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

***Avaliação comparativa, “in vitro” e “in vivo”, das
propriedades antioxidantes da dieta do estado de São
Paulo com a Dieta Mediterrânea***

Claudimar de Jesus Oliveira

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Titular Jorge Mancini Filho

São Paulo
2008

DEDALUS - Acervo - CQ

30100013595

Ficha Catalográfica

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

Oliveira, Claudimar de Jesus

O48a Avaliação comparativa, "*in vitro*" e "*in vivo*", das propriedades antioxidantes da dieta do estado de São Paulo com a dieta mediterrânea / Claudimar de Jesus Oliveira. -- São Paulo, 2008. 76p.

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

Orientador: Mancini Filho, Jorge

1. Antioxidante : Ciência dos alimentos 2. Dieta : Nutrição experimental I. T. II. Mancini Filho, Jorge, orientador.

641.19 CDD

Claudimar de Jesus Oliveira

***Avaliação comparativa, “in vitro” e “in vivo”, das propriedades
antioxidantes da dieta do estado de São Paulo com a Dieta
Mediterrânea***

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Titular Jorge Mancini Filho
Orientador/presidente

Dra Nágila R. Teixeira Damasceno
1º. examinador

Dra. Ursula M.Langer Marquez
2º. examinador

Dedico este trabalho ao bem
mais valioso da minha vida:
minha família (pais, irmãos,
sobrinhos e cunhados).
Amor eterno...

Agradecimentos

Agradecer é o ato de reconhecer a contribuição de cada um na realização de um projeto, um sonho.

Seja uma palavra, um abraço, sorrisos e conquistas compartilhadas.

A Deus em primeiro lugar, juntamente com minha preciosa família e todos compreendem o porque.

Ao professor Jorge Mancini Filho, agradecimentos merecidos, não somente como um excelente orientador, mas pela pessoa especial que é.

Aos meus amigos/irmãos Alessandro de Lima, Cleverson Busso, Domingos, Felipe Gomes, Júlio Anderson, Júlio Carrijo, Marcelo Cocá, Mário Henrique, Maximiliano Gama e Renato Miranda.

Às minhas amigas /irmãs Ana Cláudia Freire, Carla Cristina, Cleicy Cessel, Cleire Freitas, Elisângela, Fernanda Almeida, Ivana Chaves, Janice Souza, Karine Anusca,

Às minhas estimadas professoras Maria Margareth Naves e Mara Reis, por serem um grande exemplo a ser seguido sempre.

Aos mais novos inquilinos do meu coração: Acácio Pagan, Alexandre (Laboratório de Minerais), Aline (Técnica em Bromatologia), Artemir Coelho, Bárbara Bicalho, Carolina Batista, “Chico” Leo, Cristiane Hermes, Davi, Edílson Feitosa, professor Eduardo Purgatto, Francisco, Gabriela Taciro, Giuliana Cruzeta, Helena Chibao, Jô, João Domingos, Joaquim Júnior, Liliane Pires, Luciana Setaro, Lurdinha, Marcos Martins, Marina Paes, Marliz Medina, Michele, Milana Dan, Milessa Afonso, Paulo Santos, Paulo de Lima, Peterson “Foca”, Priscila Broinizi, Robson, Reginaldo Trindade, Ricardo Serraceni, Rosângela Pavan, Sílvia Rocca, Valdenir de Moraes, Valter “Balloo”, Viviane Rocha e Vinícius Cruzatt.

Às parceiras fiéis de laboratório Ana Mara Silva, Eliane Bonifácio, Fernanda Archilla, Lucília Rabelo e Paula Garcia.

Aos amigos, que mesmo longe, fizeram todos os pensamentos positivos que puderam: Alex Souza, Angelito Gonçalves, Cláudio Luiz, Crênis Melo, D. Jane, D. Vilma, Claudinha, Cleusedil, Deusélio Maione, Erick Richter, Fábio Crespo, Glauco, Guilherme Diagostini, Isa Adorno, Ivan Paes, José Soares,

Karin Cristina, Leciemy Bittencourt, Lidiane Rocha, Marcela Sene, Marcelo Rabahi, Maria das Graças Miranda, Neto, Raison Alves, Renata Campos, Sebastião Elias, Sirlene, Valter Silveira e William Santos.

À minha família paulistana: Tia Anésia, Joana e Leonardo. Com muito, muito carinho!

Agradeço imensamente o apoio técnico realizado por verdadeiros anjos da guarda: Cléo e Mônica (Secretaria do Departamento de Alimentos – FCF), Jorge de Lima e Elaine (Secretaria de Pós Graduação), Daniela e Majô (Apoio Acadêmico), Dona Cida (Bloco 13 A), Renato e Auriluce (Informática), Marcos (Bloco 9 – IQ), Equipe do Biotério (Flávia, Vagner, Renata e demais), Alexandre e Nilton (Tecnologia de Alimentos), João e Gilberto (Portaria) e Ângelo, Adriana e demais colaboradores da Biblioteca do Conjunto das Químicas.

Talvez palavras nunca serão suficientes para expressar minha gratidão, mas simplesmente, agradeço.

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	I
LISTA DE TABELAS	II
LISTA DE GRÁFICOS	III
RESUMO	IV
ABSTRACT	V
1 - INTRODUÇÃO	01
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	03
2.1. Espécies reativa de oxigênio (ERO's), espécies reativas de nitrogênio e estresse oxidativo	03
2.2 - Antioxidantes não enzimáticos	05
2.2.1 - Antioxidantes vitamínicos	06
2.2.2 – Compostos fenólicos	07
2.3 - Antioxidantes enzimáticos	11
2.4 - Ácidos graxos ω 3, ω 6 e ω 9	13
2.5 - Métodos para avaliação de atividade antioxidante <i>in vitro</i>	17
2.5.1 - Sistema β -caroteno / ácido linoléico (aquoso)	17
2.5.2 - Ensaio do radical 2,2-difenil-picrilhidrazil (DPPH)	18
2.6 - Análise para avaliação da peroxidação lipídica em tecidos animais	18
2.6.1 - Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	18
2.7 – Avaliação de dietas	19
2.7.1 – Avaliações no Brasil	19
2.7.2 – Dieta Mediterrânea	21
3 – OBJETIVOS	24
3.1 - Objetivo geral	24
3.2 - Objetivos específicos	24
4 - MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 - Elaboração das rações – tratamentos	25
4.2 - Composição centesimal das rações	27

4.2.1 – Umidade	27
4.2.2 – Carboidratos	28
4.2.3 – Lipídios	28
4.2.4 – Proteínas	28
4.2.5 - Resíduo mineral fixo (cinzas)	28
4.3 - Obtenção dos extratos das rações	28
4.4 - Determinação de fenólicos totais–método Folin Ciocalteau	29
4.5 - Avaliação antioxidante in vitro	29
4.5.1 - Sistema β -caroteno / ácido linoléico (aquoso)	29
4.5.2 - Ensaio do radical 2,2-difenil-picrilhidrazil (DPPH)	30
4.6 - Ensaio biológico	31
4.7 - Determinação do perfil de ácidos graxos – tecidos e rações	32
4.7.1 - Fígado, cérebro e plasma	32
4.7.2 - Esterificação de ácidos graxos	33
4.7.3 – Rações	33
4.7.4 - Determinação do perfil de ácidos graxos por cromatografia a gás	33
4.8 - Preparo de tecidos – cérebro, fígado e plasma	33
4.8.1 – Cérebro	33
4.8.2 – Fígado	33
4.8.3 – Plasma	34
4.8.4 - Análise de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) – medida de lipoperoxidação	34
4.8.5 - Atividade de enzimas antioxidantes – fração citosólica cérebro e fígado	35
4.8.5.1 - Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)	35
4.8.5.2 - Atividade da Catalase (CAT)	35
4.8.5.3 - Atividade da Glutathione redutase (GR)	36
4.8.5.4 -Atividade da Glutathione peroxidase (GPx)	36
4.8.6 - Determinação de proteínas dos tecidos	36
4.8.7 - CEA – Coeficiente de Eficácia Alimentar	37
4.8.8 – Estatística	37
5 - Resultados e discussão	38

5.1 - Composição centesimal das dietas	38
5.2 - Atividade antioxidante das dietas	38
5.2.1 - Fenólicos totais - método Folin Ciocalteau	42
5.3 - Ensaio biológico em ratos	43
5.3.1 - Peso, consumo de ração e Coeficiente de Eficácia Alimentar (CEA)	43
5.3.2 - Composição de ácidos graxos (AG) das rações e tecidos animais.	44
5.3.3 – TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico)	52
5.3.3.1 – Fígado	52
5.3.3.2 – Cérebro	53
5.3.3.3 - Plasma	54
5.3.4 - Atividade de enzimas antioxidantes	55
6 - Conclusões	59
7 - Referências bibliográficas	60

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

		Pág.
Figura 1A	Estrutura fenólica dos ácidos hidroxibenzóicos	07
Figura 1B	Estrutura fenólica dos ácidos hidroxicinâmicos	08
Figura 2	Esquematização do metabolismo de compostos fenólicos	10
Figura 3	Diagrama do metabolismo de fenólicos	11
Figura 4	Vias para produção e remoção de ERO's por enzimas Antioxidantes	13
Figura 5	Síntese de eicosanóides	16

LISTA DE TABELAS

		Pág.
Tabela 1	Quantidade (g/per capita/dia) por grupos de alimentos de cada população estudada	26
Tabela 2	Composição centesimal das dietas ofertadas	38
Tabela 3	Quantidade de fenólicos totais, em equivalente de ácido gálico	42
Tabela 4	Dados de peso, consumo de ração e CEA	43
Tabela 5	Porcentagem de AG, nas rações, divididos por classe, em 1g de ração	45
Tabela 6	Frações lipídicas plasmáticas (mg/dl)	47
Tabela 7	Porcentagem de AG, no fígado	48
Tabela 8	Porcentagem de AG, no cérebro	49
Tabela 9	Porcentagem de AG, no plasma	50

LISTA DE GRÁFICOS

		Pág.
Gráfico 1	Percentual de varredura dos extratos das rações, de acordo com o ensaio do DPPH	39
Gráfico 2	Percentual de proteção das rações, de acordo com o método de cooxidação do β - caroteno/ácido linoléico	39
Gráfico 3	Medida de lipoperoxidação do tecido hepático	52
Gráfico 4	Medida de lipoperoxidação do tecido cerebral	54
Gráfico 5	Medida de lipoperoxidação do tecido plasmático	55
Gráfico 6A	Atividade da superóxido dismutase no tecido hepático	56
Gráfico 6B	Atividade da catalase no tecido hepático	56
Gráfico 6C	Atividade da glutational peroxidase no tecido hepático	57
Gráfico 6D	Atividade da glutational redutase no tecido hepático	57
Gráfico 7A	Atividade da superóxido dismutase no tecido cerebral	57
Gráfico 7B	Atividade da catalase no tecido cerebral	57
Gráfico 7C	Atividade da glutational peroxidase no tecido cerebral	57
Gráfico 7D	Atividade da glutational redutase no tecido cerebral	57

RESUMO

Avaliação comparativa, “in vitro” e “in vivo”, das propriedades antioxidantes da dieta do estado de São Paulo com a Dieta Mediterrânea

O bom funcionamento do organismo está intimamente relacionado com o consumo alimentar, pois através dos alimentos obtemos os nutrientes essenciais para processos biológicos vitais. Várias pesquisas vêm sendo realizadas com a finalidade de se determinar a atividade antioxidante de compostos em alimentos e de forma geral, condutas e hábitos alimentares. Alguns padrões dietéticos são seguidos como modelo, sendo o caso da Dieta Mediterrânea. No presente estudo, avaliou-se a atividade antioxidante de rações alimentares (comumente denominadas dietas) consumidas em duas localidades: 1) estado de São Paulo e 2) Grécia. As rações foram elaboradas com alimentos coccionados e alimentos *in natura*, inerentes a cada população, obtidos através de relatórios de órgãos oficiais - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e *European Commission (Health Monitoring Programme - Data Food Networking - DAFNE)*. Após processamento, esses alimentos foram liofilizados e então, triturados. Para determinação da atividade antioxidante *in vitro*, alíquotas das rações foram desengorduradas, devido à natureza dos ensaios antioxidantes *in vitro*. Para determinação da atividade antioxidante *in vitro* foram realizados dois ensaios: cooxidação β -caroteno/ácido linoléico e 2,2-difenil-picrilhidrazil (DPPH). Além da atividade antioxidante *in vitro*, foram executados ensaios nas dietas para a determinação da composição centesimal, perfil de ácidos graxos e determinação dos compostos fenólicos totais. Após esse delineamento, realizou-se o ensaio biológico, onde foram utilizados 30 ratos machos, da linhagem Wistar, recém desmamados e submetidos a 30 dias de tratamento, sob condições ambientais controladas, após os quais, os animais foram sacrificados para a retirada de cérebro, fígado e plasma. Ensaio foram realizados nesses tecidos com a finalidade de se avaliar a eficácia da conduta dietoterápica: atividade de enzimas antioxidantes em tecidos alvo (fígado e cérebro), peroxidação de tecidos (fígado, cérebro e plasma) e perfil de ácidos graxos (fígado, cérebro e plasma). Os resultados obtidos indicaram que as duas dietas estudadas mantiveram a integridade orgânica. Um fato relevante é que a dieta do Estado de São Paulo foi composta por alimentos acessíveis e de hábito regular na população nacional estudada, sendo essa equiparada qualitativamente com a Dieta Mediterrânea, uma referência mundial. A Dieta Nacional do Estado de São Paulo (DNSP) possui atividade antioxidante similar à Dieta Mediterrânea (DM), utilizada como modelo de referência. Palavras-chave: dieta mediterrânea, dieta paulista, antioxidantes, compostos fenólicos.

ABSTRACT

Comparative evaluation, “in vitro” and “in vivo”, of the antioxidants properties of the diet of the state of São Paulo with the Mediterranean Diet

The good operation of the organism is intimately related with the alimentary consumption, since through the victuals we obtain essential nutrients for vital biological processes. Several researches have been accomplished with the purpose of being determined the antioxidant activity of composed in victuals and of general form, conducts and alimentary habits. Some dietary patterns are followed as model, being the case of the Mediterranean Diet. In the present study, the antioxidant activity of alimentary diets was evaluated (commonly denominated diets) consumed at two places: 1) state of São Paulo and 2) Greece. The diets were elaborated with victuals cooked and victuals *in natura*, inherent to each population, obtained through reports of official organs - Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE) and European Commission (Health Monitoring Programme - it Dates Food Networking - DAFNE). After processing, those victuals were lyophilized and then, triturated. For determination of the activity antioxidant in vitro, aliquots of the rations were degreased, due to the nature of the tests antioxidant in vitro. For determination of the activity antioxidant in vitro two rehearsals were accomplished: co-oxidation of linoléico acid and β -carotene and 2,2-difenil-picrilhidrazil (DPPH). Besides activity antioxidant in vitro, were made executed in the diets for the determination of the centesimal composition, profile of fat acids and determination of compositions total phenolics compounds. After that out line, took place the biological rehearsal, where 30 male mice were used, of the lineage Wistar, recently weaned and submitted to 30 days of treatment, under controlled environmental conditions, after the ones which, the animals were sacrificed for the brain retreat, liver and it shapes. Rehearsals were accomplished in those tissues with the purpose of evaluating the effectiveness of the diets: activity of antioxidant enzymes in woven objective (liver and brain), peroxidation of tissues (liver, brain and it shapes) and profile of fat acids (liver, brain and it shapes). The obtained results indicated that the two studied diets maintained the organic integrity. An important fact is that the diet of the State of São Paulo was composed by accessible victuals and of regular habit in the studied national population, being that comparison qualitative with the Mediterranean Diet, a world reference. The National Diet of the State of São Paulo (DNSP) it possesses similar antioxidant activity to a reference model, Mediterranean Diet (DM). Key-words: mediterranean diet, paulista diet, antioxidants, phenolics compounds.

1 - INTRODUÇÃO

Das injúrias sofridas pelo organismo, o estresse oxidativo vem recebendo atenção especial por estar relacionado com patologias, dentre elas câncer, diabetes mellitus, doenças cardiovasculares, hipertensão arterial, Alzheimer e outras enfermidades crônicas não transmissíveis (SEIFRIED, 2007).

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio da homeostase do oxigênio – balanço entre componentes oxidantes e antioxidantes. Aproximadamente 1-3% do oxigênio utilizado nas reações orgânicas, são convertidos a Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's). As três principais ERO's são o radical ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil ($HO^\cdot$) (SEIFRIED, 2007).

Durante a síntese mitocondrial de ATP (adenosina trifosfato), parte do oxigênio utilizado converte-se a ERO's. Além do metabolismo aeróbio, o sistema citocromo P450 também contribui para esta síntese (KARIHTALA e SOINI, 2007).

O aumento significativo das concentrações de ERO's é considerado tóxico para biomoléculas como DNA, outras proteínas, lipídeos (JEZEK e HLAVATÁ, 2005).

Apresentando um balanço entre ERO's e antioxidantes, as espécies reativas possuem funções determinadas, desde controle da resposta imune e a apoptose de células tumorais, sendo que em seus níveis basais desempenham papel importante na regulação da transdução de sinal, função de proteínas e atividade bactericida de fagócitos, entre outros (MOYALN e REID, 2007; OZBEN, 2007).

Para a manutenção do balanço entre a formação de ERO's e a sua depleção, há o papel essencial de antioxidantes provenientes da dieta, como vitaminas lipossolúveis, vitaminas hidrossolúveis, minerais que auxiliarão na constituição de enzimas antioxidantes e compostos fenólicos. É recomendável que estes antioxidantes atuem juntos para a redução dos níveis de ERO's, já que alguns terão sua melhor atividade em meios lipídicos, outros em meios aquosos (PODSEDEK, 2007).

Um dos padrões de referência de dieta potencialmente rica em compostos que apresentam atividade antioxidante, é a denominada Dieta do Mediterrâneo, precisamente a dieta grega da ilha de Creta. No estudo *Seven Countries*, iniciado em 1958, chefiado por Ancel Benjamin Keys, foram constatados baixos índices de doenças cardiovasculares e outras enfermidades crônicas não transmissíveis nessa localidade.

Uma das questões consideradas foi o delineamento alimentar, onde se constatou elevado consumo de azeite de oliva, frutas e hortaliças, moderado consumo de vinho, produtos lácteos e baixo consumo de gorduras saturadas e alimentos que as contém. Trata-se de uma dieta rica em antioxidantes como vitaminas C, E, A e compostos fenólicos (MACKENBACH, 2007; SIMOPOULOS, 2001).

