UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Área de Nutrição Experimental

Aplicação de técnicas estatísticas multivariadas na avaliação
de associações entre biomarcadores do estresse oxidativo e
fatores dietéticos em indivíduos com dislipidemia controlada
por estatinas

Patrícia Borges Botelho

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof^a. Dr^a. Inar Alves de Castro

**São Paulo
2009**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Área de Nutrição Experimental

Aplicação de técnicas estatísticas multivariadas na avaliação
de associações entre biomarcadores do estresse oxidativo e
fatores dietéticos em indivíduos com dislipidemia controlada
por estatinas

Patrícia Borges Botelho

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof^a. Dr^a. Inar Alves de Castro

**São Paulo
2009**

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

B748a Botelho, Patrícia Borges
Aplicação de técnicas estatísticas multivariadas na avaliação de associações entre biomarcadores do estresse oxidativo e fatores dietéticos em indivíduos com dislipidemia controlada por estatinas / Patrícia Borges Botelho. -- São Paulo, 2009. 80p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.

Orientador: Castro, Inar Alves de

1. Nutrição experimental : Ciência dos alimentos 2. Nutrição : Doenças 3. Antioxidante : Nutrição 4. Ácido graxo : Metabolismo I. T. II. Castro, Inar Alves de, orientador.

641.1 CDD

Patrícia Borges Botelho

Aplicação de técnicas estatísticas multivariadas na avaliação
de associações entre biomarcadores do estresse oxidativo e
fatores dietéticos em indivíduos com dislipidemia controlada
por estatinas

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Inar Alves de Castro
Presidente/ Orientadora

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

*A Deus pelas graças e bênçãos derramadas em minha vida.
Aos meus pais, Ítalo e Suely, e as minhas irmãs, Isabela e Andressa,
pelo amor incondicional e pelas palavras de incentivo e conforto dadas
mesmo a distância e ao Rodrigo, pelo auxílio e incentivo dados
durante a realização deste projeto.
Dedico a vocês mais esta conquista!*

“O que nos faz grandes é não perder o futuro de vista. É chegar a uma porta, fincar a bandeira da conquista e, nesse mesmo instante, começar a buscar outros portos. É criar desafios, calcular riscos, avançando sempre. Porque a grande aventura é viver. E a vida, assim como as ondas, tem um jeito diferente de se repetir, de prometer descobertas e abrigar todos os tipos de sonhos e embarcações. O que nos faz ser grandes é ser como o mar: incansável na sua procura pela onda perfeita, até descobrir que a perfeição está na própria busca.”

Autor desconhecido

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Professora **Inar**, pelos importantes ensinamentos e pela incessante colaboração para a realização deste projeto. Agradeço também pelo conforto nas horas difíceis, pelas broncas e pelos “puxões de orelha”. Enfim, pela compreensão e amizade. Obrigada por tudo!

A todos os colegas de laboratório (**Marliz, Caroline, Cyntia, Mariana, Ana Carolina, Cristina, Natália e Luciene**) pelo apoio e pelos momentos de alegria, em especial à Carol, pela amizade que construímos! Agradeço a cada um de vocês que do seu jeito me apoiou, me ouviu, me deu conselhos! Afinal, vocês fizeram me sentir em casa, mesmo eu não sendo daqui, tornando mais fácil essa etapa da minha vida!

Aos meus amigos de república, **Marcela, Adrilaine, Tatiane, Thaís e André**, pelo apoio, pelos conselhos e pelos momentos de alegria! O meu muito obrigada a vocês!

À **Marliz, Caroline e Mariana**, pelo apoio e pela paciência para retirar as dúvidas que surgiam ao longo das análises. À **Ana Carolina, à Cristina e à Natália**, pela montagem do banco de ácidos graxos, à **Ana Carolina**, pelo auxílio na esterificação de ácidos graxos, e à **Cristina**, pelo auxílio no dia da coleta.

À **Cyntia**, minha aluna de iniciação científica, pela incessante colaboração e pela amizade. Você foi imprescindível para a realização deste trabalho. Já te falei, não te largo mais!

Ao **Alexandre (Mococa)**, farmacêutico-bioquímico, pela colaboração nas coletas dos dados e pelo profissionalismo no atendimento aos voluntários.

À **Vânia**, pelo auxílio nas análises de perfil de ácidos graxos.

À **Joana**, pela atenção, carinho e auxílio prestados. Obrigada por tudo, Jô!

Aos técnicos **Luciene e Vítor**, pelo auxílio na realização das análises.

À **Vera**, secretária do ambulatório de lipoproteínas, e aos Doutores **Peterson e André**, médicos do ambulatório, pela relevante colaboração e pelo apoio durante o período de coletas.

Aos **voluntários**, pela valiosa contribuição no desenvolvimento da pesquisa.

Ao **Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP e à **Comissão de Pós-Graduação**, pela oportunidade de realizar este curso.

Ao **Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia**, em especial aos médicos e residentes do ambulatório de lipoproteínas e ao **Dr. Marcelo Bertolami**, pelo apoio e pela oportunidade de realizar a pesquisa nessa instituição.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – **FAPESP**, pela concessão do auxílio financeiro para a realização da pesquisa e da bolsa de estudo.

Ao **Edílson, à Cleonice e à Mônica**, da Secretaria do Bloco 14, por todo o auxílio dispensado.

À **Elaine, ao Jorge e à Majô**, da Secretaria de Pós-Graduação, pela atenção disponibilizada.

À **Profª Dulcinéia Abdalla, à Tanize e à Elaine**, do Laboratório de Bioquímica, pela análise de LDL(-), à **Rosângela**, do Laboratório de Lípidos, pela análise do perfil de ácidos graxos, e à **Renata**, do Laboratório de Análises Clínicas, pelas análises de lipoproteínas.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE QUADROS.....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iv
ABSTRACT.....	v
RESUMO.....	vi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 Caracterização do estresse oxidativo	4
2.2 Antioxidantes.....	7
2.2.1 Tocoferóis.....	11
2.2.2 Ácido ascórbico (vitamina C).....	13
2.2.3 Carotenóides	14
2.2.4 Compostos fenólicos	15
2.3 O estresse oxidativo e as doenças cardiovasculares (DCV)	16
2.4 Influência das estatinas sobre o estresse oxidativo e as doenças cardiovasculares	20
2.5 Influência da dieta sobre o estresse oxidativo e as doenças cardiovasculares	24
2.6 Métodos de avaliação do estresse oxidativo <i>in vivo</i> e suas limitações (plasma)	29
2.7 Análise estatística multivariada – PCA e análise de agrupamento..	33
3 OBJETIVOS.....	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS	37

4.1 Materiais	37
4.1.1 Reagentes	37
4.2 Casuística	37
4.3 Metodologia	39
5 RESULTADOS	50
5.1 Características clínicas, bioquímicas e antropométricas dos indivíduos avaliados em um intervalo de 30 dias	50
5.2 Caracterização do estresse oxidativo e do perfil nutricional dos indivíduos classificados de acordo com gênero	53
5.3 Análise multivariada	56
6 DISCUSSÃO	61
7 CONCLUSÕES	70
8 REFERÊNCIAS	71
Anexo 1	81
Anexo 2	84
Anexo 3	85
Anexo 4	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características clínicas, bioquímicas e antropométricas dos indivíduos avaliados no intervalo de 30 dias (n=57).....	51
Tabela 2 - Variação da ingestão diária de macro e micronutrientes no intervalo de 30 dias.....	52
Tabela 3 - Caracterização do estresse oxidativo, do perfil lipídico e dos dados antropométricos de acordo com o sexo.....	55
Tabela 4 - Correlação entre as quatro variáveis e as componentes principais.....	56
Tabela 5 - Características bioquímicas, clínicas e nutricionais dos clusters (grupos) formados pela análise multivariada considerando os quatro biomarcadores do estresse oxidativo.....	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais tipos de reações radicalares.....	4
Figura 2 - Estrutura química do tocoferol.....	11
Figura 3 - Etapas da lipoperoxidação e a ação antioxidante do α – tocoferol associado ao ascorbato.....	12
Figura 4 - Oxidação do ácido ascórbico.....	13
Figura 5 - Estrutura química do β -Caroteno.....	14
Figura 6 - Estrutura química de algumas subclasses de flavonóides.....	16
Figura 7 - Progressão da aterosclerose.....	17
Figura 8 - Relação entre formação de ERO, disfunção endotelial e placa de ateroma.....	19
Figura 9 - Ação das estatinas no controle do colesterol sérico.....	21
Figura 10 - Efeitos pleiotrópicos das estatinas.....	23
Figura 11 - Número de indivíduos recrutados durante o estudo.....	38
Figura 12 - Projeção dos indivíduos no plano gerado pelas 4 variáveis (1 x 2), separados de acordo com a análise de agrupamento.....	58
Figura 13 - Transporte reverso de colesterol.....	68

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais fontes dietéticas de antioxidantes	10
Quadro 2 - Exemplos de alguns estudos que investigaram a ação pró-oxidante e/ou antioxidante de compostos bioativos presentes nos alimentos...	26
Quadro 3 - Métodos de avaliação do estresse oxidativo em humanos (plasma).....	32

LISTA DE ABREVIATURAS

CC	Circunferência da Cintura
CQ	Circunferência do Quadril
CT	Colesterol
DCV	Doenças Cardiovasculares
DPPH	<i>Diphenylpicrylhydrazyl</i>
ERO	<i>Espécie Reativa de Oxigênio</i>
FRAP	<i>Ferric Reducing Power Assay</i>
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ICDP	Instituto de Cardiologia Dante Pazzanese
IMC	Índice de Massa Corporal
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LDL(-)	LDL minimamente modificada
MDA	Malondialdeído
MUFA	<i>Monounsaturated Fatty Acids</i>
N6/N3	Relação ômega 6 e ômega 3
NO	Óxido Nítrico
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>
PBS	<i>Phosphate saline buffer</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PI	<i>Peroxidability Index</i>
PON-1	Paraoxonase-1
PUFA	<i>Polyunsaturated Fatty Acids</i>
SFA	<i>Saturated Fatty Acids</i>
TBARS	<i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i>
TG	Triglicerídeos
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>
α-TH	α -Tocoferol
α-T[•]	α -Tocoferila

ABSTRACT

Application of multivariate statistical techniques to evaluate the association between biomarkers of the oxidative stress and dietetic factors in individuals with dyslipidemia controlled by statins

Oxidative stress is a physiological condition that is associated with atherosclerosis, and it can be influenced by diet. Our objective was to group 57 individuals with dyslipidemia controlled by statins according to four oxidative biomarkers, and to evaluate the diet pattern and blood biochemistry differences between these groups. Blood samples were collected and the following parameters were evaluated: diet intake by 6-day dietary register, plasma fatty acids, lipoprotein concentration, glucose, oxidized low density lipoprotein (LDL_{ox}), malondialdehyde (MDA), and total antioxidant activity by DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) and FRAP (Ferric reducing power) assays. Individuals were separated into five groups by cluster analysis. All groups showed a difference with respect to at least one of the four oxidative stress biomarkers. The separation of individuals in the first axis was based upon their total antioxidant activity. Clusters located on the right side showed higher total antioxidant activity, higher myristic fatty acid, and lower arachidonic fatty acid proportions than clusters located on the left side. A negative correlation was observed between DPPH and the peroxidability index. The second axis showed differences in oxidation status as measured by MDA and oxLDL concentrations. Clusters located on the upper side showed higher oxidative status and lower HDL cholesterol concentration than clusters located on the lower side. There were no differences in diet among the five clusters. Therefore, fatty acid synthesis and HDL cholesterol concentration seem to exert a more significant effect on the oxidative conditions of the individuals with dyslipidemia controlled by statins than does their food intake.

Keywords: diet, nutrients, oxidation, multivariate statistic, fatty acids

RESUMO

Aplicação de técnicas estatísticas multivariadas na avaliação de associações entre biomarcadores do estresse oxidativo e fatores dietéticos em indivíduos com dislipidemia controlada por estatinas

Estresse oxidativo é uma condição fisiológica que está associada à aterosclerose e pode ser influenciada pela dieta. Diante disso, o objetivo do presente estudo foi agrupar 57 indivíduos com dislipidemia controlada por estatinas, de acordo com quatro biomarcadores do estresse oxidativo, e avaliar diferenças quanto ao padrão dietético e ao perfil lipídico entre esses grupos. Para isso, amostras de sangue foram coletadas de 57 indivíduos com dislipidemia controlada por estatinas e os seguintes parâmetros foram avaliados: ingestão dietética por meio do registro alimentar de 6 dias, ácidos graxos plasmáticos, concentração de lipoproteínas, triglicerídeos, glicose, LDL oxidada (LDL_{ox}), malondialdeído (MDA) e atividade antioxidante total por DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) e FRAP (*Ferric reducing power*). Os indivíduos foram separados em cinco grupos pela análise de agrupamento. Todos os grupos apresentaram diferença com relação a pelo menos um dos biomarcadores do estresse oxidativo. A separação dos indivíduos na primeira componente baseou-se na atividade antioxidante total. Dessa forma, os *clusters* (grupos) localizados no quadrante direito caracterizaram-se por capacidade antioxidante total mais alta, bem como por maiores concentrações de ácido mirístico e menores de ácido araquidônico que os *clusters* (grupos) localizados no quadrante esquerdo. Uma correlação negativa foi observada entre DPPH e índice de peroxidabilidade. A segunda componente baseou-se nas diferenças no estado de oxidação determinado pelas concentrações de MDA e LDL_{ox}. Os *clusters* (grupos) localizados no quadrante superior apresentaram estado oxidativo mais alto e menor concentração de HDL que os *clusters* (grupos) localizados no quadrante inferior. Nenhuma diferença foi observada quanto à ingestão dietética entre os cinco *clusters* (grupos). Portanto, supõe-se que a síntese de ácidos graxos e a concentração de HDL parecem exercer efeito mais expressivo que a ingestão dietética nas condições oxidativas dos indivíduos com dislipidemia controlada por estatinas.

Palavras-chave : *dieta, nutrientes, oxidação, estatística multivariada, ácidos graxos*

1 INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo pode ser definido como a ruptura da sinalização e do controle redox (JONES, 2006). Muitos estudos demonstram a importância dessa condição no desenvolvimento das doenças cardiovasculares, incluindo a aterosclerose (URSINI; SEVANIAN, 2002; HANSEL; NICOLLE; LALANNE, 2007; PAPA HARALAMBUS; GRIENDLING, 2007). Sabe-se que partículas de LDL (*Low density lipoproteins*) são preferencialmente depositadas na parede vascular, onde são oxidadas em consequência do estresse oxidativo (HANSEL; NICOLLE; LALANNE, 2007). Esse processo ocorre durante os estágios recentes da disfunção endotelial, promovendo o desenvolvimento das células espumosas e, conseqüentemente, das lesões ateroscleróticas (ESTERBAUER *et al.*, 1992), tornando a oxidação da LDL um dos principais fatores de risco para a progressão da aterosclerose (BERLINER; HEINECKE, 1996; URSINI; SEVANIAN, 2002; GIRONA *et al.*, 2008). Por essa razão, o estresse oxidativo pode ser altamente deletério para os indivíduos que apresentam LDL em concentrações elevadas e que necessitam do uso de medicamentos para o seu controle.

Muitos fatores podem influenciar o estado oxidativo e a susceptibilidade à oxidação, como a dieta, o tabagismo, o exercício físico, dentre outros. Considerando que alguns nutrientes podem promover a melhora do sistema antioxidante, reduzindo o risco de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, especialmente em condições subótimas (BARJA, 2002), o consumo de dieta rica em antioxidantes naturais pode contribuir para a redução do estresse oxidativo pós-prandial e tem sido associado com a prevenção e/ou tratamento da aterosclerose

(URSINI; SEVANIAN, 2002; KALIORA; DEDOUSSIS; SCHMIDT, 2006; KALIORA; DEDOUSSIS, 2007).

Uma das principais limitações em estudos que envolvem estresse oxidativo em humanos é a falta de um biomarcador específico que caracterize o estado oxidativo e a susceptibilidade do organismo à oxidação (MORI *et al.*, 2003; PAPA HARALAMBUS; GRIENDLING, 2007; STEPHENS; BAIN; HUMPHRIES, 2008). Além disso, considerando que estudos com humanos não podem ser invasivos, quase todos os experimentos são desenvolvidos em amostras de sangue ou de urina. Desta forma, as limitações relacionadas à amostragem de tecidos e a dificuldade em quantificar as espécies reativas biológicas envolvidas nesse processo contribuem para que não se tenha alcançado até o momento um consenso sobre qual biomarcador deve ser utilizado para diagnosticar o estresse oxidativo em humanos (BLUMBERG; FREI, 2007).

Recentemente, Capitani *et al.* (2009) propuseram o uso de técnicas da estatística multivariada para classificar compostos naturais e sintéticos de acordo com sua atividade antioxidante medida por cinco diferentes metodologias *in vitro*. Uma dessas técnicas, conhecida como PCA (*Principal Component Analysis*), reduz a quantidade de variáveis originais a menor número de novas variáveis não correlacionadas, baseada na correlação linear entre elas. Essas ferramentas estatísticas tornam possível a separação de indivíduos de acordo com seu perfil de oxidação, avaliado por mais que três biomarcadores, sendo essa dispersão graficamente visível. Além disso, a análise de agrupamento, outra técnica multivariada, pode ser usada para agrupar indivíduos de acordo com suas similaridades e diferenças em relação a todos os biomarcadores selecionados.

Considerando que indivíduos com dislipidemia controlada são altamente susceptíveis aos efeitos deletérios do estresse oxidativo e que vários biomarcadores devem ser avaliados para a caracterização dessa condição em humanos, o objetivo desse estudo foi aplicar técnicas da estatística multivariada para agrupar indivíduos com dislipidemia controlada por estatinas de acordo com quatro biomarcadores oxidativos e avaliar as diferenças quanto ao padrão dietético e ao perfil lipídico entre os grupos formados.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Caracterização do *estresse oxidativo*

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do metabolismo humano, sendo os radicais livres produzidos naturalmente ou em função de alguma anormalidade biológica. Estes são definidos como átomos, moléculas ou íons que contêm um elétron não pareado em seu último orbital, apresentando grande instabilidade e elevada reatividade. Tendem a ligar o elétron não pareado com outros, presentes em estruturas próximas de sua formação, comportando-se como receptores ou como doadores de elétrons (ABUJA; ALBERTINI, 2001, STEPHENS; KHANOLKAR; BAIN, 2009). Os principais tipos de reações que envolvem radicais livres estão sumarizados na **Figura 1**.

Figura 1 - Principais tipos de reações radicalares. Modificado de Cerqueira; Medeiros; Augusto (2007).

