BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

**Biodisponibilidade da clorofilina cúprica e seu impacto
sobre o estresse oxidativo e parâmetros nutricionais em
estudo com ratos**

Bárbara Bicalho Gomes

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Prof.^a Dr.^a Ursula Maria Lanfer Marquez

19854
São Paulo
2009

DEDALUS - ACERVO - CQ

30100016532

Ficha Catalográfica

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

Gomes, Bárbara Bicalho

G633b Biodisponibilidade da clorofilina cúprica e seu impacto
sobre o estresse oxidativo e parâmetros nutricionais em estudo
com ratos / Bárbara Bicalho Gomes. - São Paulo, 2009.
122p.

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

Orientador: Lanfer Marquez, Ursula Maria

I. Biodisponibilidade : Nutrição experimental 2. Antioxidante :
Ciência dos alimentos I. T. II. Lanfer Marquez, Ursula Maria,
orientador.

641.1 CDD

Bárbara Bicalho Gomes

**Biodisponibilidade da clorofilina cúprica e seu impacto sobre o
estresse oxidativo e parâmetros nutricionais em estudo com
ratos**

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof.^a Dr.^a Ursula Maria Lanfer Marquez
Orientador

Presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, 16/12 de 2009.

**“Tua caminhada ainda não terminou...
A realidade te acolhe
dizendo que pela frente
o horizonte da vida necessita
de tuas palavras
e do teu silêncio.**

**Se amanhã sentires saudades,
lembra-te da fantasia e
sonha com tua próxima vitória.
Vitória que todas as armas do mundo
jamais conseguirão obter,
porque é uma vitória que surge da paz
e não do ressentimento.**

**É certo que irás encontrar situações
tempestuosas novamente,
mas haverá de ver sempre
o lado bom da chuva que cai
e não a faceta do raio que destrói**

**Não faças do amanhã
o sinônimo de nunca,
nem o ontem te seja o mesmo
que nunca mais.
Teus passos ficaram.
Olhes para trás...
mas vá em frente
pois há muitos que precisam
que chegues para poderem seguir-te.”**

(Charles Chaplin)

DEDICATÓRIA

À minha mãe

Marli Bicalho

Pelo exemplo e amor incondicional. Pelos valores ensinados, por ser minha melhor amiga, por abrir mão dos seus sonhos em favor dos nossos, por ter sempre a palavra certa na hora certa, por ser minha mãe! A melhor do mundo!

Aos meus irmãos

Rafael Bicalho, Marco Túlio Bicalho e Eugênio Bicalho

Por sempre me apoiarem, cada um ao seu modo. Tudo se torna mais fácil tendo a certeza de que sempre posso contar com vocês e que por mais que nos separemos sempre estaremos juntos. Que sorte a minha poder compartilhar a vida com vocês! A conquista de um é a comemoração de todos, só nós sabemos o que significa cada uma delas. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Os últimos anos foram repletos de momentos felizes, novas amizades, grandes saudades e aprendizados. Às pessoas que estiveram ao meu lado, mesmo que distantes, os agradecimentos não se limitam à realização deste trabalho. Pois graças a vocês hoje posso dizer que valeu a pena!

Agradeço:

A Deus, por todos os dias ter motivos para agradecer, por tantas oportunidades, por uma vida tão feliz, por ter o privilégio de ter uma família e amigos tão queridos.

À **Prof^a. Ursula M. Lanfer Marquez**, por me receber como aluna e me direcionar na realização desta pesquisa. Por ser uma profissional extremamente competente, e por sempre me instigar na busca de novos conhecimentos. Meus sinceros agradecimentos por propiciar meu crescimento profissional e pessoal!

Ao **Prof. Elísio Evangelista**, da Universidade Federal de Ouro Preto, por ter sido meu grande incentivador. Pela maestria no ensino da bioquímica e pelo grande exemplo de profissional que és para mim!

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

À **Prof^a. Silvia Berlanga**, pela valiosa colaboração na realização deste trabalho. E pelas sugestões na banca de qualificação.

A todos os professores do Departamento de Alimentos e Nutrição experimental (FCF/USP) pelos ensinamentos transmitidos. Em especial aos professores **Inar Castro** e **João Nascimento** pelo grande aprendizado durante a realização do Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE). Ao Prof. **Jorge Mancini Filho**, pela atenção e conselhos em momentos difíceis.

À **Prof^a. Nágila Damasceno** por avaliar meu trabalho e pelas importantes sugestões.

Ao Prof. **José Luís Guerra** pelas análises histológicas e suporte técnico.

À Chr. Hansen pelo fornecimento das amostras de Clorofilina cúprica, essenciais no desenvolvimento do trabalho.

Ao pessoal do biotério pela simpatia e competência.

Aos amigos estatísticos que tanto se empenharam em me ajudar, cada um em uma fase deste trabalho: **Cecília Medrano, Ismenia Blavatsky e Leonardo Girardi**. Sempre pacientes e dispostos a me ajudar a desvendar a “chatística”.

Aos estagiários, **Fernanda Chino e Marcelo Koike**, pela grande ajuda. Agradeço especialmente àquela que se tornou uma grande amiga: **Juliana Almeida**.

À **Capes** pela bolsa concedida.

À **FAPESP** (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo suporte financeiro de auxílio à pesquisa, tornando viável o desenvolvimento do trabalho.

À minha mãe, **Marli Bicalho**, meu exemplo de vida, minha melhor amiga, por me conhecer mais que a mim mesma, é incrível como por tantas vezes meus “grandes” problemas se tornaram mínimos ao escutar seus conselhos. Por inúmeras vezes, graças a isso foi suportável a distância. Obrigada por ser sempre meu porto seguro, por ter abdicado de tudo pelos filhos e hoje se realizar com os nossos sonhos.

Aos meus irmãos, **Rafael Bicalho, Marco Túlio Bicalho** (meu irmão gêmeo) e **Eugênio Bicalho**, por terem se tornado homens admiráveis e por sempre estarem ao meu lado. Saibam que tenho muito orgulho de tê-los como irmãos! Que sejamos sempre um por todos e todos por um!

Ao meu pai, **Ângelo Gomes**, que com seus exemplos e atitudes muito me ensinou e me tornou uma pessoa mais forte. Obrigada pelo incentivo e torcida sempre.

À minha avó querida, **Ruth de Mattos**, por ser um exemplo de força para todos nós.

À toda minha família, em especial aos meus tios **Zazá, Marinã, Chico e Mira** pelo incentivo constante aos estudos de todos os sobrinhos.

À minha prima-gêmea **Mariana Bicalho**, por todo o apoio e incentivo quando só haviam dúvidas. Apesar da distância ter nos tirado a convivência tão próxima, você será sempre a irmãzinha que não tive! Obrigada por tudo!

Ao **Matheus Moreira**. Não tenho palavras para lhe agradecer por SEMPRE estar disposto a me ajudar. Saiba que te admiro muito. Nada que faça será o suficiente para retribuir. Agradeço também à sua mãe, **Zuleide Campos**,

pelo carinho com que sempre me recebeu. Nunca vou me esquecer das suas palavras de apoio e incentivo à minha vinda para São Paulo.

Às queridas amigas de república:

Beatriz Protti, por ter me recebido tão bem quando tudo era tão estranho.

Cecília Medrano, você tornou tudo mais fácil. Obrigada por ser amiga e também minha companheira nas baladinhas e viagens.

Viviane Linda, pela amizade construída ao longo desses anos.

Lauren Russo, pela convivência e apoio.

E especialmente à **Anna Flávia Rocha**, pelo seu jeito meigo e doce. Pelas conversas tão agradáveis, pela amizade sincera e otimismo. E também por estar sempre disposta a me ajudar nas revisões. E a **Mauren Russo**, pelos bons momentos compartilhados, conversas, risadas e principalmente por ser uma das poucas a me apoiar e entender nas mudanças radicais dos últimos meses.

Obrigada, meninas! Por terem sido como uma família e pelos momentos felizes que dividimos!

Ao meu querido amigo **Augusto Giovanetti**, por muitas vezes ser como um irmão, e por sempre me socorrer quando preciso. Como é bom ter um amigo como você!

À minha eterna amiga **Anelise Andrade**. Obrigada pelo apoio incondicional. Pelas conversas raras, mas sempre tão felizes. Por sempre me ajudar a rir dos meus defeitos e erros, ao invés de me julgar. Podemos ficar meses sem nos falar que sempre será como se tivéssemos passado a tarde juntas na faculdade. Amo você!

À **Illana Louise**, minha amiga de todas as horas: viagens, frans, lanterna, rei, jp, eldorado, USP, "ó". A sua amizade tornou tudo mais fácil e mais feliz. Obrigada por tudo! Por todos os momentos que compartilhamos. Com certeza, em sua maioria de grandes felicidades. Amizade que levarei pra vida inteira! Saiba que te admiro muito, você é minha irmã do coração.

Ao **Rodrigo Holanda**, que também se tornou um grande amigo! Obrigada pelos momentos de descontração, pelo seu bom humor e suas histórias que sempre me levam as gargalhadas.

À **Juliana Almeida** (Juliete), minha florzinha! Pelo carinho, atenção, companheirismo. Por sua alegria contagiante. Por sempre me escutar e se fazer

tão presente em minha vida. Com certeza a sua amizade foi uma das mais importantes que aqui conquistei. Obrigada amiga!

À **Elma Wartha** (barô), agradeço muito a esta querida amiga! Por além de me ajudar nas análises das enzimas, sempre me socorrer, dando conselhos tão preciosos. Obrigada pela amizade sincera e companheirismo.

À **Ana Mara de Oliveira** (mimosinha), por sempre estar disposta a ajudar. Por tantas risadas no PAE, pelas conversas infundáveis pelos corredores da faculdade. Obrigada pelo carinho e atenção com que sempre me escuta.

À **Liliane Pires** (Lili), por sempre me dar abraços tão carinhosos. Pela sua sensibilidade e especialmente pelas conversas e palavras de apoio.

À **Eliane Bonifácio**, por ser tão meiga e amiga. Você é um anjinho.

Ao **Jorge Roberto**, que aos poucos também se tornou um grande amigo. Obrigada pelo apoio e torcida.

Às grandes amigadas que conquistei no Laboratório de Análise de Alimentos:

À **Karla Oliveira**, por ter me recebido com tanto carinho no Laboratório. Obrigada pela atenção e companheirismo. E por ter esse coração enorme que conquista a todos ao seu redor.

À **Cinthya Higashi**, pela ajuda com os ratinhos. Pelo sorriso doce, por sempre ajudar a todos com tanta dedicação.

À **Tais Motta**, pelos ensinamentos. Foi muito bom trabalhar com você.

À **Thaís Campos** (Thaizetes), por sempre estar sorrindo, pelo bom humor. Por ser companheira e amiga!

À **Isabel Massaretto** (Belzita), pela alegria que contagia a todos. Pelo carinho e conselhos.

À **Ana Aline Bine**, por sempre me receber com um sorriso no rosto. Pela ajuda e torcida.

À **Daniela Borrmann** pelas conversas e incentivo. À **Vanilda Arruda**, pelo bom humor e risadas. Agradeço ainda pelos bons momentos, conversas, e convívio diário, à **Marina Moriya**, **Renata Neves**, **Riana Jordão**, **Luciana Tedesco**, **Patrícia Sinnecker**, **Bruno Garcia** e **Alexandre Bera**.

Aos queridos amigos do Laboratório de Lipídes, por me receberem tão bem, pelas conversas agradáveis e por sempre se mostrarem tão dispostos a

colaborar: **Felipe Gomes, Rosângela Pavan, Milessa da Silva, Lucilia Rabelo e Claudimar Oliveira.**

Aos colegas do curso: **Vivianne Rocha, Leo Torres e Cassiana Ganem.**

Às queridas amigas da graduação **Marta Salgueiro, Renata Netto e Livia Garcia**, pela torcida. Apesar da distância vocês estão sempre presentes nas minhas boas lembranças.

Ao **Vinícius Quintão**, pelo incentivo e carinho em um momento um tanto quanto conturbado. O seu apoio foi essencial. Muito obrigada!

Aos funcionários da secretaria de Alimentos e Nutrição Experimental, **Edilson, Cléo, Mônica** pela prontidão em atender aos pedidos de todos.

Aos responsáveis pela Secretaria de Pós Graduação, **Jorge de Lima** e especialmente à **Elaine Midori**, pelo carinho com que sempre me recebeu e por ter me estendido a mão quando precisei.

A todos os funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela boa vontade, dedicação e eficiência no desempenho de seus trabalhos. Especialmente a **Lurdinha, Cida, Josefa** e ao **Rodrigo** pela colaboração e por sempre ser tão atencioso.

À bibliotecária **Leila Bonadio**, da biblioteca do Conjunto das Químicas da USP, pela revisão das referências bibliográficas.

Agradeço ainda a:

Tomaz Roberto, por ter me apoiado em vários momentos, pelas caronas e conversas.

Marcos Tamae, pelo apoio e incentivo e à sua família por ter me recebido tão bem em sua casa.

André Gomes, por não medir esforços em me ajudar.

Finalmente, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Aqueles que não foram aqui nomeados, sintam-se lembrados e cobertos de carinho, pois é assim que os tenho.

“Sonho que se sonha só, é só um sonho que se sonha só. Mas sonho que se sonha junto é realidade.”

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS	III
ABREVIATURAS E SIGLAS	IV
RESUMO	VI
ABSTRACT	VIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. CLOROFILA E CLOROFILINA CÚPRICA	4
2.1.1. ESTRUTURA QUÍMICA	4
2.1.2. CLOROFILINA CÚPRICA COMO CORANTE ALIMENTAR	8
2.1.3. ATIVIDADE ANTICARCINOGENÉTICA E ANTIMUTAGÊNICA	10
2.1.4. MECANISMOS DE AÇÃO PARA A ATIVIDADE ANTIMUTAGÊNICA E ANTICARCINOGENÉTICA	13
2.1.5. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	16
2.1.6. EFEITOS ADVERSOS	19
2.1.7. DIGESTÃO E METABOLIZAÇÃO DA CLOROFILINA	21
2.2. RADICAIS LIVRES E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs)	24
2.3. ESTRESSE OXIDATIVO E PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	25
2.4. ANTIOXIDANTES	27
2.4.1. ANTIOXIDANTES ENDÓGENOS	28
2.4.1.1. ENZIMAS ANTIOXIDANTES	28
2.4.2. ANTIOXIDANTES EXÓGENOS	30
2.4.2.1. VITAMINA E	30
3. OBJETIVOS	34
3.1. OBJETIVO GERAL	34
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34

4. EXPERIMENTOS REALIZADOS	34
4.1. EQUIPAMENTOS	35
4.2. REAGENTES	35
4.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	36
4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
5. EXPERIMENTO I: BIODISPONIBILIDADE DA CLOROFILINA CÚPRICA <i>IN VIVO</i>	37
5.1. JUSTIFICATIVA	37
5.2. MATERIAL E MÉTODOS	37
5.2.1. ENSAIO BIOLÓGICO	37
5.2.2. ANÁLISES QUÍMICAS	41
5.2.2.1. EXTRAÇÃO DOS DERIVADOS DA CHL-CU	41
5.2.2.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	42
5.2.2.3. COMPOSIÇÃO DAS DIETAS	43
5.2.2.3.1. UMIDADE	43
5.2.2.3.2. LIPÍDEOS	44
5.2.2.3.3. RESÍDUO MINERAL FIXO	44
5.2.2.3.4. PROTEÍNAS	45
5.2.2.3.5. CARBOIDRATOS	45
5.2.3. EXAME HISTOLÓGICO DO INTESTINO	46
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.3.1. COMPOSIÇÃO DA DIETA AIN-93G	46
5.3.2. ANÁLISE HISTOLÓGICA	47
5.3.3. DETECÇÃO DE DERIVADOS DA CHL-CU NO SORO SANGUÍNEO E TECIDOS <i>IN VIVO</i>	49
5.3.4. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE NO TRATO GASTROINTESTINAL E ABSORÇÃO DOS DERIVADOS DA CHL-CU	52
5.3.4.1. ANÁLISE DA CHL-CU COMERCIAL POR CLAE	52
5.3.4.2. ANÁLISE DO SORO SANGUÍNEO	55
5.3.4.3. ANÁLISE DOS TECIDOS HEPÁTICO E RENAL	56
5.3.5. ANÁLISE DAS FEZES	59
6. EXPERIMENTO II: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS ANTIOXIDANTES	62
6.1. JUSTIFICATIVA	62
6.2. MATERIAL E MÉTODOS	62
6.2.1. ENSAIO BIOLÓGICO	62

6.2.2. PREPARO DOS HOMOGENATOS DO CÉREBRO E FÍGADO	66
6.2.2.1. HOMOGENATO DE CÉREBRO	66
6.2.2.2. HOMOGENATO DE FÍGADO	67
6.2.3. MEDIDA DA PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)	67
6.2.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE	68
6.2.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA CATALASE	69
6.2.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE	70
6.2.7. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUTASE	70
6.2.8. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS NOS TECIDOS	71
6.2.9. COMPOSIÇÃO DAS DIETAS	71
6.2.10. EXAME HISTOLÓGICO DO FÍGADO	71
6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
6.3.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA DIETA AIN-76A	71
6.3.2. AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE DIETA, GANHO DE PESO DOS ANIMAIS E DO COEFICIENTE DE EFICÁCIA ALIMENTAR (CEA)	72
6.3.3. TEORES DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS) E ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES NO TECIDO HEPÁTICO	72
6.3.4. TEORES DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS) E ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES NO TECIDO CEREBRAL	74
6.3.5. ANÁLISE HISTOLÓGICA	79
7. EXPERIMENTO III: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS NUTRICIONAIS	81
7.1. JUSTIFICATIVA	81
7.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
7.3. MATERIAL E MÉTODOS	87
7.3.1. ENSAIO BIOLÓGICO <i>PAIR FEED</i>	87
7.3.2. ANÁLISES QUÍMICAS	90
7.3.2.1. COMPOSIÇÃO DA DIETA AIN-93G	90
7.3.2.1. DETERMINAÇÃO DO TEOR PROTÉICO DAS FEZES	90
7.3.2.2. DETERMINAÇÃO DA DIGESTIBILIDADE APARENTE DAS PROTEÍNAS	90
7.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	90
7.4.1. GANHO DE PESO E CONSUMO DE DIETA	90
7.4.2. PESO DOS ÓRGÃOS	95
7.4.3. PESO E UMIDADE DAS FEZES	96
7.4.4. TEOR DE NITROGÊNIO E PROTEÍNAS NAS FEZES E DIGESTIBILIDADE PROTÉICA	98

8. CONCLUSÕES	101
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
10. ANEXOS	118

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química das clorofilas <i>a</i> e <i>b</i>	4
Figura 2 – Estrutura química da clorofilina cúprica de sódio	5
Figura 3 – Estruturas químicas da clorina cúprica <i>e</i> ₄ e clorina cúprica <i>e</i> ₆	6
Figura 4 – Cromatogramas representativos de cinco amostras diferentes de clorofilina cúprica comercial	7
Figura 5 – Fotomicrografias de cortes histológicos de intestino delgado de ratos suplementados com 3% de Chl-Cu, coloração H-E	47
Figura 6 – Soro sanguíneo de ratos	49
Figura 7 – Tecido hepático de ratos	50
Figura 8 – Tecido renal de ratos	50
Figura 9 – Cromatograma representativo da Chl-Cu comercial	51
Figura 10 – Espectro de absorção visível: A)clorina cúprica <i>e</i> ₆ ; B)clorina cúprica <i>e</i> ₄	53
Figura 11 – Cromatograma representativo do soro de animais suplementados com Chl-Cu	54
Figura 12 – Cromatograma representativo do soro de animais que receberam dieta controle	55
Figura 13 – Cromatograma representativo do extrato de tecido hepático de animais suplementados com Chl-Cu	56
Figura 14 – Cromatograma representativo do extrato de tecido renal de animais suplementados com Chl-Cu	56
Figura 15 – Espectro de absorção de pico eluído em 17,5 minutos, presente nos tecidos hepático e renal de animais suplementados com Chl-Cu	57
Figura 16 – Cromatograma representativo das fezes de animais suplementados com Chl-Cu	59
Figura 17 – Fotomicrografias de cortes histológicos de fígados de ratos	79
Figura 18 – Evolução do ganho de peso médio dos animais durante o período experimental	82
Figura 19 – Consumo de dieta pelos animais durante o período experimental	84

Figura 20 – Consumo total de dieta durante o período experimental	90
Figura 21 – Ganho de peso total durante o experimento	91
Figura 22 – Teor de nitrogênio fecal	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição da dieta basal AIN-93G _____	38
Tabela 2 – Composição da mistura de minerais AIN-93G _____	39
Tabela 3 – Composição da mistura de vitaminas AIN-93G _____	39
Tabela 4 – Composição centesimal das Dietas AIN-93G (g/100g) _____	46
Tabela 5 – Composição da dieta basal AIN-76A _____	63
Tabela 6 – Composição da mistura de vitaminas AIN-76A _____	64
Tabela 7 – Composição da mistura de minerais AIN-76A _____	65
Tabela 8 – Composição centesimal das Dietas AIN-76A (g/100g) _____	72
Tabela 9 – Teores de TBARS no tecido hepático _____	73
Tabela 10 – Atividade específica de enzimas no tecido hepático _____	74
Tabela 11 – Teores de TBARS no tecido cerebral _____	74
Tabela 12 – Atividade específica de enzimas no tecido cerebral _____	77
Tabela 13 – Ganho de Peso dos animais durante o período de 9 semanas _____	82
Tabela 14 – Consumo de dieta, em gramas, durante o período experimental ____	84
Tabela 15 – Coeficiente de Eficácia Alimentar _____	86
Tabela 16 – Coeficiente de Eficácia Alimentar _____	92
Tabela 17 – Peso relativo de órgãos (g/100 g de peso corporal) _____	95
Tabela 18 – Peso das fezes pré e pós liofilização e umidade (%) _____	96
Tabela 19 – Teor de proteína consumida e excretada e digestibilidade protéica aparente _____	99

ABREVIATURAS E SIGLAS

ACR	Acrilamida
AD	Ad libitum
AFB ₁	Aflatoxina B ₁
B[α]P	Benzo[α]pireno
BCA	Ácido bincichoninico
BPDE	Benzo[α]pireno-7,8-diidrodiol-9,10-epóxido
CAT	Catalase
CEA	Coeficiente de eficácia alimentar
Chl-Cu	Clorofilina Cúprica
CHO-K1	Células de ovário de hamster chinês
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DMH	1,2 dimetilhidrazina
DPPH	2,2 difenil-1-picril-hidrazil
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAO/WHO	Food and Agriculture Organization/World Health Organization
FAD	Flavina mononucleotídeo
FDA	Food and Drug Administration
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
H-E	Hematoxilina-eosina
ICR-191	Acridina 2-metoxi-6-cloro-9-(3-2-cloroetil)aminopropilamino
IQ	2-Amino-3-metilimidazol-[4,5,f] quinolina
IDA	Ingestão Diária Aceitável
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
MDA	Malonaldeído
NADPH	β-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato - forma reduzida
NOEL	No observed effect level
8-OH-dG	8-hidroxideoxiguanosina
PF	<i>Pair fed</i>

PhIP	2-amino-1-metil-6-fenilimidazol-[4,5- b] piridina
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TMA	Trimetilamina
TMAO	Trimetilamina-N-óxido

RESUMO

GOMES, B.B. **Biodisponibilidade da clorofilina cúprica e seu impacto sobre o estresse oxidativo e parâmetros nutricionais em estudo com ratos.** 2009. 122p. Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

A ingestão de clorofilina cúprica (Chl-Cu), na forma de corante ou suplemento alimentar tem sido associada a potenciais efeitos benéficos e à prevenção de doenças crônicas. Contudo, são poucos os estudos relativos à sua absorção *in vivo*, atividade antioxidante e impacto no estado nutricional. Diante desses fatos, foram realizados três experimentos com ratos, nos quais foram fornecidas dietas suplementadas com 0,1 e 3% de Chl-Cu. No primeiro experimento foi comprovada a absorção da Chl-Cu para o sangue e distribuição para fígado e rins. A análise da Chl-Cu comercial por CLAE evidenciou a presença de dois componentes principais, a clorina cúprica e_4 e clorina cúprica e_6 . A clorina cúprica e_4 foi efetivamente absorvida e detectada no soro, fígado e rins, enquanto a clorina cúprica e_6 não foi detectada. Esses resultados indicam que a clorina cúprica e_6 foi degradada durante a passagem pelo trato gastrointestinal ou não foi absorvida e distribuída para os órgãos. A análise histológica do intestino não indicou qualquer alteração morfológica. No segundo experimento foi avaliado o potencial antioxidante da Chl-Cu em ratos sob estresse oxidativo induzido por deficiência de vitamina E, e administração concomitante de Chl-Cu na dieta. A Chl-Cu foi capaz de proteger o tecido cerebral contra o aumento nos níveis de TBARS, mas o mesmo não foi observado no tecido hepático. Não houve diferença significativa na atividade das enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GPx e GR) entre os grupos controle, deficiente em vitamina E e suplementado com Chl-Cu. Desta forma, o efeito antioxidante da Chl-Cu parece ser relacionado a uma proteção contra a peroxidação lipídica *in situ*, mas não com a modulação enzimática. Foi possível observar ainda, que os animais que receberam suplementação com Chl-Cu apresentaram ganho de peso menor que os respectivos controles. Um terceiro experimento foi realizado para investigar se o reduzido ganho de peso dos animais foi causado pela baixa aceitação da dieta ou estaria relacionado a algum efeito antinutricional da Chl-Cu. Em ensaio biológico *pair-fed*, o efeito

negativo da Chl-Cu no desenvolvimento dos animais foi confirmado. A ingestão do pigmento levou também a uma diminuição na digestibilidade protéica aparente indicando ter havido comprometimento na absorção do N protéico e possivelmente de algum outro nutriente. A literatura indica a formação de complexos da Chl-Cu com diferentes componentes alimentares apoiando a hipótese de que a Chl-Cu possa ter interferido na utilização de proteínas e possivelmente de outros nutrientes pelo organismo animal.

Palavras-chave: Clorofilina cúprica, biodisponibilidade, absorção, peroxidação lipídica, atividade antioxidante.

ABSTRACT

GOMES, B.B. **Bioavailability of dietary sodium copper chlorophyllin and its impact on oxidative stress and nutritional parameters study in rats**. 2009. 122p. Thesis (Doctoral) – School of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo - Brazil, 2009.