Outra questão que deve ser considerada é a presença de ácidos graxos na dieta que atuam no controle de processos inflamatórios e de doenças cardiovasculares. Ácidos graxos $\omega 3$ vêm mostrando extensivamente um papel positivo no controle desses processos. É pertinente que se mantenha uma razão entre o consumo de ácidos graxos $\omega 6$ e $\omega 3$ para que haja um favorecimento da biossíntese de ácido docosahexaenóico (DHA) e menor produção de eicosanóides pró-inflamatórios (MACKENBACH, 2007; RUXTON *et al*, 2000; CHRYSOHOOU *et al.*, 2004; ORTEGA, 2006; SIMOPOULOS, 2001).

Já a dieta nacional vem sendo constantemente questionada pelo baixo consumo de frutas e hortaliças, justamente fontes exógenas importantes de antioxidantes, além da redução no consumo de ácidos graxos polinsaturados (JAIME, 2007).

Dessa forma, torna-se necessária a avaliação de atividade antioxidante total de dietas, a determinação do perfil de compostos antioxidantes para que se possa ter uma estimativa de seu potencial.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Espécies reativa de oxigênio (ERO's), espécies reativas de nitrogênio e estresse oxidativo

Espécies reativas de oxigênio são moléculas altamente reativas ou fragmentos de moléculas que são continuamente produzidas em todos os organismos aeróbios como uma consequência do próprio metabolismo. O termo engloba vários tipos de metabólitos reativos de oxigênio, incluindo radicais livres, os quais são definidos como moléculas contendo um ou mais elétrons desemparelhados no orbital externo. Exemplos são o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxil ($HO^{\cdot}$), oxigênio singlet (1O_2), peróxil ($RO_2^{\cdot}$) e radical alcoxil ($RO^{\cdot}$). Há também espécies não radicalares como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (JEZEC e HLAVATÁ, 2005).

A origem estimada dos ERO's é o próprio metabolismo aeróbio, especificamente ocorrendo na mitocôndria, com utilização de oxigênio para síntese de ATP. Estima-se que cerca de 1 a 5% do total de oxigênio consumido no metabolismo aeróbio produza ânion superóxido, o primeiro produto de redução do oxigênio. A maior parte do ânion superóxido, um radical livre com baixa reatividade, é gerada na cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, especificamente nos complexos I, II e III. O ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) não possui capacidade de penetrar a membrana lipídica. Entretanto, é capaz de inibir a função mitocondrial de inativação dos centros Fe-S na cadeia transportadora de elétrons, causando dano pelo acúmulo, podendo levar à apoptose. Já o peróxido de hidrogênio pode ser formado espontaneamente a partir do oxigênio molecular nos peroxissomos ou mais frequentemente, da dismutação do ânion superóxido e desempenha um papel importante na carcinogênese, sendo capaz de ultrapassar a membrana celular e causar alguns danos no núcleo das células. O radical hidroxil é responsável pelas maiores injúrias sofridas pelas células, por possuir um elétron altamente instável em sua estrutura. A maior parte do radical hidroxil é produzida na presença de metais de transição reduzidos (Fe, Cu, Co ou Ni), principalmente via reação de Fenton, quando o ferro entra em contato com peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Uma das maiores injúrias induzidas pelo radical hidroxil é o dano às bases nitrogenadas do DNA e a desoxirribose, por várias vias, causando dano aos

genes supressores de tumores e aumentando a expressão de protooncogenes (KARIHTALA e SOINI, 2006).

Pequenas quantidades de ERO's são continuamente produzidas nos peroxissomos, sistema citocromo P450 e células inflamatórias incluindo neutrófilos, eosinófilos e macrófagos. A enzima NADPH oxidase também é uma fonte endógena de ERO's, especificamente ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), por catalisar a transferência de um elétron da forma reduzida do NADH ou NADPH para oxigênio molecular. A xantina oxidase, uma enzima originada da conversão irreversível da xantina desidrogenase ou pela oxidação da cisteína, catalisa a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$). O ácido araquidônico, quando convertido a leucotrienos inflamatórios e prostaglandinas pela 5-lipoxigenase e ciclooxigenase, forma assim a base para formação de ERO's no músculo esquelético (MOYLAN e REID, 2007).

Já o óxido nítrico ($NO^{\cdot}$) é sintetizado em vários tipos de células. É um radical livre gerado a partir da L-arginina por três óxido nítrico sintases (NOS). A maior parte do óxido nítrico ($NO^{\cdot}$) é sintetizada pela óxido nítrico sintase induzível (i NOS), geralmente após estímulo inflamatório. Outras NOS incluem a endotelial (e NOS) e a neuronal (n NOS). O $NO^{\cdot}$ em baixas concentrações, é um importante regulador de algumas funções fisiológicas, incluindo adesão celular, neurotransmissão, broncodilatação, tônus e permeabilidade vascular. Ao contrário do $HO^{\cdot}$, o $NO^{\cdot}$ raramente interage diretamente com macromoléculas. Entretanto, quando reage com superóxido, a reação dá origem a um potente oxidante: peróxinitrito ($ONOO^{\cdot}$), com reatividade comparável ao radical hidroxil ($\cdot OH$). O peróxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) está envolvido em numerosos eventos potencialmente carcinogênicos (OZBEN, 2007).

Mas, as espécies reativas tanto de oxigênio quanto de nitrogênio, possuem funções fisiológicas importantes, quando em equilíbrio. Pesquisas demonstraram que a geração dessas espécies é um processo fisiológico normal, particularmente pela própria imunocompetência e na coordenação e ativação de numerosos sinais de vias de transdução. O primeiro radical descrito como um regulador fisiológico foi o óxido nítrico com efeitos sobre o tônus vascular e adesão plaquetária. Hoje em dia, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é reconhecido como um mensageiro chave intracelular a níveis subtóxicos sinalizando vias como fator de crescimento epidermal e ativação do NF- κ B

(fator de transcrição celular). O óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) também estão envolvidos em vias apoptóticas (KARIHTALA e SOINI, 2006; SEIFRIED ET AL., 2007).

É válido citar algumas fontes exógenas que potencialmente podem gerar ERRO's, como vários xenobióticos, algumas drogas, raios ultravioleta e irradiação iônica.

2.2 - Antioxidantes não enzimáticos

Em contra partida às injúrias ocasionadas pelo estresse oxidativo, existem várias estratégias de defesa incluindo antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos bem como respostas adaptativas (SIES e SEVANIAN, 2005).

Antioxidantes são substâncias que neutralizam ERO's e previnem os danos causados pelos mesmos, antes que reajam com alvos biológicos (lipídeos, proteínas, DNA, etc), prevenindo reações em cadeia ou a ativação do oxigênio a produtos altamente reativos. Os antioxidantes naturais podem ser classificados em dois grandes grupos, sendo esses, o enzimático (enzimas como Superóxido Dismutase, Catalase e Glutathione Peroxidase) e o não enzimático (compostos fenólicos, ácido ascórbico, vitamina E, Coenzima Q_{10} , carotenóides) (RATNAM *et al*, 2006; SCHNEIDER E OLIVEIRA; 2004).

De acordo com Kouryl e Donangelo (2003), os antioxidantes, de acordo com seu mecanismo de ação, podem ser classificados como: antioxidantes de prevenção (impedem a formação de radicais livres), varredores (impedem o ataque de radicais livres às células) e de reparo (favorecem a remoção de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas).

Do ponto de vista de sistemas biológicos a descoberta do papel de ERO's no câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, doenças auto imunes, desordens neurodegenerativas, idade e outras doenças, tem levado a uma revolução que promete um novo paradigma nos tratamentos de saúde. Embora os antioxidantes não sejam listados em farmacopéias, inúmeras pesquisas têm sido conduzidas mundialmente sobre esses compostos (RATNAM *et al*, 2006)

2.2.1 - Antioxidantes vitamínicos

A vitamina C (ácido ascórbico) tem gerado um grande interesse tanto pelo seu potencial sobre a função imune como por sua atividade antioxidante. Além de atuar como antiescorbútico possui efeitos profiláticos e terapêuticos em condições patológicas, tais como enfermidades infecciosas, deficiências imunológicas, aterosclerose, age como cofator de diversas reações, é crucial na síntese de colágeno e carnitina, conversão do ácido fólico em ácido folínico, contribui na oxidação do ferro férrico em ferroso e participa no metabolismo de alguns hormônios é o principal antioxidante solúvel em água e atua como a primeira defesa contra os radicais livres no sangue e no plasma. Atua como elemento terminal na proteção contra o dano tecidual mediado por radicais livres. Também participa da regeneração da vitamina E e na interface membrana-citosol (KELLER, BRANDSCH, EDER, 2004; SANCHEZ-MORENO *et al.*, 2004; RODRIGUEZ G. P. *et al.*, 2000; TORRES *et al.*, 2002).

A vitamina E é uma substância lipossolúvel e existente na natureza como tocoferóis e tocotrienóis, em quatro formas diferentes, sendo o α -tocoferol a forma antioxidante mais ativa e amplamente distribuída nos tecidos e no plasma. A vitamina E constitui o antioxidante lipossolúvel mais efetivo encontrado na natureza é um importante fator de proteção contra a peroxidação lipídica nas membranas celulares e na circulação sanguínea (SILVA e NAVES, 2001).

Os carotenóides (carotenos e xantofilas) estão presentes em várias frutas e vegetais. Vários deles são precursores da vitamina A (β -caroteno, γ -caroteno e β -criptoxantina) e devido a dupla ligação conjugada eles são "varredores" de radicais e quelantes de oxigênio singlet (PODSEDEK, 2007).

O licopeno é classificado como um carotenóide, sendo considerado como um dos mais potentes antioxidantes relacionado com a prevenção da carcinogênese e aterogênese por proteger moléculas como lipídeos, lipoproteínas de baixa densidade (LDL), proteínas e DNA. É tido como o carotenóide que possui a maior capacidade seqüestrante de oxigênio, possivelmente devido à presença das duas ligações duplas não conjugadas, o que lhe oferece maior reatividade (SHAMIL e MOREIRA, 2004).

2.2.2 – Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são agentes antioxidantes presentes em vários alimentos, podendo agir na prevenção da oxidação da LDL (*low density lipoprotein*), estresse oxidativo, doenças crônicas não transmissíveis e no processo degenerativo da osteoporose. As propriedades antioxidantes destes compostos são responsáveis por suas propriedades anticarcinogênica, antiviral, antiinflamatória entre outras. Eles também podem prevenir fragilidade capilar e agregação plaquetária (NINFALI *et al*, 2005; MARRUGAT - 2004; PUEL, 2004).

A resposta usual ao estresse em vegetais, é o aumento no conteúdo total de fenólicos, especialmente ácido clorogênico (LULE e XIA, 2005).

Compostos fenólicos são os mais abundantes antioxidantes em nossas dietas. São divididos em dois grupos: flavonóides (flavonóis, isoflavonóides, flavanóis, antocianidinas, flavanonas e flavonas) e ácidos fenólicos (ácidos hidroxicinâmicos e ácidos hidroxibenzóicos), descritos na figura 1A e 1B. Os flavonóides são os mais abundantes polifenóis (CHEYNIER, 2005).

Ácidos hidroxibenzóicos

$R_1=R_2=R_3=H, R_4=OH$	<i>p</i> -Ácido hidroxibenzóico
$R_1=R_4=H, R_2=R_3=OH$	Ácido protocatecuico
$R_1=R_4=H, R_2=OCH_3, R_3=OH$	Ácido vanílico
$R_1=H, R_2=R_3=R_4=OH$	Ácido gálico
$R_1=H, R_2=R_4=OCH_3, R_3=OH$	Ácido siringico
$R_1=R_4=OH, R_2=R_3=H$	Ácido gentísico

Figura1A. Estruturas dos ácidos hidroxibenzóicos (YEH eYEN, 2003).

Os compostos fenólicos são componentes importantes de várias frutas, hortaliças, bebidas e outros alimentos, os quais contribuem para o sabor, a cor e propriedades como a sensação de amargo e adstringência. A presença dos mesmos nos alimentos tem um efeito importante sobre a estabilidade oxidativa e microbiana dos produtos. Adicionalmente, vários compostos fenólicos possuem importante atividade

biológica. O uso de compostos fenólicos em alimentos funcionais e aplicações na medicina tem sido estimulado. Os compostos fenólicos presentes nos alimentos mostram considerável diversidade na sua estrutura e são divididos em diferentes classes. Os flavonóides e compostos fenólicos relacionados existem em uma diversidade de conjugados complexos com ésteres, açúcares e ácidos orgânicos. Os ácidos fenólicos estão entre as classes de ácidos monocíclicos simples que incluem os derivados de ácido hidroxibenzóico e hidroxicinâmico (FIORIDI *et al*, 2003).

Estudos *in vitro* têm mostrado que flavonóides podem induzir uma grande variedade de sistemas enzimáticos envolvendo importantes vias que regulam divisão e proliferação celular, agregação plaquetária, detoxificação, respostas imunes e inflamatórias. Flavonóides tem a capacidade de atuar como antioxidantes sobre ERO's (LULE e XIA, 2005).

A questão da capacidade de varredura de ERO's é dependente da sua capacidade de doar elétrons. Seu efeito antioxidante depende da estabilidade em

Ácidos hidroxicinâmicos

Figura1B. Estruturas dos ácidos hidroxicinâmicos (YEH & YEN, 2003).

estruturas de diferentes sistemas, bem como o número e a localização de grupos hidroxil. A configuração química dos polifenóis afetará suas propriedades biológicas: biodisponibilidade, atividade antioxidante, interações específicas com receptores celulares/enzimas e outras propriedades. As principais classes de polifenóis são definidas de acordo com a natureza do seu esqueleto de carbono: ácidos fenólicos, flavonóides e menos comum, estilbeno e ligninas. O ácido caféico é o ácido fenólico mais frequentemente encontrado na natureza, enquanto que o ácido ferúlico é o menos frequente. Este está geralmente ligado à fibra alimentar. O ácido caféico está normalmente presente sob a forma de ésteres. O cafeoil mais frequentemente encontrado é o ácido clorogênico, o qual está presente em frutas, hortaliças e café (PODSEDEK, 2007; SCAALBERT e WILLIAMSON, 2000).

Quanto à absorção de polifenóis, a evidência indireta para a absorção através da barreira intestinal é o aumento da capacidade antioxidante do plasma, após consumo de alimentos ricos em polifenóis. Os poucos estudos em humanos mostram que as quantidades de polifenóis encontrados intactos na urina varia de um para outro. Outros não encontrados na urina podem ser excretados para a bile. Vários compostos mostraram ser estáveis nos sucos gástrico e intestinal. A estrutura tem um impacto fundamental na absorção intestinal. O peso molecular, a glicosilação e esterificação, são parâmetros muito discutidos. O fato de estar glicosilados, esterificados ou na forma de agliconas, influenciam a absorção desses compostos. Em humanos, o pico pós-prandial é observado de uma a duas horas após a ingestão de vários flavonóis e flavanóis, mas é mais extenso para isoflavonas e outros que necessitam de degradação parcial pela microbiota colônica. Para muitos flavonóides absorvidos no intestino delgado, a concentração plasmática decresce rapidamente. Sendo assim, a manutenção de uma alta concentração no plasma requer uma repetida ingestão de polifenóis todo tempo (SCALBERT et al, 2002).

Para a metabolização, duas β -glucosidases são comumente relacionadas: β -glucosidase citosólica e a hidrolase florizina lactase (LPH) (DAY *et al*, 1998).

Em relação ao metabolismo, compostos fenólicos são extensivamente metabolizados nos tecidos, uma vez que são absorvidos através da barreira intestinal ou para aquelas frações não absorvidas ou re-excretadas na bile, pela microbiota

colônica. Todos os polifenóis estão conjugados na forma de O-glucuronídeos, ésteres sulfatos O-metil éter. Esta conjugação ocorre primeiro na barreira intestinal. Esses conjugados, então, alcançam o fígado onde serão futuramente metabolizados (SCALBERT *et al*, 2002).

Uma esquematização do provável metabolismo dos compostos fenólicos pode ser observada na figura 2.

FARMACOCINÉTICA DOS FLAVONÓIDES DA DIETA

Figura 2. Diagrama esquemático do mecanismo proposto envolvendo a absorção intestinal e hidrólise de compostos fenólicos (MANACH e DONOVAN, 2004).

Na figura 3, apresentada a seguir, demonstra o diagrama esquemático envolvendo os mecanismos de absorção e distribuição dos flavonóides. Agliconas resultantes da ação da LPH, CBG ou enzimas produzidas pela microbiota do intestino grosso estão disponíveis para conjugação pelas enzimas de fase II nas células epiteliais do intestino delgado. No interior dos enterócitos, essas agliconas são

glicuronidadas e possivelmente metiladas. Os metabólitos resultantes e posteriormente absorvidos são capazes de entrar nos hepatócitos e são conjugados no fígado. Os metabólitos são novamente excretados para o lúmen intestinal na bile ou entram na circulação sistêmica (MANACH e DONOVAN, 2004)

Figura 3. Diagrama do metabolismo de fenólicos (MANACH & DONOVAN, 2004).

2.3 - Antioxidantes enzimáticos

Um dos mecanismos de defesa utilizado por organismos aeróbios contra o dano causado por ERO's é o uso de enzimas para eliminar essas espécies através de sua conversão a compostos menos tóxicos. Deste modo, enzimas são geralmente referidas, como as enzimas antioxidantes e dentre essas, as mais amplamente distribuídas incluem a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. O reconhecimento da importância do papel dessas enzimas contra o dano causado por ERO's aconteceu rapidamente após a descoberta da primeira enzima antioxidante, que foi a superóxido dismutase, através do trabalho de McCord e Fridovich, em 1969. As enzimas antioxidantes constituem uma importante parte na defesa dos organismos aeróbios

contra a produção de ERO's, bem como na prevenção e reparo dos danos moleculares gerados em várias situações (JOHNSON, 2002).

Essas enzimas formam um grupo que tem como característica estagnar o processo de propagação em cadeia dos danos ocasionados por ERO's. Elas são denominadas enzimas de detoxificação, constituindo uma segunda linha de defesa (GENESTRA, 2007).

A superóxido dismutase (SOD) é um dos mais eficientes antioxidantes intracelulares. A SOD catalisa a dismutação do $O_2^{\cdot -}$ a O_2 e a H_2O_2 . Há algumas isoformas da SOD e humanos apresentam três formas de SOD: citosólica (Cu, Zn-SOD), mitocondrial (Mn-SOD) e extracelular (EC-SOD) (VALKO et al, 2006).