Os radicais livres, cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio, são denominados Espécies Reativas de Oxigênio (ERO). As mitocôndrias são consideradas as principais fontes geradoras de ERO. Outras

fontes de produção de ERO são: a via de degradação da purina, a degradação peroxissomal de ácidos graxos de cadeia longa e ramificada, a atividade enzimática das NADPH oxidases, as reações de hidroxilação catalizadas pelo sistema citocromo P450, bem como o metabolismo de eicosanóides mediado pelas ciclooxigenases e lipooxigenases (CASH; PAN; SIMON, 2007, SCHÖNFELD; WOJTCZAK, 2008). Fontes exógenas são representadas por tabagismo (LYKKESFELDT, 2007), poluição (SCHÖNFELD; WOJTCZAK, 2008), exercícios físicos e radiação ionizante (ABUJA; ALBERTINI, 2001), dentre outros.

As principais ERO distribuem-se em dois grupos, as radicalares e as não-radicalares. Entre as radicalares destacam-se a hidroxila ($\text{HO}^\bullet$), o anion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), a peroxila ($\text{ROO}^\bullet$), a hidroperoxila ($\text{HO}_2^\bullet$) e a alcóxila ($\text{RO}^\bullet$). Já entre as não-radicalares têm-se o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso (HClO) (SCHÖNFELD; WOJTCZAK, 2008).

A reatividade dessas espécies depende do tipo de radical e do substrato com qual esse radical estiver reagindo. Quando duas ERO reagem entre si, estas compartilham elétrons não pareados por meio de ligações covalentes. Entretanto, quando o radical livre reage com uma molécula não-radicalar, uma nova espécie reativa é gerada, iniciando uma cascata de reações (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Logo, considerando-se que a maioria das moléculas biológicas são não-radicalares, a geração de espécies reativas de oxigênio, tais como o radical hidroxila *in vivo*, usualmente pode desencadear reações em cadeia, como a lipoperoxidação, que é representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação, conforme se observa a seguir (ÇIMEN, 2008):

A iniciação da peroxidação lipídica é causada pela reação de lipídios com alguma espécie que possua reatividade suficiente para retirar um átomo de hidrogênio de um grupo metileno. Ácidos graxos saturados ou monoinsaturados são mais resistentes à oxidação que os ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) devido ao número de duplas ligações em sua estrutura. A representação eletrônica das duplas ligações consiste em dois componentes, a ligação sigma e a ligação pi, sendo que a última é uma ligação fraca, uma vez que os pi elétrons estão fracamente ligados ao núcleo, o que confere maior reatividade aos compostos insaturados (FRANKEL, 2005).

O radical hidroxila é reconhecido como a principal espécie iniciadora e a mais importante na lipoperoxidação. Entretanto, estudos recentes indicam que o ferro também desempenha papel determinante na iniciação desse processo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Considerando que o átomo de hidrogênio tem somente um elétron, a retirada do mesmo de um grupo metila por meio da reação do ácido graxo com o radical hidroxila, por exemplo, leva à formação de um elétron desemparelhado no carbono (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Esses radicais formados podem sofrer várias reações, isto é, podem reagir entre si e formarem compostos estáveis ou se ligarem a moléculas não-radicalares, contribuindo, assim, para propagação da peroxidação lipídica. Considerando que o

oxigênio é uma molécula hidrofóbica e se concentra no interior das membranas, a maioria dos radicais carbono dos ácidos graxos, em condições aeróbicas, combina-se com o oxigênio, levando à formação do radical peroxila ($\text{LOO}\cdot$). Esses são capazes de abstrair o hidrogênio de uma outra molécula lipídica, isto é, de uma cadeia de ácidos graxos adjacentes, formando hidroperóxidos (LOOH). Os hidroperóxidos, por sua vez, são compostos instáveis que sofrem decomposição, principalmente na presença de metais de transição, formando novas espécies reativas ($\text{LOOH} \rightarrow \text{LO}\cdot + \text{HO}\cdot$) que irão propagar a reação até que o substrato termine (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

No organismo humano, o excesso da produção desses compostos pode levar à superestimulação de algumas vias intracelulares, o que geralmente está associado ao desenvolvimento de diversas doenças, tais como aterosclerose, doença de Alzheimer, dentre outras. Em virtude disso, as células dispõem de uma variedade de mecanismos de defesa contra os danos causados pela produção excessiva dessas espécies (FERNANDES *et al.*, 2005).

Portanto, o desequilíbrio entre os compostos pró-oxidantes e o sistema de defesa antioxidante caracteriza o estresse oxidativo. Os danos causados por esse desequilíbrio são refletidos na oxidação de lipídios, proteínas e DNA, além de inúmeras outras alterações nos diferentes mecanismos fisiológicos que utilizam a sinalização redox para sua ativação (SOMOGYI *et al.*, 2007).

2.2 Antioxidantes

Halliwell e Gutteridge (1999) definiram antioxidante como qualquer substância que, presente em baixas concentrações em relação ao substrato oxidante, é capaz

de prevenir ou retardar a oxidação desse substrato. Os principais mecanismos de ação desses compostos são: a captura de radicais, a supressão de estados excitados através de sistemas catalíticos que neutralizam ou eliminam as ERO e a ligação com íons metálicos, tornando-os indisponíveis para a produção de espécies oxidantes.

Os antioxidantes podem ser divididos em dois grupos, dependendo do seu mecanismo de ação: os com atividade *chain breaking*, ou seja, que impedem a propagação das reações em cadeias, ou os com atividade *radical scavenger*, que reduzem a velocidade da reação de iniciação da peroxidação lipídica. Entre os antioxidantes *radical scavenger* destacam-se as catalases, a superóxido dismutase, a glutathione peroxidase e os quelantes de metais (FRANKEL, 2005, SOMOGYI et al, 2007). Já entre os *chain breaking* destacam-se o α -tocoferol, o β -caroteno e o ácido ascórbico, embora também apresentem atividade *radical scavenger*. Tais antioxidantes previnem a formação descontrolada de radicais livres e ERO ou inibem sua reação com estruturas biológicas (SOMOGYI et al., 2007).

Compostos com atividade antioxidante estão presentes nas células e nos tecidos. Alguns são sintetizados pelo organismo, enquanto outros podem ser obtidos de fontes exógenas, tais como dieta.

Os principais antioxidantes encontrados no sangue humano são o ácido úrico e a albumina. O poder antioxidante da albumina se deve à presença do grupo sulfidríla, que reage rapidamente com o ácido peroxinitroso e com o HOCl e lentamente com o H_2O_2 . Já o ácido úrico é capaz de reagir com os radicais $RO_2^{\cdot}$, $OH^{\cdot}$ e $NO_2^{\cdot}$, sendo reconhecido como um poderoso *scavenger* (FRANKEL, 2005). Além disso, o ácido úrico é capaz de quelar íons metálicos como ferro e cobre. Outras fontes de antioxidantes que contribuem para a capacidade antioxidante total são

ácido ascórbico, bilirrubina, α -tocoferol, flavonóides, carotenóides e proteínas séricas, tais como transferrina e ceruloplasmina. Os antioxidantes de fontes dietéticas que têm atraído interesse entre os pesquisadores são o α -tocoferol, o ácido ascórbico, os carotenóides, em especial o β -caroteno, e os compostos fenólicos (YEUM *et al.*, 2004), conforme pode ser observado no **Quadro 1**.

Quadro 1 - Principais fontes dietéticas de antioxidantes

<i>Antioxidantes</i>	<i>Estrutura molecular</i>	<i>Fontes dietéticas</i>
Tocoferóis	<p>Ref: Modificado de Halliwell; Gutteridge, 1999</p>	<p><i>Óleos e gérmen de trigo</i></p>
Carotenóides	<p>Ref: Modificado de Halliwell; Gutteridge, 1999</p>	<p><i>Frutas e verduras alaranjadas</i></p>
Ácido ascórbico	<p>Ref: Modificado de Halliwell; Gutteridge, 1999</p>	<p><i>Laranja, limão, goiaba, etc</i></p>
Compostos fenólicos - genisteína	<p>Ref: Modificado de Halliwell; Gutteridge, 1999</p>	<p><i>Soja</i></p>

2.2.1 Tocoferóis

A vitamina E é um dos mais importantes antioxidantes naturais lipossolúveis encontrados em óleos vegetais derivados de alimentos. É constituída por fenóis metilados e existe em oito diferentes formas: quatro tocoferóis (α , β , δ , γ) e quatro tocotrienóis (α , β , δ , γ). Destes, o α -tocoferol (α -TH) (**Figura 2**) parece ter maior atividade antioxidante que os demais (WILLCOX; CURB; RODRIGUEZ, 2008).

Figura 2 - Estrutura química do tocoferol. Modificado de Halliwell; Gutteridge (1999)

Os tocoferóis e tocotrienóis são constituídos de um anel cromanol com uma hidroxila, que pode doar átomos de hidrogênio e reduzir os radicais livres, e uma cadeia lateral hidrofóbica que os capacita penetrar nas membranas biológicas. Por isso, existem muitas razões para supor que esses compostos tenham ação protetora contra DCV e outras patologias ligadas ao dano oxidativo (FRANKEL, 2005).

A ação antioxidante do tocoferol é caracterizada pela sua reação com o radical peroxila. Este é formado durante a peroxidação lipídica, iniciada pela abstração de um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (PUFA). O α -TH interrompe a reação em cadeia da peroxidação lipídica (**Figura 3A**) doando átomos de hidrogênio e produzindo, assim, hidroperóxidos lipídicos. O radical tocoferila (α -T $\cdot$) formado é então estabilizado por ressonância (FRANKEL, 2005).

Figura 3 - Etapas da lipoperoxidação e ação antioxidante do α -tocoferol associado ao ascorbato (AH). Modificado de Cerqueira; Medeiros; Augusto (2007). $\text{R}^\bullet$: radical livre; LH: lipídio; $\text{L}^\bullet$: radical lipídico; $\text{LOO}^\bullet$: radical peroxila; LOOH: hidróperóxido lipídico; $\alpha\text{-TH}$: α -tocoferol; $\alpha\text{-T}^\bullet$: radical tocoferila

Alguns mecanismos podem converter $\alpha\text{-T}^\bullet$ em $\alpha\text{-TH}$ (**Figura 3B**), sendo a reação com ácido ascórbico na superfície das membranas e lipoproteínas o mecanismo mais conhecido.

Além disso, $\alpha\text{-TH}$ atua em nível celular exercendo funções não antioxidantes, como a inibição da proliferação de células musculares lisas das artérias, a inibição da agregação plaquetária, da adesão de monócitos à parede do endotélio, da captação de LDL oxidada ($\text{LDL}_{(-)}$) e da produção de citocinas. Esses mecanismos

parecem estar relacionados com efeitos específicos do α -tocoferol na transdução de sinais e na expressão gênica (AZZI, 2004, AZZI, 2007).

2.2.2 Ácido ascórbico (vitamina C)

O ácido ascórbico é uma vitamina hidrossolúvel envolvida em múltiplas funções biológicas, sendo essencial para formação do colágeno e para prevenção de hemorragia. Humanos são vulneráveis a sua deficiência uma vez que não sintetizam a enzima *L-gulono-gamma-lactona* oxidase, tornando este ácido um nutriente essencial ao organismo (EMADI-KONJIN *et al.*, 2005).

Em meio fisiológico, encontra-se predominantemente na forma de monoânion ascorbato, o qual é rapidamente oxidado à ascorbila e deidroascorbato e depletado em fluidos biológicos extracelulares (**Figura 4**) (KARLSEN; BLOMHOFF; GUNDERSEN, 2005)

Figura 4 - Oxidação do ácido ascórbico. Modificado de Cerqueira; Medeiros; Augusto (2007).

O radical ascorbila, entretanto, é relativamente não reativo, quando comparado a outros radicais livres, contribuindo para eliminar espécies altamente reativas e formar um radical de reatividade baixa (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007).

O ácido ascórbico possui complexos efeitos multifuncionais, podendo agir como antioxidante, pró-oxidante e quelante de metais, agente redutor ou como sequestrante de oxigênio. Em meio aquoso, age como antioxidante em concentrações relativamente altas (aproximadamente 1 mM), porém pode agir como pró-oxidante a baixas concentrações (aproximadamente 0,01 mM), especialmente na presença de íons metálicos. Além disso, o ácido ascórbico atua como um eficiente agente redutor, uma vez que regenera outros antioxidantes, aumentando sua efetividade (FRANKEL, 2005).

2.2.3 Carotenóides

Carotenóides são isoprenóides (Figura 5), geralmente constituídos por oito unidades de isoprenos, formando uma longa cadeia de polieno que pode conter de 2 a 15 duplas ligações conjugadas, o que permite muitas configurações cis e trans. São amplamente distribuídos na natureza, sintetizados exclusivamente em plantas e responsáveis pela coloração de frutas e hortaliças (FRASER; BRAMLEY, 2004).

Figura 5 - Estrutura química do β -caroteno. Modificado de Halliwell; Gutteridge (1999).

Atualmente, existem cerca de 600 carotenóides identificados, porém somente 20 dos encontrados em tecidos humanos são provenientes da dieta. Entre estes, os

principais são os hidrocarbonetos, licopeno e β -caroteno e as xantofilas, astaxantina, cantaxantina, luteína e zeaxantina (WILLCOX; CURB; RODRIGUEZ, 2008).

As suas propriedades antioxidantes são determinadas principalmente pela sua estrutura molecular, uma vez que possui um sistema de duplas ligações conjugadas, o que torna possível a captação de radicais livres, por meio da transferência de elétrons, abstração de hidrogênio ou adição de uma espécie radicalar, bem como por meio da transferência de energia (no caso do oxigênio singlet) (YOUNG; LOWE, 2001).

Geralmente os radicais carotenóides, assim como os radicais tocoferila e ascorbila, são estabilizados por ressonância, sendo, portanto, pouco reativos (FRASER; BRAMLEY, 2004).

2.2.4 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são encontrados principalmente em frutas como *cranberries* e *blueberries*, vegetais, óleo de oliva, soja, chás e vinho tinto. São reconhecidos pela sua alta atividade antioxidante, sendo os mais comuns os flavonóides. Estes apresentam várias subclasses de moléculas, tais como flavonóis, flavonas, flavononas e isoflavonas, conforme se observa na **Figura 6** (LAPOINTE; COUILARD; LEMIEUX, 2006).

Figura 6 - Estrutura química de algumas subclasse de flavonóides. Modificado de Halliwell; Gutteridge (1999)

Alguns mecanismos têm sido propostos para explicar a ação antioxidante dos compostos fenólicos: interrupção da reação em cadeia da peroxidação lipídica, por meio da sua reação com algumas espécies radicalares; reação com metais pró-oxidantes, tais como ferro e cobre, que são conhecidos por favorecer a formação dos radicais livres; supressão da peroxidação lipídica pela reciclagem de outros antioxidantes como o tocoferol e a preservação da atividade da paraoxonase associada a HDL (*High Density Lipoprotein*), a qual é capaz de proteger a LDL contra a oxidação (KALIORA; DEDOUSSIS; SCHMIDT, 2006).

2.3 O estresse oxidativo e as doenças cardiovasculares (DCV)

As doenças cardiovasculares são as principais causas de morte nos países ocidentais e representam cerca de 41% de todas as causas de mortes na Europa.

As principais formas de DCV são: angina, infarte do miocárdio, AVC (acidente vascular cerebral) e aterosclerose (WORLD HEALTH REPORT, 2004). Considerando sua multicausalidade, alguns dos fatores de risco para as DCV são obesidade, sedentarismo, hipertensão arterial e tabagismo. As lesões que acompanham essa doença estão associadas à aterosclerose (TAPIERO; TOWNSEND; TEW, 2004).

A aterosclerose consiste em lesões focais da íntima arterial, caracterizadas pela deposição de colesterol, fibrose e inflamação. As lesões ateroscleróticas precoces, denominadas estrias gordurosas, consistem em depósitos de macrófagos contendo lipídios e linfócitos T na região subendotelial (CHOY *et al.*, 2004). As lesões avançadas são caracterizadas pela presença de uma “capa” fibrosa (**Figura 7**) de tecido conectivo e células musculares lisas, estando frequentemente associadas à calcificação (COSTOPOULOS; LIEW; BENNETT, 2008).

Figura 7 - Progressão da aterosclerose. Modificada de Duque (1998).

Na maioria dos casos, a formação da placa está associada a uma disfunção endotelial caracterizada pela ativação de moléculas de adesão e prejuízos na

vasodilatação e nas propriedades anticoagulantes (COSTOPOULOS; LIEW, BENNETT, 2008).

Essas alterações vasculares podem resultar da interação de vários fatores, incluindo anormalidades metabólicas e nutricionais, como hiperlipidemia, forças mecânicas associadas com diabetes mellitus, lípidos ou proteínas modificadas oxidativamente, ou seja, o estresse oxidativo (CHOY *et al.*, 2004). O estresse oxidativo é considerado um potente fator de risco para DCV, uma vez que as ERO são constantemente produzidas nas células endoteliais, apresentando função central no desenvolvimento e na ruptura das placas ateroscleróticas (SIEKMEIER; STEFFEN; MÄRZ, 2007).

Uma hipótese corrente sugere que fatores de risco envolvidos na patogênese da aterosclerose seriam capazes de modular a expressão de genes relacionados à resposta inflamatória vascular por meio da sinalização redox, uma vez que podem estimular ou sensibilizar células vasculares, através da formação de ERO. Essas ERO e/ou moléculas modificadas pelas mesmas, como a LDL (*Low Density Lipoprotein*) oxidada, servem como segundo mensageiro acoplado a moléculas que transmitem esses sinais extracelulares, aumentando a expressão de genes aterogênicos, tais como os das moléculas de adesão e outros genes inflamatórios vasculares (CIPOLLONE; FAZIA; MEZZETTI, 2007).

Vários estudos têm demonstrado que a LDL₍₋₎ tem forte efeito aterogênico, comparado à LDL normal, e possui função relevante na patogênese da aterosclerose. Em resumo, a LDL₍₋₎ é fagocitada pelos macrófagos, formando as células espumosas. Elas também estimulam a expressão de genes envolvidos com a síntese de moléculas de adesão celular, de fatores de crescimento e citocinas,

bem como a proliferação, migração e hipertrofia das células (SIEKMEIER; STEFFEN; MÄRZ, 2007) (**Figura 8**).

A expressão induzida desses genes promove a infiltração de monócitos na parede dos vasos, provocando um sinal pró-inflamatório adicional. Logo, o *feedback* positivo serviria para potencializar a resposta inflamatória local e a disfunção de células endoteliais (CIPOLLONE; FAZIA; MEZZETTI, 2007).

Figura 8 - Relação entre formação de ERO, disfunção endotelial e placa de ateroma. Modificado de Siekmeier *et al.* (2007).

Além disso, as ERO são capazes de inativar a molécula após sua síntese e liberação, contribuindo, assim, para a disfunção endotelial. Portanto, a disfunção endotelial pode ser caracterizada pelo aumento da expressão de moléculas de adesão celular, de citocinas, de fatores de crescimento, de variações na síntese de metabólitos de ácido araquidônico e prostaciclina e de variações na síntese do NO,

sendo o principal fator envolvido no desenvolvimento da aterosclerose (SIEKMEIER; STEFFEN; MÄRZ, 2007).

