

Elisabete Pinho Valente

O USO DE ANTIOXIDANTES NA PREVENÇÃO DA DOENÇA



UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto

2014

Elisabete Pinho Valente

O USO DE ANTIOXIDANTES NA PREVENÇÃO DA DOENÇA



UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto

2014

Elisabete Pinho Valente

O uso de antioxidantes na prevenção da doença

Assinatura

(Elisabete Pinho Valente)

“Trabalho de conclusão de ciclo apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas”

Orientadora:

Professora Doutora Carla Moutinho

Resumo

As espécies reativas de oxigénio e as espécies reativas de azoto produzidas no organismo durante os processos metabólicos fisiológicos são neutralizadas pelas defesas antioxidantes.

Contudo, em diversos estados patológicos, estilos de vida incorretos e/ou a permanência constante em condições ambientais desfavoráveis pode ocorrer a acumulação de radicais livres, originando-se uma situação de *stress* oxidativo.

O *stress* oxidativo está implicado em várias doenças nomeadamente cancro, doenças cardiovasculares como a aterosclerose, doenças oculares como a degeneração macular, doença de Alzheimer, entre outras.

Os antioxidantes por terem a capacidade de evitar os processos oxidativos, atuam impedindo a formação das espécies reativas, ou eliminando-as, exercendo assim uma ação protetora. No entanto, devido ao facto destes compostos se encontrarem em baixas concentrações no organismo, a suplementação antioxidante torna-se fundamental para reforçar a ação destes.

Estudos iniciais sobre o uso de antioxidantes na prevenção de doenças crónicas sugeriram uma ação benéfica para a saúde. Porém, estudos clínicos realizados posteriormente não obtiveram resultados concordantes com os primeiros, revelando mesmo ausência de efeito salutar.

Desta forma, o presente trabalho visa proceder à revisão bibliográfica da utilização de antioxidantes na prevenção de doenças cardiovasculares, do cancro, de doenças oculares e da doença de Alzheimer.

Abstract

The reactive oxygen species and the reactive nitrogen species produced in the organism during the physiological and metabolic processes are neutralized by antioxidant defences.

However, due to the various pathological states, incorrect lifestyles, the constant permanence of unfavourable environmental conditions the accumulation of free-radicals occurs, producing a situation of oxidative stress.

The oxidative stress is implied in various diseases, such as cancer, cardiovascular diseases, like atherosclerosis, ocular diseases as macular degeneration, Alzheimer, among others.

The antioxidants, for having the ability to avoid oxidative processes, act preventing the formation of reactive specimens, or eliminating them, therefore exercising a protective action. However, due to the fact that these compounds arise in low concentrations in the organism, antioxidant supplementation becomes critical to enhance their action.

Initial studies on the use of antioxidants in the prevention of chronic diseases have suggested a beneficial effect on health. However, further clinical studies did not achieve consistent results with the first, even revealing absence of salutary effect.

Thereby, the present study aims to carry out a bibliographic review of the use of antioxidants in the prevention of cardiovascular disease, cancer, eye disease and Alzheimer's disease.

Agradecimentos

Ao terminar esta etapa quero agradecer a todos os que me acompanharam e incentivaram ao longo deste meu percurso acadêmico.

À Professora Doutora Carla Moutinho, pelo seu apoio, disponibilidade, simpatia, pelas palavras de encorajamento, paciência e dedicação mostrada ao longo da realização deste trabalho de conclusão de ciclo.

Aos meus pais, pelo amor, apoio, dedicação e positivismo que me transmitiram e por tornarem um sonho realidade.

À minha irmã, Beatriz, pelo carinho, apoio e incentivo que sempre demonstrou ao longo desta etapa. É a minha vida e o meu orgulho!

Aos meus avós e prima, por estarem sempre presentes e pelo amor, apoio e incentivo nos momentos mais difíceis.

Às minhas amigas, Andreína, Raquel e Patrícia, por todo o apoio incondicional, amizade, paciência, força e boa disposição.

Aos meus colegas de faculdade por todos os momentos de companheirismo e amizade.

À Universidade Fernando Pessoa.

Muito Obrigada!

<u>Índice Geral</u>	Pág.
Resumo	v
Abstract	vi
Agradecimentos	vii
Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xiii
Lista de Abreviaturas	xiv
I. Introdução	1
II. Capítulo 1: Espécies reativas - os radicais livres	4
1.1. Contextualização histórica	4
1.2. Conceito e características dos radicais livres	5
1.3. Efeitos desempenhados pelas ERO	8
1.4. Processos de formação de radicais livres	11
1.4.1. Fontes endógenas	11
1.4.2. Fontes exógenas	17
III. Capítulo 2: Antioxidantes	20

2.1.	Perspetivas históricas	20
2.2.	Conceito de antioxidantes	20
2.3.	Classificação dos antioxidantes	22
2.3.1.	Antioxidantes Enzimáticos	22
2.3.2.	Antioxidantes Não Enzimáticos	26
2.4.	Defesas antioxidantes	39
2.5.	Fontes de aquisição de antioxidantes.....	40
IV.	Capítulo 3: Doenças que podem beneficiar da terapia antioxidante	43
3.1.	Estados patológicos gerais	43
3.2.	Doença cardiovascular	44
3.2.1.	Estudos epidemiológicos e clínicos.....	47
3.3.	Cancro.....	53
3.3.1.	Estudos epidemiológicos e clínicos.....	57
3.4.	Doença ocular	62
3.4.1.	Estudos epidemiológicos e clínicos.....	65
3.5.	Doença neurodegenerativa - Doença de Alzheimer.....	67

3.5.1. Estudos epidemiológicos e clínicos.....	69
V. Capítulo 4: Efeitos controversos do uso dos antioxidantes e possíveis razões para a sua ineficácia	71
4.1. Efeitos provocados no indivíduo	71
4.2. Dosimetria estabelecida para administração de antioxidantes.....	74
4.3. Possíveis razões para a ineficácia dos antioxidantes	75
VI. Conclusão geral.....	78
VII. Referências bibliográficas	80
Anexos.....	92

<u>Lista de Figuras</u>	Pág.
Figura 1: Etapas da peroxidação lipídica	10
Figura 2: Formação de radicais livres na cadeia transportadora de eletrões	12
Figura 3: Esquema global da redução do oxigénio e respetiva formação de ERO	13
Figura 4: Reação referente à formação do radical superóxido.....	13
Figura 5: Reação de formação do peroxinitrito.....	13
Figura 6: Reação de formação do peróxido de hidrogénio	14
Figura 7: Reações de Fenton e de Haber-Weiss	14
Figura 8: Formação de ERO em células fagocíticas na presença da NADPH oxidase..	16
Figura 9: Conversão da hipoxantina em ácido úrico com a formação de $O_2\bullet -$ e de H_2O_2	17
Figura 10: Formação do radical hidroxilo mediado por iões metálicos	19
Figura 11: Quadro resumo das fontes de radicais livres	19
Figura 12: Reações enzimáticas envolvidas na manutenção da glutatona na forma reduzida	25
Figura 13: Estrutura da Glutaciona	28
Figura 14: Estrutura química da coenzima Q_{10}	29

Figura 15: Reação da oxidação do ubiquinol a ubiquinona	30
Figura 16: Reações de oxidação/redução do ácido ascórbico	31
Figura 17: Estrutura química do α -tocoferol	32
Figura 18: Estrutura química dos principais carotenoides	33
Figura 19: Principais estruturas das classes de flavonoides	35
Figura 20: Estruturas químicas dos principais antioxidantes sintéticos	37
Figura 21: Algumas doenças induzidas pelo <i>stress</i> oxidativo	43
Figura 22: Ação do <i>stress</i> oxidativo no desenvolvimento de insuficiência cardíaca ...	46
Figura 23: Atuação das ERO nas várias fases do processo de carcinogénico	54

Lista de Tabelas

Pág.

Tabela 1: Fontes de antioxidantes na dieta	41
Tabela 2: Relação entre a ocorrência de eventos cardiovasculares e consequente morte e a ingestão do multivitamínico face ao placebo	52
Tabela 3: Resultados gerais obtidos relativos aos efeitos dos suplementos antioxidantes na prevenção do cancro	60
Tabela 4: Efeitos dos suplementos antioxidantes na incidência de diversos tipos de cancro	61
Tabela 5: Resultados obtidos sobre o efeito preventivo da ingestão de antioxidantes dietéticos na prevenção da doença de Alzheimer	69

Lista de Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AINEs: Anti-inflamatórios não esteróides

AREDS: do inglês *Age-related eye disease study*

AREDS 2: do inglês *Age-related eye disease study 2*

ATP: do inglês *Adenosine triphosphate*

AVC: Acidente vascular cerebral

BHA: Butil-4-hidroxianisol

BHT: Butil-4-hidroxitolueno

CAT: Catalase

CTE: Cadeia transportadora de elétrons

DCV: Doença cardiovascular

DMRI: Degeneração macular relacionada com a idade

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ERN: Espécies reativas de azoto

ERO: Espécies reativas de oxigénio

FNB: do inglês *Food and nutrition board*

GMPc: Guanosina monofosfato cíclico

GPx: Glutationa peroxidase

Gr: Glutationa redutase

Grx: Glutarredoxina

GSH: Glutationa

GST: Glutationa-S-transferase

8-OHdG: 8-Hidro-2'-deoxiguanosina

H₂O₂: Peróxido de hidrogénio

HOCl: Ácido hipocloroso

HOPE: do inglês *Heart outcomes prevention evaluation*

HOPE-TOO: do inglês *Heart outcomes prevention evaluation study - the ongoing outcomes*

IC: Intervalo de confiança

LDL: do inglês *Low density lipoprotein*

MDA: Malonildialdeído

NADH: do inglês *Nicotinamide adenine dinucleotide*

NADPH: do inglês *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*

NDGA: Ácido nordihidroguaiarético

NO[•]: Radical monóxido de azoto

NO₂[•]: Radical dióxido de azoto

NO₃⁻: Ião Nitrato

N₂O₃: Trióxido de diazoto

N₂O₄: Tetróxido de diazoto

NOS: Monóxido de azoto sintetase

O₂¹: Oxigénio singleto

O₂^{•-}: Radical superóxido

OH[•]: Radical hidroxilo

ONOO⁻: Ião Peroxinitrito

PG: Galhato de propilo

PHS II: do inglês *The physicians' health study II*

RDA: do inglês *Recommended dietary allowance*

RDI: do inglês *Reference daily intake*

RO•: Radical alcoxilo

ROO•: Radical peroxilo

RR: Risco relativo

SELECT: do inglês *Selenium and vitamin E cancer prevention trial*

SOD: Superóxido dismutase

SU.VI.MAX: do francês *Supplémentation en vitamines et minéraux antioxydants*

TBHQ: *Terc*-butil-hidroquinona

Trx: Tiorredoxinas

TrxR: Tiorredoxina redutase

UI: Unidade Internacional

UL: do inglês *Tolerable upper intake level*

UV: Ultravioleta

UVA: Ultravioleta A

UVB: Ultravioleta B

WHS: do inglês *Women's health study*

XOR: Xantina oxidoreductase

I. Introdução

Os organismos vivos estão sujeitos a vários processos oxidativos, os quais levam à formação de espécies reativas.

Das espécies reativas mais comuns presentes nos sistemas biológicos, desatacam-se as de oxigénio (ERO) e as de azoto (ERN).

As espécies reativas englobam os radicais livres, como o superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o hidroxilo (OH^{\bullet}), o peróxilo (ROO^{\bullet}), o alcoxilo (RO^{\bullet}), o monóxido de azoto (NO^{\bullet}), e o dióxido de azoto (NO_2^{\bullet}), mas também intermediários neutros e carregados, como o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o peroxinitrito ($ONOO^-$) e ainda espécies capazes de dar origem a radicais livres, como é exemplo o oxigénio singleto (O_2^1), o ferro e o cobre (Bianchi e Antunes, 1999; Degáspari e Waszczynskyj, 2004; Oliveira *et al.*, 2009; Lobo *et al.*, 2010).

Os radicais livres caracterizam-se por possuírem um ou mais eletrões desemparelhados, sendo extremamente instáveis e reativos contribuindo assim para o desenvolvimento de várias lesões no organismo. Podem ser sintetizados quer por fontes endógenas, através de processos metabólicos fisiológicos, como por exemplo, através da respiração aeróbica, pela atividade dos peroxissomas e enzimas do citocromo P450, quer por fontes exógenas, como por exemplo, devido à exposição a radiações ultravioleta (UV), gama ou raio-X, ozono, fármacos, *stress*, dieta, tabaco, poluição e solventes orgânicos (Bianchi e Antunes, 1999; Garcez *et al.*, 2004; Lobo *et al.*, 2010).

O desequilíbrio entre os processos de formação e remoção dos radicais livres é o foco desencadeador de muitas doenças, uma vez que se instala no organismo uma situação de *stress* oxidativo.

Exemplos de condições clínicas associadas à produção exagerada de radicais livres são, doenças degenerativas (arteriosclerose), cardiopatias, diabetes, doenças inflamatórias (artrite reumatoide), doenças oculares, doenças pulmonares, doenças cardiovasculares (DCV), doenças neurológicas (doenças de Parkinson e Alzheimer),

cancro e envelhecimento celular, entre outras (Bianchi e Antunes, 1999; Garcez *et al.*, 2004; Cerqueira *et al.*, 2007; Catania *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2009).

A fim de limitar e impedir a indução de danos celulares provocados pelas espécies reativas de oxigénio e de azoto, o organismo recorre ao sistema de defesa antioxidante, o qual é composto por várias fases e antioxidantes (Chakraborty *et al.*, 2009).

Os antioxidantes, propriamente ditos, são compostos que em baixas concentrações, podem prevenir ou reduzir a extensão do dano oxidativo, por possuírem a capacidade de atrasar ou inibir a oxidação de moléculas, como lípidos, proteínas, hidratos de carbono e ácidos nucleicos. Podem ser classificados como sendo antioxidantes enzimáticos ou não enzimáticos e podem ser de origem natural ou sintética (Bianchi e Antunes, 1999; Degáspari e Waszczynskyj, 2004).

Os antioxidantes enzimáticos, também conhecidos como sendo os responsáveis pelos processos de remoção endógena de espécies reativas, compreendem enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GPx).

Os antioxidantes não enzimáticos podem ser, na sua grande maioria, inseridos no organismo através da ingestão de certos alimentos, como frutas e vegetais, ou através de suplementos dietéticos, sendo os principais deste grupo, os carotenoides, as vitaminas C e E, o selénio, o zinco e os flavonoides. Estes antioxidantes provenientes da dieta funcionam como um complemento aos antioxidantes enzimáticos (Ferreira e Matsubara, 1997; Bianchi e Antunes, 1999; Degáspari e Waszczynskyj, 2004).

Os antioxidantes atuam no organismo através da quebra das reações em cadeia, em que participam as ERO e/ou as ERN, ou por prevenção das reações oxidativas, por meio da complexação de iões metálicos, captação de radicais livres, decomposição de peróxidos e/ou pela inibição de enzimas responsáveis pela síntese de espécies reativas de oxigénio e de azoto (Chakraborty *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2009).

Estudos epidemiológicos realizados revelarem uma relação inversa entre a ingestão de alimentos ricos em antioxidantes e a incidência de cancro e outras doenças crónicas e degenerativas. Desta forma, a ingestão de antioxidantes surgiu como terapêutica preventiva de diversas patologias. No entanto, estudos mais recentes demonstraram ausência de benefícios, e até mesmo efeitos negativos, na saúde com a administração de suplementos enriquecidos em antioxidantes (Bianchi e Antunes, 1999; Chakraborty *et al.*, 2009; Myung *et al.*, 2013).

A razão da inexistência de resultados concordantes, entre os estudos epidemiológicos e os clínicos recentemente realizados, pode ser justificada devido: i) à administração de doses inadequadas de antioxidantes; ii) à duração do tratamento (demasiado curta ou longa e não permitir avaliar os efeitos positivos da administração de antioxidantes) ou iii) devido ao tipo de antioxidante em estudo, no que diz respeito à sua biodisponibilidade, estabilidade no organismo, solubilidade e capacidade de resistir ao efeito de primeira passagem (Bianchi e Antunes, 1999; Chakraborty *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2009; Firuzi *et al.*, 2011).

A terapia antioxidante parece ser uma via promissora para a prevenção ou tratamento de diversas patologias associadas ao *stress* oxidativo. Contudo, são necessários mais estudos nesta área para determinar as margens de segurança de cada antioxidante e o efeito exercido relativamente a cada doença (Bianchi e Antunes, 1999; Pham-Huy *et al.*, 2008).

Face ao exposto, este trabalho de conclusão de ciclo tem como objetivo fazer uma revisão bibliográfica do uso dos antioxidantes na prevenção da doença, mais concretamente na análise da correlação (inversa) entre a ingestão de antioxidantes e o risco de cancro, e a patogénese de doenças cardiovasculares, oculares e de Alzheimer, por serem as que apresentam maior incidência em Portugal e que causam maior mortalidade na população (Direção Geral da Saúde, 2012).

II. Capítulo 1: Espécies reativas - os radicais livres

1.1. Contextualização histórica

O estudo de radicais livres surgiu aquando da segunda guerra mundial e das explosões das bombas atómicas de Hiroshima e Nagasaki, em 1945, pois até então desconhecia-se a toxicidade exercida pela molécula de oxigénio (Gerschman *et al.*, 1954).

Em 1954, Gerschman e colaboradores apresentaram uma teoria sobre os radicais livres, indicando que as propriedades tóxicas do oxigénio se deviam às suas formas reduzidas, nomeadamente aos radicais superóxido e hidroxilo e ao peróxido de hidrogénio (Gerschman *et al.*, 1954; Devasagayam *et al.*, 2004; Valko *et al.*, 2007; Sen e Chakraborty, 2011).

Logo a seguir, em 1956, Denham Harman propôs que os radicais livres estariam envolvidos nos processos de envelhecimento, desencadeando uma grande investigação neste área (Harman, 1956; Valko *et al.*, 2007).

