

NILO SÉRGIO IRACET NUNES

**O EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE LICOPENO SOBRE O
ESTRESSE OXIDATIVO**

**Florianópolis
2003**

NILO SÉRGIO IRACET NUNES

**O EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE LICOPENO SOBRE O
ESTRESSE OXIDATIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Santa Catarina, para a obtenção do título de mestre em Nutrição da Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Regina Lúcia Martins Fagundes.

FLORIANÓPOLIS

2003

AGRADECIMENTOS

Aos colegas Adriana, Bethânia, Cláudia, Louise, Ivan, Neiva e Paulo, embarcamos juntos .

Aos professores da primeira turma de mestrado e Nutrição da UFSC, que nos habilitaram a navegar.

Aos que doaram seu tempo e também pegaram remos, Gersón, Márcia, Deise, Fabiola, Selma, Thiago e professora Emilia.

Ao professor Danilo, no trecho de mar revolto mostrou a corrente marítima para sair.

À banca examinadora que muito nos honra por aceitar o convite.

Especialmente à professora Regina por apontar o rumo, dividir o leme e os remos em todos os momentos.

DEDICATÓRIA

À minha família, especialmente à minha esposa, havia alguém à espera, por isso chegamos.

RESUMO

O atual e crescente interesse em estudar o licopeno provém de sucessivas observações sobre o possível papel protetor deste componente dietético em doenças degenerativas. Recentemente tem sido demonstrado que a ingestão de licopeno é inversamente associada ao risco de doenças coronarianas e câncer de próstata. O tomate e seus derivados são clássicas fontes de licopeno, no entanto, goiaba, mamão e pitanga são também importantes fontes deste antioxidante. O objetivo deste estudo foi comparar o efeito do licopeno presente no tomate e na goiaba sobre o estresse oxidativo. O estudo foi realizado durante 28 dias com ratos machos adultos Wistar, divididos em 4 grupos que receberam as dietas: controle; cafeteria; cafeteria suplementada com licopeno, fonte: tomate; cafeteria suplementada com licopeno, fonte: goiaba. Amostras do fígado foram coletadas para análise das seguintes parâmetros antioxidantes: 1- enzimas: catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST) e glutathione reductase (GR); 2: tripeptídeos: glutathione na forma total (GT) e reduzida (GSH). Para a análise do dano celular, TBARS e glutathione oxidada (GSSG) foram analisados. O ganho de peso dos animais submetidos à dieta cafeteria foi significativamente maior em relação ao grupo controle, entretanto, não houve diferença significativa no ganho de peso entre os grupos cafeteria. Na análise do consumo alimentar não foi observado diferença no consumo energético entre o controle e cafeteria, porém, os grupos cafeteria suplementados com tomate ou goiaba apresentam um consumo energético maior, acompanhado de aumento nos níveis de consumo de carboidratos e de lipídeos. Observou-se um aumento significativo dos biomarcadores de estresse oxidativo, mensurados a partir dos resultados encontrados nas análises do TBARS e da glutathione oxidada (GSSG) nos grupos cafeterias. Os valores de SOD e CAT diminuídos nos grupos com dietas cafeteria suplementadas com tomate ou goiaba em relação ao grupo cafeteria não suplementado podem ser representativos de maior capacidade antioxidante das dietas com licopeno. Os resultados mostram que nos grupos suplementados com licopeno, proveniente tanto do tomate como da goiaba, houve uma possível menor utilização das defesas endógenas. Isto pode sugerir a ação antioxidante do licopeno contrapondo ao estresse oxidativo induzido pela dieta rica em gorduras presente na dieta cafeteria. Em conclusão, o licopeno presente na alimentação, originário tanto do tomate como da goiaba, pode estar envolvido na diminuição do estresse oxidativo provocado por uma ingestão elevada de gordura.

Palavras-chave: estresse oxidativo; antioxidantes; tomate; goiaba; fígado de rato.

ABSTRACT

The recent and increasing interest in studying lycopene comes from successive observations about the possible protective role of this dietetic component over degenerative diseases. Recently, it has been demonstrated that lycopene ingestion is inversely related to the risk of coronary disease and prostate cancer. Tomato (*Lycopersicon esculentum*) and its subproducts are classical sources of lycopene, however guava (*Psidium guajava*), papaya (*Carica papaya*) and pitanga (*Eugenia uniflora*) are also important sources of this antioxidant. This study's objective was to compare the effect of lycopene present in tomato and guava on the oxidative stress. The study was performed during 28 days with male adult Wistar rats, divided into four groups that received the following diets: control, cafeteria, tomato lycopene supplemented cafeteria and guava lycopene supplemented cafeteria. Liver samples were collected for analysis of the following antioxidant parameters: 1) enzymes: catalase (CAT), superoxid-dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST) and glutathione reductase (GR); 2) tripeptide: total glutathione (GT) and reduced (GSH). For analysis of cellular damage TBARS and oxidized glutathione (GSSG) were analyzed. Weight gain of the animals submitted to cafeteria diets was significantly higher than the control group, however, there was no significant difference in weight gain between the cafeteria groups. Food intake analysis showed no difference of energy consumption between control and cafeteria groups, but the cafeteria groups supplemented with tomato or guava presented a higher energy ingestion, together with increased carbohydrate and lipid ingestion. Significant increase of oxidative stress biomarkers was observed from the results found in TBARS and oxidized glutathione (GSSG) analyses of the cafeteria groups. The diminished SOD and CAT values found in the cafeteria groups supplemented with tomato or guava (when compared to the cafeteria group not supplemented) may be representative of higher antioxidant capacity of the lycopene-enriched diets. Results showed that in both lycopene supplemented groups (tomato and guava), a possible lower utilization of endogenous defenses occurred. This may suggest the antioxidant action of lycopene counteracting to the oxidative stress induced by the excessive fat present in the cafeteria diet. Concluding, the lycopene present in foods originated from tomato or from guava, may be involved in the alternative prevention of oxidative stress induced by high ingestion of fat.

Key-words: oxidative stress, antioxidants, tomato, guava. rat liver

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Espécies reativas e estresse oxidativo	1
1.2 Efeitos dos antioxidantes em macromoléculas	3
1.3 Doença humana e estresse oxidativo.....	8
1.4 Antioxidantes.....	10
1.4.1 Antioxidantes endógenos.....	11
1.4.2 Antioxidantes exógenos	13
2 OBJETIVOS	22
2.1 Geral.....	22
2.2 Específicos	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 Delineamento Experimental.....	23
3.2 Formulação das dietas.....	24
3.2.1 Preparo do pó de tomate e da goiaba.....	25
3.2.2 Determinação da composição nutricional centesimal do pó de tomate e da goiaba	26
3.3 Obtenção das amostras para as determinações das atividades enzimáticas	27
3.4 Determinações Bioquímicas.....	28
3.4.1 Catalase.....	28
3.4.2 Superóxido Dismutase.....	28
3.4.3 Glutathiona Peroxidase	29
3.4.4 Glutathiona S-Transferase	29
3.4.5 Glutathiona Redutase.....	30
3.4.6 Glutathiona Reduzida	30
3.4.7 Glutathiona Total (GT) e oxidada (GSSH).....	31
3.4.8 Determinação do dano celular (TBARS).....	31
3.5 Análise Estatística	32
4 RESULTADOS	33
4.1 Consumo Alimentar	33
4.2 Análise do peso corporal dos animais	35

4.3 Análises Bioquímicas	36
4.3.1 Análise das defesas antioxidantes enzimáticas	36
4.3.2 Análise das defesas antioxidantes não enzimáticas	41
4.3.3 Análise do dano celular	44
5 DISCUSSÃO	45
6 CONCLUSÃO	51
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
ANEXOS	
ANEXO – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA	

1 INTRODUÇÃO

1.1 Espécies Reativas no Estresse Oxidativo

Acredita-se que, há aproximadamente 4,5 bilhões de anos, o oxigênio molecular estava ausente da atmosfera terrestre. A existência do oxigênio era somente possível em moléculas como monóxido de carbono (CO), dióxido de carbono (CO₂) ou formando vapor d'água com o hidrogênio (FRIDOVICH,1997). O aparecimento do oxigênio molecular ocorreria mais tarde, cerca de 3 bilhões de anos, pela dissociação das moléculas de água por ação dos raios ultra-violeta, sendo posteriormente, produzido por organismos fotossintéticos que usam a energia solar para a fotólise (FLESCHIN *et al*, 2000). Os primeiros invertebrados aeróbicos surgiram há cerca de 1 bilhão de anos e o Homo sapiens há 2 milhões de anos. Descendentes dos primeiros seres heterotróficos conseguiram desenvolver a capacidade de aproveitar o oxigênio no processo de nutrição, utilizando-o como oxidante para liberar energia a partir do alimento, em reação praticamente inversa à fotossíntese (MAYES, 2002).

Nos dias atuais, o oxigênio compõe 21% dos gases atmosféricos, imprescindível para a respiração dos seres aeróbicos através de obtenção de energia na cadeia mitocondrial de transporte de elétrons, que gera 80% da adenosina trifosfato (ATP) para as células. Além disso 65% do corpo do homem adulto é composto por oxigênio, a maior parte dentro da molécula d'água (SEN; PACKER, 2000). Paradoxalmente, o oxigênio que sustenta a vida aeróbica, é letal para os organismos aeróbicos em poucos dias se inspirada a 100% na pressão de uma atmosfera, e apenas em uma hora se inspirado na pressão de cinco atmosferas (MENDÉZ; RODRÍGUEZ, 1997). O oxigênio molecular pode atingir uma condição tóxica através de suas espécies intermediárias chamadas de espécies reativas de oxigênio (ERO), estas reagem com biomoléculas envolvendo-se em diversos processos patológicos, tanto na etiologia como no desenvolvimento deles (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999a). A toxicidade do oxigênio é um fenômeno complexo e, conforme Gershman et al, (1954), resulta da ação das espécies reativas de oxigênio nos processos de hiperóxia e na radiação ionizante. Em 1994, Wilhelm Filho relata que esta toxicidade também é um fenômeno contínuo e presente nos estados de normóxia em organismos aeróbicos saudáveis.

Entre as espécies reativas de oxigênio ou formas intermediárias existem os elementos mais instáveis e reativos conhecidos como radicais livres. O termo radical livre define toda

espécie que possui um ou mais elétrons não pareados na camada eletrônica ou orbital atômico mais externo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999a). A rotação de um elétron ímpar (livre) determina a atração para um campo magnético, peculiaridade que confere à espécie alta instabilidade química e tendência à reatividade inespecífica. As espécies que possuem a estrutura eletrônica com todos os elétrons pareados em spins opostos estão particularmente em uma situação de estabilidade química, de certa forma, protegidos para a atração de um campo magnético e para as reações de interações de elétrons com outras espécies (FANG *et al*, 2002; THOMAS, *et al*, 2003).

O elétron ímpar, característico do radical livre, pode estar presente em:

- 1) uma molécula muito pequena, como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) ou óxido nítrico (NO^{\bullet});
- 2) átomos como o H, N, C e enxofre ou átomos de metais de transição;
- 3) parte de uma grande biomolécula como uma proteína, carboidrato, lipídio ou um ácido nucléico.

Estas espécies químicas assumem acentuada tendência de interagir com outras biomoléculas, buscando combinar seu(s) elétron(s) solitário(s) para adquirir estabilidade, sendo reconhecidas como espécies muito reativas. A interação ocorre através da inserção de elétrons (atividade redutora) ou retirando elétrons (atividade oxidante), resultando na desestabilização da molécula participante da interação, a qual assumirá a condição também de espécie reativa (ROVER *et al*, 2000; FANG *et al*, 2002).

As espécies reativas se originam na natureza, a partir de duas importantes substâncias:

- 1) O oxigênio atmosférico, que contém 2 elétrons desemparelhados, cada um localizado em um orbital distinto na última camada e no mesmo estado de spin (paralelo), podendo originar ERO.
- 2) O composto gasoso, óxido nítrico, um poluente atmosférico, mas também sintetizado em diversas células do organismo humano, podendo originar ERN (espécies reativas de nitrogênio).

Tanto o metabolismo celular como fatores ambientais, podem induzir o aparecimento destas espécies reativas. Entre os fatores ambientais, reconhecidos como ativadores destas espécies, destacam-se os raios solares (gama e ultravioleta), raios-X, a fumaça do cigarro, os medicamentos, os poluentes ambientais e a dieta. Por exemplo, ondas eletromagnéticas de

baixa intensidade podem romper a molécula de água no organismo humano e gerar o radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$). Raios ultravioletas podem quebrar a ligação covalente O – O no peróxido de hidrogênio (H_2O_2), também resultando no radical hidroxil ($2\bullet\text{OH}$). Diversas moléculas no organismo humano, através do processo fisiológico, podem gerar o radical superóxido ($\text{O}_2\bullet$), como adrenalina, dopamina e substâncias de defesa como fagócitos (macrófagos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos). Estas células ativadas produzem espécies reativas de oxigênio (o íon superóxido, hidroperóxidos e o oxigênio singlete) como parte do mecanismo para eliminar substâncias estranhas, atuando como bactericidas (FINKEL; HOLBROOK, 2000).

No processo inflamatório são dois os sistemas que atuam produzindo espécies reativas de oxigênio: a NADPH oxidase ($\text{NADP}^+/\text{NADPH} + \text{H}^+$ acoplado à membrana celular dos neutrófilos) e a mieloperoxidase, localizada nos neutrófilos. As plaquetas, ativadas ou não, estão relacionadas com a geração de superóxido de maneira contínua, implicados na agregação plaquetária. O óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$) liberado pelos neutrófilos, pode impedir a reatividade plaquetária que caracteriza as enfermidades cardiovasculares. O ácido hipocloroso (HClO), considerado um forte oxidante, é derivado da mieloperoxidase dos neutrófilos e atua como microbicida (MENDÉZ; RODRÍGUEZ, 1997).

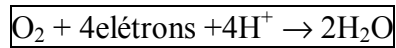
1.2 Efeitos de Oxidantes em Macromoléculas

A alimentação, principalmente pela excessiva ingestão calórica, tem despertado atualmente importante interesse como fonte geradora de radicais livres. O metabolismo energético celular, particularmente devido à atividade metabólica mitocondrial, faz o aproveitamento da energia contida nos alimentos através de uma seqüência de reações químicas finalizando com a produção de 38 moléculas de ATP por molécula de glicose, liberando 686.000 calorias. Este processo se desenvolve em duas etapas: 1) Glicólise - a molécula de glicose origina 2 moléculas de ácido pirúvico; 2) Ciclo de Krebs - o ácido pirúvico entra na mitocôndria, transforma-se em acetilcoenzima A, o qual por sua vez, entra numa série de reações que liberam CO_2 e H_2O ; e onde, na cadeia respiratória, - em que os hidrogênios liberados vão para as cristas mitocôndrias, passam por diversos transferidores (NADH_2 , FADH_2 citocromos), liberam energia para a síntese de ATP, e combinam-se com o oxigênio, formando água. Desta forma, o oxigênio, por possuir no estado fundamental dois elétrons desemparelhados nos orbitais mais externos, age como oxidante (combustão por oxigênio), recebendo elétrons da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

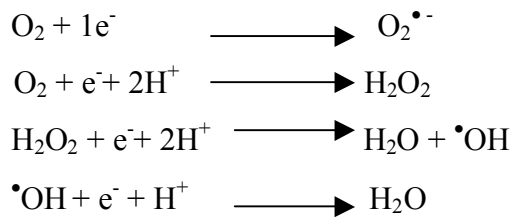
(NADPH) e da flavina adenina dicotinamida reduzida (FADH) que atuam como redutores (MENDÉZ; RODRÍGUEZ, 1997; ROVER *et al*, 2000, HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999a).

Este processo de transporte de elétrons na mitocôndria, que finaliza com a redução do O₂ a H₂O, pode se constituir na maior fonte endógena de ERO (MURRAY *et al*, 1990). A redução de O₂ para H₂O utiliza duas rotas:

- 1) Citocromo C-Oxidase - formação de H₂O após receber simultaneamente 4 elétrons (redução tetravalente). Acredita-se que em torno de 95% do oxigênio metabolizado na mitocôndria utiliza esta via.



2) Oxigenase – formação de espécies intermediárias reativas de oxigênio, como o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila (redução seqüencial univalente). Em torno de 2 a 5% do oxigênio metabolizado na mitocôndria pode usar esta rota.



O oxigênio (O₂) atmosférico, cujo número atômico é 8 e com a seguinte distribuição eletrônica na última camada $\boxed{\uparrow\downarrow} \boxed{\uparrow\downarrow \uparrow \uparrow}$ não é particularmente reativo com moléculas biológicas, pois sua configuração com elétrons desemparelhados apresenta-se com spins paralelos, o que implica na necessidade de inversão do estado de spin, criando uma restrição para a ocorrência de reações rápidas com qualquer biomolécula (restrição de spin). Desta forma, o arranjo de spins paralelos do oxigênio diminui a habilidade para remover simultaneamente dois elétrons de outras moléculas. No entanto, o oxigênio atmosférico, pode converter-se em uma espécie reativa por dois mecanismos: ativação, por absorção de energia, e por redução univalente. Desta forma pode adquirir a seguinte configuração na última camada : $\boxed{\uparrow\downarrow} \boxed{\uparrow\downarrow \uparrow\downarrow \uparrow}$

O oxigênio ao absorver energia, suficiente para inverter o sentido de um dos spins paralelos forma o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) com 2 elétrons desemparelhados em spins opostos, sobrepondo a restrição de spin e adquirindo alta capacidade de reação com moléculas orgânicas.

No processo de redução intracelular para H_2O , o oxigênio, forma substâncias intermediárias, que, apesar do curtíssimo tempo de vida, estão condicionalmente propensas a interagir inespecificamente com moléculas celulares, provocando diversas alterações químicas, considerando-se, portanto, estas espécies reativas responsáveis pela toxicidade atribuída ao oxigênio. Estima-se que, entre 2 a 5% do oxigênio reduzido durante a cadeia respiratória mitocondrial possa ser deslocado da rota oxidase para oxigenase e susceptível a formação de metabólitos reativos (HALLIWELL, 2000; FANG *et al*, 2002; THOMAS *et al*, 2003).