Dessa forma, muitas das doenças cardiovasculares são consequência do processo aterosclerótico que se inicia por meio de lesões na íntima das artérias. Além disso, sabe-se que um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da aterosclerose é a oxidação de lipídios e de proteínas presentes na LDL. Logo, supõe-se que quanto maior for a susceptibilidade do organismo à oxidação, maior será o volume de lesões arteriais e o risco de desenvolver as diferentes formas de doenças cardiovasculares.

2.4 Influência das estatinas sobre o estresse oxidativo e as doenças cardiovasculares

Segundo Sposito *et al.* (2007), na hipercolesterolemia isolada, os medicamentos recomendados são as estatinas (sinvastatina, atorvastatina, fluvastatina, lovastatina e pravastatina) que podem ser administradas em associação à ezetimiba, colestiramina e eventualmente a fibratos e ao ácido nicotínico. As estatinas são inibidores da HMG-CoA redutase, uma das enzimas-chave na síntese intracelular do colesterol (**Figura 9**). Como consequência da ação das estatinas, há aumento do número de receptores de LDL nos hepatócitos, que irão remover da circulação mais VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*), IDL (*Intermediary Density Lipoprotein*) e LDL para repor o colesterol intracelular, contribuindo para a redução do colesterol circulante.

Figura 09 - Ação da estatinas no controle do colesterol sérico – Modificado de Liao (2005)

Portanto, as estatinas são potentes inibidores da biossíntese do colesterol e exercem efeitos benéficos na prevenção primária e secundária das doenças arteriais coronarianas. Além disso, estudos recentes indicam que as estatinas podem exercer efeitos não dependentes da redução do colesterol, conhecidos por efeitos pleiotrópicos. Entre esses, destacam-se a restauração da função endotelial, o

aumento da estabilidade das placas ateroscleróticas e o decréscimo do estresse oxidativo e da inflamação vascular (LIAO, 2005).

Esses efeitos são decorrentes da alteração ou inibição da prenilação de pequenas proteínas G (Rho, Rab, Rac, Ral e Rap) que se ligam a compostos isoprenóides (farnesil pirofosfato e geranylgeranyl pirofosfato) formados durante a síntese do colesterol. Essas proteínas estão intimamente envolvidas na regulação da sinalização celular, podendo causar forte impacto na fisiologia de múltiplos tipos de tecidos, conforme ilustra a **Figura 10**. Portanto, a alteração ou inibição da prenilação desses segundos mensageiros pode afetar a expressão e a atividade de receptores parácrinos e moléculas sinalizadoras envolvidas no remodelamento vascular e na vasomotilidade, contribuindo para a redução da pressão arterial em virtude da menor vasoconstrição (ITO; TALBERT; TSIMIKAS, 2006).

As estatinas também podem exercer efeitos antioxidantes, contribuindo, dessa forma, para a melhoria da função endotelial. Rikitake *et al.* (2001), em um estudo com aortas de coelhos alimentados com colesterol, observaram que as estatinas foram capazes de inibir a produção de espécies reativas de oxigênio, tais como o ânion superóxido e os radicais hidroxila, favorecendo o relaxamento dependente do endotélio. Além disso, estudos realizados com cultura de tecidos *in vitro* demonstraram que as estatinas são capazes de reduzir a geração de ERO, independentemente da redução do colesterol (SUMI *et al.*, 2001).

Figura 10 - Efeitos pleiotrópicos das estatinas – Modificado de Liao (2005). AT1: angiotensina 1; ET-1: endotelina 1; hs-CRP: Proteína C reativa; MMP: metaloproteinases; NO: óxido nítrico; PAI-1: inibidor do ativador de plasminogênio 1; ERO: espécies reativas de oxigênio; SMC: célula muscular lisa; TF: fator tecidual; t-PA: ativador de plasminogênio tecidual; TXA₂: tromboxano A₂; Rac1 e RhoA: Pequenas proteínas G.

Portanto, os efeitos das estatinas estão além da redução da síntese do colesterol, uma vez que estas têm apresentado efeitos de suma relevância para a redução do estresse oxidativo, fator agravante para os indivíduos que já apresentaram dislipidemia.

2.5 Influência da dieta sobre o estresse oxidativo e as doenças cardiovasculares

A importância da adoção de hábitos dietéticos saudáveis é bem reconhecida como forma de redução do risco das DCV. Atualmente, observa-se aumento crescente no número de publicações nos quais se investiga o efeito da suplementação de nutrientes isolados, como ácidos graxos, pigmentos e outros, sobre o estresse oxidativo (COUILLARD *et al.*, 2006).

Sabe-se que dietas com baixa proporção de gorduras são geralmente recomendadas para o decréscimo dos níveis de LDL e de colesterol total. Entretanto, esse tipo de dieta pode levar também ao aumento da concentração de triglicérides em determinadas circunstâncias, uma vez que a redução de gordura geralmente está associada ao aumento da proporção de carboidratos. Além disso, o aumento do consumo de ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados pode promover efeitos benéficos, incluindo os efeitos antiinflamatórios no endotélio (COUILLARD *et al.*, 2006).

Outro composto que se apresenta associado à redução do risco das DCV é o licopeno. Este mostrou reduzir significativamente os níveis de LDL₍₋₎ em indivíduos que consumiam 126 g de molho para espaguete (39,2 mg de licopeno), 540 mL de suco de tomate (50,4 mg de licopeno) ou 74,58 mg de licopeno em cápsulas (75 mg de licopeno) por uma semana com uma semana de *washout* entre cada tratamento (AGARWAL; RAO, 1998).

Outros exemplos de efeitos de determinados nutrientes sobre o estresse oxidativo, analisados em modelos humanos e animais, encontram-se descritos no **Quadro 2**.

Portanto, percebe-se que inúmeras são as pesquisas que tratam do efeito de um nutriente isolado sobre o estresse oxidativo e raros são os que fazem associações multivariadas entre o hábito alimentar da população e tais biomarcadores, ainda que, em geral, a composição da dieta seja mais importante que a ingestão de um nutriente isolado.

Diante disso, é importante ressaltar que para se entender e se obter resultados fidedignos a respeito da suplementação é necessário primeiramente conhecer a influência dos alimentos que compõe a dieta do indivíduo sobre os parâmetros que caracterizam o estresse oxidativo, para então compreender a influência de um composto isolado e a sua interação com os alimentos presentes nessa dieta. Por exemplo, a variação de determinado biomarcador do estresse oxidativo pode ser consequência de mudanças no hábito alimentar e não de determinada suplementação. Além disso, em virtude de fatores genéticos, os indivíduos podem apresentar respostas diferentes, ou até mesmo opostas, a determinados componentes da dieta (DIEHR; BERESFORD, 2003).

Quadro 2 – Exemplos de alguns estudos que investigaram a ação pró-oxidante e/ou antioxidante de compostos bioativos presentes nos alimentos.

Fonte dietética	Composto bioativo	Ação antioxidante	Ação pró-oxidante	Sem efeito
Resveratrol	Kaindl et al. (2008) Modelo: células colorretais Dose: 10 μ M resveratrol Resultado: preveniu formação de hidroperóxido lipídico	Rocha et al. (2009) Modelo: animal Dose: dieta padrão + 6 mg/L de resveratrol Resultados: redução da defesa antioxidante e aumento dos hidroperóxidos lipídicos no fígado	Blackhurst; Marais (2006) Modelo: humano Dose: 0,35 g de álcool/Kg Resultados: não houve mudança significativa nos níveis de hidroperóxidos, <i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i> (ORAC) e <i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i> (TBARS)
Carotenóides	Vaisman et al. (2006) Modelo: humano Dose: 1,29 mg de β -caroteno/1.500 kcal Resultados: aumento dos níveis de carotenóides e redução do fator nuclear κ B (NF κ B)	Helden et al. (2009) Modelo: neutrófilos de indivíduos saudáveis Dose: 5 μ M Resultados: inibição da mieloperoxidase e aumento da oxidação de purinas	Carrapeiro et al. (2007) Modelo: animal Dose: 5 e 500 mg/kg de dieta Resultados: não houve diferença significativa nos níveis de TBARS dos grupos com e sem suplementação de licopeno.
Ferro	Domitrović; Tota; Milin (2008) Modelo: animal Dose: 1% do peso Resultados: aumento do retinol e do tocoferol no fígado	Domitrović; Tota; Milin (2008) Modelo: animal Dose: 1% do peso Resultados: aumento do TBARS e redução do retinol e do tocoferol sérico.	Colpo et al. (2008) Modelo: humanos Dose: 150 mg Resultados: não houve alteração nos seguintes parâmetros: NPSH, oxidação do DCHF, ALA-D, GSHPx
Vitamina C	Sasazuki et al. (2008) Modelo: humano Dose: 50 ou 500 mg Resultados: redução da produção de ERO	Childs et al. (2001): n= 14 Dose: 12,5 mg/kg de peso corpóreo Resultados: redução hidroperóxidos e 8-Iso-PGF2 α	Cholewa et al. (2008) Modelo: humano Dose: 240 mg/dia Resultados: nenhum efeito sobre a atividade antioxidante e níveis de malondialdeído (MDA)

Isoflavonas	<p>Jiang et al. (2007) Modelo: células musculares esqueléticas Dose: 12,5 a 100µM Resultados: aumento da atividade da superóxido dismutase e glutathione peroxidase</p>		<p>Hsu et al. (2003) Modelo: animal Dose: 240 – 1.920 mg/100 g de dieta Resultados: nenhuma mudança significativa nos níveis de triglicerídeos, LDL, MDA, glutathione peroxidase e superóxido dismutase</p>
Ômega- 3	<p>Nyby et al. (2005) Modelo: animal Dose: ratos receberam três dietas: 1) dieta regular (controle); 2) dieta contendo 60% frutose (FFR); ou 3) dieta contendo 60% frutose e 4.4% óleo de peixe (FFR-FO) Resultados: prevenção de hiperlipidemia e redução de 8-isoprostanos, peróxido de hidrogênio</p>	<p>Oarada et al. (2008) Modelo: animal Dose: 5 a 15% Resultados: aumento de TBARS e da expressão de moléculas de adesão</p>	<p>Carrapeiro et al. (2007) Modelo: animal Dose: óleo de peixe 8% contendo 2% EPA e 1% DHA Resultados: não houve aumento da oxidação medida por TBARS em homogenato de cérebro</p>
Ácido graxo oléico	<p>Acín et al. (2007) Modelo: animal Dose: 10% de ácido oléico Resultados: redução da progressão da aterosclerose, dos níveis de TG e de isoprostanos</p>	<p>Fuhrman; Volkova; Aviram (2006) Modelo: animal Dose: 500µg/300µL de tampão fosfato Resultados: aumento de TG e da susceptibilidade do soro à oxidação</p>	<p>Eder et al. (2006) Modelo: animal Dose: 169 g de óleo de oliva Resultados: não exerceu efeito protetor significativo sobre o dano oxidativo do DNA medido por 8-oxo-DG.</p>
Catequinas	<p>Panza et al. (2008) Modelo: humano Dose: 2g da folha da C. Sinensis/200mL de água (chá verde) Resultados: aumento dos polifenóis, <i>Ferric reducing power assay (FRAP)</i></p>	<p>Galati et al. (2006) Modelo: hepatócitos de ratos. Dose: 30µL da solução de compostos fenólicos/10mL de suspensão de hepatócitos Resultados: aumento da produção induzida de ERO</p>	<p>Willcox et al. (2003) Modelo: animal Dose: 0,5% de quercetina adicionada à ração Resultados: não reduziu significativamente os níveis de F2-isoprostanos plasmáticos e do tecido cardíaco.</p>

Portanto, percebe-se que é de grande importância a realização de estudos com objetivo de caracterizar o hábito alimentar da população, a fim de se identificar os principais nutrientes que se encontram associados com biomarcadores do estresse oxidativo, de forma a se obter informações relevantes para estudos posteriores, que utilizem algum tipo de suplementação ou intervenção alimentar.

Com esse propósito, alguns pesquisadores têm buscado agrupar indivíduos que tenham ingestão similar de nutrientes. Esses estudos têm examinado associações dos grupos com fatores dietéticos, demográficos e medidas de saúde (DIEHR; BERESFORD, 2003). Porém, até o momento, não é do nosso conhecimento a existência de estudos que examinaram a variação dos biomarcadores em função de fatores socioeconômicos e culturais, do padrão dietético e das suas modificações ao longo de um curto período de tempo por meio de técnicas estatísticas multivariadas, permitindo, assim, agrupar os indivíduos de acordo com o seu nível de estresse oxidativo.

Diante do exposto, percebe-se que o estresse oxidativo está diretamente associado ao desenvolvimento das doenças cardiovasculares e pode ser acelerado ou retardado nos indivíduos em função dos nutrientes presentes na dieta. Nutrientes ingeridos por meio dos alimentos ou de suplementos podem apresentar ação pró ou antioxidante no organismo. Tratando-se de um sistema altamente complexo, pouco se sabe sobre a influência desses nutrientes na variação de biomarcadores oxidativos em populações com maior risco cardiovascular, como pacientes que fazem o uso de medicamentos para o controle da dislipidemia.

2.6 Métodos de avaliação do estresse oxidativo e da capacidade antioxidante *in vivo* e suas limitações

As ERO possuem meia-vida extremamente curta, o que as torna difíceis de serem detectadas nos estudos experimentais. Com a finalidade de superar essa dificuldade, muitos métodos baseiam-se na detecção de produtos formados a partir da ação das ERO em substratos específicos. Os hidroperóxidos são um dos produtos formados durante a peroxidação de lipídios insaturados, como ácidos graxos e colesterol. Esses hidroperóxidos sofrem degradação, originando outros compostos, como ácidos carboxílicos e aldeídos (HALIWELL; GUTERIDGE, 1999).

Entre os métodos disponíveis para a quantificação dos produtos da lipoperoxidação, destaca-se o *TBARS* (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*), que baseia-se na reação do malondialdeído, formado pela degradação dos hidroperóxidos, com o ácido tiobarbitúrico. O método *TBARS*, apesar de ser altamente criticado pela sua falta de especificidade, é simples, sensível, de baixo custo e apresenta boa correlação com métodos mais específicos, sendo, por isso, um dos mais utilizados para estudos de oxidação lipídica. Resultados mais específicos têm sido reportados por autores que determinam a concentração de TBARS ou mesmo de MDA nas amostras por meio do HPLC (*High-performance liquid chromatography*) em substituição à espectrofotometria (KAPPUS, 1985, LYKKESFELDT, 2007).

Outro método utilizado para avaliar a oxidação de lipídios é a detecção de LDL oxidada (LDL₍₋₎) por elisa sanduíche (FAULIN *et al.*, 2008). Sabe-se que a presença de LDL₍₋₎ na íntima dos vasos pode promover uma resposta imune de células endoteliais vasculares, as quais respondem com a produção de moléculas

de adesão como a ICAM (*intercellular adhesion molecule-1*), a VCAM (*circulating vascular cell adhesion molecule-1*) e a E-selectina, facilitando o recrutamento de monócitos circulantes e a formação de células espumosas, sendo, portanto, recomendável a utilização desse método como forma de se avaliar o estresse oxidativo (COUILLARD *et al.*, 2006).

Em relação à dosagem da capacidade antioxidante total, a literatura apresenta várias metodologias, entre elas, o ORAC. Nessa metodologia, o AAPH gera radicais centrados no carbono, que reagem com o oxigênio, formando o radical peroxila ($\text{ROO}^{\cdot}$). Este pode reagir com a fluoresceína ou diretamente com os antioxidantes presentes na amostra analisada. Quando o antioxidante reage com o radical peroxila ou com o radical fluoresceinil, regenerando a fluoresceína, este preserva a fluorescência medida a 485 nm de excitação e 525nm de emissão. Isso persiste até o antioxidante ser completamente consumido e a partir desse ponto a fluoresceína passa a ser rapidamente oxidada, levando ao decaimento da fluorescência (THAIPONG *et al.*, 2006, BISBY; BROOKE; NAVARATNAM, 2008).

Outros métodos amplamente utilizados para se avaliar a capacidade antioxidante são o FRAP (*Ferric reducing power assay*) e o DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). O FRAP baseia-se na habilidade dos antioxidantes presentes no plasma em reduzir Fe^{3+} para Fe^{+2} , produzindo uma coloração azul intensa que é quantificada espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 593 nm (BENZIE; STRAIN, 1996; CHUNG *et al.*, 2001). O DPPH é um radical livre estável que, quando misturado com substâncias que podem doar um átomo de hidrogênio, como os antioxidantes presentes no plasma e/ou no soro, sofre redução e perde sua coloração violeta (MARTINEZ *et al.*, 2006).

Outra forma de avaliar o estresse oxidativo é a quantificação de substâncias antioxidantes, como o α -tocoferol, os carotenóides e o ácido ascórbico. Essas medidas permitem avaliar a resposta do organismo ao estresse, uma vez que esses compostos são antioxidantes responsáveis pela detoxificação dos radicais livres antes que eles causem lesões (WILLCOX; CURB; RODRIGUEZ, 2008). Desta forma, a menor proporção desses compostos na sua forma reduzida sugere possível aumento no estresse oxidativo.

Além dos métodos citados acima, outros largamente usados para medir o estresse oxidativo são os F₂-isoprostanos e os produtos da peroxidação protéica, dentre outros. O **Quadro 3** caracteriza alguns dos métodos utilizados para mensurar o estresse oxidativo no plasma.

Quadro 3 – Métodos de avaliação do estresse oxidativo em humanos (plasma)

Método	Princípio	Comentário	Referência
Plasma TAOS/TAS	Medida da inibição de um processo oxidativo <i>in vitro</i> pelo plasma	Tecnicamente simples, provê a medida de capacidade antioxidante total.	STHEPENS; KHANOLKAR; BAIN, 2009
F ₂ -isoprostanos	Produto da oxidação de fosfolipídios contendo ácido araquidônico mediada por radicais livres	Extremamente específico. Alguns autores o consideram forte candidato a padrão ouro para se analisar a peroxidação lipídica <i>ex vivo</i> . Entretanto, é tecnicamente complexo por requerer espectroscopia de massa.	STHEPENS; KHANOLKAR; BAIN, 2009
Peroxídeos lipídicos	Peroxidação de produtos lipídicos. Esses são frequentemente instáveis.	Requer HPLC ou GC-MS	STHEPENS; KHANOLKAR; BAIN, 2009
TBARS/MDA	Malondialdeído, um produto da peroxidação lipídica que se liga ao ácido tiobarbitúrico resultando em um cromógeno que é medido por fluorescência ou absorbância	Largamente utilizado e tecnicamente simples. A especificidade pode ser aumentada por HPLC.	STHEPENS; KHANOLKAR; BAIN, 2009
Biomarcadores de peroxidação protéica	8-hidroxideoxiguanosina (8-ohdG) gerada a partir da oxidação do DNA	Medida por HPLC. Kits comerciais recentemente desenvolvidos	STHEPENS; KHANOLKAR; BAIN, 2009
Atividade e expressão gênica de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase)	Enzimas antioxidantes localizadas em organelas subcelulares ou no citosol de células eucariotas que previnem ou combatem a formação descontrolada de radicais livres	É usualmente medida por métodos indiretos	SOMOGY <i>et al.</i> (2007)

Portanto, percebe-se que não existe nenhum método direto para medidas de ERO intracelular, uma vez que, comparados a outros metabólitos biológicos, as ERO intracelulares são altamente reativas e, por isso, possuem tempo de vida extremamente curto (CASH; PAN; SIMON, 2007). Logo, os métodos existentes mensuram, na realidade, compostos formados a partir da ação das ERO ou os efeitos das mesmas, o que dificulta em certas circunstâncias a caracterização do estresse oxidativo. Dessa forma, na ausência de consenso científico, os pesquisadores têm adotado várias metodologias para diagnosticar o estresse oxidativo em seus estudos.

