode atuar reduzindo a produção de testosterona.

O grupo tratado com γ -orizanol apresentou o melhor Coeficiente de Eficácia Alimentar (CEA) enquanto o grupo tratado com etanol apresentou o pior CEA. Entre os demais grupos não houve diferença estatísticas no CEA em relação ao controle negativo. Tal achado pode estar relacionado ao efeito anabólico anteriormente descrito para o γ -orizanol.

Os achados neste estudo em relação a atividade da SOD no tecido hepático e administração de etanol em grupos experimentais corrobora os resultados apresentados por outros autores. Chotimarkorn e Ushio (2008) utilizaram camundongos como modelos experimentais, os quais foram divididos em seis grupos (n=15), onde o grupo controle negativo recebeu água destilada e o grupo controle positivo recebeu etanol. Para ambos os grupos essas substâncias foram administradas nas doses de 5 g/kg/dia por via orogástrica durante 30 dias. Para análise da atividade da SOD os autores utilizaram a mesma metodologia proposta neste estudo. Ao final do experimento os achados mostraram redução significativa da atividade da SOD no grupo que recebeu etanol. Resultados similares foram encontrados em vários estudos que utilizaram o etanol como indutor de estresse oxidativo (FAREMI *et al.*, 2008; RODRIGUES, 2008; WANG, *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2009; PARI *et al.*, 2008). Em relação ao tecido hepático, o grupo tratado exclusivamente com γ -orizanol apresentou atividade da SOD similar ao grupo que recebeu somente etanol. O grupo que recebeu as três substâncias experimentais; etanol, γ -orizanol e α -tocoferol foi o que apresentou a menor atividade de SOD seguido pelos grupos que receberam etanol mais γ -orizanol e/ou α -tocoferol. O grupo que recebeu exclusivamente α -tocoferol apresentou atividade de SOD maior

que o controle positivo (etanol), no entanto apresentou uma concentração menor de unidade ativa de SOD que o controle negativo.

A atividade da SOD no tecido cerebral sofreu redução estatisticamente significativa no grupo tratado com etanol em relação ao controle negativo. Este resultado também foi observado por Reddy *et al.*, (1999). O grupo tratado exclusivamente com γ -orizanol apresentou uma concentração de U de SOD/mg de tecido 2,51 vezes superior ao grupo tratado com etanol, porém 2,38 vezes inferior ao controle negativo. Ao contrário do encontrado no tecido hepático, no tecido cerebral o grupo que apresentou a menor quantificação de U de SOD/mg de tecido foi o grupo tratado exclusivamente com tocoferol, sendo 1,55 vezes menor que o grupo tratado com as três substâncias experimentais (G8). É interessante observar que o grupo tratado exclusivamente com γ -orizanol apresentou atividade similar ao grupo que recebeu etanol associado ao γ -orizanol, e γ -orizanol associado ao α -tocoferol, o que sugere que de alguma forma na presença de etanol ou associado ao α -tocoferol, o γ -orizanol exerceu atividade de recuperação nos níveis de SOD. O grupo tratado exclusivamente com α -tocoferol, com exceção do grupo tratado com etanol, apresentou a mais baixa concentração de U/mg de tecido. Em estudo realizado por Weinberg *et al.* (2001) a suplementação de vitamina E (800 UI) associada a óleo de girassol aumentou a taxa de isoprostanos F2 e prostaglandinas 2α , sugerindo que a vitamina E pode funcionar como um pró-oxidante em indivíduos fumantes consumindo uma dieta rica em ácidos graxos poliinsaturados. Eder *et al.*, (2002) encontraram redução na atividade da SOD e glutathiona nos eritrócitos de ratos suplementados com altas doses de acetato de tocoferol e óleo de salmão. Os achados sugerem que altas quantidades de α -tocoferol podem favorecer atividade pró-oxidante.

A concentração de GSH no tecido hepático não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos controle negativo e positivo, apesar de haver uma tendência a uma concentração maior no grupo controle negativo. Uysal *et al.* (1989), em estudo onde grupos tratados de forma crônica com etanol foi detectado um incremento de GSH hepático. Os grupos tratados exclusivamente com γ -orizanol ou α -tocoferol apresentaram uma concentração estatisticamente similar, porém superior aos grupos controle e aos grupos tratados tanto com etanol associado com

γ -orizanol, ou etanol associado ao α -tocoferol, ou ainda com ambos. A atividade reduzida da glutathiona pode ser resultado de sua inativação pelas EROS levando a um dano proteico. Ghatak e Panchal (2012) em estudo com ratos encontraram que a administração de 50 mg/kg de γ -orizanol reduziu os níveis de peróxidos lipídicos e aumentou os níveis de GSH, indicando uma efetiva propriedade antioxidante.