Nas espécies reativas de oxigênio no metabolismo celular, incluem-se todos os radicais e não radicais derivados do oxigênio, como as espécies reativas de nitrogênio e de cloro. A geração de todas estas espécies requer a presença de O_2 .

Existem várias rotas possíveis para a formação da espécie superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) a partir do O_2 pela captação de um elétron. O ânion superóxido é uma espécie pouco reativa e não tem habilidade para penetrar nas membranas lipídicas, limitando sua ação ao compartimento onde é produzida. No entanto, poderá atuar como oxidante ou redutor, oxidando enxofre e grupos sulfídricos, ácido ascórbico ou NADPH e reduzindo citocromo e íons metálicos.

O peróxido de hidrogênio é considerado pouco reativo, pois não ataca diretamente os vários componentes celulares, mas pode atravessar facilmente as membranas biológicas e se difundir por distâncias consideráveis. A formação do H_2O_2 pode resultar da conversão do $\text{O}_2^{\bullet-}$ pela dismutação com a participação da superóxido dismutase (SOD), ou mesmo espontaneamente.

Em sistemas biológicos, o radical hidroxila ($^{\bullet}\text{OH}$) é considerado a mais reativa espécie de oxigênio (ERO), parcialmente reduzido. É capaz de reagir com todas as macromoléculas, oxidando moléculas orgânicas por duas possíveis reações: introduzindo-se na molécula orgânica formando produtos hidroxilados ou retirando H do átomo desta molécula. Produz derivados que não podem ser regenerados pelo metabolismo celular. O $^{\bullet}\text{OH}$ pode se originar da interação entre H_2O_2 e $\text{O}_2^{\bullet-}$ catalisada por íons metálicos Fe^{++} ou Cu^{++} (Reação de Haber-

Weiss), ou pela reação do H_2O_2 com metais de transição (Reação de Fenton).

Pode ser formado em sistemas biológicos a partir da entrada de energia no oxigênio (raios ionizantes ou energia térmica) invertendo seu spin ou pela oxidação de outras espécies parcialmente reduzidas como $\cdot OCl$ e H_2O_2 . É capaz de difundir-se por distâncias apreciáveis nas membranas e de danificar as moléculas incluindo proteínas, enzimas e o ácido desoxiribonucleico (DNA).

Assim, considera-se que as formas ativadas de oxigênio, além do importante papel na origem da vida e na evolução biológica, podem também ser extremamente deletérias, citotóxicas em níveis patológicos, agindo nocivamente sobre proteínas, carboidratos, lipídios e sobre os ácidos nucleicos (FANG *et al*, 2002; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999b; FRIDOVICH, 1997).

A peroxidação lipídica é definida como a ação oxidativa de lipídios poliinsaturados. Os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAS) caracterizam-se por possuírem ao longo de suas cadeias, mais de uma ligação dupla entre carbonos ($H_2C = CH_2$), sendo por este motivo, destacadamente susceptíveis à oxidação por ERO. O rompimento da barreira eletroquímica entre uma ERO e um ácido graxo insaturado é o passo inicial para a oxidação lipídica em membranas.

Os fosfolipídios de membrana são os principais alvos desta reação, que se constitui, numa reação em cadeia, podendo-se propagar pelas membranas celulares, envolvendo as etapas de iniciação, propagação e terminação (FANG *et al*, 2002; THOMAS, *et al*, 2003).

Na etapa de iniciação ocorre o seqüestro do hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado da membrana celular. Tal seqüestro pode ser realizado pelo $\cdot OH$ ou pelo $LO\cdot$ (radical alcóxila com conseqüente formação do $L\cdot$ radical lipídico). Na propagação o $L\cdot$ reage com O_2 , resultando $LOO\cdot$ (radical peróxila), que por sua vez seqüestra novo hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado, tornando-o novamente $L\cdot$. O término da peroxidação lipídica ocorre quando ($L\cdot$ o $LOO\cdot$) se propagam até destruírem-se (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Os principais produtos finais da oxidação lipídica, compreendem os derivados da decomposição de hidroperóxidos como álcoois, aldeídos, cetonas e outros hidrocarbonetos. Especialmente o malonaldeído pode ser mensurado como indicador da oxidação lipídica e

diversos estudos na literatura científica identificam e avaliam o dano oxidativo nos lipídios pela formação de produtos da reação entre ácidos graxos e espécies reativas de oxigênio (FERRARI, 1998; NAGYOVÁ *et al*, 1998).

A peroxidação lipídica é uma reação freqüente nos alimentos e compromete o odor e o sabor, sendo característica da rancificação dos alimentos com conteúdo lipídico. Da mesma forma, a peroxidação lipídica na membrana celular prejudica seriamente sua função, alterando sua estrutura e fluidez. Há perda da permeabilidade iônica, permitindo influxo excessivo de cálcio que ativa as enzimas autolíticas, liberação do conteúdo de organelas celulares e formação de produtos citotóxicos, com risco de morte celular.

Reconhecendo que os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), são destacadamente susceptíveis à oxidação por ERO, devido às suas múltiplas duplas ligações, aceita-se que alta ingestão de PUFAs, juntamente com a presença de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), compõem um fator de risco para a peroxidação lipídica em diversas células, incluindo as células musculares dos vasos sanguíneos, macrófagos e células β pancreáticas (FERRARI, 1998; MELO; GUERRA, 2002).

O DNA é provavelmente o principal alvo biológico atacado por oxidação (HALLIWEL, 2000), resultante da interação com espécies reativas de oxigênio, em particular com o radical hidroxila (BRENNAN *et al*, 1999).

O ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio não são normalmente reativos junto ao DNA, entretanto na presença de ferro ou cobre (reação de Fenton), o H_2O_2 é convertido no radical hidroxil, altamente reativo, capaz de promover a reação de oxidação com o açúcar ou com a base do DNA, podendo resultar na degeneração da base (oxidação da pirimidina), na quebra da cadeia do DNA e no entrelaçamento de proteínas (KOW, 2002). A 8-hidroxi-guanosina, um produto do ataque do radical hidroxila ao DNA, é utilizado como um marcador para se estimar o dano oxidativo ao DNA (LUTSENKO *et al*, 2002; THOMAS *et al*, 2003).

Outra consequência do estresse oxidativo é o ataque e modificação das proteínas, resultante de reações iniciadas principalmente pelo radical hidroxila, com a consequente oxidação dos aminoácidos, a formação de entrecruzamento e a oxidação de toda a cadeia protéica que resulta na perda de sua função biológica e fragmentação (BERLLET;

STADTMAN, 1997).

As ERO podem acarretar a oxidação da cadeia de resíduos de aminoácidos, a formação de entre-cruzamento de proteínas e a oxidação da cadeia protéica resultando na fragmentação da proteína. As proteínas apresentam em sua estrutura muitos sítios reativos susceptíveis ao ataque por formas reativas de oxigênio. Diversas proteínas podem conter sítios ligantes de metal, especialmente susceptíveis a eventos oxidativos, o metal pode interagir com H_2O_2 através da reação de Fenton, formando o radical hidroxila, ocorrendo a oxidação do aminoácido com inativação e destruição da proteína. Um exemplo clássico desta interação ocorre com a hidrolase-triptofano cerebral, que gera o radical $\cdot OH$ pela reação de Fenton, resultando na destruição da própria molécula (BERLETT; STADTMAN, 1987).

O estresse oxidativo pode ser compreendido como uma situação em que se observa um aumento na velocidade de formação de espécies oxidantes ou como uma concomitante diminuição na atividade do sistema de defesa, resultando no aumento continuado das concentrações, em estado estacionário, de espécies de oxigênio ativo. Em situações de estresse oxidativo, se manifestam os efeitos tóxicos dos radicais livres, produzindo-se primeiro dano celular reversível, que pode desencadear dano irreversível e, inclusive, morte celular se o estresse oxidativo persiste (FLECHA, 1990). Pode ser mensurado pela atividade dos radicais livres através de três critérios: determinação dos níveis de antioxidantes endógenos (enzimático e não enzimático); mensuração dos produtos de oxidação de moléculas pela detecção direta de radicais livres e determinação de antioxidantes exógenos como vitamina E, vitamina C, carotenóides, folato, urato, flavonóides, entre outros.

1.3 Doença Humana e Estresse Oxidativo

A associação entre o estresse oxidativo e inúmeras doenças em humanos está relatada de forma consistente na literatura científica. Recentemente tem sido considerado o fator mais importante na causa de doenças crônicas não transmissíveis (RAO; AGARVAL, 1999). O estado estacionário de estresse oxidativo contribui para o declínio das funções celulares, o envelhecimento, a mutação “espontânea” e numerosas patologias (FRIDOVICH, 1997; KOW, 2002).

Uma consequência do estresse oxidativo é a peroxidação lipídica (lipoperoxidação), conforme já mencionado, que se propaga nos ácidos graxos poliinsaturados das membranas

biológicas, alterando a permeabilidade e eventualmente rompendo-as. A lipoperoxidação tem sido considerada na patogênese de muitas desordens degenerativas de grande incidência atual, a exemplo do diabetes e doenças cardiovasculares (VANNUCCHI *et al*, 1998). Um aumento na produção de superóxido tem sido observado em pacientes portadores de diabetes tipo I e produtos da peroxidação lipídica estão aumentados no cérebro de ratos com diabetes tipo II, enquanto a atividade de enzimas antioxidantes como catalase e superóxido dismutase estão diminuídas (REAGAN *et al*, 2001).

A doença arterosclerótica vascular tem na elevação do nível de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) um fator de risco, principalmente quando a oxidação da LDL está identificada e são conhecidas várias rotas que envolvem a oxidação da LDL, como a geração de oxidantes a partir da mieloperoxidase (enzima secretada por fagócitos) e a formação do peróxi-nitrito pela reação do óxido nítrico gerado nas paredes celulares dos vasos sanguíneos com o superóxido (LEEUWENBURG *et al*, 1997).

A doença de Alzheimer e o mal de Parkinson, duas das mais prevalentes doenças neurodegenerativas associadas à idade, têm sido relacionadas à degeneração das sinapses e morte das células nervosas.

Na doença de Alzheimer, os neurônios do hipocampo e de outras regiões que estão ligadas à aprendizagem e à memória, são seletivamente vulneráveis. Um dos mecanismos bem caracterizados envolvidos na doença de Alzheimer é a anormalidade no complexo α -cetoglutarato desidrogenase, um componente mitocondrial do ciclo de Krebs e do metabolismo do glutamato. Diversas formas reativas de oxigênio podem inibir a atividade desta enzima, comprometendo o fornecimento de energia para os neurônios do hipocampo e também prejudicando a remoção de glutamato, um potencial citotóxico para neurotransmissores (SHEU; BLASS, 2001).

No mal de Parkinson, neurônios dopaminérgicos da *substantia nigra*, região que controla os movimentos corpóreos, são destacadamente vulneráveis. Os tremores e a rigidez que o caracterizam, resultam da progressiva degeneração de neurônios dopaminérgicos, que diminuem ou cessam a produção de L-dopamina. Dados de estudos pós-morte de tecidos cerebrais de pacientes com mal de Parkinson mostraram evidências da peroxidação lipídica, nitratação protéica, aumento dos produtos da oxidação do DNA (8-hidroxi guanina) na *substantia nigra* e o aumento generalizado de carbonilas protéicas por todo o cérebro

(MATTSON *et al*, 2001).

As ERO podem danificar o DNA e a divisão celular, quando não ou mal reparada gera a mutação. Se estas mudanças ocorrerem em genes críticos, tais como oncogene ou gene supressor tumoral, a iniciação ou progressão do tumor pode resultar. O dano celular causado por ERO pode induzir mitoses, aumentando o risco do DNA lesado acarretar mutações (NIJVELDT *et al*, 2001).

Evidências experimentais e epidemiológicas sugerem que a oxidação do DNA é mutagênica e é o maior contribuidor para o câncer em humanos, através de fontes principalmente como o fumo, inflamação crônica, dieta rica em gorduras, pobre em frutas e verduras e fontes endógenas como a fuga de oxidantes da mitocôndria. Muitos estudos têm provido mais do que simples associação entre agentes carcinogênicos e dano oxidativo do DNA por medir a indução de enzimas de reparo de carcinogênese oxidativa e pela demonstração da supressão da carcinogênese oxidativa por administração de antioxidantes. O contínuo dano oxidativo ao DNA está associado com o desenvolvimento da maioria dos cânceres, como os do cólon, do pulmão, do reto e da próstata (HERCBERG *et al* 1998; HALLIWELL, 2000).

1.4 Antioxidantes

Os organismos aeróbios, dependentes do metabolismo oxidativo, em sua evolução adaptativa à atmosfera rica em oxigênio, desenvolveu um sistema de defesa antioxidante para detoxificar as formas reativas de oxigênio e nitrogênio. Sob condições fisiológicas normais, o estresse oxidativo produzido por radicais livres é combatido por um complexo sistema de defesa antioxidante. Os antioxidantes são substâncias que, quando presentes em baixas concentrações, comparadas aos substratos oxidáveis, previnem significativamente a oxidação destes substratos (FANG, 2002; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999c).

Os seguintes mecanismos de ação dos antioxidantes foram propostos: atuam como inibidores das reações dos radicais (ROVER *et al*, 2000); impedem o ataque sobre os aminoácidos das proteínas e evitam a formação de lesões e perda da integridade celular (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Os antioxidantes, conforme o mecanismo de ação, são classificados em antioxidantes

primários e secundários. Os primeiros atuam interrompendo a cadeia da reação através da doação de elétrons ou de hidrogênio aos radicais livres, convertendo-os em produtos termodinamicamente estáveis. Os antioxidantes secundários atuam retardando a etapa de iniciação da autooxidação, por diferentes mecanismos que incluem formação de substâncias complexas com metais; seqüestro de oxigênio; decomposição de hidroperóxidos para formar espécie não radical; absorção de radiação ultravioleta ou desativação do oxigênio singlete (MELO; GUERRA, 2002). Diversas substâncias endógenas e exógenas atuam em sinergismo, compondo um sistema antioxidante (SEN; PACKER, 2000), que inclui enzimas tais como superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase (GPx), e também substâncias não enzimáticas como a glutathione (GSH), α -tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico, carotenóides, urato e flavonóides entre outros de menor contribuição (NIJVELDT *et al*, 2001).

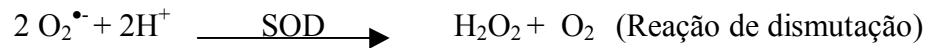
O sistema de defesa antioxidante humano inclui antioxidantes produzidos no próprio organismo e também de fontes externas (nutricionais), que podem prevenir a formação de ERO, remover os radicais antes que ocorra dano, reparar o dano oxidativo, eliminar moléculas danificadas e prevenir mutação (LAMPE, 1999).

1.4.1 Antioxidantes endógenos

Os antioxidantes endógenos são sintetizados no próprio organismo humano que compõem um sofisticado sistema enzimático (principalmente o trinômio superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase) e não enzimático de defesa (tripeptídeo glutathione) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999c).

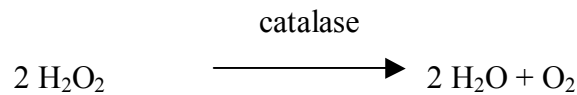
Superóxido dismutase

A superóxido dismutase (SOD) é uma metaloenzima presente nos organismos aeróbicos sob três formas distintas, de acordo com a presença do cofator metálico no sítio ativo: o cobre e Zinco (Cu/Zn- SOD); o manganês (Mn-SOD) e o ferro (Fe-SOD). As SODs são encontradas no citosol de células eucariontes, na mitocôndria e no espaço celular dos mamíferos e catalisam a conversão do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (reação de dismutação). O $O_2^{\bullet-}$ é a base para outras formas ativas de oxigênio e o H_2O_2 , por sua vez, é capturado e degradado através da ação da catalase e peroxidase.



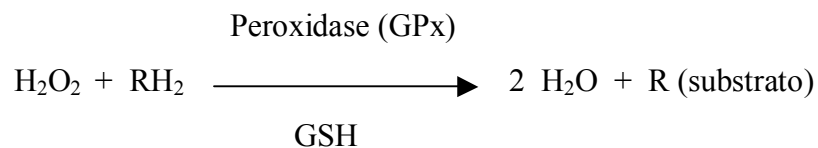
Catalase

A catalase se encontra em abundância em todos os tecidos (perixomas), sendo escassa no cérebro, no coração e no músculo esquelético, componente do fígado e possui como sítio ativo um grupo heme (Fe II). Catalisa a inativação do H_2O_2 , convertendo-o em O_2 e H_2O .



Peroxidases

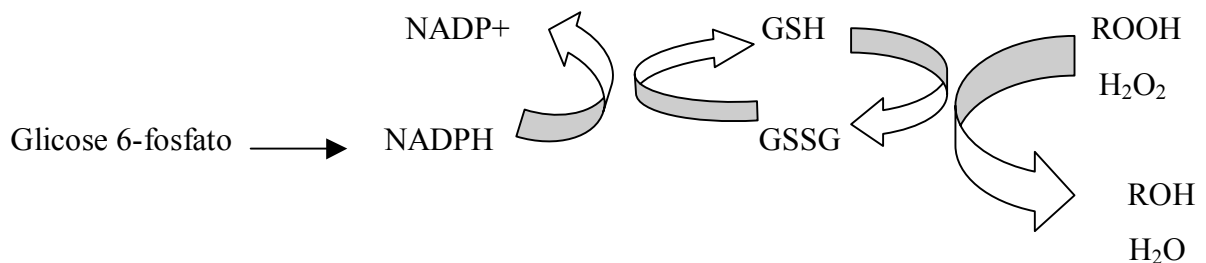
Peroxidases são enzimas que usam vários doadores de elétrons para reduzir o H_2O_2 a H_2O . A principal peroxidase em vertebrados é a glutathiona peroxidase (GSH-Px). Nesta reação, o tripeptídeo glutathiona (GSH), o substrato, é oxidado formando um dissulfeto, mas a glutathiona redutase (GR) converte novamente a GSH, usando NADPH. A reação mostrada a seguir exemplifica um sistema complexo de várias reações que envolvem GSH, o ciclo redox da GSH.