2.7 Análises estatísticas multivariadas – Análise em componentes principais e análise de agrupamento

Estudos que envolvem uma série de determinações realizadas em um mesmo indivíduo são frequentes na bioquímica clínica. Muitas vezes a obtenção e a análise de diferentes biomarcadores são etapas necessárias para se estabelecer um diagnóstico preciso. No caso das doenças cardiovasculares, é cada vez mais comum que vários parâmetros clínicos, antropométricos, dietéticos, genéticos e socioculturais sejam considerados na avaliação de risco. Porém, o tratamento univariado dos dados permite apenas que cada aspecto seja interpretado isoladamente, dificultando uma visão mais ampla das possíveis interações.

A estatística multivariada compreende um conjunto de técnicas descritivas que permite avaliar associações entre vários parâmetros determinados em um mesmo indivíduo, considerando-se todos ao mesmo tempo e com a mesma importância. As principais técnicas multivariadas empregadas em estudos clínicos têm sido a Análise em Componentes Principais (PCA), de correspondência, fatorial, discriminante, de agrupamento (*cluster*) e de escalonamento multidimensional, com objetivo de simplificação, classificação, agrupamento, investigação de dependência múltipla, predição e construção de hipóteses. A principal diferença entre esses métodos baseia-se no tipo de variável que está sendo tratada (contínua, categórica) e na métrica usada no cálculo das distâncias ou dissimilaridades.

Uma das principais aplicações da estatística multivariada nos estudos clínicos refere-se à possibilidade de agrupamento de indivíduos ou pacientes de acordo com vários critérios simultaneamente. Isto é, vários parâmetros são determinados em cada indivíduo e, através, por exemplo, da Análise de Agrupamento, pode-se

agrupar esses indivíduos de acordo com suas similaridades e diferenças avaliadas em todos esses parâmetros. Isto é possível porque a unidade na qual cada medida é obtida (mg/dL, anos, kg, mmol/L, etc) é previamente re-escalada, assumindo todas a mesma dimensão.

Dessa forma, é possível coletar os diferentes dados de uma população (em diferentes unidades) e então separar os indivíduos dessa população em grupos, seguindo critérios geométricos de posicionamento. Porém, apenas as técnicas de agrupamento não permitem identificar a razão pelo qual os indivíduos foram separados dessa forma. Para alcançar essa resposta, assim como para permitir a visualização dos grupos num espaço p -dimensional, é comum a aplicação de outras técnicas multivariadas, como a PCA, quando tratam-se de variáveis contínuas.

Nesse caso, a PCA permite que o número original de variáveis seja reduzido a um número menor de “novas variáveis”, conhecidas como “componentes”, através da correlação ou covariância entre elas. Assim, os indivíduos poderão ser posicionados num gráfico p -dimensional, de acordo com a contribuição de cada um para a variação daquele eixo específico. Em termos de visualização e interpretação é comum adotar-se $p \leq 3$.

Em resumo, partindo-se das variáveis originais (ex: peso em kg, colesterol em mg/dL, idade em anos, etc) obtidas em cada indivíduo, aplica-se a PCA nas variáveis padronizadas, para gerar a distribuição desses indivíduos em um gráfico, em geral bidimensional, no qual cada eixo representa um novo conjunto de variáveis correlacionadas. Desta forma, pode-se interpretar que cada quadrante do gráfico bidimensional apresenta um conjunto de características diferentes do outro. A seguir, pode-se aplicar a análise de agrupamento para identificar quais indivíduos

podem ser alocados em cada grupo e, então, com a PCA, identificar porque eles foram separados dessa forma.

Portanto, o uso dessas técnicas torna-se fundamental quando não se pode assumir que uma variável seja mais importante do que outra na obtenção de um determinado diagnóstico. Considerando que o presente estudo trata especificamente de um diagnóstico de estresse oxidativo, no qual os métodos são indiretos e limitados, a estatística multivariada parece ser uma excelente ferramenta para reduzir a subjetividade adotada na interpretação dos resultados nesse tipo de estudo clínico. Entretanto, é preciso ter em evidência que o sucesso na interpretação dos resultados irá depender tanto do tratamento estatístico correto, quanto da seleção das variáveis originais. Portanto, fica claro que esse tipo de pesquisa integrada (bioquímica clínica e estatística) deve ser sempre realizada com profundo conhecimento científico nas duas áreas.

3 OBJETIVOS

O objetivo desta pesquisa foi de agrupar os indivíduos de acordo com o nível de estresse oxidativo determinado através de quatro biomarcadores, identificando as características relativas ao padrão dietético, perfil de ácidos graxos plasmáticos e perfil de lipoproteínas associados a cada grupo.

Neste estudo os indivíduos foram agrupados de acordo com os valores obtidos por quatro biomarcadores de estresse oxidativo avaliados no plasma e no soro: LDL(-), MDA e atividade antioxidante total (medida por FRAP e DPPH). Por meio desse estudo, avaliamos as seguintes hipóteses:

H₁: os indivíduos agrupados de acordo com o nível de estresse oxidativo apresentam diferenças quanto à ingestão dietética.

H₂: os indivíduos agrupados de acordo com o nível de estresse oxidativo apresentam diferenças quanto ao perfil de ácidos graxos plasmáticos.

H₃: os indivíduos agrupados de acordo com o nível de estresse oxidativo apresentam diferenças quanto ao perfil de lipoproteínas plasmáticas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Reagentes

Foram utilizados os seguintes reagentes e/ou soluções: TPTZ (2,4,6 –tris (2-pyridil)-1,3,5-triazine)(*Sigma*, cód:T1253), $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (*Vetec*, cód 342), DPPH (*Sigma*, cód D9132), MDA(*Fluka*, cód: 63287), metanol grau HPLC (*Merck*, Germany), acetonitrila grau HPLC (*Merck*, Germany), ácido fosfórico (*Synth*, cód: A1035.01.BJ), ácido tiobarbitúrico – TBA (*Sigma*, cod:T5500), tween20 (*Synth*, cód: T1028.02. BI), PMSF (Phenylmethylsulfonylfluoride) (*Sigma*, cód: P7626), benzamidina (*Sigma*, cód: B6506), aprotinina (*Sigma*, cód: A1153), fosfato de potássio monobásico (*Sigma*, cód: P5379), estreptavidina ligada à peroxidase (*Invitrogen Corp.*, Carlsbad, CA, USA), OPD (ortofenilenodiamina) (*Sigma*, cód: P3804TAB), clorofórmio (*Synth*, cód: C106201BJ). Todos os demais reagentes foram de grau analítico.

4.2 Casuística

O estudo foi realizado com pacientes do Ambulatório de Dislipidemia do Instituto de Cardiologia Dante Pazzanese (ICDP). Para compor a amostra, utilizou-se um banco de dados com 1.056 pacientes do ICDP e realizou-se também o recrutamento no local das consultas (**Figura 11**).

Figura 11 - Número de indivíduos recrutados no estudo.

Os critérios de inclusão utilizados para seleção dos pacientes foram: possuir vínculo com o ICDP, concordar com o termo de consentimento livre e esclarecido, ter idade compreendida entre 30 e 80 anos, possuir índice de massa corporal (IMC) entre 18,5 e 29,9 kg/m². Além disso, o tratamento utilizado para a dislipidemia deveria ser à base de estatinas, sendo as mais comuns a sinvastatina e atorvastatina, cujas dosagens variaram entre 10 e 80 mg/dia.

No caso das mulheres, somente foram incluídas aquelas que na pós-menopausa não fizeram reposição hormonal. Alguns critérios de exclusão que também foram utilizados na seleção dos pacientes foram: possuir histórico de diabetes, doença renal e/ou cardiovascular.

O estudo foi realizado com 57 indivíduos, sendo 22 homens e 35 mulheres. Entrevistas e coleta de plasma foram realizadas duas vezes para cada indivíduo, no intervalo de 30 dias, com objetivo de avaliar a variação normal dessas medidas, uma vez que 30 dias foi considerado pela equipe como um período insuficiente para alteração nos hábitos alimentares e no estilo de vida. Para isso, os indivíduos foram orientados a manter a mesma dieta e rotina durante os 30 dias de intervalo adotado entre as duas coletas.

A pesquisa foi constituída de duas etapas: 1ª) entrevista e coleta de sangue e 2ª) determinações bioquímicas nas amostras de plasma e soro.

4.3 Metodologia

1ª ETAPA: entrevista e coleta de sangue

Dados socioeconômicos e dietéticos

Os dados socioeconômicos e culturais consistiram em perguntas diretas referentes ao consumo de bebida alcoólica, tabagismo, prática de exercícios físicos, uso de medicamentos, renda familiar e escolaridade (**Anexo 1**).

Para avaliação dietética foi utilizado o registro alimentar de três dias (sendo 2 dias da semana e um do final de semana), como método quantitativo da ingestão alimentar (**Anexo 2**). Esse método fornece informações como: o tipo de alimento ingerido, a quantidade em medidas caseiras e o horário da refeição, permitindo quantificar os nutrientes que são consumidos em três dias pré-determinados (CINTRA *et al.*, 1997, POLLARD *et al.*, 2003).

Para isso, foi utilizado o programa Nutri quanti®, que baseia-se em tabelas de composição de alimentos como a TACO, a USDA e a tabela da USP (www.nutriquanti.com.br). Para sua utilização, foi solicitada uma senha de acesso ao responsável pelo desenvolvimento do programa. O programa disponibiliza a quantidade de calorias, carboidratos, proteínas, lipídios totais, fibras, minerais, algumas vitaminas hidrossolúveis e lipossolúveis, ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados e colesterol em cada 100 gramas do alimento consumido. O registro alimentar de três dias foi realizado duas vezes para o mesmo indivíduo, no intervalo de 30 dias, totalizando seis registros por pessoa.

Avaliação antropométrica

Para a pesagem e aferição da estatura dos pacientes foi utilizada balança mecânica da Fillizola, seguindo a metodologia citada por Jelliffe (*apud* Franceschini, 1998). O IMC foi calculado e analisado segundo a WHO (2000) considerando-se a seguinte relação:

$$\text{IMC (kg/m}^2\text{)} = \text{peso / (altura)}^2$$

Para a aferição da circunferência da cintura e do quadril foi utilizada fita métrica inextensível, flexível e milimetrada, tomando-se sempre o cuidado para que não houvesse compressão dos tecidos e para que a fita não ficasse solta. As mensurações foram feitas seguindo o protocolo de Costa (2001). A partir dos parâmetros, circunferência da cintura (CC) e do quadril (CQ), foi estabelecido o indicador CC/CQ para determinação do tipo físico e, conseqüentemente, dos riscos para a saúde.

Coleta de sangue

A coleta de sangue foi realizada seguindo todos os cuidados de higiene e assepsia. O sangue foi coletado com seringas descartáveis e transferido para tubos Vacutainer (Becton Dickinson, NJ), contendo 1% de K₂EDTA para determinação dos biomarcadores do estresse oxidativo; tubos com 7,5 mg NaF + 15 mg Na₂EDTA para mensuração da glicose plasmática e tubos sem anticoagulante para obtenção do soro, seguido da centrifugação a 1.600 xg por 10 min, a 4°C (centrífuga HITACHI modelo CF-15R, Tokio, Japan). Após tal procedimento, soro e plasma foram transferidos para tubos tipo *ependorf* e imediatamente congelados sob nitrogênio líquido. Nas amostras de plasma destinadas à análise de LDL₍₋₎, foram adicionados 5µL/mL de um coquetel de antioxidantes [BHT (*Butylated hydroxytoluene*) 4 mM, PMSF (*Dhenylmethanesulfonylfluoride*) 200 mM, benzamidina 400 mM e aprotinina 40 µg/mL]. Todas as amostras foram transportadas do IDPC para o Laboratório de Bioquímica de Produtos Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP imersas em nitrogênio líquido, transferidas para ultrafreezer e mantidas a -80°C até o momento da análise.

A coleta de sangue foi realizada duas vezes no mesmo indivíduo em um intervalo de tempo de 30 dias, para posterior comparação e análise da variância dos biomarcadores e sua associação com a ingestão dietética apresentada pela população em estudo.

O procedimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (**Anexo 3**) e pelo Comitê de Ética do Instituto de Cardiologia Dante Pazzanese (**Anexo 4**), onde foram realizadas as coletas.

2ª ETAPA: determinações bioquímicas nas amostras de plasma e soro

Concentração de lipoproteínas e glicose

Concentrações de triacilgliceróis, colesterol total (CT), HDL, LDL, VLDL e glicose foram determinadas no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Métodos colorimétricos enzimáticos da Labtest Diagnostica SA (Lagoa Santa, MG) foram usados para a determinação do colesterol total sérico (Colesterol Liquiform, cat. 76, Enzimático-Trinder), fração HDL (Colesterol HDL, cat. 13, pela precipitação com ácido fosfotúngstico e cloreto de magnésio), triglicerídeos sérico (Triglicérides Liquiform, cat. 87, Enzimático-Trinder) e glicose plasmática (Glicose PAP Liquiform, cat 84, GOD-Trinder). O valor das leituras foi determinado por meio de um espectrofotômetro da Micronal B-380 (São Paulo). As concentrações de VLDL (lipoproteínas de densidade muito baixa) e LDL-colesterol foram estimadas a partir da fórmula de Friedwald (1972): $LDL = CT - (HDL - TG/5)$

Atividade redutora do plasma (FRAP)

A atividade redutora do plasma foi determinada de acordo com Benzie e Strain (1996). Em um tubo de ensaio misturaram-se 100µL de plasma em 3 mL de solução FRAP composta por $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 20 mmol/L, TPTZ (2,4,6 – tris (2-pyridyl)-1,3,5-triazine) 10 mmol/L e tampão acetato pH 3.6 (300 mmol/L), na proporção 1:1:10. Agitou-se no vórtex por aproximadamente 5 segundos e procedeu à leitura

no espectrofotômetro (UV-Mini 1240, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) na absorvância de 593 nm, após seis minutos.

Paralelamente, foi preparado um branco constituído de 100 µL de água milli-Q e 3 mL de solução FRAP. Uma amostra contendo 1.000 µmol/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ foi preparada e submetida aos mesmos procedimentos analíticos das amostras de plasma. O valor da absorvância dessa amostra de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ foi adotado como padrão.

A fórmula utilizada para o cálculo da atividade redutora do plasma está descrita a seguir, sendo que a concentração de FRAP padrão ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) é igual a 1.000 µmol/L.

$$\text{FRAP } (\mu\text{M}) = \frac{(\text{Abs amostra} - \text{Abs branco})}{(\text{Abs } \text{FeSO}_4 - \text{Abs branco})} \times [\text{FRAP padrão } (\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})]$$

Atividade antioxidante total no soro determinada pelo método DPPH

A capacidade antioxidante do soro foi mensurada espectrofotometricamente por meio do método descrito por Chrzczanowicz *et al.* (2008), com modificações. Neste, 100µL de soro foram misturados a 900 µL de metanol e centrifugados a 9.500 xg a 4°C por 10 minutos para realizar a desproteinização do soro. Após esse procedimento, 5 µL de solução de DPPH em metanol 10 mmol/L foram adicionados a 970 µL de metanol, incubados por 3 minutos à temperatura ambiente e submetidos a leitura da absorvância a 517nm. A seguir, 25 µL de soro desproteinizado foram adicionados a essa solução e incubados por 30 min à temperatura ambiente. Paralelamente, foi preparado um branco constituído de 25 µL

água milli-Q e 975 µL da solução de DPPH preparada, conforme descrito anteriormente.

A decomposição do radical DPPH por compostos antioxidantes presentes no soro promove a queda da absorbância a 517 nm, permitindo, assim, o cálculo da porcentagem de inibição do DPPH, de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ inibição do DPPH} = 1 - \left(\frac{\text{Absorbância da amostra } T_{30'}}{\text{Absorbância do branco } T_{30'}} \right) \times 100$$

ELISA para determinação de LDL₍₋₎

A oxidação da LDL presente nas amostras de plasma foi avaliada utilizando-se “Elisa sanduíche”, de acordo com Faulin *et al.* (2008). Microplacas com 96 poços (Costar, Corning Inc., NY, USA) foram preenchidas com 50 µL (0.5 µg/well) do anticorpo monoclonal anti-LDL₍₋₎ 1A3H2 em 0.05 M tampão carbonato-bicarbonato, pH 9.6 *overnight* a 4°C, para que ocorresse a aderência do anticorpo à placa. As placas foram lavadas três vezes com 200 µL PBS contendo 0,05% Tween 20 pH 7,4. Sítios ligantes livres foram bloqueados com 150 µL/poço de PBS contendo 2% de leite em pó desnatado, previamente inativado pelo aquecimento (100°C), e 0,01% Tween 20 por 1 ½ h a 37°C, seguida da lavagem das placas. Padrões ou plasma (1:2.000 a 1:10.000 diluídos em PBS contendo 1% leite desnatado e 0,01% Tween 20) foram adicionados (50 µL/poço) na placa e incubados por 1 ½ h a 37°C, a fim de que ocorresse a ligação da suposta LDL₍₋₎ presente no plasma com o anticorpo que aderiu à placa. A seguir, as placas foram lavadas e incubadas com o anticorpo

monoclonal conjugado à biotina anti-LDL₍₋₎ 2C7D5F10 (0,5 µg/well) por 1 h a 37°C, que se liga ao complexo anticorpo/antígeno formado. Após a lavagem, 50 µL/poço de estreptavidina conjugada à peroxidase (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) foram adicionadas e a placa foi incubada por 1 h a 37°C, para que ocorresse sua ligação com a biotina do anticorpo adicionado anteriormente. A reatividade da peroxidase foi medida após a lavagem das placas, pela incubação com 50 µl de OPD (*ortho-phenylenediamine*) diluído em tampão citrato-fosfato pH 5.3 (que possui peróxido de hidrogênio) a 37°C por 15 minutos. A reação foi finalizada pela adição de ácido sulfúrico 2,0 M; a absorbância a 492 nm foi medida por espectrofotometria, utilizando um leitor de microplaca (Spectra Count Microplate Photometer, Packard Instruments Company, Downers Grove, Illinois, USA).