O grupo tratado com etanol não apresentou diferença estatística significativa entre o grupo que recebeu etanol associado ao γ -orizanol, ou etanol associado ao α -tocoferol. No entanto, o grupo que recebeu as três drogas experimentais (etanol + γ -orizanol + α -tocoferol) apresentou uma concentração de GSH maior que os grupos que receberam somente γ -orizanol ou α -tocoferol. O grupo tratado com γ -orizanol mais α -tocoferol apresentou a maior concentração de GSH. Isto evidencia um efeito sinérgico em relação a estas duas substâncias no tecido hepático. Nystron (*apud* ISLAM et al., 2011) relata que os principais componentes do γ -orizanol foram capazes de reduzir os hidroperóxidos lipídicos a nível hepático, os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e recuperar os níveis de glutathiona concomitante ao aumento da atividade da SOD. A porção ferúlica do γ -orizanol, seria ainda capaz de prevenir a redução dos níveis de glutathiona (GSH), SOD, catalase e glutathiona peroxidase sob a ação de raios gama.

No tecido cerebral, os grupos tratados exclusivamente com γ -orizanol ou α -tocoferol não apresentaram diferença estatística na concentração de GSH em relação ao controle negativo, porém foi verificada uma concentração de GSH superior ao grupo tratado com etanol (controle positivo). O grupo tratado com etanol associado a γ -orizanol apresentou uma concentração de GSH maior que o grupo controle positivo. No entanto, isto não foi observado nos demais grupos: etanol associado a α -tocoferol, γ -orizanol associado a α -tocoferol, e o grupo que recebeu as três drogas experimentais. Nestes grupos não houve diferença estatística em relação ao controle positivo. Isto demonstra nestes achados que o α -tocoferol não foi capaz de exercer incremento na concentração de GSH no tecido cerebral, e ainda que a associação entre γ -orizanol e α -tocoferol parece ter exercido um efeito pró-oxidante neste tecido. Vários estudos demonstram que em quantidades elevadas a vitamina E pode levar a um estado pró-oxidante, provavelmente por aumentar as

concentrações do radical tocoferil (MUKAI *et al.*, 1993; BONDY *et al.*, 1996; HUSAIN *et al.*, 1987, EDER *et al.*, 2002; WEINBERG *et al.*, 2001).

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos, nas condições realizadas desta pesquisa, permitem inferir:

- Nas análises *in vitro*, com exceção do ensaio de redução do complexo fosfomolibdênio, o γ -orizanol apresentou uma significativa capacidade antioxidante frente ao α -tocoferol. O ensaio FRAP foi o que resultou em maior atividade antioxidante do γ -orizanol frente ao α -tocoferol, o que denota uma boa capacidade de transferência de elétrons.

- O γ -orizanol exerceu um maior ganho de peso nos modelos experimentais, bem como uma maior eficácia alimentar em relação ao ganho de peso obtido em relação ao consumo alimentar, o que sugere que esta substância agiu positivamente no estado nutricional dos animais.

- Em relação a concentração de SOD no tecido hepático, o γ -orizanol e o α -tocoferol não exerceram efeito de proteção frente ao consumo crônico de etanol. Pelo contrário, exerceram sinérgico pró-oxidante tanto de forma isolada e agravada quando atuaram em sinergismo.

- No tecido cerebral o γ -orizanol e o α -tocoferol exerceram efeito protetor em relação à concentração de SOD somente quando administrados na presença de etanol. O que sugere que o benefício antioxidante só é evidenciado em organismos que sofreram alguma injúria oxidativa. Em organismos que não foram injuriados estas substâncias de forma isolada ou associadas exerceram atividade pró-oxidante, conforme já evidenciado na literatura científica.

- O γ -orizanol e o α -tocoferol no tecido hepático quando administrados de forma isolada sem a presença de etanol favoreceram o aumento na concentração de glutathiona reduzida, demonstrando um efeito protetor em relação aos grupos controle. No entanto, quando administradas de forma associada exerceram efeito deletério na concentração de glutathiona reduzida, sugerindo um efeito pró-oxidante. No entanto, na presença de etanol quando administradas de forma associada foram capazes de exercer efeito protetor ao estresse oxidativo provocado pelo etanol.

- No tecido cerebral o γ -orizanol e o α -tocoferol administrados de forma isolada apresentaram o mesmo comportamento em relação ao tecido hepático. No entanto, somente o γ -orizanol foi capaz de exercer efeito positivo na GSH frente ao etanol.

- As quantidades e/ou tempo de duração dos antioxidantes administradas neste estudo podem ter favorecido atividades distintas nos diferentes órgãos avaliados.

- A complexidade das reações entre combinações de antioxidantes e vários métodos de ensaios da capacidade antioxidante sugerem questionamentos quanto a interpretação de dados provenientes de condições mais complexas, tais como a atividade antioxidante em organismos vivos.

- Os efeitos de diferentes antioxidantes reconhecidos na literatura não parecem ser aditivos em sistemas biológicos, mas sim regulados por interações que necessitam serem melhores exploradas. Assim, se faz necessário que mais pesquisas *in vivo* com metodologias diferenciadas sejam realizadas para aprofundar a discussão quanto à atividade antioxidante do γ -orizanol.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEVEDO, A. M. et al. Composición y capacidad antioxidante de espécies aromáticas y medicinales com alto contenido de timol y carcravol. **Scientia et Technica**, v. 12, n. 33, p. 125-128, 2007.