Uma segunda fase de pesquisa de radicais livres em sistemas biológicos ficou datada em 1969, quando foi descoberta a enzima superóxido dismutase por McCord e Fridovich. Esta enzima é considerada um antioxidante enzimático fazendo parte do processo de remoção de radicais livres, como será constatado posteriormente (McCord e Fridovich, 1969; Valko *et al.*, 2007).

A partir desta descoberta, e até ao final do século XX, as evidências científicas da relação dos radicais livres com os organismos vivos progrediram significativamente. Foram identificadas as vias metabólicas produtoras destas espécies e as lesões provenientes da sua elevada concentração no meio fisiológico e ainda foi estabelecida uma associação entre a presença dos mesmos e o desenvolvimento de condições patológicas (Ribeiro *et al.*, 2005).

1.2. Conceito e características dos radicais livres

O termo “radicais livres” refere-se a moléculas e/ou a átomos que contêm um ou mais elétrons desemparelhados nas suas órbitas atômicas ou moleculares (Bianchi e Antunes, 1999; Valko *et al.*, 2007).

A configuração da camada eletrónica confere a estas espécies uma elevada instabilidade, um tempo de semivida muito curto, um considerável grau de reatividade e uma elevada capacidade para se combinar de forma inespecífica com um grande número de biomoléculas, como por exemplo os lípidos, as proteínas e os ácidos nucleicos. Estas características são fatores que tornam os radicais livres determinantes no aparecimento de vários estados patológicos (Bianchi e Antunes, 1999; Valko *et al.*, 2007).

Existe uma grande diversidade de espécies reativas sendo que as mais relevantes nos sistemas biológicos são as espécies reativas de oxigénio (ERO), as espécies reativas de azoto (ERN), os radicais derivados de tióis, as espécies reativas de cloro, as espécies reativas de carbono e certos metais de transição, como por exemplo o ferro e o cobre (Oliveira *et al.*, 2009).

Ao grupo de espécies reativas de oxigénio pertencem os radicais livres de oxigénio, mas também espécies não radicalares derivadas do oxigénio, que têm a capacidade de gerar radicais livres. São vários os exemplos de espécies reativas de oxigénio, sendo as mais relevantes os radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxilo (OH^{\bullet}), peróxido (ROO^{\bullet}) e alcóxido (RO^{\bullet}), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o ácido hipocloroso ($HOCl$) e o oxigénio singleto (O_2^1) (Devasagayam *et al.*, 2004; Garcez *et al.*, 2004; Valko *et al.*, 2007).

Relativamente às espécies reativas de azoto, o radical monóxido de azoto (NO^{\bullet}), o peroxinitrito ($ONOO^-$), o radical dióxido de azoto (NO_2^{\bullet}), o trióxido de diazoto (N_2O_3) e o tetróxido de diazoto (N_2O_4) são alguns dos exemplos (Garcez *et al.*, 2004; Valko *et al.*, 2007).

Uma vez que existe uma grande variedade de espécies reativas, cada uma apresenta certas particularidades que permite diferenciá-la uma das outras, no que diz respeito aos seus processos de formação, atuação, reatividade e interação com outras estruturas.

Assim, em relação às ERO, o **radical superóxido** ($O_2^{\bullet-}$) é a espécie mais abundante e comum na célula, sendo considerado uma espécie reativa de oxigénio primária, por ser formado após a primeira redução do oxigénio. Tem também a capacidade de dar origem a ERO secundárias, como o peróxido de hidrogénio, mediante reações catalisadas por metais de transição. O envolvimento deste radical nos sistemas vivos foi divulgado aquando da descoberta da enzima superóxido dismutase (SOD) (Ferreira e Matsubara, 1997; Devasagayam *et al.*, 2004; Garcez *et al.*, 2004; Valko *et al.*, 2007).

A produção do radical superóxido ocorre principalmente na mitocôndria, na cadeia transportadora de eletrões (CTE), mas também pela ação das células fagocíticas, como os neutrófilos, monócitos e macrófagos, aquando dos mecanismos de defesa contra as infeções bacterianas. No entanto, também pode ser obtido a partir de reações de auto-oxidação e reações enzimáticas em várias estruturas (Devasagayam *et al.*, 2004; Garcez *et al.*, 2004).

Este radical apresenta normalmente pouca reatividade, dependendo do ambiente celular em que se forma, atuando principalmente como agente redutor em grande parte das reações (Ferreira e Matsubara, 1997; Garcez *et al.*, 2004).

O **radical hidroxilo** (OH^{\bullet}) é uma espécie extremamente reativa. Após a sua formação apresenta um tempo de semivida muito curto, reage rapidamente e de forma inespecífica com os alvos celulares mais próximos do seu local de formação, causando modificações em várias biomoléculas, podendo levar à inativação do ADN ou de proteínas, à mutação genética ou à peroxidação lipídica (Ferreira e Matsubara, 1997; Garcez *et al.*, 2004; Valko *et al.*, 2007).

Este radical é muito nocivo para o organismo, pois apresenta uma capacidade superior de lesar as células em relação a todas as outras ERO, devido ao facto de não existir no organismo um sistema de defesa enzimático que o neutralize.

É formado a partir do peróxido de hidrogénio e através da reação de Fenton, a qual será explicada posteriormente, quando há sobrecargas de ferro no organismo (Devasagayam *et al.*, 2004; Garcez *et al.*, 2004).

O **peróxido de hidrogénio** (H_2O_2) não é considerado um radical livre, pois não tem eletrões desemparelhados na última camada. No entanto, é um metabolito do oxigénio, uma espécie reativa de oxigénio, e como tal, é tão prejudicial ao organismo como a espécie anterior, pois tem a capacidade de dar origem ao radical hidroxilo na presença de metais, como o ferro (Ferreira e Matsubara, 1997; Garcez *et al.*, 2004).

Esta espécie reativa apresenta um tempo de semivida longo, tem a capacidade de atravessar as membranas lipídicas, pode reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao ferro, sendo que a sua toxicidade aumenta drasticamente na presença deste metal (Ferreira e Matsubara, 1997; Junior *et al.*, 2005).

O peróxido de hidrogénio é formado principalmente na matriz mitocondrial durante a redução do oxigénio (Devasagayam *et al.*, 2004; Garcez *et al.*, 2004).

O **oxigénio singleto** (O_2^1) apresenta uma elevada reatividade, um tempo de semivida muito curto, sendo capaz de modificar diretamente o ADN, lesar as proteínas e ser iniciador da peroxidação lipídica, dando origem aos radicais ROO^\bullet e RO^\bullet (Devasagayam *et al.*, 2004; Garcez *et al.*, 2004).

É formado por reações de fotossensibilização, pelos fagócitos ou por reações catalisadas por peroxidases (Ferreira e Matsubara, 1997; Devasagayam *et al.*, 2004; Garcez *et al.*, 2004).

Relativamente às ERN, o radical **monóxido de azoto** (NO^\bullet) pode reagir com outras espécies radicalares para lhes dar origem, as quais, à semelhança das espécies anteriores, têm o poder de modificar proteínas, lípidos e material genético (Devasagayam *et al.*, 2004; Garcez *et al.*, 2004).

Numa situação de excesso de produção de monóxido de azoto, este pode ser convertido a espécies reativas como o **peroxinitrito** ($ONOO^-$) e o radical **dióxido de azoto** (NO_2^\bullet), os quais podem induzir danos inflamatórios.

Das espécies acima apresentadas, apenas os radicais monóxido de azoto e o dióxido de azoto têm características de radicais livres; o peroxinitrito é uma espécie reativa de azoto com propriedades não radicalares (Devasagayam *et al.*, 2004; Garcez *et al.*, 2004).

1.3. Efeitos desempenhados pelas ERO

Os radicais livres são produtos do metabolismo celular normal e exercem funções, quer benéficas, quer deletérias para o organismo.

Os efeitos benéficos ocorrem a baixas ou médias concentrações de ERO e envolvem funções fisiológicas normais, como a expressão de genes, a defesa contra agentes infecciosos pelos macrófagos e linfócitos citotóxicos e o crescimento celular (Valko *et al.*, 2007; Kunwar e Priyadarsini, 2011).

Têm ainda a capacidade de: i) gerarem, na mitocôndria, ATP a partir de ADP através da fosforilação oxidativa; ii) intervirem na desintoxicação de xenobióticos pelo citocromo P450; iii) causarem a apoptose de células defeituosas e incapazes de realizarem as suas funções, podendo funcionar como espécies anti tumorais e iv) participarem na biossíntese de moléculas, como a tiroxina e prostaglandinas (Devasagayam *et al.*, 2004; Kunwar e Priyadarsini, 2011).

Por outro lado, quando há uma produção elevada de radicais livres no organismo, verifica-se um efeito prejudicial proveniente da sua atuação nas células, causando danos biológicos. Este acontecimento, designa-se *stress* oxidativo e diz respeito a uma superprodução de ERO ou ERN e/ou a uma deficiência de substâncias antioxidantes, capazes de neutralizar a ação das espécies reativas (Devasagayam *et al.*, 2004; Valko *et al.*, 2007; Kunwar e Priyadarsini, 2011).

Assim, um excesso de ERO pode danificar várias biomoléculas presentes em estruturas celulares, nomeadamente, moléculas lipídicas, proteicas, nucleicas e hidratos de carbono, inibindo ou alterando as suas funções em vários tecidos, estando implicadas na origem de várias doenças.

As membranas celulares são muito propensas à oxidação pelas ERO, uma vez que são constituídas por uma bicamada de fosfolípidos. Esta bicamada é composta por elevadas concentrações de ácidos gordos polinsaturados, podendo ocorrer peroxidação lipídica por ação das espécies reativas (Devasagayam *et al.*, 2004; Kunwar e Priyadarsini, 2011).

A peroxidação lipídica apresenta várias consequências como alterações na fluidez, na permeabilidade e na integridade da membrana e formação de radicais lipídicos, como o peroxilo. Consiste num conjunto de reações em cadeia, estando classificada em várias etapas, iniciação, propagação e terminação (Figura 1). Inicialmente, ocorre o sequestro do hidrogénio do ácido gordo (LH) da membrana pelo radical hidroxilo ou pelo radical alcóxido (LO^{\bullet}) com a formação do radical lipídico (L^{\bullet}). Na etapa seguinte, este radical reage com o oxigénio dando origem ao radical peroxilo (LOO^{\bullet}), o qual capta outro hidrogénio do ácido gordo polinsaturado e forma mais uma vez o radical lipídico. Por último, o radical lipídico e peroxilo reagem em conjunto e propagam-se até se autodestruírem (Ferreira e Matsubara, 1997; Kunwar e Priyadarsini, 2011).

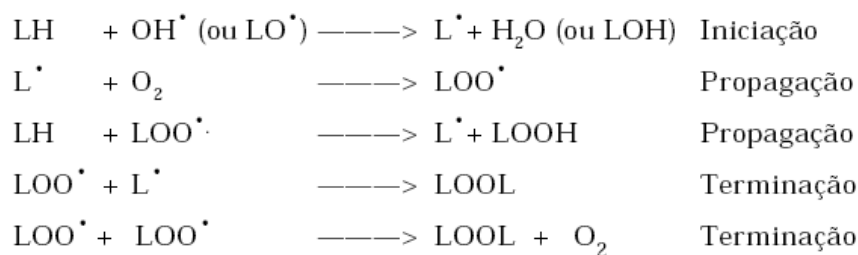


Figura 1: Etapas da peroxidação lipídica (Retirado de: Ferreira e Matsubara, 1997).

As proteínas também podem ser atacadas pelos radicais livres, resultando na sua fragmentação em aminoácidos, na formação de ligações cruzadas proteína-proteína e na alteração da sua estrutura terciária, por ocorrer fragmentação, agregação e degradação proteolítica, respetivamente (Devasagayam *et al.*, 2004; Junior *et al.*, 2005; Kunwar e Priyadarsini, 2011).

O ADN, apesar de ser uma molécula estável e bem protegida, quando interage com as ERO também pode sofrer alterações por parte destas, tais como, alteração das bases, perda de purinas, quebras na estrutura, alteração da desoxirribose, formação de ligações cruzadas entre o ADN e proteínas e danos no sistema de reparação do ADN. A principal consequência destas alterações é a modificação do material genético, com consequente mutagénese, carcinogénese, envelhecimento e morte celular (Devasagayam *et al.*, 2004; Valko *et al.*, 2007; Kunwar e Priyadarsini, 2011).

Os hidratos de carbono podem igualmente ser atacados por estas espécies. Assim, pode ocorrer a oxidação da glicose e de monossacarídeos, os quais levam à formação de mais ERO. A glicose oxidada pode ainda reagir com as proteínas, através da glicosilação (Junior *et al.*, 2005).

Por norma, existe no organismo um equilíbrio entre as espécies oxidantes e antioxidantes, mantendo-se assim o equilíbrio redox, a fim de evitar lesões no organismo e posterior aparecimento de doenças (Valko *et al.*, 2007).

1.4. Processos de formação de radicais livres

Os radicais livres são formados no organismo pela ação de enzimas altamente reguladas, como a NADPH oxidase ou a monóxido de azoto sintetase (NOS), no decorrer de processos de transferência de eletrões, no metabolismo celular normal e pela exposição a fatores exógenos (Bianchi e Antunes, 1999; Valko *et al.*, 2007).

Podem ser sintetizados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e os seus alvos celulares dependem do seu local de formação.

Os radicais livres tanto podem provir no organismo de fontes endógenas, como de fontes exógenas (Bianchi e Antunes, 1999; Valko *et al.*, 2007).

1.4.1. Fontes endógenas

As fontes de obtenção endógenas de radicais livres localizam-se na mitocôndria, nas membranas celulares e no citoplasma e compreendem os seguintes processos metabólicos e/ou fisiológicos, a respiração aeróbica, a fagocitose e a atividade dos peroxissomas, do sistema citocromo P450 e da enzima xantina desidrogenase (Bianchi e Antunes, 1999; Garcez *et al.*, 2004).

Em condições fisiológicas, cerca de 95-98 % de oxigénio é consumido pelos tecidos, ou seja, é reduzido a água, mas os restantes 2 a 5 % de oxigénio podem dar origem às espécies reativas de oxigénio por não receberem todos os eletrões (Garcez *et al.*, 2004; Barbosa *et al.*, 2010).

As mitocôndrias têm como função produzir energia, mas também são consideradas as principais fontes celulares de espécies reativas de oxigénio, uma vez que o metabolismo oxidativo envolve a redução do oxigénio molecular por quatro eletrões (Garcez *et al.*, 2004; Barbosa *et al.*, 2010).

O local de formação de espécies oxidantes ocorre na cadeia transportadora de elétrons, a qual tem a função de transferir os elétrons para o oxigênio.

A CTE é constituída por quatro complexos ligados à membrana e por duas moléculas transportadoras, a coenzima Q, ou ubiquinona, e o citocromo c (Figura 2). Os complexos I e II catalisam a transferência de elétrons para a coenzima Q, a partir de dois doadores de elétrons, o NADH, presente no complexo I, e o succinato presente no complexo II. O complexo III tem a função de transportar os elétrons da coenzima Q reduzida para o citocromo c e o complexo IV termina a sequência com a transferência de elétrons do citocromo c para o oxigênio molecular, reduzindo-o a água (Nelson e Cox, 2002; McEwen *et al.*, 2011).

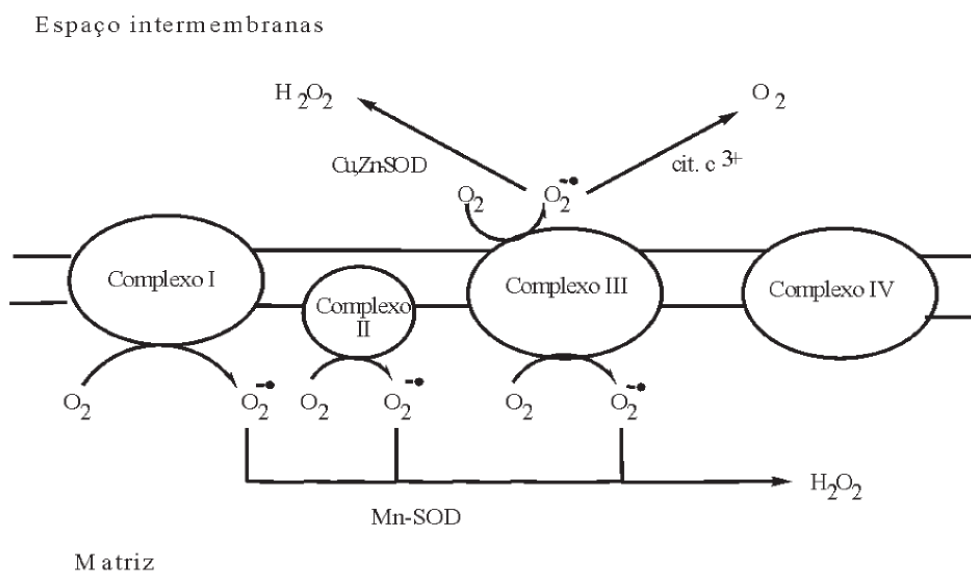


Figura 2: Formação de radicais livres na cadeia transportadora de elétrons (Mn-SOD: Superóxido dismutase manganês; CuZn-SOD: Superóxido dismutase cobre-zinco) (Retirado de: Cerqueira *et al.*, 2007).

A redução do oxigênio, no complexo III, envolve a formação de espécies intermediárias potencialmente perigosas.

As três principais ERO obtidas por este processo são o radical superóxido, o radical hidroxilo e o peróxido de hidrogênio, sendo as reações mediadas por enzimas específicas, na presença de íons como o ferro e o cobre (Figura 3) (Barbosa *et al.*, 2010).

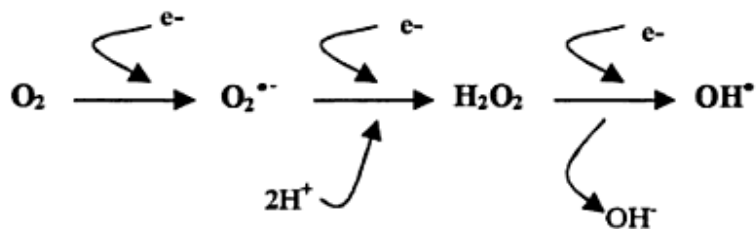


Figura 3: Esquema global da redução do oxigénio e respetiva formação de ERO (reação não se encontra estequiometricamente acertada) (Adaptado de: Garcez *et al.*, 2004).