A reação de dismutação pode ser descrita de maneira simplificada, da seguinte forma:

A atividade da catalase consiste em converter o H_2O_2 gerado, inclusive, na dismutação do $O_2^{\cdot -}$, a água e oxigênio. Esta enzima opera a elevados níveis de H_2O_2 (JEZEK e HLAVATÁ, 2005).

Além da detoxificação do H_2O_2 , a catalase é responsável pela detoxificação de outros fenóis e álcoois. É encontrada tanto em peroxissomos quanto na fração citosólica (KARIHTALA e SOINI, 2007; VALKO et al, 2006).

A reação de detoxificação do H_2O_2 pode ser descrita de maneira simplificada, da seguinte forma:

Já a glutathiona peroxidase (GSH-Px), juntamente com a glutathiona reduzida (GSH), converte H_2O_2 a água e glutathiona oxidada (GSSG). Posteriormente, a glutathiona oxidada é reduzida novamente a GSH, pela glutathiona redutase (GR), tendo o NADPH como cofator (ROVER JUNIOR et al, 2001).

A GSH-Px compete com a catalase para detoxificação do H_2O_2 e é a maior fonte de proteção contra baixos níveis no estresse oxidativo (VALKO et al,2006).

Geradores importantes de espécies reativas e o papel das enzimas antioxidantes estão resumidos na figura 4.

Figura 4. Vias para produção e remoção de ERO's pelas enzimas SOD, CAT; GPx e GR (AFONSO et al., 2007)

2.4 - Ácidos graxos $\omega 3$, $\omega 6$ e $\omega 9$

Os possíveis distúrbios ocasionados pelo estresse oxidativo podem ser amenizados não somente por compostos antioxidantes, mas também por outros nutrientes funcionais, como ácidos graxos do grupo $\omega 3$ (omega três), $\omega 6$ (ômega seis) e $\omega 9$ (ômega nove). O consumo de ácido eicosapentaenóico (EPA) e de docosahexaenóico (DHA), ambos da família $\omega 3$ e derivados do ácido α -linolênico, está relacionado com baixas taxas de doenças cardiovasculares e câncer, assim como outras patologias relacionadas ao estresse oxidativo (VISIOLI e HAGEN, 2007; SHAMIL e MOREIRA - 2004; XIA et al. - 2005; VEACH - 2005; SCHNEIDER e OLIVEIRA -

2004; KNEKT - 2004; KOURYI e DONANGELO - 2003; CALDER, 2003; CASTRO-GONZALÉZ, 2002; SILVA e NAVES, 2001).

Ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (PUFA) têm 20 ou 22 átomos de carbono e 4, 5 ou 6 duplas ligações cis com grupos metileno interrompidos, ordenados em ômega 6 ($\omega 6$) ou ômega ($\omega 3$). Os ácidos graxos de cadeia longa nutricionalmente mais importantes são o araquidônico (ARA; C20:4 $\omega 6$), eicosapentaenóico (EPA; C20:5 $\omega 3$) e ácido docosahexaenóico (DHA; C22:6 $\omega 3$). Fisiologia humana depende, em várias vias, desses ácidos graxos, cada um como componentes dos fosfolípidos de membrana em tecidos específicos ou como precursores para síntese de diferentes biocompostos (ex: prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos). Contribuem de forma benéfica para a manutenção da saúde com aumento da idade, particularmente pela redução da incidência de doenças cardiovasculares (ABBADI *et al.*, 2004)

Os ácidos graxos α -linolênico e linoléico são classificados como insaturados e essenciais, não sendo produzidos endogenamente pelo corpo humano, sendo precursores dos eicosanóides que estão associados ao desenvolvimento cerebral e da retina dos fetos; no sistema imunológico diminuindo a resposta à produção de interleucina 1(IL1) e 6 (IL6) e do fator de necrose tumoral; no sistema cardiovascular por apresentarem efeitos antitrombóticos, antiarrítmicos, aumentam o tempo de sangramento evitando a aderência plaquetária nas artérias; prevenindo a aterosclerose, diminuindo a taxa de colesterol total sérica, além da inibição da síntese hepática de triacilgliceróis (HJERKINN *et al.*, 2005).

As duas principais classes de PUFA possuem funcionalidades distintas. Um excesso de $\omega 6$, como ácido araquidônico, muda o estado fisiológico para um que é pró-trombótico e pré-agregador, levando a complicações inflamatórias e cardiovasculares. Por outro lado, $\omega 3$ como EPA, tem sido demonstrado como atuante na prevenção e tratamento de numerosas doenças, incluindo doenças cardiovasculares, inflamação, artrite e câncer. Assim, um ótimo balanço entre $\omega 6$ e $\omega 3$ na dieta humana é importante para a homeostase das respostas inflamatórias. Em mamíferos, os ácidos graxos de cadeia longa são sintetizados por um grupo de dessaturases ligadas à membrana e enzimas elongases. A síntese desses ácidos graxos ocorre através de uma série alternada de reações começando com ácido linoléico (LA; C18:2 $\omega 6$), para a série $\omega 6$ e

ALA (ácido α -linolênico; C18:3 ω 3) para a série ω 3. Embora a dieta ocidental provenha uma quantidade adequada de ω 6, observa-se que a ingestão de ω 3 é geralmente muito menor do que o recomendado (PEREIRA et al, 2004.).

Outros benefícios relacionados aos ácidos graxos ω 3 estão relacionados a processos como asma, fibrose cística, artrite reumatóide, desordens comportamentais (hiperatividade, dislexia), depressão, distúrbio bipolar e a própria questão da fluidez de membrana, que assim como ω 6, constituem um importante componente da membrana das células, influenciando na fluidez e no comportamento de enzimas ligadas à membrana e receptores (EL-BADRY, GRAF e CLAVIEN, 2007; RUXTON et al., 2007; JOORDENS, KUIPERS e MUSKIET, 2007)

Focando ácidos graxos da família ω 6, os eicosanóides derivados do ácido araquidônico possuem atividade biológica essencial quando estão em pequenas quantidades. Somente em altas concentrações eles contribuem para formação de trombos e desenvolvimento de desordens inflamatórias. O tromboxano A2 (TXA2), um potente agregador plaquetário e vasoconstrictor e o leucotrieno B4 (LTB4), um potente indutor de inflamação, podem estar elevados quando há a metabolização exarcebada de ácidos graxos ω 6. A esquematização da síntese de eicosanóides a partir do ácido araquidônico pode ser vista na figura 4 (El-Badry, Graf e Clavien, 2007).

Por serem essenciais, esses ácidos graxos devem ser ingeridos através da dieta. As principais fontes vegetais de ácido α -linolênico são: óleo de linhaça, óleo de canola, nozes e alguns vegetais de folhas escuras. Fontes de origem animal de ω 3 incluem óleos de peixe como salmão, sardinha, truta, cavala e atum. Quanto às fontes de ácido graxo linoléico (ω 6) incluem óleos de origem vegetal como: óleo de girassol, óleo de canola, óleo de soja e óleo de milho (CHONG, SINCLAIR e GUYMER, 2006).

Desde 1994, vem sendo discutida a recomendação de ω 6, ω 3 e demais ácidos graxos, onde se preconizou uma razão de consumo entre ω 6 e ω 3 entre 5:1 em até 10:1. (FAO, 1994). Em abril de 1999, foi realizado um "workshop" com o intuito de se revisar essas determinações, onde não foram sugeridas expressivas mudanças (SIMOPOULOS, LEAF e SALEM, 1999).

Recentemente as recomendações quanto ao consumo dos ácidos graxos ω 6 e ω 3 apresentam outros valores, onde a razão varia de 4:1 até aproximadamente 6:1, o

que seria fisiologicamente favorável à síntese de derivados do metabolismo do ácido α -linolênico, que possuem atividade antiinflamatória e antitrombogênica, já que tanto o ácido linoléico e o ácido α -linolênico competem pelas mesmas enzimas em seu metabolismo. Nas dietas ocidentais, essa razão gira em torno de 15-16:1 (RUXTON et al., 2007; EL-BADRY, GRAF e CLAVIEN, 2007; ABBADI *et al.*, 2004).

Figura 5. Síntese de eicosanóides a partir do ácido diomo- γ -linoléico, ácido araquidônico e ácido eicosapentaenóico. LT - leucotrieno; PG - prostaglandina; TX - tromboxano (modificado a partir de : Simopoulos, A.P. World Rev. Nutr. Diet., c.92, p.1-22, 2003) (EL-BRADY, GRAF & CLAVIEN, 2007).

Os ácidos graxos ω 9 cis são denominados ácidos graxos monoinsaturados (MUFA's), com uma única dupla ligação. São considerados hipocolesterolêmicos, mas com menor potencial que os PUFA's. Eles têm sido associados à melhora na sensibilidade à insulina e maior resistência às modificações oxidativas (CHONG, SINCLAIR e GUYMER, 2006).

Em relação aos MUFA's, especificamente o ácido oléico, da família ω 9, sua importância está atrelada à Dieta do Mediterrâneo. O interesse pela Dieta do Mediterrâneo vem crescendo ao longo dos anos devido ao fato do consumo alimentar na região mediterrânea ter sido ligado a longevidade, aumento da qualidade de vida, menor incidência de doenças cardiovasculares, outras enfermidades não transmissíveis

e declínio cognitivo. Tradicionalmente, os benefícios de dietas ricas em MUFA's foram ligados aos efeitos sobre o metabolismo de lipoproteínas e em menor extensão, a outros fatores de risco. Mas atualmente se identificou que existe um conjunto de outros benefícios sobre os mecanismos de trombogênese (PÉREZ-JIMÉNEZ *et al.*, 2006).

As principais fontes de ácido graxo oléico são as nozes e o azeite de oliva, sendo que este último possui em sua composição cerca de 80% deste ácido graxo. Preferencialmente o azeite extra virgem deve ser consumido, já que o refino retira outras substâncias que colaboram com o potencial benéfico deste produto (RAMOS e RAMOS, 2005).

2.5 - MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

2.5.1 - Sistema β -caroteno / ácido linoléico (aquoso)

O método do sistema β -caroteno / ácido linoléico foi descrito inicialmente por Marco (1968) e posteriormente modificado por Miller (1971). O método colorimétrico se baseia na leitura referente à descoloração da solução preparada com β -caroteno e ácido linoléico, em meio aquoso, já que a descoloração acontece devido a ação das estruturas radicalares formadas pela oxidação do ácido linoléico sobre as duplas ligações do β -caroteno, que perdem seu cromóforo, originando perda de coloração do complexo alaranjado, típico da solução. A presença de antioxidantes no sistema tem por função proteger o ácido linoléico, avaliando a atividade de inibição de radicais livres (HUANG e WANG, 2004; DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006).

Geralmente, utiliza-se como antioxidante padrão positivo, butil-hidróxido tolueno (BHT).

Os resultados são expressos como porcentagem de inibição da oxidação, sendo calculada em relação ao decaimento da absorbância do controle. Diminui-se o valor da absorbância inicial da absorbância final tanto do controle quanto da amostra para a aplicação na seguinte fórmula, para obtenção dos valores finais:

$$\% \text{ da inibição da oxidação} = \frac{\bar{x} \text{ abs. controle} - \bar{x} \text{ abs. amostra}}{\bar{x} \text{ abs. controle}} \times 100$$

(CORDENUNSI *et al.*, 2005; HASSIMOTTO, GENOVESE e LAJOLO, 2005).

2.5.2 - Ensaio do radical 2,2-difenil-picrilhidrazil (DPPH)

Este ensaio está baseado no método desenvolvido por Blois (1958).

O ensaio do DPPH é geralmente realizado da seguinte forma: é confeccionada uma solução de DPPH em metanol e misturada com a solução da amostra desejada. É feita a leitura da solução a 515nm por trinta minutos ou até a absorbância permanecer estável. Ao ocorrer a redução, a cor da solução enfraquece. Acredita-se que este ensaio envolva reação de transferência de hidrogênio. É um método simples, rápido e tem sido sugerida a sua utilização para medir a capacidade antioxidante de frutas, vegetais, sucos e extratos (DUARTE-ALMEIDA et al, 2006; HUANG, OU e PRIOR, 2005; BRAND-WILLIAMS, CUVELIER e BERSET, 1995).

De acordo com Duarte-Almeida (2006), o decaimento da absorbância das amostras (Aam) correlacionado ao decaimento da absorbância do controle (Ac) resulta na porcentagem de seqüestro de radicais livres (%SRL), que pode ser expressa através da seguinte equação:

$$\% \text{ SRL} = \frac{Ac - A_{am}}{Ac} \times 100$$

2.6 - Análise para avaliação da peroxidação lipídica em tecidos animais

2.6.1 - Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A peroxidação lipídica em tecidos resulta na produção e propagação da reação com espécies reativas, primeiramente envolvendo PUFA's da membrana celular ou de organelas. Isto tem sido implicado na patogênese de inúmeras doenças incluindo aterosclerose, diabetes, câncer e artrite reumatóide (KOTA, KRISHNA e POLASA, 2008).

Os dienos conjugados formados durante a peroxidação podem ser detectados espectrofotometricamente. A elevação dessas substâncias em animais e humanos pode estar associada ao estresse oxidativo, segundo pesquisas (JACKSON, 1999).

A mesma oxidação desses ácidos graxos insaturados, pode levar à formação de outros compostos, como o dialdeídomalônico (MDA), facilmente detectável pelo método do TBA (ácido tiobarbitúrico). Entretanto, outras substâncias além do MDA, podem

reagir com o TBA, resultando em produtos com absorção similar ao MDA. Por esta característica, este método é identificado como TBARS, quantificando as substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico. Esta reação gera compostos de cor rósea, os quais podem ser medidos através do espectrofotômetro a 532nm (JENTZSCH, 1995).

Várias hipóteses têm sido propostas em relação à formação de MDA *in vivo*. Algumas hipóteses descreveram a oxidação lipídica como sendo capaz de produzir MDA como produto de decomposição de ácidos graxos. O mecanismo envolve formação de endoperóxidos provenientes de PUFA's com duas ou mais ligações. Um mecanismo alternativo apresentado por Esterbauer et al, é baseado na formação sucessiva de hidroperóxidos através da β -oxidação de PUFA's. MDA é então diretamente formado a partir de um 3-hidroperoxialdeído ou pela reação entre acroleína e radical hidroxil. Aldeídos, como MDA, são capazes de formarem adutos com biomoléculas como proteínas, DNA e RNA (LYKKESFELDT, 2007).

Outras metodologias vêm sendo aplicadas utilizando CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) (SELJESKOG, HERVIG e MANSOOR, 2006).

2.7 – Avaliação de dietas

2.7.1 – Avaliações no Brasil

A correlação entre consumo alimentar e o avanço de enfermidades num âmbito geral e atualmente, crônicas não transmissíveis, fez com que surgissem estudos epidemiológicos para investigar causas, conseqüências e possíveis intervenções (JAIME e MONTEIRO, 2005).

No Brasil, o estágio inicial do processo de desenvolvimento das metodologias para avaliação dietética de indivíduos e populações parece ter ocorrido durante a década de 1930. No pós segunda guerra, essa área específica do conhecimento ganhou ênfase, sobretudo a partir dos estímulos técnico-financeiros e materiais propiciados por organizações internacionais como a Organização Mundial de Saúde (OMS), a *Food and Agriculture Organization* (FAO), a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) e o *Interdepartmental Committee on Nutrition for National Development* (ICNND). Vale ressaltar que, ao longo do processo de constituição e consolidação da ciência da nutrição, diferentes métodos, técnicas e instrumentos têm sido utilizados

para a obtenção de informações quantitativas e/ou qualitativas sobre o consumo e os hábitos alimentares de indivíduos e populações. No decorrer da década de 1970, a metodologia de pesos e medidas foi a modalidade de inquérito dietético mais recomendada pela FAO. Essa modalidade foi utilizada no Estudo Nacional da Despesa Familiar (Endef), realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 1974. Em 1988, foi realizada a primeira Pesquisa de Orçamentos Familiares, conduzida pelo IBGE, tendo sido repetida nos anos de 1995 e 2002 (VASCONCELOS, 2007).

A partir desses estudos, tornou-se possível uma estimativa da disponibilidade de alimentos nos domicílios brasileiros.

Jaime e Monteiro (2005) analisando os dados obtidos a partir da última POF, correlacionando os mesmos com dados obtidos através do estudo *World Health Survey (WHS)*, realizado no Brasil pela Fundação Osvaldo Cruz, puderam observar que menos da metade dos indivíduos adultos no Brasil, consomem hortaliças diariamente, enquanto que menos de um terço, consomem frutas e que somente 13% seguem corretamente as recomendações de ingestão de frutas e hortaliças. Entende-se por ingestão adequada o consumo de 400g (quatrocentos gramas) de frutas e hortaliças ou o equivalente a cinco porções desses alimentos por dia.

Jaime et al (2007) puderam constatar que acima da questão dos altos preços desses alimentos (comparados com outros itens e no contexto de renda familiar), produção ineficiente e distribuição no varejo, está o pouco conhecimento da população acerca dos benefícios do consumo desses alimentos, especialmente no caso dos vegetais. Mas, é sempre válido lembrar que o custo também pode limitar a inserção desses alimentos aos hábitos alimentares, sendo necessário rever desde a cadeia de produção, subsídios até a distribuição (CLARO *et al*, 2007).

Em detrimento ao consumo de frutas e hortaliças, que estão ligadas a extensos benefícios à saúde de um modo geral e o consumo ascendente de calorias, foi observada a persistência de valores elevados para o colesterol dietético, aumento dos ácidos graxos saturados, ácidos graxos *trans* e redução de carboidratos de baixo nível glicêmico, paralelamente à estagnação ou redução do consumo de leguminosas, verduras, legumes, frutas e sucos naturais, acompanhado da ascensão do consumo já excessivo de açúcar refinado, refrigerantes e biscoitos, configurando desse modo os

traços mais marcantes e negativos da evolução do padrão alimentar observada nesse período (LIMA e SAMPAIO, 2007; LOPES *et al*, 2005).

Este quadro pode ser evidenciado tanto em adultos como em adolescentes, justamente em um período de reforço de hábitos alimentares (Neutzling *et al*, 2007).

De acordo com a última POF, o montante energético estimado *per capita* chega a 1811 kcal, sendo que a participação relativa de macronutrientes na disponibilidade alimentar domiciliar indica que 59,6% das calorias totais provêm de carboidratos, 12,8% de proteínas e 27,6% de lipídeos. Isso evidencia adequação da dieta às recomendações nutricionais. Não se deve esquecer que mesmo havendo uma adequação nutricional de macronutrientes, o aumento de gorduras e alimentos refinados é crescente e linear. Mas, frutas, verduras e legumes correspondem a apenas 2,3% das calorias totais, ou cerca de um terço das recomendações para o consumo desses alimentos (cerca 6-7% das calorias totais de uma dieta de 2.300 kcal diárias, estimada pela FAO). (LEVY-COSTA *et al*, 2005).