AGARWAL, S.; RAO, A. V. Tomato lycopene and low density lipoprotein oxidation: a human dietary intervention study. **Lipids**, n. 33, p. 981-984, 1998.

AGUILAR-GARCIA, C.; GAVINO, G.; BORACAÑO-MOSQUEDA, M.; HEVIA, P.; GAVINO, V. C. Correlation of tocopherol, tocotrienol, γ -orizanol e total polyphenol in rice bran with different antioxidant capacity assays. **Food Chemistry**, v. 102, p. 1228-1232, 2007.

AKIYAMA, Y. et al. Screening of chemiluminescence constituents of cereals and DPPH radical scavenging activity of γ -orizanol. **Luminescence**, v. 16, p. 237-241, 2001.

ALBANO, E.; CLOT, P.; MORIMOTO, M.; TOMASI, A., INGELMAN-SUNDBERG, M.; FRENCH, S. W. Role of Cytochrome P4502E1- dependent formation of hydroxyethyl free radical in the development of liver damage in rats intragastrically fed with ethanol. **Hepatology**, v. 23 n. 1, p. 217-23, 1996.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Ciclo celular e morte celular. In: **Biologia molecular da célula**. Porto Alegre-RS: Artmed, 2004, p. 983-1026.

ALMEIDA, I. M. C.; BARREIRA, J. C. M.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; FERREIRA, I. C. F. R. Dietary antioxidant supplements: benefits of their combined use. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 3232-3237, 2011.

AUGUSTYNIAK, A.; SKRZYDLEWSKA, E. L. L-carnitine in the lipid and protein protection against ethanol-induced oxidative stress. **Alcohol**, v. 43, p. 217-223, 2009.

AVASARALA, A. et al. A temporal study on the histopathological, biochemical and molecular responses of CCl₄-induced hepatotoxicity in CYP2e1-null mice. **Toxicology**, v. 228, p. 310-322, 2006.

BALASUNDRAN, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, p. 191-203, 2006.

BALLINGER, S. W. et al. Mitochondrial integrity and function in atherogenesis. **Circulation**, v. 106, p. 544-549, 2002.

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

BARNHAM, K. J.; MASTERS, C. L.; BUSH, A. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. **Nature Reviews: Drug Discovery**, v. 3, p. 205-214, 2004.

BARZILAI, A.; YAMAMOTO K. I. DNA damage responses to oxidative stress. **DNA Repair**, v. 3, p. 1109-1115, 2004.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 276-287, 1971.

BEHL, C.; MOOSMANN, B. Antioxidant neuroprotection in Alzheimer's Disease as preventive and therapeutic approach. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33, n. 2, p. 182-191, 2002.

BERG, J. M.; TYMOCZKCO, J.; STRYER, L. **Bioquímica**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant Power”: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, n. 239, p. 70-76, 1996.

BEUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, n. 239, v. 1, p. 276-287, 1971.

BIANCHI, M. L.; ANTUNES, L. M. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.**, n. 12, v. 2, p. 123-130, 1999.

BIOFARMAB. Disponível em <http://www.eclipsebiofarmab.se>, acessado em 10/06/2012, às 21:15h.

BISWAS, S.; SIRCAR, D.; MITRA, A.; DE, B. Phenolic constituents and antioxidant properties of some varieties of Indian rice. **Nutrition & Food Science**, v. 41, n. 2, p. 123-135, 2011.

BLANC, J. et al. Protective role of uncoupling protein 2 in atherosclerosis. **Circulation**, v. 107, p. 388-390, 2003.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**. v. 37 n. 8, p. 911-17, 1959.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**. v. 181, p. 1199-1200, 1958.

BONDY, S. C.; GUO, S. X.; ADAMS, J. D. Prevention of ethanol-induced changes in reactive oxygen parameters by α -tocopherol. **Alcohol & Alcoholism**, v. 31, n. 4, p. 403-410, 1996.

BRADFORD, M. M. A. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activities. **Lebensm. -Wiss. u.-Technol.**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BUONOCORE, G.; PERRONE, S.; TATARANNO, M. L. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. **Seminars in fetal & Neonatal Medicine**, v. 15, p. 186-190, 2010.

BUTTKE, T. M.; SANDSTROM, P. A. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. **Immunology Today**, v. 15, n. 1, p. 7-10, 1994.

CARROLL, Y. L.; CORRIDAN, B. M.; MORRISSEY, P. A. Lipoprotein carotenoid profiles and the susceptibility of low density lipoprotein to oxidative modification in healthy elderly volunteers. **European Journal Clinical Nutrition**, v. 54, p. 500-507, 2000.

CHEMBLINK. Disponível em <http://www.chemblink.com>, acessado em 12/06/2012, às 23:30h.

CHEN, L.; HU, J. Y.; WANG, S. Q. The role of antioxidants in photoprotection: a critical review. **Journal of the American Academy of Dermatology**, *in press*, 2012.

CHEN, L. H.; XI, S.; COHEN, D. A. Liver antioxidant defenses in mice fed ethanol and the AIN-76A diet. **Alcohol**, v. 12 n. 5, p. 453-457, 1995.