Ciclo Redox da Glutathiona

A GSH é o maior composto tiol de baixo peso molecular em vegetais e animais, constituindo-se num importante antioxidante natural. Tanto pode estar presente na dieta humana como pode ser sintetizado no organismo humano (síntese de novo); sendo, portanto, considerado um antioxidante endógeno e exógeno. Detoxifica metabólitos reativos de oxigênio oriundos do ambiente e do próprio organismo. O GSH é um tripeptídeo (L γ -glutamina, L-cisteína-glicina), contém na cadeia cisteína um grupo funcional $\text{CH}_2\text{-SH}$ que serve como um sítio ativo para muitos

tióis. Uma característica dos tióis é atuar como um agente redutor, aceitando elétrons das ERO, neutralizando-os e transformando-os em espécies menos tóxicas. O tiol será oxidado a dissulfeto (C–S–S–C) e um radical tiiil (C–S•) é produzido quando o tiol perde um átomo de H do grupo SH. O radical tiiil pode ser recombinado para dissulfeto e este poderá ser reduzido para GSH através da glutathiona dissulfeto redutase. Esta regeneração necessita de NADPH, mantido pelo metabolismo da glicose. O ciclo redox da glutathiona mantém uma relação elevada da glutathiona reduzida (GSH) sobre a glutathiona oxidada (GSSG), constituindo-se no principal mecanismo solúvel de defesa antioxidante celular não-enzimática.



Glutathiona S-transferases

As glutathiona S-transferases são um grupo de enzimas que catalisam a formação de tioésteres pela adição de GSH a um grande número de compostos que contêm um carbono eletrofílico. Este conjunto de enzimas é importante na biotransformação de xenobióticos e inclui-se como enzimas de biotransformação de fase II (SAGARA *et al*, 1998).

1.4.2 Antioxidantes exógenos

Entre os antioxidantes nutricionais, o ácido ascórbico é considerado o principal antioxidante hidrossolúvel. A vitamina C atua na fase aquosa como um antioxidante sobre os ERO, mas não é capaz de agir nos compartimentos lipofílicos para inibir a oxidação dos lípidios. A vitamina C reage com O_2 , H_2O_2 e $\bullet OH$, neutralizando ainda o oxigênio singlete. Por outro lado, estudos "*in vitro*" mostraram que essa vitamina, em baixa concentração e na presença de metais de transição, tais como o ferro, pode atuar como uma molécula pró-oxidante e gerar H_2O_2 e $\bullet OH$. Do ponto de vista biológico, a propriedade mais interessante do ácido ascórbico é sua habilidade em atuar como agente redutor, agindo sobre diversos radicais

livres, principalmente na ação indireta como um antioxidante, regenerando o α -tocoferol resultando no radical ascorbil. Este pode ser removido por dismutação, produzindo ascorbato (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999c).

β -caroteno

O β -caroteno é encontrado, especialmente, em vegetais e frutas de cor amarelo laranja. Possui a importante função biológica em humanos de conversão para vitamina A, quando ocorre a deficiência desta, podendo gerar 2 moléculas de vitamina A. É reconhecido como um efetivo inativador do oxigênio singlete; para cada molécula de β -caroteno ingerido, pelo menos 1000 moléculas de oxigênio singlete são inativadas. Estudos epidemiológicos em humanos sugerem que o β -caroteno é um protetor contra o câncer, exercendo este efeito independente do seu papel de precursor de vitamina A (OLSON, 1999).

α -tocoferol

O α -tocoferol, um constituinte lipossolúvel da membrana celular, que reage com H_2O_2 e OH^\bullet protegendo a membrana dessas ERO, tem sua maior ação antioxidante ao reduzir a propagação das espécies radicais peroxil (LOO^\bullet). O mecanismo de ação do α -tocoferol envolve a perda do átomo de H (doação de hidrogênio lábil) durante a redução do LOO^\bullet para $LOOH$, resultando o radical α -tocoferoxil ($\alpha-T^\bullet$), um radical menos reativo, suficientemente estável para bloquear a reação em cadeia dos radicais livres com os ácidos graxos poliinsaturados. O $\alpha-T^\bullet$ poderá ser novamente convertido a α -tocoferol pela ação redutora do ácido ascórbico. Outra atividade antioxidante importante do α -tocoferol é sua habilidade para desativar o oxigênio singlete, embora seja menos eficiente que o β - caroteno e o licopeno (STAHL; SIES, 1999).

Flavonóides

Entre os antioxidantes presentes nos vegetais, os mais ativos e freqüentemente encontrados são os compostos fenólicos, tais como os flavonóides (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Os flavonóides pertencem a um grupo de substâncias vegetais naturais e são encontrados em frutas, verduras, grãos, flores, sucos, chás e vinhos. Os quatro principais

grupos de flavonóides são flavonas, flavononas, flavonóis e antocianinas. Os flavonóides podem interferir com diferentes sistemas produtores de radicais e também aumentar a função dos antioxidantes endógenos. Ao reagirem com os radicais, são oxidados por estes, resultando num radical mais estável e menos reativo.

Estes compostos têm a capacidade de doar H e, portanto, inibir as reações em cadeia provocadas pelos ERO. Determinados flavonóides podem reagir diretamente com superóxidos, enquanto outros reagem com óxido nítrico, inibindo a interação entre radicais livres e óxido nítrico, na formação de peróxido-nitritos que oxidam LDL no processo de isquemia-reperfusão. Devido a LDL oxidada está implicada no desenvolvimento da aterosclerose, a atividade antioxidante dos flavonóides contribui com efeitos benéficos sobre o sistema cardiovascular. A rota da xantina oxidase, que reage com oxigênio molecular resultando em ânion superóxido, importante na injúria tecidual, especialmente após o fenômeno isquemia-reperfusão, também é inibida por flavonóides (NIJVELDT *et al*, 2001; KNEKT; LOFT, 2003).

Licopeno

O licopeno é um carotenóide constituído somente por átomos de carbono e hidrogênio que contém 11 ligações duplas conjugadas e 2 ligações não conjugadas, um isômero de cadeia aberta do β -caroteno. Sua fórmula molecular é $C_{40}H_{56}$ e seu peso molecular é de 53685 daltons. Na biossíntese dos carotenóides, o licopeno é uma molécula de posição central, estando na rota da biotransformação a partir do C-40 (fitoeno), o qual é enzimaticamente desnaturado sucessivamente para ζ -caroteno, neurosporeno, licopeno, β -caroteno e oxocarotenóides.

Os carotenóides, corantes naturais presentes em várias frutas e vegetais, são sintetizados e estocados no aparato fotossintético, constituindo-se em defesa contra a fotooxidação. O licopeno é um pigmento vermelho que absorve a luz na fotossíntese, e que, particularmente protege as plantas da fotooxidação (DI MASCIO *et al*, 1989; STAHL; SIES, 1999). A ação antioxidante dos carotenóides envolve a transferência da energia excitada do 1O_2 para o carotenóide. Através da sua rotação e interação com solventes à sua proximidade, o carotenóide dissipa a energia excitada. Entre os carotenóides distribuídos em tecidos humanos, o licopeno está entre os maiores níveis e com grande variação na sua distribuição. Não possui atividade de pró-vitamina A, entretanto, é o carotenóide sequestrador mais

eficiente de $^1\text{O}_2$, e também possui ação sobre radicais peróxidos, dióxido de nitrogênio, radical til e sufonil, sendo ao menos duas vezes mais eficiente que o β -caroteno sobre os radicais peróxidos, e o mais eficiente seqüestrador de radicais (STAHL; SIES, 1999; RAO; SHEN, 2002).

A estrutura com cadeia aberta do licopeno e as duplas ligações não conjugadas aumentam sua capacidade seqüestradora, devido ao baixo nível de energia que possuem, o que permite ao licopeno aceitar o estado mais excitado do oxigênio, reduzindo o risco de câncer pelo ataque ao DNA e às membranas lipídicas por oxidação (DI MASCIO *et al* 1989). É aceito como um supressor mais ativo da proliferação celular que o β -caroteno, e estudos "*in vivo*" ressaltam esta atividade supressora tumoral do licopeno (STAHL; SIES, 1999).

A maior parte do licopeno ingerido é excretado nas fezes, concentrando-se mais no fígado do que outros órgãos; no entanto, níveis fisiológicos de licopeno são assimilados por outros órgãos como mamas, próstata, pulmão, cólon e pele (BOILEAU *et al*, 2000). Os níveis plasmáticos de licopeno, situam-se entre 0,22 e 1,06 nmol/ml, contribuindo com 21 a 43% do total dos carotenóides. O licopeno no plasma consiste numa mistura isômera, sendo que os isômeros *cis* contribuem com 50% do licopeno total. A meia vida plasmática do licopeno é de 2 a 3 dias (STAHL; SIES, 1999).

As frutas e vegetais são fontes de uma variedade de carotenóides, e estudos de Paetau *et al* (1998) relatam que o consumo de frutas e legumes aumenta os níveis plasmáticos de carotenóides. Entre as frutas destacam-se como fontes de licopeno o mamão, a goiaba, a pitanga e o tomate (STAHL; SIES, 1999; PAETAU *et al* 1998).

Adélia Rodríguez-Amaya (1999) em seu trabalho sobre fontes de carotenóides, apresenta os seguintes valores de licopeno: em tomates espécie Santa Cruz (*Lycopersicum esculentum*): 31 ± 20 μg de licopeno/g de fruta; 40 ± 6 μg de licopeno/g de mamão Tailândia (*Carica papaya*), 53 ± 6 μg de licopeno/g de goiaba vermelha (*Psidium guajava*); e $73 \pm$ μg de licopeno/g de pitanga (*Eugenia uniflora*).

No entanto, a absorção do licopeno e de carotenóides pode ser influenciada por diversos fatores. Segundo Rodríguez-Amaya (1999), os carotenóides se encontram em níveis maiores na casca em vez da polpa, aumentam consideravelmente durante a maturação e são maiores em alimentos oriundos de lugares de clima quente.

A influência dos fatores climáticos e geográficos podem ser exemplificadas em frutas como mamão; aqueles oriundos do estado da Bahia contém maiores níveis de licopeno que os provenientes do estado de São Paulo. A goiaba descascada, ao contrário de outras frutas, possui a maior relação μg licopeno/g de fruta, pois seu conteúdo de licopeno está concentrado na polpa e a concentração de licopeno parece também crescer com o estado de maturação das frutas (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999).

Deve-se considerar que, para a digestão, absorção e metabolismo dos carotenóides, vários passos são necessários: 1) o alimento matriz deve ser digerido; 2) os carotenóides devem combinar-se com sais biliares formando as micelas; 3) as micelas devem mover-se para as membranas das vilosidades intestinais, liberando os carotenóides; 4) dentro do enterócito, devem ser metabolizados, podendo ser re-secretados dentro do lúmen, formando as células de “turnover”, ou os carotenóides podem ser incorporados nos quilomicra secretados na linfa. Os quilomicra então transportam os carotenóides para o fígado, onde podem ser estocados ou resintetizados em lipoproteínas de baixa densidade (VLDL). Pela ação das lipases lipoproteicas, entram nos tecidos extrahepáticos, podendo ser acumulados na forma de LDL e HDL (LEE *et al*, 1999).

Em diversos estudos sobre a absorção do licopeno, o tomate destaca-se entre as fontes dietéticas. De acordo com Rodríguez-Amaya (1999) a absorção dos carotenóides é estimulada pela presença de lipídios, da mesma forma para Stahl e Sies (1999), o cozimento do suco de tomate na presença de 1% de óleo de milho incrementou significativamente a absorção de licopeno, sendo que possíveis fatores melhoram a biodisponibilidade do licopeno em produtos de tomate processado, podendo ocorrer a liberação do carotenóide pela ruptura térmica da parede celular e a mistura do licopeno no óleo serve como um veículo, facilitando a absorção.

A maioria do licopeno encontrado em tomates e seus derivados está sob a forma *trans*, contrastando com os níveis nos tecidos biológicos, incluindo o soro (STAHL; SIES, 1999). Entretanto, quando o tomate recebe processamento térmico, ocorre uma menor isomerização na forma *trans* sem mudança significativa na composição isômera *cis*. Aceita-se que o conteúdo de fibra do tomate pode contribuir para a isomerização na forma *trans*. O licopeno na forma *trans* é uma molécula mais longa devido à extensão de sua cadeia, enquanto o licopeno *cis* apresenta uma cadeia menor. Apesar de ambas as formas serem pouco solúveis em água, a forma *cis* parece ter melhor solubilidade e menor capacidade de cristalização, além de ser melhor incorporada nas micelas de sais biliares (BOILEAU *et al*, 2000).

Durante o processo de amadurecimento, a concentração de carotenóides aumenta entre 10 a 14 vezes devido, principalmente, ao acúmulo de licopeno, ao mesmo tempo que decresce o conteúdo de clorofila, mudando as características dietéticas e organolépticas da fruta (BRAMLEY, 2002).

As plantas sintetizam carotenóides via 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DOPX). Em uma das etapas desta via, ocorre a participação das enzimas: fitoeno sintetase (PSY) e licopeno β -ciclase (LCY-B). O tomate possui dois genes para a PSY (PSY- 1 e PSY- 2). As formas PSY- 2 e LCY-B predominam nos tecidos verdes e não são importantes para a carotegênese no amadurecimento das frutas. Na formação do licopeno, os níveis de PSY-1 estão aumentados enquanto a LCY-B está diminuída; esta última enzima participa na conversão do licopeno para outras formas de carotenóides (BRAMLEY, 2002). Segundo Giovannuci (1999) as cores das espécies de tomate diferem do amarelo para o vermelho alaranjado, dependendo da razão licopeno/beta-caroteno da fruta, o qual também está associado com a presença da enzima beta-ciclase, que participa da transformação do licopeno em beta-caroteno.

As primeiras observações sobre as atividades biológicas do licopeno foram reportadas por Ernster *et al* (1959), mostrando que a injeção intraperitoneal de licopeno aumentou a sobrevivência de ratos irradiados (STAHL; SIES, 1999).

O interesse mais recente no licopeno e seu potencial papel preventivo sobre o câncer, iniciou quando Giovannuci *et al* (1995) demonstraram uma inversa relação entre a ingestão dietética de licopeno e a incidência do câncer de próstata (BOILEAU *et al*, 2000). Giovannuci (1999), em revisão literária nas publicações em língua inglesa, relata que, entre 72 estudos, 57 deles reportam uma inversa associação entre a ingestão de tomate ou o nível de licopeno sanguíneo e o risco de câncer, sendo que 35 destes estudos foram estatisticamente significativos, enquanto que nenhum estudo indicou que o alto consumo de tomate ou o nível de licopeno elevou o risco para o câncer.

Os níveis séricos e teciduais de licopeno, a ingestão de tomates e seus produtos derivados têm sido relacionados com o decréscimo do risco para doenças crônicas como o câncer e também as cardiovasculares. As propriedades antioxidantes do licopeno foram primeiramente responsáveis por estes benefícios, mas sugere-se que outros mecanismos, como a modulação da comunicação intracelular (junções celulares), o sistema hormonal-

imunológico e rotas metabólicas possam estar igualmente envolvidas. Diversos estudos com animais e humanos observaram que o licopeno regula a comunicação entre as junções celulares e que a deficiência desta comunicação está presente em muitos tipos de cânceres (RAO; AGARWAL, 2000).

Produtos derivados do tomate, incluindo ketchup, suco de tomate e molho para pizza, fornecem 80% do licopeno da dieta de norte-americanos (ARAB; STECK, 2000) que, por ser lipossolúvel, pode prover grande proteção antioxidante para moléculas lipídicas e protéicas. A ingestão de tomates e derivados aumentam os níveis séricos de licopeno além de diminuir os níveis de lipídios oxidados, mensurados pelo TBARS, os níveis da oxidação protéica, mensurados pela perda do grupo tiol (-SH), e os níveis do dano oxidativo ao DNA, verificado pela mensuração de 8-hidroxi guanosina (RAO; AGARWAL, 2000).

Em estudo realizado com 578 homens que desenvolveram câncer de próstata, os resultados sugerem que os níveis de licopeno plasmático mantiveram relação entre a ingestão de tomate e o risco para desenvolver câncer de próstata (GANN *et al*, 1999). A ingestão de derivados do tomate, além de aumentar os níveis séricos de licopeno, também diminuiu os níveis séricos de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (RAO; ARGAWAL, 2000). Em outro estudo, publicado por estes mesmos autores, avaliando o efeito da dieta nos níveis séricos de licopeno e de peroxidação lipídica em fumantes, verificaram que a dieta isenta de licopeno resultou no aumento do TBARS e depleção do licopeno sérico. Repetidas determinações do TBARS feitas durante um tratamento de 17 pacientes revelaram um aumento de 20% no TBARS do plasma de todos os 5 pacientes com câncer de próstata e em 8 de 12 pacientes com câncer de pulmão (MUINDI *et al*, 1994). A etiologia do câncer de mama é ainda pouco conhecida, entretanto, dietas ricas em gorduras, vinculadas a estresse oxidativo e a peroxidação lipídica têm sido sugeridas como um importante papel na carcinogênese. Produtos da peroxidação lipídica podem acumular-se no tecido mamário. O malondialdeído (MDA), o principal produto da peroxidação lipídica, revelou-se significativamente elevado em pacientes com câncer de mama em relação aos pacientes controles, não portadores de câncer (WANG *et al*, 1996). Em células expostas a nitrilotriacetato férrico e ascorbato, a suplementação de licopeno reduziu em 86% a peroxidação lipídica (TBARS), e 77% os níveis de 8-hidroxiguanosina (MATOS *et al*, 2000). A incidência e multiplicidade de adenomas e carcinomas pulmonares decresceu significativamente em ratos suplementados com licopeno em relação ao grupo controle (KIM *et al*, 2000). A administração de licopeno em ratos inibiu

a carcinogênese gástrica induzida por N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina, com diminuição da lipoperoxidação lipídica e aumento de glutatona reduzida, glutatona peroxidase, glutatona S-transferase e glutatona redutase, sugerindo que o licopeno pode exercer um efeito modulador no oxidante e no status antioxidante na mucosa gástrica (VELMURUGAN *et al*, 2002).

Levy *et al* (1995), utilizando cultura de células tratadas com licopeno, observaram inibição da proliferação de células cancerosas em mamas e pulmão de humanos. Este efeito inibidor do licopeno foi maior que o observado com a utilização de α -caroteno, o qual necessitava de uma dose 10 vezes maior para atingir o mesmo efeito supressor do licopeno. Da mesma forma, a dosagem de beta-caroteno para o mesmo efeito supressor de licopeno, necessitou ser 4 vezes maior.