The ingestion copper chlorophyllin (Cu-Chl) in form of as food colorant or supplement has been associated with potential beneficial effects and the prevention of chronic diseases. However, little is known about Cu-Chl absorption *in vivo*, its antioxidant activity and its impact on status nutritional. In view of these facts, three experiments were carried out on rats fed 1 and 3% Cu-Chl supplemented diets. In the first experiment, the absorption of the pigment into the bloodstream and distribution to the liver and kidneys was comproved. HPLC analysis of food-grade Cu-Chl evidenced two main components, copper-chlorin e₆ and copper-chlorin e₄. The Cu-chlorin e₄ was effectively absorbed and found in serum, liver and kidneys, while Cu-chlorin e₆ was not detected. This result indicates that Cu-chlorin e₆ was either not absorbed and distributed to organs or was degraded during its passage through the gastrointestinal tract. Histological analyses of the intestine did not show any morphological alteration. In a second experiment the antioxidant potential of Cu-Chl in rats under oxidative stress induced by vitamin E deficiency and simultaneous Cu-Chl administration in diet was investigated. The presence of chlorophyllin protected brain tissue from increased TBARS levels, however the same effect was not observed in liver. There was no significant differences in activities of antioxidant enzymes (CAT, SOD, GPX and GR) among control, vitamin E deficient and Cu-Chl-supplemented groups. Therefore, any antioxidant effect of Cu-Chl seems to be related to *in situ* protection against peroxidation but not to antioxidant enzyme modulation. Weight gains of the animals receiving Cu-Chl supplemented diets were lower than those of the control group. A third experiment was conducted to evaluate whether the reduced weight gain was caused by low food acceptance or by an antinutritional effect of Cu-Chl. This biological *pair-fed* test confirmed the negative effect of Cu-Chl on the development of rats. The pigment ingestion also decreased the apparent protein digestibility indicating that N protein and possibly other nutrients

had its absorption compromised. Literature evidenced formation of Cu-Chl complexes with different food components supporting the hypothesis that Cu-Chl might have interfered in the utilization of proteins and possibly other nutrients by the animal organism.

Keywords: copper chlorophyllin; bioavailability; absorption; lipid peroxidation; antioxidant activity;

1. INTRODUÇÃO

A clorofila, sob ponto de vista estrutural, é formada por um anel tetrapirrólico coordenado por um íon Mg^{+2} central, sendo a lipofilicidade desta molécula devida à presença do álcool fitol. A clorofilina cúprica (Chl-Cu) é um derivado semi-sintético hidrossolúvel produzido a partir de vegetais verdes, sem o grupo fitílico e no qual o átomo de magnésio é substituído por outros metais como zinco ou cobre, sendo comercializada na forma de sais de sódio e/ou potássio. Estes derivados são mais estáveis e por isso apresentam um custo inferior ao da clorofila natural, justificando seu emprego na maioria dos estudos de avaliação de efeito biológicos, realizados *in vitro* e *in vivo* (SARKAR *et al.*, 1994; LANFERMARQUEZ, 2003; SCOOTER *et al.*, 2005).

A clorofilina cúprica atualmente é comercializada em vários países, incluindo o Brasil, como corante verde e/ou aditivo tanto na indústria de alimentos, quanto na indústria farmacêutica. Além disso, é crescente seu consumo como suplemento alimentar.

A agência reguladora norte-americana *Food and Drug Administration* (FDA) considera inócua a adição de até 3% de clorofilina cúprica na dieta de ratos e com reduzida probabilidade de apresentar qualquer efeito adverso. Para seres humanos a FDA permite a utilização de Chl-Cu como desodorante interno para indivíduos com incontinência urinária em doses de até 300mg ao dia (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2002).

Referências a este pigmento têm aumentado significativamente na literatura científica recente devido, em grande parte, aos trabalhos que descrevem propriedades antimutagênicas, anticarcinogênicas e antioxidantes em estudos *in vivo* e *in vitro* (CHERNOMORSKY, 1994; FERRUZZI e BLAKESLEE, 2007;

PRATT *et al.*, 2007; SIMONICH *et al.*, 2007; ORNER *et al.*, 2008). A atividade anticarcinogênica atribuída à molécula de clorofilina pode ser explicada por sua capacidade de formar complexos com agentes cancerígenos como a aflatoxina. Estudo clínico realizado na China demonstrou que a ingestão de clorofilina promoveu um decréscimo de 50% da excreção urinária de aflatoxina N⁷ guanina, um biomarcador associado ao risco aumentado de desenvolvimento de câncer hepático (EGNER *et al.*, 2003).

Estudos científicos sugerem ainda, que a ingestão de clorofilas e de seus derivados semi-sintéticos, podem fornecer proteção antioxidante. Estudos *in vitro* realizados com a clorofila natural *a* e *b*, bem como com os derivados feofitinas e feoforbídeos evidenciaram atividade antioxidante, embora variável para cada composto, quando avaliada pela metodologia do descoramento do beta-caroteno em sistema de emulsão contendo metil-linoleato (LANFER-MARQUEZ *et al.*, 2005). Em estudo semelhante, a Chl-Cu comercial apresentou atividade antioxidante mais pronunciada quando comparada a clorofila natural, pelo método de captação do radical livre 2,2 difenil-1-picril-hidrazil (DPPH[•]) e ensaio de descoloração do radical 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato (ABTS⁺). Segundo os autores, este resultado pode estar relacionado com a substituição do magnésio pelo cobre e com a solubilidade da molécula (FERRUZZI *et al.*, 2002a).

Kumar *et al.*, (2004), relatam que a Chl-Cu ofereceu proteção contra a peroxidação lipídica e apoptose em linfócitos esplênicos de ratos, induzida por irradiação, demonstrando assim, o efeito antioxidante da clorofilina *in vitro* e *in vivo*. Em estudo similar, Bloor *et al.*, (2000) examinaram *in vitro* o possível efeito preventivo da clorofilina na indução de dano oxidativo por radiação gama ou por fotossensibilização utilizando mitocôndrias hepáticas de ratos. Os autores

observaram que o pigmento ofereceu um grau muito maior de proteção quando comparado com antioxidantes convencionais como o ácido ascórbico e a glutathione (GSH).

Apesar de um crescente número de estudos relatar os efeitos benéficos da clorofilina, pouco se sabe e se tem estudado sobre sua absorção pelo trato gastro intestinal e metabolização.

Deste modo, a ingestão de Chl-Cu, na forma de corante ou suplemento alimentar, aliado à propaganda de inúmeros efeitos benéficos à saúde, justifica a avaliação de sua absorção *in vivo*, visto que poucos dados são conhecidos a este respeito. Além disto, justifica o estudo do potencial antioxidante da Chl-Cu em animais sob estresse oxidativo induzido pela deficiência de vitamina E, e do impacto do consumo desse pigmento no estado nutricional dos animais.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CLOROFILA E CLOROFILINA CÚPRICA

2.1.1 ESTRUTURA QUÍMICA

As clorofilas representam uma família de pigmentos naturais verdes, presentes em tecidos fotossintéticos de todas as plantas superiores, podendo ser encontrados também em algas e algumas bactérias fotossintéticas. Quimicamente, a clorofila é uma porfirina formada por quatro anéis pirrólicos, coordenados com um íon de magnésio (Mg^{2+}) no centro. Um quinto anel isocíclico (V), é localizado ao lado do terceiro (III) anel pirrólico. Adicionalmente, as clorofilas possuem um álcool isoprenóide monoinsaturado, o fitol ($C_{20}H_{39}OH$), que é esterificado com a carboxila do quarto anel (IV) conferindo hidrofobicidade à molécula. As clorofilas *a* e *b* ocorrem juntas na natureza, em geral, em uma razão aproximada de 3:1 (HENDRY e HOUGHTON, 1996). A clorofila *b* difere da clorofila *a* por apresentar um grupo aldeído (-CHO) no lugar do grupamento metila no anel II (GROSS, 1991) (Figura 1).

Figura 1. Estrutura química das clorofilas *a* e *b*.

A instabilidade das clorofilas naturais a ácidos, calor e luz é bem estabelecida (FERRUZZI *et al.*, 2002a), dificultando a sua aplicabilidade como corante. Deste modo, derivados mais estáveis vêm sendo utilizados em substituição ao pigmento natural.

A busca por pigmentos verdes mais estáveis resultou no desenvolvimento da Chl-Cu, um derivado hidrossolúvel semi-sintético produzido a partir de extratos brutos de clorofila. Sua obtenção ocorre a partir da saponificação destes extratos em meio alcalino, acarretando a remoção do grupo fitol e a clivagem do anel isocíclico. Paralelamente, o magnésio central é substituído por cobre. Esse processo resulta na produção de uma mistura de ácidos mono, di e tricaborxílicos que podem formar sais com sódio ou potássio (Figura 2) (SARKAR *et al.*, 1994; CHERNOMORSKY *et al.*, 1997).

Figura 2. Estrutura química da clorofilina cúprica de sódio

As preparações comerciais de clorofilina compreendem uma mistura de vários derivados da clorofila, denominados clorinas (CHERNOMORSKY, 1994; MORTENSEN e GEPPEL, 2007). Análises dessas preparações indicam que os componentes mais comuns são a clorina cúprica e₆, na forma de ácido tricarboxílico, e a clorina cúprica e₄, um ácido dicarboxílico (Figura 3).

Figura 3. Estruturas químicas da clorina cúprica e₄ e clorina cúprica e₆

As diferenças na composição da clorofilina são devidas à variabilidade na matéria prima utilizada para sua obtenção (ex: alfafa, ervas, urtiga, espinafre e algas) e do processo tecnológico empregado. Estudos detalhados demonstram que além das clorinas cúpricas e₄ e e₆, podem ser detectados outros derivados, como: feoforbídeo cúprico, purpurina cúprica 7, rodina cúprica g₇, pirofeoforbídeo a, porfirinas cúpricas, dentre outros. É possível encontrar ainda, derivados sem o metal (INOUE *et al.*, 1994; MORTENSEN e GEPPEL, 2007).

Mortensen e Geppel (2007), analisaram por cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas, cinco diferentes preparações comerciais de Chl-Cu e encontraram grandes variações de composição (Figura 4).

Figura 4. Cromatogramas representativos de cinco amostras diferentes de clorofilina cúprica comercial (MORTENSEN e GEPPEL, 2007).

A clorofilina cúprica de sódio é a preparação mais comercializada. A remoção do grupo fitol, introdução de cobre e conversão para o sal de sódio, seguida de lavagem e purificação, conferem a este pigmento semi-sintético solubilidade em água e características químicas e físicas particulares, como uma maior estabilidade comparada à clorofila natural (INOUE *et al.*, 1994). O cobre proporciona uma coloração verde estável ao pigmento, tornando-o resistente aos agentes que normalmente degradam a clorofila natural, como pH ácido, luz e aquecimento (HUMPHREY, 2004).

2.1.2 CLOROFILINA CÚPRICA COMO CORANTE ALIMENTAR

A *Food and Agriculture Organization* (FAO) define os aditivos alimentares como:

“toda substância, que não apresenta valor nutritivo, adicionada ao alimento com a finalidade de impedir alterações, manter, conferir ou intensificar seu aroma, cor e sabor; modificar ou manter seu estado físico geral, ou exercer qualquer ação exigida para uma boa tecnologia de fabricação do alimento”

(FAO, 1974).

A presença de diferentes e inúmeros compostos químicos nos alimentos justifica o interesse e a necessidade de se avaliar a inocuidade dos aditivos, bem como regulamentar seu uso. Em 1962, a *Food and Agriculture Organization/World Health Organization* (FAO/WHO) designou um comitê de especialistas em aditivos alimentares, denominado Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), para avaliar sistematicamente o potencial tóxico, a mutagenicidade e a carcinogenicidade dessas substâncias. O JECFA, baseado em dados experimentais, tem a missão de recomendar, ou não, o uso de determinado aditivo. Este órgão também é responsável por estabelecer a Ingestão Diária Aceitável (IDA) para cada aditivo alimentar, indicando a quantidade que pode ser consumida diariamente de forma segura e por toda a vida, sem apresentar riscos à saúde humana, dentro dos conhecimentos atuais (ANTUNES e ARAUJO, 2000). A IDA é usualmente expressa em miligramas ou microgramas da substância por quilo de peso corporal.

Cada país apresenta um órgão responsável pela regulamentação do uso de aditivos de alimentos em seu território. Nos Estados Unidos, o órgão

responsável é o *Food and Drug Administration* (FDA). No Brasil, a regulamentação dos aditivos alimentares é responsabilidade da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

A Chl-Cu é autorizada e amplamente comercializada em muitos países como corante alimentar. A FDA estima como seguro um consumo diário de 90 mg/pessoa de clorofilina cúprica de sódio por consumidores acima de dois anos de idade (FDA, 2002).

Em 2002, a FDA avaliou a segurança do uso da clorofilina cúprica de sódio como corante alimentar, após um requerimento feito pela Kraft Foods Inc., relacionado à adição deste pigmento a bebidas cítricas (FDA, 2002). A agência norte-americana revisou publicações científicas relevantes, dentre elas um estudo realizado por Harrison e colaboradores (1954), em que a clorofilina cúprica de sódio e potássio foi oferecida a ratos em concentrações de até 3% na dieta por até dois anos. A FDA concluiu não haver indicações de efeitos adversos aos ratos em qualquer uma das doses testadas durante o consumo deste aditivo alimentar. Adicionalmente, no estudo avaliado não foi evidenciada toxicidade do metal (FDA, 2002).

O mesmo estudo, realizado em 1954, foi também avaliado pelo JECFA que considerou o consumo da Chl-Cu inócuo para os animais, e assim estabeleceu a dose do pigmento em que não são observados efeitos (NOEL-*no observed effect level*). Aplicando um fator de segurança de 200 vezes sobre o valor do NOEL, a agência calculou a IDA da Chl-Cu, para humanos de 60 kg, como sendo de 450 mg/pessoa/dia (FAO/WHO, 1975). A partir desses dados, a FDA calculou que o consumo diário estimado para a Chl-Cu corresponde a 1/5 do consumo diário aceitável, e desta forma concluiu que o uso da Chl-Cu como corante alimentar é

apropriado e seguro, aprovando o requerimento feito pela Kraft Foods, para o uso em bebidas cítricas (FDA, 2002).

No Reino Unido, a Chl-Cu faz parte da lista elaborada pelo “Conselho e Parlamento Europeu sobre o uso de corantes em gêneros alimentícios”. O uso do pigmento foi permitido em uma ampla variedade de alimentos *quantum satis* (quantidade suficiente para obter o efeito tecnológico necessário), sendo o seu consumo diário aceitável de 15 mg/kg de peso corporal/dia (GREAT BRITAIN, 1993). No entanto, segundo os autores, existem poucos dados relativos ao seu consumo, uma vez que um número crescente de pessoas costuma ingerir a Chl-Cu na forma de suplemento alimentar o que dificulta a obtenção de estimativas de ingestão (GREAT BRITAIN, 1993).

No Brasil, a ANVISA não estabeleceu um limite máximo para a utilização da Chl-Cu como corante alimentar, permitindo seu uso *quantum satis* em alimentos listados (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008).

2.1.3 ATIVIDADE ANTICARCINOGÊNICA E ANTIMUTAGÊNICA

Inúmeros estudos têm evidenciado que a Chl-Cu tem potente atividade antimutagênica e anticarcinogênica em uma variedade de modelos de estudo *in vitro* e em experimentos com bactérias, com animais e órgãos alvo, destacando-se aqueles realizados com *Salmonella typhimurium*, *Drosophila*, truta e ratos (HARTING e BAILEY, 1998; NEGRAES *et al.*, 2004a). Em sua revisão Waters e colaboradores (1996) descrevem a Chl-Cu como uma molécula que apresenta um efeito antimutagênico contra numerosos agentes presentes em alimentos e no meio ambiente, que apresentam estrutura aromática e planar incluindo a aflatoxina B₁ (AFB₁), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e aminas heterocíclicas.

Suas propriedades anticarcinogênicas foram inicialmente demonstradas em modelo com trutas. Em estudo realizado por Dashwood *et al.*, (1991), a Chl-Cu e a AFB₁ foram co-administradas na dieta, e os níveis de adutos AFB₁-DNA, considerados biomarcadores do risco de câncer hepático, foram determinados após um, três, cinco e sete dias. A Chl-Cu foi fornecida em doses crescentes (0, 0,5, 1,0 e 2,0 g/kg de dieta) de acordo com a administração do carcinógeno. Observou-se um efeito dose dependente, de forma que um aumento na dose de Chl-Cu produziu concomitante decréscimo no número de adutos formados, sendo que a maior dose (2,0 g/kg de dieta) acarretou uma inibição de 70%. Esta potente inibição da formação de adutos induzida pela AFB₁ em trutas, foi confirmada em estudos posteriores realizados pela mesma equipe de pesquisadores (BREINHOLT *et al.*, 1995; DASHWOOD *et al.*, 1998). Recentemente, Simonich e colaboradores (2007), observaram que a Chl-Cu foi capaz de reduzir em 63% o número médio de criptas aberrantes no cólon de ratos da linhagem Fisher-344 expostos à AFB₁.

Foi realizado na cidade de Qidong, China, estudo duplo cego com humanos constantemente expostos a alimentos contaminados com AFB₁. Tal pesquisa demonstrou que os participantes que receberam Chl-Cu três vezes por dia, durante quatro meses, apresentaram uma redução de 50% no nível médio de excreção urinária de aflatoxina N⁷ guanina quando comparados com indivíduos do grupo placebo, confirmando a ação quimiopreventiva da Chl-Cu. A excreção deste biomarcador vem sendo associada ao aumento do risco de desenvolvimento de câncer hepático em estudos prospectivos epidemiológicos (EGNER *et al.*, 2001).

Conforme já mencionado, a Chl-Cu tem se mostrado efetiva não apenas contra a AFB₁, mas também contra outros agentes carcinógenos. Em estudo com

ratas fêmeas da linhagem Fisher-344, verificou-se que o oferecimento concomitante do pigmento e do carcinógeno 2-amino-1-metil-6-fenilimidazol-[4,5-b] piridina (PhIP) reduziu a multiplicidade de adenocarcinoma mamário (HASEGAWA *et al.*, 1995). A administração por gavagem de 15 mg de Chl-Cu/kg de peso corporal a ratas fêmeas ICR, 30 minutos antes da aplicação tópica de dibenzo[α]pireno (DBP) e de seu metabólito carcinogênico benzo[α]pireno-7,8-diidrodiol-9,10-epóxido (BPDE) acarretou redução significativa na incidência e multiplicidade de papilomas na pele dos animais iniciados por estes compostos (PARK e SURH, 1996).

Baseando-se no fato de que dietas ricas em carnes vermelhas e pobres em vegetais verdes estão associadas a um risco aumentado de câncer de cólon, Vogel e colaboradores (2005a), avaliaram em ratos, o efeito da suplementação de dietas com o grupo protéstico heme, presente em inúmeras proteínas como a hemoglobina e a mioglobina, na presença do espinafre ou clorofila. Os autores observaram que a dieta suplementada com heme aumentou a citotoxicidade no cólon e estimulou a proliferação de colonócitos, além de inibir a esfoliação destas células. A oferta concomitante de espinafre ou clorofila na dieta, por sua vez, inibiu estes efeitos tóxicos, além de prevenir a formação de metabólitos citotóxicos produzidos a partir do grupo heme. Estudo semelhante, realizado com a Chl-Cu não evidenciou os mesmos efeitos positivos (VOGEL *et al.*, 2005b). Estes resultados indicam que a clorofila natural e a Chl-Cu podem não apresentar necessariamente as mesmas propriedades biológicas, uma vez que esta é hidrossolúvel e aquela, lipossolúvel.

Pratt *et al.*, (2007), avaliaram a atividade quimiopreventiva da Chl-Cu contra o hidrocarboneto DBP em trutas, e foi observado que este pigmento foi

efetivo em reduzir os adutos de DNA e a incidência final de tumores no estômago e no fígado. Em outro estudo, a habilidade da Chl-Cu em reagir com o agente mutagênico acridina 2-metoxi-6-cloro-9-(3-2-cloroetil) aminopropilamino (ICR-191) foi investigada *in vitro*, evidenciando uma forte associação da ICR-191 com o pigmento, superior à associação do ICR-191 com o DNA (PIETRZAK *et al.*, 2008).

2.1.4 MECANISMOS DE AÇÃO PARA A ATIVIDADE ANTIMUTAGÊNICA E ANTICARCINOGÊNICA

Inúmeros estudos têm sido realizados para evidenciar o mecanismo de ação para as atividades anticarcinogênica e antimutagênica da Chl-Cu. Os seguintes mecanismos foram propostos: formação de complexos com agentes genotóxicos, agindo a Chl-Cu como molécula “interceptora”; atividade antioxidante, pelo sequestro de espécies reativas de oxigênio, além da interferência ou inibição não específica de enzimas do citocromo P450 envolvidas na bioativação de carcinógenos ou outras enzimas metabolizantes (NEAULT *et al.*, 1998; EDENHARDER *et al.*, 1995; BRONZETTI *et al.*, 1990; NEGISHI *et al.*, 1990; TACHINO *et al.*, 1994; DASHWOOD *et al.*, 1996; KUMAR *et al.*, 1999). Além disso, estudos têm sugerido uma atividade moduladora no sistema de reparo de DNA (BEZ *et al.*, 2001 a e b; RAMPAZO *et al.*, 2002) e da resposta imune (SHARMA *et al.*, 2007; YUN *et al.*, 2006).

A hipótese da ação como molécula “interceptora” é uma das mais aceitas, sendo amplamente descrita na literatura; a Chl-Cu formaria complexos moleculares com compostos aromáticos planares, como por exemplo, o hepatocarcinógeno AFB₁, o hidrocarboneto aromático policíclico, DBP, e as aminas heterocíclicas, PhPI e 2-amino-3-metilimidazol-[4,5,f] quinolina (IQ). Dessa forma o pigmento bloquearia a absorção destes compostos, reduzindo ou

impedindo a interação com tecidos-alvo, levando conseqüentemente, à diminuição da formação de adutos com o DNA.

Os primeiros estudos *in vitro* sobre a complexação da Chl-Cu com mutágenos foram realizados por Arimoto *et al.*, (1993). Tais autores verificaram que a Chl-Cu ligada à sefarose como suporte sólido foi capaz de se complexar fortemente com mutágenos de estrutura policíclica planar, em particular com a AFB₁ e a quinacrina. Em estudo posterior, realizado pelo mesmo grupo de pesquisadores, a Chl-Cu foi imobilizada pelo uso da quitosana como suporte sólido, e verificou-se que essa forma insolúvel da Chl-Cu foi efetiva também na adsorção de aminas heterocíclicas, IQ e PhIP, dentre outras (ARIMOTO *et al.*, 1997). A clorofilina-quitosana também preveniu a formação de adutos induzidos por aminas heterocíclicas em ratos (HAYATSU *et al.*, 1999).

Em 1995, Breinholt e colaboradores, relataram que a Chl-Cu foi capaz de formar *in vitro* fortes complexos não covalentes com a AFB₁. Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisa, demonstrou a formação desse complexo AFB₁-Chl *in vivo*, apoiando a hipótese da sua contribuição para a redução da biodisponibilidade de AFB₁ sistêmica e assim na sua mutagenicidade/carcinogenicidade relativa (BREINHOLT *et al.*, 1999; HAYASHI *et al.*, 1999).

Confirmando esses resultados, Mata e colaboradores (2004), avaliaram a absorção de DBP, AFB₁ e PhPI utilizando a linhagem de células do epitélio intestinal humano Caco-2 na presença da Chl-Cu. Observou-se que o transporte da AFB₁ e DBP foi significativamente inibido pelo pigmento, o que apóia o modelo de ligação direta da Chl-Cu a carcinógenos no trato intestinal.

Estudos têm mostrado ainda, que a complexação da Chl-Cu com diferentes compostos ocorreria não só no intestino, mas apresentaria também uma atividade pós-absortiva *in situ*, como por exemplo, atividade antioxidante (PIETRZAK *et al.*, 2003).

Verificou-se recentemente que em soluções aquosas contendo DNA, a Chl-Cu foi capaz de formar complexos com cada um dos três intercaladores de DNA: laranja da acridina, quinacrina e doxorubicina. Os resultados apóiam o papel da Chl-Cu como molécula interceptora, neutralizando a atividade biológica de compostos aromáticos incluindo mutágenos e drogas antineoplásicas (PIETRZAK *et al.*, 2006).

Finalmente, supõe-se que o pigmento pode interagir também com outros componentes da dieta ou outros compostos presentes no trato gastrointestinal, alterando a biodisponibilidade dos mesmos. Estudo realizado por Yamazaki *et al.*, (2004), com pacientes apresentando trimetilaminúria, uma alteração metabólica caracterizada pela incapacidade em oxidar e converter a trimetilamina (TMA) da dieta, em trimetilamina-N-óxido (TMAO), mostrou que a ingestão de 180 mg Chl-Cu/dia durante três semanas foi capaz de reduzir a concentração da TMA urinária livre e aumentar a concentração de TMAO para concentrações similares às observadas em indivíduos normais. Segundo os autores, um possível mecanismo seria a complexação da Chl-Cu com alimentos que apresentam a TMA em sua composição, retardando ou impedindo sua absorção, e levando à eliminação da TMA diretamente nas fezes.

2.1.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Dentre os mecanismos estudados para explicar as propriedades antimutagênica e anticarcinogênica da Chl-Cu contra uma ampla variedade de agentes mutagênicos, destaca-se uma possível atividade antioxidante (DASHWOOD *et al.*, 1998; CHUNG *et al.*, 1999; KUMAR *et al.*, 1999).

Os primeiros estudos foram realizados por Sato e colaboradores (1977 e 1980a). A Chl-Cu apresentou atividade antioxidante *in vitro* por supressão da peroxidação lipídica em homogenatos de fígado de ratos. Segundo os autores, as clorinas cúpricas, principais compostos da Chl-Cu seriam responsáveis por esta atividade. A clorina cúprica e_4 foi identificada como o principal antioxidante encontrado na Chl-Cu de grau comercial (SATO *et al.*, 1980b e 1986). Adicionalmente, o pré-tratamento com Chl-Cu ofereceu proteção contra lesão hepática em ratos induzida por administração de tetracloreto de carbono (CCl_4). A peroxidação de lipídeos de membrana de células hepáticas seria uma das principais causas da toxicidade do CCl_4 . Desta forma, segundo o autor, o efeito preventivo da Chl-Cu seria consequência da inibição da peroxidação lipídica hepática (SATO *et al.*, 1985).

A comparação do efeito da Chl-Cu e de antioxidantes convencionais como o ascorbato, glutatona, manitol e tert-butanol, em mitocôndrias hepáticas expostas à radiação gama evidenciou que a Chl-Cu ofereceu um grau maior de proteção que os outros compostos, na inibição da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (BOLOOR *et al.*, 2000). Apoio a estes resultados foi obtido em estudo *in vitro* no qual a Chl-Cu apresentou potente capacidade antioxidante contra diferentes espécies reativas de oxigênio (EROs)

dentre eles o radical estável 2,2 difenil-1-picril-hidrazil (DPPH*) (KUMAR *et al.*, 2001).