CHENG, K. C.; CAHILL, D. S.; KASAI, H.; NISHIMURA, S.; LOEB, L. A. 8-hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G → T and A → C substitutions. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 1, p. 166-172, 1992.

CHOTIMARKORN, C.; USHIO, H. The effect of trans-ferulic acid and gamma-orizanol on ethanol-induced liver injury in C57BL mouse. **Phytomedicine**, v. 15, p. 951-958, 2008.

CICERO, A. F. G.; GADDI, A. Rice bran oil and γ -orizanol in the treatment of hyperlipoproteinemias and other conditions. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 277-289, 2001.

DI MAMBRO, V. M.; AZZOLINI, A.E.C.S.; VALIM, Y.M.L.; FONSECA, M.J.V. Comparison of antioxidant activities of tocopherols alone and in pharmaceutical formulations. **International Journal of Pharmaceuticals**, v. 262, p. 93-99, 2003.

EDER, K.; FLADER, D.; HIRCHE, F.; BRANDSCH, C. Excess dietary vitamin E lowers the activities of antioxidant enzymes in erythrocytes of rats fed salmon oil. **Journal of Nutrition**, v. 132, n. 11, p. 3400-3404, 2002.

EVANS, P.; HALLIWELL, B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. **British Journal of nutrition**, v. 85, n. 2, p. 67-74, 2001.

FANG, Y.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**, v. 18, p. 872-879, 2002.

FAREMI, T.; SURU, S. M.; FAFUNSO, OBIOHA, U. E. Hepatoprotective potentials of *Phyllanthus amarus* against ethanol-induced oxidative stress in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 2658-2664, 2008.

FARMER, P. B. DNA and protein adducts as markers of genotoxicity. **Toxicology Letters**, v. 149, p. 3-9, 2004.

FEARON, I. M.; FAUX, S. P. Oxidative stress and cardiovascular disease: novel tools give (free) radical insight. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 47, p. 372-381, 2009.

FIAMONCINI, R. L. **Análise do estresse oxidativo em jogadores juniores de futebol: comparação entre pré e pós-exercício aeróbio e anaeróbio**. 2002, 88 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) –Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

FIAMONCINI, R. L.. **Análise do estresse oxidativo em jogadores juniores de futebol: comparação entre pré e pós-exercício aeróbio e anaeróbio**. Florianópolis, 2002. 87 f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Engenharia de Produção), Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2002.

FRANCO, R.; OLEA, R. S.; REYES, E. M. R.; PANAYIOTIDIS, M. I. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: ménage à trios. **Mutation Research**, v. 674, p. 3-22, 2009.

GARCIA, R. W. D. Reflexos da globalização na cultura alimentar: considerações sobre a mudança na alimentação urbana. **Nutrition Review**, Campinas, v. 16, n. 4, p. 483-92, 2003.

GARCÍA, E. F.; LÉRIDA, I. C.; GALÁN, M. J.; FERNADÉZ, J. G.; GÁLVEZ, A. P.; MÉNDEZ, D. H. Carotenoids bioavailability from foods: from plant pigments to efficient biological activities. **Food Research International**, v. 46, p. 438-450, 2012.

GHATAK, S. B.; PANCHAL, S. J. Anti-hyperlipidemic activity of orizanol, isolated from crude rice bran oil, on Triton WR-1339-induced acute hyperlipidemia in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 3, p. 642-648, 2012.

GILLESPIE, M. S. **Metabolic aspects of orizanol in rats**. 2003, 77 f. Dissertation (Master of Science) – Louisiana State University, Louisiana.

GONZAGA, I. V. F. **Suplementação com óleo de arroz semi-refinado com alto teor de gama-orizanol na dieta de garanhões**. 2008, 87 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Produção Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

GRAF, E. Antioxidant potential of ferulic acid. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 13, p. 435-448, 1992

GRIFFITHS, H. R.; LUNEC, J. Ascorbic acid in the 21st century – more than a simple antioxidant. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 10, p. 173-182, 2001.

GRUNEWALD, K. K.; BAILEY, R. S. Commercially marketed supplements for bodybuilding athletes. **Sports Medicine**, v. 15, p. 90-103, 1993.

GUNDUC, N.; EL, S. N. Assessing antioxidant activities of phenolic compounds of common Turkish food and drinks on in vitro low-density lipoprotein oxidation. **Journal of food science**, v. 68, n. 8, p. 2591-2595, 2003

HALLIWELL, B. Antioxidant characterization: methodology and mechanism. **Biochemical Pharmacology**, v. 49, p. 1341-1348, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4. ed. London: Oxford University Press, 2007.

HALVORSEN, B. L. et al. A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. **Journal of Nutrition**, v. 132, n. 3, p. 461-471, 2002.

HININGER, I. A. et al. No significant effects of lutein, lycopene or β -carotene supplementation on biological markers of oxidative stress and LDL oxidizability in healthy adult subjects. **Journal of American College of Nutrition**, v. 20, p. 232-238, 2001.