A característica lipofílica do licopeno permite sua localização nas membranas celulares e LDL plasmática, possibilitando reduzir a susceptibilidade da LDL à oxidação. Estima-se que há aproximadamente 2300 moléculas de lipídios oxidáveis em cada molécula de LDL.

Também reconhece-se que o licopeno pode ter um efeito inibidor sobre a síntese de colesterol por inibição da HMG-CoA redutase além de estimular a atividade de receptor no macrófago, o que leva ao aumento da frequência na degradação da LDL plasmática, e assim, aumentar a remoção da LDL. O estudo multicêntrico EURAMIC (1997) observou capacidade antioxidante do licopeno nos indivíduos com altas taxas de gorduras polinsaturadas (KOLLMEIR *et al*, 1997) . Arab e Steck, 2000 relatam redução no risco de infarto do miocárdio em pessoas que possuem altas concentrações de licopeno no tecido adiposo.

Estudos indicam que pessoas que consomem tomate e seus derivados são menos susceptíveis ao câncer, coronariopatias, doenças que estão entre as maiores causas de morbimortalidade nas últimas décadas. Constituindo-se o tomate como a maior fonte de licopeno dietético na América do Norte (ARAB; STECK, 2000; DEWANTO *et al*, 2002).

Outras fontes possuem uma concentração de licopeno semelhante ao tomate e seus derivados, como mamão, pitanga, melancia e goiaba, e merecem ser estudadas quanto as suas propriedades antioxidantes. Entretanto as frutas e os vegetais contém na sua composição diversos fitoquímicos, além do licopeno, considerados protetores á saúde dos seres humanos

(AMES *et al*, 1995)

Zhao *et al* (1998), relataram que a adição de licopeno na ração alimentar de ratos correlaciona-se com os níveis de licopeno no tecido hepático.

Estudos em humanos apontam que pequenas doses (5mg-20mg) de licopeno, correspondentes a doses dietéticas, já seriam suficientes para a redução de estresse oxidativo (RAO; SHEN, 2002).

A goiaba é um fruto nativo da costa atlântica brasileira, de fácil disponibilidade o ano todo, que, além de ser fonte de licopeno, destaca-se por seu rico conteúdo em vitamina C.

Muitos trabalhos reconhecem a goiaba por apresentar capacidade antimicrobial, anti-diarréica e protetora contra os danos de isquemia-reperusão (YAMASHIRO *et al*, 2003; LOZOYA *et al*, 2002; ABDELRAHIM *et al*, 2002). Em relação à sua capacidade antioxidante, os resultados apontados por Jimenez *et al*. (2001) sugerem um efeito antioxidante atribuído a polifenóis e fibra dietética, e apenas consideram a possibilidade da participação de outros antioxidantes, como a vitamina C e carotenóides. Verifica-se que na literatura científica há uma lacuna em estudos que estabeleçam relação entre goiaba/licopeno e capacidade antioxidante correspondente.

O presente trabalho tem por objetivo comparar o efeito antioxidante do licopeno presente no tomate (uma fonte bem detalhada na literatura científica) e a goiaba (ainda incipiente na literatura pertinente), sobre o estresse oxidativo induzido por dieta tipo cafeteria em ratos.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Comparar o efeito antioxidante da adição do licopeno existente no tomate e na goiaba sobre o estresse oxidativo induzido por dieta tipo “cafeteria”, no fígado de ratos adultos.

2.2 Específicos

- Avaliar o estado nutricional por meio da variação ponderal dos animais;
- Determinar os níveis hepáticos dos tripeptídeos: glutathiona na forma total (GT), reduzida (GSH) e oxidada (GSSG);
- Determinar os níveis hepáticos de enzimas antioxidantes:
 - ✓ catalase;
 - ✓ superóxido dismutase (SOD);
 - ✓ glutathiona peroxidase (GPx);
 - ✓ glutathiona s-transferase (GST);
 - ✓ glutathiona redutase (GR).
- Avaliar a peroxidação lipídica por meio da análise do ácido tiobarbitúrico (TBARS).
- Estabelecer correlação entre os diferentes parâmetros acima com o status antioxidante do fígado de ratos tratados e não tratados com tomate e goiaba.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

Foram utilizados ratos machos adultos da linhagem Wistar, provenientes do Biotério Central da UFSC, com pesos de aproximadamente 150g, no início do tratamento. No laboratório, os 32 animais foram divididos em quatro grupos (n=8), segundo a dieta as quais foram submetidos e mantidos individualmente em gaiolas metabólicas, em temperatura ambiente, recebendo água *ad libitum*, em ciclo claro-escuro de 12 horas, durante um período de aclimatação de uma semana.

Os animais foram tratados durante 4 semanas (28 dias), período suficiente para observar o efeito da dieta sobre o estresse oxidativo. Transcorrido o período do experimento, os animais foram sacrificados, sendo a cavidade abdominal aberta e imediatamente após, o fígado foi perfundido com solução salina (NaCl 0,9%) à baixa temperatura para retirar o excesso de sangue, posteriormente extraído do animal e pesado.

As determinações bioquímicas hepáticas efetuadas foram: as enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione s-transferase (GST), glutathione reductase (GR), e os tripeptídeos glutathione na forma total (GT), reduzida (GSH) e a oxidada (GSSG), e os níveis de lipoperoxidação total pela análise do ácido tiobarbitúrico (TBARS).

A variação ponderal foi observada pelo registro semanal do peso corpóreo em balança marca Coleman, modelo PW 30-15. O consumo alimentar foi determinado diariamente (balança de precisão, modelo PR1000 NW), através do controle resto e ingesta dos alimentos ofertados.

3.2 Formulação das Dietas

Os animais foram divididos em quatro grupos, de acordo com os tratamentos administrados descritos abaixo:

Grupo 1 - controle: a dieta controle foi preparada de acordo com as normas do *Committee on Laboratory Animal Diets* (1979), e modificada segundo as recomendações da AIN-93M (REEVES *et al*, 1993). A sua composição pode ser observada na tabela 1:

Tabela 1: Formulação (g/100g) da dieta controle.

Formulação	%
Caseína	14
Mistura de Sais Minerais	3,5
<i>Tert</i> -butilhidroquinona	0,08
Bitartarato de Colina	0,25
L-Cistina	0,18
Mistura Vitamínica	1
Celulose	5
Açúcar	10
Amido de milho	64
Óleo de soja	4

Grupo 2 - “cafeteria”: hiperenergética/hiperlipídica;

Grupo 3 - “cafeteria”: hiperenergética/hiperlipídica mais licopeno, suplementação de 5g de tomate seco (aproximadamente 5mg de licopeno);

Grupo 4 - “cafeteria”: hiperenergética/hiperlipídica mais licopeno, suplementação de 5g de goiaba seca (aproximadamente 5 mg de licopeno).

A dieta tipo “cafeteria” - hiperenergética/hiperlipídica foi composta pela dieta controle oferecida “ad libitum” e de alimentos variados de alta palatabilidade, seguindo os trabalhos de ROTHWELL; STOCK (1982) e FAGUNDES; KRETZER (1993). Foi utilizada a técnica dos

Blocos Incompletos Balanceados (BUSSAB; MORETTIN, 1991), na qual, os alimentos de três a três foram agrupados em 4 blocos, sendo 5g de cada alimento, totalizando 15g/dia por bloco, oferecidos em recipiente separado da dieta controle. Foram oferecidos os seguintes alimentos: salgado tipo “baconzitos”, biscoito sortido, pé de moleque, salgado tipo “cheetos” (bola ou tubo), biscoito coco, chocolate, suspiro, amendoim doce e salgado tipo “fandango de presunto”.

A quantidade de suplementação de licopeno proveniente das 5g de tomate em pó e 5g de goiaba vermelha em pó, oferecida diariamente misturada a dieta controle correspondeu à, aproximadamente, 5 mg de licopeno/dia (GÄRTNER; STAHL; SIES, 1997; RODRIGUEZ-AMAYA, 1999).

O valor de 5mg de licopeno foi utilizado com base nos trabalhos publicados por Rao e Shen, 2002 e em trabalho recente (dados ainda não publicados) realizado no Laboratório de Nutrição Experimental (UFSC).

O valor de 5mg de licopeno foi utilizado com base nos trabalhos publicados por Rao e Shen, 2002 e em trabalho recente (MOREIRA *et al*, 2002a) realizado no Laboratório de Nutrição Experimental da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.2.1 Preparo do pó de tomate e da goiaba

Tomates e goiabas maduras, provenientes de Florianópolis, adquiridas no comércio, foram higienizadas em água corrente, pesados em balança digital (Coleman, modelo PW 3015, capacidade 1500g e sensibilidade de 0,1g), cortados em pequenos pedaços e secados em estufa ventilada (marca Fanem, modelo 320SE) à 60C, por aproximadamente 48 horas, até a completa retirada de toda umidade. Após, foram triturados em liquidificador industrial (marca Visa, modelo LQ 4,0) e pulverizados em moinho (marca Fritsch modelo Pulverisette 14), e acondicionados em sacos plásticos e mantidos sob refrigeração. Uma amostra foi separada para a análise centesimal.

3.2.2 Determinação da composição centesimal do pó de tomate e da goiaba

A composição centesimal do pó de tomate e da goiaba foi determinada de acordo com os seguintes protocolos: a umidade (voláteis a 105° C), a cinza (resíduo mineral fixo) e os lipídios (extrato etéreo) segundo o protocolo do Instituto Adolfo Lutz (1976); a proteína foi determinada pelo teor de nitrogênio ($N \times 6,25$) segundo a AOAC (1980); a fibra segundo o método descrito por van Soest e Wine (1967) e os glicídios (nifext) foram determinados por diferença.

3.3 Obtenção das amostras para as determinações das atividades enzimáticas

Para a determinação dos antioxidantes hepáticos, os fígados dos animais foram dissecados, perfundidos (para retirar o excesso de sangue) com solução salina (NaCl 0,9%) e mantidos constantemente em gelo. Um pedaço de fígado foi secado superficialmente com papel-filtro e imediatamente pesado. As homogeneizações (diluições de 1:9, v:v) foram realizadas com tampão fosfato-Na 20 mM, pH 7,4, contendo 0,1% de Triton X-100 e 0,15 M de cloreto de sódio, constantemente mantido em gelo. Foram empregados cerca de 20 impactos em homogeneizador Potter-Elvehjem, seguidos de centrifugação a 10000 g durante 10 minutos, a 4°C. Os sobrenadantes foram mantidos a -170°C (nitrogênio líquido) até sua utilização. Foram separadas amostras para cada análise enzimática, no sentido de evitar perdas de atividade decorrentes de sucessivos descongelamentos-congelamento das mesmas (WILHELM FILHO *et al*, 1994).

3.4 Determinações Bioquímicas

3.4.1 Catalase

Pelo método descrito por Aebi (1984) foi determinado a catalase. Este ensaio quantifica a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio em 240 nm durante 20 segundos, pela enzima presente na amostra. Nesta determinação foi utilizada uma solução de peróxido de hidrogênio 10mM em tampão fosfato 50mM, pH 7,0, preparada e titulada no dia da análise, à qual eram adicionados 20 μ l da amostra e o valor da constante de velocidade da atividade da enzima (K) calculada nos 3-5 segundos iniciais. Todas as amostras foram analisadas em duplicata e os valores expressos em mmol min⁻¹ g⁻¹. Cálculo: CATALASE (mmol.min⁻¹.g⁻¹) = K x fatores de diluição (homogenato x cubeta) x 1,5, (60s divididos pelo coeficiente de extinção molar de H₂O₂ = 40) onde K é a constante de velocidade da atividade da enzima calculada no programa (GBCUV-Kinetics) em um computador acoplado ao espectrofotômetro. Os fatores de diluição utilizados foram: 20x para homogenato (0,1g de homogenato em 1,9ml de tampão) e 100x para a cubeta (20 μ l do homogenato em 2 ml de volume final).

3.4.2 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi medida espectrofotometricamente em 480 nm, de acordo com o método de Misra e Fridovich (1972), modificado por Boveris *et al* (1983), mediante a oxidação da adrenalina (mudança de pH 2,0 para pH 10,0), que forma o ânion superóxido e um cromóforo róseo, o adrenocromo, onde a enzima presente na amostra retarda sua formação. Numa cubeta contendo glicina 50 mM, pH 10,2, foi adicionado adrenalina 60 mM (mantida em pH em torno de 2,0, gelo e frasco âmbar para evitar a oxidação). A velocidade de formação do adenocromo foi monitorada durante cerca de 100 segundos do início da reação (com acréscimo de absorvância a cada intervalo de 15 segundos em torno de 0,013-0,015 unidades), para então adicionar a alíquota da amostra, geralmente em torno de 10 a 70 μ l, dependendo da concentração e atividade da enzima presente na amostra. O tempo total de monitoramento da reação foi de 3 minutos. Curvas de 3 a 5 pontos permitiram avaliar indiretamente a atividade da SOD nestas condições. Os valores da SOD (U SOD g⁻¹) foram expressos em termos de atividade da enzima, onde uma unidade de SOD é definida como a

quantidade de enzima necessária para diminuir à metade a velocidade espontânea de formação do adrenocromo.

3.4.3 Glutathione peroxidase (GPx)

A determinação da glutathione peroxidase foi realizada segundo o método de Flohé e Gunzler (1984). Nesta determinação a enzima catalisa a redução do peróxido de hidrogênio, bem como de outros hidroperóxidos, utilizando a glutathione reduzida (GSH) como cofator para esta reação, produzindo glutathione oxidada (GSSG). Foi utilizado 10µl da amostra e 10µl de tert-butilhidroperóxido (t-BuOOH) colocados em 1ml de meio de reação composto por 25ml de tampão fosfato 0,1M, pH 7.0, 8,6mg de NADPH, 10ml de ácido dietilenotriaminopentacético (DPTA) 5mM, pH 7.0, 15ml de água destilada, 24mg de glutathione redutase (GR), e 5U de glutathione reduzida (GSH), colocada momentos antes do ensaio. Este ensaio é baseado na medida do decréscimo da absorvância promovido durante a redução da GSSG catalisada na presença de NADPH. A velocidade de oxidação do NADPH é proporcional à velocidade de produção da GSSG, a partir da GSH em presença de t-BuOOH, catalisada pela GPx. Os valores da atividade da GPx foram expressos em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$. Cálculo: $\text{GPx } (\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}) = (K - K_1) / 6,22 \times \text{fatores de diluição (homogenato} \times \text{cubeta)}$, onde K é a constante de velocidade da atividade da enzima calculada no programa (GBCUV-Kinetics) em um computador acoplado ao espectrofotômetro, K_1 corresponde à absorvância do branco e 6,22 corresponde ao coeficiente de extinção molar ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) do NADPH. Os fatores de diluição utilizados foram: 20x para homogenato (0,1g de fígado em 1,9ml de tampão) e 102x para cubeta (10µl do homogenato em 1020µl de volume final).

3.4.4 Glutathione S-transferase (GST)

As determinações da enzima da glutathione S-transferase foram medidas espectrofotometricamente em 340nm de acordo com Keen *et al* (1976). As glutathiones S-transferases são um grupo de enzimas que catalisam a formação de tioésteres, pela adição de GSH a um grande número de compostos que contém um carbono eletrofílico. O método consiste na adição de 10µl da amostra em um meio contendo 10µl de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 0,1M (CDNB), 10µl de glutathione reduzida (GSH) 0,1M e 970µl de tampão

fosfato 0,1M, pH 7.0 na cubeta da amostra. Na cubeta de referência os 10 μ l de amostra são substituídos por 10 μ l do tampão. As análises foram feitas em duplicatas e os valores de atividade da enzima foram expressos em $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$. Cálculo: GST ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) = (K / 9,6) x fatores de diluição (homogenato x cubeta) onde 9,6 corresponde ao coeficiente de extinção molar ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) do CDNB, e K é a constante de velocidade da atividade da enzima calculada no programa (GBCUV-Kinetics) em um computador acoplado ao espectrofotômetro. Os fatores de diluição utilizados foram: 20x para o homogenato (0,1g de fígado em 1,9ml de tampão) e 100x para a cubeta (10 μ l do homogenato em 1ml de volume final).

3.4.5 Glutathione redutase (GR)

A glutathione redutase foi determinada pelo método proposto por Carlberg e Mannervick (1975). A amostra (50 μ l) foi adicionada a um meio de reação (950 μ l) contendo 25ml de tampão fosfato 0,1M, pH 7,0, 8,6mg de NADPH, 10ml de DPTA 5mM, pH 7,0, 30,6mg de glutathione oxidada (GSSG) e 15ml de água destilada, e, durante 30 segundos em 340nm, foi verificada a taxa de oxidação do NADPH, devido à redução da glutathione oxidada (GSSG) pela glutathione redutase presente na amostra. Os valores foram expressos em $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$. Cálculo: GR ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) = (K / 6,22) x fatores de diluição (homogenato x cubeta), onde 6,22 é o coeficiente de extinção molar ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e K é a atividade da enzima calculada no programa (GBCUV – Kinetics) em computador acoplado ao espectrofotômetro. Os fatores de diluição utilizados foram: 20x para o homogenato (0,1g de fígado em 1,9ml de tampão) e 20x para a cubeta (50 μ l do homogenato em 1ml de volume final).

3.4.6 Glutathione reduzida (GSH)

A concentração de glutathione reduzida em precipitado ácido de fígado foi determinada pelo método de Beutler *et al* (1963). A adição de 0,2ml de ácido 2-nitrobenzóico (DTNB) 2,5mM nas cubetas contendo 1,9ml de tampão fosfato 0,2M, pH 8,0 e 0,1ml do extrato ácido, permitia, após 3 minutos, a obtenção da formação máxima do ânion tiolato (TNB), de cor amarela, mensurável em 412nm. As concentrações foram expressas em mM de glutathione reduzida. Cálculo: GSH (mM) = (A_{412} / 14,1) x diluições (extrato ácido x cubeta x DTNB), onde A_{412} corresponde à absorvância em 412nm e 14,1 ao coeficiente de extinção molar ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

$^1\text{cm}^{-1}$) do ânion tiolato (TNB). Os fatores de diluição utilizados foram: 20x para o homogenato (0,1g de fígado em 1,9ml de tampão), 20x para a cubeta (0,1ml do homogenato em 2ml de volume final) e 1,1x do DTNB (0,2ml do DTNB em 2,2ml de volume final).