Em cada placa analisada foi realizada uma curva de calibração com concentrações variando entre 0,625 e 20 µg/mL do padrão de LDL₍₋₎ extraído do plasma por FLPC (*Fast Protein Liquid Chromatography*). A partir dessa curva foi gerada uma equação da reta que permitiu realizar os cálculos da concentração da LDL₍₋₎. Os resultados foram expressos em U/L, sendo que 1 unidade representa 1 g/L de apolipoproteína B oxidada.

Malondialdeído – MDA/TBARS

A concentração de malondialdeído no plasma foi determinada por meio da sua separação pela cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), como descrito previamente por Cheng, Wu, Huang (2008), com modificações. Esta metodologia consistiu na derivatização do MDA com o ácido tiobarbitúrico, no qual 1 mol de MDA reage com 2 moles de TBA, em meio ácido, formando um aduto (TBA-MDA).

A derivatização foi realizada em tubos com tampa de rosca, nos quais para cada 50 μL de plasma foram adicionados 25 μL de BHT 1% em etanol, 250 μL de TBA 39,9 mM, 425 μL de água milli-Q e 750 μL de ácido fosfórico. A seguir, agitaram-se os tubos por 10 segundos no vórtex e os aqueceu em banho-maria a 100°C, por uma hora. Seguida à derivatização pelo calor, as amostras foram resfriadas em banho de gelo. Após, transferiram-se 500 μL para um *eppendorff*. Subsequentemente, foram adicionados 400 μL de metanol-HPLC e 100 μL de NaOH 1 M, para a extração do complexo MDA-TBA. Os *eppendorfs* foram centrifugados a 14.000 xg por 5 minutos, sendo o sobrenadante transferido para os respectivos *vials*.

A análise cromatográfica foi realizada em um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (Agilent Technologies 1200 series - Santa Clara, USA) conectado a um computador. O conjugado MDA-TBA (20 μL) foi injetado em uma coluna analítica de fase reversa Phenomenex C18 (250 mm x 4.6 mm; 5 mm – Phenomenex, Torrance, USA) com pré-coluna LC8-D8 (Phenomenex AJ0-1287 – Torrance, USA) e quantificado fluoremetricamente a uma excitação de 515 nm e emissão de 543 nm. A taxa de fluxo da bomba foi 1,0 mL/ min com fase móvel constituída de 60% tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6.0 e 40 % metanol.

Foi preparada uma curva de calibração utilizando malondialdeído (MDA) (Fluka 63287) nas concentrações 0,5 a 5,0 μmol . A partir da equação da reta gerada por essa curva, foi realizado o cálculo da concentração de MDA nas amostras de plasma.

A cada corrida feita no HPLC foi preparado o branco com água milli-Q e um controle externo constituído pelo MDA (Fluka 63287), na concentração de 5 μmol .

Perfil de ácidos graxos no plasma

A fração lipídica foi extraída do plasma de acordo com Folch, Lees e Sloang Stanley (1957). A técnica baseia-se na homogeneização de 1 mL do plasma com 10 mL de metanol durante 2 minutos. Em seguida, foram adicionados 20 mL de clorofórmio, sendo a mistura homogeneizada por mais 5 minutos. A mistura foi então filtrada em funil de Buckner, sendo o filtrado coletado em quitassato e o resíduo lavado com 30 mL de clorofórmio/metanol (2:1). O filtrado recolhido foi transferido para uma proveta de 100 mL com tampa esmerilhada e o seu volume aferido para adicionar $\frac{1}{4}$ deste volume obtido de KCl 0,88% em água. A fase superior foi desprezada por aspiração a vácuo e a fase inferior filtrada em sulfato de sódio anidro e evaporada em rota-evaporador a 30°C. O extrato obtido foi reconstituído em 2,5 mL de clorofórmio para posterior esterificação dos ácidos graxos.

Os ácidos graxos do plasma foram determinados por cromatografia a gás, após esterificação descrita por Hartman e Lago (1973). Para esterificação e posterior análise cromatográfica, foram utilizados 2,0 mL do extrato obtido através da extração da fração lipídica e evaporado em atmosfera de nitrogênio. Em seguida, foram adicionados 0,5 mL de NaOH metanólico a 0,5 N; a amostra foi homogeneizada e mantida em banho-maria por 5 minutos. À amostra fria foram adicionados 1,5 mL da mistura de esterificação (composta por cloreto de amônio, metanol e ácido sulfúrico), levemente agitada e levada ao banho-maria por mais 3 minutos. Em seguida, à amostra fria foram adicionados 1,5 mL da solução saturada de cloreto de sódio e agitado levemente. A fração dos metil ésteres foi extraída com duas porções sucessivas de 0,5 mL de hexano (grau HPLC). Na fase superior extraída, foi

adicionado 1 mL de solução saturada de cloreto de sódio. Em seguida, a fase superior foi evaporada em atmosfera de nitrogênio e ressuspensa em 120 µL de hexano (grau HPLC) para a determinação dos ácidos graxos por cromatografia a gás.

A composição de ácidos graxos foi determinada em um cromatógrafo a gás SHIMADZU, GC-17A, equipado com uma coluna capilar Supelcowax 10 de 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno. Foi utilizado o gás hélio como gás de arraste, com fluxo de 1 mL/min. As temperaturas do injetor e do detector foram 250° C e 270° C, respectivamente. A programação de temperatura inicial da coluna foi de 170°C com acréscimo de 1° C/min, até atingir o platô de 225° C, permanecendo nesta temperatura por 10 minutos. Uma mistura padrão de trinta e sete ésteres metil de ácidos graxos (Sigma Chemical Co. cód.18919), complementada com uma mistura padrão de "n-3 PUFA" contendo dezenove componentes (Supelco, Inc), foi usada para identificar os picos. Os resultados foram expressos como % do total de ácidos graxos presentes na amostra.

Considerando que o índice de peroxidabilidade do plasma (PI) representa o grau de insaturação dos ácidos graxos plasmáticos, seu cálculo foi determinado conforme Hsu *et al.* (2001):

$$PI = (\% \text{ dienóico} \times 1) + (\% \text{ trienóico} \times 2) + (\% \text{ tetraenóico} \times 3) + (\% \text{ pentaenóico} \times 4) + (\% \text{ hexaenóico} \times 5).$$

Análises estatísticas

Inicialmente, os resultados obtidos para cada variável foram comparados nos dois intervalos de tempo (0 e 30 dias), através de teste T para variáveis

dependentes, adotando-se o valor α de 5%. Considerando-se que poucas variáveis mostraram diferenças significativas entre os valores obtidos nos dois intervalos de tempo, optou-se por utilizar o valor médio dos dois intervalos para todas as variáveis. Diferenças entre os resultados apresentados pelos grupos (homens e mulheres) foram comparadas através de teste T para variáveis independentes.

Análise multivariada em componentes principais (PCA), seguida da análise de agrupamentos, foram aplicadas com objetivo de classificar os 57 indivíduos de acordo com seu estresse oxidativo avaliado por quatro biomarcadores. Desta forma, PCA e análise de agrupamento foram conduzidas em uma matriz original (57x4). A matriz 57x4 para variáveis independentes expressas em diferentes unidades ($\mu\text{mol/L}$, U/L, % de inibição ou Fe_2SO_4 $\mu\text{mol/L}$) foi preparada adotando-se os quatro biomarcadores como colunas e os indivíduos como linhas. Os autovalores maiores que um foram separados para apresentar a projeção dos indivíduos no plano (1X2). Após a obtenção dos gráficos de PCA para variáveis e indivíduos, foi conduzida a análise de agrupamento com objetivo de separar os indivíduos em grupos. Essa análise foi realizada com base nas medidas de similaridade, a partir de dados previamente normalizados, adotando-se a distância euclidiana e o método de Ward para agrupamento. ANOVA, seguida por teste de Tukey HSD, foram aplicados para avaliar as diferenças entre os cinco grupos formados, considerando o gênero e a idade como co-fatores. Além disso, a homogeneidade das variâncias foi previamente avaliada pelo teste de Hartley. Um valor de α menor que 5% foi adotado como significativo. O *software* Statistica v.7.1 (StatSoft Inc., Tulsa, USA) foi utilizado para todos os tratamentos estatísticos e gráficos apresentados neste estudo.

5 RESULTADOS

5.1 Características clínicas, bioquímicas e antropométricas dos indivíduos avaliadas no intervalo de 30 dias

Analisando as **Tabelas 1 e 2**, observa-se que houve redução da capacidade antioxidante medida por FRAP e aumento da ingestão de carboidratos e vitaminas do complexo B no intervalo de 30 dias. Considerando que esse intervalo não é suficiente para que ocorram mudanças no padrão alimentar e no estilo de vida dos indivíduos, as diferenças observadas para o valor de FRAP e para a ingestão de carboidratos e de vitaminas refletem a variabilidade natural desses parâmetros. A determinação da LDL₍₋₎ foi realizada apenas com as amostras obtidas na 2ª coleta.

As **Tabelas 1 e 2** também apresentam a comparação dos valores obtidos no presente estudo com os valores reportados na literatura, exceto para LDL₍₋₎. Observa-se que a concentração de MDA em indivíduos com dislipidemia controlada por estatinas foi maior ($p < 0,001$) quando comparado às concentrações apresentadas na literatura para indivíduos normolipidêmicos.

Tabela 1 - Características clínicas, bioquímicas e antropométricas dos indivíduos avaliadas no intervalo de 30 dias (n=57).

Variáveis	T ₀	T ₃₀	Média ^a	Desvio Padrão	P ^b	CV%	Valores reportados na literatura
<i>Biomarcadores</i>							
MDA (μmol/L)	1,36	1,42	1,40	0,36	0,252	26	1,00 ^c
FRAP (μmol/L)	912,00	855,00	885,00	177,00	<0,001	20	638,00 a 1634,00 ^d
DPPH (% de inibição)	4,50	4,50	4,50	1,30	0,839	29	5,00 a 15,00 ^e
LDL ₍₋₎ (U/L)	-	19,61	-	20,24	-	103	-
<i>Dados antropométricos</i>							
IMC (kg/m ²)	26,80	26,70	26,70	3,00	0,634	11	18,50 a 24,90 ^f
CC/CQ	0,87	0,86	0,87	0,08	0,222	9	0,85 -1,00
<i>Exames bioquímicos</i>							
Colesterol (mg/L)	188,40	183,30	186,00	34,30	0,517	18	<200,00 ^g
LDL (mg/L)	127,70	126,30	127,00	30,30	0,756	24	<130,00 ^g
HDL (mg/L)	34,60	33,60	34,10	8,10	0,249	24	>40,00 ^g
Triglicerídeos (mg/L)	130,80	117,00	124,10	74,90	0,545	60	< 150,00 ^g
Glicose (mg/dL)	105,20	105,50	105,30	10,80	0,631	10	70,00 – 100,00 ^g

^a n = 57^b Valor de probabilidade obtido pelo teste T para variáveis dependentes^c Del Rio; Stewart; Pellegrini, 2005^d Benzie e Strain, 1999^e Chrzczanowicz *et al.*, 2008^f World Health Organization, 2000^g Recomendações dos níveis séricos de colesterol e frações, triglicerídeos e glicose segundo *National Cholesterol Education Program* (NCEP), 2001.

Tabela 2 - Variação da ingestão diária de macro e micronutrientes no intervalo de 30 dias (n=57).

Variáveis	T ₀	T ₃₀	Média	Desvio Padrão	P ^a	Ingestão Dietética de Referência(DRI) ^b
Ingestão energética – Kcal	1.414,80	1.554,80	1.498,80	543,00	0,019	2.000,00
Proteína (% de energia)	19,23	18,03	18,67	25,40	0,505	10,00- 35,00
Gordura (% de energia)	34,35	32,24	33,36	46,18	0,463	20,00 – 35,00
Carboidrato (% de energia)	47,41	49,73	48,06	46,34	<0,001	45,00 - 65,00
SAFA (% de energia)	8,02	8,86	8,35	12,59	0,002	< 10% of total energia ^c
MUFA (g)	13,20	15,50	14,40	6,70	0,067	-
PUFA (% de energia)	4,70	4,90	4,80	6,30	0,103	6 -10%of total energia ^c
Colesterol (mg)	193,60	196,60	195,10	98,70	0,722	<300,00mg ^c
Fibra (g)	16,00	15,20	15,62	7,05	0,378	25 ,00- 30,00
Cálcio (mg)	421,20	479,70	448,85	255,41	0,064	1.000,00 – 1.200,00
Ferro (mg)	6,20	6,40	6,32	2,90	0,569	8,00 -18,00
Magnésio (mg)	149,60	153,80	150,88	60,97	0,432	320,00 – 420,00
Potássio (mg)	1.622,90	1.655,30	1.634,31	596,45	0,713	4700,00
Sódio (mg)	1.836,60	1.938,60	1.894,49	870,18	0,182	1.200,00 – 1.500,00
Zinco (mg)	8,00	7,70	7,89	4,21	0,283	8,00 – 11,00
Vitamina C (mg)	94,40	102,10	97,04	91,64	0,444	75,00 – 90,00
Vitamina B1 (mg)	0,70	0,90	0,78	0,50	0,025	1,10 - 1,20
Vitamina B2 (mg)	0,80	1,00	0,90	0,48	0,003	1,10 - 1,30
Niacina (mg)	14,80	17,50	16,16	11,88	0,072	14,00 - 16,00
Vitamina B6 (mg)	0,60	0,80	0,68	0,46	0,020	1,30 - 1,70
Vitamina A (µg RE)	291,27	411,54	360,59	507,24	0,195	700,00 – 900,00
Folato (µg)	65,70	68,50	65,32	52,98	0,989	400,00

^a Probabilidade obtida pelo teste T para variáveis dependentes.

^b United States Departament of Agricultural - Dietary Reference Intakes, 2004.

^c World Health Organization, 2003.

Os valores médios de FRAP e DPPH foram também estatisticamente mais baixos ($p < 0,001$) quando comparados aos valores médios encontrados na literatura. Já a concentração média de colesterol total, triacilglicerol e LDL apresentaram-se dentro dos valores de referência recomendados pelo National Cholesterol Education Program-NCEP (2001), demonstrando o efeito das estatinas no controle da dislipidemia nesses indivíduos. Entretanto, a concentração de HDL encontrou-se abaixo dos valores recomendados e a concentração de glicose acima da recomendação, podendo ser considerada uma condição de pré-diabetes para essa população.

Analisando a ingestão de nutrientes (**Tabela 2**), exceto para sódio e vitamina C, todos os micronutrientes apresentaram-se abaixo do recomendado pela DRI (*Dietary Reference Intake*), levando-se em consideração a média de valores recomendados para homens e mulheres. Todavia, deve-se considerar a dificuldade em analisar a ingestão dos micronutrientes, uma vez que não são todos os micronutrientes de interesse que estão disponíveis nas tabelas de composição de alimentos. Além disso, as tabelas utilizadas para análise dos dados são compilações de tabelas norte-americanas, cuja composição das amostras pode diferir da composição dos alimentos cultivados e consumidos no Brasil.

5.2 Caracterização do estresse oxidativo e do perfil nutricional dos indivíduos classificados de acordo com o gênero

Analisando-se a **Tabela 3**, observa-se que os homens apresentaram maior atividade antioxidante total (FRAP e DPPH) do que as mulheres, embora nenhuma diferença tenha sido encontrada para MDA e LDL₍₋₎.

Segundo o NCEP (2001), as concentrações recomendadas para lipoproteínas plasmáticas seriam: colesterol < 200 mg/dL; LDL < 130 mg/dL e HDL > 40 mg/dL. Analisando a **Tabela 3**, percebe-se que as médias obtidas, tanto para o grupo das mulheres quanto para o grupo dos homens, encontram-se dentro dos valores de referência, exceto para HDL, que se mostrou abaixo do recomendado, em ambos os grupos.

Em relação ao perfil de ácidos graxos plasmáticos, observaram-se menores níveis de ácido graxo linoléico (insaturado) entre os homens. Tal resultado proporcionou menor porcentagem de PUFA para o grupo dos homens em relação ao grupo das mulheres.

Tabela 3 - Caracterização do estresse oxidativo, do perfil lipídico e dos dados antropométricos de acordo com o sexo.

Variáveis	Mulheres (n=35)	Homens (n=22)	P^a
Idade (anos)	66,00	58,00	0,008
MDA (μmol/L)	1,40	1,40	0,736
FRAP (μmol/L)	830,20	988,40	<0,001
DPPH (% de inibição)	4,20	4,90	0,023
LDL ₍₋₎ (U/L)	19,60	19,70	0,974
Colesterol (mg/L)	187,40	181,30	0,455
LDL (mg/dL)	128,60	122,90	0,426
HDL (mg/dL)	36,70	29,70	0,001
Triglicerídeos (mg/dL)	110,60	143,60	0,086
Glicose (mg/dL)	103,40	108,60	0,050
Ácidos graxos plasmáticos (%)			
C 14:0 – mirístico	1,40	1,30	0,479
C 16:0 – palmítico	21,20	22,30	0,134
C 18:0 – esteárico	6,00	6,50	0,191
C 18:1 n-9 – oléico	18,30	20,20	0,075
C 18:2 n-6 – linoléico	30,50	27,30	0,014
C 18:3 n-3 – linolênico	1,60	1,50	0,476
C 20:4 n-6 – araquidônico	8,80	8,40	0,620
C 20:5 n-3 – eicosapentaenóico	0,70	0,70	0,890
C 22:6 n-3 –docosaexaenóico	1,20	1,30	0,583
SFA (%)	30,10	31,50	0,146
MUFA (%)	23,50	25,30	0,129
PUFA (%)	45,40	41,90	0,041
Índice de peroxidabilidade (PI)	73,60	70,10	0,314

^a Valor de propabilidade obtida pelo teste T para variáveis independentes.

5.3 Análise multivariada

Os valores médios das duas coletas realizadas de todos os parâmetros obtidos dos 57 indivíduos nos dois intervalos (0 e 30 dias), incluindo homens e mulheres, foram aplicados na análise estatística multivariada. Primeiramente, a PCA foi aplicada para reduzir as quatro variáveis originais, ou seja, os quatro biomarcadores do estresse oxidativo, a um menor número de componentes não correlacionados. As três primeiras componentes (autovalores >1) foram selecionadas nesta análise, representando 94% da variação total.

A **Tabela 4** apresenta a contribuição das variáveis para cada componente principal. Levando em consideração os autovalores maiores que um, os indivíduos foram separados na primeira componente principal de acordo com sua atividade antioxidante total, determinada por FRAP (+0,92) e DPPH (+0,93), respectivamente; na segunda componente pelo estado oxidativo avaliado pelo MDA (+0,74) e LDL₍₋₎ (+0,70) e na terceira componente, que encontra-se acima e abaixo do plano, também pelo seu estado oxidativo avaliado por MDA (+0,67) e LDL₍₋₎ (-0,69), porém agora com sinais opostos.