HIROSE, M.; OZAKI, K. TAKABA, K.; FUKUSHIMA, S.; SHIRAI, T. NOBUYUKI, I. Modifying effects of the naturally occurring antioxidants γ -orizanol, phytic acid, tannic acid and n-tritriacontane-16,18-dione in a rat wide-spectrum organ carcinogenesis model. **Carcinogenesis**, v. 12, n. 10, p. 1917-1921, 1991.

HUANG, C. J. **Potential functionality and digestibility of orizanol as determined using in vitro cell culture models**. 2003. 159 f. Thesis (Doctor of Philosophy) – Department of Food Science, Louisiana State University, Louisiana.

HUANG, Y.; OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J. DEEMER, E. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated β -cyclodextrin as the solubility enhancer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 1815-1821, 2002.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; DE FÁTIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.

HUSAIN, S. R.; CILLARD, J.; CILLARD, P. α -tocopherol prooxidant effect and malondialdehyde production. **Journal of the American Oil Chemists**, v. 64, n. 1, p. 109-111, 1987.

IKEDA, I.; TANAKA, K.; SUGANO, M.; VAHOUNY, G. V.; GALLO, L. L. Inhibition of cholesterol absorption in rats by plant sterols. **Journal of Lipid Research**, v. 29, p. 1573-1582, 1988.

ILHAN, A. et al. Ginkgo biloba prevents phone-induced oxidative stress in rat brain. **Clinica Chimica Acta**, v. 340, p. 153-162, 2004.

ISLAM, S. et al. Biological activities of rice bran-derived antioxidant phytochemicals for medical therapy. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 1847-1853, 2011.

JARIWALLA, R. J. Rice-bran products: phytonutrients with potential applications in preventive and clinical medicine. **Drugs Experimental Clinical Research**, Suíça, v. 27, n. 1, p. 17-26, 2001.

JULIANO, C.; COSSU, M.; ALAMANNI, M. C.; PIU, L. Antioxidant activity of gamma-*orizanol*: mechanism of action and its effect on oxidative stability of pharmaceutical oils. **International Journal of Pharmaceutics**, v, 299, p. 146-154, 2005.

KALIORA, A. C; DEDOUSSIS, G.V.Z; SCHIMIDT, H. Dietary antioxidants in preventing atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 187, p. 1-17, 2006.

KAWAMUKAI, M. Biosynthesis, bioproduction and novel roles of ubiquinone. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, n. 6, p. 511-517, 2002.

KEHRER, J. P. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. **Toxicology**, v. 149, p. 43-50, 2000.

KIRIBUCHI, M.; MIURA, K.; TOKUDA, S.; KANEDA, T. Hypocholesterolemic effect of triterpene alcohols with *soysterol* on plasma cholesterol in rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 29, n. 1, p. 35-43, 1983.

KLAUNIG, J. E.; KAMENDULIS, L. M. The role of oxidative stress in carcinogenesis. **Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology**, v. 44, p. 239-267, 2004.

KLAUNIG, J. E.; WANG, Z.; PU, X.; ZHOU, S. Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 254, p. 86-99, 2011.

KOUOH, F.; GRESSIER, B.; LUYCKX, M.; BRUNET, C.; DINE, T.; CAZIN, M.; CAZIN, J. C. Antioxidant properties of albumin: effect on oxidative metabolism of human neutrophil granulocytes. **Il Farmaco**, n. 54, p. 695-699, 1999.

KREIDER, R. B. et al. **Exercise & sport nutrition**: a balanced perspective for exercise physiologists. [s.n.], july, 2003.

KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and Bioproducts Processing**, v.8, n. 3, p. 217-233, 2011.

KRYSTON, T. B.; GEORGIEU, A. B.; PLISSIS, P.; GEORGAKIUS, G. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 711, p. 193-201, 2011.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; MORALES, M. T.; FETT, R. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, v. 36, n. 4, p. 1283-1287, 2006.

LAURILA, J. P.; LAATIKAINEN, L. E.; CASTELLONE, M. D. LAUKKANEN, M. O. SOD3 reduces inflammatory cell migration by regulating adhesion molecule and cytokine expression. **Plos One**, v. 4, n. 6, 5786 p., 2009

LEOPOLD, J. A.; LOSCALZO, J. Oxidative mechanisms and atherothrombotic cardiovascular disease. **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies**, v. 5, n. 1, p. 5-13, 2008.

LEVY, Y. et al. Dietary supplementation of a natural isomer mixture of β -carotene inhibits oxidation of LDL derived from patients with diabetes mellitus, **Annual Nutrition Metabolism**, v. 44, p. 54-60, 2000.

LIMA, A. **Avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*Caryocar braziliense*, Camb.)**. 2008, 182 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

LIN, M. T.; BEAL, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Nature**, v. 443, p. 787-795, 2006.

LINDSAY, D. G.; ASTLEY, S. B. European research on the functional effects of dietary antioxidants – EUROFEDA. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 23, p. 1-38, 2002.

MACLEAN, P. D.; DRAKE, E. C.; ROSS, L.; BARCLAY, C. Billirubin as an antioxidant in micelles and lipid bilayers: its contribution to the total antioxidant capacity of human blood plasma. **Free Radical Biolgy & Medicine**, v. 43, p. 600-609, 2007.