Park e colaboradores (2003) investigaram o papel da atividade antioxidante da Chl-Cu como mecanismo ativo da inibição da promoção de tumor induzido por acetato de 12-o-tetradecanoilforbol-13 (TPA). Avaliou-se o efeito inibitório da Chl-Cu na geração de radicais superóxido em células leucêmicas HL-60 diferenciadas e na formação de bases oxidadas em DNA de timo de bezerros. Segundo os autores, a Chl-Cu foi capaz de reduzir, de maneira dose-dependente, a geração de radicais superóxido estimulada pelo TPA. A formação de 8-hidroxideoxiguanosina (8-OH-dG), um marcador do dano oxidativo, no DNA de timo de bezerro tratado com H₂O₂/UV também foi inibida pelo pigmento de maneira dependente da dose. Assim, esses resultados sugerem que as propriedades antioxidantes da Chl-Cu seriam importantes na inibição da promoção de tumor induzido por TPA.

No ano seguinte, Kumar *et al.*, (2004) relataram que a Chl-Cu ofereceu proteção contra a peroxidação lipídica e apoptose em linfócitos esplênicos isolados de ratos, induzida por radiação gama.

A atividade deste pigmento prevenindo os efeitos da radiação foi estudada ainda por Kamat *et al.*, (2000), que avaliaram *in vivo* e *ex vivo* seu efeito contra danos à membrana de mitocôndrias de ratos expostos à radiação gama e a agentes indutores de estresse oxidativo. Mitocôndrias hepáticas isoladas de ratos Wistar quando expostas à radiação (450 Gy) na presença de Chl-Cu apresentaram níveis de TBARS significativamente menores em relação àquelas irradiadas na ausência deste pigmento. O mesmo efeito protetor foi observado em mitocôndrias expostas à fotossensibilização com azul de metileno na presença do

pigmento. O mesmo grupo de pesquisadores examinou *in vitro* o possível efeito preventivo da Chl-Cu na indução de dano oxidativo pela radiação gama e pela fotossensibilização em mitocôndrias hepáticas de ratos. A Chl-Cu ofereceu um maior grau de proteção quando comparado com antioxidantes convencionais como ácido ascórbico e glutathione (BOLOOR *et al.*, 2000).

A capacidade antioxidante *in vitro* da clorofila natural e derivados, assim como da Chl-Cu comercial, foram testadas através do método de captação do radical livre 2,2 difenil-1-picril-hidrazil (DPPH[•]) e pelo ensaio de descoloração do radical 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato (ABTS⁺). Foi verificado que a Chl-Cu apresentou maior capacidade antioxidante quando comparada às clorofilas naturais, sugerindo que este efeito pode estar relacionado com a substituição do magnésio pelo cobre e com a solubilidade da molécula. Além disso, derivados que apresentam íons metálicos na sua estrutura, como a clorofila natural (Mg), as feofitinas e pirofeofitinas (Zn) e a clorofilina (Cu) exibiram uma maior capacidade antioxidante quando comparados aos derivados sem metal, como as clorinas, feofitinas, pirofeofitinas (FERRUZZI *et al.*, 2002a).

As clorofilas *a* e *b*, bem como com os derivados feofitinas e feoforbídeos, evidenciaram atividade antioxidante *in vitro*, embora variável para cada composto, quando avaliados pela metodologia do descolorimento do beta-caroteno em sistema de emulsão contendo metil-linoleato (LANFER-MARQUEZ *et al.*, 2005).

Em um recente estudo, a Chl-Cu apresentou proteção contra o estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio em células endotéliais da veia umbilical humana, mecanismo atribuído à indução da expressão das enzimas heme oxigenase-1 e quinona oxiredutase (ZHANG *et al.*, 2008).

2.1.6 EFEITOS ADVERSOS

Pesquisas realizadas com a Chl-Cu e com a clorofila natural demonstram que tais pigmentos apresentam potencial antigenotóxico, anticlastogênico, antimutagênico e anticarcinogênico em vários sistemas. Contudo, há estudos que descrevem que tanto a Chl-Cu, quanto as clorofilas naturais podem apresentar efeitos genotóxicos, clastogênicos e carcinogênicos (ROMERT *et al.*, 1992; SARKAR *et al.*, 1994 e 1996).

A avaliação da atividade antimutagênica da Chl-Cu contra o agente etil metano sulfonato (EMS), empregando a hipoxantina-guanina fosforibosil transferase, evidenciou um aumento do número de mutações induzidas no locus para esta enzima em células de ovário de hamster chinês (CHO-K1), de modo dose dependente. Sugerindo então, que este pigmento potencializaria a mutagenicidade deste agente alquilante (NEGRAES *et al.*, 2004b).

Em bioensaio de carcinogenicidade com duração de um ano, ratos machos da linhagem Fisher-344 receberam, por gavagem, o mutágeno IQ de duas a três vezes por semana, durante as 35 primeiras semanas do estudo, e concomitantemente 0,1% de Chl-Cu na água de beber. Foi observado de maneira geral que a Chl-Cu diminuiu o número de incidência de tumores por animal para a maioria dos órgãos (fígado, cólon, intestino delgado, pele e glândulas Zymbal, um conjunto de glândulas sebáceas localizadas próximo ao ducto acústico externo em ratos). Por outro lado, a Chl-Cu reduziu o tempo de início para o aparecimento de tumores na pele induzido por IQ. Estes resultados sugerem que a Chl-Cu pode apresentar efeitos diversos, agindo como um quimiopreventivo para os principais órgãos alvo para a tumorigênese com IQ, porém aumentando a incidência de efeitos deletérios na pele (GUO *et al.*, 1995).

Romert e colaboradores (1992), estudaram diferentes sistemas e observaram que a Chl-Cu poderia agir como um agente modificador positivo ou negativo da mutagenicidade. Baixas concentrações do pigmento potencializaram em aproximadamente duas vezes a mutagenicidade de nitrosaminas específicas do tabaco, tanto em ensaios com *Salmonella typhimurium* quanto em ensaio de mutação gênica no locus *hprt* em células de hamster chinês V79. Em contrapartida, altas concentrações de Chl-Cu bloquearam a mutagenicidade dessas nitrosaminas.

Estudos realizados após a etapa de iniciação da mutagênese, também indicam resultados controversos. A administração de 0,1% de Chl-Cu na água de beber durante 20 semanas pós-iniciação induzida por 1,2 dimetilhidrazina (DMH) causou aumento de 10 para 47% na incidência de tumores de cólon (NELSON *et al.*, 1992). Similarmente, tratamento pós-iniciação com 0,01% de Chl-Cu, na água de beber por 47 semanas causou aumento significativo na multiplicidade de tumores no cólon de ratos em resposta ao DMH (XU *et al.*, 2001), embora no mesmo estudo tenha causado uma supressão, dependente da concentração, da formação de tumores hepáticos em ratos tratados com a amina heterocíclica, IQ.

Em outra pesquisa, ratos foram tratados com 130mg de IQ/kg de peso corporal por gavagem e receberam posteriormente, diferentes doses de Chl-Cu na água de beber (0,001, 0,01, 0,1 e 1,0%). Neste caso, foi observado que o tratamento com 0,001% de Chl-Cu, pós-iniciação, aumentou significativamente os focos de criptas aberrantes no cólon de ratos, enquanto concentrações maiores (1% de Chl-Cu) levaram à supressão dessa carcinogênese (BLUM *et al.*, 2003). Estes resultados indicam que as respostas pós-iniciação dependem de protocolo

de exposição, e podem ser influenciadas pelo agente iniciante e pela concentração de Chl-Cu.

Woo e colaboradores (2007) descreveram que o tratamento com Chl-Cu não resultou nos efeitos esperados, visto que a administração de 1% de Chl-Cu na dieta não suprimiu a neurotoxicidade induzida por acrilamida (ACR) em ratos Sprague-Dawley. Semelhantemente, o fornecimento de 0,1% de Chl-Cu na água de beber, não apresentou efeitos significativos em focos pré-neoplásicos no fígado e cólon de ratos da linhagem Fisher-344 (ORNER *et al.*, 2008).

Conforme já mencionado, as preparações comerciais de Chl-Cu compreendem uma mistura complexa de clorinas contendo um, dois ou três ácidos carboxílicos. Entretanto, tem sido observado que estas podem diferir em sua composição e por consequência, em suas propriedades, tais como: atividade antioxidante, fototoxicidade, dentre outros (CHERNOMORSKY, S. 1994).

Deste modo, variações na pureza e composição das preparações comerciais de Chl-Cu, podem explicar alguns dados inconsistentes na literatura. O ideal seria que nos estudos de antimutagenicidade e anticarcinogenicidade com Chl-Cu fossem utilizadas substâncias padrão de composição similar. Contudo, clorinas altamente purificadas, são sensíveis à luz e propensas a complexar em solução, além de extremamente caras, o que dificulta sua manipulação em laboratório. Além do mais, muitos experimentos *in vivo* com estes compostos teriam provavelmente um custo elevado (DASHWOOD, 1997).

2.1.7 DIGESTÃO E METABOLIZAÇÃO DA CLOROFILINA

O termo biodisponibilidade começou a ser utilizado na área de nutrição na década de 1980, a partir do conhecimento de que a simples presença do nutriente no alimento não garantia sua utilização pelo organismo. A biodisponibilidade pode

ser definida como a proporção da substância ingerida que é digerida, absorvida e metabolizada pelo organismo, capaz de estar disponível para uso ou armazenamento (COZZOLINO e MICHELAZZO, 2005).

Embora numerosos estudos com a clorofila natural e a Chl-Cu, tenham demonstrado efeitos biológicos potencialmente benéficos à saúde, informações relativas à digestão, absorção, metabolismo desses fitoquímicos, são absolutamente limitadas (FERRUZZI *et al.*, 2001).

Essa limitação no conhecimento acerca da biodisponibilidade de derivados da clorofila se deve ao reduzido número de pesquisas, uma vez que era consenso na comunidade científica, o fato de que esses compostos não poderiam ser absorvidos por humanos. Contudo, considerando a abundância natural da clorofila em vegetais, e a crescente aplicação da Chl-Cu em alimentos, até uma mínima absorção da clorofila e seus derivados pode apresentar importante significado fisiológico (FERRUZZI e BLAKESLEE, 2007).

Ferruzzi *et al.*, (2001) avaliaram a digestão *in vitro*, simulando as fases de digestão no estômago e intestino delgado, utilizando purê de espinafre e espinafre tratado com calor e ácido ou com ZnCl_2 . A absorção dos pigmentos naturais foi investigada usando linhagens clonais de células intestinais humanas Caco-2. Neste estudo observou-se que as clorofilas nativas são completamente convertidas para feofitinas (sem Mg^{2+}) durante a digestão. Estas foram incorporadas em micelas e subsequentemente acumuladas no interior das células Caco-2. Enquanto a incorporação de carotenóides em micelas foi de 20-40%, a de clorofilas foi de apenas 5-10%. Recentemente, Fernandes *et al.*, (2007), realizaram experimento em cães e concluíram que a absorção aparente da

clorofila e derivados, presentes no espinafre incorporado à dieta dos animais, variou entre 2,5 a 4%.

Posteriormente, Ferruzzi *et al.*, (2002b) realizaram outro estudo *in vitro* para verificar a estabilidade da Chl-Cu, composta principalmente por clorina cúprica e₄ e clorina cúprica e₆, utilizando células clonais TC7 da linhagem de células intestinais humanas Caco-2. A clorina cúprica e₄ foi relativamente estável durante a simulação da digestão. Em contraste, mais que 90% da clorina cúprica e₆ foi degradada em produtos não identificados. A estabilidade durante a digestão *in vitro* e sua assimilação efetiva por células Caco-2, sugere que a clorina e₄, ou seus metabólitos, seriam absorvidos pelo intestino humano.

Estudo clínico realizado na China forneceu as primeiras evidências de que os componentes da Chl-Cu poderiam ser absorvidos por humanos. Os participantes desta pesquisa, receberam 300 mg/dia de Chl-Cu, durante quatro meses. Ao contrário do que ocorreu com a clorina e₆ cúprica, foi possível a identificação de clorina e₄ cúprica e do éster de etil clorina e₄ cúprica no soro destes indivíduos, conferindo-lhe uma cor verde peculiar (EGNER *et al.*, 2000). Embora não existam dados quantitativos, esses resultados apóiam a hipótese de que existe uma efetiva absorção de derivados da Chl-Cu *in vivo*.

A absorção da clorina e₄ cúprica e do respectivo éster, que pode ser um produto de metabolização, após a administração oral de Chl-Cu é relevante uma vez que se contrapõe ao dogma sustentado de que a clorofila é fracamente absorvida pelo trato gastrointestinal, sendo excretada nas fezes sem sofrer alterações, como relatado por Baxter (1968).

2.2 RADICAIS LIVRES E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs)

O termo radical livre se refere a qualquer espécie química capaz de existir independentemente, contendo um ou mais elétrons desemparelhados, ou seja, ocupando isoladamente um orbital atômico ou molecular (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). A presença deste elétron desemparelhado altera a reatividade química do átomo ou da molécula, tornando-os mais reativos que as espécies não radicalares e desta forma, capazes de reagir com diversos alvos celulares (JORDÃO, 1998). Além disso, os radicais livres apresentam uma grande instabilidade e têm uma vida muito curta.

“Espécies reativas de oxigênio” (EROs) é um termo coletivo, que inclui não somente os radicais de oxigênio, tais como, o ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$) e o radical hidroxila ($OH^{\cdot}$), mas também derivados não radicalares do O_2 , como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$), ozônio (O_3) e oxigênio singlete (1O_2) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Pequenas quantidades de EROs são constantemente geradas em organismos aeróbicos durante a função celular normal, como consequência inevitável da existência de moléculas no organismo que necessitam de O_2 (HALLIWELL, 1996a). As EROs podem ser produzidas por reações químicas do O_2 com moléculas como adrenalina, dopamina, tetrahydrofolato e alguns componentes do citocromo P450; esta produção ocorre também durante a respiração celular através do sistema de transporte de elétrons localizado na membrana mitocondrial (SIES, 1986; GIROTTI, 1998). Além desta geração necessária e contínua de EROs, sua produção também pode ocorrer deliberadamente *in vivo*, como na exposição à radiação, ação da enzima óxido nítrico sintase, na biossíntese de hormônios da tireóide e por meio das ações das

células polimorfonucleares ao fagocitarem e destruírem bactérias, dentre outros processos (FRIDOVICH, 1978; HALLIWELL *et al.*, 1995, HALLIWELL, 1996 a e b).

Nas últimas duas décadas tem sido crescente o interesse sobre as espécies reativas de oxigênio (EROs) na medicina experimental e clínica (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; CADENAS e DAVIES, 2000; DROGE, 2002; VALKO *et al.*, 2004 e 2007). Visto que em altas concentrações, as EROs podem ser importantes mediadores de dano a estruturas celulares, incluindo lipídeos de membranas, proteínas e ácidos nucleicos (POLI *et al.*, 2004).

2.3 ESTRESSE OXIDATIVO E PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

O termo estresse oxidativo refere-se essencialmente à situação de um sério desbalanço entre a produção de EROs e a defesa antioxidante. SIES (1986), o definiu como “um distúrbio no balanço pró-oxidante–antioxidante em favor do primeiro, levando a um dano potencial”, muitas vezes denominado dano oxidativo.

Em princípio, o estresse oxidativo pode resultar da:

A) diminuição na capacidade de defesa antioxidante, que pode resultar por exemplo, da inadequação no consumo dos antioxidantes derivados da dieta, tais como: α -tocoferol, ácido ascórbico, aminoácidos sulfurados (necessários na síntese da glutathione reduzida) ou riboflavina (necessária na síntese de FAD, cofator da glutathione redutase), além da depleção de outros constituintes dietéticos, que podem também contribuir para o estresse oxidativo (HALLIWELL, 1996b; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999);

B) produção aumentada de EROs, como consequência por exemplo, da exposição a radiação e a agentes químicos tóxicos ou quando há a ativação

excessiva de células fagocitárias em doenças inflamatórias crônicas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

As células geralmente toleram o estresse oxidativo suave por meio da regulação da síntese de sistemas de defesa antioxidante em uma tentativa de restaurar o balanço. Porém, quando submetidas a estresse oxidativo severo, podem ocorrer sérios danos bioquímicos e fisiológicos ao organismo, decorrentes da peroxidação lipídica de membranas, inativação de sistemas enzimáticos, quebra de ligações protéicas e danos ao DNA (HALLIWELL, 1996a; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

A peroxidação lipídica consiste na reação dos radicais livres com os lipídeos celulares. Os ácidos graxos poliinsaturados presentes nas membranas das células são particularmente susceptíveis ao ataque de radicais livres, principalmente do radical hidroxila (COMPORTI, 1985; GIROTTI, 1998). A peroxidação lipídica é iniciada pelo ataque de qualquer espécie suficientemente reativa, capaz de abstrair um átomo de hidrogênio de um grupo metileno ($-CH_2$) de um ácido graxo. Há geração de radicais peróxidos, os quais também são espécies reativas, iniciando a redução de outro ácido graxo. Esta reação em cadeia pode levar a extensa lesão nas membranas celulares e lipoproteínas plasmáticas (HALLIWELL *et al.*, 1995; HALLIWELL, 1988; COMPORTI, 1985).

Os efeitos decorrentes da peroxidação lipídica são: diminuição da fluidez de membranas, facilidade na troca de fosfolipídeos entre as duas monocamadas da membrana, aumento na permeabilidade da bicamada da membrana a substâncias que habitualmente não a atravessam, a não ser por canais específicos e, inativação de sistemas enzimáticos ligados à membrana (RICHTER, 1987; VALKO *et al.*, 2007). A alteração na permeabilidade das

membranas celulares pode acarretar a perda da homeostase intracelular, e alteração no equilíbrio osmótico causando a ruptura da membrana e consequente morte celular.

Além disso, a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados é conhecida por ser acompanhada pela formação de uma mistura complexa de produtos, incluindo malonaldeído, 4-hidroxinonenal e outros compostos carbonílicos (VALKO *et al.*, 2007). Assim, a peroxidação lipídica de ácidos graxos poliinsaturados de membranas celulares é um evento altamente prejudicial, visto que não somente altera drasticamente a estrutura e função das membranas, mas também gera produtos altamente tóxicos ao organismo (ESTERBAUER, 1996).

2.4 ANTIOXIDANTES

A produção de efeitos deletérios pelas EROs *in vivo* é controlada por diversos sistemas antioxidantes. Um antioxidante pode ser definido como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparada com aquela de um substrato, retarda ou inibe significativamente a oxidação do substrato (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990).

O sistema de defesa antioxidante do organismo é constituído por substâncias endógenas, as quais são sintetizadas no organismo, ou exógenas, obtidas principalmente pela dieta. Os antioxidantes podem agir em diferentes níveis da seqüência oxidativa: de maneira detoxificadora do agente lesivo, antes que ele cause dano oxidativo, por meio do seqüestro de espécies derivadas de O_2 , ligação a íons metálicos que atuam na conversão de espécies fracamente reativas, como $O_2^{\cdot -}$ e H_2O_2 em espécies danosas, como o $OH^{\cdot}$ e bloqueio da propagação da reação radicalar em cadeia; ou pelo reparo e reposição de moléculas danificadas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990). Estes sistemas de

reparo são especialmente importantes nas lesões mutagênicas do DNA induzidas por EROs (DEMPLE e HARRISON, 1994).

2.4.1 ANTIOXIDANTES ENDÓGENOS

O organismo é capaz de sintetizar uma grande variedade de antioxidantes, incluindo o ácido úrico, a glutathiona, a transferrina, a ceruloplasmina e outras metaloproteínas, além das enzimas antioxidantes (SIES, 1993).

2.4.1.1 ENZIMAS ANTIOXIDANTES

O equilíbrio entre a atividade das três principais enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx) é de extrema importância para a manutenção do equilíbrio entre a produção e a remoção dos intermediários reativos de O_2 dos sistemas biológicos.

A atividade da SOD que consiste na dismutação do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) formando peróxido de hidrogênio deve ser complementada pela CAT e GPx, enzimas que catalisam a decomposição do mesmo (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 1994). Assim, a enzima superóxido dismutase converte um radical altamente reativo ($O_2^{\cdot-}$) em outro menos reativo (McCORD e FRIDOVICH, 1969):

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é gerado *in vivo* não só pela dismutação do ânion superóxido catalisada pela SOD, mas também por várias outras enzimas tais como xantina, urato e d-aminoácidos oxidases. Este H_2O_2 é então enzimaticamente catabolizado pela CAT e várias enzimas peroxidases, principalmente a GPx. Na presença de baixas concentrações de H_2O_2 , a GPx é a principal envolvida, enquanto a CAT parece ter um papel mais importante em quadros severos de estresse oxidativo, visto que em altas concentrações de H_2O_2

é a enzima de maior atividade (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; MATÉS, 2000; CHOW, 1988).

A ação da CAT ocorre em duas etapas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999):

Assim, a CAT decompõe o H_2O_2 a H_2O e O_2 , protegendo as células do H_2O_2 gerado. Ainda que a catalase não seja essencial para alguns tipos de células sob condições normais, ela tem um papel importante na aquisição de tolerância ao estresse oxidativo como uma resposta adaptativa das células (MATÉS, 2000).

A GPx, contém selênio no seu sítio ativo e está envolvida não somente na decomposição do H_2O_2 , mas também no metabolismo de peróxidos lipídicos (CHANCE *et al.*, 1979; MADDIPATI e MARNETT, 1987; URSINI e BINDOLI, 1987). A GPx remove o H_2O_2 acoplando sua redução a H_2O com a oxidação da glutathiona reduzida (GSH) a glutathiona oxidada (GSSG) (CHANCE, 1979):

A GSSG formada durante a reação catalisada pela GPx, é reconvertida a GSH pela atividade da glutathiona redutase (GR), uma enzima que contém flavina mononucleotídeo (FAD) um derivado hidrossolúvel da riboflavina (vitamina B2), no seu sítio ativo (THIEME, 1981). A GR utiliza como fonte de poder redutor o NADPH fornecido por vários sistemas enzimáticos, sendo o mais conhecido e

importante a via das pentoses fosfato (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999), pela seguinte reação:

Deste modo, as enzimas GPx e GR têm um papel significativo na detoxificação de peróxidos, regulação da via das pentoses fosfato, e na oxidação e redução da glutathione (CHOW, 1988).

2.4.2 ANTIOXIDANTES EXÓGENOS

Proteção adicional ao estresse oxidativo é fornecida por antioxidantes provenientes da dieta. Os antioxidantes exógenos incluem nutrientes e não nutrientes, os mais comuns são os tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), carotenóides, flavonóides, riboflavina, selênio e zinco (KIEFER *et al.*, 2004).

Uma dieta balanceada tem sido apontada como um importante fator para a manutenção e melhora da defesa antioxidante do organismo. Estudos têm evidenciado que os antioxidantes dietéticos seriam importantes no retardamento e/ou prevenção de certas doenças crônicas não transmissíveis em humanos, especialmente cardiovasculares e alguns tipos de câncer (GEY, 1995; HALLIWELL, 1996b; VALKO *et al.*, 2007).

2.4.2.1 VITAMINA E

O termo vitamina E é a designação genérica de oito compostos químicos encontrados na natureza. Estes são isômeros e apresentam graus variados de atividade vitamínica (SIES *et al.*, 1992; BLATT, LEONARD e TRABER, 2001). Existem quatro isoformas de tocoferol e tocotrienol: α , β , γ , δ . O isômero α -

tocoferol é a forma mais abundante e apresenta a maior atividade biológica dentro da classe dos tocoferóis (BLATT, LEONARD e TRABER, 2001).

A vitamina E é uma vitamina lipossolúvel e se localiza nas membranas lipídicas celulares (QUINN, 2004). Isto lhe permite mover-se entre as camadas da membrana, executando sua principal função, que é interromper a reação em cadeia da peroxidação lipídica. Esta vitamina doa um átomo de hidrogênio principalmente para os radicais peroxila, derivados da oxidação dos ácidos graxos. Nesse processo, há formação de hidroperóxidos lipídicos e do radical α -tocoferoxila (α -tocoferol $^{\bullet}$), que é pouco reativo e não oxida os ácidos graxos das membranas, ocorrendo assim, a interrupção da cadeia radicalar da peroxidação lipídica, (CHAN *et al.*, 1994; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; BRADFORD, *et al.*, 2003; QUINN, 2004):

Sendo muito intenso o processo de lipoperoxidação o α -tocoferol da membrana poderia ser totalmente convertido no radical tocoferoxila, perdendo sua ação como antioxidante. Entretanto, o α -tocoferol é imediatamente regenerado a partir do radical tocoferoxila por substâncias como a vitamina C e a ubiquinona entre outras (PACKER, 1991).

Devido à abundância da vitamina E nos alimentos, raramente se observa deficiência desta vitamina em humanos, embora baixos níveis desta vitamina predisponham a anemia hemolítica em bebês prematuros (MULLER e GOSS-SAMPSON, 1990).

Havendo deficiência em animais, pode ocorrer a oxidação de ácidos graxos insaturados de membrana, levando a alterações da estrutura e função da

mitocôndria, lisossomo e membranas plasmáticas. A deficiência desta vitamina em animais provocaria ainda, problemas no sistema reprodutor como aborto nas fêmeas e degeneração testicular nos machos, bem como distrofia muscular, cardiomiopatia, hemólise eritrocitária, necrose hepática e encefalomalácia, dentre outras disfunções (OLSON, 1973; TRABER, 1994; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

A deficiência experimental de vitamina E em animais de laboratório é um modelo de estudo da peroxidação lipídica, visto que ocasiona uma maior produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), principalmente no tecido hepático, sendo este um índice indireto da peroxidação lipídica. Dietas com quantidade normal de vitamina E, não causam o aumento destas substâncias (VANNUCCHI *et al.*, 1997).

Além disso, esses animais se mostram mais sensíveis aos efeitos tóxicos do O₂ puro. Ratos com deficiência desta vitamina antioxidante exalam mais gases hidrocarbonados, além de apresentar um aumento na taxa de antígenos de células senescentes, uma proteína de superfície celular indicativa de envelhecimento celular (DIPLOCK, 1985; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Curtos períodos de tempo são suficientes para a produção de peroxidação lipídica em ratos com deficiência de vitamina E. Em experimento onde foram sacrificados ratos que ingeriram uma dieta deficiente em vitamina E por 4 e 8 semanas notou-se um aumento de TBARS no tecido hepático em relação aos animais do grupo controle. Entretanto os valores de TBARS não diferiram entre os dois períodos estudados, demonstrando que o período de 4 semanas de deficiência parece ser suficiente para observar alterações em relação à peroxidação lipídica (TOKUMARU *et al.*, 1997).

Em animais, muitos dos sinais de deficiência de vitamina E podem ser parcialmente ou completamente aliviados pelo fornecimento de antioxidantes de bloqueio de reações em cadeia na dieta (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Uma das hipóteses deste trabalho é a de que o aumento na produção de TBARS, observada em ratos alimentados com dieta deficiente em vitamina E seja atenuada pela suplementação com a Chl-Cu.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a absorção e biodisponibilidade da Chl-Cu, seus efeitos na peroxidação lipídica em ratos submetidos a dietas deficientes em vitamina E, bem como avaliar o impacto nutricional do consumo de dieta suplementada com este pigmento.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Experimento I:

- ✓ Caracterizar a composição Chl-Cu comercial adicionada à dieta dos animais;
- ✓ Avaliar a degradação da Chl-Cu e seus derivados durante o processo digestivo;
- ✓ Verificar a absorção e biodisponibilidade da Chl-Cu;
- ✓ Avaliar a integridade da mucosa intestinal;

Experimento II:

- ✓ Medir a atividade de enzimas antioxidantes no fígado e cérebro de ratos Wistar;
- ✓ Avaliar o teor hepático e cerebral das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico;

Experimento III:

- ✓ Avaliar a evolução ponderal, o consumo alimentar e a digestibilidade protéica em animais suplementados com Chl-Cu.