Tabela 4 - Correlação entre as quatro variáveis e as componentes principais

	FATOR 1	FATOR 2	FATOR 3
MDA	-0,05	0,74	0,67
FRAP	0,92	0,11	-0,12
DPPH	0,93	0,05	0,03
LDL ₍₋₎	-0,17	0,70	-0,69

Por meio da análise de agrupamento, os 57 indivíduos foram divididos em 5 grupos. A **Figura 12** apresenta a projeção dos indivíduos separados em grupos, no plano (1X2) gerado pelas quatro variáveis. Percebe-se que a atividade antioxidante total medida por FRAP e DPPH contribuiu para a separação dos indivíduos no eixo 1 (horizontal), enquanto que os resultados obtidos por MDA e LDL₍₋₎ foram responsáveis pela separação dos indivíduos no eixo 2 (vertical).

Logo, os grupos localizados no quadrante esquerdo (3, 4,5) apresentaram menor atividade antioxidante quantificada por FRAP e DPPH que os grupos localizados no quadrante direito (1, 2). Enquanto que os grupos presentes no quadrante superior (2,3) apresentaram maior nível de estresse oxidativo avaliado por MDA e LDL₍₋₎, quando comparados aos grupos localizados na parte inferior do plano (1, 4, 5).

Figura 12 - Projeção dos indivíduos no plano gerado pelas 4 variáveis (1 x 2) separados de acordo com a análise de agrupamento

Analisando-se a **Tabela 5**, observa-se que diferenças estatísticas foram encontradas apenas para a proporção de ácido mirístico ($p=0,044$) entre os indivíduos que compunham o grupo 1 (1,60%) e o grupo 5 (1,04%) e para a proporção de ácido araquidônico ($p=0,049$) entre os indivíduos que compunham o grupo 2 (7,3%) e o 3 (10,9%). Pode-se sugerir que os indivíduos com maior atividade antioxidante apresentaram maior proporção de ácido mirístico (C14:0) e menor proporção de ácido araquidônico (C20:4) que indivíduos classificados com menor nível de atividade antioxidante.

A concentração de HDL ($p= 0,004$) diferiu significativamente entre o grupo 2 (31,4mg/dL) e o grupo 4 (40,6 mg/dL), sendo que o grupo 4 foi caracterizado por menor concentração de LDL(-).

Além disso, uma correlação estatisticamente significativa ($r= - 0,33$, $p= 0,035$) foi observada entre a atividade antioxidante avaliada por DPPH e o índice de peroxidabilidade (IP), sugerindo a influência do perfil de ácidos graxos plasmáticos sobre o estresse oxidativo.

Não foi observada nenhuma diferença estatística para o padrão dietético entre os cinco grupos (**Tabela 5**), incluindo tanto macro e micronutrientes, quanto ácidos graxos agrupados de acordo com o seu grau de saturação bem como para os dados socioeconômicos (dados não mostrados).

Tabela 5 – Caracterização bioquímica, clínica e nutricional dos *clusters* (grupos) formados pela análise multivariada, considerando os quatro biomarcadores do estresse oxidativo.

Variáveis	1	2	3	4	5	Desvio Padrão	P [†]
N	17,00	10,00	9,00	11,00	10,00	-	-
Idade (anos)	66,20	66,10	52,00	64,90	65,00	11,80	0,081
F (%) n	(53) 9	(60) 6	(63) 5	(80) 8	(71) 5	-	-
MDA (μmol/L)	1,40 ^a	1,40 ^a	1,80 ^b	1,40 ^a	1,10 ^c	0,30	0,001
FRAP (μmol/L)	1.026,80 ^a	975,60 ^a	792,10 ^b	716,50 ^b	798,40 ^b	168,70	0,017
DPPH (% de inibição)	5,60 ^a	5,10 ^a	3,70 ^b	3,50 ^b	3,50 ^b	1,20	<0,001
LDL ₍₋₎ (U/L)	4,26 ^a	32,40 ^b	45,10 ^b	7,00 ^a	29,40 ^b	21,20	<0,001
14:0 (%)	1,60 ^a	1,32 ^{ab}	1,26 ^{ab}	1,38 ^{ab}	1,04 ^b	0,50	0,044
16:0 (%)	22,10	22,30	20,40	21,80	20,70	2,50	0,289
18:0 (%)	5,57	6,41	6,23	6,47	6,43	1,20	0,629
18:1 n-9 (%)	19,80	20,30	18,40	17,00	18,70	3,40	0,648
18:2 n-6 (%)	28,40	30,10	28,30	30,50	29,90	4,20	0,237
18:3 n-3 (%)	1,70	1,47	1,70	1,67	1,27	0,50	0,299
20:4 n-6 (%)	8,20 ^{ab}	7,30 ^a	10,90 ^b	9,60 ^{ab}	8,60 ^{ab}	2,40	0,050
20:5 n-3 (%)	0,69	0,52	0,77	0,69	0,65	0,30	0,905
22:6 n-3 (%)	1,09	1,03	1,28	1,06	1,32	0,50	0,337
SFA (%)	30,60	31,40	29,90	30,70	29,90	3,10	0,612
MUFA (%)	25,20	25,30	23,10	22,20	24,00	3,70	0,870
PUFA (%)	43,00	42,50	45,80	45,80	44,80	5,50	0,812
PI	69,90	66,50	79,40	75,80	73,50	11,10	0,632
Colesterol (mg/dL)	178,00	184,80	194,30	198,60	175,20	30,20	0,063
LDL (mg/dL)	114,00	127,80	140,40	137,00	123,80	26,20	0,140
HDL (mg/dL)	32,70 ^a	31,40 ^a	32,80 ^{ab}	40,60 ^b	34,10 ^{ab}	7,90	0,004
Glicose (mg/dL)	110,10	106,80	103,40	103,50	100,50	9,90	0,174
Triglicerídeos(mg/dL)	157,40	127,20	105,10	105,00	86,10	70,30	0,868
IMC (kg/m ²)	27,10	25,20	28,10	26,40	26,80	3,00	0,384
CC/CQ	0,90	0,90	0,80	0,80	0,90	0,10	0,628
Energia (kcal)	1.455,20	1.532,00	1.478,30	1.376,30	1.577,60	483,10	0,518
Proteína(g)	66,40	69,50	65,10	68,20	74,20	29,50	0,808
Gordura (g)	52,70	57,60	54,50	52,60	54,50	23,10	0,289
SAFA (g)	16,90	14,50	12,00	13,50	13,10	7,60	0,325
MUFA (g)	14,50	16,40	12,90	13,80	13,20	6,70	0,325
PUFA (g)	8,60	7,60	6,80	6,60	8,30	3,80	0,831
Colesterol (mg)	169,90	187,10	215,10	219,70	174,90	98,70	0,511
Carboidrato (g)	178,70	184,00	182,00	157,50	199,70	57,20	0,738
Fibra (g)	16,40	14,20	14,60	13,90	18,80	6,40	0,603
Cálcio (mg)	433,20	463,80	385,50	452,90	562,60	239,80	0,696
Ferro (mg)	5,50	6,60	6,50	5,70	7,60	2,60	0,217
Magnésio (mg)	140,60	142,40	148,40	141,60	187,90	56,70	0,437
Fósforo (mg)	672,90	694,70	695,40	691,80	814,00	246,40	0,623
Potássio (mg)	1.577,80	1.582,10	1.524,00	1.599,80	1.869,20	535,00	0,834
Sódio(mg)	1.882,30	1.912,20	1.874,10	1.845,70	1.828,50	774,60	0,744
Zinco (mg)	6,50	8,80	8,40	8,20	7,30	3,90	0,142
Manganês (g)	1,40	1,50	1,80	1,40	1,80	0,80	0,496
Vitamina C (mg)	100,90	95,20	71,70	86,80	138,20	82,80	0,885
Vitamina B1 (mg)	0,80	0,90	0,70	0,60	0,80	0,40	0,328
Vitamina B2 (mg)	0,90	1,00	1,00	0,80	0,90	0,40	0,341
Niacina (mg)	15,10	13,50	18,40	15,90	16,70	9,10	0,831
Vitamina B6 (mg)	0,60	0,70	0,80	0,60	0,70	0,40	0,489
Vitamina A (μg RE)	1.559,50	966,70	1.617,70	828,50	1.311,70	1.550,90	0,745
Folato (μg)	56,60	72,80	64,00	54,10	84,20	44,10	0,722
Dose de estatina (mg/dL)	20,00	14,30	25,70	16,70	23,30	13,60	0,545

[†] Valor de probabilidade obtida por ANOVA

6 DISCUSSÃO

Inicialmente, os resultados mostraram a variabilidade dos quatro biomarcadores avaliados neste estudo, no período de 30 dias entre as duas avaliações. Considerando que esse intervalo é insuficiente para alterar o estado oxidativo do organismo, uma vez que a população avaliada manteve os mesmos hábitos alimentares e rotina social entre as duas coletas, conclui-se que essa variação reflete a variação intrínseca desses biomarcadores.

Dessa forma, ao se analisar os biomarcadores utilizados, observa-se que a média dos valores para os quatro biomarcadores que foram avaliados nos indivíduos com dislipidemia controlada por estatinas sugere que essa população apresentou estado oxidativo, representado por MDA, e susceptibilidade à oxidação, avaliada por FRAP e DPPH, mais elevada do que aqueles apresentados por indivíduos normolipidêmicos reportados na literatura.

O MDA é produzido a partir da decomposição de hidroperóxidos; estes são formados a partir da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados mediada por radicais livres ou pela reação entre radicais hidroxila e acroleína (LYKKESFELDT, 2007). O MDA é capaz de modificar a apolipoproteína B presente na LDL (JENKINS *et al.*, 2008), sendo esse fenômeno a base da aterogênese. A concentração média de MDA observada neste estudo para indivíduos com dislipidemia controlada por estatinas foi de $1,4 \pm 0,4 \mu\text{mol/L}$. Considerando que valores de MDA plasmáticos de indivíduos saudáveis encontram-se em torno de $1,0 \mu\text{mol/L}$ (DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005), percebe-se que a população estudada apresentou nível de estresse oxidativo, determinado por MDA, relativamente alto ($1,4 \pm 0,4 \mu\text{mol/L}$). Além disso, esse valor encontra-se dentro da faixa de MDA apresentada por Argawal e

Chase (2002) para indivíduos saudáveis e normolipidêmicos ($1.09 \pm 0.43 \mu\text{mol/L}$) e os reportados por Jenkins *et al.* (2008) para indivíduos idosos e hiperlipidêmicos ($1,6 \pm 0,1 \mu\text{mol/L}$).

Muitos fatores poderiam explicar esse estado oxidativo elevado observado na população estudada, sendo os principais a glicemia ligeiramente elevada ($105,3 \pm 10,8 \text{ mg/dL}$), representando estado de pré-diabetes, e a baixa concentração de HDL ($34,1 \pm 8,1 \text{ mg/dL}$). Sabe-se que elevadas concentrações de glicose podem aumentar a atividade de algumas enzimas que estão envolvidas na oxidação lipídica, tais como 12/15 lipooxigenase e NADPH oxidase. Além disso, a glicose pode reagir com grupos aminos e lipídicos, formando produtos finais de glicação avançada (AGE). Esses estão associados à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio e com o aumento na concentração de MDA (MORI *et al.*, 2003; LAMBETH, 2007; PARTHASARATHY *et al.*, 2008; REES *et al.*, 2008).

A baixa concentração de HDL apresentada nessa população também pode ter contribuído significativamente para o aumento da oxidação, uma vez que já é bem reconhecido o efeito antioxidante de algumas das proteínas que estão presentes na HDL, tais como paraoxonase 1 (PON-1) (AVIRAM *et al.*, 2004; FUHRMAN; VOLKOVA; AVIRAM, 2006; NEGRE-SALVAYRE *et al.*, 2006). A PON-1 é uma esterase que encontra-se associada a HDL, capaz de hidrolisar lipídios oxidados e, consequentemente, reduzir o estresse oxidativo em lipoproteínas, macrófagos e lesões ateroscleróticas (FUHRMAN; VOLKOVA; AVIRAM, 2006). Muitos estudos têm mostrado que a PON-1 protege a LDL e a HDL da oxidação, uma vez que degrada lipídios ativos oxidados em lipoproteínas e na parede das artérias (GIRONA *et al.*, 2008).

Portanto, a alta concentração de glicose, que indica uma condição de pré-diabetes para esses indivíduos, associada aos baixos valores de HDL, poderiam ter contribuído para o aumento do estresse oxidativo.

A análise estatística multivariada, entre uma larga possibilidade de aplicações, permite a visualização de grande número de associações simultaneamente. Além disso, esta análise permite agrupar os indivíduos após a coleta de dados e iniciar um protocolo de intervenção com os novos grupos formados. Por exemplo, tem sido enfatizada a importância das concentrações *baseline* dos antioxidantes em estudos envolvendo biomarcadores oxidativos (GRIENDLING; FITZGERALD, 2003; KALIORA; DEBOUSSIS, 2007; BLOCK *et al.*, 2008). Utilizando a estatística multivariada, é possível agrupar indivíduos de acordo com suas concentrações *baseline* avaliadas por mais que três critérios ao mesmo tempo, como sugerido por Castro *et al.* (2007), e então analisar a intervenção com antioxidantes em cada grupo. Portanto, métodos da estatística multivariada oferecem uma contribuição adicional, uma vez que muitos biomarcadores são necessários para definir e classificar o estado oxidativo ou a susceptibilidade à oxidação.

No presente estudo, primeiramente foi avaliado se os indivíduos poderiam ser classificados de acordo com seu nível de estresse oxidativo e, sequencialmente, se algum componente dietético estaria associado com essa classificação. A análise estatística multivariada mostrou ser uma ferramenta útil para classificar os indivíduos de acordo com os quatro biomarcadores analisados. Entretanto, observou-se também que não houve diferenças na ingestão dietética entre os grupos formados. Apesar da variação da ingestão dietética apresentada pelos indivíduos ter sido ampla, ao se utilizar os biomarcadores do estresse oxidativo como variáveis ativas,

os indivíduos foram separados de acordo com o grau de estresse oxidativo e não de acordo com a ingestão dietética. Dessa forma, considerando que não houve diferença entre os grupos, pode-se inferir que a dieta não foi o fator determinante para o grau de estresse oxidativo apresentado pelos mesmos.

Algumas hipóteses podem ser sugeridas para explicar a falta de associação entre a dieta e o estresse oxidativo desses indivíduos, a destacar:

- 1 - tamanho da amostra;
- 2 - limitações do banco de dados de alimentos utilizado para converter a ingestão alimentar em ingestão de nutrientes (HODSON *et al.*, 2008);
- 3 - horário da coleta, uma vez que coleta de sangue foi realizada no estado *fasting* e não no pós-prandial (SIES *et al.*, 2005);
- 4 - aspecto genético.

Stephens, Bain e Humphries (2008) sugeriram que o estresse oxidativo poderia ser melhor observado em indivíduos que estivessem expostos a interações gene-ambiente, tais como fumantes que carregam o alelo $\epsilon 4$ do gene da apolipoproteína E. Portanto, a falta de uma associação significativa entre biomarcadores do estresse oxidativo e a ingestão de nutrientes no presente estudo poderia ser explicada se variações genéticas tivessem sido incluídas nesta investigação. Para explicar tal situação, estudos posteriores serão realizados com polimorfismo de genes envolvidos no metabolismo lipídico.

A primeira componente principal (eixo horizontal, Figura 13) separou os indivíduos de acordo com sua atividade antioxidante plasmática total. Alta correlação foi observada entre FRAP e DPPH ($r=+0,73$, $p < 0,01$). Tal resultado é esperado, uma vez que ambos os métodos avaliam a habilidade dos mesmos compostos (bilirrubina, ácido úrico, ácido ascórbico, carotenóides, tocoferol, flavonóides e

outros) em doarem elétrons ou hidrogênios para radicais, no caso, Fe^{+3} e $\text{DPPH}^\bullet$, respectivamente. Além disso, uma proporção mais alta de ácido mirístico ($\text{C}_{14:0}$) e mais baixa de ácido araquidônico ($\text{C}_{20:4 \text{ n}6}$) foi observada entre os indivíduos localizados no quadrante direito, caracterizados pela maior atividade antioxidante total.

Segundo Dabadie *et al.* (2005), o ácido mirístico na posição sn-2 é capaz de controlar a expressão da $\Delta 6$ -desaturase, enzima envolvida na enlogação e dessaturação do ácido graxo α -linolênico, que se encontra protegido da oxidação pela sua posição sn-2 nos triglicerídeos dietéticos e possui atividade antiinflamatória. Logo, em concentrações adequadas, o ácido graxo mirístico pode proporcionar efeitos benéficos no perfil lipídico e de lipoproteínas, bem como no estresse oxidativo, conferindo, assim, menor risco cardiovascular a indivíduos com dislipidemia.

Já os ácidos graxos poliinsaturados, como o ácido araquidônico, são mais facilmente oxidados devido ao número de duplas ligações em sua estrutura. A representação eletrônica das duplas ligações consiste em dois componentes: a ligação sigma e a ligação pi. A ligação sigma é tão forte quanto uma ligação simples. Já a ligação pi é a mais fraca e possui menor quantidade de energia, uma vez que os pi elétrons estão fracamente ligados ao núcleo e, portanto, mais expostos. Logo, os pi elétrons são responsáveis pela maior reatividade dos compostos insaturados, atenuando a energia de ligação dos átomos de hidrogênio presentes no carbono mais próximo. Além disso, o potencial de redução de um ácido graxo poliinsaturado tem sido estimado em torno de 0,6V, enquanto o das principais ERO varia de 0,77 a 2,31, o que as tornam capazes de oxidar os mesmos (HALLIWELL, GUTERIDGE, 1999; FRANKEL, 2005).

O ácido araquidônico é o substrato primário para a 5-lipooxigenase, levando à produção de leucotrienos mais ativos de série 4, que contribuem para potencializar o processo aterogênico, inflamatório e oxidativo presente na parede das artérias (DWYER *et al.*, 2004). Portanto, os ácidos graxos poliinsaturados, como o ácido araquidônico, podem contribuir para o aumento do estresse oxidativo, explicando os resultados observados nesse estudo, no qual os indivíduos que apresentaram maior concentração plasmática de ácido araquidônico caracterizaram-se por menor capacidade antioxidante e maior concentração de MDA.