MAIANI, G. et al. Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavaibility and their protective role in humans. **Molecular Food Research**, v. 53, p. 194-218, 2009.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MATÉS, J. M.; PÉREZ-GOMEZ, C.; DE CASTRO, I. N. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clinical Biochemistry**, v. 32, n. 8, p. 595-603, 1999.

MC CORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase an enzyme function for erythrhocuprein (hemocuprein). **Jornal of Biological Chemistry**, v. 244, p. 6049-55, 1969.

MELONI, J.N.; LARANJEIRA, R. Custo social e de saúde no consume de álcool. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 26, n.1, p. 7-10, 2004.

MOTTA, V. T. **Bioquímica Clínica para o Laboratório: Princípios e Interpretações**. 4 ed. Porto Alegre: Editora Médica Missau; São Paulo: Robe Editorial; Caxias do Sul: EDUCS, 2003, 419 p.

MUKAI, K.; SAWADA, K.; KOHNO, Y.; TERAQ, J. Kinetic study of the prooxidant effect of tocopherol. Hydrogen abstraction from lipid hydroperoxide by tocopheroxyls in solution. **Lipids**, v. 28, n. 8, p. 747-752, 1993.

NADEEM, N.; WOODSIDE, J. V.; KELLY, S.; ALLISTER, R.; YOUNG, I. S.; MCENENY, J. The two faces of α - and γ -tocopherols: an *in vitro* and *ex vivo*

investigation into VLDL, LDL and HDL oxidation. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, p. 845-851, 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3 ed. São Paulo: Sarvier, 2002, 975 p.

NIKI, E. Assesment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 503-515, 2010.

OKUN, J. G.; LÜMMEN, P.; BRANDT, U. Three classes of inhibitors share a common binding domain in mitochondrial complex I (NADH: ubiquinone oxidoreductase). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 5, p. 2625-2630, 1999.

OTT, M.; GOGVADZE, V.; ORRENIUS, S. Mitochondria, oxidative stress and cell death. **Apoptosis**, v. 12, p. 913-922, 2007.

PAPAHARALAMBUS, C. A.; GRIENDLING, K. K. Basic mechanisms of oxidative stress and reactive oxygen species in cardiovascular injury. **Trends Cardiovascular Medicine**, v. 17, n. 2, p. 48-54, 2007.

PARI, L.; SURESH, A. Effect of grape (*Vitis vinifera* L.) leaf extract on alcohol induced oxidative stress in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 1627-1634, 2008.

PASTORE, A.; FEDERICI, G.; BERTINI, E. PIEMONTE, F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. **Clinica Chimica Acta**, v. 333, p. 19-39, 2003.

PELLEGRINI, N. t al. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. **Journal of Nutrition**, v. 113, n. 9, p. 2812-2819, 2003.

PICCOLI, C.; DÁPRILE, A.; SCRIMA, R.; AMBROSI, L.; ZEFFERINO, R.; CAPITANIO, N. Subcytotoxic Mercury chloride inhhibits gap junction intercellular

communication by a redox- and phosphorylation-mediated mechanism. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 52, p. 916-927, 2012.

POLLAK, O. J. Effect of plant sterols on serum lipids atherosclerosis. **Pharmacology & Therapy**, v. 31, p. 177-208, 1995.

PRATICÒ, D.; CLARK, C. M.; LIUN, F.; LEE, V. Y. M.; TROJANOWSKY, J. Q. Increase of brain oxidative stress in mild cognitive impairment. **Archives of Neurology**, v. 59, p. 972-977, 2002.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337-41, 1999.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, p. 3396-402, 2000.

QURESHI, A. A.; SAMI, S. A.; SALSER, W. A.; KHAN, F. A. Dose-dependent suppression of serum cholesterol by tocotrienol-rich fraction (TRF₂₅) of rice bran in hypercholesterolemic humans. **Atherosclerosis**, v. 161, n. 1, p. 199-207, 2002.

RE, R.; PELEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical in Biology & Medicine**, EUA, v. 26 n. 9-10, p. 1231-37, 1999.

REDDY, S.K.; HUSAIN, K.; SCHOLORFF, E.C.; SCOTT, R. B.; SOMANI, S. M. Dose response of ethanol ingestion on antioxidant defense system in rat brain subcellular fractions. **Neurotoxicology**, EUA, v. 20 n. 6, p. 977-987, 1999.

REVILLA, E. et al. Nutraceutical composition, antioxidant activity and hypocholesterolemic effect of a water-soluble enzymatic extract from rice bran. **Food Research International**, v. 42, p. 387-393, 2009.

ROCHE, M.; RONDEAU, P.; SINGH, N. R.; TARNUS, E.; BOURDON, E. The antioxidant properties of serum albumin. **FEBS Letters**, n. 582, p. 1783-1787, 2008.

RODRIGUES, P. A. et al. Gastroprotective effect of barbatusin and 3-beta-hydroxy-3-deoxybarbatusin, quinoid diterpenes isolated from *Plectranthus grandis*, in ethanol-induced gastric lesions in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 3, p. 725-730, 2010.