4. EXPERIMENTOS REALIZADOS

O delineamento experimental dos três ensaios biológicos, e os resultados obtidos serão apresentados separadamente. Apresentamos a seguir alguns aspectos comuns à realização dos três experimentos: os equipamentos, os reagentes e alguns parâmetros do delineamento experimental.

4.1 EQUIPAMENTOS

Espectrofotômetro UV/VIS (modelo U3210 Hitachi); espectrofotômetro UV/VIS (modelo UV1650PC Shimadzu); agitador orbital (modelo G67 New Brunswick); centrífuga refrigerada (modelo RC 5C Sorvall Instruments); ultracentrífuga refrigerada (modelo Beckman L8-M); homogenizador tipo Potter-Elvehjem; liofilizador Edwards® (modelo EC Super Modulyo); microcentrífuga refrigerada (Eppendorf 5415R); moinho (Polymix KCH-Analytical mill A10, Kinematica).

4.2 REAGENTES

Clorofilina cúprica de sódio, em forma de pó, 95% de pureza (100,000-WS-C-P), fornecida pela empresa Chr. Hansen. Metanol e clorofórmio (grau HPLC) adquiridos da Merck (Darmstadt, Germany). Xantina, xantina oxidase, glutationa oxidada (GSSG), glutationa reduzida (GSH), glutationa redutase, β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato – forma reduzida (NADPH), ácido tiobarbitúrico (TBA), albumina sérica bovina (BSA), todos adquiridos da Sigma®. Ácido tricloroacético, da J. T. Baker Produtos Químicos Ltda. O kit para ensaio de proteínas pelo método BCA (ácido bicinchonínico) foi obtido da Pierce (Rockford, IL, USA). Os demais reagentes foram de grau analítico.

4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os três experimentos biológicos com animais foram conduzidos no Biotério de Criação e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo após aprovação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da FCF/USP, de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (protocolos nº 48 e 106) (Anexos I e II).

As quantidades de Chl-Cu adicionadas às dietas foram definidas com base nas recomendações do estudo realizado pela Food and Drug Administration (FDA, 2002), que considerou a adição de até 3% de Chl-Cu inócua e sem qualquer efeito adverso, em ratos.

Após o preparo e homogeneização das dietas oferecidas aos animais, foram separadas alíquotas de 200g para análise da composição química, e o restante foi acondicionado hermeticamente em sacos plásticos identificados e armazenados na câmara fria da FCF/USP (~4°C°).

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) e pelo teste de Tukey empregando-se o software Prism 4,0 (GraphPad Software Inc., CA, USA), considerando valores de $P < 0,05$ estatisticamente significativos. Os dados foram expressos como média e desvio padrão.

5. EXPERIMENTO I: *BIODISPONIBILIDADE DA CLOROFILINA CÚPRICA IN VIVO*

5.1 JUSTIFICATIVA

Embora inúmeras pesquisas atribuam efeitos biológicos benéficos à Chl-Cu e derivados, na literatura científica são poucos os estudos relativos à sua digestão, absorção e metabolização.

Pretendeu-se neste estudo avaliar o comportamento da Chl-Cu e derivados durante o processo digestivo, além de uma possível absorção para a corrente sanguínea e incorporação tecidual em ratos.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 ENSAIO BIOLÓGICO

ANIMAIS

Foram utilizados 30 ratos da linhagem Wistar, machos, recém desmamados, com peso aproximado de 60g, provenientes do biotério da FCF-USP, distribuídos aleatoriamente em três grupos, de dez animais cada. Os animais foram mantidos durante quatro semanas em gaiolas metabólicas individuais de aço inox em condições ambientais controladas, com período de iluminação artificial de 12 horas intercalado com outro período também de 12 horas sem iluminação e temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, com livre acesso à dieta e à água.

DIETAS

Os animais foram alimentados com dietas diferentes, preparadas de acordo com as recomendações do *American Institute of Nutrition* (AIN), com base na dieta basal AIN-93G (REEVES *et al.*, 1993), cuja composição é indicada para animais em crescimento (Tabela 1). O grupo controle recebeu essa dieta sem qualquer suplemento, enquanto os dois grupos experimentais receberam a mesma dieta suplementada com porcentagens diferentes de Chl-Cu comercial.

Tabela 1. Composição da dieta basal AIN-93G

Componentes	Quantidade (g/kg)
Amido de milho	397,486
Caseína (mín. 85% proteína)	200,000
Maltodextrina	132,000
Sacarose	100,000
Óleo de soja	70,000
Celulose	50,000
Mistura mineral AIN-93G	35,000
Mistura vitamínica AIN-93G	10,000
L-Cistina	3,000
Bitartarato de colina	2,500
t-butylhidroquinona	0,014

Misturas de minerais e de vitaminas foram elaboradas pela empresa Rhooster (Indústria e Comércio de Alimentos Ltda, SP), seguindo composição indicada para a dieta AIN-93G (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2. Composição da mistura de minerais AIN-93G

Componentes	Quantidade (g/kg)
Carbonato de cálcio	357,00
Fosfato de potássio monobásico	196,00
Cloreto de sódio	74,00
Citrato de potássio	70,78
Sulfato de potássio	46,60
Óxido de magnésio	24,00
Citrato férrico	6,06
Carbonato de zinco	1,65
Carbonato de manganês	0,63
Carbonato de cobre	0,30
Iodato de potássio	0,01
Selenato de sódio	0,01025
Paramolibdato de amônia	0,00795
Metasilicato de sódio	1,45
Sulfato de cromo e potássio	0,275
Cloreto de lítio	0,0174
Ácido bórico	0,0815
Fluoreto de sódio	0,0635
Carbonato de níquel	0,0318
Vanadato de amônia	0,0066
Sacarose	221,026

Mistura de minerais preparada de acordo com as recomendações da AIN-93G

Tabela 3. Composição da mistura de vitaminas AIN-93G

Componentes	Quantidade (g/kg)
Ácido nicotínico	3,000
Pantotenato de cálcio	1,600
Piridoxina HCl	0,700
Tiamina HCl	0,600
Riboflavina	0,600
Ácido fólico	0,200
D-Biotina	0,020
Vitamina B12 0,1% em manitol	2,500
Vitamina E (500 UI/g)	15,000
Vitamina A (500,000 UI/g)	0,800
Vitamina D3 (UI/g 400,000g)	0,250
Vitamina K	0,075
Sacarose	974,655

Mistura de vitaminas preparada de acordo com as recomendações da AIN-93G

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os animais foram distribuídos em três grupos experimentais e alimentados com diferentes dietas durante quatro semanas:

- Grupo A (n=10) – animais alimentados com dieta controle.
- Grupo B (n=10) – animais alimentados com dieta suplementada com 1% de Chl-Cu.
- Grupo C (n=10) – animais alimentados com dieta suplementada com 3% de Chl-Cu.

As fezes de cada animal foram coletadas em frascos individuais durante os sete dias da terceira semana do experimento e armazenadas em congelador a -20°C até o momento das análises. Posteriormente, foram liofilizadas e pulverizadas em moinho.

Ao final das quatro semanas, os animais foram mantidos em jejum por 8 horas, embora com acesso à água e em seguida sacrificados sob efeito do anestésico hidrato de cloral (400mg/kg de peso corporal), via injeção intraperitoneal.

O abdômen foi aberto por uma incisão na linha média. Foram coletados aproximadamente 2 mL de sangue da aorta abdominal. Logo após a coleta, o sangue foi centrifugado em tubos Eppendorf a 5000 x *g* por 10 minutos a 4°C, para obtenção do soro, que foi congelado a -80°C. Em seguida, fígado e rins foram removidos, lavados com solução salina 0,9% e então mantidos em nitrogênio líquido até o armazenamento em freezer a -80°C, para posterior avaliação da presença da Chl-Cu e derivados.

Segmentos do intestino delgado foram removidos, cuidadosamente lavados com solução salina e fixados em formaldeído para a obtenção dos cortes histológicos.

5.2.2 ANÁLISES QUÍMICAS

5.2.2.1 EXTRAÇÃO DOS DERIVADOS DA CHL-CU

Para a realização da análise cromatográfica, 50 mg da Chl-Cu comercial, foram solubilizadas em 50 ml de uma solução metanol/água (80:20, v/v) contendo 1% de ácido acético.

Uma alíquota de 100 mg das fezes liofilizadas foi adicionada de 500 µL de água destilada e 1 ml de mistura gelada de clorofórmio/metanol. Após homogeneização e centrifugação (11.000 x g, por 10 minutos a 4°C), o sobrenadante foi descartado e adicionou-se ao resíduo 500 µL de água acidificada com 1% de ácido acético, visto que o pH ácido resulta na protonação da Chl-Cu e facilita a extração. Após nova centrifugação, retirou-se 1 mL do sobrenadante verde que então foi seco sob nitrogênio e ressuspenso em 1 mL da solução metanol/água acidificada com 1% de ácido acético (80:20, v/v). Procedimento similar para a extração do pigmento foi adotado para as dietas suplementadas com Chl-Cu oferecidas aos animais.

A extração da Chl-Cu do soro sanguíneo foi realizada de acordo com o método descrito por Egner *et al.*, (2000) com algumas modificações. Alíquotas de 400 µL de soro foram acidificadas com 100 µL tampão fosfato 0,1M (pH 5,0) e extraídas com 600 µL de mistura gelada de clorofórmio/metanol (1:1, v/v). Após centrifugação (12.000 x g, por 5 minutos a 4°C) a fase inferior de coloração verde foi coletada e seca sob nitrogênio, e em seguida ressuspensa em 500 µL de solução metanol/água acidificada com 1% de ácido acético (80:20, v/v).

Para a extração da Chl-Cu, fígado e rins foram deixados por aproximadamente 16 horas em solução de cloreto de amônio 0,85% para lise das células vermelhas. Os órgãos inteiros foram triturados e homogeneizados em

homogenizador tipo Potter-Elvehjem, com tampão fosfato 0,1M (pH 5,0), em um volume correspondente a três vezes o valor absoluto da massa do órgão. O homogeneizado foi centrifugado a 11.000 x g, por 15 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e ao resíduo adicionados 2 mL de tampão fosfato de potássio 0.1M (pH 7,0), que foi então centrifugado nas mesmas condições anteriores. Novamente o sobrenadante obtido foi desprezado e adicionou-se desta vez ao resíduo 2 mL de mistura gelada de clorofórmio/metanol (1:1, v/v). Em seguida, a centrifugação foi realizada a 12.000 x g, por 5 minutos a 4°C, obtendo-se uma fase inferior de coloração verde que foi coletada, seca sob nitrogênio e resuspensa em 400 µL metanol/água acidificada com 1% de ácido acético (80:20, v/v). Após a extração os pigmentos foram separados por CLAE.

5.2.2.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A separação por CLAE dos derivados da Chl-Cu em extratos de dieta, fezes, soro, órgãos e da Chl-Cu comercial foi realizada de acordo com os procedimentos descritos por EGNER *et al.*, (2000), utilizando as condições cromatográficas descritas a seguir.

Foi empregado cromatógrafo da marca Shimadzu, Tokyo, Japão (CLASS-M10A), UV/Vis, composto por um sistema de três bombas (LC-10ADVP), injetor automático (SIL-M10AVP), forno com controle de temperatura (CTO-10ASVP), detector de arranjos de fotodiodos (SPD-M10AVP) e fluorimétrico (RF-10A XL), e finalmente um sistema de software (Class-VP 5.032) para aquisição dos dados. A separação dos derivados foi feita em coluna Vydac C18 polimérica de fase reversa (300 Å, 250 mm x 4,6 mm; partículas de 5 µm).

Todos os reagentes utilizados eram de grau HPLC e foram previamente filtrados em membrana Millipore 0,45 µm PVDF para solventes aquosos. No

preparo das soluções foi utilizada água purificada (sistema purificador de água Millipore, modelo Milli-Q PLUS). Antes de cada corrida os solventes foram desgaseificados com gás hélio durante 10 minutos, em equipamento da marca Shimadzu, modelo DGU-2A.

Foram injetadas no cromatógrafo 50 μ L de cada amostra, previamente filtradas em membrana Millipore 0.22 μ m PTFE-Millipore. Para a separação dos componentes foi utilizado fluxo de 1 mL/min com o seguinte gradiente: solvente A, metanol/água (80:20, v/v) contendo 1% ácido acético (v/v); solvente B, metanol. Iniciou-se o gradiente com 40% B; de 0 to 20 min, fluxo linear para 80% B; de 20 to 30 min, fluxo linear para 90% B; de 30 to 40 min, fluxo linear para 100% B; de 40 to 50 min, 100% B. A detecção por arranjo de fotodiodos foi monitorada em comprimento de onda de 405-626 nm, e a detecção fluorimétrica a $E_x = 400$ nm e $E_m = 640$ nm.

Os pigmentos foram identificados com base nas características espectrais e tempos de retenção, publicados na literatura para diferentes amostras de clorofilina cúprica comercial (EGNER *et al.*, 2000; MORTENSEN e GEPPEL, 2007).

5.2.2.3 COMPOSIÇÃO DAS DIETAS

5.2.2.3.1 UMIDADE

O teor de umidade foi analisado por gravimetria, após secagem do material em estufa a 105°C até peso constante (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). Em cápsulas de porcelana previamente taradas pesou-se cerca de 5g da dieta. As amostras foram mantidas em estufa a 105°C durante 3h para a primeira pesagem e por mais três vezes após secagens por 1h em estufa a 105°C, quando as amostras atingiram peso constante. Antes de cada pesagem aguardou-se 1h para

que a amostra esfriasse em dessecador. O teor de umidade foi determinado em triplicata, pela diferença de massa antes e depois da secagem.

5.2.2.3.2 LIPÍDEOS

Os lipídeos totais foram determinados pela extração contínua em aparelho tipo Soxhlet, empregando-se éter etílico como solvente (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). Os cartuchos para extração foram preparados com papel de filtro, com algodão nas extremidades e introduziu-se cerca de 5g da dieta. O cartucho foi posto no extrator de Soxhlet, que é acoplado a um balão previamente tarado. Adicionou-se aproximadamente 300mL de éter etílico e este sistema foi aquecido durante 8h, provocando o refluxo de éter, que arrastou consigo os lipídeos da amostra. O cartucho foi retirado e o solvente removido por destilação. A seguir o balão contendo o óleo foi mantido em estufa a 105°C durante 1h. A massa de lipídeos foi calculada pela diferença entre a massa do balão antes e após o procedimento. A análise foi realizada em triplicata.

5.2.2.3.3 RESÍDUO MINERAL FIXO

O teor de cinzas foi determinado por gravimetria após a incineração, seguido de combustão em mufla a 550°C por 11 horas ou até peso constante (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). Em cadinhos previamente tarados pesou-se cerca de 2g da dieta. A mufla foi aquecida lentamente até 550°C e as amostras foram mantidas nesta temperatura durante 8 horas. Antes da pesagem aguardou-se 1h para que a amostra esfriasse em dessecador. O resíduo mineral fixo foi determinado pela diferença da massa do cadinho contendo a amostra antes e após a incineração. A análise foi realizada em triplicata.

5.2.2.3.4 PROTEÍNAS

O teor de nitrogênio foi determinado pelo método de micro-Kjeldahl e o resultado multiplicado pelo fator 6,25 para a conversão em proteína (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1984). As amostras de 30mg da dieta e fezes foram adicionados 3mL de ácido sulfúrico concentrado e 2g de sulfato de potássio e aproximadamente 0,2mg de sulfato de cobre. As amostras foram aquecidas em bloco digestor a 350°C, durante 4h. Após o resfriamento a amostra foi acrescida de 15mL de solução hidróxido de sódio 40%, que causa a liberação de nitrogênio na forma de amônia. Posteriormente a amostra foi destilada por arraste a vapor, recolhendo-se a amônia em erlenmeyer contendo 5mL de ácido bórico a 4% e 3 gotas de indicador de Kjeldahl, provocando mudança de coloração da solução pela formação de borato de amônio, que foi titulado com ácido clorídrico 0,02M. Os teores de nitrogênio e proteína, nas fezes e dietas, foram calculados pelas equações:

$$\% \text{ Nitrogênio} = \frac{\text{Volume de HCl} \times \text{fator de correção do ácido} \times 0,14 \text{ g de Nitrogênio}}{\text{Peso da amostra (g)}}$$

$$\% \text{ Proteína total} = \% \text{ N} \times \text{fator de conversão protéico (6,25)}$$

5.2.2.3.5 CARBOIDRATOS

Os teores de carboidratos totais foram calculados pela diferença entre os teores de umidade, proteínas, lipídeos e resíduo mineral fixo.

5.2.3 EXAME HISTOLÓGICO DO INTESTINO

Para o exame histológico do intestino delgado, os segmentos de tecidos foram fixados em formaldeído, e posteriormente processados, com inclusão em parafina e obtenção de cortes de aproximadamente 5 µm de espessura. Após a retirada da parafina e hidratação, as lâminas foram coradas em hematoxilina e eosina (H-E).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 COMPOSIÇÃO DA DIETA AIN-93G

Na tabela 4 são apresentados os valores encontrados para a composição química das três diferentes dietas fornecidas aos animais durante as quatro semanas do ensaio biológico.

Tabela 4. Composição centesimal das dietas AIN-93G (g/100g)¹

	A	B	C
	Dieta	Dieta	Dieta
	Controle	1% Chl-Cu	3% Chl-Cu
Umidade	6,32±0,11 ^a	6,57±0,46 ^a	6,87±0,39 ^a
Proteína	16,33±0,21 ^a	17,31±0,54 ^a	17,43±0,37 ^a
Lipídeos	7,69±0,16 ^a	7,92±0,34 ^a	7,90±0,32 ^a
Cinzas	4,92±0,75 ^a	4,78±0,07 ^a	4,23±0,11 ^a
Carboidratos ²	64,74 ^a	63,42 ^a	63,57 ^a

As análises foram realizadas em triplicata.

Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença estatística (p>0,05).

¹Resultados em base úmida, expressos como média ± desvio padrão.

²Carboidratos totais por diferença.

A análise química das três dietas não revelou qualquer diferença significativa nas concentrações de proteínas, lipídeos e carboidratos, fornecendo, portanto, o mesmo conteúdo de macronutrientes e conseqüentemente de energia.

5.3.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Na figura 5 são apresentados cortes histológicos do intestino delgado de um animal que recebeu 3% de Chl-Cu na dieta. Pode-se observar a camada muscular preservada e aderida à submucosa (A 40X); a camada submucosa sem alterações, com uma superfície de revestimento com vilosidades íntegras (B 100X); e presença de células caliciformes na cripta (C 200X).

A análise histológica realizada indica que a ingestão da Chl-Cu não provocou qualquer alteração na morfologia do intestino delgado, visto que houve manutenção da integridade das camadas submucosa, muscular e serosa, mesmo após um período de quatro semanas de suplementação com o pigmento.

Figura 5. Fotomicrografias de cortes histológicos de intestino delgado de ratos suplementados com 3% de Chl-Cu, coloração H-E. A) O corte histológico mostra vilosidades, submucosa, muscular e serosa preservadas. 40x. B) Vilosidade íntegra revestida por epitélio tipo prismático simples com numerosas células caliciformes. 100x. C) Detalhe em maior aumento evidenciando vilosidades preservadas, onde se observa o epitélio da mucosa do tipo prismático simples com células caliciformes. 200x.

5.3.3 DETECÇÃO DE DERIVADOS DA CHL-CU NO SORO SANGUÍNEO E TECIDOS *IN VIVO*

Ao final do período experimental de quatro semanas, foi realizada a coleta do sangue dos animais. A cor do soro dos animais dos grupos B e C que receberam dieta adicionada de 1 e 3% de Chl-Cu, respectivamente, foi então comparada àquela dos animais do grupo A que receberam dieta controle (Figura 6). Foi observado que mesmo após 8 horas de jejum, a cor do soro dos animais dos grupos B e C foi marcadamente verde, embora variável entre os animais, enquanto a do grupo controle mostrou apenas uma coloração amarela típica.

A diferença individual na cor do soro pode ser explicada pelo período de tempo decorrente entre a ingestão da dieta e a coleta do sangue, uma vez que os animais tiveram livre acesso à dieta. Todavia são necessários estudos farmacocinéticos adicionais para esclarecer o metabolismo da Chl-Cu, parece que este pigmento é lentamente metabolizado, apresentado uma meia vida relativamente longa. Também parece que quanto maior a concentração do pigmento na dieta, maior é a intensidade da cor verde no soro dos animais, indicando uma relação dose:efeito.

Figura 6. Soro sanguíneo de ratos. A) Dieta controle; B) Dieta suplementada com 1% de Chl-Cu; C) Dieta suplementada com 3% de Chl-Cu.

A cor verde do soro indica que a estrutura básica do macrociclo tetrapirrólico estabilizada por duplas ligações da Chl-Cu permanece intacta, embora não possamos excluir que tenham ocorrido modificações na cadeia lateral do macrociclo durante a passagem pelo trato gastrointestinal. Somente a abertura do anel tetrapirrólico por um processo oxidativo poderia causar a perda da cor, devido à interrupção das estruturas ressonantes (SCHWARTZ e ELBE, 1983).

Os tecidos hepático e renal apresentaram uma evidente coloração verde (grupos B e C), especialmente naqueles animais que receberam 3% de Chl-Cu, destacadamente diferente da coloração vermelha apresentada pelos tecidos dos animais que receberam dieta controle (grupo A) (Figuras 7 e 8). Da mesma forma, foi possível verificar uma dispersão do pigmento por todo o corpo do animal, até mesmo no tecido cerebral. A presença de derivados da Chl-Cu no soro e tecidos dos animais foi confirmada por CLAE, resultados estes apresentados mais adiante.

Figura 7. Tecido hepático de ratos. A) Dieta controle; B) Dieta suplementada com 1% de Chl-Cu; C) Dieta suplementada com 3% de Chl-Cu.

Figura 8. Tecido renal de ratos. A) Dieta controle; B) Dieta suplementada com 1% de Chl-Cu; C) Dieta suplementada com 3% de Chl-Cu.

5.3.4 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE NO TRATO GASTROINTESTINAL E ABSORÇÃO DOS DERIVADOS DA CHL-CU

5.3.4.1 ANÁLISE DA CHL-CU COMERCIAL POR CLAE

A Chl-Cu comercial adicionada às dietas foi analisada por CLAE quanto à sua composição, sendo o perfil cromatográfico apresentado na Figura 9A e B.

Na figura 9A observa-se que o pigmento contém dois componentes principais: a clorina cúprica e_6 , na forma de ácido tricarboxílico, e a clorina cúprica e_4 , um ácido dicarboxílico. A identificação destas duas substâncias foi realizada por comparação com as características espectrais e tempos de retenção, relatados por Egner *et al.*, (2000) e Mortensen e Geppel (2007). Em geral, os perfis cromatográficos estão de acordo com aqueles apresentados por Ferruzzi *et al.*, (2002b) e Mortensen e Geppel, (2007), para padrões de clorinas.

Figura 9. Cromatograma representativo da Chl-Cu comercial.

O tempo de retenção dos derivados da Chl-Cu decresce com o aumento do número de grupos carboxila (INOUE *et al.*, 1994). O grupo carboxila presente na clorina cúprica e_6 é mais polar que o grupo metil da clorina cúprica e_4 e assim,

a clorina cúprica e_6 é eluída antes da clorina cúprica e_4 . Além desses componentes principais que foram eluídos a 10 e 15 minutos, respectivamente, o cromatograma exibe alguns picos menores que também apresentaram características espectrais típicas das clorinas cúpricas.

Segundo Scooter *et al.*, (2005) os derivados da clorofilina que apresentam o cobre ligado ao anel tetrapirrólico não emitem fluorescência, assim pode-se assegurar que estas duas clorinas ainda apresentam o cobre ligado às suas moléculas visto que as mesmas não apresentaram fluorescência a $\lambda=640\text{nm}$ (Figura 9B). A presença de pequenos picos na detecção fluorimétrica indicam a presença de quantidades residuais de derivados sem o metal na Chl-Cu comercial.

Os espectros de absorção destes dois componentes na região do visível estão apresentados nas Figura 10 (A e B). O espectro de absorção do pico eluído em 10 minutos apresentou absorção máxima em 408 e 635 nm, típico da clorina e_6 , já o pico eluído em 15 minutos apresentou absorção máxima em 408 e 627 nm, típico da clorina cúprica e_4 (EGNER *et al.*, 2000; MORTENSEN e GEPPEL, 2007).

Figura 10. Espectro de absorção visível: A) clorina cúprica e_6 ; B) clorina cúprica e_4 .

O cromatograma da clorofilina cúprica comercial, utilizado neste estudo confirma tratar-se de uma mistura de vários derivados, mas com predominância da clorina cúprica e_6 , e da clorina cúprica e_4 . Dentre os compostos minoritários não se pode excluir a eventual presença do éster etil da clorina cúprica e_4 , encontrado por Egner e colaboradores, (2000) no soro de humanos, que receberam a Chl-Cu durante quatro meses. Neste estudo, o exame dos derivados presentes nas amostras do pigmento comercial e de fezes dos animais não exclui a possibilidade de que um composto eluído aos 21 minutos em concentrações muito baixas, seja o éster etil clorina e_4 , visto que este apresenta absorbância máxima compatível com aquele descrito pelos autores: 405 e 626 nm (dados não apresentados). Contudo, não foi dada maior importância devido a sua reduzida concentração.

As dietas adicionadas de Chl-Cu assim como a dieta controle, também foram analisadas quanto à presença e perfil de derivados do pigmento.

O cromatograma obtido apresentou um perfil similar àquele apresentado pela Chl-Cu comercial, com eluição das clorinas cúpricas e_6 e e_4 sugerindo que a adição do pigmento à dieta não modificou a sua composição.

5.3.4.2 ANÁLISE DO SORO SANGUÍNEO

O cromatograma apresentado na Figura 11A evidencia apenas a presença da clorina e_4 . A ausência da clorina cúprica e_6 pode indicar sua sensibilidade ao ambiente digestivo, sugerindo a sua degradação durante a passagem pelo trato gastrointestinal dos animais, ou a falta de absorção e transporte para a corrente sanguínea. Uma terceira hipótese seria sua adsorção com outros componentes da dieta causando sua excreção nas fezes.

Novamente pode-se afirmar a presença do átomo de Cu^{2+} , pela falta de fluorescência (Figura 11B).

Figura 11. Cromatograma representativo do soro de animais suplementados com Chl-Cu.