O radical superóxido é formado pela adição de um eletrão ao oxigénio molecular (Figura 4). Estudos indicam que este radical pode ser produzido por duas fontes, quer através do complexo I e III da cadeia transportadora de eletrões, quer através da intervenção de enzimas como a NADPH oxidase ou a xantina oxidase (Garcez *et al.*, 2004; Birben e Erzurum, 2012).

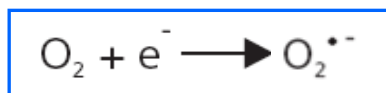


Figura 4: Reação referente à formação do radical superóxido.

No decorrer do processo de transferência de eletrões, a coenzima Q, é oxidada obtendo-se o radical semiquinona, o qual na presença de oxigénio forma os radicais superóxido. A partir da formação deste radical, outros também podem ser obtidos, como por exemplo o radical hidroxilo e o peróxido de hidrogénio e ainda o peroxinitrito pela reação com o radical monóxido de azoto (Figura 5) (Nelson e Cox, 2002; Garcez *et al.*, 2004).



Figura 5: Reação de formação do peroxinitrito.

Por sua vez, o peróxido de hidrogénio é gerado após a redução do oxigénio molecular ou pela redução do radical superóxido (Figura 6). A reação de conversão *in*

vivo do radical superóxido em peróxido de hidrogénio é catalisada pela enzima superóxido dismutase (Birben e Erzurum, 2012).

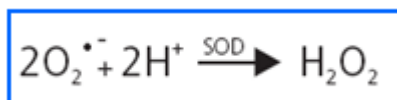
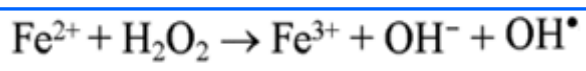
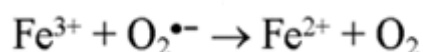


Figura 6: Reação de formação do peróxido de hidrogénio.

O radical hidroxilo pode ser originado através da reação de Fenton e Haber-Weiss, na presença de iões metálicos de transição, sendo os principais o ferro e o cobre. Assim, a partir da reação de Fenton dá-se a redução do peróxido de hidrogénio a radical hidroxilo dependente da presença de iões metálicos de transição (Figura 7) (Garcez *et al.*, 2004).

Por sua vez, a reação de Haber-Weiss consiste na reação entre o radical superóxido e o peróxido de hidrogénio formando-se assim o radical hidroxilo (Figura 7). Pode ainda ser formado pela dissociação do peroxinitrito e pela redução do ácido hipocloroso pelo anião superóxido (Garcez *et al.*, 2004).



Reação de Fenton

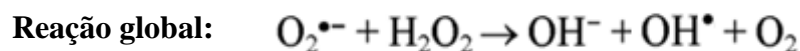


Figura 7: Reações de Fenton e de Haber-Weiss (reação global) (Adaptado de: Tedesco *et al.*, 1997).

Estudos recentes indicam que a mitocôndria, além de ter a capacidade de formar radicais livres de oxigénio, também pode produzir o radical monóxido de azoto, o qual pode funcionar como um mensageiro fisiológico, modulando a velocidade dos eletrões (Garcez *et al.*, 2004; Birben e Erzurum, 2012).

O radical monóxido de azoto pode ser formado a partir da L-arginina pela ação da enzima monóxido de azoto sintetase e dar origem ao peroxinitrito, ao reagir com o radical superóxido. Este radical pode inibir o processo de transporte de elétrons, levando a uma acumulação destes na cadeia transportadora de elétrons. Este aumento na produção de radicais livres pode induzir apoptose celular (Garcez *et al.*, 2004; Birben e Erzurum, 2012).

Os peroxissomas são organelas que possuem grande quantidade de enzimas hidrolíticas e constituem outra fonte de produção de radicais livres (Guyton e Hall, 1997; Garcez *et al.*, 2004).

Os peroxissomas contém enzimas oxidases, nomeadamente as peroxidases, que catabolizam gorduras e aminoácidos, gerando peróxido de hidrogénio, mas em contrapartida também é rico na enzima catalase. Esta enzima tem a capacidade de converter o peróxido de hidrogénio em água e oxigénio, diminuindo assim a possibilidade de dano celular no organismo mas não na totalidade, uma vez que com esta decomposição também se está a gerar oxigénio (Guyton e Hall, 1997; Garcez *et al.*, 2004).

No retículo endoplasmático liso, também há formação de radicais livres devido à presença do citocromo P450. Este sistema de enzimas microssómicas catalisa reações que levam à formação do radical superóxido, sendo mediadas por processos dependentes de NADPH (Garcez *et al.*, 2004).

O citocromo P450 possui várias características que são favoráveis ao desenvolvimento de radicais livres, como a presença de oxigénio e iões metálicos de transição, estando ainda envolvido em processos de destoxificação de substâncias prejudiciais para o organismo. Os metabolitos resultantes da ação de desintoxicação do citocromo P450 podem converter-se em intermediários reativos, os quais atuam como iniciadores da peroxidação lipídica, causando dano celular (Garcez *et al.*, 2004).

Aquando dos fenómenos fagocíticos, espécies reativas de oxigénio podem ser produzidas, uma vez que a ativação leucocitária leva a um aumento do consumo do oxigénio. Os leucócitos polimorfonucleares são importantes produtores de ERO, uma vez que possuem nas suas membranas a enzima NADPH oxidase que dá origem ao radical superóxido, o qual na presença da enzima mieloperoxidase forma o ácido hipocloroso (Figura 8). O radical superóxido pode ainda na presença da NADPH oxidase e de iões metálicos como o ferro converter-se em radical hidroxilo (Garcez *et al.*, 2004; Ribeiro *et al.*, 2005).

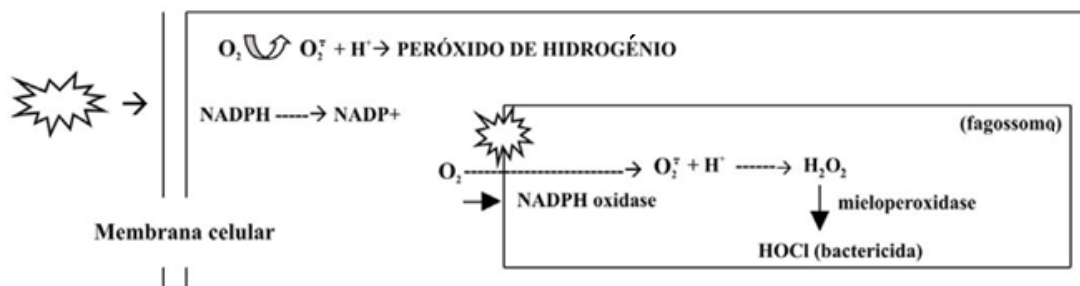


Figura 8: Formação de ERO em células fagocíticas na presença da NADPH oxidase
(Adaptado de: Ribeiro *et al.*, 2005).

Uma outra fonte de radicais livres é a enzima xantina desidrogenase. Esta converte-se em xantina oxidase através da ativação de uma protease e na presença de um baixo nível energético celular (Garcez *et al.*, 2004).

Por sua vez a xantina oxidase catalisa a conversão de hipoxantina em xantina (Figura 9), formando-se radical superóxido, o qual participa como intermediário nas reações que produzem peróxido de hidrogénio (Figura 9) (Campos e Yoshida, 2004; Junior *et al.*, 2005).

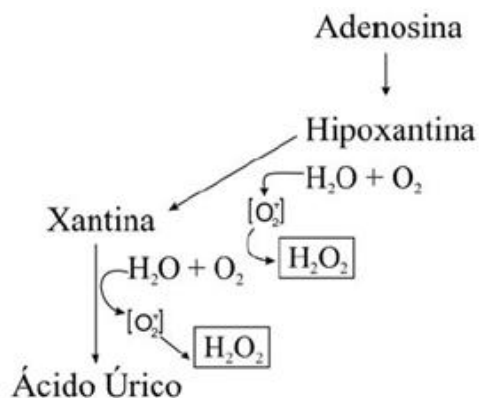


Figura 9: Conversão da hipoxantina em ácido úrico com a formação de $\text{O}_2^{\bullet-}$ e de H_2O_2 (Retirado de: Ribeiro *et al.*, 2005).

1.4.2. Fontes exógenas

Os radicais livres também podem provir de fontes externas ao organismo, sendo as principais, as radiações ionizantes, o fumo do cigarro, a exposição ao ozono, os poluentes ambientais, o *stress*, certos medicamentos, os iões metálicos pesados e os solventes orgânicos, entre outras.

A exposição a radiações ionizantes pode desencadear processos citotóxicos e carcinogénicos na pele, uma vez que as radiações UVA e UVB contribuem para o aumento das espécies oxidantes e para a diminuição das defesas antioxidantes, levando a um desequilíbrio da homeostasia redox (Garcez *et al.*, 2004).

Alguns mecanismos de resposta à exposição das radiações ionizantes podem justificar a formação de radicais livres, dado que numa fase inicial, verifica-se uma chamada de células especializadas como os neutrófilos, sendo ativado o sistema NADPH oxidase, conduzindo à formação de espécies reativas. Tal situação pode verificar-se quando os fibroblastos expostos a partículas com elevado poder ionizante têm uma maior produção de radicais superóxido e peróxido de hidrogénio na presença da enzima NADPH oxidase (Guaratini *et al.*, 2007; Birben e Erzurum, 2012).

Quando há exposição às radiações UVB, também se constatou um aumento da expressão da enzima monóxido de azoto sintetase na pele, a qual leva à formação do radical monóxido de azoto (Guaratini *et al.*, 2007).

Outro mecanismo de formação de espécies reativas pode ser observado quando fotões UVA induzem reações oxidativas por excitação de fotossensibilizadores endógenos, na presença de oxigénio, como a NADPH oxidase e as riboflavinas (Guaratini *et al.*, 2007; Birben e Erzurum, 2012).

O fumo do cigarro tem igualmente um papel determinante na obtenção de espécies reativas a partir do exterior, uma vez que é extremamente rico em espécies oxidantes, radicais livres e componentes orgânicos. Assim, podem estar presentes as ERO e as ERN, bem como os radicais livres orgânicos, como por exemplo os radicais alquilo (Garcez *et al.*, 2004; Birben e Erzurum, 2012).

Pertencentes aos componentes orgânicos existentes no fumo do cigarro, as quinonas podem formar o radical semiquinona, sendo que a partir deste pode ser produzido o radical superóxido e o peróxido de hidrogénio, o qual na presença de ferro pode levar à formação do radical hidroxilo altamente reativo. A nível pulmonar, e aquando da inalação do fumo do cigarro, também podem ser ativados certos mecanismos endógenos, como a acumulação de neutrófilos e macrófagos, a qual pode conduzir posteriormente a um aumento da lesão oxidante (Garcez *et al.*, 2004; Birben e Erzurum, 2012).

À semelhança das fontes anteriores, a exposição ao ozono também pode provocar peroxidação lipídica e desencadear uma acumulação de neutrófilos no epitélio respiratório. Esta exposição, mesmo a curto prazo, conduz à libertação de mediadores inflamatórios, como a mieloperoxidase, levando a uma diminuição das funções pulmonares (Birben e Erzurum, 2012).

Certos iões metálicos como o ferro, cobre, cádmio, mercúrio, chumbo e arsénio podem levar à formação de radicais livres e causar lesão celular por depleção da atividade enzimática através da peroxidação lipídica e reação com proteínas nucleares e

ADN. Os radicais livres podem ser gerados por processos mediados por íons metálicos através de reações do tipo Fenton (Figura 10) (Birben e Erzurum, 2012).



Figura 10: Formação do radical hidroxilo mediado por íons metálicos (Adaptado de: Birben e Erzurum, 2012).

Desta forma, são várias as fontes de radicais livres encontrando-se ilustradas na figura 11 alguns exemplos.

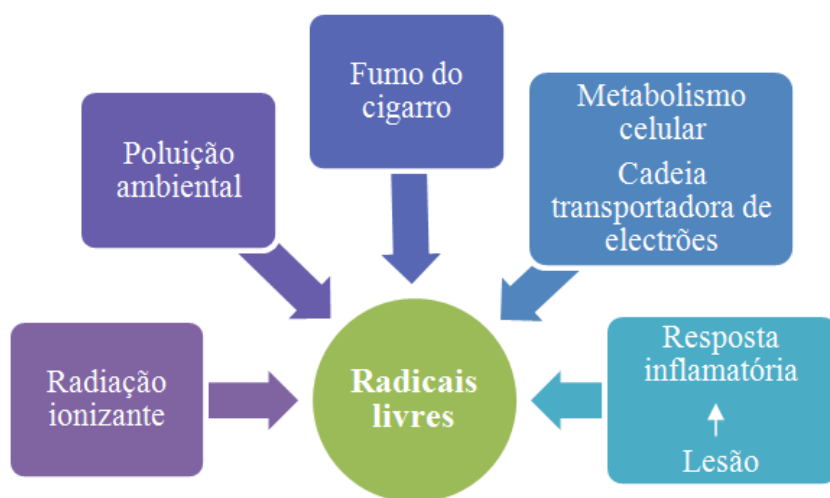


Figura 11: Quadro resumo das fontes de radicais livres (Adaptado de: Willcox *et al.*, 2004).

III. Capítulo 2: Antioxidantes

2.1. Perspetivas históricas

A primeira vez que foram utilizados certos compostos com o objetivo de retardar reações oxidativas, foi em 1797 por Berthollet (Bailey, 1996).

Inicialmente, os antioxidantes eram conhecidos como sendo produtos químicos que impediam o consumo de oxigénio. No entanto, foi a partir dos finais do século XIX que foi desenvolvida uma grande pesquisa sobre o uso dos antioxidantes a nível industrial (Lobo *et al.*, 2010).

O estudo da atuação dos antioxidantes foi primeiramente associado à prevenção da oxidação de gorduras insaturadas, que é a causa do aparecimento de ranço. Em contrapartida, o auge na investigação dos antioxidantes ficou marcado pela descoberta das vitaminas C e E, as quais demonstraram serem importantes atividades antioxidantes nos processos bioquímicos dos seres vivos (Lobo *et al.*, 2010).

Os mecanismos de ação dos antioxidantes foram analisados quando foi conhecido que uma substância com atividade antioxidante poderia ter a capacidade de se oxidar facilmente a si própria (Lobo *et al.*, 2010).

A pesquisa da vitamina E permitiu reconhecer os antioxidantes como agentes redutores, com capacidade de eliminarem os radicais livres e assim evitarem os danos celulares (Lobo *et al.*, 2010).

2.2. Conceito de antioxidantes

Segundo Halliwell e Gutteridge, “antioxidante” é definido como qualquer substância que quando presente em baixas concentrações, comparativamente às de um substrato oxidável, atrasa ou inibe significativamente a oxidação desse substrato (Halliwell e Gutteridge, 1995; Willcox *et al.*, 2004; Cerqueira *et al.*, 2007).

Uma reação de oxidação envolve a transferência de elétrons de uma substância para um agente oxidante, podendo desencadear a formação de radicais livres. Assim, os antioxidantes impedem estas reações em cadeia por remoção de intermediários reativos e inibem outras reações de oxidação, atuando como agentes de redução (Chakraborty *et al.*, 2009; Hamid *et al.*, 2010).

Os antioxidantes têm a capacidade de proteger as células do organismo de lesões causadas por substâncias instáveis, como os radicais livres, promovendo a sua destruição, e de fornecer um suporte para o sistema imunológico, evitando assim o aparecimento e a progressão de uma variedade de doenças (Chakraborty *et al.*, 2009).

Os antioxidantes são moléculas suficientemente estáveis para neutralizarem os radicais livres. No entanto, nenhum antioxidante por si só reúne todas as características de um antioxidante ideal, como por exemplo (Rahman, 2007; Lobo *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2009):

- Apresentar uma boa biodisponibilidade, quer por via oral, quer por via parenteral;
- Ter um tempo de semivida longo;
- Ser ativo no espaço intra e extracelular e na proteção de proteínas e lípidos, entre outras biomoléculas;
- Ter a capacidade de atravessar as biomembranas intactas;
- Ser um composto biológico presente em tecidos animais;
- Eliminar os radicais livres;
- Quelatar metais redox.

2.3. Classificação dos antioxidantes

Os antioxidantes encontram-se presentes no organismo para estabelecer um equilíbrio com os efeitos que advêm das espécies oxidantes, a fim de evitar o *stress* oxidativo.

Estes podem ser de origem natural ou sintética, podendo provir do metabolismo ou da dieta. São classificados em duas categorias principais: os antioxidantes enzimáticos e os não enzimáticos (Bianchi e Antunes, 1999; Birben e Erzurum, 2012; Shalaby e Shanab, 2013).

Dentro dos antioxidantes enzimáticos, estes podem subdividir-se em enzimas principais, incluindo a superóxido dismutase, a catalase e a glutathione peroxidase e em enzimas secundárias, compreendendo a glutathione reductase (Gr), a glutathione-S-transferase (GST), as tioredoxinas (Trx) e as glutathione reductases (Grx) (Shalaby e Shanab, 2013).

Os antioxidantes não enzimáticos podem ser agrupados em compostos endógenos e exógenos, mas também em, mediante as suas características: i) vitaminas, das quais fazem parte a A, a C e a E; ii) metais, como o selénio e o zinco; iii) carotenoides, incluindo o β -caroteno, licopeno, luteína e zeaxantina; iv) cofatores antioxidantes, fazendo parte a ubiquinona; v) antioxidantes de baixo peso molecular, como a glutathione e o ácido úrico e em vi) polifenóis, como os flavonoides (flavonóis, isoflavonas, catequinas) (Shalaby e Shanab, 2013).