3.4.7 Glutathiona total (GT) e oxidada (GSSG)

Para esta análise utilizou-se o método enzimático descrito por Tietze (1969). Os reagentes utilizados foram: tampão fosfato 0,1M, pH 8.0; TCA 12%; DTNB 2,525mM (15mg em 15ml de citrato de sódio 1%); NADPH (PM=833,4 g/mol) 1,5mM (1,5 $\mu\text{mol/ml}$ NaHCO_3 = 2,5mg para 1ml NaHCO_3 0.5%); GR: 0,3U/ml (Sigma G3664 – 4,5 μ de GR par 1ml de tampão). Onde a baixa de oxidação do NADPH é utilizada na redução da GSSG catalisada pela GR, permite avaliar indiretamente a concentração da glutathiona total presente na amostra. As concentrações obtidas nesse ensaio foram expressas em (mM). Os valores de GSSG foram calculados em equivalentes (2 GSH \rightarrow GSSG). A partir da concentração da Glutathiona total (GT).

3.4.8 Determinação do dano celular (TBARS)

As substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram analisadas no fígado. O teste usado para avaliar o dano celular foi baseado no trabalho descrito por Ohkawa *et al* (1979) e Bird e Draper (1984). Os homogenatos dos tecidos foram precipitados pela adição de ácido tricloroacético (TCA) 12% e agitados vigorosamente por 5 segundos (1ml de TCA 12% para 100 μl da amostra). Em seguida foram incubados por 60 minutos a 100°C na presença de 0,9ml de tampão Tris-HCL 60mM, pH 7.4 (0,1mM DPTA) e 1ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,76%. Após a incubação, o material foi resfriado durante 30 minutos a 5°C, e posteriormente centrifugado por 5 minutos a 10000g. A leitura foi realizada em 535nm e a absorbância expressa em μmolg^{-1} . Cálculo: TBARS (nmolg^{-1}) = ($A_{535}/153$) x fatores de diluição (homogenato x tubo de ensaio). Os fatores de diluição utilizados foram: 20x para o homogenato (0,1 de fígado em 1,9ml de tampão) e 30x para o tubo de ensaio (0,1ml do homogenato em 3ml de volume final). A 535 corresponde à absorbancia em 535nm e 153 corresponde ao coeficiente de extinção molar ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) do malonaldeído, principalmente componente oriundo da lipoperoxidação.

3.5 Análise estatística

Para interpretação dos resultados, os mesmos foram apresentados em forma de tabelas e gráficos, representadas por média e erro padrão. Para análise estatística entre os grupos controle e o grupo cafeteria foi utilizado o teste "t" de Student e a análise de variância de uma via (ANOVA) com teste complementar pos-hoc de Newman-Keuls foi utilizado na comparação entre os grupos cafeteria, cafeteria + tomate e cafeteria + goiaba. Foi considerado um nível mínimo de significância de 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Consumo alimentar

No gráfico 1 estão apresentados os resultados relativos ao consumo alimentar em calorias e por macronutrientes dos animais.

Na análise do consumo energético entre o grupo controle e cafeteria, não foi observado uma diferença significativa. Na comparação entre o grupo cafeteria e os grupos cafeteria suplementados com tomate e goiaba, observou-se que os suplementados apresentaram um consumo energético significativamente maior ($p < 0,01$). Os animais do grupo controle e cafeteria consumiram carboidratos de forma semelhante. Quando comparado o grupo cafeteria aos grupos cafeteria suplementados de pó de tomate ou goiaba, observou-se um consumo significativamente superior de carboidratos nesses últimos grupos ($p < 0,01$).

Observou-se um consumo inferior de proteínas entre o grupo controle e o grupo submetido a dieta cafeteria. Entre o grupo cafeteria e os grupos cafeteria suplementados, destaca-se um consumo semelhante em proteína.

Na análise do consumo de lipídios, verificou-se que o consumo de lipídeos foi maior no grupo cafeteria quando comparado ao grupo controle ($p < 0,001$). Nos grupos cafeteria com adição de pó de tomate ou goiaba apresentaram consumo significativamente mais elevado em relação ao grupo cafeteria ($p < 0,001$).

Os grupos com consumo de dietas tipo cafeteria suplementados, assumem a condição de consumo hipercalórico pelo aumento verificado nos níveis de carboidratos e lipídeos. Destaca-se a condição hipercalórica associada ao baixo consumo protéico (gráfico 1).

Análise do consumo alimentar

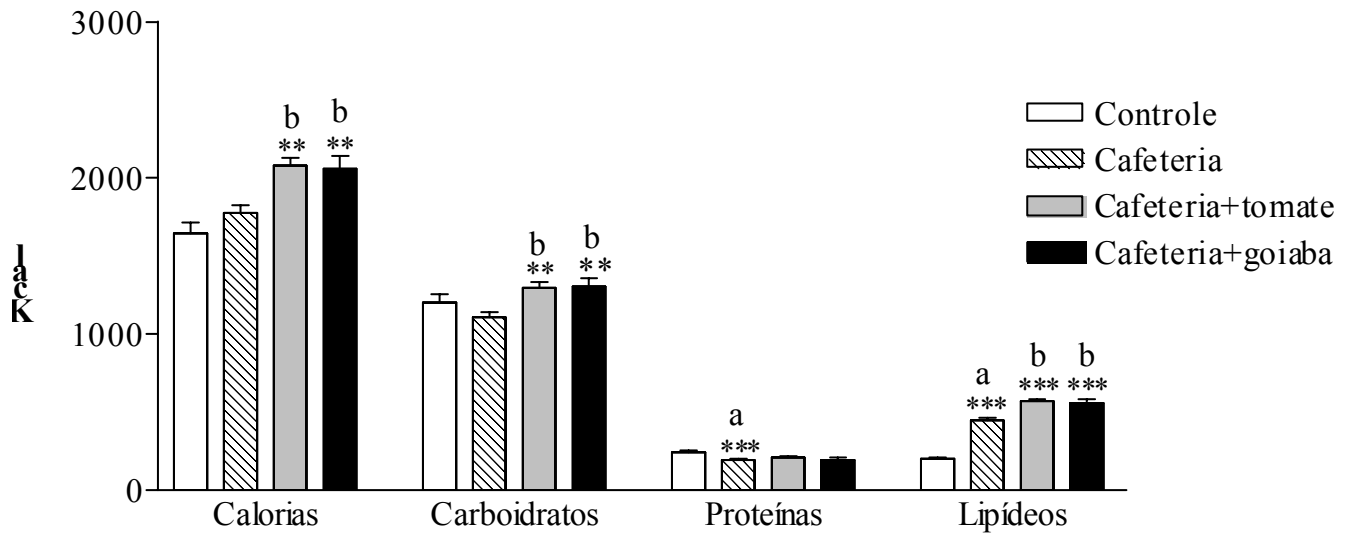


Gráfico 1. Os resultados estão representados por média e o erro padrão da média (n=8 animais por grupo experimental). O grupo controle e o grupo cafeteria foram comparados por teste "t" de Student, e os grupos cafeteria, cafeteria + tomate e cafeteria + goiaba foram comparados por ANOVA de uma via, seguida do teste pos-hoc Newman-Keuls. As letras significam diferenças estatisticamente significantes: a - cafeteria x controle; b - suplementação com tomate ou goiaba x cafeteria; **p<0,01 e ***p<0,001.

4.2 Análise do Peso Corporal dos Animais

Os índices de ganho de peso dos animais dos diferentes grupos estão apresentados na Tabela 2.

Os resultados da Tabela 2 estão representados como média e o erro padrão da média (n=8 animais por grupo experimental). O grupo controle e o grupo cafeteria foram comparados por teste "t" de Student, e os grupos cafeteria, cafeteria + tomate e cafeteria + goiaba foram comparados por ANOVA de uma via, seguida do teste pos-hoc Newman-Keuls. As letras significam diferenças estatisticamente significantes: a - cafeteria x controle; * p<0,05.

Observou-se diferença significativa do ganho de peso entre o grupo controle e cafeteria, no entanto, não foi observada diferença significativa no ganho de peso entre os três grupos cafeterias.

Tabela 2. Efeito da suplementação dietética com pó de tomate e goiaba sobre o ganho de peso dos animais.

Grupos experimentais	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Ganho de peso (g)
Controle	144,70 ± 2,34	262,99 ± 7,76	107,83 ± 5,74
Cafeteria	144,68 ± 2,70	253,55 ± 6,95	123,68 ± 4,28 ^a
Cafeteria + tomate	149,61 ± 4,48	257,75 ± 10,44	105,70 ± 7,29
Cafeteria + goiaba	150,64 ± 2,09	265,85 ± 9,55	113,13 ± 8,42

4.3 Análises Bioquímicas

4.3.1 Análise das Defesas Antioxidantes Enzimáticas

No gráfico 2 estão apresentados os resultados da análise da atividade enzimática da catalase (CAT). Não houve diferença significativa entre os grupos controle e grupo cafeteria. No entanto, verificou-se um decréscimo significativo ($p < 0,001$) dos níveis de CAT nos grupos cafeteria suplementados de pó de tomate ou goiaba em relação ao grupo cafeteria, sendo que a maior diminuição foi observada no grupo tomate. Estes dados indicam efeito distinto entre as dietas cafeteria sobre o balanço oxidativo, sugerindo que o tomate tenha apresentado um efeito mais significativo do que a goiaba.

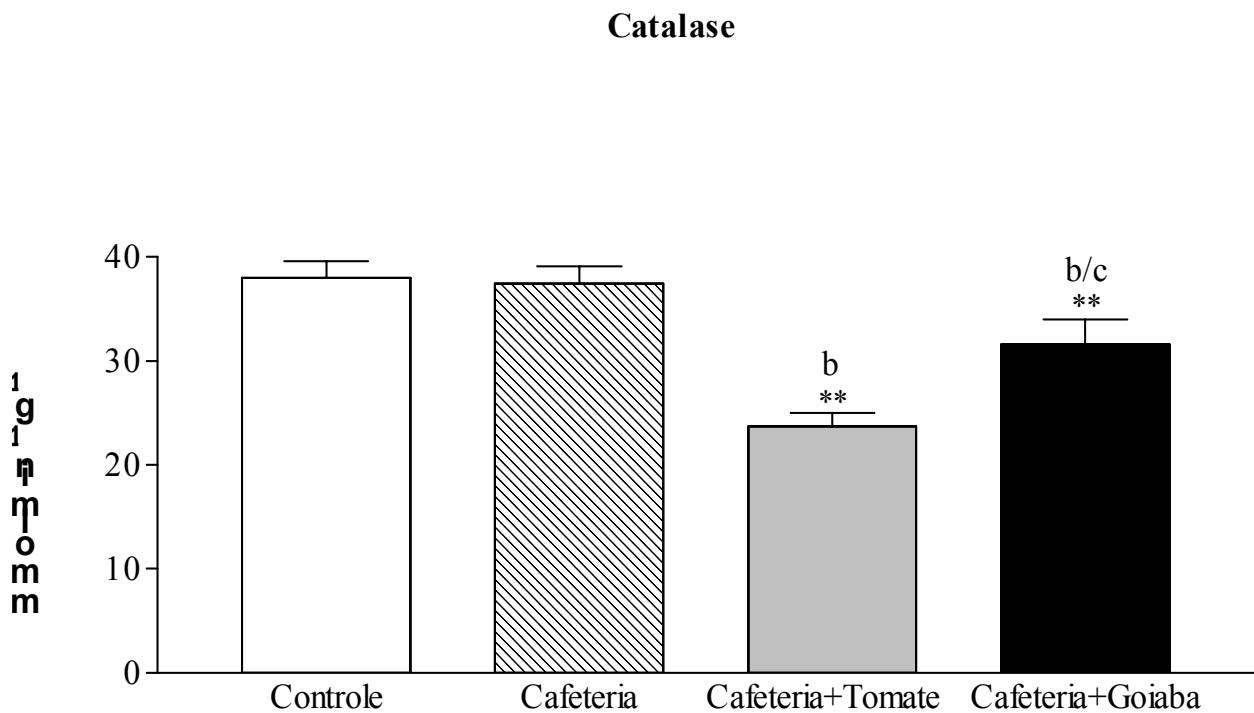


Gráfico 2. Os resultados estão representados por média e o erro padrão da média (n=8 animais por grupo experimental). O grupo controle e o grupo cafeteria foram comparados por teste "t" de Student, e os grupos cafeteria, cafeteria + tomate e cafeteria + goiaba foram comparados por ANOVA de uma via, seguida do teste pos-hoc Newman-Keuls. As letras significam diferenças estatisticamente significantes: a - cafeteria x controle; b - suplementação com tomate ou goiaba x cafeteria; c - suplementação com tomate x suplementação com goiaba; ** $p < 0,01$.

Os resultados relativos à superóxido dismutase (SOD) estão apresentados no gráfico 3. Na comparação entre o grupo controle com o grupo cafeteria, houve um aumento significativo no grupo cafeteria ($p < 0,05$). Nos grupos alimentados com dieta cafeteria adicionados de pó de tomate e goiaba, os níveis da SOD apresentaram-se significativamente diminuídos ($p < 0,01$) em relação ao grupo cafeteria. Reforça-se, portanto, a sugestão de que as dietas tipo cafeteria utilizadas no experimento apresentaram um efeito distinto no balanço oxidativo.

Superóxido dismutase

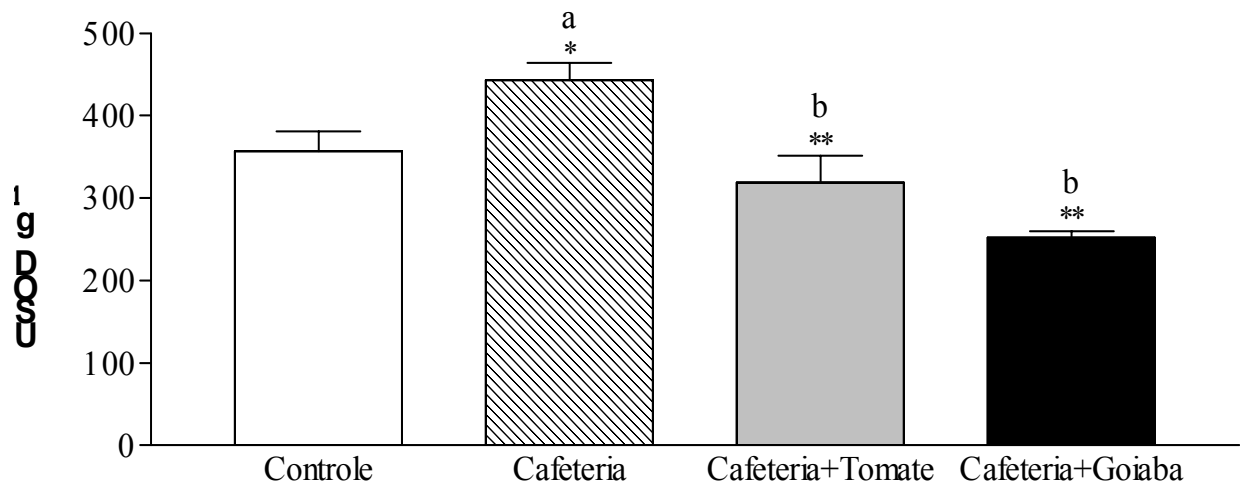


Gráfico 3. Os resultados estão representados por média e o erro padrão da média ($n=8$ animais por grupo experimental). O grupo controle e o grupo cafeteria foram comparados por teste "t" de Student, e os grupos cafeteria, cafeteria + tomate e cafeteria + goiaba foram comparados por ANOVA de uma via, seguida do teste pos-hoc Newman-Keuls. As letras significam diferenças estatisticamente significantes: a - cafeteria x controle; b - suplementação com tomate ou goiaba x cafeteria; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Não foram observadas alterações significativas nos níveis de glutati ona redutase (GR) na comparação do grupo controle e cafeteria e entre este grupo com os grupos cafeterias suplementados (gráfico 4). Entretanto, pode-se observar uma tendência de diminuição dos níveis de GR no grupo cafeteria suplementado com tomate, com um valor muito próximo da significância ($p < 0,053$).

Glutati ona redutase

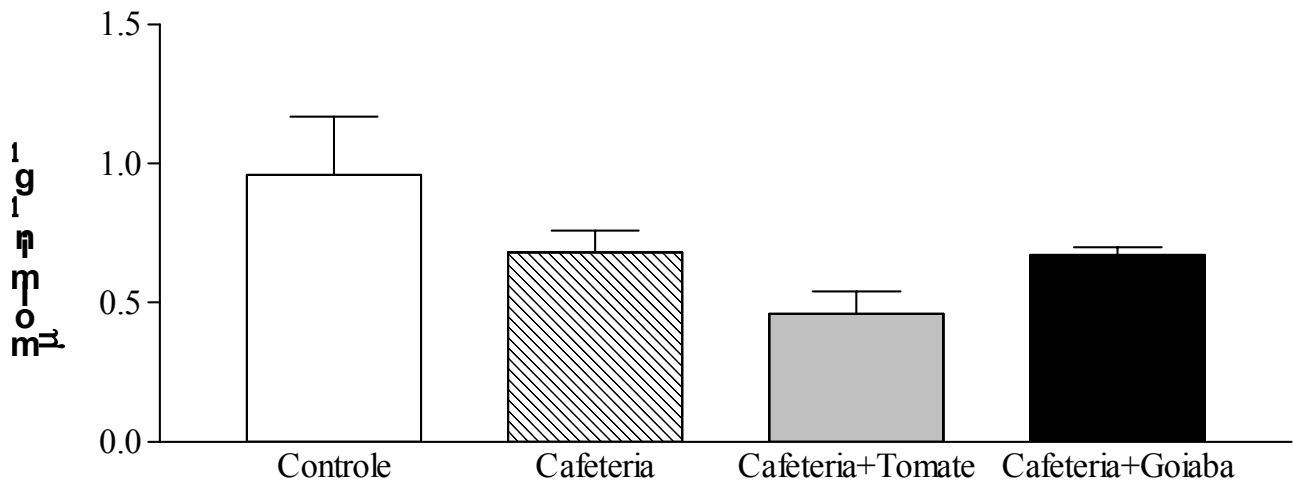


Gráfico 4. Os resultados estão representados por média e o erro padrão da média (n=8 animais por grupo experimental). O grupo controle e o grupo cafeteria foram comparados por teste "t" de Student, e os grupos cafeteria, cafeteria + tomate e cafeteria + goiaba foram comparados por ANOVA de uma via, seguida do teste pos-hoc Newman-Keuls.