Também foi observada correlação negativa entre o DPPH e o PI desses pacientes. Embora a composição de ácidos graxos do tecido adiposo e do sangue possa ser usada como biomarcador da ingestão de ácidos graxos (HODSON *et al.*, 2008), essa proporção pode ser influenciada pela atividade de dessaturases, que são fatores limitantes na biossíntese de ácidos graxos de cadeia longa e altamente insaturados, tais como o ácido graxo araquidônico e seus precursores (BARJA, 2002). Desta forma, a competição entre vias metabólicas pode levar a mudanças na composição de ácidos graxos que não estão diretamente relacionados à dieta. Uma vez que as amostras de sangue foram coletadas no estado de jejum, os ácidos graxos presentes no plasma foram derivados tanto da dieta quanto biossintetizados, de forma que ambos contribuíram para o perfil de ácidos graxos observado nos indivíduos estudados. Baseado no fato de que nenhuma associação foi observada entre ingestão dietética (incluindo ácidos graxos) e estresse oxidativo, pode-se sugerir que a síntese de ácidos graxos apresentou efeito mais expressivo na susceptibilidade à oxidação do que os ácidos graxos da dieta. É possível que o efeito da dieta sobre o estresse oxidativo nessa população, que não foi submetida a

um tratamento dietético, poderia somente ser visualizado sob condições pós-prandiais, como sugerido por Sies *et al.* (2005).

Em relação à segunda componente principal, pode-se observar que os indivíduos foram separados no eixo vertical em razão do estresse oxidativo determinado através da concentração de MDA e da oxidação da LDL. Os indivíduos posicionados na parte superior (**Figura 12**) apresentaram maior estresse oxidativo (maiores valores para MDA e LDL₍₋₎) do que àqueles posicionados no quadrante inferior. Quando foram investigadas diferenças no perfil dietético e bioquímico entre esses grupos, detectou-se diferença significativa apenas na concentração de HDL, sendo que indivíduos com maior estresse oxidativo apresentaram menores valores para essa lipoproteína.

Estudos de coorte prospectivos, bem como triagens randomizadas controladas de terapias antilipidêmicas, demonstram alta correlação negativa entre níveis de HDL e risco coronariano em pacientes com elevado, normal ou baixo LDL, sendo o transporte reverso de colesterol (**Figura 13**) um dos principais mecanismos pelos quais a HDL protege o organismo contra a aterosclerose (DEGOMA; DEGOMA; RADER, 2008).

O transporte reverso de colesterol inicia-se com a interação da ApoA-I presente na HDL com ABCA1 (*membrane cassette transport(ABC) protein A1*) que estimula a mobilização de colesterol do *pool* de lipídios intracelulares (**Figura 13 - I**). O colesterol livre externalizado é então esterificado a éster de colesterol pela LCAT (*lecithin cholesteryl acyltransferase*) na superfície da HDL e é então compartimentalizado no interior hidrofóbico da mesma (**Figura 13 - II**). A HDL interage com a ABCG1 (*ABC protein G1*) (**Figura 13 - III**) e promove a extração do excesso intracelular de colesterol dos macrófagos. A seguir, dirige-se aos

hepatócitos, onde interage com o receptor SR-B1 (**Figura 13- IV**), que transfere o colesterol para o interior dos hepatócitos ou interage com a CETP (*cholesterol ester transfer protein*) (**Figura 13 – V**), a qual transfere os ésteres de colesterol para VLDL ou LDL e os TG dessas moléculas para HDL. Como o conteúdo de TG aumenta, a HDL se torna melhor substrato para lipólise pela lipase hepática, a qual pode levar a um significativo catabolismo da HDL. Os ésteres de colesterol transferidos para lipoproteínas que contêm apoB100 (VLDL e LDL) podem se ligar aos receptores de LDL na superfície do hepatócito. Esses receptores, portanto, medeiam a entrada dessas lipoproteínas no fígado (DAVIDSON; TOTH, 2007).

Figura 13 – Transporte reverso do colesterol. Modificado de Davidson (2007). TG: Triglicerídeos; CE: éster de colesterol; VLDL: Lipoproteína de muito baixa densidade; ApoB: apolipoproteína B; LDL: lipoproteína de baixa densidade; LDL-R: receptor da LDL; FC: colesterol livre; SR-B1: Receptor Scavenger Classe B; ABCA1: *ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1*; ABCG1/G4: *ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1*; ApoA-I: apolipoproteína A 1; HDL: lipoproteína de alta densidade; CETP: proteína transportadora de éster de colesterol; LPL: lipase lipoprotéica; LCAT: lecitina colesterol acil transferase.

Logo, percebe-se que a redução dos níveis de HDL pode interferir nos níveis de LDL, levando ao seu aumento, uma vez que a transferência de TG para a HDL e de colesterol para a LDL, que permite com que a LDL seja reconhecida pelos seus receptores nos hepatócitos, estará reduzida.

Além disso, sabe-se que a HDL, em virtude da presença de suas apolipoproteínas, em especial a ApoAI e ApoAIV, e da paraoxonase-1 (PON-1), apresenta efeitos antioxidantes e antiaterogênicos (FUHRMAN, VOLKOVA, AVIRAM, 2006; CARNICER *et al.*, 2007).

A HDL exerce inúmeros outros efeitos antiaterogênicos, independentemente do transporte reverso de colesterol, como a inibição da oxidação lipídica, incluindo a redução da modificação oxidativa da LDL, redução da adesão de leucócitos e ativação de monócitos, produção de óxido nítrico e vasodilatação fluxo-induzida, prevenção do dano e da morte de células endoteliais e inibição da ativação de plaquetas e da cascata de coagulação (DEGOMA; DEGOMA; RADER, 2008).

Portanto, percebe-se que reduzidas concentrações de HDL contribuem tanto para o aumento do estresse oxidativo como para a instalação e a progressão da placa de ateroma.

7 CONCLUSÕES

As técnicas da estatística multivariada que foram aplicadas neste estudo permitiram que os indivíduos fossem agrupados de acordo com seu nível de estresse oxidativo avaliado por 4 biomarcadores de relevância clínica. Com base na análise multivariada, pode-se sugerir que a síntese de ácidos graxos e a concentração de HDL parece exercer efeito mais expressivo nas condições oxidativas dos indivíduos com dislipidemia controlada por estatinas do que a ingestão dietética, respondendo, dessa forma, as hipóteses sugeridas neste estudo.

Entretanto, futuros estudos envolvendo avaliação de polimorfismo de alguns genes envolvidos com os biomarcadores do estresse oxidativo, associados à análise multivariada, podem contribuir para explicar as razões pelas quais não foi possível observar nenhuma diferença na ingestão dietética entre os grupos formados.

REFERÊNCIAS

ABUJA, P.M.; ALBERTINI, R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. **Clinica Chimica Acta**, v.306, p.1-17, 2001.

ACÍN, S.; NAVARRO, M.A.; PERONA, J.S.; ARBONES-MAINAR, J.M.; SURRA, J.C.; GUZMAN, M.A.; CARNICER, R.; ARNAL, C.; ORMAN, I.; SEGOVIA, J.C.; OSADA, J.; RUIZ-GUTIERREZ, V. Olive oil preparation determines the atherosclerotic protection in apolipoprotein E knockout mice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.18, n.6, p.418-424, 2007.

AGARWAL, R.; CHASE, S.D. Rapid, fluorimetric-liquid chromatography determination of malondialdehyde in biological samples. **Journal of Chromatography, Biomedical Applications**, v.775, p.121-126, 2002.

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

AVIRAM, M. Introduction to the serial review on paraoxonases, oxidative stress, and cardiovascular diseases. **Free Radical Biology & Medicine**, v.37, p.1301-1303, 2004.

AZZI, A. The role of α -tocopherol in preventing disease. **European Journal of Nutrition**, v.43, n.1, p.18-25, 2004.

AZZI, A. Molecular mechanism of α -tocopherol action. **Free Radical Biology & Medicine**, v.43, p.16-21, 2007.

BARJA, G. Rate of generation of oxidative stress related damage and animal longevity. **Free Radical Biology & Medicine**, v.33, p.1167-1172, 2002.

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Analytical Biochemistry**, v.239, p.70-76, 1996.

BERLINER, J.A.; HEINECKE, J.W. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. **Free Radical Biology & Medicine**, v.20, p.707-727, 1996.

BISBY, R.H.; BROOKE, R.; NAVARATNAM, S. Effect of antioxidant oxidation potential in the oxygen radical absorption capacity (ORAC) assay. **Food Chemistry**, v.108, p.1002-1007, 2008.

BLACKHURST, D.M.; MARAIS, A.D. Concomitant consumption of red wine and polyunsaturated fatty acids in edible oil does not influence the peroxidation status of chylomicron lipids despite increasing plasma catechin concentration. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v.16, p.550-558, 2006.

BLOCK, G.; JENSEN, C.D.; MORROW, J.D.; HOLLAND, N.; NORKUS, E.P.; MILNE, G.L.; HUDES, M.; DALVI, T.B.; CRAWFORD, P.B.; FUNG, E.B.; SCHUMACHER, L.; HARMATZ, P. The effect of vitamins C and E on biomarkers of oxidative stress depends on baseline level. **Free Radical Biology & Medicine**, v.45, n.4, p.377-384, 2008.

BLUMBERG, J.B.; FREI, B. Why clinical trials of vitamin E and cardiovascular diseases may be fatally flawed: commentary on the relationship between dose of vitamin E and suppression of oxidative stress in humans. **Free Radical Biology & Medicine**, v.43, p.1374-1376, 2007.

SPOSITO, A.C.; CARAMELLI, B.; FONSECA, F.A.H.; BERTOLAMI, M.C. IV Diretriz brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.88, supl.1, p.2-19, 2007.

CAPITANI, C.D.; CARVALHO, A.C.L.; RIVELLI, D.P.; BARROS, S.B.M.; CASTRO, I.A. Evaluation of natural and synthetic compounds according to their antioxidant activity using a multivariate approach. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.111, 2009. [No prelo].

CARNICER, R.; NAVARRO, M.A.; ARBONES-MAINAR, J.M.; ACIN, S.; GUZMAN, M.A.; SURRA, J.C.; ARNAL, C.; DE LAS HERAS, M.; BLANCO-VACA, F.; OSADA, J. Folic acid supplementation delays atherosclerotic lesion development in apoE-deficient mice. **Life Sciences**, v.80, n.7, p.638-643, 2007.

CARRAPEIRO, M.M.; DONATO Jr., J.; GONCALVES, R.C.; SARON, M.L.G.; GODOY, H.T.; CASTRO, I.A. Effect of lycopene on biomarkers of oxidative stress in rats supplemented with ω -3 polyunsaturated fatty acids. **Food Research International**, v.40, n.7, p.939-946, 2007.

CASH, T.P.; PAN, Y.; SIMON, M.C. Reactive oxygen species and cellular oxygen sensing. **Free Radical Biology & Medicine**, v.43, p.1219-1225, 2007.

CASTRO, I.A.; MONTEIRO, V.C.B.; BARROSO, L.P.; BERTOLAMI, M.C. Effect of eicosapentaenoic/docosahexaenoic fatty acids and soluble fibers on blood lipids of individuals classified into different levels of lipidemia. **Nutrition**, v.23, n.2, p.127-137, 2007.

CERQUEIRA, F.M.; MEDEIROS, M.H.G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v.30, n.2, p.441-449, 2007.

CHENG, G.W.; WU, H.L.; HUANG, Y.L. Simultaneous determination of malondialdehyde and ofloxacin in plasma using an isocratic high-performance liquid chromatography/fluorescence detection system. **Analytica Chimica Acta**, v.616, n.2, p.230-234, 2008.

CHILDS, A.; JACOBS, C.; KAMINSKI, T.; HALLIWELL, B.; LEEUWENBURGH, C. Supplementation with vitamin C and N-acetyl-cysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle Injury induced by eccentric exercise. **Free Radical Biology & Medicine**, v.31, n.6, p.745-753, 2001.

CHOLEWA, J.; POPRZECKI, S.; ZAJAC, A.; WASKIEWICZ, Z. The influence of vitamin C on blood oxidative stress parameters in basketball players in response to maximal exercise. **Science & Sports**, v.23, n.3/4, p.176–182, 2008.

CHOY, P.C.; SIOW, Y.L.; MYMIN, D.; KARMIN, O. Lipids and atherosclerosis. **Biochemistry and Cell Biology**, v.82, n.1, p.212-224, 2004.

CHUNG, W.Y.; CHUNG, J.K.O.; SZETO, Y.T.; TOMLINSON, B.; BENZIE, I.F.F. Plasma ascorbic acid: measurement, stability and clinical utility revisited. **Clinical Biochemistry**, v.34, n.8, p.623-627, 2001.

CHRCZANOWICZ, J.; GAWRON, A.; ZWOLINSKA, A.; DE GRAFT-JOHNSON, J.; KRAJEWSKI, W.; KROL, M.; MARKOWSKI, J.; KOSTKA, T.; NOWAK, D. Simple method for determining human serum 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) radical scavenging activity - possible application in clinical studies on dietary antioxidants **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v.46, n.3, p.342-349, 2008.

ÇIMEN, M.Y.B. Free radical metabolism in human erythrocytes. **Clinica Chimica Acta**, v.390, p.1–11, 2008.

CINTRA, I.P.; VON DER HEYDE, M.E.D.; SCHIMITZ, B.A.S., FRANCESCHINI, S.C.C., TADDEI, J.A., SIGULEM, D.M. Métodos de inquéritos dietéticos. **Cadernos de Nutrição**, v.13, p.11-23, 1997.

CIPOLLONE, F.; FAZIA, M.L.; MEZZETTI, A. Oxidative stress, inflammation and atherosclerotic plaque development. **International Congress Series**, v.1303, p.35-40, 2007.

COLPO, E.; BEM, A.F.; PIENIZ, S.; SCHETTERT, S.D.; SANTOS, R.M.S.; GOMES FARIAS, I.L.; BERTONCELLO, I.; MOREIRA, C.M.; BARBOSA, N.V.; MORETTO, M.B.; TEIXEIRA ROCHA, J.B. A single high dose of ascorbic acid and iron is not correlated with oxidative stress in healthy volunteers. **Annals of Nutrition & Metabolism**, v.53, n.2, p.79-85, 2008.

COSTA, R.F. **Composição corporal**: teoria e prática da avaliação. São Paulo: Manoli, 2001. 184p.

COSTOPOULOS, C.; LIEW, T.V.; BENNETT, M. Ageing and atherosclerosis: mechanisms and therapeutic options. **Biochemical Pharmacology**, v.75, p.1251-1261, 2008.

COUILLARD, C.; POMERLEAU, S.; RUEL, G.; ARCHER, W.R.; BERGERON, J.; COUTURE, P.; LAMARCHE, B.; BERGERON, N. Associations between hypertriglyceridemia, dietary fat intake, oxidative stress, and endothelial activation in men. **Nutrition**, v.22, n.6, p.600-608, 2006.

DABADIE, H.; PEUCHANT, E.; BERNARD, M.; LERUYET, P.; MENDY, F. Moderate intake of myristic acid in sn-2 position has beneficial lipidic effects and enhances DHA of cholesteryl esters in an interventional study. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.16, n.6, p.375-382, 2005.

DAVIDSON, M.H.; TOTH, P.P. High-density lipoprotein metabolism: potential therapeutic targets. **American Journal of Cardiology**, v.100, p.32N-40N, 2007.

DEGOMA, E.M.; DEGOMA, R.L.; RADER, D.J. Beyond high- density lipoprotein cholesterol levels. **Journal of the American College of Cardiology**, v.51, p.2199-2211, 2008.

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

DIEHR, P.; BERESFORD, S.A.A. The relation of dietary patterns to future survival, health, and cardiovascular events in older adults. **Journal of Clinical Epidemiology**, v.56, n.12, p.1224-1235, 2003.

DOMITROVIĆ, R.; TOTA, M.; MILIN, C. Differential effect of high dietary iron on α -tocopherol and retinol levels in the liver and serum of mice fed olive oil- and corn oil-enriched diets. **Nutrition Research**, v.28, p.263-269, 2008.

DUQUE, F.L.V. Aterosclerose: aterogênese e fatores de risco. **Revista da Sociedade Brasileira de Angiologia e Cirurgia Vascular**, v.7, n.2/3, p.100-116, 1998.

DWYER, J.H.; ALLAYEE, H.; DWYER, K.M.; FAN, J.; WU, H.; MAR, R.; LUSIS, A.J.; MEHRABIAN, M. Arachidonate 5-lipoxygenase promoter genotype, dietary arachidonic acid, and atherosclerosis. **New England Journal of Medicine**, v.350, n.1, p.29-37, 2004.

EDER, E.; WACKER, M.; LUTZ, U.; NAIR, J.; FANG, X.; BARTSCH, H.; BELAND, F.A.; SCHLATTER, J.; LUTZ, W.K. Oxidative stress related DNA adducts in the liver of female rats fed with sunflower-, rapeseed-, olive- or coconut oil supplemented diets. **Chemico-Biological Interactions**, v.159, n.2, p.81-89, 2006.

EMADI-KONJIN, P.; VERJEE, Z.; LEVIN, A.V.; ADELI, K. Measurement of intracellular vitamin C levels in human lymphocytes by reverse phase high performance liquid chromatography (HPLC). **Clinical Biochemistry**, v.38, n.5, p.450-456, 2005.

ESTERBAUER, H.; GEBICKI, J.; PUHL, H.; JUERGENS, G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. **Free Radical Biology & Medicine**, v.13, n.4, p.341-390, 1992.

FAULIN, T.E.S.; SENA, K.C.M.; TELLES, A.E.R.; GROSSO, D.M.; FAULIN, E.J.B.; ABDALLA, D.S.P. Validation of a novel ELISA for measurement of electronegative LDL. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v.46, n.12, p.1769-1775, 2008.

FERNANDES, D.C.; MEDINAS, D.B.; ALVES, M.J.M.; AUGUSTO, O. Tempol diverts peroxynitrite/carbon dioxide reactivity toward albumin and cells from protein-tyrosine nitration to protein-cysteine nitrosation. **Free Radical Biology & Medicine**, v.38, n.2, p.189-200, 2005.

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

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids. **Journal of Biological Chemistry**, v.226, p.497-509, 1957.

FRANKEL, E.N. **Lipid oxidation**. 2.ed. Bridgwater: Oily Press, 2005. (Oily Press Lipid Library, v.18).

FRASER, P.D.; BRAMLEY, P.M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Progress in Lipid Research**, v.43, p.228-265, 2004.

FRIEDWALD, W.T.; LEVY, R.; FREDRICKSON, D.S. Estimations of serum low density lipoprotein cholesterol without use of preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, v.18, p.499-502, 1972.

FUHRMAN, B.; VOLKOVA, N.; AVIRAM, M. Postprandial serum triacylglycerols and oxidative stress in mice after consumption of fish oil, soy oil or olive oil: possible role for paraoxonase-1 triacylglycerol lipase-like activity. **Nutrition**, v.22, p.922-930, 2006.

GALATI, G.; LIN, A.; SULTAN, A.M.; O'BRIEN, P.J. Cellular and *in vivo* hepatotoxicity caused by green tea phenolic acids and catechins. **Free Radical Biology & Medicine**, v.40, n.4, p.570-580, 2006.

GIRONA, J.; MANZANARES, J.M.; MARIMON, F.; CABRE, A.; HERAS, M.; GUARDIOLA, M.; RIBALTA, J.; MASANA, L. Oxidized to non-oxidized lipoprotein ratios are associated with arteriosclerosis and the metabolic syndrome in diabetic patients. **Nutrition Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v.18, n.5, p.380-387, 2008.