2.3.1. Antioxidantes Enzimáticos

Os antioxidantes enzimáticos atuam no organismo como a primeira linha de defesa contra as espécies reativas, tendo a capacidade de modificar os radicais livres tornando-os em espécies menos reativas ou inertes, inativando assim os seus efeitos deletérios.

Constituem uma proteção intrínseca e incluem como enzimas mais importantes a superóxido dismutase, a catalase, a glutaciona peroxidase, a glutaciona-S-transferase, a glutaciona redutase e o sistema tioredoxinas (Kunwar e Priyadarsini, 2011; Ribeiro *et al.*, 2005; Telesi e Machado, 2008).

A **superóxido dismutase** é uma enzima presente em praticamente todas as células aeróbias e em fluidos extracelulares, tendo um papel fundamental na remoção do radical superóxido, pois atua na dismutação deste em peróxido de hidrogénio e oxigénio.

Esta enzima pode ser encontrada em diversas formas dependendo do grupo prostético metálico associado e de outros cofatores, podendo ser identificada como SOD-cobre-zinco presente principalmente no citosol, SOD-manganês existente na matriz mitocondrial e como SOD-extracelular presente na matriz extracelular, a qual também contém cobre e zinco no seu centro ativo. No entanto, é sobretudo a SOD-cobre-zinco e a SOD-manganês que atuam como sequestradores de grandes quantidades do radical superóxido (Ferreira e Matsubara, 1997; Rahman, 2007; Chakraborty *et al.*, 2009; Lobo *et al.*, 2010).

Para além de eliminar o radical superóxido, repara as células e reduz as lesões causadas por este e ainda é essencial para a produção de fibroblastos saudáveis (Rahman, 2007; Chakraborty *et al.*, 2009).

A enzima **catalase** pode ser encontrada em vários locais do organismo como por exemplo, no fígado, rins, medula óssea, mucosas e no sangue, existindo como um tetrâmero composto por quatro monómeros semelhantes, cada um contendo um grupo heme no centro ativo (Chakraborty *et al.*, 2009; Birben e Erzurum, 2012).

A catalase tem como principal capacidade catalisar a decomposição do peróxido de hidrogénio, formado no peroxissoma, em água e oxigénio, apresentando a mais rápida taxa de conversão de todas as enzimas antioxidantes (Chakraborty *et al.*, 2009).

A sua atividade é dependente do NADPH, o qual funciona como um cofator redutor que evita a inativação oxidativa da enzima. A catalase apresenta como limitação

apenas atuar nas zonas hidrófilas da célula deixando suscetíveis ao ataque dos peróxidos de hidrogénio as partes lipídicas das mesmas (Ferreira e Matsubara, 1997; Ribeiro *et al.*, 2005; Rahman, 2007; Telesi e Machado, 2008 Chakraborty *et al.*, 2009).

A **glutathiona peroxidase** é uma enzima depende de selénio que catalisa a redução do peróxido de hidrogénio e hidroperóxidos orgânicos, resultantes da peroxidação lipídica, em água ou álcool, mediante a presença do cofator glutathiona (GSH).

Existem quatro formas diferentes de GPx, enumeradas de um a quatro, sendo que a GPx-1 é a forma mais abundante e eficiente na remoção de peróxido de hidrogénio e a GPx-4 é a mais ativa na eliminação dos hidroperóxidos orgânicos (Lobo *et al.*, 2010; Birben e Erzurum, 2012).

A catalase compete com esta enzima pela remoção do peróxido de hidrogénio. No entanto, verifica-se que a GPx é mais ativa quando existem baixos níveis de concentração de peróxido de hidrogénio, constituindo assim a principal proteção contra o baixo nível de *stress* oxidativo.

Tem ainda a capacidade de atuar no citosol e na mitocôndria, aumentando assim os locais onde há eliminação de peróxido de hidrogénio, uma vez que a catalase não se encontra presente a nível mitocondrial (Ferreira e Matsubara, 1997; Ribeiro *et al.*, 2005; Rahman, 2007; Lobo *et al.*, 2010; Birben e Erzurum, 2012).

Contrariamente à enzima anterior, a **glutathiona-S-transferase** é uma enzima independente de selénio, utilizada para eliminar hidroperóxidos orgânicos, epóxidos e aldeídos insaturados. Esta transferase catalisa reações de conjugação entre a glutathiona e as moléculas oxidadas (Ribeiro *et al.*, 2005; Rahman, 2007; Lobo *et al.*, 2010; Birben e Erzurum, 2012).

Existem três tipos principais de GST, a citosólica, a mitocondrial e a associada à membrana microsomal. A GST encontra-se presente em elevadas concentrações no

fígado, estando envolvida no metabolismo da glutatona, dos eicosanóides e dos xenobióticos (Rahman, 2007; Lobo *et al.*, 2010; Birben e Erzurum, 2012).

A **glutathione redutase**, em conjunto com as duas enzimas anteriores, constitui o sistema glutatona. Esta enzima é uma flavoproteína com capacidade de regenerar a glutatona oxidada (GSSG) em glutatona reduzida (GSH), com o objetivo de manter os níveis adequados de GSH para poderem ser utilizados pela glutatona peroxidase. No entanto, para tal necessita de cofatores redutores, como o NADPH (Ferreira e Matsubara, 1997; Ribeiro *et al.*, 2005; Pham-Huy *et al.*, 2008).

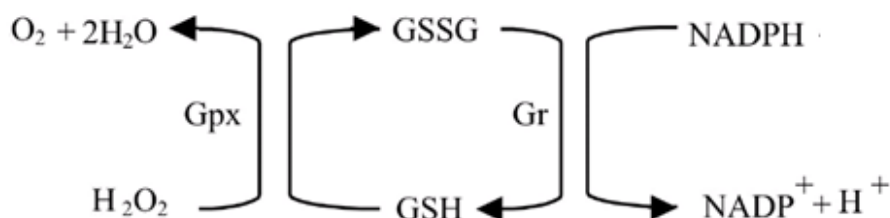


Figura 12: Reações enzimáticas envolvidas na manutenção da glutatona na forma reduzida (Adaptado de: Ribeiro *et al.*, 2005; Kunwar e Priyadarsini, 2011).

O **sistema tiorredoxina** possui enzimas oxirredutases, denominadas tiorredoxinas e tiorredoxina redutase, estando presentes no citosol e na mitocôndria.

As **tiorredoxinas** são enzimas que catalisam reduções utilizando, para tal, vários substratos. Doam equivalentes redutores para proteínas, como a GSSG e o peróxido de hidrogénio, ficando oxidadas, sendo depois reduzidas pela tiorredoxina redutase (Ribeiro *et al.*, 2005; Birben e Erzurum, 2012).

A **tiorredoxina redutase** (TrxR) utiliza o NADPH para reduzir pontes de dissulfureto da tiorredoxina. Esta enzima contém selénio na forma de selenocisteína, o qual é fundamental para a sua ação enzimática. Apresenta uma elevada especificidade por substratos, como hidroperóxidos orgânicos e peróxido de hidrogénio, o que faz com que este sistema tenha um papel fundamental na manutenção do estado redox da célula, atuando em sistemas de regulação da expressão de genes (Ribeiro *et al.*, 2005; Birben e Erzurum, 2012).

As **glutarredoxinas** são tiorredoxinas constituídas por um dissulfureto redox ativo e um local de ligação para a glutathione (Birben e Erzurum, 2012).

Assim, é através das enzimas superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase e glutathione reductase que o organismo consegue manter a concentração de ERO e de ERN dentro dos parâmetros fisiológicos e é recorrendo ao sistema tiorredoxina que regula a quantidade de alvos moleculares oxidados (Ribeiro *et al.*, 2005; Birben e Erzurum, 2012).

2.3.2. Antioxidantes Não Enzimáticos

Este grupo de antioxidantes é composto por moléculas de baixo peso molecular que proporcionam uma defesa secundária contra os radicais livres. Atuam protegendo os alvos biológicos da oxidação por suprimirem a formação do radical livre através da quelatação de iões metálicos ou da inibição de enzimas produtoras de radicais livres, por eliminarem ou desativarem estas espécies reativas ou por participarem em processos de reparação (Ribeiro *et al.*, 2005; Kunwar e Priyadarsini, 2011).

Existe uma grande diversidade de antioxidantes não enzimáticos, sendo que estes podem ser divididos em antioxidantes endógenos, os quais são produzidos pelo organismo, e em antioxidantes exógenos, naturais ou sintéticos, fornecidos através dos alimentos ou suplementos (Ribeiro *et al.*, 2005; Pham-Huy *et al.*, 2008).

Os antioxidantes exógenos servem como um complemento à atuação dos endógenos na eliminação dos radicais livres, sendo que uma deficiência nos primeiros conduz a várias doenças crónicas e degenerativas.

Dos antioxidantes não enzimáticos endógenos mais relevantes fazem parte a glutathione, o ácido úrico, a melatonina e a coenzima Q₁₀. Dos antioxidantes não enzimáticos exógenos são exemplos as vitaminas C e E, os carotenoides, os flavonoides, o selénio e o zinco (Ribeiro *et al.*, 2005; Pham-Huy *et al.*, 2008).

Em relação aos antioxidantes não enzimáticos endógenos, a **glutathiona** (GSH) é extremamente abundante, estando presente no citosol, no núcleo e na mitocôndria. Este antioxidante é um tripéptido hidrossolúvel, composto pelos aminoácidos ácido glutâmico, cisteína e glicina, sendo o átomo de enxofre presente na cisteína o responsável pela atividade antioxidante dos compostos do grupo tiol.

Apresenta como principais funções:

- Servir de cofator de várias enzimas antioxidantes;
- Transportar aminoácidos através da membrana plasmática;
- Eliminar diretamente o radical hidroxilo e o oxigénio singlete;
- Converter o peróxido de hidrogénio e peróxidos orgânicos em espécies não reativas recorrendo à ação da GPx;
- Regenerar outros antioxidantes, como as vitaminas C e E, nas suas formas ativas;
- Proteger as células contra a apoptose;
- Regular e ativar vários fatores de transcrição.

Assim, a glutathiona é um dos antioxidantes celulares mais importantes, pois está presente em elevadas concentrações e tem um papel fulcral na manutenção do equilíbrio redox das células (Rahman, 2007; Valko *et al.*, 2007; Lobo *et al.*, 2010; Birben e Erzurum, 2012).

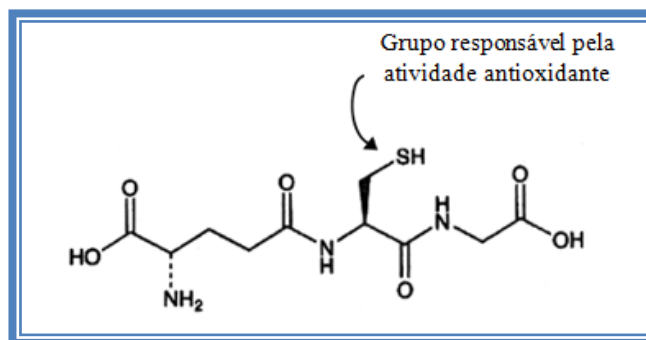


Figura 13: Estrutura da Glutathiona (GSH) (Adaptado de: Sies, 1999).

Outro antioxidante é o **ácido úrico**, que da mesma forma que o anterior é sintetizado no organismo, através do metabolismo das purinas. É o responsável por cerca de metade da capacidade de eliminação de radicais livres no plasma, sendo um antioxidante hidrossolúvel muito abundante.

Atua eficazmente na eliminação de radicais hidroxilo, peróxido e dióxido de azoto, tendo assim um papel fisiológico de proteção do ADN e prevenção da peroxidação lipídica. O ácido úrico consegue recuperar certas estruturas que se tornaram radicais livres pela doação de um elétron e de um próton e pode estabilizar o ácido ascórbico no plasma devido à sua aptidão para quelatar iões metálicos (Waring, 2002; Barreiros *et al.*, 2006; Lobo *et al.*, 2010).

A **melatonina** é uma hormona natural com um grande poder antioxidante, uma vez que tem a capacidade de atravessar as membranas celulares e a barreira hematoencefálica. Tem a função de eliminar as ERO evitando os danos induzidos por estas e, consequentemente, doenças associadas. A melatonina, contrariamente à glutathiona e outros antioxidantes, não tem a capacidade de ser regenerada, ou seja, não pode sofrer repetida redução e oxidação, sendo denominada como antioxidante terminal (Rahman, 2007; Lobo *et al.*, 2010).

A **coenzima Q₁₀** ou ubiquinona (Figura 14) tem propriedades lipossolúveis, sendo o constituinte principal de diversas membranas, como a mitocondrial interna, a do

complexo de Golgi e a dos lisossomas. É sintetizada endogenamente por todas as células, sendo assim o único lípido que tem função redox.

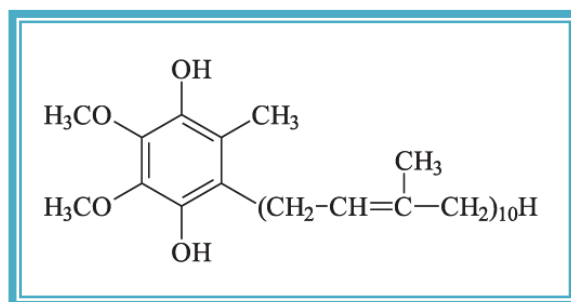


Figura 14: Estrutura química da coenzima Q₁₀ (Retirado de: Barreiros *et al.*, 2006).

Esta coenzima ao ser ingerida como suplemento antioxidante distribui-se maioritariamente pelo fígado e plasma e exerce efeitos positivos no tratamento de doenças cardíacas, hipertensão e em doenças degenerativas.

A sua forma reduzida é o ubiquinol e a oxidada é a ubiquinona e tem como principal função participar no transporte de eletrões na mitocôndria durante a fosforilação oxidativa. No entanto, a ubiquinona também consegue transportar eletrões para aceitadores que não participem na cadeia respiratória (Barreiros *et al.*, 2006; Firuzi *et al.*, 2011).

Assim, a oxidação do ubiquinol ocorre pela doação de um hidrogénio para um radical, obtendo-se a semiquinona, a qual posteriormente por reações de oxidação conduz à formação da ubiquinona com a inativação de dois radicais livres (Figura 15).

peroxidação lipídica (Bianchi e Antunes, 1999; Cerqueira *et al.*, 2007; Rahman, 2007; Pham-Huy *et al.*, 2008; Telesi e Machado, 2008; Lobo *et al.*, 2010).

Os produtos da oxidação do ácido ascórbico, por captura de um e de dois elétrons, são respetivamente, o radical ascorbilo e o ácido dehidroascórbico (forma oxidada), como pode ser visualizado na figura 16 (Cerqueira *et al.*, 2007).

O radical ascorbilo apresenta baixa reatividade e pode ser convertido novamente em ácido ascórbico por redutases dependentes do NADH, sendo utilizado como indicador de *stress* oxidativo. O ácido dehidroascórbico é pouco estável em condições fisiológicas, sendo reduzido a ácido ascórbico ou hidrolisado irreversivelmente.

A capacidade dos produtos de oxidação se reverter novamente a ácido ascórbico, torna esta vitamina um eficiente antioxidante, permitindo-a atuar na redução do cancro do estômago e na prevenção dos cancros do pulmão e colorretal. No entanto, estudos têm revelado que esta vitamina também possui poder pró-oxidante, ou seja, a aptidão de gerar radicais livres, por ter a capacidade de reduzir metais de transição (Bianchi e Antunes, 1999; Cerqueira *et al.*, 2007; Rahman, 2007; Pham-Huy *et al.*, 2008; Telesi e Machado, 2008).

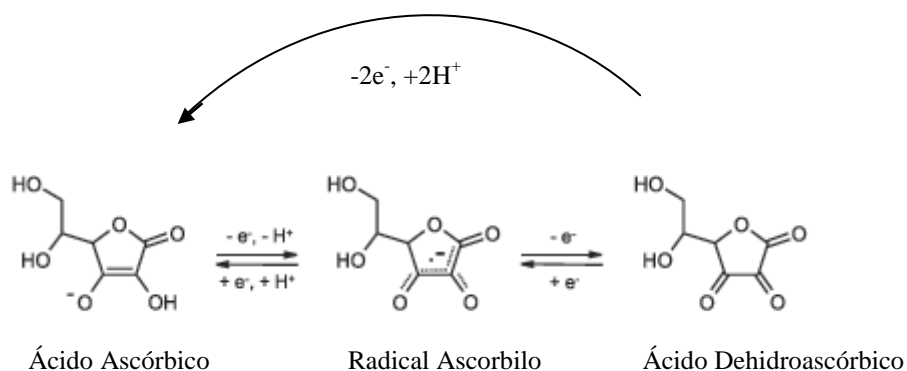


Figura 16: Reações de oxidação/redução do ácido ascórbico (Adaptado de: Cerqueira *et al.*, 2007).

A **vitamina E** é um antioxidante lipossolúvel existente em oito formas de tocoferóis e tocotrienóis. No homem, a forma mais ativa é o α -tocoferol (Figura 17),

antioxidantes para regenerarem o radical α -tocoferilo (Bianchi e Antunes, 1999; Cerqueira *et al.*, 2007).

Os **carotenoides** são compostos isoprenóides com várias ligações duplas conjugadas, o que lhes permite exercer a função de corantes naturais. Existe uma grande diversidade de carotenoides, no entanto, os principais que se encontram no homem são o β -caroteno, o licopeno e as xantofilas (Figura 18). Estes são constituintes lipofílicos e estão localizados no tecido adiposo, nas lipoproteínas e nas membranas celulares.