Num país de dimensões continentais, é comum que sejam encontradas diferenças no consumo alimentar. Enquanto que na Região Sul há um elevado consumo de farinha de trigo e um relativo baixo consumo de arroz polido, as Regiões Centro-Oeste e Sudeste demonstram justamente o contrário. Sendo o estado de São Paulo detentor de cerca de 10% de toda população nacional e apresentar uma diversidade compatível ao território nacional, esta mesma população, sem dúvida, se torna representativa para a realização de um estudo que tem como base a disponibilidade de alimentos em domicílio, de forma qualitativa.

2.7.2 – Dieta Mediterrânea

Em contra partida, um dos modelos mundiais de dieta, a Dieta Mediterrânea (DM), é caracterizada por baixo consumo de carnes vermelhas, moderado consumo de peixe leite e derivados, moderada ingestão de álcool (principalmente vinho) e alto consumo de frutas, hortaliças, cereais e azeite de oliva. A referência de dieta saudável da DM foi estabelecida a partir de um estudo epidemiológico denominado *Seven Countries Study*, chefiado por Ancel Benjamin Keys. Este estudo foi iniciado em 1958 para investigar fatores de risco para morbidade e mortalidade ocasionadas por doenças

coronarianas e outras patologias cardiovasculares, em populações adultas diferentes (homens entre 40-59 anos). Dezesesseis áreas, de sete países (Grécia, Japão, Finlândia, Itália, antiga Iugoslávia, Estados Unidos da América e Países Baixos), foram selecionadas (MOSCHANDREAS *et al*, 2005).

A partir desse estudo onde foram encontrados os menores índices de doenças coronarianas na ilha de Creta (Grécia), a DM se popularizou, sendo a dieta consumida na ilha de Creta a clássica DM. DM é rica em componentes os quais têm sugerido serem cardioprotetores: ácidos graxos monoinsaturados, ácidos graxos $\omega 3$, uma variedade de antioxidantes como vitamina C, vitamina E, flavonóides e fibras (MACKENBACH, 2007).

Simopoulos (2001) comparou a DM à dieta similar a da Era Paleolítica em composição, com baixa quantidade de gorduras saturadas, uma razão balanceada entre $\omega 6$ e $\omega 3$, baixíssima quantidade de gorduras *trans* e alta quantidade de vitaminas A e E.

Numerosos estudos epidemiológicos têm demonstrado que pessoas que consomem DM, além de possuírem um menor risco em relação a patologias cardiovasculares, têm uma maior expectativa de vida e menor risco em relação a demais enfermidades crônicas não transmissíveis (ORTEGA, 2006; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ *et al*, 2002).

Consideráveis discussões têm envolvido a contribuição de vários fatores para o declínio dessas enfermidades, mas o aumento da ingestão de PUFA's está ligado a efeitos antitrombóticos, antiarrítmicos e sensibilidade a insulina, além de influência no colesterol total (WILLETT, 2006).

Na linha dos estudos epidemiológicos, no ano de 1998 foi realizado o *Data Food Networking*, um levantamento da disponibilidade alimentar em domicílios, em 16 países europeus, incluindo a Grécia, com o intuito de avaliar indiretamente o consumo e hábitos alimentares da população. Além da Grécia, países como Alemanha, Áustria, Bélgica, Espanha, Finlândia, França, Hungria, Irlanda, Itália, Luxemburgo, Noruega, Polônia, Portugal, Reino Unido e Suécia compõem atualmente o grupo de localidades pesquisadas. O estudo DAFNE possui o mesmo perfil de questionário que as POF's, tendo sido idealizado em 1987, na Grécia, sendo que na última etapa grega, foram

selecionados domicílios, totalizando 6.756, considerando meio rural e meio urbano. Além de dados socioeconômicos, foram tomadas informações da disponibilidade alimentar média diária. Todos os alimentos foram posteriormente distribuídos em quinze principais grupos. (DAFNE, 2000).

A importância atribuída à alimentação é inquestionável. Sendo assim, os estudos para se avaliar o impacto das dietas no funcionamento do organismo têm como tendência detalhar de que forma e como este conjunto pode estar influenciando de forma benéfica.

Nos dias atuais tem se destacado a importância dos compostos antioxidantes presentes nas dietas, focalizando principalmente os compostos fenólicos, com a perspectiva de incluí-los na composição dos alimentos juntamente com nutrientes tradicionais.

Este trabalho foi direcionado à avaliação da atividade antioxidante de duas dietas, com os objetivos apresentados a seguir.

3 - OBJETIVOS

3.1 - OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antioxidante da dieta de uma determinada população brasileira (Estado de São Paulo) tendo como parâmetro de avaliação a Dieta Mediterrânea (Grega), dando ênfase na análise de compostos fenólicos, do perfil de ácidos graxos $\omega 3$, $\omega 6$, $\omega 9$ e do nível de peroxidação de tecidos alvo.

3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a atividade antioxidante das dietas específicas.
- ✓ Verificar o perfil de compostos fenólicos provenientes de fontes naturais.
- ✓ Analisar o perfil de ácidos graxos das dietas avaliadas, dando ênfase a ácidos graxos $\omega 3$, $\omega 6$ e $\omega 9$.
- ✓ Determinar o perfil dos ácidos graxos dos tecidos dos animais (cérebro, fígado e plasma).
- ✓ Verificar a extensão da oxidação lipídica nos tecidos animais (cérebro, fígado e plasma), após intervenção.
- ✓ Avaliar a atividade de algumas enzimas antioxidantes (Glutathione peroxidase – GPx; Glutathione reductase – GR; Superóxido dismutase – SOD; Catalase – Cat).

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - ELABORAÇÃO DAS DIETAS – TRATAMENTOS

Os hábitos alimentares do estado de São Paulo foram escolhidos como objeto do estudo devido a sua grande representatividade no contexto nacional. Já a Dieta Mediterrânea (grega), por ser considerada um modelo referencial de hábitos alimentares, foi selecionada como parâmetro de comparação.

As dietas utilizadas em todo o trabalho foram elaboradas com alimentos selecionados no comércio local da cidade de São Paulo.

Para a ração do segmento da população, denominada Dieta Nacional São Paulo (DNSP), a seleção dos alimentos com suas respectivas quantidades foi baseada nos dados fornecidos pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) divulgados no relatório Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF), realizada entre os anos de 2002 e 2003.

Já os dados para seleção dos alimentos utilizados para a confecção do tratamento da Dieta Mediterrânea (DM), foram baseados no relatório Data Food Networking (DAFNE), divulgado no ano de 2000.

Tanto a POF quanto o DAFNE possuem a mesma estrutura de tomada de dados, tendo em vista a determinação da disponibilidade alimentar domiciliar *per capita*.

A lista de alimentos de ambos os relatórios foi dividida por categoria de alimentos (cereais, leguminosas, hortaliças, frutas, carnes, óleos e gorduras, leite e derivados, produtos industrializados). Para a quantidade final de alimentos, foi determinado um ponto de corte em 50% (cinquenta por cento) em relação a maior quantidade do consumo do representante de determinado grupo. Alimentos que por ventura ficaram abaixo do ponto de corte tiveram sua quantidade proporcionalmente revertida a cada alimento acima do ponto de corte.

Os alimentos divididos por grupos e suas respectivas quantidades podem ser observados na tabela 1. A descrição dos alimentos divididos por categorias é apresentada no Anexo 1.

Tabela 1. Quantidade (g/per capita/dia) por grupos de alimentos de cada população estudada.

Alimentos	Quantidades (g/per capita/dia)	
	DNSP	DM
Cereais e derivados	170,09	253,86
Leguminosas	24,01	26,60
Hortaliças (folhas, frutos, tubérculos)	82,42	353,03
Frutas	78,12	306,02
Nozes e castanhas	0,00	4,72
Carnes vermelhas	79,09	108,90
Peixes	5,13	45,56
Aves	38,12	38,32
Leite de vaca e derivados	169,65	174,90
Queijo de leite de cabra	0,00	40,40
Açúcar e açucarados	58,93	57,90
Bolos e biscoitos doces	14,95	0,00
Massa de tomate	11,98	18,40
Azeite de oliva virgem	0,00	74,00
Óleo de soja	24,73	0,00
Margarina vegetal	4,51	0,00
Cerveja	21,23	23,00
Vinho	0,00	25,00
Suco de fruta	0,00	23,25
Refrigerante convencional	99,11	65,00
Café moído	7,93	5,07
Ovo de galinha	0,00	12,50

Em relação à lista de produtos da DM, alimentos provenientes da Grécia quando disponibilizados no comércio varejo local foram adquiridos e os que não possuíam essa origem foram substituídos por produtos similares nacionais, como por exemplo, hortaliças folhosas, frutas, carnes e leite de origem bovina. Após realizado todo *check list*, alimentos que são consumidos coccionados como arroz, feijão, macarrão, batata e carnes sofreram processamento adequado ou de acordo com orientações do fabricante. Alimentos consumidos *in natura* como leite, hortaliças, frutas e demais que não necessitariam de processamento anterior foram assim utilizados.

Todos os alimentos foram homogeneizados em liquidificador industrial. Dessa forma, os homogenatos foram espalhados em bandejas de aço inoxidável e as mesmas conduzidas ao liofilizador sob as seguintes condições: temperatura - 83° C, sob vácuo de 24mT.

Após liofilização, as dietas foram trituradas e armazenadas em freezer a -20° C.

4.2 - COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS DIETAS

4.2.1 - Umidade

O teor de umidade foi realizado pelo processo de secagem a vácuo, onde foram pesados 10g de amostra em cápsula, previamente tarada, aquecida por seis horas em estufa a vácuo a 70° C, sob pressão reduzida ≤ 100 mm de mercúrio (13,3kPa). Depois de retirada da estufa, a amostra foi resfriada em dessecador até temperatura ambiente e pesada até peso constante.

O cálculo foi efetuado através da seguinte fórmula:

$$\frac{100 \times N}{P \text{ am}} = \text{lipídeos ou extrato etéreo por cento m/m}$$

Onde: N: número de gramas de umidade (perda de massa em gramas);

P am.: peso da amostra (em gramas).

4.2.2 - Carboidratos

Carboidratos totais foram quantificados por diferença. Após a totalização da quantidade de umidade, proteína, lipídeos, fibras e resíduo mineral, este valor será subtraído de 100 (representando 100%).

O resultado foi expresso em g/ 100g de amostra.

4.2.3 - Lipídeos

Para a determinação do teor de lipídeos, foi utilizada a técnica preconizada pela AOAC (Associaton of Official Analytical Chemists - método 963.15, 1998). O papel de filtro contendo amostra foi transferido para o aparelho extrator tipo Soxhlet. Para a extração, foi utilizado éter de petróleo, em fluxo constante, mantido em aquecimento em chapa elétrica, à extração contínua por doze horas.

4.2.4 - Proteínas

O **método de Kjeldahl**, baseado na quantificação do Nitrogênio protéico total, é o método oficial da AOAC (método 991.20, 1998).

Para calcular o conteúdo de proteína é necessário converter o conteúdo de Nitrogênio aplicando o fator **6,25**.

4.2.5 - Resíduo mineral fixo (cinzas)

O resíduo mineral fixo foi determinado de acordo com o método da AOAC (método 930.22, 1998).

4.3 - OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DAS DIETAS

Foram utilizados 10% das dietas desidratadas e desengorduradas em relação ao volume da solução utilizada para preparo dos extratos.

Os extratos das dietas foram obtidos após agitação durante o período de uma hora em solução de metanol/água, na proporção de 1:1, em meio ácido (pH 2,0) (SAURA-CALIXTO e GOÑI, 2006).

Após o período de uma hora, os extratos foram filtrados à vácuo e armazenados em freezer a -20°C até o momento da utilização.

Foi utilizada ração desengordurada para os extratos justamente pelo perfil do meio dos testes *in vitro* de atividade antioxidante.

4.4 - DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS – MÉTODO FOLIN CIOCALTEAU

Ensaio realizado de acordo com metodologia descrita por Swain e Hills (1959).

Foram tomados 500 μL dos extratos e colocados em tubos. A esta amostra, foram adicionados 8mL de água destilada e colocado sob agitação. A esta mistura, adicionou-se 500 μL de reagente Folin Ciocalteu, com posterior agitação e em seguida, foram cronometrados três minutos. Ao final do terceiro minuto, foi adicionado 1mL de solução saturada de carbonato de sódio. Essa solução foi agitada e deixada em repouso por uma hora, para posterior leitura a 720nm em espectrofotômetro.

Para zerar o espectrofotômetro, antes de realizar a leitura das amostras, foi utilizado um “branco” (sem amostra).

Para a curva padrão, foi utilizado ácido gálico e a partir desta, foi possível determinar a concentração de fenólicos totais, sendo os mesmos expressos em μg equivalente de ácido gálico/g de amostra.

4.5 - AVALIAÇÃO ANTIOXIDANTE IN VITRO

Para determinação do potencial antioxidante das dietas, foram realizados testes *in vitro*, tendo sido eleitos a cooxidação β -caroteno/ácido linoléico e o teste de varredura do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).

4.5.1 - Sistema β -caroteno / ácido linoléico (aquoso)

Inicialmente foi preparada uma solução padrão de β -caroteno na concentração de 20mg/mL em clorofórmio. Já a emulsão de β -caroteno foi composta por 20 μL da solução de β -caroteno, 40 μL de ácido linoléico, 8 gotas de emulsificante *Tween* 40 e 1 mL de clorofórmio, sendo essa mistura agitada para completa homogeneização e promovida a evaporação do clorofórmio com nitrogênio gasoso. Após completa evaporação do clorofórmio, foram adicionados 100mL de água previamente oxigenada

por trinta minutos sob aplicação de O₂. Essa solução final foi homogeneizada vigorosamente, sendo submetida à leitura em espectrofotômetro SPECTRONIC® 20 GENESYS™ (ROCHESTER), a 470 nm, sendo recomendável a faixa de leitura entre 0,6-0,7nm.

O ensaio final da cooxidação β-caroteno/ácido linoléico foi realizado utilizando 5mL da solução emulsionada de β-caroteno/ácido linoléico em tubos próprios para leitura em espectrofotômetro, sendo adicionados 500μL do extrato das respectivas dietas. Além dos tubos contendo extratos dos tratamentos, foram feitos tubos "controles" não contendo nenhum tipo de antioxidante. Foi feita a leitura imediata, considerando essa leitura preliminar o tempo zero. Os tubos foram vedados e levados a banho-maria a 50° C. No período de duas horas, foram feitas leituras da absorbância a cada quinze minutos.

Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição da oxidação, sendo calculada em relação ao decaimento da absorbância do controle. Diminui-se o valor da absorbância inicial da absorbância final tanto do controle quanto da amostra para a aplicação na seguinte fórmula, para obtenção dos valores finais:

$$\% \text{ da inibição da oxidação} = \frac{\bar{x} \text{ abs. controle} - \bar{x} \text{ abs. amostra}}{\bar{x} \text{ abs. controle}} \times 100$$

4.5.2 - Ensaio do radical 2,2-difenil-picrilhidrazil (DPPH)

Este ensaio está baseado no método desenvolvido por Blois (1958).

O ensaio do radical 2,2-difenil-picrilhidrazil (DPPH) foi realizado utilizando uma alíquota de 500 μL dos extratos das dietas preparados como descrito anteriormente, além de 1,5mL de solução metanólica de DPPH a 6x10⁻⁵M.

Foram feitas leituras no tempo zero (logo após a adição da amostra na solução de DPPH) e após trinta minutos de reação.

Concomitante à análise dos extratos, um controle (sem adição de antioxidante ou amostra), sendo realizado o mesmo procedimento com amostras.

O comprimento de onda utilizado para leitura das absorbâncias em espectrofotômetro (SPECTRONIC® 20 GENESYS™ (ROCHESTER)) foi de 517nm.

O valor da porcentagem de varredura do radical foi obtido utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ proteção} = \frac{\text{Abs. da amostra} - \text{Abs. do controle}}{\text{Abs. do controle}} \times 100$$

4.6 - ENSAIO BIOLÓGICO

O ensaio biológico foi conduzido no Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (Anexo 1).

Foram utilizados 30 ratos machos, linhagem Wistar, recém desmamados, para que qualquer outro hábito alimentar, além do aleitamento, não interferisse na adaptação às dietas.

Os animais foram divididos em três grupos de dez animais sendo denominados Grupo Controle (C), Grupo Dieta Nacional São Paulo (DNSP) e Grupo Dieta Mediterrânea (DM). Os mesmos foram mantidos em caixas plásticas individuais, cada uma portando comedouro de vidro e bebedouro. As condições ambientais eram: temperatura controlada a $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, ciclo claro/escuro de 12h.

Todos os animais foram submetidos a um período de adaptação de sete dias, consumindo ração padrão, NUVILAB CR-1, irradiada.

Ao grupo controle, foi oferecida ração padrão. Os grupos com tratamento diferenciado, DNSP e DM, receberam dietas confeccionadas com alimentos previamente selecionados e processados.

As dietas foram oferecidas trituradas, em sistema *ad libitum*, assim como a água.

Os animais foram pesados diariamente, bem como os restos das dietas, com a finalidade de se obter dados para cálculo do Coeficiente de Eficácia Alimentar (CEA) e avaliar a aceitação dos tratamentos.

Os tratamentos foram aplicados durante trinta dias.

Os animais foram sacrificados em três dias alternados, num total de dez animais por dia. No ato do sacrifício, no mínimo três animais de cada grupo faziam parte do total.

O sacrifício foi realizado com aplicação de cloridrato de cetamina e xilazina, na proporção de 2:1, intraperitoneal. As recomendações da modalidade de sacrifício foram orientadas pelo biotério.

Foram retirados cérebro, fígado e sangue. O cérebro e o fígado foram perfundidos com solução salina a 0,9%, num total de 200mL de solução injetados através do coração.

Após a extração dos tecidos, cérebro e fígado foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados em ultrafreezer, a uma temperatura de -80°C e sangue centrifugado para obtenção de plasma.

Os tecidos hepático e cerebral foram utilizados para determinação de perfil de ácidos graxos, determinação de atividade de enzimas antioxidantes, índice de peroxidação lipídica através do método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Foi realizado ainda lipidograma (sangue) e dosagem de proteínas dos tecidos para expressão de resultados de atividade de enzimas antioxidantes e índice de peroxidação lipídica.