A ausência da clorina cúprica e_6 no soro confirma estudo prévio realizado por Egner *et al.*, (2000). Os participantes desse estudo realizado na China receberam 300 mg de Chl-Cu/dia durante quatro meses, como um potencial

agente quimiopreventivo, no combate ao efeito carcinogêncio da exposição constante dessa população à aflatoxina B₁. O soro de muitos participantes apresentou uma coloração verde, e a clorina cúprica e₄ e seu éster etílico foram identificados como principais metabólitos, enquanto a clorina cúprica e₆ não foi detectada.

Conforme o esperado não foi eluída nenhuma substância nas amostras de soro sanguíneo de animais alimentados com a dieta controle (Figura 12).

Figura 12. Cromatograma representativo do soro de animais que receberam dieta controle.

5.3.4.3 ANÁLISE DOS TECIDOS HEPÁTICO E RENAL

Nos tecidos hepático e renal de animais que receberam Chl-Cu foi possível identificar a presença da clorina cúprica e₄, indicando sua distribuição pelo organismo e incorporação nestes tecidos. Assim como no soro sanguíneo, não foi detectada a presença do derivado clorina cúprica e₆ apoiando a hipótese de que este não é absorvido ou sofre metabolização pré ou pós-absortiva. Dessa forma, os cromatogramas obtidos para o tecido hepático e renal apresentaram perfis similares entre si, apresentados nas Figuras 13A e 14A, respectivamente.

Todos os derivados identificados nos tecidos hepático e renal apresentavam o cobre ligado à sua molécula, visto que nenhum destes compostos apresentou fluorescência a $\lambda=640\text{nm}$ (Figuras 13B e 14B).

Figura 13. Cromatograma representativo do extrato de tecido hepático de animais suplementados com Chl-Cu.

Figura 14. Cromatograma representativo do extrato de tecido renal de animais suplementados com Chl-Cu.

Foi possível identificar ainda nos extratos destes dois tecidos, a presença de uma substância eluída aos 17,5 minutos. O tempo de retenção superior ao das clorinas e₆ e e₄, indica uma maior interação com a fase estacionária apolar. A substância detectada nos dois tecidos apresentou características espectrais idênticas (Figura 15). Além disso, a ausência de fluorescência indica que a mesma ainda tinha o cobre ligado ao seu anel tetrapirrólico. Salientamos que

este pico que apresenta absorção máxima em 417 e 671 nm, ao nosso conhecimento, nunca foi relatado na literatura.

Figura 15. Espectro de absorção de pico eluído em 17,5 minutos, presente nos tecidos hepático e renal de animais suplementados com Chl-Cu.

Contudo, além de estar presente nos extratos de tecido hepático e tecido renal, o mesmo pico foi detectado no pigmento comercial adicionado à dieta, apresentando tempo de retenção e espectro similares. Assim, acreditamos tratar-se de um componente minoritário ou um produto de degradação presente na preparação comercial, e não um produto derivado do metabolismo da Chl-Cu no organismo animal.

A análise dos cromatogramas do soro sanguíneo e amostras de tecido dos animais alimentados com a clorofilina cúprica não evidenciou qualquer outro metabólito deste pigmento em quantidades significativas. Assim, acreditamos que um eventual efeito biológico sistêmico atribuído ao consumo deste pigmento esteja diretamente relacionado à clorina cúprica e_4 .

Nas amostras de tecido hepático e renal de animais alimentados com dieta controle, não foi eluído qualquer derivado do pigmento.

Destacamos, que a identificação dos derivados da Chl-Cu presentes no soro sanguíneo e tecidos dos animais, mais uma vez foi realizada por comparação com as características espectrais e tempos de retenção, relatados

por Egner *et al.*, (2000) e Mortensen e Geppel, (2007). E também pela comparação com o tempo de retenção e características espectrais obtidos na análise da Chl-Cu comercial que foi adicionada às dietas.

5.3.5 ANÁLISE DAS FEZES

Nas excretas dos animais que receberam Chl-Cu foi possível identificar a presença da clorina e_6 e da clorina e_4 (Figura 16A) com tempos de retenção de 10 e 15 minutos, respectivamente, idênticos aos observados para a Chl-Cu isolada e a presente na dieta.

No cromatograma observamos também um pico com tempo de retenção maior, de 17,5 minutos. Esse componente também foi encontrado tanto nas amostras de Chl-Cu comercial adicionado à dieta, como nos tecidos hepático e renal dos animais que receberam a dieta suplementada com o pigmento. Assim como nas demais amostras a substância apresentou espectro com máximos de absorção em 417 e 671 nm, e ausência de fluorescência a $\lambda=640\text{nm}$, indicando que ainda apresenta o cobre ligado ao seu anel tetrapirrólico (Figura 16B) (SCOOTER *et al.*, 2005).

Figura 16. Cromatograma representativo das fezes de animais suplementados com Chl-Cu.

Foi observado ainda, que a quantidade relativa de clorina cúprica e_4 foi maior nas fezes do que na Chl-Cu original fornecida pela Chr.Hansen, ao contrário da quantidade de clorina cúprica e_6 que foi inferior àquela encontrada no pigmento comercial. Esse fato sugere que a clorina cúprica e_6 sofreu algum tipo de degradação durante a passagem pelo trato gastrointestinal e confirma os resultados obtidos por Ferruzzi *et al.*, (2002b), em experimento *in vitro* com células Caco-2, que simulam o ambiente gástrico e intestinal. Naquele estudo, os autores observaram que a clorina cúprica e_4 , foi estável, enquanto a clorina cúprica e_6 foi lábil à digestão, com perda de aproximadamente 90% da quantidade presente na solução aquosa de Chl-Cu utilizada.

Destacamos que os resultados obtidos reforçam a hipótese de degradação da clorina cúprica e_6 ou interação desta com outros nutrientes durante a passagem pelo trato gastrointestinal.

Como era de se esperar, nas fezes coletadas de animais que receberam dieta controle não foi identificado qualquer derivado da Chl-Cu.

Foi possível concluir que a Chl-Cu comercial adicionada à dieta dos animais era composta majoritariamente pelas clorinas cúpricas e_6 e e_4 . Houve efetiva absorção da clorina cúprica e_4 para o soro sanguíneo e incorporação desta aos tecidos hepático e renal dos animais que receberam dieta suplementada com a clorofilina cúprica. Por outro lado, a clorina cúprica e_6 , parece ter sido degradada durante a digestão no organismo animal ou não foi absorvida, visto que não foi possível detectá-la no soro, fígado ou rins destes animais.

Observou-se ainda, a incorporação de um composto não identificado aos tecidos hepático e renal. Esta substância parece ser um derivado minoritário do

pigmento comercial, visto que também foi encontrado em baixas concentrações neste.

A análise histológica do intestino delgado de animais suplementados com Chl-Cu evidenciou a manutenção da integridade das camadas muscular, submucosa, e muscular, indicando que a absorção do pigmento não alterou a estrutura típica do intestino delgado.

6. EXPERIMENTO II: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS ANTIOXIDANTES

6.1 JUSTIFICATIVA

A Chl-Cu é um derivado hidrossolúvel da clorofila natural, utilizado como corante e aditivo alimentar. Diversos efeitos benéficos vem sendo atribuídos a este pigmento, incluindo atividade anticarcinogênica, antimutagênica e antioxidante. Entretanto, as evidências científicas destas ações são ainda controversas.

O presente estudo pretendeu avaliar uma eventual capacidade da Chl-Cu em reduzir o estresse oxidativo causado pela deficiência de vitamina E por meio da determinação de indicadores químicos, bioquímicos e histológicos da peroxidação lipídica nos animais.

A deficiência experimental de vitamina E em animais de laboratório é um modelo de estudo do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e, portanto, da peroxidação lipídica.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 ENSAIO BIOLÓGICO

ANIMAIS

Foram utilizados 40 ratos da linhagem Wistar, machos, recém desmamados, com peso aproximado de 60g, provenientes do biotério da FCF-USP, distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, de dez animais cada. Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais de aço inox em condições ambientais controladas, com período de iluminação artificial de 12

horas intercalado com outro período também de 12 horas sem iluminação e temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante todo o período experimental. As dietas e a água foram fornecidas *ad libitum*.

DIETAS

Durante 9 semanas os animais foram alimentados com dietas diferentes, preparadas, de acordo com a dieta basal AIN-76A (Tabela 5), (REPORT..., 1977).

A formulação das dietas experimentais foi realizada de acordo com a recomendação da AIN-76A. Empregou-se a formulação mais antiga, pelo fato da AIN-93, indicada pelo *American Institute of Nutrition* para substituir a formulação AIN-76A conter na sua composição um antioxidante, o TBHQ (terc-butilhidroquinona), e por apresentar uma concentração maior de vitamina E.

Contudo, deve-se observar que a dieta deficiente em vitamina E não pode ser considerada totalmente isenta desta vitamina devido à pequena quantidade de α -tocoferol existente naturalmente no óleo de milho e na caseína utilizada como fonte protéica (DESAI *et al.*, 1988).

Tabela 5. Composição da dieta basal AIN-76A

Componentes	Quantidade (g/kg)
Caseína (>85% proteína)	200,0
Amido de milho	150,0
Sacarose	450,0
Fibra (celulose)	50,0
Óleo de milho	100,0
Mistura mineral AIN-76A	35,0
Mistura vitamínica AIN-76A	10,0
DL1-metionina	3,0
Bitartarato de colina	2,0

As misturas de vitaminas e minerais foram elaboradas pela empresa Rhoster (Indústria e Comércio de Alimentos Ltda, SP), seguindo composição indicada para a dieta AIN-76A, sendo a composição apresentada nas Tabelas 6 e 7, respectivamente. As dietas deficientes em vitamina E foram preparadas com misturas vitamínicas isentas de acetato de α -tocoferol.

Tabela 6. Composição da mistura de vitaminas AIN-76A

Componentes	Quantidade (g/kg)
Tiamina HCl	600,0 mg
Riboflavina	600,0 mg
Piridoxina HCl	700,0 mg
Ácido nicotínico	3,0 g
Pantotenato de cálcio	1,6 g
Ácido fólico	200,0 mg
Biotina	20,0 mg
Cianocobalamina (vitamina B12)	1,0 mg
Vitamina A (400,00 UI)	400,00 UI
Acetato de α -tocoferol (5,000 UI)*	5,000 UI
Colecalciferol (100,000 UI)	2,5 mg
Menadiona (vitamina K)	5,0 mg
Sacarose	q.s.p. 1000,0 g

Mistura de vitaminas preparada de acordo com as recomendações da AIN-76A.

*Quantidade utilizada na dieta com teor normal de vitamina E. A dieta deficiente em vitamina E foi adicionada de mistura vitamínica, isenta de acetato de α -tocoferol.

Tabela 7. Composição da mistura de minerais AIN-76A

Componentes	Quantidade (g/kg)
Fosfato ácido de cálcio	500,0
Cloreto de sódio	74,0
Citrato de potássio monohidratado	220,0
Sulfato de potássio	52,0
Óxido de magnésio	24,0
Carbonato de manganês	3,5
Citrato férrico	6,0
Carbonato de zinco	1,6
Carbonato cúprico	0,3
Iodato de potássio	0,01
Selenito de sódio	0,01
Sulfato de potássio e cromo	0,55
Sacarose	q.s.p 1000,0 g

Mistura de minerais preparada de acordo com as recomendações da AIN-76A

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os animais receberam as dietas descritas acima durante um período de 9 semanas, similar aos experimentos realizados por Maggi-Capeyron *et al.*, 2002 e Ramirez-Tortosa *et al.*, 2001. Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais:

- G1 (n=10) – animais alimentados com dieta controle, vitamina E normal.
- G2 (n=10) – animais alimentados com dieta controle, deficiente em vitamina E.
- G3 (n=10) – animais alimentados com dieta deficiente em vitamina E, e suplementada com 1% de Chl-Cu.
- G4 (n=10) – animais alimentados com dieta deficiente em vitamina E, e suplementada com 3% de Chl-Cu.

O peso corporal foi monitorado três vezes por semana, assim como o consumo alimentar. Ao final do período experimental de 9 semanas, após jejum

de 8 horas, os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal de hidrato de cloral (500mg/ml), utilizando-se uma dose de 400mg/kg de peso corporal, e então sacrificados.

O período de sacrifício dos animais estendeu-se por 10 dias, de forma que um animal de cada grupo era sacrificado por dia, visto que as análises químicas e bioquímicas deveriam ser realizadas no mesmo dia do sacrifício. Para possibilitar uma análise estatística adequada, optou-se por sacrificar um animal de cada grupo por dia.

O abdômen foi aberto por incisão na linha média, e imediatamente foi retirado um fragmento do fígado e colocado em formaldeído para a obtenção de cortes histológicos. Em seguida, cérebro e fígado foram perfundidos pela injeção de solução de NaCl 0,9% no coração. Imediatamente após a retirada do cérebro, foi finalizada a perfusão do fígado pela injeção da solução citada anteriormente na veia porta. A seguir, o tecido cerebral e fragmentos do tecido hepático foram homogeneizados para a determinação da atividade enzimática e da concentração de TBARS.

6.2.2 PREPARO DOS HOMOGENATOS DO CÉREBRO E FÍGADO

6.2.2.1 HOMOGENATO DE CÉREBRO

O cérebro retirado do animal foi pesado e homogeneizado, em homogenizador tipo Potter-Elvehjem, mantendo-se uma relação de 4:1 (v/p) de tampão fosfato de potássio 0,1M (pH 7,0) e a massa da amostra. O homogenato foi centrifugado a $1.010 \times g$, por 15 minutos a 4°C. Do sobrenadante obtido uma alíquota de 1 mL foi retirada e utilizada para a determinação de TBARS, e o restante foi novamente centrifugado a $11.000 \times g$, por 15 minutos a 4°C,

empregando-se o novo sobrenadante na determinação da atividade enzimática da CAT, SOD, GPx e GR.

6.2.2.2 HOMOGENATO DE FÍGADO

O fígado perfundido retirado do animal foi pesado e, em solução salina 0,9% reduzido a pequenos fragmentos com auxílio de tesoura. Os fragmentos foram então homogeneizados, em homogenizador tipo Potter-Elvehjem, mantendo-se uma relação de 3:1 (v/p) de tampão fosfato de potássio 0,1M (pH 7,0) e a massa da amostra. O homogenato foi então centrifugado a $1.010 \times g$, por 20 minutos a 4°C, e do sobrenadante obtido uma alíquota de 1 mL foi retirada para a determinação de TBARS, e o restante novamente centrifugado a $11.000 \times g$, por 15 minutos a 4°C. Desta vez, o sobrenadante obtido, foi centrifugado em ultracentrífuga a $105.000 \times g$, por 60 minutos a 4°C, obtendo-se a fração citosólica para a determinação da atividade enzimática da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR).

6.2.3 MEDIDA DA PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

A medida dos teores de TBARS é sensível para determinar o efeito dos antioxidantes na peroxidação lipídica *in vivo*, embora a reação sofra interferência de outras substâncias redutoras (SEPPANEN *et al.*, 2002).

Através desta técnica determina-se, por leitura espectrofotométrica em 535nm, o produto de reação entre o ácido tiobarbitúrico e o malonaldeído produzido durante a oxidação lipídica (BERNHEIM *et al.*, 1948; JUNQUEIRA *et al.*, 1986).

Foi tomado 1,0 mL do homogenato de fígado, diluído na proporção 1,5:3,5 em tampão fosfato de potássio 0,1M (pH 7,0) e adicionado de 1,0 ml de ácido tricloroacético (TCA) 5% e 2 ml de água deionizada (tempo zero). O restante da solução diluída (3,0 mL) foi incubada por 2 horas sob agitação a 37° C em agitador orbital. Ao final de duas horas 1,0 ml do incubado foi retirado e adicionado de 1,0 ml de TCA 5% e 2 ml de água deionizada.

Uma alíquota de 1,0 mL do homogenato de cérebro, diluído na proporção 1,0:3,0 em tampão fosfato de potássio 0,1M (pH 7,0), foi adicionada de 1,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) 5% (tempo zero). O restante da diluição (3,0 mL) foi incubado por 1 hora sob agitação a 37° C em agitador orbital. Ao final de uma hora foi retirado 1,0 mL do incubado e adicionado a 1,0 mL de TCA 5%.

Após a centrifugação a 1.010 x g, por 15 minutos para o cérebro e 20 minutos para o fígado, ambos à temperatura ambiente, uma alíquota de 1,0 mL do sobrenadante obtido foi retirada, submetida à reação com 1 mL de ácido tiobarbitúrico 0,67% (somente para o sobrenadante de fígado acrescentou-se 2 ml de água destilada) e colocada em banho de água fervente, por 20 minutos, seguido de resfriamento em banho de gelo. Finalmente, após 20 minutos à temperatura ambiente, foi realizada a leitura em espectrofotômetro em 535nm. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

6.2.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE

A atividade da SOD citoplasmática foi avaliada segundo método descrito por Beauchamp e Fridovich (1969), que avalia a produção dos ânions peróxido produzidos pela xantina oxidase, na presença da xantina. O ânion superóxido produzido oxida o citocromo c e esta oxidação é medida pelo aumento da densidade ótica a 550nm, a 25° C.

O volume de xantina oxidase utilizado na reação é determinado em um branco, na presença do meio de reação, de forma que se encontre uma variação na absorbância, a 500nm, entre 0,0250 a 0,0300/minuto.

A uma alíquota de 1ml do meio de reação, composto por citocromo c 100 μ M, xantina 500 mM, EDTA 1 mM e KCN 200 mM em tampão fosfato de potássio 0,05 M (pH 7,8), foram adicionados a xantina oxidase (volume determinado de acordo com o branco) e 15 μ l da fração citosólica diluída na proporção de 1:1 para cérebro e fígado, em duplicata.

Os resultados foram expressos em U/mg de proteína. Uma Unidade (U) corresponde à atividade da enzima que promove 50% de inibição da reação da xantina 25° C em pH 7,8.

6.2.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA CATALASE

O método utilizado para determinar a atividade da CAT foi descrito por Beutler (1975), que quantifica a velocidade de decomposição da H_2O_2 pela enzima por meio do decréscimo de absorbância a 230 nm a 30°C.

O meio de reação era composto por H_2O_2 10 mM (10 μ l de peridrol 30% em 10 mL de H_2O milliQ) e tampão Tris HCl 1M EDTA 5 mM (pH 8,0). Para a reação foram utilizadas duas diluições, 15 μ L da amostra mais 985 μ L do meio ou 20 μ L da amostra mais 980 μ L do meio. As amostras foram diluídas em tampão Tris HCl 1M EDTA 5 mM (pH 8,0) na proporção de 1:50 para o fígado e sem diluição para o cérebro.

Os resultados foram expressos em U/mg de proteína. Uma unidade (U) da catalase corresponde a atividade da enzima que realiza a hidrólise de 1 μ mol de H_2O_2 por minuto a 37 °C em pH 8,0.

6.2.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE

A atividade da GPx foi medida de acordo com o método descrito por Sies *et al.*, (1979). O método se baseia na medida do decréscimo de absorbância em 340 nm promovido pela oxidação do NADPH a 30°C, durante a redução da glutathiona oxidada catalisada pela glutathiona redutase.

O meio de reação continha GSH 1 mM, GR 1U/mL, peróxido de terc-butila 0,5 mM, NADPH 20 mM, EDTA 5 mM e tampão fosfato de potássio 0,1M (pH 7,0). À cubeta contendo 1 mL de meio de reação adicionou-se 10 µL da fração citosólica do fígado diluída na proporção 1:10 em tampão fosfato de potássio 0,1M (pH 7,0). A fração citosólica do cérebro foi diluída em uma proporção 1:1.

Os resultados foram expressos em U/mg de proteína. Uma unidade (U) de enzima é definida como a atividade da enzima que oxida 1 µmol de NADPH por minuto, a 30°C, em pH 7,0.

6.2.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUTASE

A GR catalisa a redução da glutathiona oxidada pela oxidação do NADPH cujo decréscimo de absorbância a 340 nm, a 30°C é medido espectrofotometricamente. O método utilizado foi descrito por Sies *et al.*, (1979).

À cubeta contendo 970 µL de meio de reação composto por EDTA 5 mM, GSSH 0,1M e NADPH 20 mM e tampão fosfato de potássio 0,1M (pH 7,0), adicionou-se 50 µL da fração citosólica do fígado diluída na proporção 1:4 em tampão fosfato de potássio 0,1M (pH 7,0). A fração citosólica do cérebro foi diluída em uma proporção 1:1.

Os resultados foram expressos em U/mg de proteína. Uma unidade (U) de enzima é definida como a atividade da enzima que oxida 1 µmol de NADPH por minuto, a 30°C, em pH 7,0.

6.2.8 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS NOS TECIDOS

O conteúdo de proteína solúvel presente nos tecidos cerebral e hepático foi determinado pelo método colorimétrico do ácido bicinchonínico (BCA), com a utilização de kit comercial de dosagem de proteína. Foi feita uma curva padrão de proteína utilizando solução padrão de albumina sérica bovina (BSA).

6.2.9 COMPOSIÇÃO DAS DIETAS

A composição química das dietas foi determinada conforme citado no item 5.2.2.3.

6.2.10 EXAME HISTOLÓGICO DO FÍGADO

Os fragmentos de fígado foram fixados em formaldeído, incluídos em parafina, e posteriormente foram obtidos cortes de aproximadamente 5µm de espessura, corados com hematoxilina-eosina (PEARSE, 1968).

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA DIETA AIN-76A

A composição química das dietas oferecidas aos animais durante o período de 9 semanas do ensaio biológico é apresentada na Tabela 8. A dieta utilizada neste experimento foi elaborada de acordo com a dieta AIN-76A, visto q a mesma não apresenta a adição de antioxidantes à sua formulação.

Tabela 8. Composição centesimal da dieta AIN-76A (g/100g)¹

	G1 Dieta Controle	G2 Dieta Vitamina E deficiente	G3 Dieta Vitamina E def. 1% Chl-Cu	G4 Dieta Vitamina E def. 3% Chl-Cu
Umidade	6,97 ± 0,09 ^a	6,77 ± 0,02 ^a	7,05 ± 0,01 ^a	7,06 ± 0,00 ^a
Proteína	17,06 ± 0,44 ^a	16,49 ± 0,18 ^a	17,83 ± 0,77 ^a	17,78 ± 0,44 ^a
Lipídeos	5,91 ± 0,07 ^a	5,82 ± 0,02 ^a	5,27 ± 0,01 ^a	5,64 ± 0,03 ^a
Cinzas	2,95 ± 0,04 ^a	2,49 ± 0,06 ^a	3,08 ± 0,05 ^a	3,43 ± 0,07 ^a
Carboidrato ²	67,11 ^a	67,98 ^a	66,77 ^a	66,09 ^a

As análises foram realizadas em triplicata.

Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença estatística (p>0,05).

¹Resultados em base úmida, expressos como média ± desvio padrão.

²Carboidratos totais por diferença.

Observa-se que não houve diferença estatística nos teores de nutrientes das dietas, que apresentaram conteúdo equivalente de proteínas, lipídeos e carboidratos, fornecendo, portanto, a mesma quantidade de macronutrientes, e consequentemente, de energia aos diferentes grupos.

6.3.2 AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE DIETA, GANHO DE PESO DOS ANIMAIS E DO COEFICIENTE DE EFICÁCIA ALIMENTAR (CEA)

Este item será apresentado no próximo capítulo que trata da avaliação de parâmetros nutricionais de ratos que receberam dieta suplementada com Chl-Cu.

Salientamos que a dieta deficiente em vitamina E oferecida, não interferiu no ganho de peso e consumo alimentar dos animais, confirmando os resultados encontrados por Seppanen *et al.*, (2002); Hayton *et al.*, (2003) e Jordão *et al.*, (2004), e sugerindo que qualquer alteração ocorrida nos mesmos se deve tão somente à presença da Chl-Cu na dieta.

6.3.3 TEORES DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS) E ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES NO TECIDO HEPÁTICO

A lipoperoxidação foi avaliada pela medida de TBARS, parâmetro indicativo

de estresse oxidativo. Os animais dos grupos G2, G3 e G4 que receberam dieta deficiente em vitamina E, apresentaram teores de TBARS significativamente aumentados, sendo em média 43 vezes maior, em relação aos animais do grupo G1, que recebiam dieta controle com níveis normais de vitamina E. Na Tabela 9 são apresentadas as médias e os desvios-padrão de TBARS para os quatro grupos experimentais, expressas em equivalentes nmol de malonaldeído/mg proteína.

Tabela 9. Teores de TBARS no tecido hepático¹

	G1 Dieta Controle	G2 Dieta Vitamina E deficiente	G3 Dieta Vitamina E def. 1% Chl-Cu	G4 Dieta Vitamina E def. 3% Chl-Cu
TBARS ²	0,08 ± 0,01 ^a	3,54 ± 0,85 ^b	3,63 ± 0,32 ^b	3,24 ± 0,91 ^b

Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença estatística ($p > 0,05$).

¹Resultados expressos como média e desvio padrão ($n=10$);

²TBARS, expressos em nmol equivalentes MDA/mg de proteína.

A análise estatística não evidenciou diferença significativa nos valores de TBARS entre o grupo G2 (dieta deficiente em vitamina E) e os grupos G3 e G4 que receberam 1 e 3% de Chl-Cu, respectivamente, indicando que, ao menos nas doses testadas, a presença de Chl-Cu no tecido hepático não foi capaz de proteger contra o estresse oxidativo induzido pela deficiência de vitamina E.

O efeito da deficiência de vitamina E, indica que o desenho experimental foi efetivo na indução de estresse oxidativo no tecido hepático. O aumento encontrado para as concentrações de TBARS nos ratos que receberam dieta deficiente em vitamina E confirma estudos anteriores nos quais a deficiência desta vitamina causou a elevação nos níveis de TBARS em diferentes tecidos como fígado, cérebro, rins, músculo esquelético e glândula adrenal de ratos (JORDÃO *et al.*, 2004; MAGGI-CAPEYRON *et al.*, 2002; RAMIREZ-TORTOSA *et al.*, 2001; CHOW *et al.*, 1999; BURCZYNSKI *et al.*, 1999). Esta vitamina

apresenta atividade antioxidante, protegendo moléculas e sistemas biológicos do dano oxidativo por espécies reativas de oxigênio, sendo importante na manutenção da integridade e estabilidade de membranas biológicas (BURTON e TRABER, 1990).

As atividades das enzimas antioxidantes: GPx, GR, CAT, e SOD no tecido hepático, estão apresentados na Tabela 10. As atividades das enzimas testadas nos três grupos, grupos G2, G3 e G4 foi similar à do grupo controle (G1).

Tabela 10. Atividade específica de enzimas no tecido hepático¹

Parâmetros	G1 Dieta Controle	G2 Dieta Vitamina E deficiente	G3 Dieta Vitamina E def. 1% Chl-Cu	G4 Dieta Vitamina E def. 3% Chl-Cu
GPx ²	1,2 ± 0,2 ^a	1,2 ± 0,3 ^a	1,2 ± 0,2 ^a	1,1 ± 0,2 ^a
GR ³	42,7 ± 4,3 ^a	45,2 ± 5,2 ^a	45,8 ± 4,8 ^a	46,5 ± 1,7 ^a
CAT ⁴	190,9 ± 44,2 ^a	183,3 ± 47,5 ^a	167,3 ± 54,1 ^a	194,5 ± 30,9 ^a
SOD ⁵	27,5 ± 4,3 ^a	29,3 ± 3,2 ^a	29,6 ± 5,7 ^a	28,7 ± 3,8 ^a

Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença estatística (p>0,05).