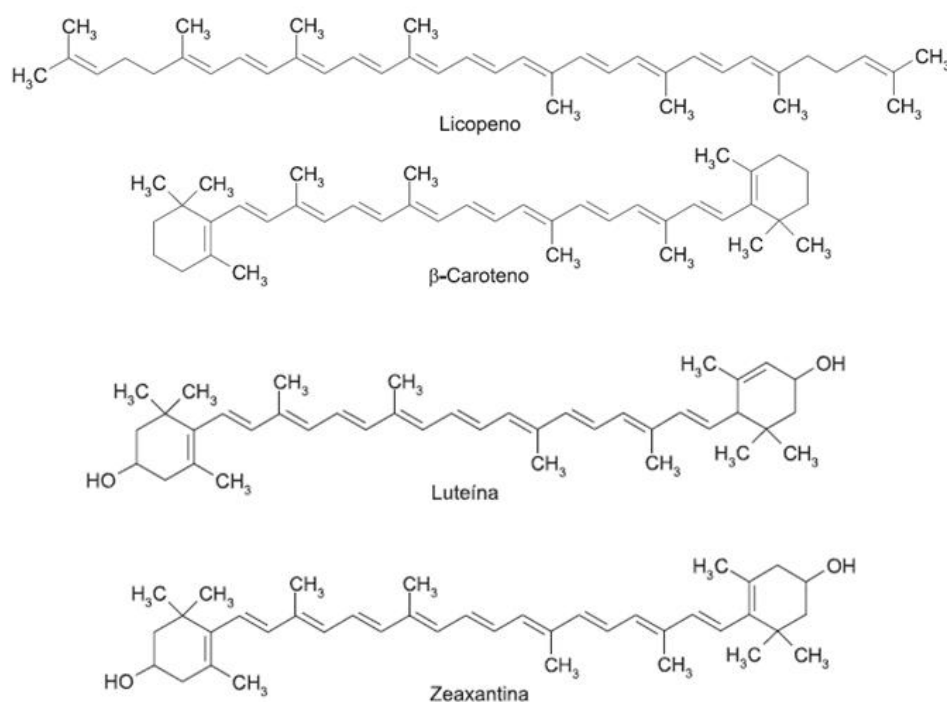


Figura 18: Estrutura química dos principais carotenoides (Retirado de Cerqueira *et al.*, 2007).

O poder antioxidante dos carotenoides está relacionado com a sua estrutura, nomeadamente no que respeita ao sistema de duplas ligações conjugadas, no sentido de ser possível captarem os radicais livres, como o peróxido.

Outros fatores que condicionam a atividade antioxidante são a sua configuração espacial, o local de ação da carotenoide dentro da célula, a interação com outros

carotenoides ou antioxidantes (vitaminas C e E), a concentração do carotenoide e a pressão parcial de oxigénio (Cerqueira *et al.*, 2007; Telesi e Machado, 2008).

Durante as reações de sequestro e inativação de radicais livres, formam-se radicais carotenoides, mas à semelhança dos radicais ascorbilo e α -tocoferilo, são pouco reativos. Assim, os carotenoides apresentam como propriedades serem sequestrantes de radicais peróxido e de oxigénio singlete, moduladores do metabolismo carcinogénico, estimuladores da comunicação entre as células, potenciadores da resposta imune e inibidores da proliferação celular (Cerqueira *et al.*, 2007; Telesi e Machado, 2008).

O **β -caroteno**, é uma provitamina uma vez que pode ser convertido endogenamente em vitamina A ativa, sendo o retinol formado fundamental para a visão, e para um bom funcionamento do sistema imunológico. Atua protegendo as membranas celulares, as proteínas e o ADN e se for ingerido em pequenas quantidades, tem a capacidade de reduzir o risco de se desenvolver cancro ou doenças cardíacas (Cerqueira *et al.*, 2007; Ehrlich, 2012).

O **licopeno** não atua como provitamina A, mas demonstra possuir atividade antioxidante e antiproliferativa, principalmente em células da mama, próstata e dos pulmões. Assim como o β -caroteno, o licopeno também possui características apolares e, desta forma, a sua ação é mais regeneradora do que preventiva, combatendo assim os radicais livres de forma mais eficiente no interior das membranas (Barreiros *et al.*, 2006; Cerqueira *et al.*, 2007).

Pertencente ao grupo das **xantofilas**, fazem parte a luteína e a zeaxantina, os quais são pigmentos vegetais que se acumulam na mácula da retina do olho. A zeaxantina, à semelhança do β -caroteno, apresenta atividade provitamina A, convertendo-se na própria vitamina A (Cerqueira *et al.*, 2007; Perry *et al.*, 2008).

Atuam filtrando a luz e formando uma barreira que protege a mácula das lesões oxidativas, evidenciando um efeito antioxidante protetor no desenvolvimento de degeneração macular. Os níveis destes pigmentos no sangue e nos tecidos devem-se à ingestão de alimentos ricos em xantofilas (Perry *et al.*, 2008).

No entanto, estudos revelaram que o β -caroteno, o licopeno e a luteína apresentam atividade pró-oxidante em concentrações elevadas de carotenoides e a pressões elevadas de oxigénio, tornando-os agentes redutores incomuns (Cerqueira *et al.*, 2007; Rahman, 2007; Pham-Huy *et al.*, 2008).

Os **polifenóis** também possuem atividade antioxidante, sendo os mais abundantes da dieta. Deste grupo, os mais importantes como antioxidantes são os flavonoides.

Existe uma grande diversidade de **flavonoides**, estando divididos em diferentes classes principais, de acordo com o estado de oxidação da cadeia heterocíclica do pirano.

Assim subdividem-se em flavonóis, flavonas/catequinas, isoflavonas, flavononas e antocianidinas (Figura 19). As antocianidinas podem ainda diferenciar-se dos outros flavonoides pelo facto de possuírem na sua estrutura o catião flavílio (Barreiros *et al.*, 2006; Rahman, 2007; Volp *et al.*, 2008).

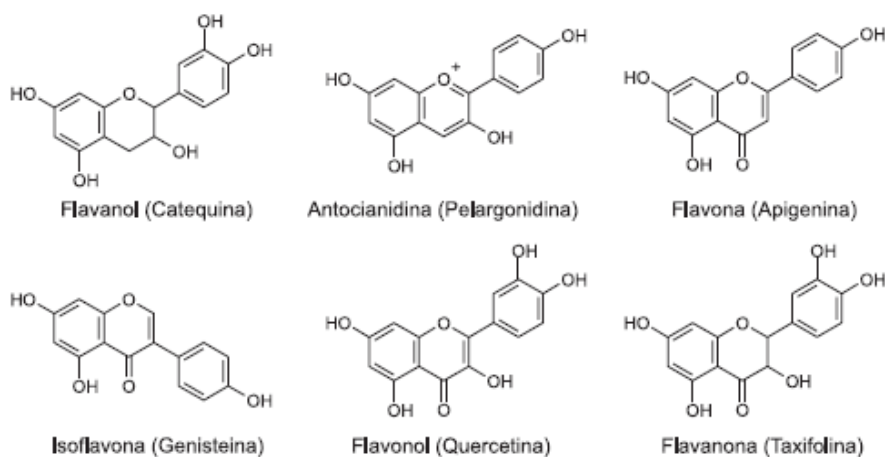


Figura 19: Principais estruturas das classes de flavonoides (Retirado de: Cerqueira *et al.*, 2007).

Estes compostos estão presentes em grande parte das plantas, possuindo uma elevada capacidade antioxidante, estando envolvidos na prevenção de doenças crónicas e degenerativas e de neoplasias.

A capacidade antioxidante é influenciada pela estrutura do flavonoide, dependendo da reatividade do dador de elétrons e prótons, da estabilidade do radical flavonoide formado, da reatividade perante outros antioxidantes, da capacidade de quelatar íons metálicos e da interação e solubilidade nas membranas (Barreiros *et al.*, 2006; Rahman, 2007).

Desta forma, o sequestro dos radicais livres está relacionado com o potencial de oxidação dos flavonoides e das espécies sequestradas, sendo que quanto menor o potencial de oxidação dos flavonoides, maior é a atividade como agente sequestrador de radicais livres e quanto maior o número de grupos hidroxilos, maior é a atividade como agente dador de prótons e elétrons.

Relativamente à estabilidade do radical formado, esta depende da capacidade do flavonoide deslocalizar o elétron desemparelhado, sendo potenciada pela presença de grupos hidroxilos em posição *orto* (Barreiros *et al.*, 2006).

A eliminação de íons metálicos do meio é essencial para a proteção antioxidante, uma vez que estes têm competência para catalisarem as reações de Fenton e Haber-Weiss.

Para apresentarem interação com as membranas, os flavonoides devem ter características lipofílicas, devendo por isso estar associados a ácidos gordos para assegurarem a sua atividade no local de ataque dos radicais livres. No entanto, quando estes possuem uma cadeia de açúcares a eles ligados, adquirem propriedades hidrofílicas, sendo armazenados em vesículas, permanecendo desta forma mais tempo no organismo (Barreiros *et al.*, 2006; Cerqueira *et al.*, 2007; Rahman, 2007; Pham-Huy *et al.*, 2008).

Atuam sequestrando radicais livres, como os radicais peróxido, alcóxido, superóxido, hidróxido, monóxido de azoto e peróxido nítrico, doando-lhes os seus elétrons e assim inibindo as suas reações em cadeia.

Os flavonoides são mais eficazes que as vitaminas C e E, uma vez que agem tanto a nível hidrofílico como lipofílico. Evidências científicas revelaram que, de forma semelhante aos antioxidantes anteriores, os flavonoides, sob certas condições, podem apresentar atividade pró-oxidante e que tal situação pode ser potenciada pela quantidade de grupos hidroxilos presentes na sua estrutura (Bianchi e Antunes, 1999; Cerqueira *et al.*, 2007; Rahman, 2007; Pham-Huy *et al.*, 2008).

Alguns metais também podem exercer atividade antioxidante, sendo o principal o **selénio**. Este é fundamental para a produção de enzimas neutralizadoras de radicais livres e para a proteção contra a peroxidação lipídica membranar. Atua em conjunto com a vitamina E, como antioxidante, e em baixas dosagens apresenta ainda propriedades anticancerígenas e imunomoduladoras, tendo um papel importante na função tiroideia (Bianchi e Antunes, 1999; Telesi e Machado, 2008).

Além dos antioxidantes acima descritos de origem natural, existem ainda os compostos **antioxidantes de origem sintética**. Deste grupo, os antioxidantes principais pertencem à família dos polifenóis e compreendem, o butil-4-hidroxianisol (BHA), o butil-4-hidroxitolueno (BHT), o *terc*-butil-hidroquinona (TBHQ) e o galhato de propilo (PG) (Figura 20) (Ramalho e Jorge, 2006; Shalaby e Shanab, 2013).

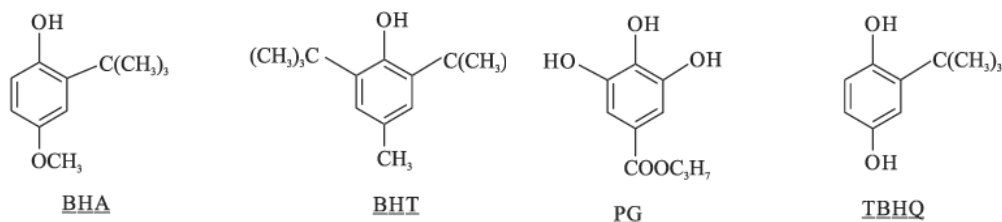


Figura 20: Estruturas químicas dos principais antioxidantes sintéticos (Retirado de: Ramalho e Jorge, 2006).

No entanto, ainda existem outros exemplos como o ácido nordihidroguaiarético (NDGA) e o ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) (Shalaby e Shanab, 2013).

Estes compostos sintéticos são utilizados principalmente na preservação de cosméticos, produtos farmacêuticos e alimentícios. No entanto, a sua aplicação nestes tem sido associada à toxicidade e instabilidade dos produtos devido à sua natureza sintética.

Devido à sua estrutura fenólica, estes antioxidantes conseguem interromper o mecanismo de oxidação por doarem um hidrogénio a um radical livre, transformando-se em radicais livres. No entanto, estes radicais formados não promovem reações de oxidação, uma vez que são estáveis em meio fisiológico (Ramalho e Jorge, 2006).

O BHA e o BHT são compostos fenólicos, cujos metabolitos podem estar relacionados com o aparecimento de carcinogenicidade e tumorigenicidade devido à sua capacidades de acumulação em vários órgãos, nomeadamente nos pulmões, rins e fígado, e aos atrasos induzidos na síntese de ADN e consequentemente no desenvolvimento das células (Shalaby e Shanab, 2013).

Contudo, estes são compostos que impedem a produção de radicais livres através do sequestro de iões metálicos, inibem a produção de certas enzimas que levam à formação de espécies reativas ou simplesmente eliminam os radicais livres (Lobo *et al.*, 2010; Kunwar e Priyadarsini, 2011; Shalaby e Shanab, 2013).

Assim, o BHA atua como sequestrador de radicais peróxido, enquanto o BHT age como sinergista ou regenerador de radicais BHA. O PG apresenta a desvantagem de, em elevadas concentrações, atuar como pró-oxidante e o TBHQ de não se complexar com os iões de ferro e cobre, como acontece com o PG. O EDTA, por ter propriedades quelantes, complexa iões metálicos evitando assim a oxidação lipídica (Ramalho e Jorge, 2006).

A descoberta de compostos antioxidantes eficientes na eliminação de radicais livres, de fabrico pouco dispendioso e com características vantajosas, como ser estável, isento de toxicidade, com aptidão para atravessar os tecidos e a barreira hematoencefálica, é uma mais-valia.

Contudo, devido à falta de segurança dos antioxidantes sintéticos, a utilização de antioxidantes de origem natural em alimentos, cosméticos, entre outros, é uma alternativa preferível por serem compatíveis com o organismo (Lobo *et al.*, 2010; Kunwar e Priyadarsini, 2011; Shalaby e Shanab, 2013).

2.4. Defesas antioxidantes

Os antioxidantes conseguem bloquear o processo de oxidação por neutralização das espécies reativas, sendo eles próprios oxidados durante este processo. Tanto os antioxidantes enzimáticos, como os não enzimáticos conferem proteção em ambiente intra e extracelular contra as ERO e as ERN.

De um modo geral, os antioxidantes agem de duas formas: por quebra das reações em cadeia, impulsionadas pelos radicais livres, no qual o antioxidante doa um eletrão ao radical livre, ou por prevenção, quer das oxidações, quer dos efeitos dos iões metálicos, por remover o catalisador inicial das reações em cadeia (Chakraborty *et al.*, 2009; Lobo *et al.*, 2010).

O sistema de defesa antioxidante atua em diferentes níveis. Numa primeira fase age na prevenção da formação das ERO e das ERN. Segue-se uma etapa de eliminação de espécies reativas formadas e posteriormente uma fase de reparação das moléculas alteradas por estas espécies. Por último, pode ainda existir um período de adaptação do organismo à produção de radicais livres (Chakraborty *et al.*, 2009; Lobo *et al.*, 2010).

Desta forma, a primeira linha de defesa antioxidante é considerada como preventiva, uma vez que impede a formação de radicais livres. Verifica-se nesta fase: i) quelatação de iões metálicos, os quais potenciam a reação de Fenton; ii) inibição de enzimas que catalisam a formação de espécies reativas; iii) transporte de oxigénio na forma ligada, de forma a não interagir com outras moléculas ou estruturas e iv) eficiente atividade da cadeia transportadora de eletrões, de maneira a haver uma produção controlada de ERO no organismo (Bianchi e Antunes, 1999; Ribeiro *et al.*, 2005; Chakraborty *et al.*, 2009; Lobo *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2009).

No segundo nível de defesa, ocorre a eliminação dos radicais livres propriamente ditos, por existir uma inibição da iniciação das reações em cadeia e/ou por haver quebra da propagação das reações em cadeia. Pode ser efetuada através de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Lobo *et al.*, 2010).

A terceira fase de proteção antioxidante baseia-se na reparação dos danos provocados pelos radicais livres, mais concretamente ao nível da molécula de ADN e das membranas celulares. As proteases e as fosfolipases têm a capacidade de degradarem e eliminarem as proteínas alteradas oxidativamente, impedindo assim, a acumulação de proteínas oxidadas (Ribeiro *et al.*, 2005; Lobo *et al.*, 2010).

Uma última linha de defesa antioxidante consiste na adaptação do organismo em resposta à produção de radicais livres, levando a que o organismo aumente a síntese de enzimas antioxidantes e as transporte para o local alvo (Bianchi e Antunes, 1999; Ribeiro *et al.*, 2005; Chakraborty *et al.*, 2009).

2.5. Fontes de aquisição de antioxidantes

Como referido anteriormente, os antioxidantes enzimáticos como a superóxido dismutase, a catalase e a glutathione peroxidase, entre outros, são obtidos endogenamente. Os mecanismos de produção deste tipo de antioxidantes são dependentes de certos iões metálicos como o cobre, o zinco e o selénio e ainda a presença de vitaminas em quantidades suficientes.

Assim, para a produção de SOD na mitocôndria é fundamental a presença de cobre e/ou zinco, enquanto que para a formação da glutathione peroxidase é indispensável a existência de selénio. No entanto, sem a presença de certas vitaminas, como a vitamina C e as do complexo B, a catalase não se consegue produzir, assim como a glutathione peroxidase não se consegue formar se não houver vitamina B₆ em quantidades suficientes (Telesi e Machado, 2008).

Alguns antioxidantes não enzimáticos, como a glutathione, o ácido úrico, a melatonina e a coenzima Q₁₀ são sintetizados no organismo. No entanto, outros

exemplos como a vitamina C, a vitamina E, os carotenoides e os polifenóis são obtidos exogenamente a partir de certos alimentos ingeridos durante uma alimentação saudável. Desta forma, os antioxidantes exógenos podem ser assimilados pelo organismo através da ingestão de certos alimentos ou através de suplementos alimentares.

Da grande diversidade de alimentos presentes na dieta, os que se destacam com quantidades significativas de antioxidantes estão descritos na tabela 1.

Tabela 1: Fontes de antioxidantes na dieta (Adaptado de: Bianchi e Antunes, 1999; Perry *et al.*, 2008; Pham-Huy *et al.*, 2008; Telesi e Machado, 2008; Chakraborty *et al.*, 2009; Hamid *et al.*, 2010).

Antioxidante	Alimentos
Vitamina C (ácido ascórbico)	Frutas cítricas - limão, laranja ; morangos, pimentos, batatas, espinafres, repolho, carnes, peixes, cereais.
Vitamina E (α -tocoferol)	Óleos vegetais - de soja, milho, gérmen de trigo e cártamo; cereais integrais, nozes, amêndoas, avelãs, manga, brócolos, ovos, carnes.
β -Caroteno	Alimentos alaranjados - cenoura , melão, laranjas, pêssegos, damasco, abóbora, manga; couve, espinafres.
Licopeno	Alimentos vermelhos - tomates , melancia, goiaba; damasco;
Xantofilas	Alimentos amarelo-alaranjado - milho, ovos ; espinafre, couve.
Selénio	Arroz, trigo , aipo, alho, cebola, brócolos, carne, fígado.
Flavonoides	Infusões , café, chocolate, azeite, vinho tinto , salsa, maçã, brócolos.

Desta forma é possível comprovar que os antioxidantes se encontram abundantemente distribuídos em frutas e vegetais, entre outros alimentos pertencentes a uma dieta saudável. Assim, a ingestão destes alimentos ricos em substâncias antioxidantes são uma mais-valia para combater o *stress* oxidativo provocado pelo excesso de espécies reativas. Estes antioxidantes obtidos a partir da dieta atuam como

um complemento à ação dos antioxidantes enzimáticos obtidos endogenamente, uma vez que estes podem não ser suficientes para regular o estado redox das células (Kunwar e Priyadarsini, 2011).

Para além da ingestão de alimentos como fontes de antioxidantes, existe ainda a administração de suplementos antioxidantes. Estes suplementos são produzidos por extração de alimentos naturais ou por síntese química. No entanto, não apresentam as mesmas características que os alimentos com propriedades antioxidantes de origem natural (Kunwar e Priyadarsini, 2011).

IV. Capítulo 3: Doenças que podem beneficiar da terapia antioxidante

3.1. Estados patológicos gerais

As diversas alterações ocorridas ao nível das proteínas, lípidos, ADN e hidratos de carbono, induzidas pelo excesso de radicais livres presentes no organismo, encontram-se implicadas na patogénese de uma grande variedade de doenças (Willcox *et al.*, 2004).

A estimulação exacerbada do ciclo celular desencadeia situações de neoplasias, assim como a resposta imune aumentada induz doenças auto-imunes e inflamatórias e a neuro-regulação acrescida leva ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (Cerqueira *et al.*, 2007).

Assim, destacam-se as doenças cardiovasculares, as doenças degenerativas, as neurológicas, as oculares, o cancro, a diabetes, as doenças inflamatórias e as pulmonares como sendo as doenças mais prevalentes decorrentes do *stress* oxidativo (Figura 21) (Cerqueira *et al.*, 2007; Valko *et al.*, 2007).



Figura 21: Algumas doenças induzidas pelo *stress* oxidativo (Adaptado de: Aruoma, 1998; Devasagayam *et al.*, 2004; Pham-Huy *et al.*, 2008).

Das doenças acima referidas apenas algumas serão analisadas ao detalhe, nomeadamente, o cancro e as doenças cardiovasculares, oculares e de Alzheimer.

As doenças neurodegenerativas, por exemplo, apresentam uma maior prevalência nas pessoas de idade avançada e devido ao facto do envelhecimento da população ser cada vez mais evidente, estas doenças tornam-se graves problemas de saúde. (Firuzi *et al.*, 2011).

3.2. Doença cardiovascular

A doença cardiovascular constitui a principal causa de morte em Portugal e em todos os restantes países europeus, assim como nos Estados Unidos e Japão (Willcox *et al.*, 2004; Direção Geral da Saúde, 2012).

Apresenta uma etiologia multifatorial e está relacionada com diversos fatores de risco, nomeadamente, tabagismo, alcoolismo, uma alimentação incorreta, *stress*, sedentarismo, diabetes, hipertensão arterial, colesterol elevado e obesidade (Pham-Huy *et al.*, 2008).

O *stress* oxidativo induzido pelas ERO em células cardíacas está associado a lesões no tecido cardiovascular, o que faz com que o desequilíbrio redox tenha um papel fulcral no desenvolvimento de várias doenças cardiovasculares, tais como, aterosclerose, doença isquémica cardíaca, cardiomiopatias, hipertrofia cardíaca, hipertensão e insuficiência cardíaca (Valko *et al.*, 2007; Pala e Gürkan, 2008).

No sistema cardiovascular, as principais fontes de *stress* oxidativo envolvem as enzimas xantina oxidoredutase (XOR), a NAD(P)H oxidase, a monóxido de azoto sintetase e os citocromos mitocondriais.

As ERO e as ERN atuam modificando a permeabilidade das membranas, perturbando a bicamada lipídica, alterando funcionalmente as proteínas celulares,

induzindo a peroxidação lipídica e provocando alteração na função dos miócitos (Pala e Gürkan, 2008).

A **aterosclerose** caracteriza-se por um espessamento local da parede do vaso, ocorrendo principalmente nas artérias musculares médias. Está associada com a existência e acumulação de células esponjosas, camadas de gordura e placas fibrosas (Willcox *et al.*, 2004).

As ERO exercem um papel importante na patogénese desta doença, uma vez que promovem a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), as quais depositam-se e contribuem para o estado inflamatório da aterosclerose. Além disso, a oxidação das LDL conduz à disfunção endotelial e pode ocorrer, quer crescimento celular, quer morte celular por apoptose (Rahman, 2007).

Decorrente de processos ateroscleróticos, poderão surgir situações de enfarte do miocárdio ou acidente vascular cerebral (AVC), uma vez que estes se devem à obstrução completa de um vaso. A ocorrência de AVC também se encontra associada à presença de radicais livres, pois estes têm como fonte de produção a xantina oxidase que produz o radical superóxido (Willcox *et al.*, 2004; Rahman, 2007).

A **lesão de isquemia-reperfusão** provoca danos no miocárdio e resulta de um restabelecimento de sangue após um período crítico de oclusão coronária. Durante este processo, a cadeia transportadora de eletrões é alterada, levando à produção de espécies reativas. Adicionalmente, o grande consumo de ATP leva à acumulação de hipoxantina e xantina que, depois de haver reperfusão e conseqüente entrada de oxigénio, são metabolizadas pela xantina oxidase, produzindo o radical superóxido e o peróxido de hidrogénio (Rahman, 2007; Valko *et al.*, 2007).

A **hipertensão arterial** afeta cerca de 42,1 % dos indivíduos adultos em Portugal e instala-se quando os valores de pressão arterial são superiores a 140/90 mm/Hg (Macedo *et al.*, 2007).

Esta doença também pode ser provocada pelo *stress* oxidativo causado pelo radical superóxido e pelo peróxido de hidrogénio. O primeiro é o responsável pela promoção da proliferação celular e o segundo é indutor de apoptose e um ativador da proteína C-quinase, a qual medeia a produção de ERO (Valko *et al.*, 2007; Pala e Gürkan, 2008).

As células endoteliais vasculares podem gerar o radical monóxido de azoto e em simultâneo com uma situação de disfunção endotelial, também contribuem para o desenvolvimento da hipertensão arterial (Valko *et al.*, 2007).

A **insuficiência cardíaca congestiva** ocorre quando a quantidade de sangue bombeado pelo coração é insuficiente para satisfazer as necessidades de oxigénio e nutrientes no organismo, originando situações de *stress* cardíaco (Figura 22).

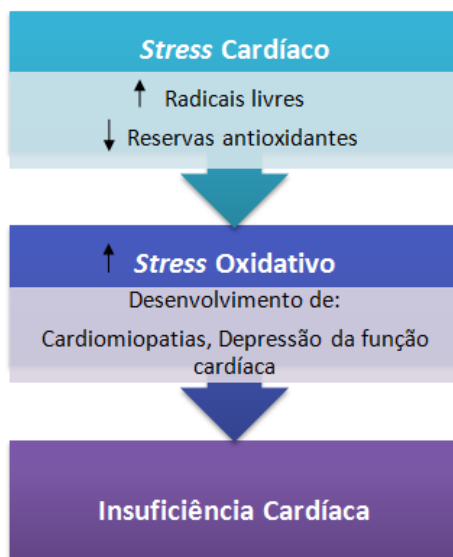


Figura 22: Ação do *stress* oxidativo no desenvolvimento de insuficiência cardíaca (Adpatado de: Singal *et al.*, 1998).

Nesta doença os níveis plasmáticos de malonildialdeído (MDA), um dos marcadores de peroxidação lipídica, encontram-se elevados e verifica-se a existência de outros fatores que promovem a produção de ERO, como a disfunção dos citocromos mitocondriais, situações recorrentes de isquemia-reperfusão e a ativação de citocinas (Singal *et al.*, 1998; Rahman, 2007; Kumar *et al.*, 2010).

3.2.1. Estudos epidemiológicos e clínicos

Nos últimos anos, vários estudos epidemiológicos observacionais têm evidenciado que a ingestão de frutas e vegetais ricos em antioxidantes, nomeadamente em vitaminas C e E e carotenoides, está associada a um baixo risco de doenças cardiovasculares (Myung *et al.*, 2013).

Desde a década de 1930 que vários estudos indicam que pessoas que tenham uma dieta rica em vitaminas C e E apresentam uma menor pressão arterial, em relação àquelas que façam uma alimentação normal. Em 1950 foi demonstrado inclusive que a ingestão de vitamina C diminuía o risco de morte cardiovascular (Asplund, 2002).

Inicialmente, os resultados de estudos observacionais incentivavam a ingestão destes antioxidantes como benéficos para a prevenção deste tipo de doenças. No entanto, ensaios clínicos randomizados mais recentes não têm confirmado este benefício.

Assim, com o passar dos anos, vários estudos testaram diversos compostos antioxidantes para avaliar a sua ação na proteção e na prevenção, quer primária, na população em geral, quer secundária, em pacientes com doenças cardiovasculares pré-existentes (Asplund, 2002; Myung *et al.*, 2013).

No “Nurses’ Health Study”, o qual teve uma duração de 16 anos, avaliou-se o efeito da ingestão de vitamina C (a partir da dieta ou através de suplementos) em cerca de 85 000 enfermeiras, para se estimar a diminuição do risco de desenvolvimento de doença cardíaca coronária (Osganian *et al.*, 2003).

Este estudo revelou uma associação inversa entre a ingestão de vitamina C e o risco de doença coronária, no que se refere à ingestão conjunta de vitamina C (a partir da dieta e suplementos) com um risco relativo (RR) de 0,73, intervalo de confiança (IC) a 95% de 0,57-0,94. Relativamente ao efeito da ingestão da vitamina C unicamente a partir da dieta, a prevenção de doença cardíaca coronária revelou-se baixa (RR de 0,86, IC a 95% de 0,59-1,26), não sendo significativa. Quanto à administração deste antioxidante através de suplementos, a prevenção de doença coronária foi mais evidente do que a administração conjunta de vitamina C (RR de 0,72, IC a 95% de 0,61-0,86) (Osganian *et al.*, 2003).

Foram também realizadas pesquisas em que foi unicamente analisado o consumo de vitamina E e o risco de desenvolver doenças coronárias.

Um ensaio reuniu uma amostra populacional de cerca de 90 000 enfermeiras, com idades compreendidas entre 34 e 59 anos, sem doenças cardiovasculares e cancro. As reduções no risco de doenças coronárias verificaram-se principalmente com uso de suplementos, uma vez que altos níveis de ingestão de fontes alimentares não resultaram na diminuição significativa da incidência destas doenças. As mulheres que tomaram suplementos por um curto período de tempo não demonstraram um benefício significativo. Porém, as que consumiram os suplementos por 2 ou mais anos tiveram uma diminuição no risco de doença cardíaca coronária de cerca de 40 % (Stamfer *et al.*, 1993).

Um outro estudo que revelou efeitos positivos da ingestão de antioxidantes na prevenção da doença cardíaca coronária, reuniu informação de nove estudos prospetivos. Estes avaliaram o efeito da ingestão das vitaminas C e E e carotenoides, durante um período de 10 anos, em indivíduos sem doença cardíaca coronária, aquando do início do estudo (Knekt *et al.*, 2004).

Os resultados revelaram que pessoas que ingeriram maior quantidade de suplementos de vitamina C tiveram uma menor incidência de doença cardíaca, relativamente aos que não efetuaram suplementação com esta vitamina. Sendo que, as pessoas que ingeriram uma quantidade superior a 700 mg de vitamina C tiveram um RR

de 0,75, IC a 95% de 0,60-0,93. No entanto, em relação à suplementação com a vitamina E, a redução da doença cardíaca coronária não foi significativa (Knekt *et al.*, 2004).

Mais tarde, também foi realizada uma meta-análise incluindo 15 estudos. Foi avaliada a relação entre os efeitos exercidos pelas vitaminas C e E e β -caroteno, a partir da dieta e de suplementos, e a diminuição do risco de doença cardíaca coronária. Com os resultados obtidos, por um período não inferior a 8,5 anos, concluiu-se que a ingestão das vitaminas C e E e o uso de suplementos de vitamina E, exerceram uma associação inversa com o risco de doença cardíaca coronária. No entanto, o uso de suplementos de vitamina C não demonstrou uma diminuição significativa no risco de doença coronária (Ye e Song, 2008).

Contudo, quando foram realizados estudos clínicos não se obteve os mesmos resultados positivos na prevenção das doenças cardiovasculares.

Um ensaio clínico denominado “Women’s Antioxidant Cardiovascular Study” realizado em cerca de 8 000 mulheres com idades iguais ou superiores a 40 anos, teve como objetivo avaliar o efeito da ingestão de suplementos de vitamina C diariamente (500 mg), de vitamina E em dias alternados (402 mg) e de β -caroteno a cada dois dias (50 mg) na prevenção secundária de eventos cardiovasculares (enfarte do miocárdio, AVC e/ou morte por doença cardiovascular). As mulheres em estudo apresentavam um historial prévio de doença cardiovascular, ou três ou mais fatores de risco para desenvolver a doença, sendo acompanhadas durante cerca de 9 anos (Cook *et al.*, 2008).

Os resultados obtidos revelaram ausência de efeitos positivos sobre a prevenção secundária das doenças cardiovasculares, através da suplementação com vitamina C (RR de 1,02, IC a 95 % de 0,92-1,13), com vitamina E (RR de 0,94, IC a 95 % de 0,85-1,04) e com β -caroteno (RR de 1,02, IC a 95 % de 0,92-1,13). Adicionalmente, foi observado que mais de 1 000 mulheres sofreram um ou mais eventos cardiovasculares durante o estudo (Cook *et al.*, 2008).

Jialal e Devaraj (2000) desenvolveram um estudo clínico intitulado “Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE)”. Avaliaram durante 4,5 anos cerca de 10 000 doentes com elevado risco de ataque cardíaco ou AVC com um consumo de cerca de 267 mg/dia de vitamina E e constataram que estes indivíduos não sofreram menos hospitalizações, nem eventos cardiovasculares, do que aqueles que tomaram placebo (Jialal e Devaraj, 2000).

Este estudo ainda se prolongou (Heart Outcomes Prevention Evaluation Study - The Ongoing Outcomes - HOPE-TOO) por mais 2,5 anos com parte dos indivíduos iniciais e não se verificaram efeitos positivos relativamente à prevenção de ataques cardíacos ou morte cardiovascular (Lonn *et al.*, 2005).

Lee e colaboradores (2005) realizaram um estudo clínico, “Women’s Health Study (WHS)”, no qual se avaliou os efeitos da suplementação da vitamina E sobre as doenças cardiovasculares em cerca de 40 000 mulheres saudáveis, com idades superiores a 45 anos, com um consumo de 400 mg, em dias alternados, de vitamina E e por um período de 10 anos.

Os resultados revelaram que não houve diferenças significativas na frequência de eventos ocorridos (RR de 0,93, IC a 95 % de 0,82-1,05) relativamente ao grupo placebo. As mesmas conclusões foram retiradas no que diz respeito à incidência de enfarte do miocárdio (RR de 1,01, IC a 95 % de 0,82-1,23), AVC (RR de 0,98, IC a 95 % de 0,82-1,17) e AVC isquémico ou hemorrágico. No entanto, houve uma diminuição de 24 %, relativamente ao grupo placebo, nas taxas de mortalidade cardiovascular. Mulheres com 65 anos ou mais, apresentaram uma diminuição de 26 % na frequência de ataques cardíacos não fatais e uma redução de 49 % nas taxas de morte cardiovascular com o consumo de vitamina E (Lee *et al.*, 2005).

Porém, não se verificou nenhum benefício global no que respeita à redução da incidência de episódios cardiovasculares com o consumo de vitamina E e, como tal, não se recomenda a suplementação com esta vitamina na prevenção de doenças cardiovasculares (Lee *et al.*, 2005).

Um estudo clínico que consistiu na administração simultânea de vários antioxidantes foi o “The Physicians’ Health Study II (PHS II)”, o qual pretendeu observar o efeito das vitaminas E e C em homens. Foram avaliados cerca de 15 000 médicos saudáveis com idades superiores a 50 anos e com um consumo de 267 mg de α -tocoferol sintético, a cada dois dias, e 500 mg/dia de vitamina C, por um período de 8 anos.

Tanto a ingestão de vitamina E como a C não exerceram efeito sobre a incidência de eventos cardiovasculares (AVC, enfarte do miocárdio), nem sobre a mortalidade cardiovascular.

A vitamina E apresentou um RR de 1,01, IC a 95 % de 0,90-1,13 em relação ao desenvolvimento de eventos cardiovasculares, um RR de 0,90, IC a 95 % de 0,75-1,07 em relação à incidência de enfarte do miocárdio e, no que respeita à mortalidade cardiovascular, um RR de 1,07, IC a 95 % de 0,90-1,29. Esta vitamina foi ainda associada a um risco aumentado de AVC hemorrágico (RR de 1,74, IC a 95 % de 1,04-2,91) (Sesso *et al.*, 2009).

Relativamente à vitamina C, obteve-se um RR de 0,99, IC a 95 % de 0,89-1,11 em relação à ocorrência de eventos cardiovasculares, um RR de 1,04, IC a 95 % de 0,87-1,24 relativamente à incidência de enfarte do miocárdio e um RR de morte cardiovascular de 1,02, IC a 95 % de 0,85-1,21 (Sesso *et al.*, 2009).

Em sequência do estudo anterior, outro foi realizado com o intuito de avaliar se a suplementação com multivitamínicos (vitamina C, vitamina E e β -caroteno) em homens médicos diminuía os eventos cardiovasculares a longo prazo (cerca de 10 anos).

Assim, e de acordo com a tabela 2, pode concluir-se que a ingestão deste multivitamínico diariamente, não trouxe benefício relativamente à prevenção de distúrbios cardiovasculares *major*, assim como em todas as situações de enfarte do miocárdio, isquemia, AVC isquémico e hemorrágico e morte.

Tabela 2: Relação entre a ocorrência de eventos cardiovasculares e consequente morte e a ingestão do multivitamínico face ao placebo (Adaptado de: Sesso *et al.*, 2013).

Resultados	Nº casos Ativos	Nº casos Placebo	Risco Relativo (IC a 95 %)
Distúrbios cardiovasculares <i>major</i>	876	856	1,01 (0,91-1,10)
Enfarte do miocárdio	317	335	0,93 (0,80-1,09)
Morte por enfarte do miocárdio	27	43	0,61 (0,38-1,00)
Total de AVC	332	311	1,06 (0,91-1,23)
Morte por AVC	89	76	1,16 (0,85-1,58)
AVC isquémico	277	250	1,10 (0,92-1,30)
AVC hemorrágico	49	45	1,08 (0,72-1,63)
Morte cardiovascular	408	421	0,95 (0,83-1,09)
Mortalidade total	1345	1412	0,94 (0,88-1,02)

Verificou-se uma ausência de benefício dos multivitamínicos face à prevenção dos distúrbios cardiovasculares *major*, na incidência de enfartes do miocárdio, na ocorrência de qualquer tipo de AVC (hemorrágico ou isquémico) e na mortalidade cardiovascular (Sesso *et al.*, 2013).

Estudos epidemiológicos indicam também que o β -caroteno exerce efeitos positivos na proteção de doenças cardiovasculares. No entanto, Vivekananthan e co-autores realizaram uma meta-análise de estudos clínicos com o objetivo de avaliar os efeitos preventivos daquele antioxidante e da vitamina E (Vivekananthan *et al.*, 2003).

Os resultados revelaram que o β -caroteno levou a um ligeiro, mas significativo, aumento da mortalidade (RR de 1,07, IC a 95 % de 1,02-1,11) e a vitamina E não demonstrou ter benefício na prevenção do número de mortes relativamente ao controlo (RR de 1,02, IC a 95 % de 0,98-1,06) ou na diminuição do risco de morte cardiovascular ou AVC (Vivekananthan *et al.*, 2003; Myung *et al.*, 2013).

Uma recente meta-análise agrupou 50 estudos com o objetivo de avaliar a eficácia de antioxidantes e vitaminas na prevenção primária e secundária de doenças

cardiovasculares. Neste estudo foi testada a suplementação das vitaminas A, B₆, B₁₂, C, D, E, β -caroteno, ácido fólico e selénio (Myung *et al.*, 2013).

À semelhança dos resultados dos estudos atrás discutidos, esta meta-análise concluiu que a suplementação, tanto com vitaminas, como com antioxidantes, não foi associada a uma redução do risco de distúrbios cardiovasculares severos (enfarte do miocárdio fatal ou não fatal, AVC isquémico, angina e morte cardiovascular) (Anexo 1) (Myung *et al.*, 2013).

Relativamente aos tipos de eventos cardiovasculares, verificou-se um aumento do risco de ocorrência de angina de peito com esta suplementação (RR de 1,04, IC a 95 % de 1,00-1,08) e com baixas doses de vitamina B₆ ocorreu uma diminuição ligeira, mas não significativa, do risco de episódios cardiovasculares (Myung *et al.*, 2013).

Desta forma, não existe evidências de que os compostos analisados no estudo exerçam proteção contra as doenças cardiovasculares (Myung *et al.*, 2013).

Assim, através dos resultados acima descritos pelos diversos estudos, os resultados apontam que não se deve recomendar a ingestão das vitaminas C e E e β -caroteno como preventivos primários e secundários de doenças cardiovasculares, assim como a administração diária dos mesmos (Asplund, 2002).

3.3. Cancro

A carcinogénese é um processo multifásico complexo, no qual devido a uma grande variedade de mutações e modificações na expressão dos genes, as células normais se transformam em anormais (Willcox *et al.*, 2004).

Existem alguns fatores que contribuem para que tal aconteça, como por exemplo, a exposição a certos agentes ambientais, a características hereditárias, a alimentação, o estilo de vida, o sexo e a idade (Willcox *et al.*, 2004).

O *stress* oxidativo atua induzindo um desequilíbrio redox em todas as fases da carcinogênese (iniciação, promoção e progressão - Figura 23), encontrando-se assim radicais livres em todas as etapas do desenvolvimento de cancro. Os principais indutores do processo de carcinogênese são as lesões no ADN, a mutação e a expressão do gene alterado (Willcox *et al.*, 2004; Pala e Gürkan, 2008).

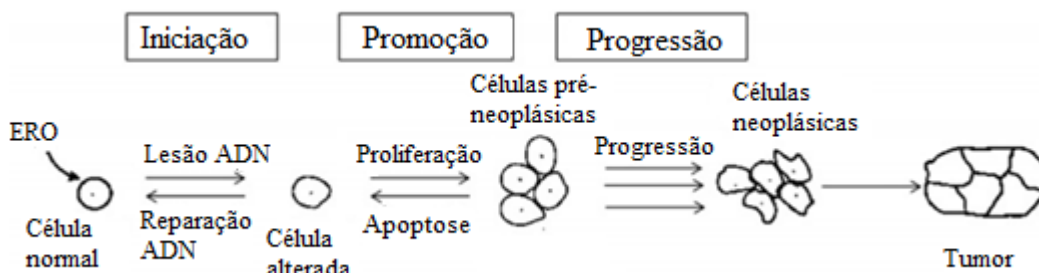


Figura 23: Atuação das ERO nas várias fases do processo de carcinogénico (Retirado de: Fuchs-Tarlovsky, 2013).

O desenvolvimento do cancro caracteriza-se pela ação cumulativa de vários acontecimentos que ocorrem numa única célula, sendo descritos pelas três fases de carcinogênese anteriormente referidas.

Na fase de iniciação, verifica-se a produção de uma célula alterada e a existência de um ciclo de síntese de ADN com o objetivo de reparar o dano produzido durante a iniciação. Na fase seguinte, há a expansão clonal das células alteradas pela indução da proliferação e/ou apoptose das células. A fase de progressão é irreversível e envolve alterações celulares e moleculares que ocorrem devido à passagem das células pré-neoplásicas a neoplásicas. Caracteriza-se pela acumulação de alterações genéticas, instabilidade genética e perturbações da integridade do cromossoma conduzindo à transição da célula benigna para maligna (Fuchs-Tarlovsky, 2013).

Assim, o primeiro passo envolvido na mutagénese e carcinogénese é a modificação irreversível do material genético devido aos danos oxidativos induzidos pelos radicais livres. Estas lesões consistem em quebras na cadeia de ADN (simples/dupla), modificações das bases (purinas/pirimidinas) e do açúcar (desoxirribose) e estabelecimento de ligações cruzadas. Estas alterações na estrutura do

ADN levam assim à indução da transcrição e transdução, a erros de replicação e à instabilidade genómica (Willcox *et al.*, 2004; Valko *et al.*, 2007; Pala e Gürkan, 2008; Pham-Huy *et al.*, 2008).

A associação entre a presença de espécies reativas e o desenvolvimento de tumores e metástases, foi evidenciada por um estudo recente. Este, ao analisar células tumorais em ratos, verificou que a migração das células do tumor, a invasão e a metastização espontânea era induzida pela produção do radical superóxido. Para além disso, constatou que, aquando da eliminação do radical superóxido, a disseminação metástica era impedida (Porporato *et al.*, 2014).

Assim, diversos tipos cancro têm a sua etiologia marcada por elevados níveis de lesões oxidativas justificadas pela presença de espécies reativas, sendo exemplos, os cancros da mama, gástrico, do cólon, do ovário, renal, da pele, da tiroide e do pulmão.

Vários metais redox, por gerarem radicais livres, e metais não-redox, por se ligarem a grupos tióis, estão relacionados com os mecanismos de carcinogénese (Valko *et al.*, 2007).

O crómio hexavalente, por ser altamente oxidante e cancerígeno, está assim associado ao **cancro do pulmão**. Este ião exerce uma ação citotóxica a nível mitocondrial e lisossomal aumentando a formação de radicais livres. A exposição a fibras de amianto, ao ozono, ao fumo do cigarro e a pós metálicos também está relacionada com os mecanismos de *stress* oxidativo e desenvolvimento de cancro pulmonar (Valko *et al.*, 2007; Pala e Gürkan, 2008; Valavanidis *et al.*, 2013).

Destes fatores, o fumo do cigarro é o que está mais intimamente associado a este tipo de cancro, verificando-se um aumento dos produtos da peroxidação lipídica no plasma de fumadores crónicos, assim como uma diminuição dos antioxidantes, como por exemplo dos carotenoides através da depleção pelo benzopireno. Também há evidências de que o fumo do cigarro, ao induzir a síntese de elevadas quantidades de ERO, conduz à inflamação e libertação de proteases, as quais provocam lesão do

parênquima pulmonar e a um possível desenvolvimento de doença pulmonar crónica, caso não haja neutralização destas (Junior *et al.*, 2005).

O cádmio, apesar de ser incapaz de produzir radicais livres diretamente, consegue fazer com que estes induzam danos na expressão dos genes. Pode ainda ativar proteínas quinases, como a proteína C-quinase, levando ao aumento da transcrição da expressão do gene alvo. Desta forma, o cádmio encontra-se relacionado com a patogénese do **cancro do pâncreas** e dos **rins** (Valko *et al.*, 2007; Pala e Gürkan, 2008).

Existem ainda outros fatores que se encontram associados com o desenvolvimento de cancro, sendo um deles, as mutações que ocorrem no gene supressor tumoral p53, o qual é um fator de transcrição que age bloqueando a divisão celular. Estas mutações permitem que o ADN alterado entre no ciclo celular, pela formação de aductos, por os genes p53 estarem inativos, e são encontradas em 50 % das lesões cancerosas e em 75 % dos casos de cancro colorretais (Willcox *et al.*, 2004; Fuchs-Tarlovsky, 2013).

Outro marcador muito comum de *stress* oxidativo induzido por ERO é o 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG). Esta molécula tem propriedades mutagénicas e capacidade de emparelhar com resíduos de adenina, sendo indicadora de lesão oxidativa (Willcox *et al.*, 2004; Rahman, 2007; Teixeira, 2013).

Também as ERN têm a capacidade de induzir a formação de um biomarcador de lesão oxidativa, a 8-nitroguanina, a qual forma-se pela reação da guanina com o peroxinitrito (Valko *et al.*, 2007; Teixeira, 2013).

A ocorrência de peroxidação lipídica encontra-se relacionada com o desenvolvimento de carcinogénese, uma vez que o radical peroxilo, ao sofrer rearranjo através de reações de ciclização, dá origem ao malonildialdeído. Este, apesar de ser um marcador de peroxidação lipídica como já referido, apresenta também características mutagénicas e carcinogénicas, constituindo assim mais um potencial biomarcador de carcinogénese. Outro produto de peroxidação lipídica recorrente é o 4-hidroxi-2-

nonenal, sendo um mediador de *stress* oxidativo bastante tóxico, mas menos mutagénico (Valko *et al.*, 2007; Pala e Gürkan, 2008).

3.3.1. Estudos epidemiológicos e clínicos

À semelhança do que se verifica com as doenças cardiovasculares, os resultados de estudos epidemiológicos revelam que os antioxidantes desempenham um papel preventivo no cancro e que as dietas ricas em frutas e vegetais diminuem o risco de desenvolvimento de vários tipos de cancro (Firuzi *et al.*, 2011).

São vários os antioxidantes testados, sendo os principais as vitaminas C e E, o β -caroteno e o selénio.

Diversos estudos epidemiológicos mostraram uma relação inversa entre a ingestão destes antioxidantes da dieta e o aparecimento de cancro do pulmão, da mama, do cólon, do estômago, da cavidade oral, da laringe e do esófago.

Um dos exemplos destes ensaios é o “Nurses’ Health Study”, o qual estudou a associação entre o consumo de carotenoides, vitaminas C e E, frutas e vegetais e o risco de cancro da mama, em cerca de 80 000 mulheres com idades compreendidas entre 33 e 60 anos, na pré-menopausa e com historial familiar deste tipo de cancro.

A pesquisa revelou que o consumo de β -caroteno a partir de alimentos e suplementos não exerceu uma diminuição significativa no risco de desenvolver cancro da mama. No entanto, uma significativa redução (63 %) do risco de cancro da mama foi evidenciada aquando do consumo de vitamina C, através da alimentação. Também foi demonstrado que mulheres que consumiam cinco ou mais peças de fruta por dia e legumes tiveram um menor risco de desenvolver cancro da mama do que aquelas que apenas consumiam menos de duas peças de fruta por dia (RR de 0,77, IC a 95 % de 0,13-0,62) (Zhang *et al.*, 1999).

No entanto, os resultados obtidos nos ensaios clínicos são bastante diferentes dos ensaios epidemiológicos.

O primeiro grande estudo para avaliar os efeitos dos suplementos antioxidantes na prevenção do cancro ficou denominado por “Linxian study”. Este testou, durante 5 anos, o risco de homens e mulheres saudáveis com uma suplementação de β -caroteno, α -tocoferol e selénio desenvolverem cancro gástrico e do esófago, comparativamente ao placebo (Blot *et al.*, 1993; Firuzi *et al.*, 2011).

Os primeiros resultados evidenciaram que as pessoas que tomavam suplementos antioxidantes tiveram um menor risco de mortalidade por cancro gástrico, mas relativamente ao cancro do esófago tal conclusão não foi constatada (Blot *et al.*, 1993; Firuzi *et al.*, 2011).

Após o seguimento do estudo por mais 10 anos, verificou-se uma pequena, mas significativa redução da mortalidade total (RR de 0,95, IC a 95 % de 0,91-0,99) e menor mortalidade por cancro gástrico (RR de 0,89, IC a 95% de 0,79-1,00). As reduções no risco de cancro foram mais evidentes em indivíduos com menos de 55 anos. Não se averiguou distinção entre o grupo que recebeu os antioxidantes e os que não receberam, em relação à diminuição das mortes por cancro do esófago. Porém, houve uma diminuição de 17 % na mortalidade por cancro esofágico nos intervenientes com menos de 55 anos e um aumento de 14 % nos participantes com mais de 55 anos (Qiao *et al.*, 2009; Firuzi *et al.*, 2011).

Desta forma, o estudo demonstrou benefício, por um período de 10 anos, na ingestão de β -caroteno, α -tocoferol e selénio na redução da mortalidade do cancro gástrico e do esófago em indivíduos mais jovens (Qiao *et al.*, 2009; Firuzi *et al.*, 2011).

Uma revisão sobre a ação dos suplementos antioxidantes (vitaminas C, E, A e β -caroteno) na prevenção de cancros gastrointestinais não obteve efeitos significativos. Adicionalmente a combinação de β -caroteno com a vitamina A (RR de 1,16, IC a 95 % de 1,09-1,23) e a vitamina E (RR de 1,06, IC a 95 % de 1,02-1,11) originou um aumento significativo na mortalidade (Bjelakovic *et al.*, 2008).

Recentemente, um estudo intitulado “Supplémentation en Vitamines et Minéraux Antioxydants (SU.VI.MAX)” avaliou os efeitos da suplementação diária de vitaminas e minerais antioxidantes na prevenção da incidência de cancro e doenças cardiovasculares em homens e mulheres (Hercberg *et al.*, 2004).

A suplementação diária testada incluía a ingestão de vitamina C (120 mg), vitamina E (30 mg), β -caroteno (6 mg), selénio (100 μ g) e zinco (20 mg) durante 7,5 anos. Os resultados permitiram concluir que a suplementação não surtiu efeito significativo preventivo sobre a incidência, tanto de cancro, nomeadamente o da pele, como das doenças cardiovasculares, como da mortalidade.

Posteriormente, ao ser feita uma avaliação distinta entre sexos, os resultados evidenciaram um efeito antioxidante protetor em homens, mas não em mulheres. Constatou-se igualmente que a mortalidade foi inferior nos homens (RR de 0,63, IC a 95 % de 0,42-0,93) em relação às mulheres (RR de 1,03, IC a 95 % de 0,64-1,63). Por esta razão, a suplementação em baixas doses de antioxidantes apenas se verificou eficaz na redução da incidência de cancro e da mortalidade no sexo masculino (Hercberg *et al.*, 2004; Hercberg *et al.*, 2007).

No entanto, os resultados positivos verificados nos homens desaparecem 5 anos após terminar a suplementação, assim como os efeitos negativos nas mulheres (Hercberg *et al.*, 2010).

O estudo “HOPE-TOO”, o qual já foi referenciado nas doenças cardiovasculares, também analisou os efeitos da ingestão diária de 266,67 mg de α -tocoferol sobre a incidência de cancro e da respetiva mortalidade durante 7 anos. Os participantes em estudo incluíam homens e mulheres com idades superiores a 55 anos, aos quais foi diagnosticado doença cardíaca ou diabetes. Os resultados não mostraram diferenças significativas, tanto no desenvolvimento de cancro, como no número de mortes com a suplementação do antioxidante α -tocoferol (Lonn *et al.*, 2005).

Recentemente, o ensaio “Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT)” teve como finalidade avaliar se a suplementação diária com selénio (200

mg) e/ou vitamina E (400 UI - 266,67 mg) reduzia, em comparação com o placebo, a incidência de cancro da próstata em homens com idade igual ou superior a 50 anos (Lippman *et al.*, 2009; Firuzi *et al.*, 2011).