4.7 - DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS – TECIDOS E DIETAS

4.7.1 - Fígado, cérebro e plasma

Foi tomado um grama do fígado, cérebro e 1mL de plasma de cada animal para extração de ácidos graxos utilizando o método de FOLCH et al. (1957).

O método consiste em homogeneizar a amostra por um minuto, utilizando 10ml de metanol. Em seguida, a este homogenato, foram adicionados 20mL de clorofórmio e homogeneizado por mais dois minutos. Essa mistura foi filtrada à vácuo em kitassato e o resíduo sólido retido no filtro, foi ressuspenso em 30mL de uma mistura de metanol e clorofórmio, na proporção de 1:2 (v/v) e homogeneizado por 3 minutos. Foi realizada uma nova filtração e a solução recolhida teve seu volume medido em proveta. A este volume, foram acrescentados 25% em relação ao volume final, de solução de KCl (cloreto de potássio), numa concentração de 0,88% e agitado posteriormente. Após a separação das fases, a porção superior foi aspirada à vácuo e à porção inferior, foram adicionados 25% em relação ao volume residual, de uma solução de metanol e água na

proporção de 1:1 (v/v), sendo agitado novamente. A fase superior foi novamente aspirada e a fase inferior foi filtrada em sulfato de sódio anidro, com a finalidade de se retirar resíduo de água. Após este procedimento, o filtrado foi evaporado sob vácuo, em rotaevaporador e ressuspenso em 2mL de clorofórmio.

4.7.2 - Esterificação de ácidos graxos

A preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos foi realizada de acordo com o método oficial preconizado pela AOCS (método Ce 2-66, 1998).

4.7.3 - Dietas

Tanto a extração de ácidos graxos como a esterificação foram realizadas utilizando os mesmos métodos para tecidos.

4.7.4 - Determinação do perfil de ácidos graxos por cromatografia a gás

Após a esterificação dos ácidos graxos, os vials contendo amostras foram inseridos em um cromatógrafo a gás, GC 17 A Shimadzu/ Class GC 10 sob as seguintes condições: coluna cromatográfica de sílica fundida SP-2560 (biscianopropil polisiloxana) de 100 m e 0.25 mm. de d.i.; temperatura da coluna: isotérmico a 180°C por 75 min.; Temperatura do vaporizador: 250°C; Temperatura de detector de ionização de chama : 300°C; Gás de arraste: Hélio (1 ml/min.); Razão de divisão da amostra no injetor = 1/50 padrão e 1/100 amostras.

4.8 - PREPARO DE TECIDOS – CÉREBRO, FÍGADO E PLASMA

4.8.1 - Cérebro – após a retirada do cérebro perfundido, o mesmo foi pesado e 1g do órgão foi retirado e homogeneizado em Potter-Elvehjem, utilizando tampão fosfato a 0,1M, pH 7,0. O volume de tampão foi igual a quatro vezes o peso do órgão. O homogenato foi centrifugado a 3.500 rpm (1.010 x g) por 20 minutos, a 4° C e o sobrenadante reservado para avaliação da peroxidação lipídica. Foi também retirado 1mL do sobrenadante e submetido a nova centrifugação a uma velocidade de 10.500 rpm (11.000 x g) por 15 minutos a 4° C, com a finalidade de ser utilizado na determinação da atividade de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase).

4.8.2 - Fígado – o processamento do fígado foi realizado de forma semelhante a do cérebro, com a ressalva de que ao invés de se utilizar o volume de tampão igual a

quatro vezes o peso do fragmento retirado (neste caso, 1g), foi utilizado um volume igual a três vezes o peso do fragmento. Após a segunda centrifugação a 10.500 rpm, foi retirada uma alíquota de 1mL do sobrenadante e submetido a nova centrifugação desta vez a 30.000 rpm, por uma hora, a 4° C, sendo assim possível obter a fração citosólica para determinação da atividade das mesmas enzimas antioxidantes.

Tanto para fígado quanto para cérebro, o homogenato extraído para análise de peroxidação lipídica, foi armazenado em ultra freezer a -80° C.

4.8.3 - Plasma – o sangue coletado, foi recolhido em tubos de centrifuga contendo anticoagulante e foram centrifugados a 4.000 rpm por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante coletado (plasma), foi armazenado em ultra freezer a -80° C.

4.8.4 - Análise de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) – medida de lipoperoxidação

Para a análise de peroxidação lipídica através do método TBARS, foram tomados 300µL do homogenato de cérebro ou fígado, obtido segundo descrição nos itens 4.8.1 e 4.8.2. A esses 300µL, foram adicionados 200µL de tampão fosfato a 0,1M, pH7,0 e homogeneizados. A esta diluição, foram adicionados 500µL de solução de ácido clorídrico (HCl) a 25% (v/v), 500µL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 1% (p/v) em solução de NaOH a 0,05M e 45µL de solução de BHT a 2%, em etanol. Os tubos contendo esta mistura, foram homogeneizados, tampados e levados a banho fervente por 10 minutos, sendo submetidos imediatamente a banho de gelo. Após resfriamento, foram adicionados 1,5ml de n-butanol, sendo homogeneizado e centrifugado a 4.000rpm, por 10 minutos, a 4° C. A fase superior foi coletada após centrifugação e submetida a análise espectrofotométrica a 532nm. As leituras foram determinadas em triplicata e o aparelho calibrado com um “branco” contendo apenas n-butanol.

A curva padrão foi feita a partir de uma solução de 1,1,3,3- tetrametoxipropano (TEP) a uma concentração de 6×10^{-6} mol/L e os resultados expressos em µMol de equivalentes de MDA/mg de proteína.

Para análise de peroxidação no plasma, a metodologia foi a mesma.

O método utilizado foi descrito por WINTERBOURN, GUTTERIDGE e HALLIWELL (1985).

4.8.5 - Atividade de enzimas antioxidantes – fração citosólica cérebro e fígado

Após 14 dias do sacrifício dos animais, foram realizadas as determinações da atividade de enzimas antioxidantes específicas no tecido hepático e cerebral. Foi utilizada a fração citosólica, como descrita anteriormente nos itens 4.9.1 e 4.9.2.

4.8.5.1 - Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

Para determinação da atividade da SOD, o meio de reação foi composto por Citocromo C (100 μ M), Xantina (500 μ M), EDTA (1mM) e KCN (200 μ M) em tampão fosfato de potássio a 0,05M (pH7,8). O volume de Xantina oxidase (0,6 unidades/mg de proteína), determinada através de um “branco”, foi o último item adicionado. Em uma cubeta de quartzo, foi inicialmente adicionado 1mL do meio, 15 μ L da fração citosólica de cada tecido e o volume determinado de Xantina oxidase. A medição foi feita em duplicata a 550nm, a 25° C.

O fundamento baseia-se na produção dos ânions peróxidos produzidos pela Xantina oxidase na presença de Xantina. O ânion superóxido oxida o Citocromo C, gerando um aumento da densidade ótica a 550nm, a 25° C.

Os resultados são expressos em U/mg de proteína.

A unidade U, pode ser descrita como a atividade da enzima que promove 50% de inibição da reação da Xantina nas condições citadas.

O método utilizado foi descrito por McCord e Fridovich (1969).

4.8.5.2 - Atividade da Catalase (CAT)

O meio de reação para a atividade da catalase, é composto por peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 10mM (obtidos a partir de 10 μ L de peridrol 30% em 10mL de H₂O miliQ) em tampão Tris HCl 1M EDTA 5mM (pH8,0). Para compor a reação, foram utilizadas duas alíquotas dos homogenatos, 15 μ L e 20 μ L, completados com 985 μ L e 980 μ L, respectivamente. Foram incubadas a 37° C para a posterior leitura a 230nm, com decréscimo da densidade ótica.

Os resultados são expressos em U/mg de proteína, onde U corresponde a atividade da enzima que promove a hidrólise de 1 μ mol de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por minuto, a 37° C em pH8,0.

O método utilizado foi descrito por Beutler (1975).

4.8.5.3 - Atividade da Glutathione redutase (GR)

Para a determinação da atividade da GR, que tem como função catalisar a redução da GSSG através da oxidação do NADPH, utiliza-se um meio de reação composto por tampão fosfato 0,1M (pH7,0), NADPH (20mM), GSSG 0,1M (glutathione oxidada) EDTA 5mM.

Foram tomados 50 μ L da amostra, aos quais foram adicionados a 970 μ L do meio, ficando incubados a 30° C, em cubetas de quartzo. O procedimento foi realizado em duplicata. A leitura de absorbância foi realizada em espectrofotômetro, a 340nm.

O fundamento desta técnica foi descrito por Sies *et al* (1979).

4.8.5.4 - Atividade da Glutathione peroxidase (GPx)

É um método que mensura o decréscimo da densidade ótica a 340nm, devido a oxidação do NADPH a 30° C, durante a redução da glutathione oxidada (GSSG), catalisada pela GR.

Para promover o meio de reação, foi utilizada glutathione reduzida (GSH), NADPH (20mM), GR (0,1U/mL), EDTA 5mM (pH7,0) e tampão fosfato de potássio 0,1M (pH7,0).

A 1mL deste meio, foram acrescentados 10 μ L da amostra, incubando esta solução a 30° c, por um minuto. Posteriormente, foram adicionados 10 μ L de peróxido de terc-butila (0,5mM), incubando novamente a solução para realização das leituras.

Os resultados são expressos em U/mg de proteína, onde U refere-se a atividade da enzima que oxida 1 μ mol de NADPH por minuto nas condições definidas.

O método foi descrito por Sies *et al* (1979).

4.8.6 - Determinação de proteínas dos tecidos

Para se determinar o conteúdo de proteínas nos tecidos cerebral, hepático e plasmático, foi realizado o método de Bradford (1985).

O método consiste diluir a amostra utilizada tanto para MDA quanto utilizadas na atividade enzimática, em tampão fosfato (100x para fígado e cérebro e 50x para plasma). A esta amostra diluída, foram adicionados 900 μ L de H₂O miliQ e 100 μ L da solução de Bradford. É realizada a leitura da absorbância a 595nm, em triplicata.

Para auxiliar a determinação da concentração de proteínas, foi feita uma curva padrão de albumina.

4.8.7 - CEA – Coeficiente de Eficácia Alimentar

O CEA é determinado a partir da seguinte fórmula:

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

Para a obtenção desses dados, tanto os animais quanto os restos das dietas foram pesados.

4.8.8 - Estatística

A análise estatística foi feita utilizando o software Prisma 4.0, sendo realizados testes ANOVA, aplicando-se posteriormente Tukey, para comparação concomitante de todos os dados, com índice de significância menor que 0,05 ($p < 0,05$).

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Composição centesimal das dietas

Tabela 2. Composição centesimal das dietas ofertadas

	Dietas		
	C	DNSP	DM
Proteína	22,00	12,30±0,18 ^a	13,30±0,22 ^a
Lipídeos	5,00	29,20±0,02 ^a	38,50±0,01 ^b
Carboidratos	Não informado	55,40±0,10 ^a	42,48±0,11 ^b
Cinzas	0,80	0,80±0,01 ^a	0,85±0,01 ^b
Fibra alimentar total	Não informado	3,10 ^a	5,72 ^b

^{a, b} Médias na mesma linha, seguida por letras diferentes, diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% ($p < 0,05$)

OBS.: realizado teste "t" somente entre as dietas DNSP e DM.

De acordo com Levy-Costa (2005), há uma adequação no consumo de macronutrientes na disponibilidade alimentar domiciliar. Cerca de 59,6% das calorias totais provêm de carboidratos, 12,8% de proteínas e 27,6% de lipídeos. Isso evidencia adequação pela população nacional, o que pode ser demonstrado na tabela 1, de acordo com percentuais apresentados na dieta DNSP. O que se destaca, desconsiderando os dados da dieta comercial, é o elevado percentual de lipídeos na dieta DM (38,5%). Há o relato de que aproximadamente 37% das calorias consumidas pelos gregos são provenientes de lipídeos (SIMOPOULOS, 2001).

5.2 - Atividade antioxidante das dietas

Para avaliação da atividade antioxidante *in vitro* das dietas, foram realizados dois ensaios: teste de varredura do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e a avaliação da cooxidação β -caroteno/ácido linoléico.

Os resultados obtidos no ensaio de varredura do radical DPPH, relativo a cada dieta, podem ser vistos no gráfico 1.

Gráfico1. Percentual de varredura dos extratos das dietas, de acordo com o ensaio do DPPH ($p < 0,05$).

Já os resultados da cooxidação β -caroteno/ácido linoléico estão demonstrados no gráfico 2.

Gráfico2. Percentual de proteção das rações, de acordo com o método de cooxidação do β - caroteno/ácido linoléico ($p < 0,05$)

O método de cooxidação β -caroteno/ácido linoléico é um método realizado em meio aquoso e mede a porcentagem de proteção da oxidação do ácido linoléico.

O ensaio do DPPH mede justamente a capacidade de estabilização de um radical pré-formado por compostos oxidáveis presentes no meio.

Os dois testes foram utilizados por serem considerados complementares. Mesmo assim, pode haver uma correlação inversa quando se aplica os dois métodos em uma mesma amostra (TEPE e SOKEMAN, 2007).

Kanatt, Chander e Sharma (2007) ao analisarem atividade antioxidante do extrato de menta, não encontraram uma correlação positiva entre os dois ensaios. Entretanto, a capacidade antioxidante do extrato de menta foi comprovada ao ser comparada com BHT.

Ao analisarmos os principais constituintes da dieta mediterrânea, pudemos notar que são fontes em potencial de antioxidantes e outros fitoquímicos. Como dito antes, a dieta mediterrânea, especificamente a grega, é um modelo de conduta alimentar. Vários estudos têm mostrado que essa população possui uma alta expectativa de vida e um menor risco de ser acometida por enfermidades crônicas não transmissíveis (CHRYSOHOOU *et al.*, 2004).

Alguns dos componentes característicos da dieta mediterrânea são componentes funcionais. Nozes são ricas em flavonóides, isoflavonóides. Vegetais compõem a mais importante fonte de compostos fenólicos. As frutas também provêm fibras, bem como vitaminas, minerais, flavonóides e terpenos, os quais proporcionam proteção contra o estresse oxidativo. Além disso, o azeite de oliva virgem é conhecido por ter altos níveis de ácidos graxos monoinsaturados e é uma boa fonte de fitoquímicos como compostos fenólicos (tirosol, hidroxitirosol e oleuropeína). Vinho e outros derivados de uva exercem um papel vasodilatador, estimulando atividade do óxido nítrico. Sob condições experimentais, o resveratrol exerceu proteção e efeitos positivos sobre a função endotelial (FITÓ, 2007; ORTEGA, 2006).

O azeite de oliva virgem é descrito como a principal fonte de lipídeos na dieta mediterrânea, além de conter cerca de trinta compostos fenólicos, sendo os principais a oleuropeína, o tirosol e hidroxitirosol. O hidroxitirosol é sintetizado a partir de moléculas de oleuropeína, sendo esta o principal composto fenólico de azeitonas. Esses compostos vêm sendo extensivamente associados à atividade antioxidante, redução no risco de doenças cardiovasculares e menor incidência de alguns tipos de cânceres. É citado que hidroxitirosol pode "varrer" radicais peroxil próximos à superfície da membrana enquanto que a oleuropeína atua na cadeia de propagação lipídica (TUCK e HAYBALL, 2002).

Briante, Febbraio e Nucci (2003) pesquisaram a atividade antioxidante de compostos de baixo peso molecular presentes no azeite extra virgem de oliva e em

seus subprodutos e encontraram uma atividade antioxidante tão alta, podendo ser comparada a do ácido ascórbico e do trolox.

Em cultura de células, Carluccio *et al* (2003) demonstraram a inibição de VCAM-1 (molécula de adesão celular vascular) e adesão de monócito, sendo o hidroxitirosol e a oleuropeína, os fitoquímicos mais potentes na redução dessas moléculas. Um papel antiinflamatório mais eficiente da oleuropeína aglicona pode ser devido a sua característica lipofílica, possibilitando assim maior sua incorporação e interação com outros lipídeos da membrana celular.

Marrugat *et al* (2004) realizando estudos em humanos, observaram uma associação entre consumo de azeite de oliva e a redução de LDL oxidada, além do aumento na resistência da molécula de LDL a oxidação. Também foi observado um aumento no em HDL colesterol após a administração de azeite de oliva virgem.

Puel *et al* (2004) estudando ratas ovariectomizadas apresentando osteopenia exarcebada, demonstraram que a oleuropeína e o azeite extra virgem foram eficazes para provocar efeitos protetores sobre perda óssea.

Covas (2007) listou em sua revisão inúmeros estudos onde vários benefícios do consumo de azeite de oliva são mencionados.

Em relação ao vinho, outro alimento fortemente vinculado aos benefícios da dieta mediterrânea, vem-se estudado a sua ligação com a redução e mortalidade ocasionada com doenças cardiovasculares. Este efeito benéfico do vinho tem sido atribuído ao conteúdo de compostos fenólicos, os quais são conhecidos antioxidantes. Os polifenóis do vinho os quais contribuem para sua cor e outras características sensoriais compreendem flavonóides e não flavonóides. Flavonóides incluem flavonóis (como a quercitina), flavan-3-ols (como a catequina), antocianinas (como malvidin-3-glicosídeo) e proantocianinas (como polímeros de polihidroxí flavan-3-ol). Dentre os não flavonóides podem ser citados o estilbeno, ácidos hidroxicinâmico e hidroxibenzóico (CIMINO *et al*, 2007).

Paixão *et al* (2007) avaliando a atividade antioxidante de vinhos e fenólicos totais, demonstraram a elevada correlação entre os dois parâmetros. Ao serem aplicados em ensaios utilizando radicais como DPPH e ABTS, os vinhos apresentaram expressiva atividade antioxidante.

Femia *et al* (2005) trabalhando com ratos puderam observar a supressão de adenomas no cólon, após administração de compostos fenólicos de alto peso molecular presentes no vinho.

Em relação aos estudos de atividade antioxidante de componentes da dieta nacional, Hassimoto, Genovese e Lajolo (2005), utilizando o método de cooxidação β -caroteno/ácido linoléico, estimaram valores entre 40% e 90% de proteção de extratos de vegetais e frutas nacionais congeladas.

Andrade-Wartha (2007), administrando extrato aquoso de caju, numa concentração de 120mg/kg de peso animal, observou elevação da atividade de enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx). Também foi observada atividade antioxidante de frações de ácidos fenólicos presentes no extrato bruto e no bagaço do caju.

A dieta DNSP, mesmo apresentando quantidades inferiores de hortaliças e frutas em relação à dieta DM, apresentou percentuais antioxidantes nos testes *in vitro* próximos ou até mesmo superiores.