¹Resultados expressos como média e desvio padrão (n=10);

²GPx-Glutationa peroxidase, U/mg de proteína;

³GR-Glutationa redutase, mU/mg de proteína;

⁴CAT-Catalase, U/mg de proteína;

⁵SOD-Superóxido dismutase, U/mg de proteína.

6.3.4 TEORES DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS) E

ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES NO TECIDO CEREBRAL

As médias das concentrações cerebrais de TBARS estão apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11. Teores de TBARS no tecido cerebral¹

	G1 Dieta Controle	G2 Dieta Vitamina E deficiente	G3 Dieta Vitamina E def. 1% Chl-Cu	G4 Dieta Vitamina E def. 3% Chl-Cu
TBARS ²	3,53 ± 0,57 ^a	5,25 ± 0,71 ^b	4,01 ± 0,61 ^a	3,85 ± 0,76 ^a

Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença estatística (p>0,05).

¹Resultados expressos como média e desvio padrão (n=10);

²TBARS, expressos em nmol equivalentes MDA/mg de proteína.

O grupo G2, que recebeu dieta deficiente em vitamina E apresentou níveis de TBARS significativamente maiores que o grupo controle alimentado com teores adequados de vitamina E, refletindo também no tecido cerebral o estresse oxidativo induzido pela deficiência de vitamina E. Porém, neste tecido foi observado que a suplementação com Chl-Cu determinou um decréscimo nos níveis de TBARS, de forma que os grupos G3 e G4, que receberam dieta deficiente em vitamina E, mas suplementada com 1 e 3% de Chl-Cu, apresentaram níveis similares ao grupo controle (G1), indicando portanto, uma proteção contra o aumento na produção de TBARS induzida pela falta de vitamina E.

O tecido cerebral é particularmente susceptível ao ataque de radicais livres, devido, em parte, ao seu alto consumo de oxigênio e ao alto teor de ácidos graxos poliinsaturados presentes nas membranas neuronais (HALLIWELL, 2001). Dentre outras razões passíveis de explicar a maior susceptibilidade do cérebro para o dano oxidativo, destaca-se, a grande presença de ferro neste tecido, propiciando a ocorrência da reação de Fenton, onde o peróxido de hidrogênio recebe um elétron do íon ferroso formando o radical hidroxila ($\text{OH}^\bullet$), espécie reativa de oxigênio altamente reativa. Além disso, as defesas antioxidantes no cérebro são modestas, os níveis de catalase, enzima que detoxifica H_2O_2 , são baixos na maior parte das regiões cerebrais; e muitos neurotransmissores são auto-oxidantes, tais como dopamina, serotonina e norepinefrina (HALLIWELL, 2001). Desta forma, os resultados encontrados sugerem que a presença da clorofilina cúprica seria capaz de proteger os lipídeos cerebrais contra a peroxidação lipídica causada pela deficiência de vitamina E.

Há alguns estudos na literatura que indicam uma atividade antioxidante para a Chl-Cu, evidenciada, dentre outros parâmetros, pela inibição da formação de TBARS em diferentes modelos experimentais. Kamat *et al.*, (2000), observaram que mitocôndrias hepáticas isoladas de ratos Wistar quando expostas à radiação (450 Gy) na presença de Chl-Cu apresentavam níveis de TBARS significativamente menores em relação às irradiadas na ausência deste pigmento. O mesmo efeito protetor foi observado em mitocôndrias expostas a fotossensibilização com azul de metileno na presença do pigmento. Bloor e colaboradores (2000), observaram um efeito antioxidante da Chl-Cu em membranas mitocondriais submetidas à radiação gama e fotossensibilização, havendo uma inibição na formação de TBARS. Kumar *et al.*, (2004) observaram que linfócitos de ratos tratados com Chl-Cu i.p. e posteriormente submetidos à irradiação (5Gy) apresentaram concentrações de TBARS menores que os animais controle. Estudo anterior demonstrou que ratos tratados com tetracloreto de carbono (CCl₄) apresentaram uma elevação significativa nos níveis de TBARS hepático, sendo estes valores significativamente menores quando os ratos foram pré-tratados com Chl-Cu por via intraperitoneal (SATO *et al.*, 1985).

Os reduzidos níveis de TBARS encontrados no tecido cerebral neste trabalho apóiam a hipótese de que a Chl-Cu agiria como um antioxidante. Porém, deve-se ressaltar que no tecido hepático a suplementação da Chl-Cu não acarretou qualquer redução nos teores de TBARS.

Na Tabela 12 são apresentadas as médias e desvios padrão da atividade das enzimas GPx, GR, CAT e SOD cerebrais. Assim como no fígado, não houve diferença estatisticamente significativa para a atividade destas enzimas no cérebro dentre os quatro grupos com diferentes tratamentos.

Tabela 12. Atividade específica de enzimas no tecido cerebral¹

<i>Parâmetros</i>	G1 Dieta Controle	G2 Dieta Vitamina E deficiente	G3 Dieta Vitamina E def. 1% Chl-Cu	G4 Dieta Vitamina E def. 3% Chl-Cu
GPx ²	57,2 ± 4,2 ^a	56,3 ± 4,5 ^a	58,4 ± 3,8 ^a	56,9 ± 4,1 ^a
GR ³	34,7 ± 1,3 ^a	34,1 ± 1,7 ^a	34,9 ± 4,2 ^a	36,3 ± 3,7 ^a
CAT ⁴	1,1 ± 0,3 ^a	0,9 ± 0,3 ^a	1,0 ± 0,3 ^a	0,8 ± 0,1 ^a
SOD ⁵	14,9 ± 3,2 ^a	14,8 ± 2,9 ^a	16,2 ± 5,1 ^a	14,9 ± 1,2 ^a

Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença estatística ($p > 0,05$).

¹Resultados expressos como média e desvio padrão ($n=10$);

²GPx-Glutationa peroxidase, mU/mg de proteína;

³GR-Glutationa redutase, mU/mg de proteína;

⁴CAT-Catalase, U/mg de proteína;

⁵SOD-Superóxido dismutase, U/mg de proteína.

Neste estudo a dieta deficiente em vitamina E acarretou um aumento nos níveis de TBARS nos dois tecidos estudados, resultados estes que são consistentes com dados da literatura relativos à deficiência de vitamina E (JORDÃO *et al.*, 2004; MAGGY-CAPEYRON *et al.*, 2002; RAMIREZ-TORTOSA *et al.*, 2001; CHOW *et al.*, 1999; BURCZYNSKI *et al.*, 1999). Porém, não levou a alterações na atividade das enzimas antioxidantes estudadas: GPx, GR, CAT e SOD.

Há estudos que demonstram que, além de acarretar aumento na peroxidação oxidativa, este modelo de estudo induz alterações na atividade de enzimas antioxidantes determinadas pela administração de dieta deficiente em vitamina E em ratos (DAM *et al.*, 1998; BECK *et al.*, 2003). Por outro lado, este efeito ainda é controverso na literatura uma vez que foram encontrados artigos que não confirmam mudanças significativas na expressão e atividade de enzimas antioxidantes (TOKUMARU *et al.*, 1997; MAGGY-CAPEYRON *et al.*, 2002; IBRAHIM *et al.*, 1999).

A suplementação da dieta com Chl-Cu, também não alterou a atividade das enzimas antioxidantes. Ao contrário disso, Kumar e colaboradores (2004) observaram que as enzimas GPx e CAT, mas não a SOD, apresentaram uma atividade maior, embora variável, nos linfócitos isolados de ratos, após os animais terem recebido Chl-Cu por via i.p. e em seguida serem submetidos a irradiação corporal.

Acreditamos, que a digestão e metabolização, a partir da ingestão da Chl-Cu via oral, em nosso estudo possa ter contribuído diferentemente com a atividade antioxidante quando comparada ao efeito do pigmento em estudos *in vitro* ou quando este é fornecido via intraperitoneal. Devemos ainda salientar, que na maioria dos estudos, a Chl-Cu foi fornecida ou utilizada antes que o estresse oxidativo fosse induzido, de modo que o pigmento agiu preventivamente. Em nossa pesquisa a Chl-Cu foi suplementada concomitantemente à indução do estresse oxidativo e demonstrou ser capaz de proteger o cérebro contra o elevado nível de TBARS.

O fato de o efeito protetor da Chl-Cu ter sido observado apenas no cérebro sugere a possibilidade de que a Chl-Cu ou algum de seus metabólitos após ser efetivamente absorvido, tenha sido capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica. Inferimos que a Chl-Cu pode ter atuado diretamente no cérebro seqüestrando espécies reativas de oxigênio.

Apesar de ter sido possível verificar a efetiva absorção de derivados da Chl-Cu no Experimento I, a falta de maiores detalhes sobre sua distribuição e metabolização *in vivo* impede conclusões adicionais sobre o mecanismo de ação envolvido na diminuição a níveis normais os teores de TBARS verificada no tecido

cerebral de animais que receberam dieta deficiente em vitamina E, mas suplementada com Chl-Cu.

6.3.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Análise histológica hepática foi realizada para avaliar se a suplementação com Chl-Cu, e também a deficiência de vitamina E poderiam acarretar alguma alteração na morfologia deste tecido. Na Figura 17 (A-D) são apresentados cortes representativos de tecido hepático dos quatro grupos de animais. Os dados histológicos indicam que os grupos G3 e G4, que receberam 1 e 3% de Chl-Cu suplementada na dieta, respectivamente (Figuras 17C e 17D) apresentaram características morfológicas similares aos observados nos grupos controle (Figuras 17A e 17B), com lobos hepáticos preservados ou seja, hepatócitos com núcleo em posição central com cromatina frouxa, nucléolo evidente e citoplasma eosinofílico e homogêneo, e arquitetura dos sinusóides sem qualquer resposta inflamatória. Não foram verificadas alterações no espaço porta, assim como na veia hepática terminal que se apresentou morfológicamente preservada. Destacamos que foi possível observar discreta degeneração microgótica nas células ao redor da veia centro lobular hepática em um número não significativo de animais que receberam a suplementação da Chl-Cu (3 animais). Acreditamos que estas alterações não representem qualquer dano fisiológico para a estrutura e função do órgão, porém, salientamos que maiores estudos são necessários para a determinação do impacto da ingestão do pigmento por períodos maiores.

Figura 17. Fotomicrografias de cortes histológicos de fígados de ratos. A) G1, dieta controle; B) G2, dieta controle deficiente em vitamina E; C) G3, dieta deficiente em vitamina E suplementada com 1% de Chl-Cu; D) G4, dieta deficiente em vitamina E suplementada com 3% de Chl-Cu. Os cortes mostram arquitetura lobular preservada, disposição radial dos hepatócitos, veia centrolobular e sinusóides arquitetural e morfologicamente preservados. 100x. Secções transversais coradas com HE.

Nossos resultados evidenciam que a deficiência de vitamina E provocou um aumento significativo nos níveis de TBARS e que a Chl-Cu foi capaz de reduzir estes níveis apenas no tecido cerebral. Além disso, tanto a deficiência de vitamina E, quanto a suplementação com o pigmento, não foram capazes de alterar a atividade das enzimas antioxidantes hepáticas e cerebrais testadas.

7. EXPERIMENTO III: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS NUTRICIONAIS

7.1 JUSTIFICATIVA

A Chl-Cu tem uma história de uso seguro, sendo utilizada principalmente como corante alimentar, mas também na higiene oral (pastas de dente), cicatrização de feridas e no controle de odores corporais, fecal e urinário em pacientes geriátricos. Além disso, outros empregos já foram relatados na literatura, como no tratamento de anemia e hipertensão (KEPHART, 1955; YOUNG e BERGEI, 1980).

No único estudo clínico relatado na literatura, realizado na China e que visava avaliar o efeito quimiopreventivo da Chl-Cu, os participantes receberam 300 mg de Chl-Cu/dia durante quatro meses, e não houve relatos de efeitos nocivos aos indivíduos. (EGNER *et al.*, 2001).

Embora a Chl-Cu venha sendo utilizada sem relatos de efeitos adversos, na realização do ensaio biológico para avaliação de parâmetros antioxidantes observamos que os ratos que receberam este pigmento na dieta apresentaram um baixo ganho de peso e consumo alimentar, quando comparado com aqueles animais que não receberam o pigmento.

Supomos inicialmente que o baixo consumo e conseqüentemente reduzido desenvolvimento apresentados seriam devidos à baixa aceitação da dieta contendo Chl-Cu, porém não dispomos de dados suficientes para garantir esta hipótese. Deste modo, julgamos necessária, a realização de um estudo *pair-fed*, para avaliar se o reduzido ganho de peso e prejuízo no crescimento dos animais é devido somente à baixa ingestão alimentar, ou se poderia estar relacionado a

algum efeito antinutricional da Chl-Cu, como a complexação com nutrientes no lúmen intestinal.

A seguir apresentamos os dados relativos ao consumo alimentar e desenvolvimento dos animais encontrados no estudo anterior (ensaio de avaliação de parâmetros antioxidantes) e posteriormente, descrevemos o delineamento experimental e os resultados obtidos no estudo *pair fed*.

7.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento II:

O peso inicial, peso final e o ganho de peso dos animais durante o período experimental de nove semanas estão apresentados na Tabela 13. Observa-se que o peso de todos os animais foi similar no início do experimento ($57,6 \text{ g} \pm 1,28$), porém, aqueles que receberam 1 e 3% de Chl-Cu (G3 e G4) apresentaram ao final do período experimental um peso 11,4 e 27,9% menor, respectivamente, em relação aos animais que receberam a dieta controle (G1).

Tabela 13. Ganho de Peso dos animais durante o período de 9 semanas¹

Peso	G1 Dieta Controle	G2 Dieta Vitamina E deficiente	G3 Dieta Vitamina E def. 1% Chl-Cu	G4 Dieta Vitamina E def. 3% Chl-Cu
Inicial (g)	$57,58 \pm 1,40^a$	$57,59 \pm 1,37^a$	$57,61 \pm 1,32^a$	$57,66 \pm 1,31^a$
Final (g)	$362,46 \pm 30,04^e$	$364,74 \pm 26,86^a$	$328,7 \pm 14,96^b$	$278,12 \pm 28,05^c$
Ganho de Peso(g)	$304,88 \pm 30,25^e$	$307,15 \pm 26,29^a$	$271,09 \pm 15,21^b$	$220,48 \pm 27,58^c$

Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença estatística ($p > 0,05$).

¹Resultados expressos como média e desvio padrão ($n=10$).

A Figura 18 ilustra a evolução ponderal dos animais durante as nove semanas de duração do experimento. Podemos observar que durante todo o período experimental os animais alimentados com o pigmento apresentam um ganho de peso inferior. A partir da sétima semana verificamos uma tendência à estabilização do peso dos animais, sugerindo que o atraso no desenvolvimento durante a fase de crescimento poderá determinar um baixo peso também na vida adulta de animais alimentados com Chl-Cu.

É possível observar ainda, que os animais do G4 que receberam a maior dose do pigmento (3% de Chl-Cu) na dieta apresentaram ganho de peso significativamente inferior em comparação com os outros três grupos, inclusive em relação àqueles que receberam dieta suplementada com 1% de Chl-Cu (G3).

Figura 18. Evolução do ganho de peso médio dos animais durante o período experimental (n=10). **G1:** Dieta Controle; **G2:** Dieta deficiente vitamina E; **G3:** Dieta deficiente vitamina E + 1% de Chl-Cu; **G4:** Dieta deficiente vitamina E + 3% de Chl-Cu.

O consumo da dieta, baseada na AIN-76A, pelos animais durante o período experimental está apresentado na Tabela 14.

Tabela 14. Consumo de dieta, em gramas, durante o período experimental¹

Consumo dieta	G1 Dieta Controle	G2 Dieta Vitamina E deficiente	G3 Dieta Vitamina E def 1% Chl-Cu	G4 Dieta Vitamina E def. 3% Chl-Cu
Consumo semanal (g)	130,58±26,96 ^a	132,15±27,62 ^a	118,72± 27,40 ^b	98,42± 28,63 ^c
ConsumoTotal (g)	1180,72±89,02 ^e	1194,85 ± 68,12 ^a	1055,31±63,27 ^b	878,51± 93,03 ^c

Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença estatística ($p > 0,05$).

¹Resultados expressos como média e desvio padrão ($n=10$).

O consumo de dieta dos grupos que receberam 1 e 3% de Chl-Cu (G3 e G4), foi 11,2 e 25,42% inferior respectivamente, em relação ao grupo controle (G1). Podemos observar, que o consumo de dieta dos animais do G3, que recebeu dieta deficiente em vitamina E suplementada com 1% de Chl-Cu foi significativamente menor que o consumo de dieta pelos animais dos grupos G1 e G2, que receberam dieta controle e dieta controle deficiente em vitamina E, respectivamente. Evidencia-se ainda, que o grupo G4, suplementado com 3% do pigmento, apresentou ingestão de dieta significativamente menor em relação aos outros três grupos G1, G2 e G3.

A Figura 19 mostra durante as nove semanas de duração do experimento a evolução do consumo alimentar dos animais. Verifica-se que o consumo dos animais de todos os grupos atinge um platô a partir da sexta semana. Além disso, a baixa ingestão alimentar dos animais suplementados com a Chl-Cu é visível do início ao fim do experimento.

Figura 19. Consumo de dieta pelos animais durante o período experimental (n=10). **G1:** Dieta Controle; **G2:** Dieta deficiente vitamina E; **G3:** Dieta deficiente vitamina E + 1% de Chl-Cu; **G4:** Dieta deficiente vitamina E + 3% de Chl-Cu.

O Coeficiente de Eficácia Alimentar (CEA) foi calculado a partir da relação entre o ganho de peso e o consumo alimentar total, durante o experimento. Apesar da observação de que o ganho de peso e o consumo de dieta pelos grupos G3 e G4, recebendo dietas adicionadas de 1 e 3% de Chl-Cu, respectivamente, tenha sido significativamente menor que o observado para os grupos controle, não houve diferença estatística entre os valores de CEA encontrados para os 4 grupos (Tabela 15).

Tabela 15. Coeficiente de Eficácia Alimentar ^{1,2}

	G1 Dieta Controle	G2 Dieta Vitamina E deficiente	G3 Dieta Vitamina E def. 1% Chl-Cu	G4 Dieta Vitamina E def. 3% Chl-Cu
CEA ²	0,26 ± 0,01 ^a	0,26 ± 0,02 ^a	0,26 ± 0,01 ^a	0,25 ± 0,01 ^a

Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença estatística ($p > 0,05$).

¹Resultados expressos como média e desvio padrão ($n=10$);

²CEA (Coeficiente de Eficácia Alimentar), corresponde à relação entre o ganho de peso e o consumo alimentar.

Desta forma, observa-se que a suplementação desta dieta com doses de 1 e 3% de Chl-Cu durante as nove semanas provocou redução significativa na evolução ponderal dos animais, e no consumo da dieta. Uma explicação para este fato poderia ser a baixa aceitação da dieta pelos animais, o que pode estar relacionado diretamente com suas características sensoriais, principalmente o sabor, embora neste momento não tenha sido possível excluir algum efeito antinutricional ou tóxico relacionado com a Chl-Cu. Como os valores de CEA não diferiram entre si, sugere-se que o reduzido desenvolvimento dos animais está relacionado à baixa ingestão alimentar das rações que continham Chl-Cu.

Vale-se ressaltar, que a FDA, em 2002, revisou estudo realizado por Harrison *et al.*, (1954), em que a clorofilina cúprica de sódio e potássio foi oferecida a ratos em concentrações de até 3% na alimentação por até dois anos. A agência concluiu não haver indicações de efeitos adversos em qualquer uma das doses testadas e também não foi evidenciada toxicidade do metal (FDA, 2002).

Apesar de haver evidências do uso desse pigmento sem toxicidade aparente, não há estudos na literatura que relatem a administração do mesmo em grandes quantidades, visto que o uso da Chl-Cu como corante alimentar pressupõe a ingestão de quantidades muito reduzidas. Contudo, deve-se levar consideração que é crescente o consumo de Chl-Cu como suplemento alimentar

em quantidades indiscriminadas, sem, contudo, existir um respaldo científico apropriado, o que remete à necessidade de estudos clínicos e toxicológicos mais aprofundados.

Os resultados deste trabalho indicam que a suplementação da dieta com Chl-Cu resultou em menor consumo de dieta pelos animais afetando o crescimento e desenvolvimento dos mesmos, apesar dos quatro grupos apresentarem um CEA similar. Estas alterações no consumo alimentar e o déficit no crescimento de animais recebendo dieta suplementada com Chl-Cu incentivou a realização de um estudo *pair fed* para uma avaliação mais aprofundada da evolução ponderal e de outros parâmetros nutricionais nestes animais.

7.3 MATERIAL E MÉTODOS

7.3.1 ENSAIO BIOLÓGICO *PAIR FEED*

ANIMAIS

Para a realização do estudo *pair fed*, foram utilizados 40 ratos da linhagem Wistar, machos, recém desmamados, com peso aproximado de 60g, provenientes do biotério da FCF-USP. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos, de oito animais cada, e mantidos por quatro semanas em gaiolas metabólicas individuais de aço inox em condições ambientais controladas, com período de iluminação artificial de 12 horas intercalado com outro período também de 12 horas sem iluminação e temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, com livre acesso à água.

DIETAS

Durante quatro semanas os animais foram alimentados com dietas diferentes, preparadas de acordo com as recomendações da American Institute of Nutrition, com base na dieta experimental AIN-93G, que atende as recomendações para animais em crescimento (REEVES *et al.*, 1993), já descrita anteriormente no item 5.2.1.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

O estudo empregou a técnica *pair fed*, utilizada para distinguir se os resultados encontrados para o crescimento dos animais foram decorrentes da baixa ingestão dietética ou, provocada pela suplementação da Chl-Cu na dieta.

De acordo com esta técnica de estudo, a quantidade de dieta oferecida a animais alimentados com dieta controle foi calculada a partir do consumo alimentar do grupo suplementado com o pigmento, de forma que os grupos pareados ingeriram a mesma quantidade de dieta. A utilização de grupos *pair fed* garante que a variável 'ganho de peso' seja isolada, e não sofra interferências acarretadas pela diferença no total de dieta ingerida pelos diferentes grupos de animais.

Os animais foram distribuídos em cinco grupos experimentais. Um grupo recebeu dieta controle *ad libitum*, dois grupos receberam dieta suplementada com Chl-Cu (1 e 3%) também *ad libitum* (AD), enquanto os outros dois grupos *pair fed* (PF), tiveram seu acesso à dieta controlado de acordo com a ingestão dos animais que receberam Chl-Cu:

- **AD** (n=8): ingestão *ad libitum* de dieta controle. Animais com livre acesso à dieta durante todo o experimento.
- **1% Chl** (n=8): ingestão *ad libitum* de dieta suplementada com 1% de Chl-Cu. Grupo

para a determinação do efeito da suplementação da dieta com 1% do pigmento.

- **PF – 1%** (n=8): ingestão controlada (*pair fed*). Animais com acesso constante à dieta, porém limitado, de acordo com a média do consumo dos animais do grupo 1% Chl-Cu.
- **3% Chl** (n=8): ingestão *ad libitum* de dieta suplementada com 3% de Chl-Cu. Grupo para a determinação do efeito da suplementação da dieta com 3% do pigmento
- **PF – 3%** (n=8): ingestão controlada (*pair fed*). Animais com acesso constante à dieta, porém limitado, de acordo com a média do consumo dos animais do grupo 3% Chl-Cu.

O peso corporal foi monitorado diariamente, assim como o consumo alimentar, pela pesagem regular dos comedouros, com a finalidade de verificar o ganho de peso e o Coeficiente de eficácia alimentar (CEA). O CEA foi calculado de acordo com a seguinte relação:

$$\text{CEA} = \text{ganho de peso do animal(g)} / \text{consumo de ração (g)}$$

As fezes dos animais foram coletadas em frascos individuais durante os sete dias da terceira semana do experimento. As fezes foram acondicionadas hermeticamente em frascos para coleta e armazenadas em congelador a -20°C. Posteriormente foram liofilizadas e pulverizadas em moinho, seguida da determinação do teor de nitrogênio e cálculo da digestibilidade aparente das proteínas.

Ao final das quatro semanas, após jejum de 8 horas, com acesso à água, os animais foram sacrificados sob efeito do anestésico hidrato de cloral, conforme já citado anteriormente. Foram removidos rins, baço, fígado, e cérebro, que foram

imediatamente lavados em solução salina 0,9%, e pesados para verificação do seu peso relativo (g/100g de peso corporal).

7.3.2 ANÁLISES QUÍMICAS

7.3.2.1 COMPOSIÇÃO DA DIETA AIN-93G

A composição química das dietas está apresentada no item 5.2.1.

7.3.2.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR PROTÉICO DAS FEZES

O teor de nitrogênio foi determinado pelo método de micro-Kjeldahl e o resultado multiplicado pelo fator 6,25 para a conversão em proteína (AOAC, 1984).

7.3.2.3 DETERMINAÇÃO DA DIGESTIBILIDADE APARENTE DAS PROTEÍNAS

A digestibilidade aparente das proteínas foi calculada pela diferença entre o nitrogênio protéico ingerido e o excretado nas fezes dos ratos.

$$\text{Digestibilidade protéica aparente} = \frac{\text{ingestão protéica (g)} - \text{excreção protéica (g)}}{\text{ingestão protéica (g)}} \times 100$$

7.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.4.1 GANHO DE PESO E CONSUMO DE DIETA

Semelhantemente ao observado no experimento anterior, os animais que receberam suplementação com 1 e 3% de Chl-Cu, apresentaram ingestão alimentar significativamente inferior (16,15% e 27,8%, respectivamente), quando comparado a dos animais do grupo controle (AD). Os animais dos grupos *pair fed* (PF-1% e PF-3%) apresentaram estas mesmas características em relação ao

consumo alimentar, visto que receberam a mesma quantidade de dieta ingerida pelos grupos suplementados com 1 e 3% de Chl-Cu. (Figura 20).

Figura 20. Consumo total de dieta durante o período experimental. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p > 0,05$). **AD**, grupo controle; **1% Chl**, grupo suplementado com 1% de Chl-Cu; **PF-1%**, grupo *pair fed* com ingestão controlada de acordo com grupo 1% Chl; **3% Chl**, grupo suplementado com 3% de Chl-Cu; **PF-3%**, grupo *pair fed* com ingestão controlada de acordo com grupo 3% Chl.

Na Figura 21 é apresentado o ganho de peso médio dos animais durante as quatro semanas do experimento. Todos os grupos tiveram um ganho de peso significativamente inferior àquele dos animais que receberam dieta controle *ad libitum*. Observou-se que os animais dos grupos pareados 1% Chl e PF-1%, que ingeriram a mesma quantidade de dieta, apresentaram um ganho de peso médio similar. Por outro lado os animais do grupo PF-3%, apresentaram um ganho de peso significativamente maior que aqueles animais que receberam 3% de Chl-Cu na dieta, mesmo consumindo as mesmas quantidades de dieta controle. Este resultado sugere que o baixo ganho de peso observado naqueles animais que receberam Chl-Cu se deve não somente ao baixo consumo da dieta, mas também à ingestão do pigmento.

Figura 21. Ganho de peso total durante o período experimental. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p > 0,05$). **AD**, grupo controle; **1% Chl**, grupo suplementado com 1% de Chl-Cu; **PF-1%**, grupo *pair fed* com ingestão controlada de acordo com grupo 1% Chl; **3% Chl**, grupo suplementado com 3% de Chl-Cu; **PF-3%**, grupo *pair fed* com ingestão controlada de acordo com grupo 3% Chl.

Dessa forma, foi verificado novamente um déficit no crescimento de animais alimentados com Chl-Cu confirmando um possível efeito negativo no desenvolvimento de ratos recém desmamados, ao menos para aqueles suplementados com 3% de Chl-Cu. Como já observado anteriormente esse déficit no crescimento não se refletiu no coeficiente de eficácia alimentar, que foi semelhante, não apresentando qualquer diferença estatística entre os cinco grupos de animais estudados (Tabela 16).

Tabela 16. Coeficiente de Eficácia Alimentar^{1,2}

	AD	1% Chl	PF-1%	3% Chl	PF-3%I
CEA	0,40±0,01 ^a	0,42±0,01 ^a	0,42±0,01 ^a	0,40±0,01 ^a	0,44±0,01 ^a

Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença estatística ($p > 0,05$).

¹Resultados expressos como média e desvio padrão ($n=10$);

²CEA (Coeficiente de Eficácia Alimentar), corresponde à relação entre o ganho de peso e o consumo alimentar.

Estudos nutricionais com a Chl-Cu são escassos na literatura e os nossos resultados divergem daqueles apresentados há mais de 50 anos por Harrison e colaboradores (1954), no qual ratos Sprague-Dawley recém-desmamados foram suplementados por dois anos com doses de até 3% de Chl-Cu na dieta (dieta para ratos Rockland, Rockland Farms, New City, New York, conforme descrito pelos autores, a dieta continha quantidades adequadas de nutrientes), para estabelecer a segurança e níveis de tolerância desse corante alimentar. Em contraste com os nossos resultados, esses autores não observaram durante todo o período experimental diferenças significativas no ganho de peso quando comparado com os ratos controle. Contudo, em testes de toxicidade aguda, realizados pelos mesmos autores, onde ratos machos e fêmeas foram alimentados com uma dieta contendo 15% de clorofilina cúprica observou-se perda de peso devido à recusa alimentar (HARRISSON *et al.*, 1954).

O JECFA, comitê responsável pela avaliação dos aditivos alimentares, analisou em 1975 este estudo citado anteriormente, e devido à falta de efeitos adversos relatados para ratos, estabeleceu como 1500 mg of Chl-Cu/kg de peso corporal/dia, o limite de concentração da Chl-Cu em que efeitos tóxicos não são observados (NOEL) (FDA, 2002). Aplicando um fator de segurança de 200 vezes sobre o NOEL, a ingestão diária aceitável (IDA) para um homem de 60 kg foi calculada como sendo de 450 mg/pessoa/dia (FAO/WHO, 1975). Além disso, a FDA (Food and Drug Administration) ainda baseada no estudo realizado por Harrison *et al.*, (1954) concluiu não haver efeitos adversos para o consumo de dietas contendo até 3% de Chl-Cu para ratos (FDA, 2002). Esta agência permite para humanos o uso da Chl-Cu como desodorante interno para indivíduos com incontinência em doses de até 300 mg/dia (FDA, 2002).

Os resultados do nosso estudo não permitem uma comparação direta com aqueles observados por Harrison *et al.*, (1954) uma vez que foi utilizada Chl-Cu produzida há quase 6 décadas atrás. A composição química e a pureza da Chl-Cu empregada não foram descritas pelos autores, e a composição da Chl-Cu comercial pode ter sido diferente daquela produzida hoje o que justificaria diferentes respostas biológicas.

Recentemente, foi publicado trabalho que relata o ganho de peso de ratos alimentados com Chl-Cu (WOO *et al.*, 2007). Segundo os autores, a administração de 1% de Chl-Cu na dieta dos animais não suprimiu a neurotoxicidade induzida por acrilamida (ACR) fornecida concomitantemente na água de beber. Paralelamente, um grupo de animais recebeu a mesma dose de Chl-Cu na dieta sem co-administração de ACR. Em ambas situações verificou-se, que a suplementação com esta dose de Chl-Cu não afetou nem o ganho de peso, nem o consumo dos animais. A clorofilina utilizada neste estudo foi obtida da empresa Tama Biochemical Co., Ltd., (Tokyo, Japan), porém não foi especificado no estudo se foi utilizada clorofilina cúprica ou clorofilina ligada a outro metal, nem a pureza do pigmento utilizado.

Neste contexto é importante considerar que a variabilidade nas preparações de Chl-Cu e condições de teste podem resultar em efeitos biológicos ambíguos e muitas vezes não reprodutíveis. Análises químicas revelam que há uma grande variação de constituintes nestas amostras, devida à variação nos extratos naturais de clorofila e do processo tecnológico empregados. Este pigmento é comercializado como uma mistura de substâncias com estruturas distintas, como as clorinas cúpricas e_6 e e_4 , feoforbídeo cúprico, rodina cúprica g_7 ,

dentre outros (CHERNOMORSKY, 1994; DASHWOOD, 1997). É observada ainda, uma variabilidade no conteúdo de sais inorgânicos (Na^+ e K^+).

Desse modo, sugerimos que o déficit no ganho de peso observado em nosso experimento pode ter sido causado pela alta concentração da Chl-Cu na dieta.

Tendo em vista o reduzido crescimento dos ratos suplementados com o pigmento, verificamos que são de extrema importância, futuras investigações que reavaliem os limites seguros de ingestão do mesmo. Pois apesar do crescente consumo de Chl-Cu como suplemento alimentar, não existem métodos analíticos e critérios de análise de pureza validados para a Chl-Cu.

7.4.2 PESO DOS ÓRGÃOS

Ao fim do período experimental os animais foram anestesiados e em seguida sacrificados, removendo-se baço, fígado, rins e cérebro para determinação do seu peso relativo (g/100g de peso corporal). Os valores encontrados estão expressos na Tabela 17.

Tabela 17. Peso relativo de órgãos (g/100 g de peso corporal)¹

	AD	1% Chl	PF-1%	3% Chl	PF-3%
Rins	0,99±0,14 ^a	1,01±0,25 ^a	0,98±0,24 ^a	0,93±0,23 ^a	1,10±0,27 ^a
Baço	0,26±0,02 ^a	0,28±0,06 ^a	0,27±0,07 ^a	0,27±0,06 ^a	0,26±0,06 ^a
Fígado	3,56±0,20 ^a	3,43±0,83 ^a	3,43±0,85 ^a	3,49±0,89 ^a	3,49±0,89 ^a
Cérebro	0,88±0,09 ^a	0,82±0,19 ^a	0,82±0,21 ^a	0,84±0,22 ^a	0,85±0,22 ^a

Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença estatística ($p > 0,05$).

¹Resultados expressos como média e desvio padrão (n=8).

AD, grupo controle; **1% Chl**, grupo suplementado com 1% de Clorofilina cúprica; **PF-1%**, grupo *pair fed* com ingestão controlada de acordo com grupo 1% Chl; **3% Chl**, grupo suplementado com 3% de Clorofilina cúprica; **PF-3%**, grupo *pair fed* com ingestão controlada de acordo com grupo 3% Chl.

Não foi encontrada diferença significativa no peso relativo dos órgãos entre os cinco grupos, não havendo alteração para aqueles animais alimentados com a Chl-Cu.

Ao contrário do observado neste estudo, Sharma *et al.*, (2007), observaram aumento significativo no peso do baço de camundongos BALB/c que receberam radiação gama e concomitantemente injeção intraperitoneal de Chl-Cu (100-200 µg/g de peso corporal). Segundo os autores a esplenomegalia seria devida ao aumento do número de linfócitos, estimulado pela administração da Chl-Cu, que, portanto, poderia modular a resposta imune.

7.4.3 PESO E UMIDADE DAS FEZES

Durante a terceira semana do ensaio, realizou-se a coleta de fezes, e ao fim do período de coleta estas foram liofilizadas. Na tabela 18 estão apresentados os pesos do material fecal, antes e após a liofilização.

Tabela 18. Peso das fezes pré e pós liofilização e umidade (%)¹

	AD	1% Chl	PF-1%	3% Chl	PF-3%
Fezes (g)	11,20±1,65 ^{a,b}	11,94±1,70 ^a	9,67±0,89 ^b	14,28±1,26 ^c	8,81±0,56 ^d
Fezes secas(g)	8,91±0,98 ^{a,b}	9,45±0,75 ^a	7,82±0,23 ^b	11,57±1,12 ^c	7,29±0,57 ^d
Umidade (g/100g)	20,44±2,01 ^a	20,85±1,52 ^a	19,13±1,58 ^{a,b}	18,97±2,23 ^{a,b}	17,25±1,89 ^b

Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença estatística ($p > 0,05$).

¹Resultados expressos como média e desvio padrão (n=8).

AD, grupo controle; **1% Chl**, grupo suplementado com 1% de Clorofilina cúprica; **PF-1%**, grupo *pair fed* com ingestão controlada de acordo com grupo 1% Chl; **3% Chl**, grupo suplementado com 3% de Clorofilina cúprica; **PF-3%**, grupo *pair fed* com ingestão controlada de acordo com grupo 3% Chl.

O peso do material fecal dos animais que receberam a Chl-Cu foi maior comparado ao dos animais que receberam dieta controle. Além disso, o peso das fezes dos animais do grupo PF-3% foi significativamente inferior aos outros quatro grupos de animais, indicando provavelmente um maior aproveitamento dos

nutrientes contidos na dieta. A liofilização não alterou essas diferenças existentes entre os grupos em relação ao peso das fezes. Finalmente, a umidade presente nas fezes não apresentou diferença significativa entre os grupos, indicando que o maior peso das fezes daqueles animais alimentados com Chl-Cu não se deve a um maior teor de umidade presente nas mesmas.

Acreditamos que boa parte da Chl-Cu ingerida com a dieta não foi absorvida pelos animais, aumentando assim a massa fecal e tornando-a escura. Além disso, uma possível complexação com nutrientes da dieta durante a passagem pelo trato gastrointestinal poderia inibir a sua absorção, contribuindo assim com o aumento do peso do material fecal e conseqüentemente, menor aproveitamento de determinados nutrientes.

Alguns dos efeitos atribuídos à Chl-Cu, como anticarcinogenicidade e antimutagenicidade tem sido explicados pela complexação intestinal do pigmento com carcinógenos, mutágenos, dentre outras moléculas tóxicas (ARIMOTO *et al.*, 1993; BREINHOLT *et al.*, 1995; ARIMOTO *et al.*, 1997; DASHWOOD *et al.*, 1997; HAYASHI *et al.*, 1999; EGNER *et al.*, 2001), o que acarretaria a diminuição da biodisponibilidade intestinal e da bioatividade celular destas substâncias tóxicas que deixariam de atuar nos órgãos alvo.

Acredita-se que a Chl-Cu poderia também se complexar com outras moléculas presentes no intestino e também na circulação sanguínea (MATA *et al.*, 2004).

Em 2005, OUAMEUR e colaboradores examinaram a interação da albumina do soro humano com a Chl-Cu em solução aquosa sob condições fisiológicas. Foi constatada uma interação inespecífica desse pigmento com as

cadeias polipeptídicas, além de alterações na conformação protéica com redução da α -hélice e aumento da estrutura β .

7.4.4 TEOR DE NITROGÊNIO E PROTEÍNA NAS FEZES E DIGESTIBILIDADE PROTÉICA

Para avaliar uma possível complexação da Chl-Cu com a proteína da dieta no trato gastrointestinal dos animais, foi determinado o teor de nitrogênio nas fezes coletadas e multiplicado pelo fator 6,25 para a conversão em proteína (AOAC, 1984).

Foi observado que o teor de nitrogênio excretado foi maior nos animais do grupo 3% Chl do que naqueles que do grupo 1%Chl e também foi significativamente maior que o encontrado nas fezes dos animais receberam dieta controle (AD, PF-1% e PF-3%) (Figura 22).

Figura 22. Teor de nitrogênio fecal. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p>0,05$). **AD**, grupo controle; **1% Chl**, grupo suplementado com 1% de Chl-Cu; **PF-1%**, grupo *pair fed* com ingestão controlada de acordo com grupo 1% Chl; **3% Chl**, grupo suplementado com 3% de Chl-Cu; **PF-3%**, grupo *pair fed* com ingestão controlada de acordo com grupo 3% Chl.

A digestibilidade aparente da proteína calculada a partir destes dados encontra-se na Tabela 19, e foi determinada pela diferença entre o nitrogênio protéico ingerido e o excretado nas fezes dos ratos.

Tabela 19. Teor de proteína consumida e excretada e digestibilidade protéica aparente¹

	AD	1% Chl	PF-1%	3% Chl	PF-3%
Proteína consumida (g)	23,73±0,93 ^a	22,55±1,02 ^a	21,10±1,12 ^a	20,35±0,99 ^a	19,33±1,12 ^a
Proteína excretada (g)	1,78±0,13 ^a	2,24±0,09 ^b	1,59±0,08 ^a	3,41±0,17 ^c	1,38±0,06 ^a
Digestibilidade aparente	92,49±0,71 ^a	90,07±0,93 ^b	92,08±0,67 ^a	83,27±1,19 ^c	92,81±0,19 ^a

Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença estatística ($p > 0,05$).

¹Resultados expressos como média e desvio padrão (n=8).

AD, grupo controle; **1% Chl**, grupo suplementado com 1% de Clorofilina cúprica; **PF-1%**, grupo *pair fed* com ingestão controlada de acordo com grupo 1% Chl; **3% Chl**, grupo suplementado com 3% de Clorofilina cúprica; **PF-3%**, grupo *pair fed* com ingestão controlada de acordo com grupo 3% Chl.

Independentemente da quantidade de dieta controle consumida a digestibilidade protéica se manteve constante (~ 93%) para os grupos AD, PF-1% e PF-3%, sendo menor para os grupos 1% Chl (~90%) e 3% Chl (~83%), o que sugere para estes dois últimos grupos, um comprometimento no aproveitamento da proteína presente na dieta.

Contudo, a clorofilina cúprica também apresenta nitrogênio em sua molécula, de forma que a excreção fecal de N destes animais corresponde à soma do N de origem protéica e daquela proveniente da Chl-Cu não absorvida.

Considerando toda a Chl-Cu ingerida pelos animais não absorvível e descontando o nitrogênio presente na molécula do pigmento do valor de nitrogênio ingerido e excretado nas fezes, a digestibilidade protéica corrigida desta maneira é semelhante entre os grupos.

Entretanto, pelo fato da Chl-Cu ser comprovadamente absorvida em algum grau, e pela impossibilidade de diferenciar a origem deste N, se proveniente da Chl-Cu ou de proteína (exógena ou endógena) a elevada excreção de N total pode indicar comprometimento na absorção do nitrogênio protéico e possivelmente de algum outro nutriente. Uma hipótese seria um menor aproveitamento do nitrogênio protéico, que somado ao baixo consumo dietético contribuiria para o prejuízo no crescimento dos animais.

Os resultados indicam que a suplementação da dieta com a Chl-Cu pode acarretar um prejuízo no crescimento dos animais, e que uma menor digestibilidade protéica seria um dos fatores responsáveis por este déficit. A formação de complexos da Chl-Cu, com diferentes componentes alimentares descrita na literatura apóia a hipótese de que a Chl-Cu possa ter interferido negativamente na utilização dos nutrientes pelo organismo animal (YAMAZAKI *et al.*, 2004; MATA *et al.*, 2004).

Dessa forma, mais uma vez salientamos a necessidade da reavaliação dos níveis de ingestão segura de Chl-Cu tanto por ratos, como também para humanos.

19854

8. CONCLUSÕES

- Os dois principais componentes, presentes na Chl-Cu que foi adicionada à dieta dos animais, apresentaram comportamentos diferentes: a clorina cúprica e₄ foi estável à digestão e efetivamente absorvida pelo organismo animal, sendo detectada no soro, fígado e rins. A clorina cúprica e₆ não foi detectada no soro e nos tecidos. Isto pode indicar que esta clorina não foi absorvida ou sofreu rápida metabolização pós-absorção. Finalmente, a ingestão da Chl-Cu não provocou qualquer alteração na morfologia do intestino delgado.
- A Chl-Cu foi capaz de proteger o tecido cerebral contra elevados níveis de TBARS induzido pela deficiência de vitamina E. Entretanto, este efeito não foi observado no tecido hepático. Nas condições estudadas, o efeito antioxidante do pigmento parece estar relacionado a uma proteção *in situ*, pois não causou qualquer alteração na atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx e GR.
- A presença de até 3% Chl-Cu na dieta causou menor consumo alimentar e ganho de peso em ratos. Um estudo *pair-fed* sugere ter ocorrido complexação da Chl-Cu com componentes da dieta que pode ter contribuído para o déficit no crescimento dos animais.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANTUNES, L. M. G.; ARAUJO, M.C.P. Mutagenicidade e antimutagenicidade dos principais corantes para alimentos. **Revista de Nutrição**. v.13, n.2, p.81-88, 2000.
2. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Regulamento técnico sobre atribuições de aditivos e seus limites máximos para alimentos. Resolução RDC nº 64 de 16 de setembro de 2008.
3. ARIMOTO, S.; FUKUOKA, S.; ITOME, C.; NAKANO, H.; RAI, H.; HAYATSU, H. Binding of polycyclic mutagens to chlorophyllin resulting in inhibition of the mutagenic activity. **Mutation Research**. v.287, p.293-305, 1993.
4. ARIMOTO, S.; HARADA, N.; TOKUNAGA, R.; JI, O.; HAYATSU, H. Adsorption of mutagens to chlorophyllin-chitosan, an insoluble form of chlorophyllin. **Mutation Research**. v.381, p.243-249, 1997.
5. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 14ed. Washington, chapter 3, p.26-27, 1984.
6. BAXTER, J.H. Absorption of phytol in normal men and in patients with Refsum disease. **Journal Lipids Research**. v.9, p.636-641, 1968.
7. BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**. v.44, p.276-287, 1969.
8. BECK, M.A.; WILLIAMS-TOONE, D.; LEVANDER, O.A. Cocksackievirus B3-resistant mice become susceptible in Se/Vitamin E deficiency. **Free Radicals Biology & Medicine**. v.34, n.10, p.1236-1270, 2003.
9. BERNHEIM, F.; BERNHEIM, M.L.C.; WILBUR, K.M. The reaction between thiobarbituric acid and the oxidation products of certain lipids. **Journal of Biological Chemistry**. v.174, p.257-264, 1948.
10. BEZ, G.C.; JORDAO, B.Q.; VINCENTINI, V.E.P.; MANTOVANI, M.S. Investigation of genotoxic and antigenotoxic activities of chlorophylls and chlorophyllin in cultured V79 cells. **Mutation Research**. v.497, p.139-145, 2001a.
11. BEZ, G.C.; JORDAO, B.Q.; VINCENTINI, V.E.P.; MANTOVANI, M.S. Differential protection of A and B chlorophyll in MMC-mediated induction of chromatid and isochromatid breaks in human lymphocytes culture. **Cytologia**. v.66, p.313-318, 2001b.

12. BEUTLER, E. Red cell metabolism, 2 ed., New York, Grune & Stratton, p.89-90, 1975.
13. BLATT, D.H.; LEONARD, S.W.; TRABER, M.G. Vitamin E kinetics and the function of tocopherol regulatory proteins. **Nutrition**. v.17, n.10, p.799-805, 2001.
14. BLUM, C. A.; XU, M.; ORNER, G. A.; DARIO DIAZ, G.; LI, Q.; DASHWOOD, W. M.; BAILEY, G. S.; DASHWOOD, R. D. Promotion versus suppression of rat colon carcinogenesis by chlorophyllin and chlorophyll: modulation of apoptosis, cell proliferation, and beta-catenin/Tcf signaling. **Mutation Research**. v.523-524, p.217-23, 2003.
15. BOLOOR, K.K.; KAMAT, J.P.; DEVASAGAYAM, T.P.A. Chlorophyllin as a protector of mitochondrial membranes against gamma-radiation and photosensitization. **Toxicology**. v.155, n.1-3, p.63-71, 2000.
16. BRADFORD, A.; ATKINSON, J.; FULLER, N.; RAND, R.P. The effect of vitamin E on the structure of membrane lipid assemblies. **Journal of Lipid Research**. v.44, n.10, p.1940-1945, 2003.
17. BREINHOLT, V.; HENDRICKS, J.; PEREIRA, C.; ARBOGAST, D.; BAILEY, G. Dietary chlorophyllin is a potent inhibitor of aflatoxin B₁ hepatocarcinogenesis in rainbow trout. **Cancer Research**. v.55, p.57-62, 1995.
18. BREINHOLT, V.; ARBOGAST, D.; LOVELAND, P.; PEREIRA, C.; DASHWOOD, MR.; HENDRICKS, J.; BAILEY, G. S. Chlorophyllin chemoprevention in trout initiated by aflatoxin B₁ bath treatment: an evaluation of reduced bioavailability vs. target organ protective mechanisms. **Toxicology and applied pharmacology**. v.158, p.141- 51, 1999.
19. BRONZETTI, G.; GALLI, A.; DELLA CROCE, C. Antimutagenic effects of chlorophyllin. **Basic Life Science**. v.52, p.463-468, 1990.
20. BURCZYNSKI, J.M.; HAYES, J.R.; LONGHURST, P.A.; COLBY, H.D. Species differences in adrenal lipid peroxidation: role of α -tocopherol. **Free Radicals Biology & Medicine**, v.26, n.7-8, p.987-991, 1999.
21. BURTON, G.W.; TRABER, M.G. Vitamin E: Antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. **Annual Review of Nutrition**. v.10, p.357-382, 1990.
22. CADENAS, E. Basic mechanisms of antioxidant activity. **Biofactors**. v.6, p.391-397, 1997.

-
23. CADENAS, E.; DAVIES, K.J.A. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Radicals Biology & Medicine**. v.29, p.222-230, 2000.
24. CHAN, W.K.M.; DECKER, E.A.; CHOW, C.K. Effect of dietary carnosinase on plasma and tissue antioxidant concentrations and on lipid peroxidation in rat skeletal muscle. **Lipids**. v.9, n.7, p.461-466, 1994.
25. CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiology Review**. v.59, p.527-605, 1979.
26. CHERNOMORSKY, S. Variability of the composition of chlorophyllin. **Mutation Research**. v.324, p.77-178, 1994.
27. CHERNOMORSKY, S.; RANCOURT, R.; VIRDI, K.; SEGELMAN, A.; PORETZ, R.D. Antimutagenicity, cytotoxicity and composition of chlorophyllin copper complex. **Cancer Letters**. v.120, p.141-147, 1997.
28. CHOW, C.K. Cellular antioxidant defense mechanisms. Boca Raton, Florida. CRC Press, v.3, p.97-100, 1988.
29. CHOW, C.K.; IBRAHIM, W.; WEI, Z.; CHAN, A.C. Vitamin E regulates mitochondrial hydrogen peroxide generation. **Free Radicals Biology & Medicine**. v.27, n.5-6, p.580-587, 1999.
30. CHUNG, W-Y., LEE, J-M., PARK, M-Y., YOOK, J-I, KIM, J., CHUNG, A-S., SURH, Y-J, PARK, K-K. Inhibitory effects of chlorophyllin on 7,12-dimethylbenz [α] anthracene-induced bacterial mutagenesis and mouse skin carcinogenesis. **Cancer Letters**. v.145, p.57-64, 1999.
31. CLIFFORD, M.N. **Understanding the biological effects of dietary complex phenol and tanins and their implications for the consumer's health and well being**: report of the European project FAIR. Local: European Community Programme for Research, Technological Development and Demonstration in the field of Agriculture and Fisheries, 1995.
32. COMPORTI, M. Lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. **Laboratory investigation**. v.35, p.599-623, 1985.
33. COZZOLINO, S. M. F.; MICHELAZZO, F. B. Biodisponibilidade: conceitos, definições e aplicabilidade. In: COZZOLINO, S. M. F., org. **Biodisponibilidade de nutrientes**. São Paulo: Manole, p.3-11, 2005.
34. DAM, P.S.V.; ASBECK, B.S.V.; BRAVENBOER, B.; OIRSCHOT, J.F.L.M.V.; GISPEN, W.H.; MARX, J.J.M. Nerve function and oxidative stress in

diabetic and vitamin E deficient in rats. **Free Radicals Biology & Medicine**. v.24, n.1, p.18-26,1998.

35. DASHWOOD, R.H.; BREINHOLT, V.; BAILEY, G.S. Chemopreventive properties of chlorophyllin: inhibition of aflatoxin B₁ (AFB₁)-DNA binding *in vivo* and anti-mutagenic activity against AFB₁ and two heterocyclic amines in the *Salmonella* mutagenicity assay. **Carcinogenesis**. v.12, n.5, p.939-942, 1991.
36. DASHWOOD, R.H.; YAMANE, S.; LARSEN, R. Study of the forces stabilizing complexes between chlorophylls and heterocyclic amine mutagens. **Environmental Molecular Mutagens**. v.27, p.211-218, 1996.
37. DASHWOOD, R.H. The importance of using pure chemicals in (anti)mutagenicity studies: chlorophyllin as a case in point. **Mutation Research**. v.381, p.283-286, 1997.
38. DASHWOOD, R.H.; NEGISHI, T.; HAYATSU, H.; BREINHOLT, V.; HENDRICKS, J.D.; BAILEY, G.S. Chemopreventive properties of chlorophylls towards aflatoxin B₁: a review of the antimutagenicity data in rainbow trout. **Mutation Research**. v.399, p.245-253, 1998.
39. DEMPSEY, B.; HARRISON, L. Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. **Annual Review Biochemistry**. v.63, p.915-948, 1994.
40. DESAI, I.D.; BHAGAVAN, H.; SALKELD, R. Vitamin E content of crude and refined vegetable oils in southern brazil. **Journal Food Composition and Analysis**. v.1, n.1, p.231-238,1988.
41. DIPLOCK, A.T. Fat soluble Vitamins, Heinemann, London, p.154, 1985.
DROGE, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiological Reviews**. v.82, p.47-95, 2002.
42. EDENHARDER, R.; LEOPOLD, C.H.; KRIES, M. Modifying actions of solvent extracts from fruit and vegetable residues on 2-amino-3-methylimidazo[4,5]quinoline (IQ) and 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5]quinoxaline (MeIQx) induced mutagenesis in *Salmonella Typhimurium* TA98. **Mutation Research**. v.341, p.302-318, 1995.
43. EGNER, P.A.; STANSBURY, K.H.; SNYDER, E.P.; ROGERS, M.E.; HINTZ, P.A.; KENSLER, T.W. Identification and characterization of chlorin e4 ethyl ester in sera of individuals participating in the chlorophyllin chemoprevention trial. **Chemical Research in Toxicology**. v.13, p.900-906, 2000.