ROMERO, F. J. Antioxidants in peripeheral nerve. **Free Radical Biolgy & Medicine**, USA, v. 20, n. 7, p. 925-932, 1996.

RONG, N.; AUSMAN, L. M.; NICOLOSI, R. J. Orizanol decreases cholesterol absorption and aortic fatty steaks in hamsters. **Lipids**, v. 32, p. 303-309, 1997.

ROSENBLOOM, C.; MILLARD-STAFFORD, M.; LATHROP, J. Contemporary ergogenic aids used by strength/power athletes. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 92, n. 10, p. 1264-1266, 1992.

ROSS, J. A.; KASUM, C. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. **Annual Reviews of Nutrition**, v. 22, p. 19-34, 2002.

ROVER JÚNIOR, L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutationa associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quimica Nova**, n. 1, p. 112-119, 2001.

SAENJUM, C.; CHAIYASUT, C.; CHANSAKAOW, S.; SUTTAJIT, M.; SIRITHUNYALUG, B. Antioxidant and anti-inflammatory activities of gamma-orizanol rich extracts from Thai purple rice bran. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, p. 1070-1077, 2012.

SASAKI, J.; et al. Effects of gamma-orizanol on serum lipids and apolipoproteins in dyslipidemic schizophrenics receiving major tranquilizers. **Clinical Therapy**, v. 12, n. 3, p. 263-268, 1990.

SCARAVIELLO, E. M. S.; ARELLANO, D. B. γ -orizanol: um importante componente del aceite de salvado de arroz. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Campinas, v. 48, n. 1, p. 7-12, 1998.

SCHNEIDER, C.D; OLIVEIRA A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, São Paulo, v. 10, n. 4, p. 308–312, 2004.

SCHÖNEICH, C. Reactive oxygen species and biological aging: a mechanistic approach. **Experimental Gerontology**, EUA, v. 34, n. 1, p. 19-34, 1999.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation total protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, n. 1, p. 192–205, 1968.

SEETHARAMAIAH, G. S.; PRABHAKAR, J. V. Orizanol content of Indian rice bran oil and its extraction from soap stock. **Journal of Food Science and Technology**, v. 23, p. 270-275, 1986.

SEETHARAMAIAH, G. S.; CHANDRASEKHARA, N. Studies of hypocholesterolemic activity of rice bran oil. **Atherosclerosis**, v. 78, p. 219-223, 1989

SEIFRIED, H. E.; ANDERSON, D. E.; FISHER, E. I.; MILNER, J. A. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. **Journal of Nutritional Biochemistry**, EUA, v. 18, n. 2007, p. 561–79, 2006.

SEITZ, H. K.; STICKEL, F. Risk factors and mechanisms of hepatocarcinogenesis with special emphasis on alcohol and oxidative stress. **Biology and Chemistry**, v. 387, p. 349-360, 2006.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, n. 4, p. 308–313, 2004.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, n. 9/10, p. 916-921, 1999.

SIGMA-ALDRICH. Disponível em <http://www.sigmaaldrich.com>, acessado em 10/06/12, às 20:50h.

SIMONIAN, N. A.; COYLE, J.T. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Annual Review of Pharmacology**, v. 36, p. 83-106, 1996.

SOARES, D. G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. Sequestering ability of butylated hydroxytoluene, propyl gallate, resveratrol, and vitamins C and E against ABTS, DPPH, and hydroxyl free radicals in chemical and biological systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 1077-1080, 2003.

SONG, Z. et al. S-adenosylmethionine (SAME) protects against acute alcohol induced hepatotoxicity in mice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 14, p. 591-597, 2003.

SRIVASTAVA, A.; SHIVANANDAPPA, T. Neuroprotective effect of *Decalepis hamiltonii* roots against ethanol-induced oxidative stress. **Food Chemistry**, v. 119, p. 626-629, 2010

SUGAMURA, K.; KEANEY JR, J. F. Reactive oxygen species in cardiovascular disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 51, p. 978-992, 2011.

SUNITHA, T.; MANORAMA, R.; RUKMINI, C. Lipid profile of rats fed blends of Rice bran oil combination with sunflower and safflower oil. **Plants Foods for Human Nutrition**, v. 51, p. 219-230, 1997.

SVILAAS, A. et al. Intakes of antioxidants in coffee, and vegetables are correlated with plasma carotenoid in humans. **Journal of Nutrition**, v. 3, n. 134, p. 562-567, 2004.

TEMPLE, N. J. Antioxidants and disease: more questions than answers. **Nutrition Research**, v. 20, n. 3, p. 449-459, 2000.

TIRAPELLI, L. F. et al. Chronic ethanol consumption induces histopathological changes and increases nitric oxide generation in the rat liver. **Tissue and Cell**, v. 43, p. 384-391, 2011.

TSUSHIMOTO, G. et al. DNA-damaging, mutagenic, clastogenic and cell-cell communication inhibitory properties of gamma-orizanol. **Journal of Toxicological Sciences**, v. 16, n. 4. p. 191-202, 1991.