5.2.1 - Fenólicos totais - método Folin Ciocalteau

Tabela 3 Quantidade de fenólicos totais, em equivalente de ácido gálico

	Dietas		
	C	DNSP	DM
Fenólicos totais (mg/100g)	11,79 $\pm$ 0,01 ^a	30,70 $\pm$ 0,00 ^b	37,90 $\pm$ 0,00 ^c

^{a, b, c} Médias na mesma linha, seguida por letras diferentes, diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% ($p < 0,05$)

Tabela 3 mostra os resultados obtidos na mensuração da quantidade de fenólicos totais.

Saura-Calixto, analisando conteúdo total de fenólicos de *pool* de frutas e vegetais, estimou em média 538mg/100g e 287mg/100g, respectivamente. Ao compararmos com os resultados obtidos nesse estudo, observamos uma considerável discrepância. Daí, infere-se que matrizes mais complexas podem não apresentar compostos redutores disponíveis além de fenólicos, os quais contribuem para contabilização de fenólicos totais através desse método. O fato do reagente de Folin-

Ciocalteau reagir com demais compostos redutores, demonstra uma limitação do método, o que poderia superestimar o total de fenólicos em matrizes isoladas.

Segundo Serrano, Goñi e Saura Calixto (2007), a avaliação de matrizes isoladas deve ser limitada, porque os métodos *in vitro* nem sempre estimam o sinergismo que ocorre entre compostos antioxidantes, mesmo em pequenas quantidades.

A questão da biodisponibilidade de compostos fenólicos não pode ser desconsiderada, visto que ainda permanece indefinida e sabemos que polifenóis são muito mais complexos do que se imagina (CHEYNIER, 2005).

5.3 - ENSAIO BIOLÓGICO EM RATOS

5.3.1 - Peso, consumo de ração e Coeficiente de Eficácia Alimentar (CEA)

Tabela 4. Dados de peso, consumo de ração e CEA

	Dietas		
	C	DNSP	DM
Peso final (g)	138,07±10,71 ^a	122,63±8,82 ^a	123,74±21,29 ^a
Consumo médio final (g)	646,93±72,47 ^a	468,78±53,02 ^b	402,85±34,76 ^c
CEA	0,21±0,02 ^a	0,26±0,02 ^b	0,31±0,07 ^c

^{a, b, c} Médias na mesma linha, seguida por letras diferentes, diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% ($p < 0,05$)

Na tabela 4 podem ser vistos os dados obtidos através do monitoramento do peso dos animais e do consumo de ração para a obtenção do CEA.

O coeficiente de eficácia alimentar (CEA) nos dá o ganho de peso proporcional à quantidade de ração consumida. Além do mais, fornece a eficácia de dietas na manutenção corporal do animal e indiretamente, um parâmetro na influência de intervenções paralelas.

Os resultados obtidos indicam que, de modo proporcional, os animais alimentados com dieta DM obtiveram um maior ganho de peso em relação à quantidade consumida. Correlacionando com a composição centesimal das dietas, a presença de

um elevado percentual de lipídeos eleva a densidade energética e o mesmo parâmetro favorece a saciedade, já que dietas ricas em lipídeos possuem um esvaziamento gástrico mais lento.

5.3.2 - Composição de ácidos graxos (AG) das dietas e tecidos animais

Os lipídeos dietéticos constituem uma importante fonte de energia. A cada grama de lipídio, são atribuídas 9kcal, enquanto que cada grama de proteína ou carboidrato equivale a 4kcal.

Em sistemas biológicos, além de fonte energética, eles desempenham importantes funções como constituição de membranas, transportadores de vitaminas lipossolúveis, precursores hormonais e até mesmo como sinalizadores celulares (EL-BRADY, GRAF e CLAVEIN, 2007).

Os ácidos graxos, divididos em suas categorias, podem desempenhar diferentes papéis dentro de um contexto biológico.

Na tabela 5 estão apresentados os dados referentes à composição de ácidos graxos nas dietas, divididos por categoria geral. Pode-se observar a predominância de ácidos graxos mono e poliinsaturados, visto que os óleos (soja e azeite de oliva extra virgem) compuseram as principais fontes lipídicas nas dietas, com predominância de ácido graxo linoléico (C18:2 ω 6) tanto na ração controle quanto na ração DNSP e ácido graxo oléico (C18:1 ω 9) na ração DM.

Não se pode ignorar o elevado percentual de gorduras saturadas, as quais podem apresentar forte relação com doenças cardíacas. Estudos vêm demonstrando que o decréscimo na ingestão de gorduras saturadas e não somente o decréscimo do total de lipídeos consumidos, diminui o colesterol total e LDL colesterol. Os ácidos graxos mais abundantes nos alimentos são o ácido palmítico e esteárico, que foram evidenciados no perfil das dietas (CHONG, 2006).

Tabela 5. Porcentagem dos principais AG nas dietas, divididos por classe.

AG (%)**	Dietas		
	C	DNSP	DM
Saturados			
C16:0	14,71 ± 0,57 ^a	18,93 ± 0,17 ^b	16,24 ± 0,02 ^c
C18:0	2,69 ± 0,11 ^a	8,66 ± 0,22 ^b	6,88 ± 0,06 ^c
TOTAL	17,40 ± 0,34 ^a	27,59 ± 0,20 ^b	23,12 ± 0,04 ^c
Monoinsaturados			
C18:1	25,66 ± 1,41 ^a	27,9 ± 0,31 ^b	59,53 ± 0,42 ^c
TOTAL	25,66 ± 1,41 ^a	27,9 ± 0,31 ^b	59,53 ± 0,42 ^c
Polinsaturados			
C18:2	50,38 ± 0,07 ^a	31,62 ± 0,11 ^b	7,63 ± 0,07 ^c
C18:3	3,88 ± 0,04 ^a	3,13 ± 0,02 ^b	0,75 ± 0,00 ^c
Trans	0,0	1,68 ± 0,11 ^a	1,81 ± 0,01 ^b
TOTAL	54,26 ± 0,06 ^a	36,43 ± 0,08 ^b	10,19 ± 0,03 ^c

ni* - não identificados

^{a, b, c} Médias na mesma linha, seguida por letras diferentes, diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% (p<0,05)

** Resultados expressos em média e desvio padrão

Tanto o ácido graxo linoléico quanto α -linolênico, ambos poliinsaturados, não podem ser sintetizados pelo organismo e, portanto, devem ser ingeridos. (EL-BRADY, GRAF, CLAVEIN, 2007).

A presença desses ácidos graxos é desejável já que os mesmos estão relacionados com síntese de membrana, redução do colesterol total plasmático, correlação inversa com doenças cardiovasculares, podem ser precursores de outros ácidos graxos de suma importância, como o DHA, e também precursores de eicosanóides que poderão atuar evitando agregação plaquetária e tendência à trombose (RUXTON et al, 2007).

Estima-se que a razão entre os ácidos graxos $\omega 6$ e $\omega 3$ na dieta, para que possam desempenhar suas funções biológicas, seja entre 5-10:1 (FAO, 1994). Nas dietas DNSP e DM, a proporção encontrada foi de 10:1.

Nota-se a presença de ácidos graxos *trans* nas dietas do grupo DNSP e DM, como descrito na tabela 6. Ácidos graxos *trans* são produzidos através da hidrogenação parcial de óleos vegetais utilizados na indústria de alimentos e em menor escala, produtos originados de animais ruminantes. Estudos clínicos demonstraram que os ácidos graxos *trans* agem sobre as lipoproteínas, aumentando os teores de LDL colesterol e reduzindo a HDL colesterol. Tais efeitos são potenciais fatores de risco para a saúde cardiovascular. Os isômeros *trans* também podem ser incorporados pelos tecidos e metabolizados de maneira semelhante aos ácidos graxos de configuração *cis*, competindo inclusive pelos mesmos sistemas enzimáticos envolvidos na síntese de ácidos graxos polinsaturados e eicosanóides (SABARENSE e MANCINI FILHO, 2003).

Já se sabe há muito tempo que a dieta pode influenciar na composição das frações lipídicas plasmáticas e contribuir para o desenvolvimento da aterosclerose. Alguns fatores dietéticos têm influenciado na concentração de colesterol plasmático total. O mais importante de todos esses fatores são os lipídeos da dieta e sua composição em ácidos graxos. Dietas ricas em ácidos graxos insaturados têm sido associadas ao decréscimo da concentração do colesterol plasmático, enquanto que altas ingestões de gorduras saturadas têm sido correlacionadas com aumento do colesterol plasmático, concomitante com elevação do risco de doenças cardiovasculares em humanos. O ácido graxo polinsaturado encontrado em maior quantidade é o ácido linoléico. Ele foi classificado como um agente hipocolesterolêmico. Já o efeito do ácido graxo α -linolênico pode ser hipotrigliceridêmico, além de outras funções associadas de ambos (AL-OTHMAN, 2000; UAUY e VALENZUELA, 2000).

Portanto, ao correlacionarmos os dados do perfil de ácidos graxos das dietas ofertadas com as frações lipídicas plasmáticas, podemos observar que não há alterações ou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre elas (tabela 6). Dados similares, após administração de dieta mista a ratos, foram encontrados por Al-Othman (2000).

A razão entre LDL/HDL, pode estar associada com o aumento do risco de doenças cardiovasculares. Por este motivo, esta razão é provavelmente o melhor

marcador para estimar os efeitos de ácidos graxos *trans* sobre lipídeos plasmáticos, os quais são mais relevantes à incidência e mortalidade ocasionada por doenças cardiovasculares (ASCHERIO, 2006).

Outra questão a ser considerada é o alto percentual de lipídeos totais observado nas dietas DNSP e DM, quando correlacionados com o lipidograma. Mesmo apresentando percentuais diferentes de lipídeos totais, não foi suficiente para alterar de modo expressivo o lipidograma, talvez por terem em comum uma elevada quantidade de PUFA's.

É válido ressaltar que o lipidograma da dieta controle, a qual não possui ácidos graxos *trans*, não diferiu das demais dietas.

Tabela 6. Frações lipídicas plasmáticas (mg/dl)

Frações lipídicas**	Animais		
	C	DNSP	DM
Triacilglicerol	36,02±12,3 ^a	46,48±19,12 ^a	46,95±20,42 ^a
Colesterol total	68,39±7,89 ^a	74,47±11,19 ^a	72,43±10,19 ^a
HDL	29,33±5,04 ^a	30,32±3,57 ^a	28,22±5,25 ^a
LDL	39,06±5,26 ^a	44,15±10,91 ^a	44,21±8,27 ^a
LDL/HDL	1,35±0,25 ^a	1,48±0,46 ^a	1,61±0,40 ^a

^{a, b, c} Médias na mesma linha, seguida por letras diferentes, diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% (p<0,05)

** Resultados expressos em média e desvio padrão

Quando analisados de um modo geral, por classes, nos tecidos hepático, cerebral e plasmático, há a prevalência de ácidos graxos insaturados, assim como nas dietas, com diferenças significativas entre eles (tabelas 7, 8 e 9). Ácidos graxos podem ser incorporados por tecidos, mas com uma taxa ainda indefinida. Não se trata de uma relação linear (LOÏ et al, 2000).

Ácidos graxos *trans*, quando encontrados em tecidos de ratos como no presente estudo, foram incorporados da dieta, já que esses animais não possuem a capacidade de sintetizá-los (SABARENSE e MANCINI FILHO, 2003).

Já que ácidos graxos *trans* são provenientes de óleos vegetais parcialmente hidrogenados utilizados na indústria e também de produtos originados de animais ruminantes, a presença de biscoitos, bolos, massas prontas e carnes como a de

cordeiro e bovina nas dietas, explica a detecção desses ácidos graxos também em tecidos, já que os mesmos podem ser incorporados.

Tabela 7. Porcentagem dos principais AG, no fígado.

AG (%)**	Animais		
	C	DNSP	DM
Saturados			
C16:0	17,85 ± 0,72 ^a	18,09 ± 0,59 ^a	17,51 ± 0,99 ^a
C18:0	17,08±2,00 ^a	15,92 ± 1,48 ^{ab}	14,10 ± 2,36 ^b
TOTAL	34,93 ± 1,36 ^a	34,01± 1,04 ^{ab}	31,61 ± 1,68 ^b
Monoinsaturados			
C18:1	11,08 ± 4,42 ^a	13,05 ± 7,58 ^a	29,41 ± 5,78 ^b
TOTAL	11,08 ± 4,42 ^a	13,05 ± 7,58 ^a	29,41 ± 5,78 ^b
Polinsaturados			
C18:2	19,94 ± 2,77 ^a	22,77 ± 2,04 ^b	11,08 ± 0,72 ^c
C18:3	0,50±0,14 ^a	0,84±0,20 ^b	0,21±0,07 ^c
C20:4	23,61± 3,93 ^a	15,42 ± 6,61 ^b	14,52 ± 2,8 ^b
C20:5	0,21±0,13 ^a	0,25±0,07 ^a	0,46±0,14 ^b
C22:5	0,59 ± 0,13 ^a	0,74 ± 0,07 ^b	0,40 ± 0,11 ^c
C22:6	3,96 ± 0,87 ^a	4,47 ± 0,68 ^a	6,29 ± 0,89 ^b
Trans	0,0	1,23 ± 0,22 ^a	0,71 ± 0,13 ^b
TOTAL	48,81 ± 1,14^a	45,72 ± 1,41^b	33,67 ± 0,69^c

ni* - não identificados

^{a, b, c} Médias na mesma linha, seguida por letras diferentes, diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% (p<0,05)

** Resultados expressos em média e desvio padrão

Tabela 8. Porcentagem de AG, no cérebro.

AG (%)**	Animais		
	C	DNSP	DM
Saturados			
C16:0	17,40 ± 1,34 ^a	19,36 ± 1,26 ^b	19,44 ± 0,74 ^b
C18:0	17,27 ± 1,39 ^a	19,35 ± 1,04 ^b	19,20 ± 0,48 ^b
TOTAL	34,67 ± 1,40 ^a	38,71 ± 1,15 ^b	38,64 ± 0,61 ^b
Monoinsaturados			
C18:1	21,80 ± 1,79 ^a	20,46 ± 0,83 ^a	20,22 ± 1,21 ^a
TOTAL	21,80 ± 1,79 ^a	20,46 ± 0,83 ^a	20,22 ± 1,21 ^a
Polinsaturados			
C18:2	1,75 ± 0,25 ^a	1,29 ± 0,27 ^{ab}	1,06 ± 0,37 ^b
C18:3	0,59 ± 0,38 ^a	0,0 ^b	0,0 ^b
C20:4	9,16 ± 1,02 ^a	10,39 ± 0,59 ^{ab}	10,91 ± 0,65 ^b
C20:5	0,0	0,0	0,0
C22:5	0,0	0,0	0,0
C22:6	10,10 ± 1,51 ^a	11,43 ± 0,45 ^{ab}	12,74 ± 1,15 ^b
Trans	0,0	0,0	0,0
TOTAL	21,60 ± 0,45 ^a	23,11 ± 0,19 ^{ab}	24,71 ± 0,31 ^b

^{a, b, c} Médias na mesma linha, seguida por letras diferentes, diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% (p<0,05)

** Resultados expressos em média e desvio padrão

A presença de DHA (ácido graxo docosahexaenóico - C22:6 ω 3) e EPA (ácido graxo eicosapentaenóico - C20:5 ω 3) em tecidos, mesmo estando ausentes ou em quantidades muito pequenas nas dietas que não permitiram a detecção através da metodologia utilizada, pode indicar biossíntese a partir do ácido graxo α -linolênico. Esses ácidos graxos (DHA e EPA) podem ser consumidos através de alimentos de origem marinha, principalmente carnes de peixes e óleo de peixe.

Tabela 9 Porcentagem de AG, no plasma.

AG (%)**	Animais		
	C	DNSP	DM
Saturados			
C16:0	19,96 ± 1,93 ^a	19,29 ± 0,97 ^a	19,90 ± 0,53 ^a
C18:0	12,16 ± 0,66 ^a	12,80 ± 0,91 ^a	10,85 ± 1,27 ^b
TOTAL	32,12 ± 1,30 ^a	32,09 ± 0,94 ^a	30,75 ± 0,90 ^a
Monoinsaturados			
C18:1	11,96 ± 1,39 ^a	13,37 ± 1,93 ^a	25,75 ± 2,03 ^b
TOTAL	11,96 ± 1,39 ^a	13,37 ± 1,93 ^a	25,75 ± 2,03 ^b
Polinsaturados			
C18:2	16,64 ± 1,03 ^a	18,57 ± 1,82 ^a	10,61 ± 0,74 ^b
C20:4	19,56 ± 2,74 ^a	17,00 ± 2,00 ^a	11,88 ± 2,59 ^b
C22:5	0,0	0,0	0,0
C22:6	1,64 ± 0,32 ^a	2,06 ± 0,20 ^a	2,96 ± 0,48 ^b
Trans	0,0	0,0	0,0
TOTAL	37,84 ± 0,82 ^a	37,63 ± 0,80 ^a	25,45 ± 0,76 ^b

^{a, b, c} Médias na mesma linha, seguida por letras diferentes, diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% (p<0,05)

** Resultados expressos em média e desvio padrão

Tecidos animais como o fígado e cérebro são capazes de promover alongamento e dessaturação de ácidos graxos essenciais, geralmente $\omega 3$ e $\omega 6$. A dessaturação competitiva de $\omega 3$, $\omega 6$ e $\omega 9$ por δ -6-dessaturase é de grande significado porque esse passo é controlado por interações de hormônios e dieta, incluindo a quantidade de ácido linoléico e ácido α -linolênico. Se ácidos graxos essenciais $\omega 3$ e $\omega 6$ estão ausentes, pode ocorrer um acúmulo de ácido graxo eicosatrienóico (C20:3 $\omega 9$), podendo este ser um marcador (UAUY e VALENZUELA, 2000).

Para a biossíntese do ácido araquidônico (C20:4 ω 6), há a participação da enzima δ -6 dessaturase, que apesar de ter maior afinidade com ácido graxo α -linolênico, na presença de grandes quantidades de ácido linoléico pode levá-la a participar mais ativamente da biossíntese de ácido araquidônico. O resultado é a inibição da via de síntese de EPA e DHA e possivelmente diminuição dos níveis plasmáticos desses ácidos graxos (RUXTON *et al*, 2007).

Eicosanóides derivado ω 6 são biologicamente ativos em pequenas quantidades. Em altas concentrações, contribuem para formação de trombos e o desenvolvimento de distúrbios inflamatórios, associados com produção de tromboxano A2 (TXA2), um potente agregador plaquetário e vasoconstrictor, e leucotrieno B4 (LTB4), um poderoso indutor de inflamação, aderência e quimiotaxia leucocitária. Na presença de EPA ou DHA, tromboxano A3 (TXA3), um fraco vasoconstrictor e agregador plaquetário está aumentado. Além do mais, DHA e EPA aumentam a concentração de prostaglandina 13(PG13), sem decréscimo de PG12 (ambos são vasodilatadores ativos e inibidores de agregação plaquetária (EL-BADRY, GRAF e CLAVIEN, 2007).

As tabelas 6, 7 e 8 apresentam valores de DHA presentes em todos os tecidos estudados. Apesar da diferença significativa, os grupos que receberam ração identificada como DNSP ou DM, apresentaram quantidades iguais ou maiores que o grupo controle. A discrepância entre a quantidade identificada nas dietas de DHA, EPA (os quais não foram identificados) e α -linolênico em relação à presença dos mesmos em tecidos, se deve ao fato de que o trabalho foi realizado com ratos recém-desmamados, com os tecidos em estudo totalmente formados, sendo o leite materno uma expressiva fonte de DHA, contribuindo para a formação desses tecidos, além de estarem circulantes no plasma (TINOCO *et al.*, 2007).

Infere-se, portanto, que a provável biossíntese de DHA foi satisfatória para a manutenção principalmente do tecido cerebral e hepático.

Além da relação com questões cardiovasculares e inflamatórias, EPA e particularmente o DHA, estão relacionados com composição de membranas e são importantes no desenvolvimento normal do cérebro, participando da estrutura de fosfolípidos. Acredita-se também que o DHA confere fluidez à membrana neuronal e ajuda a regular neurotransmissores (BOURRE *et al.*, 1989; RUXTON *et al*, 2007).

Ácidos graxos insaturados representam uma classe desses nutrientes que apresentam expressiva suscetibilidade à peroxidação lipídica. Sendo assim, ácidos graxos polinsaturados possuem uma vulnerabilidade ainda maior.

5.3.3 – TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico)

5.3.3.1 - Fígado

A avaliação de malonaldeído (MDA) tem sido extensivamente utilizada há décadas. Entre os diferentes métodos estabelecidos, a reação com 2-ácido tiobarbitúrico (TBA) é o mais amplamente usado. Os adutos formados durante a reação podem ser medidos por absorbância. Correlação entre predição de peroxidação lipídica e medida da concentração de TBARS sustentam o valor desse método (JENTZSCH, 1996).

Valores alterados de TBARS podem refletir alguma injúria sobre lipídeos de membranas, ocasionadas pela ação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, sendo os ácidos graxos polinsaturados os mais suscetíveis à peroxidação (KOTA, KRISHNA e POLASA, 2007).

No presente estudo, a única alteração observada após a oferta das dietas foi o aumento dos resultados de TBARS no fígado (gráfico 3).

Gráfico 3. Medida de lipoperoxidação do tecido hepático ($p < 0,05$)

^{a, b} Médias na mesma linha, seguidas por letras diferentes, diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% ($p < 0,05$)

É válido ressaltar que o método utilizado (TBARS) possui como limitante a capacidade de reação a outras substâncias que não o MDA, com o TBA, resultando em produtos que possam ter sua absorbância mensurada elevando, teoricamente, a concentração de TBARS (JENTZSCH, 1996).

Quando correlacionamos os dados de TBARS obtidos a partir do tecido hepático à composição de ácidos graxos insaturados do mesmo órgão, notamos que os mesmos com funções biológicas expressivas, como por exemplo, o DHA (ácido graxo docosahexaenóico), não apresentaram percentual diferente do controle, sendo que no grupo DM o valor apresentado foi maior que o valor do grupo controle.

Sendo assim, infere-se que a diferença obtida pode estar associada às limitações do método ou à oxidação de outros ácidos graxos polinsaturados como ácido araquidônico e ácido linoléico.

5.3.3.2 - Cérebro

O sistema nervoso é o órgão com a segunda maior concentração de lipídeos, sendo a primeira, o tecido adiposo. Os lipídeos constituintes são basicamente estruturais de membranas celulares, não participando do metabolismo energético. Por essa razão, é necessário assegurar que o cérebro receba um aporte adequado de nutrientes, especialmente lipídeos. É bem conhecido que ácidos graxos polinsaturados da dieta influenciam na composição de ácidos graxos da membrana e que eles são particularmente importantes para o desenvolvimento cerebral normal (BOURRE, 1989).

Sendo este tecido rico em ácidos graxos mais suscetíveis à oxidação, qualquer injúria sofrida ou um aporte inadequado de nutrientes, poderia favorecer um decréscimo de ácidos graxos estruturais. Na presença de oxidação e formação de compostos indicando esse processo, pode haver a determinação da mesma por métodos como o TBARS.

Neste trabalho, não houve uma alteração na mensuração de TBARS, no tecido cerebral, em relação ao grupo controle, como mostra o gráfico 4.

Gráfico 4. Medida de lipoperoxidação do tecido cerebral ($p < 0,05$)

^a. Médias na mesma linha, seguida por letras iguais, não diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% ($p < 0,05$)

Sendo o cérebro um órgão que utiliza altas taxas de oxigênio e possuir naturalmente uma baixa capacidade antioxidante, qualquer desajuste nesse sentido pode incidir em alguma injúria, sendo este órgão um bom alvo para se avaliar o impacto da atividade antioxidante de compostos (VASCONCELOS *et al*, 1999).

5.3.3.3 - Plasma

A parte líquida do sangue forma o plasma, o qual é formado por cerca de 90% de água, onde estão dissolvidas diversas substâncias, entre elas os antioxidantes (BAYNES e DOMINICZAR, 2000).

Conforme apresentado no gráfico 5, grupo DM apresentou concentração de TBARS similar ao grupo controle, enquanto que o grupo DNSP, inferior aos demais grupos. Isso se deve, talvez, a presença de substâncias antioxidantes que são capazes de neutralizar hidroperóxidos produzidos, já que a dieta DNSP apresentou maior proteção à oxidação em relação às demais, pelo ensaio de cooxidação do β -caroteno/ácido linoléico.

Em um estudo realizado em humanos, Netzel *et al* (2001) observaram que a ingestão de 400mL de suco de frutas rico em antioxidantes por indivíduos saudáveis, reduziu em 18% o nível de MDA plasmático após quatro semanas de suplementação.

Gráfico 5. Medida de lipoperoxidação do tecido plasmático ($p < 0,05$).

^{a, b, c} Médias na mesma linha, seguida por letras diferentes, diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% ($p < 0,05$)

Já Choi e Hwang (2005) ao administrarem extratos de plantas medicinais na dose de 0,2g/Kg de peso corporal a ratos, observaram um decréscimo significativo na concentração de MDA no plasma dos animais.

Mesmo a dieta DM não diferiu do grupo controle, podendo estar demonstrando assim nível de normalidade em TBARS e no potencial antioxidante de compostos presentes no plasma.

5.3.4 - Atividade de enzimas antioxidantes

Como descrito anteriormente, as enzimas antioxidantes constituem uma importante parte na defesa dos organismos aeróbios contra a atuação de ERO's, bem como na prevenção e reparo dos danos moleculares gerados em várias situações. Essas enzimas formam um grupo que tem como característica estagnar o processo de propagação em cadeia dos danos ocasionados por ERO's. Elas são denominadas enzimas de detoxificação, constituindo uma segunda linha de defesa (GENESTRA, 2007; JOHNSON, 2002).

Os resultados encontrados nesse estudo, revelaram somente uma alteração na GPx no tecido hepático, nos grupos DNSP e DM (gráficos 6C). Tanto catalase como GPx têm como função detoxificar H_2O_2 . Correlacionando com demais dados (TBARS e

perfil de ácidos graxos), num contexto geral, houve a preservação de uma importante linha de defesa do organismo e isso pode ser mais evidenciado nas enzimas do tecido cerebral, órgão que por natureza, estaria mais suscetível a essas alterações que o próprio fígado (gráficos 7A, 7B, 7C e 7D) (BALU *et al*, 2005).

Mesmo a atividade da GPx estando alterada, mostrando-se reduzida no grupo DNSP e DM, a atividade da GSHR não foi afetada, já que está envolvida com a regeneração da GPx.

Alguns compostos podem alterar a atividade dessas enzimas, quando administrados isoladamente. Yeh e Yen (2003), após suplementarem com ácidos fenólicos sintéticos gentissico, gálico, *p*-cumárico e ferúlico, sem submetê-los a nenhum modelo de estresse, constatarem a elevação da atividade dessas enzimas.

Já Andrade-Wartha (2007) ao administrar extrato aquoso de caju nas concentrações de 80 e 240mg/Kg de peso corporal do animal (ratos machos recém desmamados normais), não percebeu elevação na atividade das referidas enzimas no tecido hepático.

Mas, num contexto onde se trabalha com matrizes muito mais complexas, essa relação pode ser um pouco mais delicada de ser feita.

Gráfico 6A. Atividade SOD, no tecido hepático ($p < 0,05$). Gráfico 6B. Atividade CAT, no tecido hepático ($p < 0,05$).

Gráfico6C. Atividade GPx, no tecido hepático($p<0,05$). Gráfico6D. Atividade GR, no tecido hepático ($p<0,05$).

Balu *et al* (2005) suplementando ratos jovens com extrato de semente de uva, não obteve potencialização da atividade de enzimas antioxidantes pesquisadas neste estudo.

Gráfico7A. Atividade SOD, no tecido cerebral ($p<0,05$). Gráfico7B. Atividade CAT, no tecido cerebral ($p<0,05$).

Gráfico7C. Atividade GPx, no tecido cerebral.

Gráfico7D. Atividade GR, no tecido cerebral.

Sendo uma matriz complexa, a ração pode conter elementos que quelam diretamente com ERO's e não necessariamente potencialize a atividade de enzimas antioxidantes. Iwai *et al* (2002) realizaram um ensaio biológico onde foi utilizado um fermentado de soja em ratos, sem indução de estresse oxidativo, alimentados por três semanas. Neste estudo, as enzimas não foram induzidas pelo fermentado. Porém, foi observada a produção de TBARS reduzida, sugerindo que o fermentado pudesse inibir a peroxidação lipídica no plasma e em outros tecidos e a oxidação da LDL colesterol, possuindo assim, uma ação antioxidante direta justamente por não ter havido a indução das enzimas antioxidantes. Resultados semelhantes foram encontrados no presente estudo.

As avaliações nutricionais e bioquímicas das dietas estudadas, focalizando os compostos fenólicos e os processos de inibição da oxidação, abre a perspectiva da realização de outros estudos visando, comparativamente, a influência dos mesmos sobre a longevidade e a incidência de quadros patológicos das enfermidades crônicas não transmissíveis.

6) CONCLUSÕES

- A Dieta Nacional São Paulo (DNSP) possui atividade antioxidante similar a um modelo de referência, Dieta Mediterrânea (DM).
- Mesmo contendo percentual de lipídeos considerável, as dietas manipuladas não promoveram alterações no lipidograma, indicando que a composição dos ácidos graxos pode interferir no mesmo.
- Nos tecidos estudados dos animais que receberam as dietas DNSP e DM foram observadas alteração nos valores de TBARS e na atividade de enzimas antioxidantes. Mesmo não potencializando a atividade de enzimas antioxidantes, as dietas DNSP e DM mantiveram um padrão de normalidade quando comparadas entre si, principalmente no tecido cerebral.
- Pelos resultados obtidos neste trabalho, pôde-se observar que a dieta DNSP apresentou-se equivalente a DM a qual tem sido destacada como também responsável pela longevidade e pela baixa incidência de enfermidades crônicas não transmissíveis na população.

7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBADI, A. Biosynthesis of very-long-chain polyunsaturated fatty acids in transgenic oilseeds: constraints on their accumulation. **Plant Cell**, v.16, p.2734-2748, 2004.

AFONSO, V.; CHAMPY, R.; MITROVIC, D.; COLLIN, P.; LOMRI, A. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. **Joint, Bone, Spine**, v.74, n.4, p.324-329, 2007.

AL-OTHMAN, A.A. Growth and lipid metabolism responses in rats fed different sources. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.51, p.159-167, 2000.

ANDRADE-WARTHA, E.R. **Propriedades antioxidantes de clones do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.):** efeito sobre a lipoperoxidação e enzimas participantes do sistema antioxidante de defesa do organismo animal. São Paulo, 2007. 134p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

ASCHERIO, A. Trans fatty acids and blood lipids. **Atherosclerosis Supplements**, v.7, p.25-27, 2006.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 16.ed. Arlington: AOAC, 1998. v.1.

BALU, M.; SANGEETHA, P.; HARIPRIYA, D.; PANNEERSELVAM, C. Rejuvenation of antioxidant system in central nervous system of aged rats by grape seed extract. **Neuroscience Letters**, v.383, n.3, p.295-300, 2005.

BAYNES, J.; DOMINICZAK, M.H. **Bioquímica médica**. São Paulo: Manole, 2000. 566p.

BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v.181, n.26, p.1199-1200, 1958.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Coordenação de Índice de Preços - *Título-Pesquisa de orçamentos familiares 2002-2003 [recurso eletrônico] : aquisição alimentar domiciliar per capita; Brasil e grandes regiões e unidades da Federação / IBGE. Coordenação de Índice de Preços -Imprensa-Rio de Janeiro : IBGE, c2004 -Descr Fis-1 CD-ROM : il., color ; 12 cm*

BOURRE, J.M.; FRANÇOIS, M.; YOUYOU, A.; DUMONT, O.; PICIOTTI, M.; PASCAL, G.; DURAND, G. The effects of dietary α -linolenic acid on the composition of nerve membranes, enzymatic activity, amplitude of electrophysiological parameters, resistance to poisons and performance of learning tasks in rats. **Journal of Nutrition**, v.119, n.12, p.1880-1892, 1989.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, n.1/2, p.248-254, 1976.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie**, v.28, p.25-30, 1995.

BRIANTE, R.; FEBBRAIO, F.; NUCCI, R. Antioxidant properties of low molecular weight phenols present in the Mediterranean diet. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.6975-6981, 2003.

CALDER, P.C. Long-chain n-3 fatty acids and inflammation: potential application in surgical and trauma patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36, n.4, p.433-446, 2003.

CARLUCCIO, M.A.; SICULELLA, L.; ANCORA, M.A.; MASSARO, M.; SCODITTI, E.; STORELLI, C.; VISIOLI, F.; DISTANTE, A.; DE CATERINA, R. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.23, n.4, p.622-629, 2003.

CASTRO-GONZALÉZ, M.I. Ácidos graxos omega3: beneficios y fuentes. **Interciencia**, v.27, n.3, p.128-136, 2002.

CHEYNIER, V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.81, p.223S-229S, 2005.

CHOI, E.M.; HWANG, J.K. Effect of some medicinal plants on plasma antioxidant system and lipid levels in rats. **Phytotherapy Research**, v.19, p.382-386, 2005.

CHONG, E.W.T.; SINCLAIR, A.J.; GUYMER, R. Facts on fats. **Clinical and Experimental Ophthalmology**, v.34, p.464-471, 2006.

CHRYSOHOOU, C.; PANAGIOTAKOS, D.B; PITSAVOS, C.; DAS UNDURTI, N.; STEFANADIS, C. Adherence to the Mediterranean diet attenuates inflammation and coagulation process in healthy adults: the ATTICA Study. **Journal of the American College of Cardiology**, v.44, n.1, p.152-158, 2004.

CIMINO, F.; SULFARO, V.; TROMBETTA, D.; SAIJA, A.; TOMAINO, A. Radical-scavenging capacity of several Italian red wines. **Food Chemistry**, v.103, n.1, p.75-81, 2007.

CLARO, R.M.; CARMO, H.C.E.; MACHADO, F.M.S.; MONTEIRO, C.A. Income, food prices, and participation of fruit and vegetables in the diet. **Revista de Saúde Pública**, v.41, n.4, p.557-564, 2007.

CORDENUNSI, B.R.; GENOVESE, M.I.; NASCIMENTO, J.R.O.; HASSIMOTTO, N.M.A.; SANTOS, R.J.; LAJOLO, F.M. Effects of temperature on the chemical composition and antioxidant activity of three strawberry cultivars. **Food Chemistry**, v.91, n.1, p.113-121, 2005.

COVAS, M.A. Olive oil and the cardiovascular system: review. **Pharmacological Research**, v.55, p.175-186, 2007.

CUEVAS, A.M.; GERMAIN, A.M. Diet and endothelial function. **Biological Research**, v.37, n.2, p.225-230, 2004.

DAY, A.J.; DUPONT, M.S.; RIDLEY, S.; RHODES, M.; RHODES, M.J.C.; MORGAN, M.R.A.; WILLIAMSON, G. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver β -glucosidase activity. **FEBS Letters**, v.436, n.1, p.71-75, 1998.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n.26, v.2, p.446-452, 2006.

EL-BRADY, A.M.; GRAF, R.; CLAVIEN, P.A. Omega3 - omega6: what is right for the liver? **Journal of Hepatology**, v.47, p.718-725, 2007.

European Food Availability Databank Based on Household Budget Surveys – The Data Food Networking (DAFNE) project - **DAFNE Publication**, v.I, 2000.

FEMIA, A.P.; CADERNI, G.; VIGNALI, F.; SALVADORI, M.; GIANNINI, A.; BIGGERI, A.; GEE, J.; PRZYBYLSKA, K.; CHEYNIER, V.; DOLARA, P. Effect of polyphenolic extracts from red wine and 4-OH-coumaric acid on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in rats. **European Journal of Nutrition**, v.44, n.2, p.79-84, 2005.

FITÓ, M.; GUXENS, M.; CORELLA, D.; SAEZ, G.; ESTRUCH, R.; DE LA TORRE, R.; FRANCES, F.; CABEZAS, C.; LOPEZ-SABATER, M.C.; MARRUGAT, J.; GARCIA-ARELLANO, A.; AROS, F.; RUIZ-GUTIERREZ, V.; ROS, E.; SALAS-SALVADO, J.; FIOL, M.; SOLA, R.; COVAS, M.-I. Effect of a traditional Mediterranean diet on lipoprotein oxidation: a randomized controlled trial. **Archives of Internal Medicine**, v.167, n.11, p.1195-1203, 2007.

FLORIDI, S.; MONTANARI, L.; MARCONI, O.; FANTOZZI, P. Determination of free phenolic acids in wort and beer by coulometric array detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.6, p.1548-1554, 2003.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids. **Journal of Biological Chemistry**, v.226, p.196-204, 1999.

FAO. Fat and oils human nutrition: report of a joint expert consultation. **FAO Food and Nutrition Paper**, v.57, p.i-xix, 1-147, 1994.