O gráfico 5 apresenta os resultados da glutathiona peroxidase (GPx). Observa-se na comparação dos resultados dos grupos cafeterias, que há uma tendência de redução dos níveis hepáticos no grupo cafeteria suplementado com goiaba ($p < 0,069$). Entretanto, os níveis de GPx não foram significativamente afetados pelo tipo de dieta administrada.

Glutathiona peroxidase

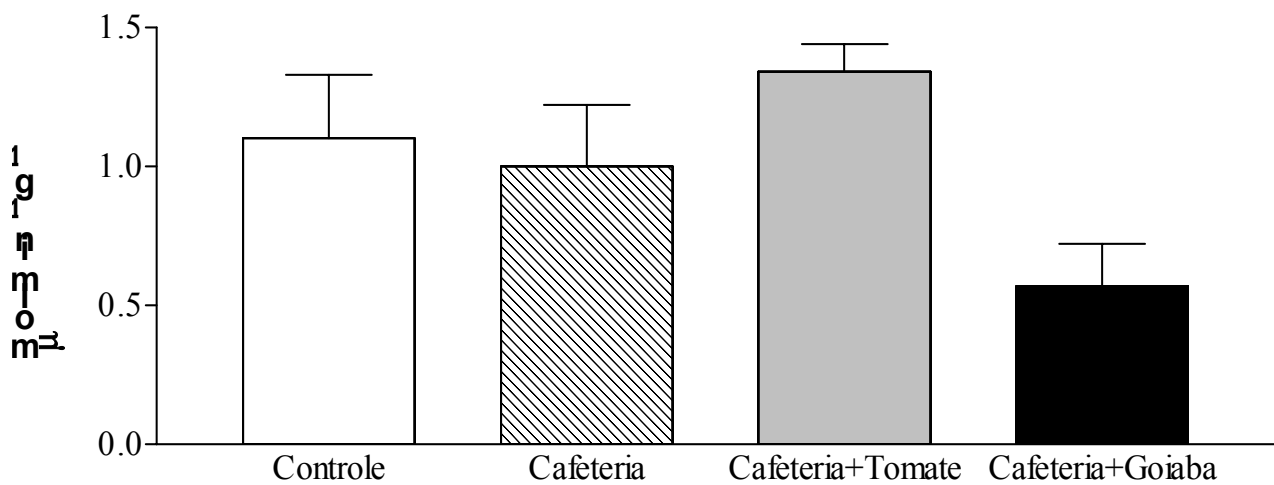


Gráfico 5. Os resultados estão representados por média e o erro padrão da média ($n=8$ animais por grupo experimental). O grupo controle e o grupo cafeteria foram comparados por teste "t" de Student, e os grupos cafeteria, cafeteria + tomate e cafeteria + goiaba foram comparados por ANOVA de uma via, seguida do teste pos-hoc Newman-Keuls.

Os níveis hepáticos da glutatona S-transferase (GST) apresentaram-se diminuídos nos animais alimentados com dieta cafeteria em relação ao controle. Nos grupos suplementados com tomate e goiaba, observou-se um aumento significativo em relação ao grupo cafeteria ($p < 0,05$) (gráfico 6).

Glutationa S-transferase

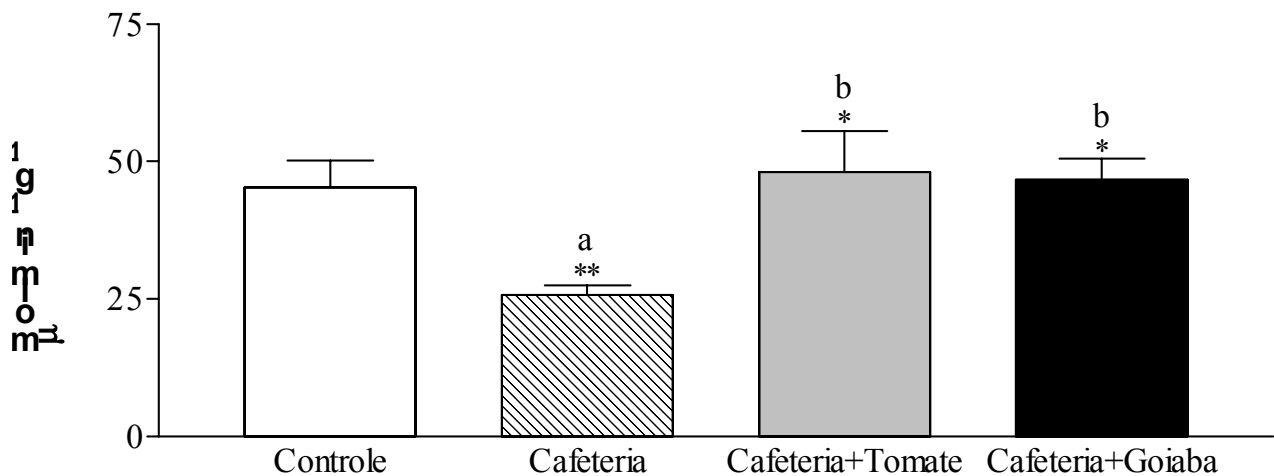


Gráfico 6. Os resultados estão representados por média e o erro padrão da média (n=8 animais por grupo experimental). O grupo controle e o grupo cafeteria foram comparados por teste "t" de Student, e os grupos cafeteria, cafeteria + tomate e cafeteria + goiaba foram comparados por ANOVA de uma via, seguida do teste pos-hoc Newman-Keuls. As letras significam diferenças estatisticamente significantes: a - cafeteria x controle; b - suplementação com tomate ou goiaba x cafeteria; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

4.3.2 Análise das Defesas Antioxidantes Não Enzimáticas

No gráfico 7 estão apresentados os resultados da análise glutatona reduzida (GSH). No grupo cafeteria o teor foi significativamente diminuído em relação ao grupo controle ($p < 0,01$). Porém, não houve diferença significativa no teor da glutatona reduzida (GSH) entre o grupo cafeteria e cafeteria suplementada com tomate e goiaba. Este resultado, pode ser sugestivo do efeito pró-oxidante da dieta cafeteria, independente da suplementação de pó de tomate ou goiaba.

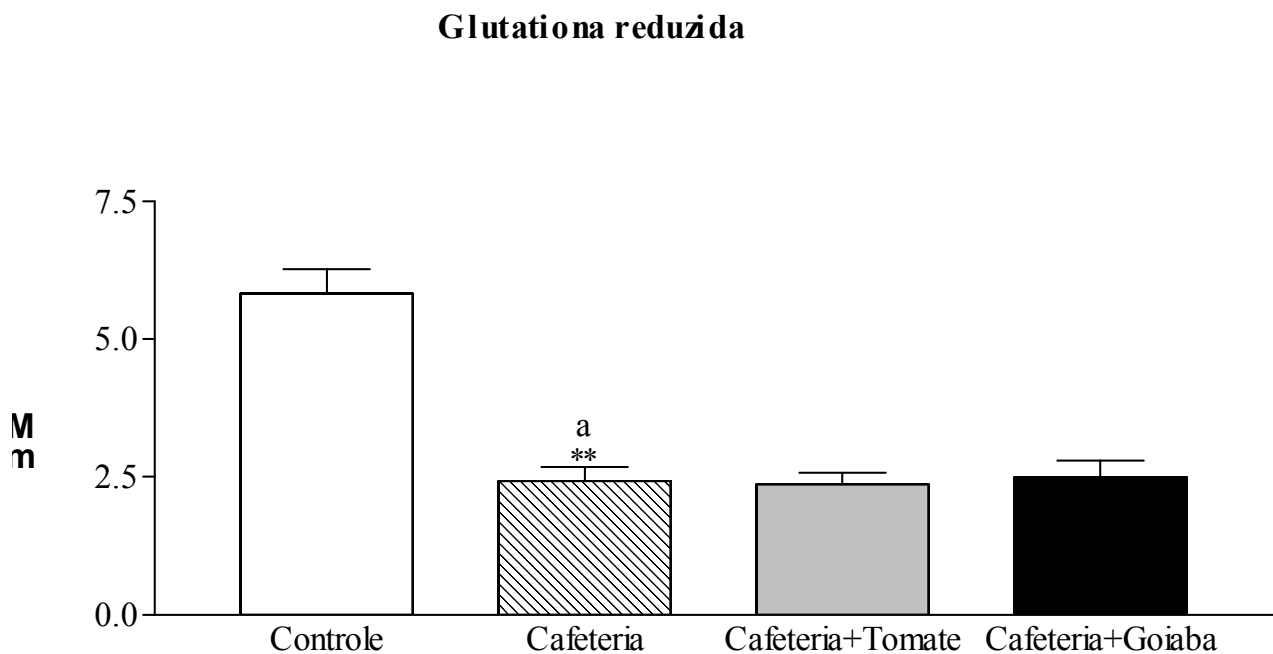


Gráfico 7. Os resultados estão representados por média e o erro padrão da média (n=8 animais por grupo experimental). O grupo controle e o grupo cafeteria foram comparados por teste "t" de Student, e os grupos cafeteria, cafeteria + tomate e cafeteria + goiaba foram comparados por ANOVA de uma via, seguida do teste pos-hoc Newman-Keuls. As letras significam diferenças estatisticamente significantes: a - cafeteria x controle; ** $p < 0,01$.

O gráfico 8 mostra que a glutatona total (GT) manteve-se em níveis semelhantes entre o controle e o grupo cafeteria, assim, como não houve diferenças significativas na comparação dos resultados dos grupos cafeterias.

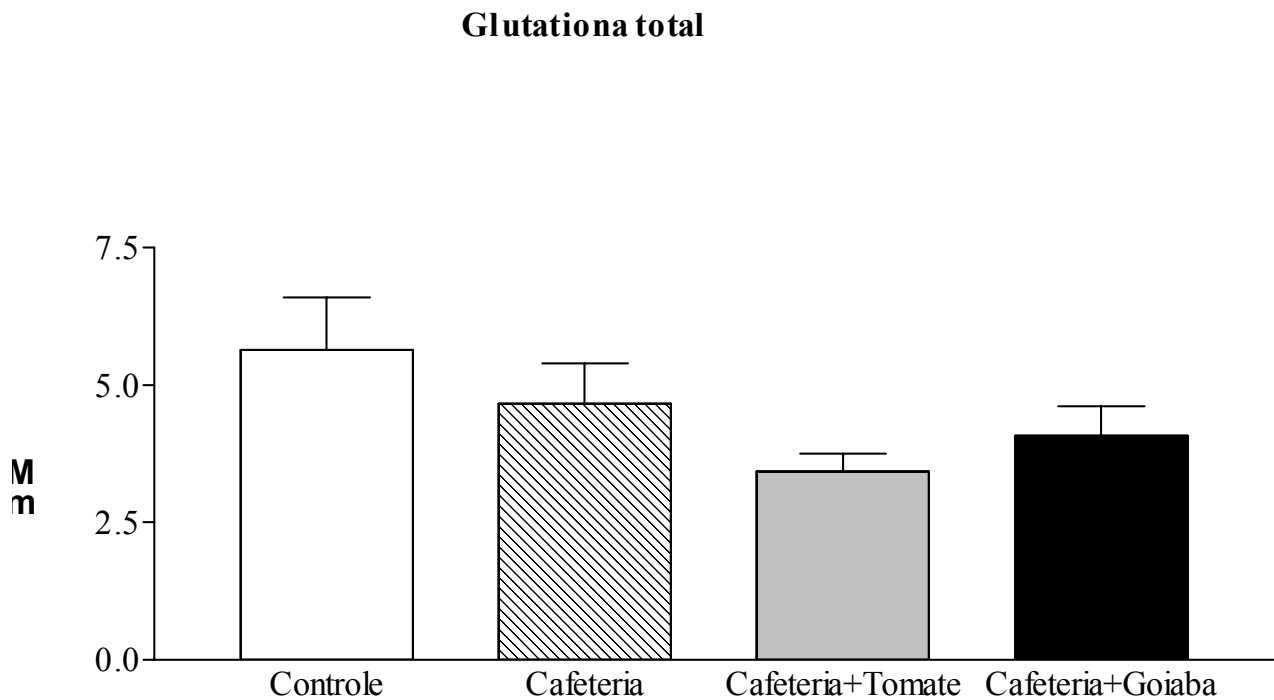


Gráfico 8. Os resultados estão representados por média e o erro padrão da média (n=8 animais por grupo experimental). O grupo controle e o grupo cafeteria foram comparados por teste "t" de Student, e os grupos cafeteria, cafeteria + tomate e cafeteria + goiaba foram comparados por ANOVA de uma via, seguida do teste pos-hoc Newman-Keuls.

No gráfico 9 estão apresentados os resultados da glutatona oxidada (GSSG). O grupo cafeteria apresentou níveis aumentados de GSSG em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Nos grupos suplementados com tomate ou goiaba, em comparação com o grupo cafeteria, não houve diferença significativa. Porém, houve uma redução nos grupos suplementados, sendo esta redução maior no suplementado com tomate. Esses resultados apresentaram perfil semelhante ao encontrado para o TBARS (gráfico 10), confirmando a indução de um estresse oxidativo associado às dietas hiperlipídicas, independente da suplementação utilizada.

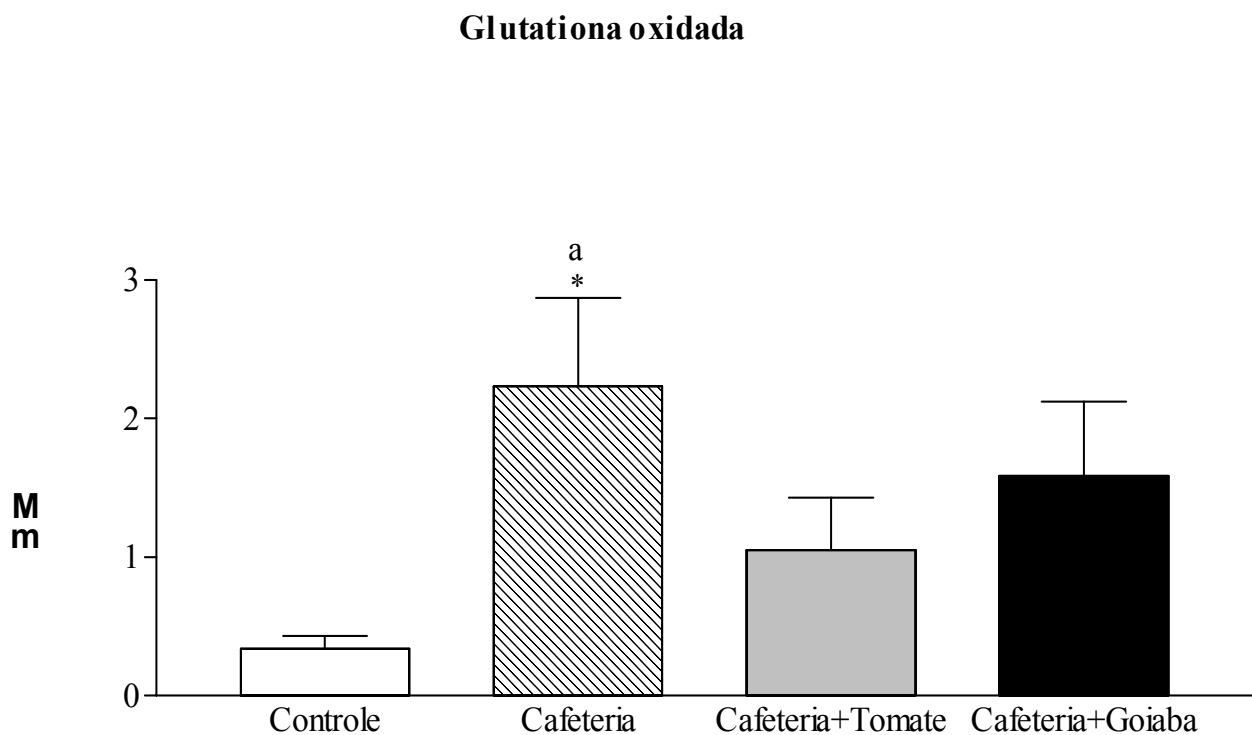


Gráfico 9. Os resultados estão representados por média e o erro padrão da média (n=8 animais por grupo experimental). O grupo controle e o grupo cafeteria foram comparados por teste "t" de Student, e os grupos cafeteria, cafeteria + tomate e cafeteria + goiaba foram comparados por ANOVA de uma via, seguida do teste pos-hoc Newman-Keuls. As letras significam diferenças estatisticamente significantes: a - cafeteria x controle: $*p < 0,05$.

4.3.3 Análise do Dano Celular

Houve uma elevação significativa nos níveis do TBARS no grupo cafeteria em relação ao grupo controle ($p < 0,001$), confirmando a condição de estresse oxidativo estabelecido pelo regime cafeteria. O mesmo perfil foi verificado nos grupos submetidos à dieta cafeteria e à dieta cafeteria suplementada com tomate ou goiaba. Estes resultados estão de acordo com os resultados encontrados para a GSSG, sugerindo elevação do estresse oxidativo associado aos grupos submetidos à dieta cafeteria (gráfico 10).

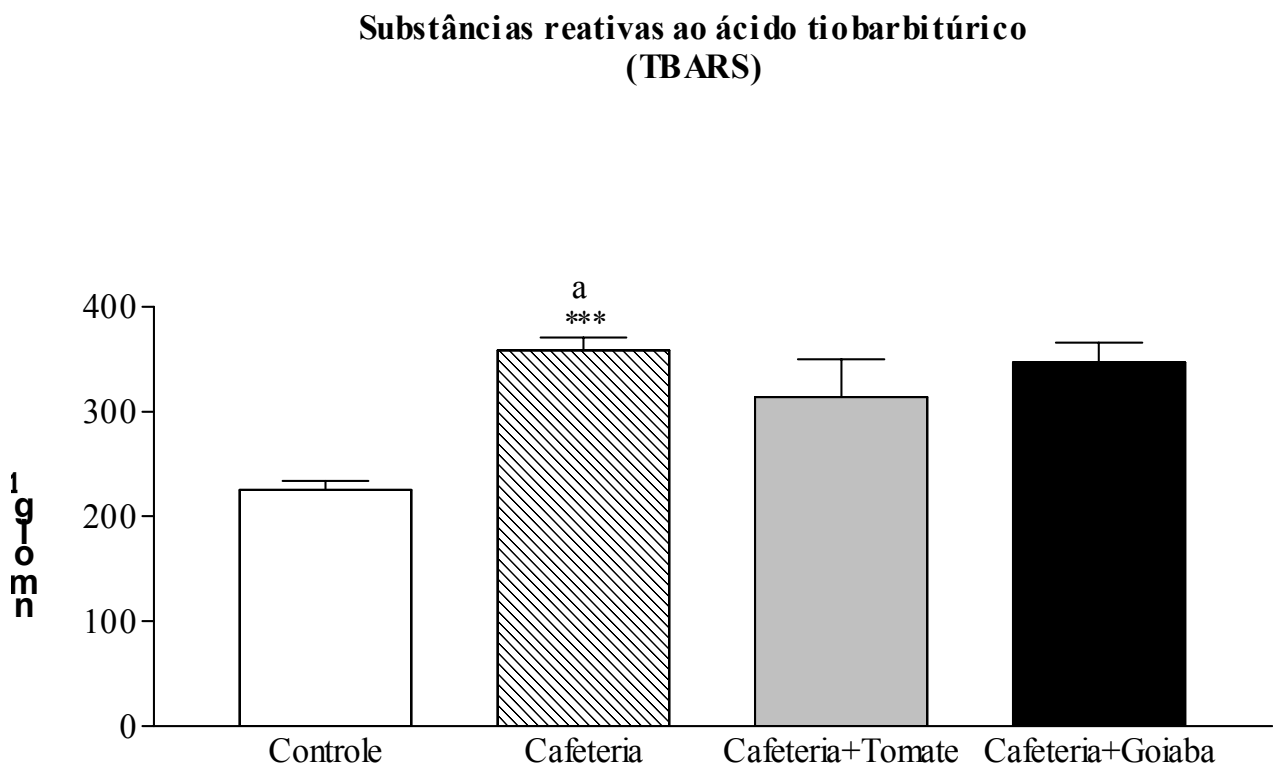


Gráfico 10. Os resultados estão representados por média e o erro padrão da média ($n=8$ animais por grupo experimental). O grupo controle e o grupo cafeteria foram comparados por teste "t" de Student, e os grupos cafeteria, cafeteria + tomate e cafeteria + goiaba foram comparados por ANOVA de uma via, seguida do teste pos-hoc Newman-Keuls. As letras significam diferenças estatisticamente significantes: a - cafeteria x controle; *** $p < 0,001$.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, ao comparar o consumo alimentar entre os grupos controle e cafeteria, observou-se que o grupo cafeteria apresentou de forma significativa um menor consumo de proteínas, aumento significativo de consumo lipídico, semelhante consumo de carboidratos e do valor energético total. Entretanto, apesar do consumo energético semelhante entre esses dois grupos, observou-se ganho significativo de peso no grupo cafeteria.

Em trabalho experimental realizado por Iossa *et al* (2000) com ratos alimentados com dieta rica em gordura, estes não apresentaram ganho de peso quando comparados ao grupo com baixo conteúdo de gordura na dieta, ao contrário do observado no presente trabalho, e em outro recente trabalho realizado no Laboratório de Nutrição Experimental da Universidade Federal de Santa Catarina (MOREIRA *et al*, 2002b).

Samaha *et al* (2003) observaram, em humanos, maior perda de peso num grupo de indivíduos com dieta pobre em carboidratos do que em indivíduos alimentados com dieta pobre em gorduras, sugerindo a maior importância dos carboidratos no ganho de peso relativamente às gorduras. No presente estudo, considerando os níveis semelhantes de carboidratos entre os grupos controle e cafeteria, provavelmente ocorreu à utilização do aporte lipídico aumentado para estoque energético, sem necessidade da conversão de proteínas em energia lábil, eliminando o fator antieconômico desta conversão, o que está de acordo com Moreira e Waitzberg, 2002.

Por outro lado, na comparação do consumo de alimentos entre os grupos cafeterias, observou-se consumo semelhante de proteínas entre os três grupos e maior consumo de carboidratos, lipídios e energético total nos grupos suplementados (condição hipercalórica). Contrariando a expectativa de um maior ganho de peso corporal para os grupos cafeterias suplementados, observou-se ganho de peso de forma semelhante entre os três grupos cafeterias. Estima-se que o aumento do volume das fezes eliminadas, observado nos grupos suplementados, via excreção maior de gordura associadas às fibras do tomate e da goiaba, possa ter contribuído para evitar um ganho de peso diferenciado para os grupos suplementados.

Estudos com modelos animais, têm sido utilizados para verificar "*in vivo*" as funções bioquímicas do licopeno (RISO *et al*, 1999; LEAL *et al*, 1999; BREINHOLT *et al*, 2000; VELMURUGAN *et al*, 2002). O modelo experimental utilizado no presente estudo verificou, em ratos, que o consumo de 4 tipos de dietas (a ração AIN/93 como dieta controle e 3 tipos de dietas cafeterias, sendo duas suplementadas com alimentos fontes de licopeno), durante 4 semanas, determinou alterações nos níveis hepáticos de alguns componentes da defesa antioxidante e sobre biomarcadores do estresse oxidativo.

Na análise do processo oxidativo e perfil antioxidante, quando se compara os grupos de animais alimentados com a ração controle e dieta cafeteria, neste último grupo, observou-se depleção significativa nos níveis de GSH e GST. Este resultado está associado ao aumento significativo dos biomarcadores de estresse oxidativo mensurados a partir dos resultados encontrados nas análises do TBARS e da glutatona oxidada (GSSG) no grupo cafeteria. No presente estudo foi verificado um aumento acima de 35% no TBARS dos ratos alimentados com dieta cafeteria. Estes dados confirmam presença do estresse oxidativo induzido pelos regimes experimentais com dieta cafeteria, independentemente da suplementação antioxidante utilizada.

Velmurugan *et al* (2002), em um estudo também utilizando ratos, encontraram relação entre aumento da peroxidação lipídica sanguínea (TBARS) e tumor em crescimento acompanhado por níveis reduzidos de GSH, GPx, GST e GR, após tratamento com droga indutora de estresse oxidativo. O grupo de animais do presente estudo que recebeu dieta cafeteria manteve valores semelhantes de GPx e GR ao grupo controle, apesar do aumento significativo do TBARS no grupo com dieta cafeteria.

As enzimas CAT e SOD compõem um arranjo de defesa antioxidante sincronizado, agindo sobre os substratos $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , respectivamente. Os níveis não depletados destas enzimas no grupo cafeteria, podem sugerir que a alteração no balanço oxidativo neste grupo não relaciona-se exclusivamente com as formas reativas $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 elevadas.

Os valores de SOD e CAT diminuídos nos grupos com dietas cafeteria suplementada em relação à cafeteria não suplementada podem ser representativos da maior capacidade antioxidante das dietas suplementadas, apesar do valor energético e lipídios elevados.

O aumento do valor energético, verificado nas dietas cafeterias suplementadas poderia induzir um aumento da fosforilação oxidativa, condição capaz de elevar de TBARS, GSSG e os níveis de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , apesar das diminuições das atividades de SOD e CAT. Provavelmente, os antioxidantes nutricionais presentes no tomate e na goiaba, incluindo principalmente, o licopeno, seriam responsáveis por esta compensação.

Esta condição, de menores níveis de SOD e CAT e de maiores níveis de GST nos grupos suplementados em comparação com níveis aumentados de SOD e CAT e diminuídos de GST no grupo cafeteria, também pode ser indicativa de um balanço oxidativo diferente entre os grupos suplementados e cafeteria.

Para Kristal (1998) o consumo calórico por si altera a composição dos ácidos graxos das membranas. O consumo hipocalórico poderia diminuir os ácidos graxos poliinsaturados como os 22:4 e 22:5, induzindo o aumento de ácidos graxos poliinsaturados 18:2, capazes de manter a fluidez das membranas e reduzir a peroxidação.

No presente estudo, devido ao consumo calórico ser semelhante entre os grupos controle ($1644,48 \pm 70,99$) e cafeteria ($1777,01 \pm 48,72$) não foi possível atribuir o efeito do consumo calórico sobre o balanço oxidativo. No entanto, o consumo hiperlipídico observado no grupo cafeteria ($447,80 \pm 16,05$ grupo cafeteria e $200,17 \pm 8,65$ grupo controle) pode ter relação com o aumento no estresse oxidativo, demonstrado nos níveis elevados de TBARS (oxidação lipídica), somado à glutathiona oxidada (GSSG) elevada, que se associou à depleção de GSH e indução da SOD. Estes dados reproduzem a ocorrência de alterações no sistema antioxidante por indução do sistema oxidativo, como relatos em estudos efetuados em ratos por diversos autores (JEWEL; OBRIEN, 1999; TANIGUCHI *et al*, 2000; VELMURUGAN *et al*, 2002).

Conforme citado anteriormente, o estudo de Velmurugan *et al* (2002) em que induziu o estresse oxidativo e câncer em ratos através da administração de MNNG (*N*-methyl-*N*-nitro-nitrosoguanadina), durante as duas primeiras semanas, e utilizou como antioxidante a suplementação com licopeno puro (2,5 mg/kg de peso), esta suplementação relacionou-se com o aumento e recuperação de todos os parâmetros antioxidantes analisados (GSH, GPx, GST, GR), até cerca de 5 meses após o tratamento com MNNG.

No presente estudo, através da análise comparativa entre os três grupos cafeterias, também obteve-se níveis de GST elevados associados à suplementação de licopeno, ao passo que os níveis de TBARS, GSSG, GT, GR, GPx e GSH apresentam-se semelhantes ao grupo cafeteria sem suplementação. Aparentemente, caso a dieta cafeteria fosse interrompida e substituída por ração normal, deveria ocorrer uma maior recuperação do status antioxidante dos grupos suplementados.

O mesmo perfil encontrado para os biomarcadores de estresse oxidativo, mensurado a partir da análise do TBARS e da glutathiona oxidada (GSSG), mostra um estresse oxidativo semelhante entre os três grupos cafeterias. Entretanto, considerando que os grupos alimentados com dietas cafeterias suplementadas foram expostos ao maior efeito da fosforilação oxidativa por consumo calórico aumentado e que, pelo aumento do consumo lipídico, também possivelmente consumiram maiores teores de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), estes grupos suplementados poderiam exibir um estresse oxidativo aumentado, em comparação à dieta controle.

Reconhecidamente, os PUFAs estão vastamente distribuídos nos alimentos industrializados que compõem as dietas tipo cafeteria e que foram utilizadas neste experimento. Esta presença de ácidos graxos poliinsaturados na molécula lipídica, devido ao número de duplas ligações, aumenta a suscetibilidade da interação com as substâncias reativas (ERO e ERN) dando início a peroxidação lipídica (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 1999a). Desta maneira, pode-se supor que o estresse oxidativo registrado de forma semelhante para o grupo cafeteria e os grupos cafeterias suplementados não reproduziu o nível da condição pró-oxidante mais elevada das dietas nos grupos suplementados.

A suplementação de licopeno pode ser sugerida como o fator antioxidante que se contrapõe ao efeito pró-oxidante aumentado nas dietas cafeterias suplementadas, e possibilitam balanço oxidativo semelhante para grupos expostos a condições oxidantes diferentes. Assim a condição pró e antioxidante das dietas cafeterias apresenta-se de forma simultaneamente antagônica, pois, à medida que o valor calórico total e de lipídios (pró-oxidantes) cresce nas dietas com pó de tomate ou goiaba disponibilizam o agente antioxidante (licopeno). Desta forma, os valores semelhantes ocorridos nos biomarcadores de estresse oxidativo (TBARS e GSSG), podem ser sugestivamente relacionados como resultantes destas duas tendências.

A elevação significativa de GST nas dietas com fontes de licopeno em relação à cafeteria não suplementada, pode ser relacionada à presença do licopeno, além de outros componentes vegetais. As observações relatadas por Martinez-Ferrer *et al* (2002), nas quais ratos alimentados com licopeno apresentaram igualmente níveis superiores de GST hepáticos em comparação à dieta controle, após indução de câncer no cólon por administração de azoxymethano (AMO) também foram similares. Adicionalmente, a dieta tipo cafeteria poderia, apesar dos níveis inalterados de GSH, e considerando os níveis elevados de GSSG, estar limitando a atividade da GST pela menor disponibilidade de glutathione, importante co-fator da mesma. Também Breinholt *et al* (2000) relatam níveis elevados de GST plasmáticos e no fígado de ratos suplementados com licopeno em relação ao grupo controle, após indução de estresse oxidativo por administração de amina heterocíclica (2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo).

Os níveis semelhantes de GT entre os três grupos sugerem que, apesar do maior processo oxidativo sobre os grupos suplementados, a síntese enzimática supera a oxidação de GSH, indicando que o sistema de defesa antioxidante dos grupos suplementados mostrou-se, em parte, capaz de reverter o estresse oxidativo.

Apesar da análise das enzimas GR e GPx não apresentar diferença significativa em sua atividade entre os grupos cafeterias, observou-se no grupo cafeteria com adição de pó de goiaba a tendência ($p < 0,069$) de níveis menores de GPx. Por outro lado, o grupo cafeteria com adição de pó de tomate apresentou uma tendência muito próxima do nível de significância ($p < 0,053$) de níveis menores de GR, além de estar significativamente relacionado às atividades diminuídas de CAT em relação aos ratos tratados com as outras dietas tipo cafeteria. De qualquer modo, a tendência de diminuição de GR, implica uma restrição de recuperar os níveis de glutathione reduzida (GSH) nos hepatócitos.

Portanto, este arranjo do balanço oxidativo entre os grupos cafeterias sugere uma condição, em ambos os grupos suplementados, associada a uma menor indução de enzimas, podendo significar que os suplementos tenham assumido uma capacidade poupadora das defesas endógenas.

Ficou evidenciado que a dieta cafeteria, independentemente do suplemento antioxidante utilizado, tomate ou goiaba, aparentemente não foi suficientemente capaz de reverter totalmente o quadro de estresse oxidativo hepático. Eventualmente, isso poderia

ocorrer, caso a suplementação viesse associada a uma dieta controle, após o estresse oxidativo estabelecido previamente pela dieta tipo cafeteria.

Acredita-se que futuros estudos devam ser desenvolvidos para melhor caracterizar os efeitos do tomate e da goiaba sobre o estresse oxidativo, pois em trabalho ficou demonstrado o papel determinante da dieta hipercalórica no estresse oxidativo (MOREIRA *et al*, 2002b). Outro aspecto a ser destinado como perspectiva futura consiste na contribuição relativa dos carotenóides, particularmente do licopeno presente na goiaba, em comparação a outras categorias de antioxidantes, como os polifenóis-flavonóides (JIMÉNEZ-ESCRIG *et al*, 2001), através de modelos que possam detectar as capacidades antioxidantes totais de extratos vegetais.

6 CONCLUSÃO

1) O modelo experimental utilizado, permitiu que as dietas com conteúdo antioxidante assumissem ação pró-oxidante devido ao conteúdo elevado de calorias à base de carboidratos e lipídios, o que pode ter sido resultante de condições palatáveis mais apreciadas pelos animais.

2) Aparentemente as dietas suplementadas não foram capazes de reverter totalmente o quadro de estresse oxidativo. Isto poderia ocorrer, caso a suplementação não fosse associada à dieta cafeteria.

3) Apesar do efeito pró-oxidante das dietas suplementadas, os biomarcadores de estresse oxidativo apresentam-se semelhantes a dieta “cafeteria” que, com a não indução das defesas antioxidantes endógenas (diminuição da catalase, superóxido dismutase, glutathione redutase e peroxidase) podendo significar a ação antioxidante do licopeno.

4) O comportamento das defesas antioxidantes endógenas e marcadores do estresse oxidativo revelou tendência semelhante entre os grupos suplementados com tomate e goiaba. Sugerindo potencial antioxidante semelhante entre as duas fontes.

5) Este experimento permite sugerir que a quantidade e o tipo de lipídio da dieta, supostamente os PUFA, podem exercer efeito pró-oxidante em dieta isocalóricas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELRAHIM, S.I.; ALMAGBOUL, A.S.; OMER, M.E.; ELEGAMI, A. Antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. **Fitoterapia**. v. 73.n. 7-8. p.713-715, 2002.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Meth. Enzymol.** v.105, p.121-126, 1984.

AMES, B.N.; GOLD, L.S.; WILETT, W.C. The causes and prevention of cancer. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**. v.92, p. 5258-5265, June 1995.

ARAB, L.; STECK, S. Lycopene and cardiovascular disease. **Amer. J. Clin. Nutr.**v.71, p.1691-1696, 2000.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. 13 ed. Washington, **Assoc. Off. Agric. Chem.**, p. 858, 1980.

BERLETT, B. S.; STADTMAN, E. R. Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. **J. Biol. Chem.** v.272, n.33, p.20313-20316, 1987.

BEUTLER, E.; DURON, O. ; KELLY, B.M. Improved method for the determination of blood glutathione. **J. Lab. Clin. Med.** v.61, p.882-90, 1963.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radical livre e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr. Campinas**. v.12, n.2, p. 123-130, 1999.

BIRD, R.P.; DRAPER, A.H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. **Methods Enzymol.** v.105, p.295-305, 1984.

BOILEAU, T.W.M.; CLINTON, S.K.; ERDMAN, J.W. Tissue lycopene concentrations and isomer patterns are affected by androgen status and dietary lycopene concentration in male F344 rats. **J. Nutr.** v.130, p.1613-1618, 2000.

BRAMLEY, P.M. Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. **J. Exp. Botany**. v.53, n.377, p.2107-2113, 2002.

BRENNAN, L. A. ; MORRIS, G.M.; WASSON, G.R.; HANNIGAN, B.M.; BARNETT, Y.A. The effect of vitamin C or vitamin E supplementation on basal and H₂O₂-induced DNA damage in human lymphocytes. **Brit. J. Nutr.** v.84, p.195-202, 1999.