GRIENDLING, K.K.; FITZGERALD, G.A. Oxidative stress and cardiovascular injury. Part II: Animal and human studies. **Circulation**, v.108, p.1912-1916, 2003.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3.ed. New York: Clarendon Press; Oxford: Oxford University Press, 1999. p.285, 293, 625. (Oxford Science Publications).

HANSEL, B.; NICOLLE, C.; LALANNE, F. Effect of low-fat, fermented milk enriched with plant sterols on serum lipid profile and oxidative stress in moderate hypercholesterolemia. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.86, p.790-796, 2007.

HARTMAN, L.; LAGO, B.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, v.22, p.475-477, 1973.

VAN HELDEN, Y.G.J.; KEIJER, J.; KNAAPEN, A.M.; HEIL, S.G.; BRIEDE, J.J.; VAN SCHOOTEN, F.J.; GODSCHALK, R.W.L. β -Carotene metabolites enhance inflammation-induced oxidative DNA damage in lung epithelial cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v.46, n.2, p.299-304, 2009.

HODSON, L.; SKEAFF, C.M.; FIELDING, B.A. Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake. **Progress in Lipid Research**, v.47, p.348-80, 2008.

HSU, C.; CHIU, W.; YEH, S. Effects of soy isoflavone supplementation on plasma glucose, lipids, and antioxidant enzyme activities in streptozotocin-induced diabetic rats. **Nutrition Research**, v.23, p.67–75, 2003.

HSU, H.C.; LEE, Y.T.; CHEN, M.F. Effects of fish oil and vitamin E on the antioxidant defense system in diet-induced hypercholesterolemic rabbits. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v.66, p.99-108, 2001.

INSTITUTE OF MEDICINE. Food and Nutrition Board. **Dietary Reference Intakes:** table for vitamins, minerals and macronutrients; organized by age and gender. Washington: National Academies of Science, 2004. Disponível em: http://fnic.nal.usda.gov/nal_display/index.php?info_center=4&tax_level=2&tax_subject=256&topic_id=1342. Acesso em: 02 de julho de 2009

ITO, M.K.; TALBERT, R.L.; TSIMIKAS, S. Statin-associated pleiotropy: possible beneficial effects beyond cholesterol reduction. **Pharmacotherapy**, v.26, p.85S-96S, 2006.

JELLIFFE, D.B. Evaluación del estado de nutrición de la comunidad. Ginebra: WHO, 1978. (Publicação Científica, n.53). *apud*: FRANCESCHINI, S.C.C.; PRIORI, S.E.; ARAÚJO, R.M.A. **Manual de técnicas de obtenção de medidas antropométricas**. Viçosa: [s.n.], 1998.

JENKINS, D.J.A.; KENDALL, C.W.C.; MARCHIE, A.; JOSSE, A.R.; NGUYEN, T.H.; FAULKNER, D.A.; LAPSLEY, K.G.; BLUMBERG, J. Almonds reduce biomarkers of lipid peroxidation in older hyperlipidemic subjects. **Journal of Nutrition**, v.138, n.5, p.908-913, 2008.

JIANG, S.; JIANG, Z.; WU, T.; MA, X.; ZHENG, C.; ZOU, S. Protective effects of a synthetic soybean isoflavone against oxidative damage in chick skeletal muscle cells. **Food Chemistry**, v.105, n.3, p.1086–1090, 2007.

JONES, D.P. Redefining oxidative stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.8, n.9/10, p.1865-1879, 2006.

KAINDL, U.; EYBERG, I.; ROHR-UDILOVA, N.; HEINZLE, C.; MARIAN, B. The dietary antioxidants resveratrol and quercetin protect cells from exogenous pro-oxidative damage. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.4, p.1320-1326, 2008.

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

KALIORA, A.C.; DEDOUSSIS, G.V.Z. Natural antioxidant compounds in risk factors for CVD. **Pharmacological Research**, v.56, p.99-109, 2007.

KAPPUS, H. Lipid peroxidation: mechanisms, analysis, enzymology and biological relevance. In: SIES, H., ed. **Oxidative stress**. London: Academic Press, 1985.

KARLSEN, A.; BLOMHOFF, R.; GUNDERSEN, T.E. High-throughput analysis of vitamin C in human plasma with the use of HPLC with monolithic column and UV-detection. **Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.824, n.1/2, p.132-138, 2005.

LAMBETH, J.D. Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy. **Free Radical Biology & Medicine**, v.43, p.332-347, 2007.

LAPOINTE, A.; COUILARD, C.; LEMIEUX, S. Effects of dietary factors on oxidation of low-density lipoprotein particles. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.17, p.645-658, 2006.

LIAO, J.K. Effects of statins on 3- hidroxy-3- methylglutaryl coenzyme A reductase inhibition beyond low-density lipoprotein cholesterol. **American Journal of Cardiology**, v.96, p.24F-33F, 2005.

LYKKESFELDT, J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. **Clinica Chimica Acta**, v.380, n.1/2, p.50-58, 2007.

MARTINEZ, S.; VALEK, L.; RESETIC, J.; RUZIC, D.F. Cyclic voltammetry study of plasma antioxidant capacity- Comparison with the DPPH and TAS spectrophotometric methods. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v.588, n.1, p.68-73, 2006.

MORI, T.A.; WOODMAN, R.J.; BURKE, V.; PUDDEY, I.B.; CROFT, K.D.; BEILIN, L.J. Effect of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on oxidative stress and inflammatory markers in treated-hypertensive type-2 diabetic subjects. **Free Radical Biology & Medicine**, v.35, n.7, p.772-781, 2003.

NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM. (NCEP) **Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report.** 2001. 1-28. (NIH Publication). Disponível em: <http://www.americanheart.org.htm>. Acesso em: 02 de julho de 2008.

NEGRE-SALVAYRE, A.; DOUSSET, N.; FERRETTI, G.; BACCHETTI, T.; CURATOLA, G.; SALVAYRE, R. Antioxidant and cytoprotective properties of high-density lipoproteins in vascular cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v.41, n.7, p.1031-1040, 2006.

NIBY, M.D.; MATSUMOTO, K.; YAMAMOTO, K.; ABEDI, K.; ESLAMI, P.; HERNANDEZ, G.; SMUTKO, V.; BERGER, M.E.; TUCK, M.L. Dietary fish oil prevents vascular dysfunction and oxidative stress in hyperinsulinemic rats. **American Journal of Hypertension**, v.18 n.2, pt.1, p.213-219, 2005.

NUTRIQUANTI. **Sistema de acompanhamento do consumo alimentar.** (Version 1), 2007. Disponível em: <http://www.nutriquanti.com.br.htm>. Acesso em: 23 de maio de 2008.

OARADA, M.; TSUZUKI, T.; GONOI, T.; IGARASHI, M.; KAMEI, K.; NIKAWA, T.; HIRASAKA, K.; OGAWA, T.; MIYAZAWA, T.; NAKAGAWA, K.; KURITA, N. Effects of dietary fish oil on lipid peroxidation and serum triacylglycerol levels in psychologically stressed mice. **Nutrition**, v.24, n.1, p.67–75, 2008.

PANZA, V.S.P.; WAZLAWIK, E.; SCHUETZ, G.R.; COMIN, L.; HECHT, K.C.; SILVA, E.L. Consumption of green tea favorably affects oxidative stress markers in weight-trained men. **Nutrition**, v.24, n.5, p.433–442, 2008.

PAPAHARALAMBUS, C.A.; GRIENDLING, K.G. Basic mechanisms of oxidative stress and reactive oxygen species in cardiovascular injury. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v.17, p.48-52, 2007.

PARTHASARATHY, S.; LITVINOV, D.; SELVARAJAN, K.; GARELNABI, M. Lipid peroxidation and decomposition - conflicting roles in plaque vulnerability and stability. **Biochimica et Biophysica Acta, Molecular and Cell Biology of Lipids**, v.1781, n.5, p.221-231, 2008.

POLLARD, J.; WILD, C.P.; WHITE, K.L.M.; GREENWOOD, D.C.; CADE, J.E.; KIRK, S.F.L. Comparison of plasma biomarkers with dietary assessment methods for fruit and vegetable intake. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.57, n.8, p.988-998, 2003.

REES, M.D.; KENNETT, E.C.; WHITELOCK, J.M.; DAVIES, M.J. Oxidative damage to extracellular matrix and its role in human pathologies. **Free Radical Biology & Medicine**, v.44, n.12, p.1973-2001, 2008.

RIKITAKE, Y.; KAWASHIMA, S.; TAKESHITA, S.; YAMASHITA, T.; AZUMI, H.; YASUHARA, M.; NISHI, H.; INOUE, N.; YOKOYAMA, M. Anti-oxidative properties of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, contribute to prevention of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **Atherosclerosis**, v.154, n.1, p.87-96, 2001.

ROCHA, K.K.R.; SOUZA, G.A.; EBAID, G.X.; SEIVA, F.R.F.; CATANEO, A.C.; NOVELLI, E.L.B. Resveratrol toxicity: effects on risk factors for atherosclerosis and hepatic oxidative stress in standard and high-fat diets. **Food and Chemical Toxicology**, v.47, n.6, p.1362-1367, 2009.

SASAZUKI, S.; HAYASHI, T.; NAKACHI, K.; SASAKI, S.; TSUBONO, Y.; OKUBO, S.; HAYASHI, M.; TSUGANE, S. Protective effect of vitamin C on oxidative stress: a randomized controlled trial. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v.78, n.3, p.121-128, 2008.

SCHÖNFELD, P.; WOJTCZAK, L. Fatty acids as modulators of the cellular production of reactive oxygen species. **Free Radical Biology & Medicine**, v.45, p.231-241, 2008.

SIEKMEIER, R.; STEFFEN, C.; MARZ, W. Role of oxidants and antioxidants in atherosclerosis: results of *in vitro* and *in vivo* investigations. **Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics**, v.12, p.265-282, 2007.

SIES, H.; STAHL, W.; SEVANIAN, A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. **Journal of Nutrition**, v.135, p.969-972, 2005.

SOMOGYI, A.; ROSTA, K.; PUSZTAI, P.; TULASSAY, Z.; NAGY, G. Antioxidants measurements. **Physiological Measurement**, v.28, p.R41-R55, 2007.

STEPHENS, J.W.; BAIN, S.C.; HUMPHRIES, S.E. Gene-environment interaction and oxidative stress in cardiovascular disease. **Atherosclerosis**, v.200, p.229-238, 2008.

STEPHENS, J.W.; KHANOLKAR, M.P.; BAIN, S.C. The biological relevance and measurement of plasma markers of oxidative stress in diabetes and cardiovascular disease. **Atherosclerosis**, v.202, p.321-329, 2009.

SUMI, D.; HAYASHI, T.; THAKUR, N.K.; JAYACHANDRAN, M.; ASAI, Y.; KANO, H.; MATSUI, H.; IGUCHI, A. HMG-CoA reductase inhibitor possesses a potent anti-atherosclerotic effect other than serum lipid lowering effects - the relevance of endothelial nitric oxide synthase and superoxide anion scavenging action. **Atherosclerosis**, v.155, n.2, p.347-357, 2001.

TAPIERO, H.; TOWNSEND, D.M.; TEW, K.D. Organosulfur compounds from alliaceae in the prevention of human pathologies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.58, p.183-193, 2004.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; HAWKINS BYRNE, D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.19, n.6/7, p.669-675, 2006.

URSINI, F.; SEVANIAN, A. Postprandial oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, v.383, p.599-605, 2002.

VAISMAN, N.; HAENEN, G.R.M.M.; ZARUK, Y.; VERDUYN, C.; BINDELS, J.G.; VERLAAN, S.; MEIJER, E.P. Enteral feeding enriched with carotenoids normalizes the carotenoid status and reduces oxidative stress in long-term enterally fed patients. **Clinical Nutrition**, v.25, n.6, p.897-905, 2006.

YEUM, K.J.; RUSSELL, R.M.; KRINSKY, N.I.; ALDINI, G. Biomarkers of antioxidant capacity in the hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.430, n.1, p.97-103, 2004.

YOUNG, A.; LOWE, G.M. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.385, p.20-27, 2001.

WILLCOX, J.K.; CATIGNANI, G.L.; ROBERTS, L.J. Dietary flavonoids fail to suppress F2-isoprostane formation *in vivo*. **Free Radical Biology & Medicine**, v.34, p.795-799, 2003.

WILLCOX, B.J.; CURB, J.D.; RODRIGUEZ, B.L. Antioxidants in cardiovascular health and disease: key lessons from epidemiologic studies. **American Journal of Cardiology**, v.101, p.75D-86D, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The world health report 2004- changing history**. Geneva: World Health Organization, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity: preventing and managing the global epidemic: report of a WHO Consultation**. Geneva: World Health Organization, 2000. 256p. (WHO Technical Report Series, 894).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases**. Geneva: World Health Organization, 2003.

Anexo 1**❖ DADOS PESSOAIS:**

Data: __/__/__

nº do protocolo: _____

Paciente: _____ Sexo:

M F

Telefone: _____ Idade: _____ anos

Profissão: _____

Doença de Base:

- () Hipercolesterolemia
- () Hipercolesterolemia familiar
- () Síndrome metabólica
- () Dislipidemia

❖ DADOS SÓCIOECONÔMICOS E CULTURAIS:**• Grau de Escolaridade:**

- () 1º grau completo
- () 1º grau incompleto
- () 2º grau completo
- () 2º grau incompleto
- () Ensino superior completo
- () Ensino superior incompleto
- () Analfabeto

• Renda Familiar:

- () menor que R\$ 500,00
- () R\$ 500,00 a R\$ 1.000,00
- () R\$ 1.000,00 a R\$ 2.000,00
- () Mais que R\$ 2000,00

- **Em relação a sua vida social:**

() Faz o uso de bebida alcoólica

(Frequência: _____ Quantidade: _____)

() Fuma

(Frequência: _____ Quantidade: _____)

- **Faz exercícios regularmente? () Não () Sim**

() Caminhada

() Ginástica

() musculação

() natação

() bicicleta

() nenhum

() outros:

—

Com que frequência?

() Diariamente

() 2 vezes na semana

() 3 vezes por semana

() 5 vezes por semana

- **Faz o uso de algum tipo de medicação? () Não () Sim**

() atorvastatina

() Sinvastatina

() Atenolol

() Propanolol

() Captopril

() Puran T4

() Outros hormônios para tireóide

() Outros:

• **Faz o uso de algum tipo de suplemento? () Não () Sim**

() ômega 3

() Cálcio

() vitaminas

() Proteína

() Outros:

—

AVALIAÇÃO NUTRICIONAL ANTROPOMÉTRICA

Estatura (cm)	
Peso	
Circun.cint (cm)	
Circun.quadril (cm)	

Anexo 2

Registro Alimentar

Data: __/__/__

Nome: _____

Refeição	Alimento	Quantidade
Café da Manhã Horário:		
Lanche da manhã Horário:		
Almoço Horário:		
Lanche Horário:		
Jantar Horário:		
Ceia Horário:		

() Dia Típico

() Dia Atípico

Anexo 3

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**
Comitê de Ética em Pesquisa - CEPOfício CEP nº 68/2007

São Paulo, 29 de maio de 2007.

Ilmo(a). Sr(a).
Profa. Dra. Inar Alves de Castro
FBA

Prezado(a) Senhor(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 28 de maio de 2007, **APROVOU** o projeto "Efeito da dieta na variação de biomarcadores do 'stress' oxidativo em indivíduos com dislipidemia" (Protocolo CEP nº 427) apresentado por Vossa Senhoria, devendo apenas ser providenciado as seguintes alterações:

- a) Substituir, no projeto em metodologia, 'grupo placebo' por 'grupo controle' ;
- b) No TCLE:
 - b.1. o item IV – 1, 2 e 3 deverão ser detalhados e redigidos em consonância com o objetivo do projeto, incluindo os benefícios esperados;
 - b.2. retirar o item IV – 4, uma vez que não há indenização prevista;
 - b.3. retirar do último parágrafo do item III "...ou para membros de sua família."

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Prof. Dra. Valentina Porta
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
FCF/USP

Anexo 4

DATA DA ENTRADA: 20 de agosto de 2007.

DATA DA 1ª AVALIAÇÃO: 04 de setembro de 2007.

DATA DA 2ª AVALIAÇÃO: 02 de outubro de 2007.

CAAE: 0078.1.131.018-07

N.º DO PROTOCOLO NO CEP: 3554.

(ESTE N.º DEVERÁ CITAR NAS CORRESPONDÊNCIAS REFERENTES A ESTE PROJETO)

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dr. Marcelo Chiara Bertolami

PROJETO DE PESQUISA: "Aplicação de Técnicas Estatísticas Multivariadas na Avaliação de Associações entre Biomarcadores do Stress Oxidativo e Fatores Dietéticos em indivíduos com Dislipidemia".

Comentários/Considerações:

O objetivo desse estudo será medir a presença desses radicais nas amostras de sangue e avaliar se os alimentos que você ingere através da dieta estão protegendo seu organismo. Para isso, iremos perguntar através de um questionário, quais são os alimentos que você costuma comer normalmente e vamos coletar uma amostra de seu sangue agora e daqui a 30 dias."

Ao se proceder à análise ao projeto em questão, considera-se que:

- a) O projeto preenche os requisitos fundamentais das resoluções CNS 196/96, 251/97 e 292/99, sobre as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, do Conselho Nacional de Saúde / Conselho Nacional de Ética em Pesquisa / Agência Nacional de Vigilância Sanitária e as Boas Práticas de Pesquisa Clínica do ICH-GCP.
- b) O Comitê de Ética em Pesquisa avaliou o Protocolo de Estudo e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

- c) O Comitê de Ética em Pesquisa segue os preceitos das resoluções CNS196/96, 251/97 e 292/99, sobre as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, do Conselho Nacional de Saúde / Conselho Nacional de Ética em Pesquisa / Agência Nacional de Vigilância Sanitária e as Boas Práticas de Pesquisa Clínica do ICH-GCP.

Diante do exposto, O Comitê de Ética em Pesquisa, manifesta-se pela:

- **Protocolo de Estudo - Aprovado**
- **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Aprovado**

Documentos Entregue:

- Informação de currículo dos investigadores;
- Declaração da autorização da chefia do setor para coleta dos dados;
- Orçamento detalhado;
- Declaração de destino do material coletado;
- Declaração de que os resultados se tornem públicos;
- Termo de compromisso do investigador;
- Declaração de privacidade dos dados;
- Protocolo com as modificações solicitadas – Emenda 1;
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido com as modificações solicitadas;
- Folha de rosto.

Situação: Projeto avaliado e aprovado em reunião 02 de outubro de 2007.

São Paulo, 02 de outubro de 2007.

Pedro L. Farsky

Pedro Silvio Farsky
Coordenador CEP
CRM 55073

AV.DR.DANTE PAZZANESE,500-PRÉDIO 1- IBIRAPUERA-04012-180-S.P
Telefax:(11) 5085-6040 cepidpc@terra.com.br