UYVAL, M.; KUTALP, G.; ÖZDEMIRLER, G.; AYKAÇ, G. Ethanol-induced changes in lipid peroxidation and glutathione content in rat brain. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 23, p. 227-230, 1989.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; BENFATO, V. S.; MANFEDRINI, V.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para a determinação. **Química Nova**, v. 3, p. 1323-1338, 2007.

VITAMIN RESEARCH PRODUCTS INC. Disponível em <http://vrp.com>, acessado em 05/06/12, às 20:45h.

WANG, H.; FENG, F.; ZHUANG, B.; SUN, Y. Evaluation of hepatoprotective effect of Zhi-Zi-Da-Huang decoction and its two fractions against acute alcohol-induced liver injury in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, p. 273-279, 2009.

WEIDNER, A. M. *et al.* RNA oxidation adducts 8-OHG and 8-OHA change with A β ₄₂ levels in late-stage Alzheimer's Disease. **Plos ONE**, v 6, n. 9, e24930.

WEINBERG, R. B.; VANDERWERKEN, B. S.; ANDERSON, R. A.; STEGNER, J. E.; THOMAS, M. J. Pro-oxidant effect of vitamin E in cigarette smokers consuming a high polyunsaturated fat diet. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 21, p. 1029-1033, 2001.

WHEELER, K. B.; GARLEB, K. A. Gamma-oryzanol – plant sterol supplementation: metabolic, endocrine and physiologic effects. **Journal of Sport Nutrition**, v. 1, p. 170-177, 1991.

WINTERBOURN, C.; GUTTERIDGE, J. M.; HALIWELL, B. Doxorubicin-dependent lipid peroxidation at low partial pressures of O₂. **Journal of Free Radicals in Biology & Medicine**, EUA, v. 1, n. 1, p. 43–49, 1985.

XU, Z.; NA, H.; GODBER, J. S. Antioxidant activity of tocopherols, tocotrienols and γ -oryzanol components from rice bran against cholesterol oxidation accelerated by 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 2077–2081, 2001.

YAN, L.; LEVINE, R. L.; SOHAL, R. S. Oxidative damage during aging targets mitochondrial aconitase. **Proceedings of the National Academy of Sciences–Biochemistry**, v. 94, p. 11168-11172, 1997.

YASUKAWA, K.; AKIHISA, T.; KIMURA, Y.; TAMURA, T.; TAKIDO, M. Inhibitory effect of cycloartenol ferulate, a component of rice bran, on tumor promotion in two-stage carcinogenesis in mouse skin. **Biological Pharmacological Bulletin**, v. 21, n. 10, p. 1072-1076, 1998.

YEPEZ, B.; ESPINOSA, M.; LÓPEZ, S.; BOLAÑOS, G. Producing antioxidant fractions from herbaceous matrices by supercritical fluid extraction. **Fluid Phase Equilibria**, n. 194-197, p. 879–884, 2002.

YOU, Y. et al. *In vitro* and *in vivo* hepatoprotective effects of the aqueous extract from *Taraxacum officinale* (dandelion) root against alcohol-induced oxidative stress. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 1632-1637, 2010.

YUYAMA, K.; AGUIAR, J. P. L.; YUYAMA, L. K. O. Camu-camu: um fruto fantástico como fonte de vitamina C. **Acta Amazonica**, v. 32, n. 1, p. 169-174, 2002.

ZELKO, I. G.; MARIANI, T. J.; FOLZ, R. J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD, Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free Radical Biology**, v. 33, n. 3, p. 337-349, 2002.

ZHANG, R.; HU, Y.; YUAN, J.; WU, D. Effects of Puerariae radix extract on the increasing intestinal permeability in rat with alcohol-induced liver injury. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, p. 207-214, 2009.

ZHONG, Y. et al. Induction of brain CYP2E1 by chronic ethanol treatment and related oxidative stress in hippocampus, cerebellum, and brainstem. **Toxicology**, v. 302, p. 275-284, 2012.

ANEXO I

Reagentes empregados nas análises

- Ensaio DPPH

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl

Metanol

- Ensaio ABTS

2,2-azinobis (3-etilbenzoatizolina-6- ácido sulfônico)

Metanol

- Ensaio do complexo fosfomolibdênio

Ácido ascórbico

Ácido sulfúrico

Metanol

Molibdato de amônio

- Ensaio FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

Acetato de sódio trihidratado

Ácido acético glacial P.A

Ácido clorídrico P.A

Álcool metílico P.A.

Cloreto férrico hexahidratado (PM= 270,3)

Sulfato ferroso heptahidratado (PM= 278,02)

- Determinação da superóxido dismutase

Ácido etilenodiaminotetracético

Fosfato de potássio monobásico

Fosfato de potássio dibásico

Metionina

Nitro blue tetrazolium

Riboflavina

- Determinação da glutathione

Ácido Tricloroacético

5,5'-dithiobis-(2-ácido sulfônico)

ANEXO II



Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 90/10, sobre o projeto intitulado: “Avaliação do potencial terapêutico das substâncias extraídas do pó cerífero da *Copernícia prunifera nas dislipidemias*”, de responsabilidade de Maria Goretti Rodrigues de Queiroz, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 09 de setembro de 2010.

Fortaleza, 16 de Novembro de 2010.


Prof. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA