



Licenciatura em Ciências da Nutrição

Relação entre a dieta e a actividade antioxidante do plasma

Trabalho de investigação

Elaborado por Filipa da Silva Mendes Correia

Aluno nº 200791708

Orientador: Prof. Doutor Paulo Figueiredo

Barcarena

Junho 2011

Universidade Atlântica

Licenciatura em Ciências da Nutrição

Relação entre a dieta e a actividade antioxidante do plasma

Trabalho de investigação

Elaborado por Filipa da Silva Mendes Correia

Aluno nº 200791708

Orientador: Prof. Doutor Paulo Figueiredo

Barcarena

Junho 2011

O autor é o único responsável pelas ideias expressas neste relatório

Resumo

Introdução - Fluidos biológicos como o plasma reflectem o estado metabólico do indivíduo num dado momento, este estado metabólico é fortemente influenciado tanto por factores genéticos como pelo estilo de vida. O “stress” oxidativo pode aumentar como resultado de uma dieta pobre ou de hábitos desadequados como o tabagismo, que aumentam a exposição a espécies reactivas de oxigénio. A adopção de uma dieta rica em compostos bioactivos com actividade anti-radicalar pode contribuir para reduzir o “stress” oxidativo na população em geral. **Objectivos** – Estudar a actividade antioxidante do plasma humano e relacioná-la com a dieta. **Métodos** – Este estudo avaliou a actividade redutora do plasma humano através da técnica de FRAP (redução do ião férrico), avaliou a actividade antiradicalar do plasma relativamente ao radical DPPH[•] (2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo) e ao radical superóxido. Aplicaram-se questionários de Frequência Alimentar de modo a conseguir associar a presença de determinados antioxidantes no plasma com o tipo de dieta seguida pelos voluntários. Efectuou-se ainda a comparação de um método colorimétrico e de um método de fotoquimioluminescência na avaliação da actividade de neutralização do Radical superóxido. **Resultados** – Existe uma associação negativa entre a técnica de sequestração do radical DPPH[•] e dois comportamentos de risco, como o tabagismo e o índice de massa corporal e uma associação positiva entre a idade ou a prática de actividade física com a actividade redutora do plasma. Relativamente à capacidade de neutralização do radical superóxido (fotoquimioluminescência), encontrou-se uma associação positiva deste parâmetro com o consumo frequente e mensal de leite, legumes e saladas. O método de fotoquimioluminescência permite detectar a actividade antiradicalar de soluções de ácido gálico 100 a 1000 vezes menos concentradas do que o método colorimétrico. **Conclusão** – Este estudo comprova que tanto o tabaco como o excesso de peso podem levar a uma diminuição da protecção antioxidante existente no nosso organismo, e que o consumo mensal de determinados alimentos juntamente com a prática de exercício físico, aumentam significativamente a actividade antioxidante do plasma. O método de fotoquimioluminescência é adequado ao estudo de amostras biológicas diluídas como o plasma humano. **Palavras-chave:** plasma, actividade antioxidante, dieta, “stress” oxidativo

Abstract

Introduction - Biological fluids such as blood plasma reflect the metabolic status of the individual at any given time. This metabolic state is strongly influenced by both genetic factors and by lifestyle. The oxidative "stress" can increase as a result of a poor diet or inadequate habits such as smoking, which increases exposure to reactive oxygen species. Adopting a diet rich in bioactive compounds with anti-radical activity can contribute to reduce oxidative "stress" in the general population. **Objectives** – Evaluate the antioxidant activity of human plasma and relate it with diet. **Methods** - This study measured the reducing activity of human plasma (FRAP - ferric reduction antioxidant power), and the antiradical activity of plasma against the radical DPPH' (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) and the radical superoxide anion. Food frequency questionnaires were also applied in order to correlate the presence of certain antioxidants in the plasma with the type of diet followed by the volunteers. **Results** - A negative correlations was found between the technique of sequestration of radical DPPH' and parameters associated with risk behaviours such as smoking and a high body mass index. A positive correlation was found between the reduction activity of plasma (FRAP) and age or physical activity. The neutralization of the superoxide radical (photochemiluminescence) showed a positive correlation with the frequent monthly consumption of milk, vegetables and salads. The photochemiluminescence method is able to detect the antioxidant activity of gallic acid solutions 100 to 1000 times less concentrated than the ones analysed by the colorimetric method. **Conclusion** - This study shows that smoking and overweight status can lead to a decrease in the antioxidant protection of our organism. The monthly consumption of certain functional foods and the regular practice of physical exercise can significantly increase the plasma's antioxidant activity. The photochemiluminescence method is adequate to the evaluation of antioxidant activity of biological fluids such as plasma.

Keywords: plasma, antioxidant activity, diet, oxidative "stress"

Índice

Resumo	iv
Índice	vi
Índice de figuras.....	viii
Introdução	1
Sistema antioxidante humano	1
Antioxidantes endógenos	1
Antioxidantes exógenos	2
Interacções entre espécies de antioxidantes.....	2
Actividade antioxidante do plasma e a idade.....	3
Actividade antioxidante do plasma e as doenças.....	3
Actividade antioxidante do plasma e o estilo de vida.....	4
Actividade física	4
Exposição a poluentes / Tabagismo.....	4
Actividade antioxidante do plasma e a dieta	4
1. Parte Experimental.....	6
1.1 Amostragem.....	6
1.2 Análise Laboratorial	7
1.2.1 Determinação da actividade antioxidante do plasma relativamente ao radical DPPH'	7

1.2.2	Determinação da actividade redutora do plasma humano	7
1.2.3	Determinação da neutralização do radical superóxido por fotoquimioluminescência.....	8
1.2.5	Questionários	9
1.2.4	Análise de dados e Cálculos	9
1.3	Resultados.....	9
1.3.1	Amostragem.....	9
1.3.2	Comparação de 2 métodos de medida da actividade de sequestração do Radical superóxido	10
1.3.3	Sequestração do radical DPPH'	11
1.3.4	Determinação do poder antioxidante de redução férrica (FRAP).....	12
1.3.5	Determinação da capacidade de neutralização do radical superóxido seguida por fotoquimioluminescência	13
1.3.6	Análise de questionários	14
	Conclusão.....	16
	Bibliografia	17

Índice de figuras

Figura 1 - Inibição do anião superóxido seguida por a) fotoquimioluminescência e b) espectroscopia de UV-Vis	11
Figura 2 - Inibição do radical DPPH• pelas amostras de soro incluídas no estudo	12
Figura 3 - Actividade redutora férrica das amostras de soro	13
Figura 4 - Actividade de sequestração do radical superóxido seguida por fotoquimioluminescência.....	14

Índice de tabelas

Tabela 1 - Correlações de Pearson.....	15
Tabela 2 - Correlações de Pearson entre os diferentes testes	16

Introdução

Sistema antioxidante humano

Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células, sendo definidos como “qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada com a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz” (Sies, 1993).

Os seres vivos possuem um sistema eficaz de defesa antioxidante contra os agentes nocivos aos quais estão constantemente sujeitos, devendo este sistema garantir o equilíbrio das espécies reactivas de oxigénio (ROS) no próprio organismo, de modo a evitar disfunções celulares, envelhecimento precoce, invalidez e doença (Caballero, Allen, & Prentice, 2005).

Os antioxidantes podem ter origem endógena e/ou exógena, e incluem tanto moléculas orgânicas que neutralizam os radicais livres como enzimas redutoras (Robert & Jacob, 1995). Estes compostos podem por vezes actuar em sinergia, aumentando a defesa do organismo contra o “stress” oxidativo (Jeffrey, Ravinder, & van Kammenc, 2000). As defesas antioxidantes do plasma humano incluem o ácido ascórbico, o tocoferol e os carotenóides, bem como a bilirrubina, o ácido úrico, os grupos tiol de proteínas, a coenzima Q10, a glutathione peroxidase, a superóxido dismutase e a catalase (Gopinathan, *et al*, 1994).

Antioxidantes endógenos

Os antioxidantes endógenos, como a glutathione, a bilirrubina, o ácido úrico e a coenzima Q10, são aqueles produzidos pelo corpo humano, e são os primeiros a actuar e a proteger o organismo contra o excesso de radicais livres que estão constantemente presentes no nosso corpo (Gopinathan, J. Miller, D. Milnerb, & A. Rice-Evans, 1994), sendo porém insuficientes para uma protecção completa do organismo humano (Caballero, Allen, & Prentice, 2005).

Os antioxidantes endógenos podem combater o excesso de radicais livres através de diversos mecanismos, nomeadamente, através da regulação do metabolismo normal do oxigénio e do controlo dos níveis de óxido nítrico, de radical superóxido e de peróxido de hidrogénio, que são produtos metabólicos resultantes da degradação oxidativa de diversas biomoléculas como ácidos gordos (Sorensen *et al*, 2003)

Antioxidantes exógenos

A acção dos antioxidantes endógenos deve ser complementada por antioxidantes exógenos, nomeadamente a vitamina C (ácido ascórbico), a vitamina E (tocoferol), os carotenóides e os flavonóides, apenas obtidos a partir da dieta. Este tipo de antioxidantes é necessário à defesa global contra a oxidação e manutenção da saúde (Robert & Jacob, 1995), pois contribuem para a prevenção e interrupção dos processos oxidativos (Gopinathan *et al*, 1994).

Interacções entre espécies de antioxidantes

Existem várias interacções de oxidação-redução entre os diferentes antioxidantes endógenos e exógenos. Quando um agente antioxidante se oxida por reacção com um radical ou ião metálico pode ser regenerado por outro antioxidante que ainda se encontra reduzido, e em excesso, criando um ambiente redutor (Robert & Jacob, 1995).

Estudos indicam que o consumo de vitamina C leva a maiores níveis plasmáticos de vitamina E e de outros antioxidantes endógenos, como a glutathione e o ubiquinol. A suplementação em conjunto destas duas vitaminas leva a uma sinergia na redução dos níveis séricos de peróxidos (Robert & Jacob, 1995).

Foi também possível comprovar um aumento significativo (cerca de 50%) dos teores de glutathione (uma enzima antioxidante endógena) como resposta do sistema antioxidante endógeno, em indivíduos saudáveis alimentados com uma dose baixa de vitamina C (Robert & Jacob, 1995).

Actividade antioxidante do plasma e a idade

O plasma é um importante veículo que pode actuar como protector e distribuir antioxidantes da dieta pelo organismo (Quiles *et al.*, 1998).

Parece existir uma associação entre os antioxidantes do plasma e a idade do paciente, sendo que, à medida que se envelhece, o número total de antioxidantes no plasma, nomeadamente a vitamina C e a bilirrubina, começa a diminuir e o número de ROS aumenta (Gopinathan, *et al.* 1994 e Reddy, & van Kammenc, 2000 e Simonelli, *et al.* 2002). O envelhecimento refere-se a um conjunto de processos que levam a um aumento gradual da vulnerabilidade ao “stress” oxidativo, assim como a probabilidade de morte (Cabo, *et al.*, 2004).

Por outro lado, o sistema de defesa antioxidante endógeno, e em particular, o enzimático, é estimulado pelas agressões oxidativas que provocam uma resposta metabólica de defesa pelo que não é muito desenvolvido nos recém-nascidos, que apresentam geralmente uma baixa capacidade antioxidante do plasma.

Actividade antioxidante do plasma e as doenças

Um elevado nível de radicais livres tem sido associado à ocorrência de várias doenças tais como, doenças cardiovasculares, Alzheimer, Parkinson, esquizofrenia, diabetes e cancro. Assim, pensa-se que os efeitos destas doenças ou mesmo a sua progressão poderão ser minimizados por uma dieta particularmente rica em antioxidantes (Chatterjee, *et al.* 2005).

Num indivíduo saudável existe um equilíbrio entre a produção de radicais livres e o mecanismo de defesa com antioxidantes, no entanto em estados de doença este equilíbrio é afectado, podendo originar uma superprodução de radicais livres ou um défice de antioxidantes, como albumina, bilirrubina, vitamina C e ácido úrico (Jeffrey, Ravinder, & van Kammenc, 2000), resultando em “stress” oxidativo. A ingestão de determinados alimentos ricos em antioxidantes, como açafrão, alho, chá verde ou frutos vermelhos pode ajudar a combater este défice (Chatterjee *et al.* 2005).

Actividade antioxidante do plasma e o estilo de vida

Actividade física

Demonstrou-se que a actividade física intensa tem uma associação positiva com o aumento da capacidade antioxidante do plasma em indivíduos mais velhos, evitando assim o “stress” oxidativo (Franzoni, *et al.* 2006). No entanto, o exercício físico intenso aumenta a exposição celular ao oxigénio, pelo que pode induzir um ligeiro aumento do “stress” oxidativo em atletas, que devem contrabalançar esse efeito adoptando uma dieta rica em antioxidantes, ou mesmo utilizando suplementos com esse efeito.

Exposição a poluentes / Tabagismo

Existem diversos compostos químicos aos quais estamos expostos por via oral, por via respiratória ou por via dérmica que têm um efeito oxidante directo sobre as nossas biomoléculas ou que podem conduzir à formação de radicais ou outros oxidantes capazes de agredir as estruturas celulares. É o caso dos medicamentos, o álcool, o tabaco, os poluentes ambientais e os contaminantes alimentares (Sorensen, *et al.* 2003).

Actividade antioxidante do plasma e a dieta

A dieta é o principal factor que pode afectar tanto o sistema antioxidante como a produção de radicais livres (Jeffrey, Ravinder, & van Kammenc, 2000). De facto, vários estudos indicam que o aumento do consumo de frutas e verduras está associado a um aumento da protecção contra várias doenças, como o cancro, doenças cardiovasculares e cerebrovasculares (Cao, *et al.* 1998), devido ao seu conteúdo em carotenóides, polifenóis e vitaminas. Estes compostos são responsáveis pelas propriedades anti-cancerígenas, anti-virais e anti-inflamatórias (Di Renzo, *et al.*, 2007). Por outro lado, a adopção de uma dieta restrita em calorias favorece a redução na produção metabólica de espécies oxidantes, ou seja, favorece uma redução do “stress” oxidativo.

Os carotenóides podem actuar como supressores de espécies reactivas de oxigénio ou de radicais livres, estimulando assim a resposta imunológica e evitando o “stress” oxidativo (Sommerburg, Zang, & van Kuijk, 1997). Os carotenóides no plasma humano são ainda bons indicadores do consumo de frutas e hortaliças.

Os flavonóides são pigmentos naturais, ingeridos na dieta, com um elevado poder antioxidante baseado na sua capacidade redutora das ROS e de neutralização dos radicais. Exemplos de alimentos ricos em flavonóides são a fruta, verduras, cerveja, vinho, chá verde, chá preto e soja. (Heim, Tagliaferro, & Bobilya, 2002).

A vitamina C protege o plasma sanguíneo contra os danos oxidativos, sendo muito eficaz na protecção contra diversas doenças e contra os processos degenerativos causados pelo “stress” oxidativo. (Frei, England, & Ames, 1989)

A vitamina E encontra-se presente no plasma sanguíneo na forma de δ -tocoferol. A sua actividade antioxidante é especialmente importante na prevenção da peroxidação lipídica induzida por radicais livres, iões férricos e cúpricos ou outros oxidantes (Demirkaya & Kadioglu, 2007).

Assim, há evidências de que a ingestão diária de frutas e hortaliças aumenta o número de antioxidantes no plasma. Vários estudos observacionais e ensaios clínicos têm fornecido evidências científicas de que dietas ricas em frutas, vegetais, legumes, cereais integrais, peixes e produtos lácteos com baixo teor de gordura estão associados a uma menor incidência de várias doenças crónicas. (Di Renzo, *et al.*, 2007).

A manga, por exemplo, é um fruto bastante rico em antioxidantes incluindo compostos fenólicos, carotenóides e vitamina C. Os antioxidantes fornecidos na dieta por frutas e verduras são muito importantes uma vez que as espécies reactivas do oxigénio que são produzidas durante os processos oxidativos são a chave para o início da aterosclerose, conseguindo assim combater o início da doença. (Robles-Sánchez, *et al.*, 2011) É importante reconhecer que os vegetais possuem uma capacidade antioxidante superior ao das frutas, pelo que devem ser sempre incluídos na dieta. (Di Renzo, *et al.*, 2007)

Este estudo conclui que, uma suplementação com antioxidantes naturais, através de uma dieta mediterrânica equilibrada, particularmente rica em produtos frescos orgânicos, pode aumentar a resistência das biomoléculas ao “stress” oxidativo em populações com baixa ingestão habitual de micronutrientes antioxidantes. (Di Renzo, *et al.*, 2007)

O morango tem um alto valor nutritivo e tem sido associado com o conteúdo relevante de micronutrientes antioxidantes, como vitamina C e ácido fólico, e mais recentemente com a variedade e alto teor de antioxidantes polifenólicos, tais como flavonóides, taninos e ácidos fenólicos. (Tulipani, *et al.*, 2011) Este estudo revela que os morangos realmente têm um efeito benéfico sobre a capacidade antioxidante do plasma, diminuindo assim o “stress” oxidativo no organismo.

O consumo de chá e infusões também se mostra benéfico na dieta, devido aos antioxidantes presentes nas infusões. (Villano, *et al.*, 2010). A infusão de Rooibos (*Aspalathus linearis*) afecta a capacidade antioxidante do plasma bem como os triacilgliceróis, o colesterol e os níveis de glicemia plasmática. Este tipo de infusão aumenta a defesa antioxidante do plasma sendo um óptimo suplemento da dieta. (Villano, *et al.*, 2010).

Diversos estudos revelam também que o consumo de chá preto aumenta significativamente a capacidade antioxidante do plasma atingindo níveis máximos após cerca de 60 min e um maior aumento foi encontrado após o consumo de chá verde (Lotito & Frei, 2006)

O consumo de cerveja causa também um aumento significativo na capacidade antioxidante do plasma após 1 h, retornando aos níveis normais após 2 h, e também aumento dos níveis plasmáticos dos ácidos fenólicos. (Lotito & Frei, 2006)

1. Parte Experimental

1.1 Amostragem

A amostragem efectuada incluiu 16 amostras de plasma sanguíneo de funcionários de uma clínica médica que se disponibilizaram para participar neste estudo.

Seleccionaram-se dadores saudáveis pois pretendemos validar a utilização dos métodos testados para avaliar o efeito dos componentes da dieta no estado de defesa antioxidante

do indivíduo. Estes parâmetros apresentam-se alterados em diversas situações patológicas pelo que estas não foram consideradas no trabalho.

1.2 Análise Laboratorial

Este trabalho tem uma base laboratorial pelo que a recolha de dados é do tipo analítico. As técnicas utilizadas na obtenção dos dados experimentais são as seguintes:

1.2.1 Determinação da actividade antioxidante do plasma relativamente ao radical DPPH•

A actividade antiradicalar do plasma foi avaliada através da capacidade de sequestração do radical DPPH• seguida por espectroscopia de UV-Vis (colorímetro de UV-Vis, Pharmacia LBK, Novaspec II). O radical DPPH• em solução metanólica ou etanólica tem um máximo de absorvância a 517 nm, sendo a sua forma reduzida incolor.

Efectuou-se uma mistura de 1 mL de soro e 1 mL de acetona que foi homogeneizada em vortex (1 min de agitação); de seguida centrifugou-se esta mistura durante 4 min, à velocidade de 4000 rpm. O sobrenadante foi filtrado numa pipeta Pasteur com enchimento de algodão de forma a remover pequenas partículas de precipitado não separadas por centrifugação. Seguidamente adicionaram-se 100 µL deste sobrenadante filtrado a 4 mL de uma solução de DPPH• em metanol a 95% (Fluka) (0,2 mg/100 mL); incubou-se a mistura durante 15 min no escuro, a uma temperatura de 22° C e por fim leu-se a sua absorvância a 517 nm. A inibição do radical DPPH• foi calculada como a diferença relativa percentual entre a absorvância da amostra e a de um branco de metanol.

1.2.2 Determinação da actividade redutora do plasma humano

A actividade redutora do plasma foi testada utilizando o teste do poder antioxidante de redução férrica (FRAP). Esta técnica consiste na medição da capacidade de espécies antioxidantes para reduzir iões férricos (Fe^{3+}) a iões ferrosos (Fe^{2+}). Os iões ferrosos (Fe^{2+}) formam com um dos reagentes utilizados um complexo de cor azul que apresenta um máximo de absorvância a 593 nm. Preparou-se a quantidade de reagente FRAP adequada ao número de determinações a realizar e colocou-se o frasco do reagente num

banho de água termostaticado a 37° C. Colocaram-se 100 µL de plasma num frasco de centrífuga e adicionaram-se 3 mL do reagente FRAP; incubou-se a mistura a 37° C, durante 4 min, e após esse período leu-se a absorvância a 593 nm contra um branco de água. Para quantificar a actividade de redução férrica (teste de FRAP) das diferentes amostras foi traçada uma recta de calibração utilizando uma gama de concentrações de FeSO₄ entre 0,1 e 1 mM ($y = 1,2205x - 0,0826$; $R^2 = 0,9963$).

1.2.3 Determinação da neutralização do radical superóxido por fotoquimioluminescência

A actividade de sequestração do radical superóxido foi avaliada por fotoquimioluminescência (Photochem, Analytik Jena), no modo aquoso, utilizando como padrão o ácido ascórbico. Foi construída uma recta de calibração na gama de $2,0 \times 10^{-4}$ mM a $1,2 \times 10^{-4}$ mM e utilizou-se um volume de amostra de 10 µL, diluídos num meio reaccional com um volume total de 2535 µL. Os reagentes são fornecidos sob a forma de um kit que compreende um tampão aquoso, um reagente de fotosensibilização e uma solução-padrão de ácido ascórbico.

De forma análoga, construiu-se ainda uma recta de calibração com ácido gálico na gama de $2,0 \times 10^{-4}$ mM a $4,0 \times 10^{-4}$ mM.

1.2.4 Determinação da neutralização do radical superóxido por espectroscopia de UV-VIS

Uma mistura de reagentes permite a formação local de radicais superóxido que são neutralizados pelos antioxidantes presentes na amostra. Após consumir todos os antioxidantes presentes na amostra, os radicais remanescentes reagem com um segundo kit de reagentes para produzir um complexo corado com um máximo de absorvância a 560 nm. O aumento linear da absorvância é representado em função do tempo de reacção e o declive dessa recta é proporcional à concentração de antioxidantes da amostra. Utilizando este método construiu-se uma recta de calibração com ácido gálico na gama de 0,05 mM a 0,2 mM.

1.2.5 Questionários

Os questionários recolhidos compreendem uma ficha de identificação dos parâmetros biométricos do dador, informação sobre estilo de vida, doenças crónicas ou consumo de medicamentos e uma avaliação da dieta.

A dieta é avaliada através de uma descrição sucinta da frequência de consumo dos principais tipos de alimentos e respectivas doses.

1.2.4 Análise de dados e Cálculos

As análises foram efectuadas em duplicado para despistar erros aleatórios. As correlações entre os dados laboratoriais e os dados dos questionários de frequência alimentar foram avaliadas com o programa estatístico *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS®) versão 17.0 para *Microsoft Windows*®. Foi utilizado o coeficiente de associação de *Pearson*.

1.3 Resultados

1.3.1 Amostragem

A amostra incluiu 15 voluntários com idades compreendidas entre os 26 e os 61 anos ($40,6 \pm 12,22$) sendo que 12 destes são do sexo feminino (80%) e 3 do sexo masculino (20%).

Nesta amostra 10 pessoas não são fumadoras (66,7%) e 5 são fumadoras (33,3%); 4 têm doenças crónicas e 11 não têm qualquer tipo de doença crónica. Em relação à prática de actividade física, 9 voluntários não praticam regularmente actividade física (60,0%) enquanto os restantes 6 (40,0%) o fazem; 33,3% dos voluntários encontram-se num estado nutricional adequado enquanto os restantes 66,7% apresentam excesso de peso.

Mesmo numa população saudável, factores como genética, estilo de vida ou exposição a poluentes específicos podem provocar alterações significativas dos parâmetros testados, chegando a sobrepor-se à influência da dieta. Assim a principal limitação deste tipo de trabalhos é a de exigir um número elevado de amostras para se poder avaliar a

variabilidade dos parâmetros seleccionados. A cooperação dos dadores, na disponibilização do plasma e preenchimento dos questionários em regime gratuito é também um factor limitante.

Este trabalho envolveu uma amostragem relativamente pequena, que pode limitar a relevância estatística da análise de alguns parâmetros. No entanto, dado o carácter invasivo da recolha de plasma, este estudo preliminar destina-se a obter alguns dados que contribuam para o aperfeiçoamento e validação de um ensaio numa escala mais alargada.

1.3.2 Comparação de 2 métodos de medida da actividade de sequestração do radical superóxido

O radical superóxido é uma espécie química com relevância biológica, ou seja, é um radical que ocorre naturalmente nas células dos seres vivos, mesmo em condições de boa saúde geral. A avaliação da capacidade antioxidante do plasma em relação a este radical permite avaliar o nível de defesa plasmática em relação a este radical de oxigénio, tanto como resultado dos níveis de ácido úrico ou albumina como pelos teores de vitaminas e outros antioxidantes da dieta. Estão descritos na literatura dois métodos de avaliação da actividade de sequestração deste radical: um método colorimétrico e um método de fotoquimioluminescência. Estes métodos envolvem equipamentos e reagentes com preços distintos e não se encontrou um teste comparativo destes dois métodos aplicados à mesma amostra ou padrão antioxidante.

Estes métodos foram testados utilizando um composto representativo dos antioxidantes da dieta – o ácido gálico. Este é um composto fenólico existente em quantidades apreciáveis em diversos frutos e legumes. Traçaram-se rectas de calibração utilizando soluções-padrão com diferentes concentrações de ácido gálico, seleccionando a gama de trabalho de modo a adequar-se à zona de linearidade típica de cada técnica. A determinação efectuada por espectroscopia de UV-Vis mostrou-se linear na gama de 0,05 mM a 0,2 mM enquanto a gama linear do método de fotoquimioluminescência foi de 0,0002 mM a 0,0004 mM.

O método de fotoquimioluminescência permite detectar a actividade de antioxidantes presentes em concentrações muito mais baixas do que a gama linear do método colorimétrico e apresenta uma amplitude da gama linear inferior. Este resultado indica que o método de fotoquimioluminescência é adequado a amostras muito diluídas e de baixo volume que é difícil concentrar de forma a analisar pelo método de UV-Vis.

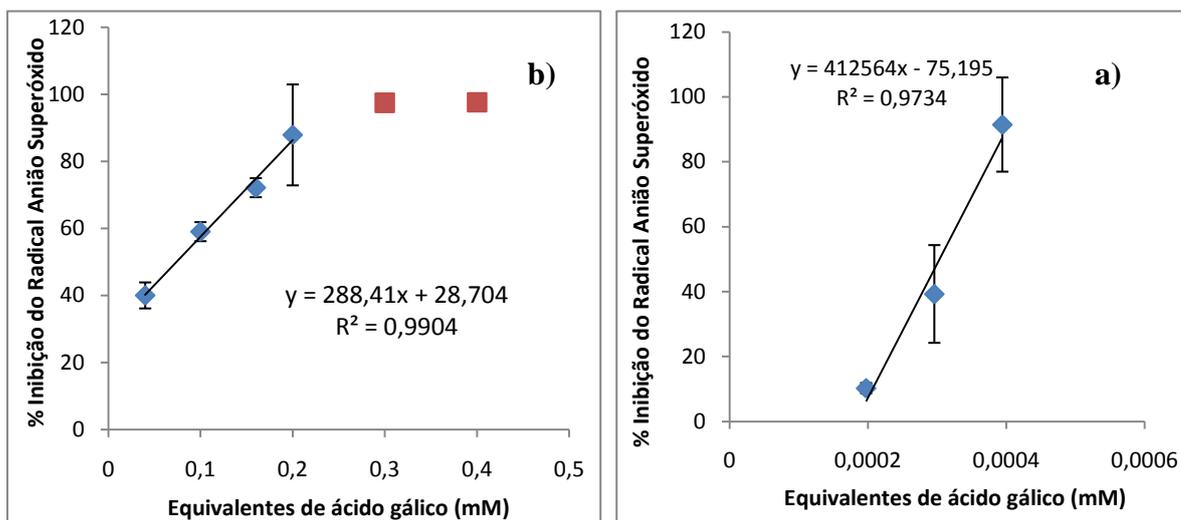


Figura 1 - Inibição do radical superóxido seguida por a) fotoquimioluminescência e b) espectroscopia de UV-Vis

Este critério aplica-se a amostras biológicas obtidas por processos invasivos, como é o caso do plasma ou tecidos. **(Figura 1)**

1.3.3 Sequestração do radical DPPH•

A actividade do plasma humano relativamente à sequestração do radical DPPH• variou na gama de 47,2% a 74,9%, tendo uma média de $52,4 \pm 7,3$. Observou-se que a maioria das amostras apresenta uma inibição próxima dos 50%, apontando para uma falta de variação entre os diferentes indivíduos, destacando-se no entanto dois indivíduos.

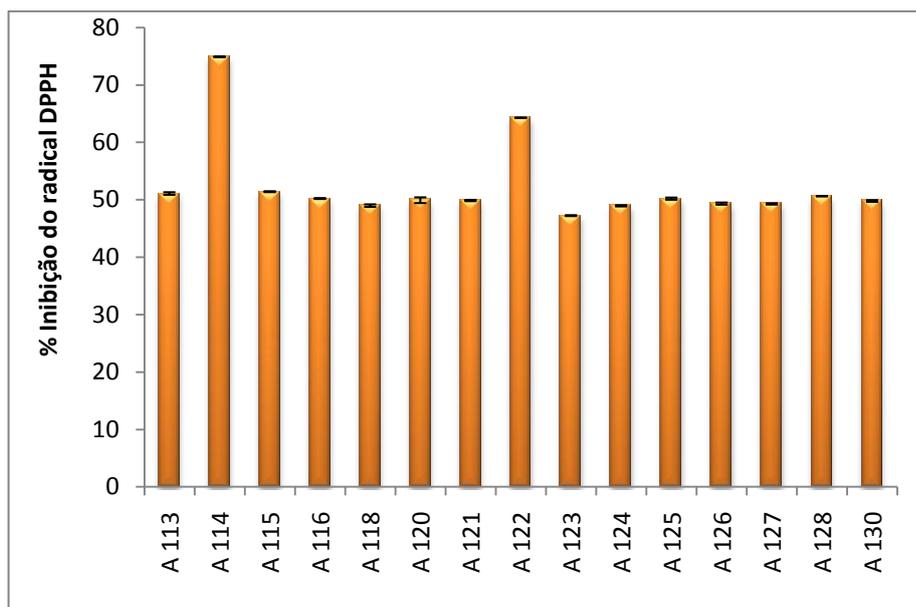


Figura 2 - Inibição do radical DPPH• pelas amostras de soro incluídas no estudo

A actividade das amostras do soro deste grupo de voluntários relativamente ao radical DPPH• apresentou grande homogeneidade, com excepção de 2 voluntários com actividade destacadamente mais elevada. Este resultado parece indicar que serão função sobretudo dos antioxidantes endógenos, cujo teor deve ser mais homogéneo em voluntários saudáveis do que o teor de antioxidantes exógenos mais dependente de variações temporais e interindividuais relacionadas com a dieta e com os processos de absorção e metabolização dos antioxidantes ingeridos. **(Figura 2)**

1.3.4 Determinação do poder antioxidante de redução férrica (FRAP)

Após a aplicação deste teste nas amostras de soro, verificou-se uma actividade antioxidante de redução férrica que variou entre 0,535 mM e 1,311 mM em equivalentes de FeSO₄ (valor médio de 0,84±0,19).

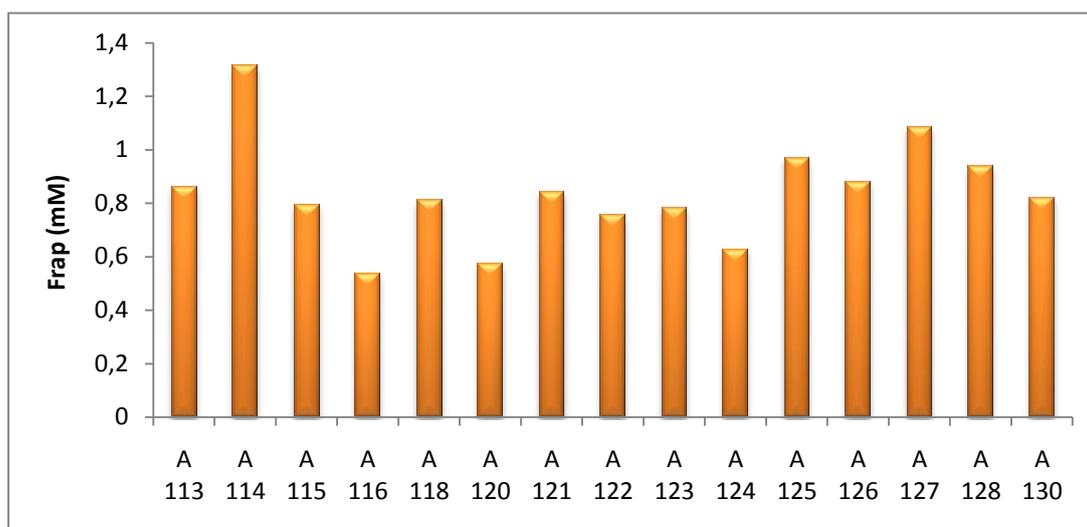


Figura 3 - Actividade redutora férrica das amostras de soro

Como se pode observar na Figura 3 esta actividade antioxidante apresenta maiores diferenças interindividuais, o que parece indicar que expressa contributos de componentes de variação no curto prazo como a dieta e o estado metabólico no momento da colheita. **(Figura 3)**

1.3.5 Determinação da capacidade de neutralização do Radical superóxido seguida por fotoquimioluminescência

O método de fotoquimioluminescência permite avaliar a capacidade de sequestração do radical superóxido por antioxidantes presentes em concentrações 100 a 1000 vezes mais baixas que as necessárias para medir esta actividade utilizando o método colorimétrico. Sendo a repetibilidade comparável, o método de fotoquimioluminescência pode portanto dispensar passos de extracção e concentração em matrizes como soluções aquosas diluídas ou fluidos biológicos.

A actividade das amostras de soro relativamente à sequestração do radical superóxido variou entre 35,0 e 102,9 equivalentes de ácido ascórbico (nmoles/mL de soro), com um valor médio de $56,9 \pm 16,7$ equivalentes de ácido ascórbico (nmoles/mL de soro).

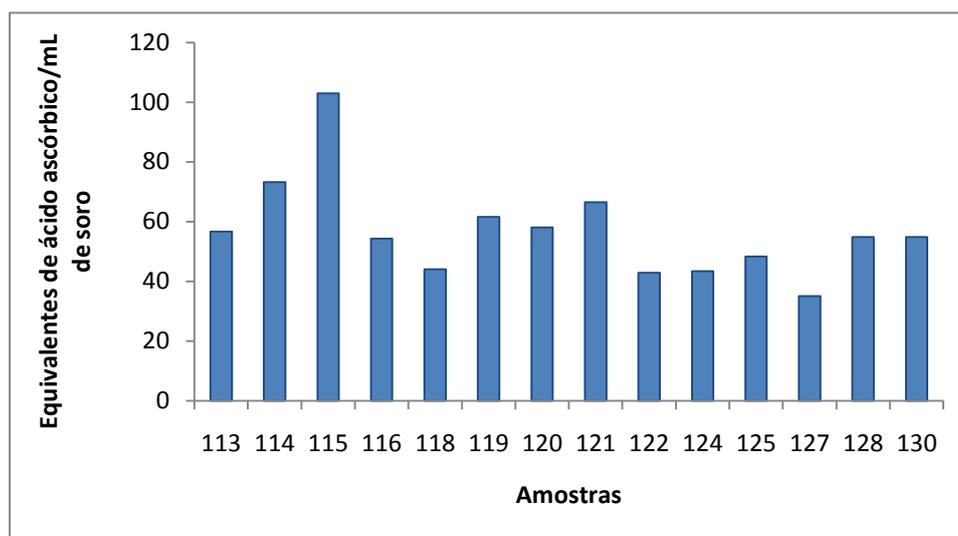


Figura 4 - Actividade de sequestração do Radical superóxido seguida por fotoquimioluminescência.

Os resultados referentes ao radical superóxido apresentam uma variabilidade análoga aos resultados da actividade redutora férrica mas com diferenciação dos valores individuais, ou seja as amostras mais redutoras não são necessariamente aquelas que têm maior actividade anti-radicalar relativamente a este anião. **(Figura 4)**

1.3.6 Análise de questionários

Observaram-se associações positivas entre a idade e actividade redutora do plasma bem como entre prática de exercício físico e actividade redutora do plasma.

A associação positiva com a idade pode reflectir uma maior produção de enzimas redutoras como resposta ao “stress” oxidativo a que o organismo está exposto ao longo dos anos. Desta forma, a actividade e eficácia dos antioxidantes endógenos parece ser superior à dos antioxidantes exógenos, obtidos através da dieta. A prática de exercício físico regular está fortemente relacionado com o aumento das defesas antioxidantes no organismo humano. Encontraram-se correlações negativas entre a actividade antiradicalar (DPPH•) e dois factores de risco: o tabagismo e o índice de massa corporal elevado, ou seja, estes dois factores parecem estar associados a uma diminuição do teor de antioxidantes exógenos no organismo humano. **(Tabela 1)**

Tabela 1 - Correlações de Pearson

	FRAP	DPPH•	PhotoChem
Sexo	0,20	0,44	0,05
Índice de massa corporal	-0,24	-0,49	-0,19
Idade	0,47	0,23	-0,38
Ser fumador	-0,24	-0,49	-0,19
Doenças crónicas	0,01	0,22	-0,17
Pratica de actividade física	0,45	0,02	0,14
<i>Frequência mensal de consumo de:</i>			
Leite	-0,41	-0,29	0,529*
Queijo	0,26	0,02	-0,33
Iogurtes líquidos e sólidos	-0,21	-0,30	0,44
Pão e tostas	0,00	0,13	0,08
Arroz e massa	-0,23	0,32	-0,11
Batata	-0,02	0,02	0,48
Carne Vermelha	0,31	0,30	0,05
Ovos	0,15	-0,21	-0,25
Azeite	0,20	0,08	-0,11
Cereais integrais	-0,12	-0,08	-0,25
Carne Branca	0,02	0,32	-0,10
Peixe	-0,19	-0,18	-0,28
Sopa de Legumes	0,15	-0,02	-0,28
Legumes e saladas	-0,24	-0,21	0,570*
Fruta	-0,01	0,05	-0,35
Margarina	-0,20	-0,08	0,35

No teste da capacidade de neutralização do radical superóxido seguida por fotoquimioluminescência obtiveram-se duas correlações significativas. Encontraram-se correlações positivas entre o consumo de leite, cerca de 1 Chávena de 250 mL, bem como o consumo de ½ Chávena almoçadeira de legumes e/ou saladas, o que é expectável uma vez que os vegetais contribuem para um aumento dos antioxidantes encontrados no plasma, ajudando assim numa protecção contra as ROS. Estes resultados estão de acordo com trabalhos publicados que indicam que a ingestão diária de frutas e hortaliças aumenta o número de antioxidantes total no plasma, (Robles-Sánchez, *et al.*,

2011) e que os vegetais possuem uma capacidade antioxidante superior ao das frutas, pelo que devem ser sempre incluídos na dieta. (Di Renzo, *et al.*, 2007)

Em relação aos diferentes testes de actividade antioxidante efectuados obteve-se uma boa associação, positiva entre a actividade antiradicalar (DPPH•) e a actividade redutora do plasma (FRAP) e uma associação positiva fraca entre as duas actividades antiradicalares.

Tabela 2 - Correlações de Pearson entre os diferentes testes

	PhotoChem	FRAP	DPPH•
PhotoChem		0,108	0,316
FRAP	0,108		0,538*
DPPH•	0,316	0,538*	

Conclusão

A actividade antioxidante do plasma depende de equilíbrios entre factores externos como dieta e estilo de vida e factores internos como o sistema de defesa antioxidante endógeno.

Comportamentos de exposição a “stress” oxidativo como o tabagismo e o desequilíbrio do índice de massa corporal podem levar a uma diminuição da protecção antioxidante existente no nosso organismo.

O consumo mensal de alimentos antioxidantes e a prática de exercício físico podem contrabalançar esse efeito negativo e contribuir para reforçar as nossas defesas contra espécies reactivas de oxigénio.

O método de fotoquimioluminescência parece ser mais apropriado a amostras diluídas como fluidos biológicos enquanto o método colorimétrico pode ser usado com amostras concentradas como extractos de antioxidantes.

Bibliografia

Caballero, B., Allen, L., & Prentice, A. (2005). *Encyclopedia of Human Nutrition*. Oxford: Elsevier Academic press.

Cabo, R., Cabello, R., Rios, M., López-Lluch, G., Ingram, D., A. Lane, M.,(2004). Calorie restriction attenuates age-related alterations in the plasma membrane antioxidant system. *Experimental Gerontology* , 297–304.

Cao, G., L Booth, S., A Sadowsk, J., & L Prior, R. (1998). Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables. *the American Journal of Clinical nutrition* , 1081–1087.

Chatterjee, S., T. Balakrishna, P., Tilak, J. C., & P.A. Devasagayam, T. (2005). A modified, economic, sensitive method for measuring total antioxidant capacities of human plasma and natural compounds using Indian saffron (*Crocus sativus*). *Clinica Chimica Acta* , 155–163.

Demirkaya, F., & Kadioglu, Y. (2007). Simple GC-FID method development and validation for determination of α -tocopherol (vitamin E) in human plasma. *Journal of Biochemical and biophysical Methods* , 363–368.

Di Renzo, L., Di Pierro, D., Bigioni, M., Sodi, V., Galvano, F., Cianci, R., (2007). Is antioxidant plasma status in humans a consequence of the antioxidant food content influence?). *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* , 185 - 192.

Franzoni, F., Ghiadoni, L., Galetta, F., Plantiga, Y., Lubrano, V., Huang, Y.,(2006). Physical Activity, Plasma Antioxidant Capacity, and Endothelium-Dependent Vasodilation in Young and Older Men. *American Journal of Hypertension* , 0895-7061.

Frei, B., England, L., & N. Ames, B. (1989). Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Medical Sciences* , 6377-6381.

Gopinathan, V., J. Miller, N., D. Milnerb, A., & A. Rice-Evans, C. (1994). Bilirubin and ascorbate antioxidant activity in neonatal plasma. *FEBS Letters* , 197-200.

Heim, E.; K., R. Tagliaferro, A., & J. Bobilya, D. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 572–584.

Jeffrey, K. Y., Ravinder, R., & P. van Kammenc, D. (2000). Abnormal age-related changes of plasma antioxidant proteins in schizophrenia. *Psychiatry Research*, 137 - 151.

K., J., U, Y., Reddy, R., & P. van Kammenc, D. (2000). Abnormal age-related changes of plasma antioxidant proteins in schizophrenia. *Psychiatry Research*, 137 - 151.

Lotito, S. B., & Frei, B. (2006). Consumption of flavonoid-rich foods and increase plasma antioxidant capacity in humans. *Free Radical Biology & Medicine*, 1727 - 1746.

Lyan, B., Azañis-Braesco, V., Cardinault, N., Tyssandier, V., Borel, P., Cécile, M., (2001). Simple method for clinical determination of 13 carotenoids in human plasma using an isocratic high-performance liquid chromatographic method. *Journal of Chromatography*, 297–303.

Robert, A., & Jacob, D. (1995). The integrated antioxidant system. *Pergamon*, 755-766.

Robles - Sánchez, M., Astiazarán-García, H., Matín-Belloso, O., Gorintin, S., Alvarez-Parrilla, E., A. de la Rosa, L., (2011). Influence of whole and fresh-cut mango intake on plasma lipids and antioxidant capacity of healthy adults. *Food Research International*.

Sies, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *European Journal Biochemical*, **215**, 213-219.

Simonelli, F., Zarrilli, F., Mazzeo, S., Verde, V., Romano, N., Savoia, M., (2002). Serum oxidative and antioxidant parameters in a group of Italian patients with age-related maculopathy. *Clinica Chimica Acta*, 111 –115.

Sommerburg, O., Zang, L.-Y., & J.G.M. van Kuijk, F. (1997). Simultaneous detection of carotenoids and vitamin E in human plasma. *Journal of Chromatography*, 209–215.

Sorensen, M; Autrup, H; Moller, P; Hertel, O; Jensen, S; Vinzents, P; Kraudsen, L; Loft, S. (2003) *Linking exposure to environmental pollutants with biological effects*. Mutation Research, 255-271.

Tulipani, S., Alvarez - Suarez, J., Busco, F., Bompadre, S., Quiles, J., Mezzetti, B., (2011). Strawberry consumption improves plasma antioxidant status and erythrocyte resistance to oxidative haemolysis in humans. *Food Chemistry* **128**, 180 - 186.

Villano, D., Pecorari, M., Francesca Testa, M., Raguzzini, A., Stalmach, A., Crozier, A., (2010). Unfermented and fermented rooibos teas (*Aspalathus linearis*) increase plasma total antioxidant capacity in healthy humans. *Food Chemistry*, 679–683.