GENESTRA, M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. **Cellular Signalling**, v.19, p.1907-1819, 2007.

HASSIMOTO, N.M.A.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables and commercial frozen fruit pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.2928-2935, 2005.

HJERKINN, E.M.; SELJEFLØT, I.; ELLINGSEN, I.; BERSTAD, P.; HJERMANN, I.; SANDVIK, L.; ARNESEN, H. Influence of long-term intervention with dietary counseling, long-chain n-3 fatty acid supplements, or both on circulating markers of endothelial activation in men with long-standing hyperlipidemia. **American Journal Clinical of Nutrition**, n.81, n.3, p.583-589, 2005.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.1841-1856, 2005.

HUANG, L.H.; WANG, B.G. Antioxidant capacity and lipophilic content of seaweeds collected from the Qingdao coastline. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.4993-4997, 2004.

IWAI, K.; NAKAYA, N.; KAWASAKI, Y.; MATSUE, H. Antioxidative functions of natto, a kind of fermented soybeans: effect on LDL oxidation and lipid metabolism in cholesterol-fed rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.12, p.3597-3601, 2002.

JACKSON, M.J. An overview of methods for assessment of free radical activity in biology. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.58, n.4, p.1001-1006, 1999.

JAIME, P.C.; MACHADO, F.M.S.; WESTPHAL, M.F.; MONTEIRO, C.A. Nutritional education and fruit and vegetable intake: a randomized community trial. **Revista de Saúde Pública**, v.41, n.1, p.154-157, 2007.

JAIME, P.C.; MONTEIRO, C.A. Fruit and vegetable intake by Brazilian adults, 2003. **Cadernos de Saúde Pública**, v.21, suppl., p.S19-S24, 2005.

JENTZSCH, A.M.; BACHMANN, H.; FUERST, P.; BIESALSKI, H.K. Improved analysis of malondialdehyde [MDA] in human body fluids. **Free Radical Biology & Medicine**, v.20, n.2, p.251-256, 1996.

JEZEK, P.; HLAVATÁ, L. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues and organism. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, n.37, p.2478-2503, 2005.

JOHNSON, P. Antioxidant enzyme expression in health and disease: effects of exercise and hypertension. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v.133, p.493-505, 2002.

JOORDENS, J.C.A.; KUIPERS, R.S.; MUSKIET, F.A.J. Preformed dietary DHA: the answer to a scientific question may in practice become translated to its opposite. **American Journal of Human Biology**, v.19, p.582-584, 2007.

KANATT, S.R.; CHANDER, R.; SHARMA, A. Antioxidant potencial of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lamb meat. **Food Chemistry**, v.100, p.451-458, 2007.

KARIHTALA, P.; SOINI, Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. **APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, n.115, p.81-103, 2007.

KELLER U.; BRANDSCH C.; EDER K. Supplementation of vitamins C and E increases the vitamin E status but does not prevent the formation of oxysterols in the liver of guinea pigs fed an oxidised fat. **European Journal of Nutrition**, n.43, p.353-359, 2004.

KOTA, N.; KRISHNA, P.; POLASA, K. Alterations in antioxidant status of rats following intake of ginger through diet. **Food Chemistry**, v.106, p.991-996, 2008.

KOURYL, J.C.; DONANGELO, C.M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Revista de Nutrição**, v.16, n.4, p.433-441, 2003.

LEVY-COSTA, R.B.; SICHIERI, R.; PONTES, N.S.; MONTEIRO, C.A. Disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil: distribuição e evolução (1974-2003). **Revista de Saúde Pública**, n.39, v.4, p.530-540, 2005.

LIMA, L.P.; SAMPAIO, H.A.C. Caracterização socioeconômica, antropométrica e alimentar de obesos graves. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.12, n.4, p.1011-1020, 2007.

LOÏ, C.; CHARDIGNY, J.-M.; ALMANZA, S.; LECLERE, L.; GINIES, C.; SEBEDIO, J.-L. Incorporation and metabolism of dietary *trans* isomers of linolenic acid alter the fatty acid profile of rat tissues. **Journal of Nutrition**, v.130, n.10, p.2550-2555, 2000.

LOPES, A.C.S.; CAIAFFA, W.T.; SICHIERI, R.; MINGOTI, S.A.; LIMA-COSTA, M.F. Consumo de nutrientes em adultos e idosos em estudo de base populacional: Projeto Bamtui. **Cadernos de Saúde Pública**, v.21, n.4, p.1201-1209, 2005.

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

MACKENBACH, J.P. The Mediterranean diet story illustrates that “why” questions are as important as “how” questions in disease explanation. **Journal of Clinical Epidemiology**, n.60, p.105-109, 2007.

MANACH, C.; DONOVAN, J.L. Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. **Free Radical Research**, v.38, n.8, p.771-785, 2004.

MARCO, G.J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.45, p.594-598, 1968.

MARRUGAT J. Effects of differing phenolic content in dietary olive oils on lipids and LDL oxidation: a randomized controlled trial. **European Journal of Nutrition**, n.43, p.140-147, 2004.

MARRUGAT, J.; COVAS, M.-I.; FITO, M.; SCHROEDER, H.; MIRO-CASAS, E.; GIMENO, E.; LOPEZ-SABATER, M.C.; DE LA TORRE, R.; FARRE, M. Effects of differing phenolic content in dietary olive oils on lipids and LDL oxidation: a randomized controlled trial. **European Journal of Nutrition**, v.43, n.3, p.140-147, 2004.

MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, M.A.; FERNANDEZ-JARNE, E.; SERRANO-MARTINEZ, M.; MARTI, A.; MARTINEZ, J.A.; MARTIN-MORENO, J.M. Mediterranean diet and reduction in the risk of a first acute myocardial infarction: an operational healthy dietary store. **European Journal of Nutrition**, v.41, n.4, p.153-160, 2002.

McCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase, an enzyme function for erythrocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, v.244, p.6049-6055, 1969.

MELO, E.A.; GUERRA, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.36, n.1, p.1-11, 2002.

MILLER, H.E. A simplified method for the evaluation of antioxidant. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.48, p.91, 1971.

MOSCHANDREAS, J.; KAFATOS, A.; ARAVANIS, C.; DONTAS, A.; MENOTTI, A.; KROMHOUT, D. Long-term predictors of survival for the Seven Countries Study cohort from Crete: from 1960-2000. **International Journal of Cardiology**, v.100, n.1, p.85-91, 2005.

MOYLAN, J.S.; REID, M.B. Oxidative stress, chronic disease and muscle wasting. **Muscle & Nerve**, n.35, p.411-429, 2007.

NETZEL, M.; STRASS, G.; JANSSEN, M.; BITSCH, I.; BITSCH, R. Bioactive anthocyanins detected in human urine after ingestion of blackcurrant juice. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v.20, n.2, p.89-95, 2001.

NEUTZLING, M.B.; ARAUJO, C.L.P.; VIEIRA, M.F.A.; HALLAL, P.C.; MENEZES, A.M.B. Frequência de consumo de dietas ricas em gordura e pobres em fibra entre adolescentes. **Revista de Saúde Pública**, v.41, n.3, p.336-342, 2007.

NINFALI, P.; MEA, G.; GIORGINI, S.; ROCCHI, M.; BACCHIOCCA, M. Antioxidant capacity of vegetables, spices and dressings relevant to nutrition. **British Journal of Nutrition**, v.93, n.2, p.257-266, 2005.

ORTEGA, R.M. Importance of functional foods in the Mediterranean diet. **Public Health Nutrition**, v.8A, n.9, p.1136-1140, 2006.

OZBEN, T. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.96, n.9, p.2181-2196, 2007.

PAIXÃO, N.; PERESTRELO, R.; MARQUES, J.C.; CAMARA, J.S. Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. **Food Chemistry**, v.105, n.1, p.204-214, 2007.

PEREIRA, S.L.; HUANG, Y.-S.; BOBIK, E.G.; KINNEY, A.J.; STECCA, K.L.; PACKER, J.C.L.; MUKERJI, P. A novel ω 3-fatty acid desaturase involved in the biosynthesis of eicosapentaenoic acid. **Biochemical Journal**, v.378, n.2, p.665-671, 2004.

PÉREZ-JIMÉNEZ, F.; LISTA, J.D.; PEREZ-MARTINEZ, P.; LOPEZ-SEGURA, F.; FUENTES, F.; CORTES, B.; LOZANO, A.; LOPEZ-MIRANDA, J. Olive oil and haemostasis: a review on its healthy effects. **Public Health Nutrition**, v.9, n.8A, p.1083-1088, 2006.

PODSEDEK, A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: a review. **LWT – Food Science and Technology**, n.40, n.1, p.1-11, 2007.

POKORNÝ, J. Are natural antioxidants better - and safer - than synthetic antioxidants? **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.109, p.629-642, 2007.

PUEL, C.; QUINTIN, A.; AGALIAS, A.; MATHEY, J.; OBLED, C.; MAZUR, A.; DAVICCO, M.J.; LEBECQUE, P.; SKALTSOUNIS, A.L.; COXAM, V. Olive oil and its main phenolic micronutrient (oleuropein) prevent inflammation-induced bone loss in the ovariectomised rat. **British Journal of Nutrition**, v.92, n.1, p.119-127, 2004.

PUEL, C. Olive oil and its main phenolic micronutriente (oleuropein) prevent inflammation –induced bone loss in the ovariectomised rat. **British Journal of Nutrition**, n.92, p.119-127, 2004.

RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v.29, n.4, p.755-760, 2006.

RAMOS, S.; RAMOS, M.E.M. Dieta e risco cardiovascular: ômega 3, óleo de oliva, oleaginosas, o que é fato? **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul**, n.6, p.10-11, 2005.

RATNAM, D.V.; ANKOLA, D.D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D.K.; KUMAR, M.N.V.R. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**, v.113, n.3, p.189-207, 2006.

ROVER Jr., L.; HÖEHR, N.F.; VELLASCO, A.P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v.24, n.1, p.112-119, 2001.

RUXTON, C.H.S.; REED, S.C.; SIMPSON, J.A.; MILLINGTON, K.J. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, v.20, p.275-285, 2007.

SABARENSE, C.M.; MANCINI FILHO, J. Efeito da gordura vegetal parcialmente hidrogenada sobre a incorporação de ácidos graxos *trans* em tecidos de ratos. **Revista de Nutrição**, v.16, n.4, p.399-407, 2003.

SANCHEZ-MORENO, C.; CANO, M.P.; ANCOS, B.; PLAZA, L.; OLMEDILLA, B.; GRANADO, F.; MARTIN, A. Consumption of high-pressurized vegetable soup increases plasma vitamin C and decreases oxidative stress and inflammatory biomarkers in healthy humans. **Journal of Nutrition**, n.134, n.11, p.3021-3025, 2004.

SAURA-CALIXTO, F.; SOÑI, I. Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. **Food Chemistry**, v.94, p.442-447, 2006.

SCALBERT, A.; MORAND, C.; MANACH, C.; REMESY, C. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.56, n.6, p.276-282, 2002.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **Journal of Nutrition**, v.130, p.2073S-2085S, 2000.

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.10, n.4, p.308-318, 2004.

SEIFRIED, H.E.; ANDERSON, D.E.; FISHER, E.I.; MILNER, J.A. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. **Journal of Nutritional Biochemistry**, n.18, n.9, p.567-579, 2007.

SELJESKOG, E.; HERVIG, T.; MANSOOR, M.A. A novel HPLC method for the measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS): a comparison with a commercially available kit. **Clinical Biochemistry**, v.39, p.947-954, 2006.

SERRANO, J.; GOÑI, I.; SAURA-CALIXTO, F. Food antioxidant capacity determined by chemical methods may underestimate the physiological antioxidant capacity. **Food Research International**, v.40, p.15-21, 2007.

SHAMIL, N.J.I.E.; MOREIRA, E.A.M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, v.17, n.2, p.227-236, 2004.

SIES, H.; STAHL, W.; SEVANIAN, A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. **Journal of Nutrition**, v.135, n.5, p.969-972, 2005.

SIES, H.; KOCH, O.R.; MARTINO, E.; BOVERIS, A. Increase biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol treated rats. **FEBS Letters**, v.103, p.287-290, 1979.

SILVA, C.R.M.; NAVES, M.M.V. Suplementação de vitaminas na prevenção do câncer. **Revista de Nutrição**, v.14, n.2, p.135-143, 2001.

SIMOPOULOS, A.P. The Mediterranean diets: what is so special about the diet of Greece? the scientific evidence. **Journal of Nutrition**, n.131, p.3065S-3073S, 2001.

SIMOPOULOS, A.P.; LEAF, A.; SALEM Jr., N. Workshop on the essentiality of and recommended dietary intakes for omega-6 and omega-3 fatty acids. **Journal of the American College of Nutrition**, v.18, n.5, p.487-489, 1999.

SWAIN, T.; HILLS, W.E. The phenolic constituents of *Punus domestica*. I. Quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.10, p.63-68, 1959.

TEPE, B.; SOKMEN, A. Screening of the antioxidative properties and total phenolic contents of three endemic *Tanacetum* subspecies from Turkish flora. **Bioresource Technology**, v.98, p. 3076-3079, 2007.

TINOCO, S.M.B.; SICHIERI, R.; MOURA, A.S.; SANTOS, F.S.; CARMO, M.G.T. Importância dos ácidos graxos essenciais e os efeitos dos ácidos graxos *trans* do leite materno para o desenvolvimento fetal e neonatal. **Cadernos de Saúde Pública**, v.23, n.3, p.525-534, 2007.

TORRES, M.; MÁRQUEZ, M.; SUTIL DE NARANJO, R.; YÉPEZ, C.; LEAL DE GARCÍA, M.; MUÑOZ, M.; GÓMEZ, M.E. Aspectos farmacológicos relevantes de las vitaminas antioxidantes (E, A y C). **Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica**, v.21, n.1, p.22-27, 2002.

TUCK, K.L.; HAYBALL, P.J. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.13, n.11, p.636-644, 2002.

UAUY, R.; VALENZUELA, A. Marine oils: the health benefits of n-3 fatty acids. **Nutrition**, v.16, n.7/8, p.680-684.

UMAR LULE, S.; XIA, W. Food phenolics, pros and cons: a review. **Food Reviews International**, v.21, n.4, p.367-388, 2005.

VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free-radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v.160, n.1, p.1-40, 2006.

VASCONCELOS, A.P.; MANOLI, L.P.; SILVEIRA, P.P.; TORRES, I.L.; GAMARO, G.D.; DALMAZ, C. Effect of two different models of chronic stress on oxidative stress in cerebral cortex and hippocampus of rat. In: MEETING OF SOUTH AMERICAN GROUP FOR FREE RADICAL RESEARCH, 1, Florianópolis, 1999. **Abstracts**. Florianópolis: CCB/UFSC, 1999. p.69.

VASCONCELOS, F.A.G. Tendências históricas dos estudos dietéticos no Brasil. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v.14, p.197-219, 2007.

VEACH J. Functional dichotomy: glutathione and vitamin E in homeostasis relevant to primary open-angle glaucoma. **British Journal of Nutrition**, n.91, p.809-829, 2004.

VISIOLI, F.; HAGEN, T.M. Nutritional strategies for healthy cardiovascular aging: focus on micronutrients. **Pharmacological Research**, v.55, p.199-206, 2007.

WILLETT, W.C. The Mediterranean diet: science and practice. **Public Health Nutrition**, v.9, n.1A, p.105-110, 2006.

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

YANISHILIEVA, N.V.I.; MARINOVA, E.M. Effects of antioxidants on the stability of triacylglycerols and methyl esters of fatty acids of sunflower oil. **Food Chemistry**, v.54., n.4, p.377-382, 1995.

YEH, C.T.; YEN, G.C. Effects of phenolic acids on human phenolsulfotransferases, in relation on their antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.1474-1479, 2003.

ANEXO 1 – Tabela da descrição dos alimentos divididos por categorias

Grupos de Alimentos	Alimentos	
	DNSP	DM
Cereais e derivados		
	Arroz polido	Arroz "pilaf"
	Farinha de trigo	Farinha de trigo
	Amido de milho	Macarrão com ovos
	Fécula de mandioca	Pão "pita"
	Flocos de milho	-
	Macarrão com ovos	-
	Pão francês	-
Leguminosas		
	Feijão rajado	Feijão gigante ("kourkia")
Hortaliças (folhas, frutos, tubérculos)		
	Alface	Endívia
	Repolho	Couve
	Tomate	Tomate
	Cebola	Batata inglesa
	Batata inglesa	-
Frutas		
	Banana nanica	Laranja
	Laranja pêra	Melancia
	Melancia	Maçã
	Maçã	
Nozes e castanhas		
	Castanha de coco da Bahia	Pistache
Carnes vermelhas		
	Alcatra	Carne de vitela
	Chã de dentro	Carne de cordeiro
	Contrafilé	Carne suína

Grupos de Alimentos	Alimentos	
	DNSP	DM
<i>Carnes vermelhas</i>		
	Patinho	-
	Acém	-
	Costela	-
	Fígado bovino	-
	"Hambúrguer"	-
	Carne seca	-
	Carré suíno	-
	Pernil suíno	-
	Salsicha	-
	Lingüiça suína	-
<i>Peixes</i>		
	Merluza	Sardinha fresca
	Pescada branca	-
	Sardinha fresca	-
	Sardinha em conserva	-
	Tilápia	-
<i>Aves</i>		
	Sobrecoxa de frango	Sobrecoxa de frango
<i>Leite de vaca e derivados</i>		
	Leite de vaca	Leite de vaca
	Queijo minas frescal	-
	Queijo mussarela	-
	Iogurte natural	-
<i>Leite de cabra e derivados</i>		
	-	Queijo "feta"

Grupos de Alimentos	Alimentos	
	DNSP	DM
Leite de cabra e derivados	-	Iogurte
Açúcar e açucarados	Açúcar cristal	Açúcar cristal
	Açúcar refinado	Leite condensado
	Sorvete	-
	Chocolate em pó	-
Bolos e biscoitos doces	Bolo	-
	Biscoito doce	-
Condimentos	Massa de tomate	Massa de tomate
	Molho de tomate	-
Óleos e alimentos gordurosos	Óleo de soja	Azeite extra virgem de oliva
	Margarina vegetal	-
Bebidas e infusões	Cerveja pilsen	Cerveja pilsen
	Refrigerante convencional	Vinho (Retsina)
	Café	Refrigerante convencional
	-	Café

<i>Grupos de Alimentos</i>	<i>Alimentos</i>	
	<i>DNSP</i>	<i>DM</i>
<i>Bebidas e infusões</i>	-	Suco de fruta
<i>Ovos</i>	-	Ovo de galinha