- 44 EGNER, P. A.; WANG, J. B.; ZHU, Y. R.; ZHANG, B. C.; WU, Y.; ZHANG, Q. N.; QIAN, G. S.; KUANG, S. Y.; GANGE, S. J.; JACOBSON, L. P.; HELZLSOUER, K. J.; BAILEY, G. S.; GROOPMAN, J. D.; KENSLER, T. W. Chlorophyllin intervention reduces aflatoxin-DNA adducts in individuals at high risk for liver cancer. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.98, n.25, p.14601- 14606, 2001.
- 45 EGNER, P.A.; MUNOZ, A.; KENSLER, T.W. Chemoprevention with chlorophyllin in individuals exposed to dietary aflatoxin. **Mutation Research**. v.523-524, p.209-216, 2003.
- 46 ESTERBAUER, H. Estimation of peroxidative damage: a critical review. **Pathology Biology**. v.44, p.25-28, 1996.
- 47 FERNANDES, T. M.; GOMES, B. B.; LANFER-MARQUEZ, U. M. Apparent absorption of chlorophyll from spinach in an assay with dogs. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.8, p.426-432, 2007.
- 48 FERRUZZI, M.G.; FAILLA, M.L.; SCHWARTZ, S.J. Assessment of degradation and intestinal cell uptake of carotenoids and chlorophyll derivatives from spinach puree using an *in vitro* digestion and Caco-2 human cell model. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.49, p.2082-2089, 2001.
- 49 FERRUZZI, M. G.; BOHM, V.; COURTNEY, P.; SCHWARTZ S. J. Antioxidant and antimutagenic activity of dietary chlorophyll derivatives determined by radical scavenging and bacterial reverse mutagenesis assays. **Journal of Food Science**. v.67, p.2589-2595, 2002a.
- 50 FERRUZZI, M.G.; FAILLA, M.L.; SCHWARTZ, S.J. Sodium Copper Chlorophyllin: *In vitro* Digestive Stability and Accumulation by Caco-2 Human Intestinal Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.2173-2179, 2002b.
- 51 FERRUZZI, M.G.; BLAKESLEE, J. Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. **Nutrition Research**. v.27, p.1-12, 2007.
- 52 FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Evaluation of certain food additives. **Technical Report Series**, Geneva, v.557, p.1-37, 1974.
- 53 FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/WORLD HEALTH ORGANIZATION. Toxicological Evaluation of Some Food Colours, Enzymes, Flavour Enhancers, Thickening Agents, and Certain Other Food

- Additives. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO Food Additives Series. n.6, p.74-77, Geneva, 1975.
54. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Listing of color Additives Exempt From Certification: Sodium Copper Chlorophyllin. 21 CFR Part 73, Docket n.00c-0929. April, 2002. Disponível em:
<http://www.fda.gov/ForIndustry/ColorAdditives/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/ColorAdditiveListingRegulations/ListingofColorAdditivesExemptfromCertification/ucm108066.htm>. Acesso em: 10 set. 2009.
55. FRIDOVICH, I. The biology of oxygen radicals. **Science**. v.201, p.875-880, 1978.
- GIROTTI, A.W. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. **Journal of Lipid Research**. v.39, n.8, p.1529-1542, 1998.
56. GEY, K.F. Prevention of early stages of cardiovascular disease and cancer may require concurrent optimization of all major antioxidants and other nutrients: an update and reevaluation of observational data and intervention trials. In: BELLOMO, G.; FINARDI, G.; MAGGI, E.; RICE-EVANS, C. Free radicals, lipoprotein oxidation and atherosclerosis: biological and clinical aspects. London: Richelieu Press, 1995. p.205-228 (Richelieu free radical series, v.9).
57. GREAT BRITAIN. Ministry of Agriculture, Fisheries, and Food. **Dietary intake of food additives in the UK: initial surveillance**. London: HMSO, 1993. (Food Surveillance Paper, n.37).
58. GROSS, J. Pigments in vegetables: chlorophylls and carotenoids. New York: Van Nostrand Reinhold, p.351, 1991.
59. GUO, D.; HORIO, D.T.; GROVE, J.S.; DASHWOOD, R.D. Inhibition by chlorophyllin of 2-amino-3-methylimidazo-[4,5-f]quinoline-induced tumorigenesis in the male F344 rat. **Cancer Letters**. v.95, p.161-165, 1995.
60. GUTTERIDGE, J.M.C.; HALLIWELL, B. Antioxidants in nutrition, health, and disease, Oxford University Press, NY, 1994.
61. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, M.C. The antioxidants of Human Extracellular Fluids. **Archives of Biochemistry And Biophysics**. v.280, n.1, p.1-8, 1990.

62. HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; ARUOMA, I. The Characterization of antioxidants. **Food Chemistry Toxicology**. v.33, n.7, p.601-617, 1995.
63. HALLIWELL, B. Cellular Stress and Protections Mechanisms. **Biochemical Society Transactions**. v.24, n.4, p.1023-1027, 1996a.
64. HALLIWELL, B. Antioxidants in Human Health And Disease. **Annual Review of Nutrition**. v.16, p.33-50, 1996b.
65. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in Biology and Medicine, 3rd ed., Oxford University Press, NY, 1999.
66. HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. **Drugs Aging**. v.18, n.9, p.685-716, 2001.
67. HARRISSON, J.W.E.; LEVI, S.E.; TRABIN, B. The safety and fate of potassium sodium copper chlorophyllin and other copper compounds. **Journal of the American Pharmaceutical Association**. v.43, p.722-737, 1954.
68. HARTING, U.; BAILEY, G. S. Chemoprotection by natural chlorophylls *in vivo*: inhibition of dibenzo[a,l]pyrene-DNA adducts in rainbow trout liver. **Carcinogenesis**. v.19, n.7, p.1323-1326, 1998.
69. HASEGAWA, R.; HIROSE, M.; KATO, T.; HAGIWARA, A.; BOONYAPHIPHAT, P.; NAGAO, M.; ITO, M.; SHIRAI, T. Inhibitory effect of chlorophyllin on PhIP-induced mammary carcinogenesis in female F344 rats. **Carcinogenesis**. v.16, n.9, p.2243-2246, 1995.
70. HAYASHI, T.; SCHIMERLIK, M.; BAILEY, G. S. Mechanism of chlorophyllin anticarcinogenesis: dose-response inhibition of aflatoxin uptake and biodistribution following oral co-administration in rainbow trout. **Toxicology and applied pharmacology**. v.158, p.132- 40, 1999.
71. HAYATSU, H.; SUGIYAMA, C.; ARIMOTO-KOBAYASHI, S.; NEGISHI, T. Porphyrins as possible preventers of heterocyclic amine carcinogenesis. **Cancer Letters**. v.143, p.185-187, 1999.
72. HAYTON, S.M.; KRISS, A.; WADE, A.; MULLER, D.P.R. The effects of different levels of all-rac- and RRR- α -tocopheryl acetate (vitamin E) on visual function in rats. **Clinical Neurophysiology**. v.114, p.2124-2131, 2003.
73. HENDRY, G.A.F.; HOUGHTON, J.D. **Natural food colorants**. 2.ed. London: Blackil Academic Professional. p.131-155, 1996.

74. HUMPHREY, A.M. Chlorophyll as a Color and Functional Ingredient. **Journal of Food Science**. v.69, n.5, p.422-425, 2004.
75. IBRAHIM, W.; LEE, U-S.; SZABO, J.; BRUCKER, G.; CHOW, C.K. Oxidative stress and status in mouse kidney: effects of dietary lipid and vitamin E plus iron. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v.10, p.674-678, 1999.
76. INOUE, H.; YAMASHITA, H.; FURUYA, K.; NONOMURA, T.; YOSHIOKA, N.; LI, S. Determination of copper (II) chlorophyllin by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal Chromatography**. v.679, p.113-127, 1994.
77. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 3ed. São Paulo, v.1, p.21-22, 1985.
78. JORDÃO, A.A. Efeito de uma dose aguda de etanol sobre a peroxidação lipídica em ratos: ação da vitamina E. São Paulo: Faculdade de Ciências farmacêuticas da USP, 1998. 113p. (Tese, doutorado em Ciência dos Alimentos).
79. JORDAO, A.A.; CHIARELLO, P.G.; ARANTES, M.R.; MEIRELLES, M.S.; VANNUCCHI, H. Effect of an acute dose of ethanol on lipid peroxidation in rats: action of vitamin E. **Food and Chemical Toxicology**. v.42, n.3, p.459-464, 2004.
80. JUNQUEIRA, V.B.C.; SIMIZU, K.; VIDELA, L.A.; BARROS, S.B.M. Dose-dependent study of the effects of acute lindane administration of rat liver superoxide anion production, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation. **Toxicology**. v. 41, p.193-204, 1986.
81. KAMAT, J.P.; BOLOOR, K.K.; DEVASAGAYAM, T.P.A. Chlorophyllin as an effective antioxidant against membrane damage *in vitro* and *ex vivo*. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1487, p.113-127, 2000.
82. KEPHART, J.C. Chlorophyll derivatives-their chemistry, commercial preparation and uses. **Economic Botany**. v.9, p.3-38, 1955.
83. KIEFER, I.; PROCK, P.; LAWRENCE, C.; WISE, J.; BIEGER, W.; BAYER, P.; RATHMANNER, T.; KUNZE, M.; RIEDER, A. Supplementation with mixed fruit and vegetable juice concentrates increased serum antioxidants and folate in healthy adults. **Journal of the American College of Nutrition**. v.23, p.205-211, 2004.

84. KUMAR, S.S.; CHAUBEY, R.C.; PRIYADARSINI, K.I.; DEVASAGAYAM, T.P.A.; CHAUHAN, P.S. Inhibition of radiation-induced DNA damage in plasmide pBR 322 by chlorophyllin and possible mechanism(s) of action, **Mutation Research**. v.425, p.71-79, 1999.
85. KUMAR, S.S.; DEVASAGAYAM, T.P.A.; BHUSHAN, B.; VERMA, N.C. Scavenging of reactive oxygen species by chlorophyllin: an ESR study. **Free Radical Research**. v.35, n.5, p.563-574, 2001.
86. KUMAR, S.S.; SHANKAR, B.; SAINIS, K.B. Effect of chlorophyllin against oxidative stress in splenic lymphocytes *in vitro* and *in vivo*. **Biochimica Biophysica Acta**. v.1672, n.2, p.100-111, 2004.
87. LANFER-MARQUEZ, U.M.; BARROS, R.M.C.; SINNECKER, P. Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives by the β -carotene bleaching method. **Food Research International**, v.38, n.8-9, p.885-891, 2005.
88. LANFER-MARQUEZ, U. M. O papel da clorofila na alimentação humana: uma revisão. **Revista Brasileira da Ciências Farmacêuticas**. v.39, n. 3, p. 227-242, 2003
89. McCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase, an enzyme function for erythrocyte (hemocuprein). **The Journal of Biological Chemistry**. v.244, p.6049-6055, 1969.
90. MADDIPATI, K.R.; MARNETT, L.J. Characterization of the major hydroperoxide-reducing activity of human plasma. **Journal Biology Chemistry**. v.262, p.17398-17403, 1987.
91. MAGGI-CAPEYRON, M.-F.; CASES, J.; BADIA, E.; CRISTOL, J.-P.; ROUANET, J.-M.; BESANÇON, P.; LEGER, C.L.; DESCOMPS, B. A diet high in cholesterol and deficient in vitamin E induces lipid peroxidation but does not enhance antioxidant enzyme expression in rat liver. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v.13, p.296-301, 2002.
92. MATA, J.E.; YU, Z.; GRAY, J.E.; WILLIAMS, D.E.; RODRIGUEZ-PROTEAU, R. Effects of chlorophyllin on transport of dibenzo (α -I)pyrene, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-b]pyridine, and aflatoxin B₁ across Caco-2 cell monolayers. **Toxicology**. v.196, p.117-125, 2004.

- 93 MATÉS, J. M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**. v.153, p.83-104, 2000.
- 94 MORTENSEN, A.; GEPEL, A. HPLC-MS analysis of the green food colorant sodium copper chlorophyllin. **Innovative Food Science and Emerging Technologies** 8, 419-425, 2007.
- 95 MULLER, D.P.R.; GOSS-SAMPSON, M.A. Neurochemical, neurophysiological, and neuropathological studies in vitamin E deficiency. **Critical Review in Neurobiology**, v.5, p.239, 1990.
- 96 NEAULT, J. F.; TAJMIR-RIHI, H. A. DNA-Chlorophyllin Interaction. **Journal of Physical Chemistry B**. v.102, p.1610-1614, 1998.
- 97 NEGISHI, T.; ARIMOTO, S.; NISHIZAKI, C.; HAYATSU, H. Inhibition of the genotoxicity of 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole(Trp-P-2) in *Drosophila* by chlorophyll. **Basic Life Science**. v.52, p.341-344, 1990.
- 98 NEGRAES, P.D.; JORDAO, B.Q.; VICENTINI, V.E.P.; MANTOVANI, M.S. Anticlastogenicity of chlorophyllin in the different cell cycle phases in cultured mammalian cells. **Mutation Research**. v.557, p.177-182, 2004a.
- 99 NEGRAES, P.D.; JORDAO, B.Q.; VICENTINI, V.E.P.; MANTOVANI, M.S. The mutagenic potentiator effect of chlorophyllin by the HGPRT assay. **Toxicology in Vitro**. v.18, p.147-149, 2004b.
- 100 NELSON, R. L. Chlorophyllin, an antimutagen, acts as a tumor promoter in the rat-dimethylhydrazine colon carcinogenesis model. **Anticancer Research**. v.12, n.3, p.737-739, 1992.
- 101 OLSON, R.E. Vitamin E and its relation to heart disease. **Circulation**. v.48, n.1, p.179-184, 1973.
- 102 ORNER, G. A.; ROEBUCK, B. D.; DASHWOOD, R. H.; BAILEY, G. S. Post-initiation chlorophyllin exposure does not modulate aflatoxin-induced foci in the liver and colon rats. **Journal of Carcinogenesis**. v.5, n.1, p.6, 2008.
- 103 OUAMEUR, A. A.; MARTY, R.; TAJMIR-RIHI, H. A. Human serum albumin complexes with chlorophyll and chlorophyllin. **Biopolymers**. v.77, n.3, p.129-136, 2005.
- 104 PACKER, L. Protective role of vitamin E in biological systems. **American Journal**

Clinical of Nutrition. v.53, n. 4, p.1050-1055, 1991.

105. PARK, K.K.; SURH, Y.J. Chemopreventive activity of chlorophyllin against mouse skin carcinogenesis by benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide. **Cancer Letters.** v.102, p.143-149, 1996.
106. PARK, K.K.; PARK, J-H.; JUNG, Y-J.; CHUNG, W-Y. Inhibitory effects of chlorophyllin, hemin and tetrakis(4-benzoic acid)porphyrin on oxidative induced by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate as a possible anti-tumor promoting mechanism. **Mutation Research.** v.542, p.89-97, 2003.
107. PEARSE, A.G.E. Histochemistry: theoretical and applied. 3rd ed., v.2, London, Churchill, 1968.
108. PIETRZAK, M.; WIECZOREK, Z.; STACHELSKA, A.; DARZYNKIEWICZ, Z. Interaction of chlorophyllin with acridine orange, quinacrine mustard and doxorubicin analyzed by light absorption and fluorescence spectroscopy. **Biophysical Chemistry.** v.104, p.305-313, 2003.
109. PIETRZAK, M.; WIECZOREK, Z.; WIECZOREK, J.; DARZYNKIEWICZ, Z. The "interceptor" properties of chlorophyllin measured within the three-component system: Intercalator-DNA-chlorophyllin. **Biophysical Chemistry.** v.123, p.1-19, 2006.
110. PIETRZAK, M.; HALICKA, H. D.; WIECZOREK, Z.; WIECZOREK, J.; DARZYNKIEWICZ, Z. Attenuation of acridine mutagen ICR-191 – DNA interactions and DNA damage by the mutagen interceptor chlorophyllin. **Biophysical Chemistry.** v.135, p.69-75, 2008.
111. PRATT, M. M.; REDDY, A. P.; HENDRICKS, J. D.; PEREIRA, C.; KENSLER, T. W.; BAILEY, G. S. The importance of carcinogen dose in chemoprevention studies: quantitative interrelationships between, dibenzo[a,l]pyrene dose, target organ DNA adduct biomarkers and final tumor outcome. **Carcinogenesis.** v.28, n.3, p.611-624, 2007.
112. POLI, G.; LEONARDUZZI, G.; BIASI, F.; CHIARPOTTO, E. Oxidative stress and cell signalling. **Current Medicinal Chemistry.** v.11, p.1163-1182, 2004.
113. QUINN, P.J. Is the distribution of α -tocopherol in membranes consistent with its putative functions? **Biochemistry.** v.69, n.1, p.58-66, 2004.

- 114 RAMIREZ-TORTOSA, C.; ANDERSEN, O.M.; GARDNER, P.T.; MORRICE, P.C.; WOOD, S.G.; DUTHIE, S.J.; COLLINS, A.R.; DUTHIE, G.G. Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E-depleted rats. **Free Radical Biology and Medicine**. v.31, p.1033-1037, 2001.
- 115 RAMPAZO, L.G.L.; JORDAO, B.Q.; VICENTINI, V.E.P. MANTOVANI, M.S. Chlorophyllin antimutagenesis mechanisms under different treatment conditions in the micronucleous assay in V79 cells. **Cytologia**. v.67, p.323-327, 2002.
- 116 REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition and ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**. v.123, p.1939-1951, 1993.
- 117 REPORT of the American Institute of Nutrition ad hoc committee on standards for nutritional studies. **Journal of Nutrition**. v.107, p.1340-1348, 1977.
- 118 RICHTER, C. Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes. **Chemistry and Physics of Lipids**. v.44, n.2-4; p.175-184, 1987.
- 119 ROMERT, L.; CURVALL, M.; JENSSEN, D. Chlorophyllin is both a positive and negative modifier of mutagenicity. **Mutagenesis**. v.7, p.349-355, 1992.
- 120 SARKAR, D.; SHARMA, A.; TALUKDER, G. Chlorophyll and chlorophyllin as modifiers of genotoxic effects. **Mutation Research**. v.318, p.239-247, 1994.
- 121 SARKAR, D.; SHARMA, A.; TALUKDER, G. Chlorophyll and chromosome breakage. **Mutation Research**. v.360, p.187-191, 1996.
- 122 SATO, M.; IGUCHI, N.; MURATA, T. Effect of sodium copper chlorophyllin on lipid peroxidation. I. Effect on lipid peroxidation in rat liver homogenates in the presence of both Fe^{2+} and L-ascorbic acid. **Yakugaku Zasshi**. v.97, p.268-273, 1977.
- 123 SATO, M.; IMAI, K.; MURATA, T. Effect of sodium copper chlorophyllin on lipid peroxidation 3. The antioxidative activities of the commercial preparations of sodium copper chlorophyllin. **Yakugaku Zasshi**. v.100, p.580-584, 1980a.
- 124 SATO, M.; FUJIURA, H.; IMAI, K.; MURATA, T. Effect of sodium copper

chlorophyllin on lipid peroxidation 4. The antioxidative action of copper chlorins. **Yakugaku Zasshi**. v.100, p.941-944, 1980b.

- 126 SATO, M.; IMAI, K.; KIMURA, R.; MURATA, T. Effect of sodium copper chlorophyllin on lipid peroxidation VIII. Its effect on carbon tetra chloride-induced liver injury in rats. **Chemistry Pharmacology Bulletin**. v.33, n.8, p.3530-3533, 1985.
- 127 SATO, M.; FUJIMOTO, I.; SAKAI, T.; AIMOTO, T.; KIMURA, R.; MURATA, T. Effect of sodium copper chlorophyllin on lipid peroxidation: IX on the antioxidative componentes in commercial preparations on sodium copper chlorophyllin. **Chemistry Pharmacology Bulletin**. v.34, p.2428-2434, 1986.
- 128 SCHWARTZ, S.J.; ELBE, J.H.V. Kinetics of chlorophyll degradation to pyropheophytin in vegetables. . **Journal of Food Science**. v.48, p.1303-1306, 1983.
- 129 SCOTTER, M.J.; CASTLE, L.; ROBERTS, D. Method development and HPLC analysis of retail foods and beverages for copper chlorophyll (E141[i]) and chlorophyllin (E141[ii]) food colouring materials. **Food Additives and Contaminants**. v.22, n.12, p.1163-1175, 2005.
- 130 SEPPANEN, C.M.; CSALLANN, A.S. The effect of paprika carotenoids on *in vivo* lipid peroxidation measured by urinary excretion of secondary oxidation products. **Nutrition Research**. v.22, n.9, p.1055-1065, 2002.
- 131 SHARMA, D.; KUMAR, S.S.; SAINIS, K.B. Antiapoptotic and immunomodulatory effects of chlorophyllin. **Molecular Immunology**. v.44, p.347-359, 2007.
- 132 SIES, H.; KOCH, O.R.; MARTINO, E.; BOVERIS, A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol treated rats. **FEBS Letters**. v.103, p.287-290, 1979.
- 133 SIES, H. Biochemistry of oxidative stress, Angewandte Chemie International Edition in English, v.25, p.1058-1071, 1986.
- 134 SIES, H.; STAHL, W.; SUNDQUIST, A.R. Antioxidant functions of vitamins: vitamins E and C, beta-carotene and other carotenoids. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.699, p.7-20, 1992.

- 135 SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**. v.215, n.2, p.213-219, 1993.
- 136 SIMONICH, M. T.; EGNER, P. A.; ROEBUCK, B. D.; ORNER, G. A.; JUBERT, C.; PEREIRA, C.; GROOPMAN, J. D.; KENSLER, T. W.; DASHWOOD, R. H.; WILLIAMS, D. E.; BAILEY, G. S. Natural chlorophyll inhibits aflatoxin B₁-induced multi-organ carcinogenesis in the rat. **Carcinogenesis**. v.28, n.6, p.1294-1302, 2007.
- 137 TACHINO, N.; GUO, D.; DASHWOOD, W.M.; YAMANE, S.; LARSEN, R.; DASHWOOD, R. Mechanisms of the *in vitro* antimutagenic action of chlorophyllin against benzo[α]pyrene: studies of enzyme inhibition, molecular complex formation and degradation of the ultimate carcinogen. **Mutation Research**. v.308, p.191-203, 1994.
- 138 THIEME, R.; PAI, E.F.; SCHIRMER, R.H.; SCHULZ, G.E. Three-dimensional structure of glutathione reductase at 2 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**. v.152, n.4 p.763-782, 1981.
- 139 TOKUMARU, S.; OGINO, R.; SHIROMOTO, A. Increase on lipid hydroperoxides in tissues of vitamin E deficient rats. **Free Radical Research**. v.26, n.2, p.169-174, 1997.
- 140 TRABER, M.G. Determinants of plasma vitamin E concentrations. **Free Radicals Biology Medicine**. v.16, p.229-239, 1994.
- 141 URSINI, F.; BINDOLI, A. The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes. **Chemistry Physiology Lipids**. v.44, p.255-276, 1987.
- 142 VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; RODHES, C.J.; TELSER, J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v.266, n.1-2, p.37-56, 2004.
- 143 VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; MARK, T.D.; CRONIN, C.; MILAN, M.; JOSHUA, T. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v.39, p.44-84, 2007.
- 144 VANNUCCHI, H.; JORDÃO-JR, A.A.; IGLESIAS, A.C.G. Effect of different dietary

- levels of vitamin E on lipid peroxidation in rats. **Archivos Latinoamericanos de Nutrition**. v.47, n.1, p.34-37, 1997.
- 145 VOGEL, J.; JONKER-TERMONT, D.S.M.L.; LIESHOUT, E.M.M.; KATAN, M.B.; MEER, R. Green vegetables, red meat and colon cancer: Chlorophyll prevents the cytotoxic and hyperproliferative effects of haem in rat colon. **Carcinogenesis**. v.26, p.387-393, 2005a.
- 146 VOGEL, J.; JONKER-TERMONT, D.S.M.L.; KATAN, M.B.; MEER, R.V.D. Natural chlorophyllin prevents heme-induced cytotoxic and hyperproliferative effects in rat colon. **Nutrition and Cancer**. v.135, p.1995-2000, 2005b.
- 147 WANDERS, R.J.A.; DENIS, S. Identification of superoxide dismutase in rat liver peroxisomes. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1115, p.259-262, 1992.
- 148 WATERS, M. D.; STACK, H. F.; JACKSON, M. A.; BROCKMAN, H. E.; FLORA, S. Activity profiles of antimutagens: *in vitro* and *in vivo* data. **Mutation Research**. v.350, p.109-129, 1996.
- 149 WOO, G-H.; SHIBUTANI, M.; KUROIWA, K.; LEE, K-Y.; TAKAHASHI, M.; INOUE, K.; FUJIMOTO, H.; HIOSE, M. Lack of preventive of dietary fibers or chlorophyllin against acrylamide toxicity in rats. **Food and Chemical Toxicology**. v. 45, p.1507-1515, 2007.
- 150 YAMAZAKI, H.; FUJIEDA, M.; TOGASHI, M.; SAITO, T.; PRETI, G.; CASHMAN, J.R.; KAMATAKI, T. Effects of dietary supplements, activated charcoal and copper chlorophyllin, on urinary excretion of trimethylamine in Japanese trimethylaminuria patients. **Life Sciences**. v.74, p.2739-2747, 2004.
- 151 YOUNG, R.W.; BERGEL, J.F. Use of chlorophyllin in the care of geriatric patients. **J. Am. Geriatr. Soc.**, v.24, p.46-47, 1980.
- 152 YUN, C-H.; JEON, Y. J.; YANG, Y.; JU, H. R.; HAN, S. H. Chlorophyllin suppresses interleukin-1 beta expression in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 cells. **International Immunopharmacology**. v.6, p.252-259, 2006.
- 153 XU, M.; ORNER, G. A.; BAILEY, G. S.; STONER, G. D.; HORIO, D. T.; DASHWOOD, R.H. Post-initiation effects of chlorophyllin and indole-3-carbinol in rats given 1,2-dimethylhydrazine or 2-amino-3-methyl-imidazo. **Carcinogenesis**. v.22, n.2, p.309-314, 2001.

- 154 ZHANG, Y.; GUAN, L.; WANG, X.; WEN, T.; XING, J.; ZHAO, J. Protection of chlorophyllin against oxidative damage by inducing HO-1 and NQO1 expression mediated by PI3K/Akt and Nrf2. **Free Radical Research**. v.42, n.4, p.362-371, 2008.