BREINHOLT, V.; LAURIDSEN, S.T.; DANESHVAR, B.; JACOBSEN, J. Dose-response effects of lycopene on selected drug-metabolizing and antioxidant enzymes in the rat. **Cancer Lett.** v.154, p.201-210, Jun, 2000.

BOVERIS, A.; CADENAS, E. Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species. In: CLERCH, L.; MASSARO, D. **Oxygen, Gene Expression, and Cellular Function.**, Marcel Dekker: New York. v.105, p.1-25, 1997.

BUSSAB, W.O.; MORETTIN, P.A. Estatística Básica. 4rd ed. São Paulo: Editora Atual, 1991.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Purification and characterization of flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. **J. Biol. Chem.** v. 250, n.14, p.5475-5480, 1975.

COMMITTEE ON LABORATORY ANIMAL DIETS. Assembly of Life Sciences National Research Council **Nutr. Abst. Ver.** v.40,p.413-419,1979.

DEWANTO, V.; WU, X.; ADOM, K.K.; LIU, R.H. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. **J. Agric. Food Chem.** v.50, p.3010-3014, 2002.

DI MASCIO P.; KRAISER S.; SIES H. Lycopene as the most effective biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Arch. Biochem. Biophys.** v.274, p.532-538, 1989.

FAGUNDES, R.L.M., KRETZER, I.R. Tecido adiposo marrom e sua implicação no desenvolvimento da obesidade. **Rev Cienc Saúde.**v.12, p.59-68,1993.

FANG, Y. Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants and nutrition. **Rev. Nutr.** v.18, n.10, p.872-878, 2002.

FERRARI, C.K.B. Oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos: mecanismos gerais e implicações nutricionais e patológicas. **Rev. Nut. Campinas.** v.11, n.1, p.3-14, 1998.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil.** v.43.n 1.p.61-68, 1997.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature.** v.408,2000.

FLECHA, B. S. G. Estress oxidativo en patologia humana. Métodos de estudio de aplicación clínica. **ACTA Bioquímica Clínica Latinoamericana.** v.24, n.1, p.67-74, 1990.

FLESCHIN, S.; FLESCHIN, M.; NITA, S.; PAVEL, E.; MAGEARU, V. Free radicals mediated protein oxidation in biochemistry. **Roum. Biotechnol. Lett.**, v.5, n.6, p. 479-495, 2000.

FLOHÉ, L.; GUNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods. Enzymol.** v.105, p.114-121, 1984.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **J. Exp. Biol.** v.201, p.1203-1209, 1997.

GANN, P.H.; MA, J.; GIOVANNICCI, W.W.; SACKS, F.M.; HENNEKENS, C.H.; STAMPFER, M.J. Lower prostate cancer risk in men with elevated plasma lycopene levels. **Cancer Res.** v.59, p. 1225-1230,1999.

GÄRTNER, C.; STAHL, W.; SIES, H.. Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes. **Amer. J. Clin. Nutr.** v.66, p.116-122, 1997.

GERSHMAN, R.; GILBERT, D.L.; NYE,S.W.; DWYER, P.; FENN, W.O. Oxygen poisoning and X-radiation: a mechanism in common. **Science.** v. 119. p. 623-626, 1954.

GIOVANNUCI, E. Tomato-Based Products, Lycopene, and cancer: Review of the epidemiologic literature. **J. Cancer Institute.** v. 91, n. 4, February 17, 1999.

GIOVANNUCI, E.; ASCHIERO, ^a; RIMM, E.B.; STAMPFER, M.J.; COLDTIZ, G.A.; WILLETT, W.C.; Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer. **J. Natl. Cancer Inst.** v. 87. p. 1767-1776, 1995.

HALLIWEL, B. Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutritional studies? How far have we come? **Amer. J. Clin. Nutr.** v.72, p.1082-1087, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. The chemistry of free radicals and related "reactive species". **Free Radical Biology and Medicine.** Oxford, 3^aed., Clarendon Press, p.36-104, 1999a.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Oxidative stress: adaptation, damage, repair and death. **Free Radical Biology and Medicine.** Oxford, 3^aed., Clarendon Press, p.246-350, 1999b.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Antioxidant defences. **Free Radical Biology and Medicine.** Oxford, 3^aed., Clarendon Press, p.105-245, 1999c.

HERCBERG, S.; GALAN, P.; PREZIOSI, P. ALFAREZ, M.J.; VAZQUEZ, C. The potential role of antioxidant vitamins in preventing cardiovascular diseases and cancers. **Nutr.** v.14, n.6, 1998.

IOSSA, S.; LIONETTI, L.; MOLLIKA, M. P.; CRESCENZO, R.; BARLETTA, A .; LIVERINI, G. Effect of long-term high-fat feeding on energy balance and liver oxidative activity in rats. **Brit. J. Nutr.** v.84, p.377-385, 2000.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. **Métodos Químicos e Físicos para Análise de alimentos**, U.L., 2ª ed., São Paulo, Inst. Adolfo Lutz, p. 11-37, 1976.

JEWELL, C.; O'BRIEN N.M. Effects of dietary supplementation with carotenoids os xenobiotic metabolizing enzymes in the liver, lung, kidney and small intestine of rat. **Brit. J. Nutr.** v.81, p. 235-242, 1999.

JIMENEZ-ESCRIG, A.; RINCON, N.; PULIDO, R.; SAURA-CALIXTO, F. Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant. **J. Agric. Food Chem.** v.49, n.11, p. 5489-5493, 2001.

KEEN, J. B.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for several actives from glutathione S-transferase. **J. Biol. Chem.** v.251, p.6183-6188, 1976.

KIM, D.J.; TAKASUKA, N.; NISHINO, H.; TUSUDA, H. Chemoprevention of lung cancer by lycopene. **Biofactors.** v. 13. n. 1-4. p. 95-102, 2000.

KNEKT, P.; LOFT, S. Oxidative DNA damage in human white blood cells in dietary antioxidant intervention studies. **Amer. J. Clin. Nutr.** v. 76, n.3, p.560, 2003.

KOLLMEIR, L.; KARK, J.D.; GOMEZ, E.; MARTIN, B.C.; STECK, S.E.; KARDINAAL, A. F. M.; RINGDFAD, J.; THAMM, M; MASAEV, V.; RIESMERSMA, R.; MARTIN, J. M.; HUTUUNEN, J. K.; KOK, F. J. Lycopene and myocardial infarction risk in the Euramic study. **Am J Epidemiol.** p.146, 618-626, 1997.

KOW, Y. W. Oxidative stress, DNA damage and human diseases. **Dojindo Newsletter.** v.2, 2002.

KRISTAL, B.P. Dietary restriction augments protection again induction of mitochondrial permeability transition. **Free Radic. Biol. Med.** v.24, p. 269-277, 1998.

LAMPE, J. W. Heath effects of vegetables and fruit: assessing mecanisms of action in human experimental studies. **Am. J. Clin. Nutr.** v.70, n.3, p.475S-491S, 1999.

LEAL, M.; SHIMADA, A.; RUÍZ,F.; MEJÍA, E.G. Effect of lycopene on lipid peroxidation and glutathione-dependent enzymes induced by T-2 toxin in vivo. **Toxicol. Let.** v.190, p.1-10, 1999.

LEE, C.M.; BOILEAU, A.C.; BOILEAU, T.W.M.; WILLIANS, A.W.; SWANSON K.S.; HEINTZ, K.A.; ERDMAN JR, J.W. Review of animal models in carotenoid research. **J. Nutr.** v.129, p.2271-2277, 1999.

LEEUWENBURGH, C.; HARDY, M.N.; HAZEN, S.L.; WAGHRE,P.; OH-ISHI,S.; STEINBRECHER, U.P.; HEINECKE, J.W. Reactive nitrogen intermediates promote low density lipoprotein oxidation in human. Atherosclerotic intima. **J. Biochem. Mol. Biol.** v.272, n.3, issue of January 17, p.1433-1436, 1997.

LEVY, D.; BISIN, E.; FELDMAN, B.; GIAT, Y.; MIINSTER, A.; DANILENKO, M. Lycopene is more potent inhibitor of human cancer proliferation than either alpha-carotene or beta-carotene **Nutr. Cancer.** v.24, n. 3, p.257-266, 1995.

LOZOYA, X.; REYES-MORALES, H.; CHAVEZ-SOTO, M.A.; MARTINEZ-GARCIA MDEL, C.; SOTO-GONZALEZ, Y.; DOUBOVA, S.V Intestinal anti-spasmodic effect of a phytodrug of *Psidium guajava* folia in the treatment of acute diarrheic disease. **J. Ethopharmacol.** v. 83. n.1-2. p. 19-24, 2002.

LUTSENKO, E.A.; CÁRCAMO, J.M.; GOLDE, D.W. Vitamin C prevents DNA mutation induced by oxidative stress. **J. Biol. Chem.** v.277, p. 16895-16899, 2002.

MARTINEZ-FERRER, M.; VERGHESE, M.; WALKER, L.T.; CHAWAN, B.C.; SHACKELFORD, L. Anticarcinogenic activity of lycopene in colon of Fisher 344 male rats. **Annual Meeting and Food Expo.** Anaheim, California, Session Nutrition, p.06-17, 2002.

MATOS, H.R.; DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M.H. Protective effect of licopeno on lipid peroxidation and oxidative DNA damage in cell culture. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 383. n 1. p. 56-59, 2000.

MATTSON, M. P.; PEDERSEN, W.A; DUAN, W.; CULMSEE, C.; CAMANDOLA,S. Cellular and molecular mechanisms underlying perturbed energy metabolism and neuronal degeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Ann. New York Acad. Sci.**, p.154-175, 2001.

MAYES, P. A. Oxidação Biológica. In: MURRAY, R.K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P.A.; RODWELL. **Harper: Bioquímica.** 9ªed., São Paulo, Atheneu, 2002.

MELO, E. A.; GUERRA, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Bol. SBCTA,** Campinas. v.35, n.1, p.1-11, 2002.

MENDÉZ, J. D.; RODRÍGUEZ, H. G. R. Sobre los beneficios de los radicales libres. **Rev. Méd. Instituto Mexicano del Seguro Social.** v.35, n.4, p.309-313, 1997.

MISRA, H.P.; FRIDOVICH,I. Purification and properties of superoxide dismutase from a red alga, *Porphyridium cruentum*. **J. Biol. Chem.** v. 252, n.18, p.6421-6423, 1977.

MOREIRA, E. A.M.; FAGUNDES, R. L. M.; WILHELM FILHO, D.; NEVES, D.; SELL, F.; PEDROSA, C. R.; BELLISLE, F.; KUPEK, E. Lycopene attenuates diet-induced oxidative stress in rats. In: XI th Meeting of the Society for Free Radical Research International, 2002, Paris. **Supplement to Free Radical Biology & Medicine.** v.33, p.S208, 2002a.

MOREIRA, E. A.M.; FAGUNDES, R. L. M.; WILHELM FILHO, D.; FACCIN, G.L.; COUTO, M. M.; PEDROSA, C. R. Effect of hypercaloric and hypocaloric diets with different lipid contents on oxidative stress in rats. In: XI th Meeting of the Society for Free Radical Research International, 2002, Paris. **Supplement to Free Radical Biology & Medicine**. v.33, p.S231, 2002b.

MOREIRA, J.C.; WAITZBERG, D.L. Consequências Funcionais da Desnutrição. In: WAITZBERG, D.L. **Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica**. 3^aed, São Paulo: Atheneu, 2000. p.399-409.

MUINDI, J.F.; SCHER, H.I.; RIGAS,J.R.; WARRELL, R.P.; YOUNG, C.W. Elevated plasma lipid peroxide content correlates with rapid plasma clearance of all-trans-retinoic acid in patients with advanced cancer. **Cancer Res**. v.54, n.8, p. 2125, 1994.

NAGYIOVÁ, A.; KUDLÁCKOVÁ, M.; GRANCIOVÁ, E.; MAGÁLOVÁ, T. LDL oxidizability and antioxidative status of plasma in vegetarians. **Ann Nutr. Metab**. v.42, p.328-332, 1998.

NIJVELDT, R. J.; NOOD, E.V.; HOORN, D.E.V.; BOELENS, P.; NORREN, K.V.; LEEUWEN, P.A.V. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **Am. J. Clin. Nutr**. v.74, n.4, p.418-425, 2001.

OLSON, J.A. Carotenoids and human health. **Arch. Latinoamericanos de Nutrição**. v.49, n,1, p.7S-10S, 1999.

OHKAWA, H.; OSHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal. Biochem**. v. 95, n. 2, p.351-8, 1979.

PATEU, I.; KHACHIC, F.; BROWN, E.D.; BEECHER, G.R.; KRAMER, T.R.; CHITTAMS, J.; CLEVIDENCE, B.A. Chronic ingestion of lycopene-rich tomato juice or lycopene supplements significantly increases plasma concentrations of lycopene and related tomato carotenoids in humans. **Am. J. Clin. Nutr**. v.68, p.1187-1195, 1998.

RAO, A. V.; SHEN, H. Effect of low dose lycopene intake on lycopene bioavailability and oxidative stress. **Nutr. Res**. v.22, p.1125-1131, 2002.

RAO, A.V.; AGARWAL, S. Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease: A review. **J. Am. Coll. Nutr**.v.19, n.5, p.563-569, 2000.

RAO, A.V.; AGARWAL, S. Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease: A review. **Nutr. Res**. v.19, n.2, p.305-323, 1999.

REAGAN, P.; MAGARINOS, A.M.; MCEWEN, B. S. Neurological changes induced by stress in streptozotocin diabetic rats. **Ann. New York Acad. of Sci**. p. 126- 137, 2001.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C.JR.; AIN-93, purified diets for laboratory rodents: Final report of American Institute of Nutrition ad hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. **J. Nutr.** v.123, p.1939-1951, 1993.

RISO, P.; PINDER, A.; SANTANGELO, A.; PORRINI, M. Does tomato consumption effectively increase the resistance of lymphocyte DNA to oxidative damage? **Am. Soc. Clin. Nutr.** v.69, n.4, p.712-718, 1999.

RODRÍGUEZ-AMAYA, D.B. Latin american food sources of carotenoids. **Arq. Latinoam. Nutr.**v.49, n.1-S,1999.

ROTHWELL, N.J.; STOCK, M.J. Effects of feeding a "cafeteria" diet on energy balance and diet-induced thermogenesis in four strains of rats. **J. Nutr.** 1982;112:1515-1524.

ROVER JR, L.; FENALTI, N.; VELLASCO, A.P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Rev. Química Nova.** v.24, n.1, p.112-118, 2000.

SAMAHA, F.F.; IQBAL, N.; SESHARI, P.; CHICANO, K. L.; DAILY, D. A.; MCGRORY, J. WILLIAMS, B.S.T.; GRACELY, E. J.; STERN, L. A Low-carbohydrate as compared with a low-fat diet in severe obesity. **New Eng. J. Med.**v.348, p.2074-81, 2003.

SAGARA, Y.; DARGUSH, R.; CHAMBERS, D.; DAVIS, J.; SCHUBERT, D.; AHER, P. Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress. **Free Radic. Biol. Med.** v.24, p. 1375-1389, 1998.

SEN, C. K.; PACKER, L. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. **Am. J. Clin. Nutr.** v.72, p.653S-669S, 2000.

SHEU, K. R.; BLASS, J. P. The α -ketoglutarate dehydrogenase complex. **Ann. New York Acad. Scie.**, p. 61-78, 2001.

STAHL, W.; SIES, H. Carotenoids: Occurrence, biochemical activities, and bioavailability. **Antiox. Food Suppl. Human Health.** p.183-202, 1999.

TANIGUCHI, M.; YASUTAKE, A.; TAKEDOMI, K. Effect of dietary sulfur containing amino acids oxidative damage in the rat liver caused by N-nitrosodimethylamine administration. **Brit. J. Nutr.** v.84, p. 211-217, 2000.

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and others tissues. **Ann. Biochem.** v.27, n.3, p.502-522, 1969.

THOMAS, J.A. Estresse oxidativo e defesa contra antioxidantes. In: SHILS, M. E.; OLSON, J. A.; SHIKE, M.; ROSS, A. C. **Tratado de Nutrição Moderna na Saúde e na Doença**. 9^aed, São Paulo: Manole, 2003. p.801-812.

van SOEST, P.J.; WINE, R.H. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV Determination of plant wall constituents. **Journal of the A.O.A.C.** v.1, p. 50-55,1967.
VANNUCCHI, H.; MOREIRA, E.A.M.; CUNHA,D.F.; JUNQUEIRA-FRANCO, M.V.M.; BERNARDES, M.M.; JORDÃO Jr, A. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. **Medicina**, Ribeirão Preto v.31, p.31-44, 1998.

VELMURUGAN, B.; BHUVANESWARI, V.; NAGGINI, S. Antiperoxidative effects of lycopene during N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced gastric carcinogenesis. **Fitoter.** v.73, p. 604-601, 2002.

WANG, M.; DHINGRA, K.; HITTELMAN, W.N.; LIEHR, J.G.; DE ANDRADE, M.; LI, D. Lipid peroxidation-induced putative malondialdehyde-DNA adducts in human breast tissues. **Cancer Epidemiol. Biomarkers.** v. 5. n.9. p. 705-710, 1996.

WILHELM FILHO, D.; GONZÁLEZ-FISCHER, B.; BOVERIS,A. Gill diffusion as a physiological mechanism for hydrogen peroxide elimination by fish. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 27. p. 2879-2882, 1994.

YAMISHIRO, S.; NOGUCHI, K.; MATSUZAKI, T.; MIYAGI, K.; NAKASONE, J.; SAKANASHI, M.; SAKANASHI, M.; KUKITA, I.; ANIYA, Y.; SAKANASHI, M. Cardioprotective effects os extracts from *Psidium guaiava* L. and *Limonium wrightii*, okinawan medicinal plants, against ischemia-reperfusion injury in perfused rat hearts. **Pharmacol.** v.67. p. 128-135, 2003.

ZHAO, Z.; KHACHIK, F.; RICHIE JR, JP.; COHEN, L.A. Lycopene uptake and tissue disposition in male and female rats. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v.218, n.2, 1998.