Numa primeira fase, com uma duração de ensaio de 5,5 anos, não se averiguou redução do número de casos de cancro da próstata, nem de outros tipos de cancro. Numa etapa seguinte, com uma duração de cerca de 7 anos, verificou-se a existência de um número superior de casos de cancro da próstata em homens que tomaram a vitamina E isolada (RR de 1,13, IC a 99 % de 0,91-1,41) em relação ao placebo, não havendo um risco aumentado de cancro da próstata nos homens que tomaram o selénio e a vitamina E conjuntamente (Lippman *et al.*, 2009; Firuzi *et al.*, 2011; Klein *et al.*, 2011).

Uma meta-análise realizada recentemente reuniu vários ensaios com o objetivo de avaliar o efeito dos suplementos antioxidantes na prevenção primária e secundária de vários tipos de cancro (Myung *et al.*, 2010).

Os resultados revelaram que a administração de suplementos antioxidantes (vitaminas A e E e β -caroteno) não tiveram uma influência significativa na prevenção de neoplasias relativamente à ingestão de placebo (RR de 0,99, IC a 95 % de 0,96-1,03). Além deste facto, nenhum antioxidante individualmente atuou significativamente na prevenção do desenvolvimento de cancro (tabela 3). Adicionalmente, foi descrito que elevadas doses de β -caroteno em fumadores pode provocar cancro do pulmão (Myung *et al.*, 2010).

Tabela 3: Resultados gerais obtidos relativos aos efeitos dos suplementos antioxidantes na prevenção do cancro (Adaptado de: Myung *et al.*, 2010).

Antioxidante	Risco Relativo	Intervalo de Confiança a 95%
Vitamina A	0,98	0,90-1,08
Vitamina E	1,02	0,90-1,16
β - Caroteno	1,01	0,96-1,07

Assim, os suplementos antioxidantes não exerceram um efeito significativo na prevenção primária (RR de 1,00, IC a 95 % de 0,97-1,04) e secundária (RR de 0,97, IC a 95 % de 0,83-1,13) do cancro.

Através da tabela 4 pode ser observado os tipos de cancro nos quais os suplementos antioxidantes não exerceram uma ação preventiva, nomeadamente os cancros da pele, do cólon, da cabeça e pescoço, do pulmão, da próstata, do esófago, da bexiga (apresentando um aumento significativo do risco), da mama, do estômago e dos rins (Myung *et al.*, 2010).

Tabela 4: Efeitos dos suplementos antioxidantes na incidência de diversos tipos de cancro (Adptado de: Myung *et al.*, 2010).

Tipos de Cancro	Risco Relativo	IC a 95 %
Cancro da pele	0,98	0,91-1,05
Cancro colorretal	0,97	0,84-1,12
Cancro da cabeça e pescoço	0,87	0,68-1,13
Cancro do pulmão	1,00	0,83-1,20
Cancro da próstata	0,84	0,69-1,02
Cancro do esófago	1,01	0,81-1,26
Cancro da bexiga	1,52	1,06-2,17
Cancro da mama	1,00	0,90-1,11
Cancro do estômago	0,99	0,79-1,24
Cancro do rim	0,95	0,62-1,46

Desta forma, com os estudos acima analisados pode concluir-se que não há evidência de que certos suplementos antioxidantes, designadamente, as vitaminas C, E e A, o β -caroteno, o selénio e o zinco, exerçam um efeito preventivo primário, ou secundário, no desenvolvimento de cancro, podendo mesmo a ingestão destes despoletar algum tipo de cancro (Myung *et al.*, 2010).

3.4. Doença ocular

O olho é um órgão complexo, sensível e muito suscetível a lesões oxidativas causadas pela luz e toxinas. É constituído por três camadas distintas, a camada externa, composta pela esclerótica e córnea, a camada média formada pelo corpo ciliar e íris e a camada interna composta pela retina (Seeley *et al.*, 2005; Sen e Chakraborty, 2011).

O *stress* oxidativo está relacionado com o desenvolvimento de várias doenças oculares, entre elas, cataratas, glaucoma e degeneração macular (Sen e Chakraborty, 2011).

A etiologia destas enfermidades pode ser explicada pelo facto de serem doenças relacionadas com o envelhecimento, altura da vida em se verifica um maior número de lesões provenientes da ação das ERO.

Por **cataratas** entende-se a turvação ou opacidade do cristalino, devido a uma acumulação de proteínas. Esta anomalia é muito comum em pessoas mais idosas, mas também pode dever-se a uma situação de traumatismo ou infeção (Seeley *et al.*, 2005).

Podem, ou não, levar à cegueira dependendo da dimensão da opacidade, do seu tamanho e localização. No entanto, mesmo situações graves de cataratas que causem cegueira, podem ser tratadas (Gene, 2009).

A produção de ERO e a redução de antioxidantes endógenos encontram-se na base da formação de cataratas e dos danos oxidativos induzidos pela radicação UV (Oduntan e Mashige, 2011).

Este tipo de radiação pode ser responsável pelo desenvolvimento de cataratas, por ter a capacidade de danificar as proteínas cristalinas, os lípidos, os polissacarídeos e os ácidos nucleicos. A conversão desta energia luminosa num impulso nervoso também forma espécies reativas, como os radicais superóxido e hidroxilo e o peróxido de hidrogénio (Oduntan e Mashige, 2011; Sen e Chakraborty, 2011).

O envelhecimento, como referido, é outro fator que está relacionado com esta doença, por diminuir a eficácia dos mecanismos de reparação e por haver uma acumulação de componentes oxidados na lente.

Também a peroxidação lipídica pode originar cataratas, uma vez que se verifica um aumento da quantidade de produtos de peroxidação, como peróxidos lipídicos, nas porções lipídicas do humor aquoso em pessoas com catarata (Oduntan e Mashige, 2011).

Outro aspeto que comprova a existência de *stress* oxidativo aliado à formação de cataratas é o aumento significativo da atividade da enzima superóxido dismutase (Oduntan e Mashige, 2011).

O **glaucoma** caracteriza-se por um aumento da pressão intraocular causado pela acumulação de humor aquoso, como consequência do bloqueio das veias do humor aquoso ou do canal de Schlemm (Seeley *et al.*, 2005).

Se o glaucoma não for tratado pode mesmo causar cegueira, por lesar a retina, a papila ótica e o nervo ótico, uma vez que deixa de haver aporte de sangue necessário à viabilidade das células da retina, ocorrendo, conseqüentemente, a morte das mesmas (Seeley *et al.*, 2005).

A patogénese do glaucoma encontra-se relacionada com a presença de espécies reativas, verificando-se o aumento das lesões do ADN nestes pacientes.

O *stress* oxidativo tem a capacidade de provocar modificações no humor aquoso e vítreo, podendo induzir alterações no nervo ótico, as quais estão presentes no glaucoma. Os danos oxidativos também podem ocorrer nas células da retina e provocar a morte neuronal do nervo ótico, conduzindo ao glaucoma (Oduntan e Mashige, 2011).

Foi ainda constatado um aumento da atividade da enzima monóxido de azoto sintetase, das suas isoenzimas e da nitrotirosina, sendo que esta última funciona como

um marcador de *stress* oxidativo na progressão da morte celular na rede ótica em pessoas com glaucoma (Oduntan e Mashige, 2011).

Comparativamente com um indivíduo que possua catarata, o que tem glaucoma apresenta um aumento significativo de *stress* oxidativo e uma diminuição da atividade antioxidante no humor aquoso (Oduntan e Mashige, 2011).

A **degeneração macular** ou **degeneração macular relacionada com a idade** (DMRI) está associada a uma perda da visão de precisão, pelo facto de haver lesão da mácula, a qual é responsável por a pessoa ver com nitidez os detalhes do campo de visão (Seeley *et al.*, 2005; Gene, 2009).

Também pode causar cegueira e a sua origem pode ter diversas causas, como por exemplo, devido a doenças hereditárias, traumatismo, tumor, idade, tabagismo e/ou exposição solar (Seeley *et al.*, 2005; Oduntan e Mashige, 2011).

O *stress* oxidativo também está relacionado com o desenvolvimento de DMRI, pois a retina é muito vulnerável a este devido ao seu elevado consumo de oxigénio, ao alto teor de ácidos gordos polinsaturados, à exposição à luz visível e UV e à presença de fotossensibilizadores que aumentam a produção de ERO (Oduntan e Mashige, 2011).

Pelas razões acima descritas, as células do epitélio pigmentar da retina são muito propensas aos efeitos das ERO, sendo que estas aumentam pela acumulação de iões ferro e/ou devido ao fumo do cigarro.

As ERO e outros radicais livres têm sido implicados na morte celular por apoptose e conseqüentemente no desenvolvimento de alterações patológicas na degeneração macular.

Outro fator que comprova a existência de espécies reativas associadas à DMRI é a diminuição do conteúdo de luteína e de zeaxantina, as quais têm a função de formarem uma barreira natural que protege a mácula dos danos oxidativos (Willcox *et al.*, 2004; Oduntan e Mashige, 2011).

Como forma de contrariar estes danos, o uso de antioxidantes pode prevenir ou retardar a progressão de DMRI.

3.4.1. Estudos epidemiológicos e clínicos

Relativamente às doenças oculares, estudos epidemiológicos revelaram uma relação inversa entre o consumo de frutas e legumes ricos em vitaminas C e E e carotenoides e a presença de cataratas e doença macular relacionada com a idade. Segundo estes estudos, a última doença encontra-se inversamente relacionada com a ingestão dos carotenoides, luteína e zeaxantina (Willcox *et al.*, 2004).

Um estudo que avaliou a ingestão dietética de vitaminas C e E, de β -caroteno e de zinco, em pessoas com idade igual ou superior a 55 anos, revelou que estas tinham um risco diminuído de sofrer de degeneração macular. No entanto, grande parte dos estudos clínicos prospetivos não obteve o mesmo resultado, como a meta-análise realizada por Chong e colaboradores, os quais avaliaram se os antioxidantes da dieta (vitamina A, C, E, β -caroteno, luteína, zeaxantina, licopeno e zinco) tinham ação na prevenção primária da DMRI. A pesquisa revelou que estes antioxidantes têm pouco, ou nenhum efeito, sobre a prevenção primária da DMRI precoce (Chong *et al.*, 2007).

Um grande ensaio clínico intitulado “Age-Related Eye Disease Study (AREDS)” estudou o resultado da ingestão de altas doses de antioxidantes, como a vitamina C (500 mg), a vitamina E (266,67 mg), o β -caroteno (15 mg), o zinco (80 mg) e o cobre (2 mg) no desenvolvimento de DMRI avançada, em indivíduos com idades compreendidas entre os 55 e os 80 anos e que padeciam de degeneração macular. O estudo realizou-se durante 6,3 anos e revelou que os indivíduos com degeneração macular intermédia apresentaram um risco 25 % menor de progressão para DMRI avançada, em relação aos que ingeriram placebo (Chew, 2013).

Este estudo também avaliou a progressão para catarata. No entanto, ao contrário do resultado obtido para a DMRI, não houve efeito significativo na prevenção do desenvolvimento da catarata e na sua progressão (RR de 0,97, IC a 99 % de 0,84-1,11).

No seguimento deste último estudo, o “AREDS 2” testou, durante 5 anos, participantes com as mesmas características do estudo anterior e que ingeriram, além dos antioxidantes atrás referidos, ácidos gordos ómega-3 e luteína (10 mg) ou zeaxantina (2 mg). Compostos que, à partida, proporcionariam resultados mais significativos na prevenção da progressão para DMRI avançada, comparativamente com o AREDS. Os resultados foram favoráveis para os indivíduos que ingeriram luteína ou zeaxantina, verificando-se uma redução de 10 % no risco de progressão para DMRI avançada (RR de 0,99, IC a 95% de 0,82-0,99) (Chew, 2013).

Quando as análises se restringiram unicamente aos indivíduos que fizeram uma menor ingestão de luteína ou zeaxantina dietético, a redução no risco de progressão para DMRI avançada melhorou em relação aos resultados obtidos no estudo anterior (RR de 0,75, IC a 95 % de 0,59-0,94) (Chew, 2013).

Neste estudo também se avaliou a prevenção da progressão da catarata, com a adição da luteína ou zeaxantina, sendo que os resultados obtidos não foram significativos (RR de 0,95, IC a 95 % de 0,83-1,09) relativamente à ação preventiva daquela. No entanto, quando administrada em baixas doses, apresentou um resultado benéfico (Chew, 2013; Emily *et al.*, 2013).

Outros estudos clínicos também foram realizados podendo ser analisados no Anexo 2.

Em suma, os resultados obtidos relativos à prevenção das cataratas não foram significativos em nenhum dos estudos apresentados. Relativamente aos resultados dos ensaios da DMRI, verificou-se que a suplementação com ácido fólico e vitaminas do complexo B tem a capacidade de reduzir o risco de degeneração macular (Anexo 2) (Chew, 2013).

Com base nos resultados acima referidos, pode concluir-se que na prevenção da catarata os suplementos antioxidantes não têm um papel significativo. Relativamente à progressão da DMRI, a administração de luteína ou zeaxantina parecem ser benéficos,

assim como o ácido fólico e ainda o zinco, por ter demonstrado ligeiro benefício na prevenção da perda de visão e na progressão da DMRI.

3.5. Doença neurodegenerativa - Doença de Alzheimer

O cérebro é muito suscetível a sofrer danos oxidativos, uma vez que possui elevado teor de ácidos gordos polinsaturados oxidáveis, elevado consumo de oxigénio, presença de iões metálicos, um pobre sistema de defesa antioxidante e abundantes moléculas pró-oxidantes (Rahman, 2007; Pala e Gürkan, 2008; Sen e Chakraborty, 2011).

Várias doenças neurológicas têm a sua etiologia associada ao *stress* oxidativo, como são exemplos, a doença de Alzheimer, de Parkinson, esclerose múltipla e esclerose lateral amiotrófica (Pham-Huy *et al.*, 2008).

As doenças neurodegenerativas afetam o sistema nervoso central e verifica-se a perda de “populações” neuronais e acumulação extracelular de materiais fibrilares (Rahman, 2007).

A **doença de Alzheimer** é a doença neurodegenerativa mais comum e caracteriza-se pela perda de neurónios e sinapses, levando à privação progressiva de memória, ao défice cognitivo, declínio da habilidade de linguagem e raciocínio que leva a demência e morte (Willcox *et al.*, 2004; Rahman, 2007).

É uma doença que se desenvolve gradualmente, com predomínio dos sintomas iniciais entre os 60-70 anos, verificando-se a presença de placas senis (locais de degeneração) e emaranhados neurofibrilares (Willcox *et al.*, 2004; Rahman, 2007).

O *stress* oxidativo está fortemente implicado no desenvolvimento da doença de Alzheimer por várias razões (Willcox *et al.*, 2004; Valko *et al.*, 2007; Pala e Gürkan, 2008):

- Os neurónios são muito sensíveis ao ataque das espécies reativas - têm membranas ricas em ácidos gordos polinsaturados; o metabolismo cerebral exige muito oxigénio e o teor de glutatona é muito baixo;
- As lesões cerebrais existentes são devidas ao dano oxidativo, provocado pela acentuada oxidação do ADN, das proteínas e dos lípidos (elevado teor de 4-hidroxi-2-nonenal);
- Presença de iões metálicos que catalisam a produção de radicais livres: elevada quantidade de ferro, baixo teor de cobre (por atuar juntamente com as enzimas antioxidantes), elevadas concentrações de zinco (induz a morte neuronal) e elevado teor de alumínio (leva à peroxidação lipídica por causar rearranjo dos lípidos).

Verifica-se ainda a produção do β -amiloide, um péptido tóxico, que é sintetizado a partir da proteína precursora amiloide. O dano oxidativo encontra-se associado a este biomarcador, em pacientes com doença de Alzheimer, pois este é o principal constituinte das placas senis no cérebro, encontrando-se ainda depositado nos emaranhados neurofibrilares (Valko *et al.*, 2007; Pham-Huy *et al.*, 2008).

Recentemente, a apolipoproteína, por ser um transportador de lípidos e sofrer muitos ataques por parte dos radicais livres, tem sido associada com a patogénese da doença de Alzheimer. Propôs-se assim uma correlação direta entre a sua peroxidação e a doença de Alzheimer.

A razão que leva à agregação, deposição e toxicidade do β -amiloide é a perda da homeostasia metálica, uma vez que se os níveis de zinco estiverem, por exemplo, baixos protegem contra a toxicidade deste péptido. Contrariamente, se os níveis forem elevados, desencadeiam morte neuronal, a qual é independente, ou sinérgica, dos efeitos tóxicos do β -amiloide (Valko *et al.*, 2007).

3.5.1. Estudos epidemiológicos e clínicos

Vários antioxidantes têm sido associados na prevenção da doença de Alzheimer ou no declínio das capacidades cognitivas, sendo os principais as vitaminas C e E e o β -caroteno.

Uma meta-análise avaliou o efeito da ingestão dos antioxidantes mais comuns (vitaminas C e E e β -caroteno) a partir da dieta na prevenção do risco de doença de Alzheimer. O estudo indicou que os três antioxidantes apresentavam efeitos benéficos na prevenção da doença de Alzheimer, facto que pode ser comprovado pelos resultados obtidos no risco relativo de cada antioxidante (tabela 5) (Li *et al.*, 2012).

Tabela 5: Resultados obtidos sobre o efeito preventivo da ingestão de antioxidantes dietéticos na prevenção da doença de Alzheimer (Adaptado de: Li *et al.*, 2012).

Antioxidante	Risco Relativo	Intervalo de Confiança a 95%
Vitamina C	0,83	0,72-0,94
Vitamina E	0,76	0,67-0,84
β-Caroteno	0,88	0,73-1,03

Assim, pelos resultados acima apresentados pode concluir-se que estes antioxidantes exercem um efeito protetor na doença de Alzheimer, sendo que a vitamina E é a que mais se destaca, com um efeito mais significativo (Li *et al.*, 2012).

Um estudo clínico envolvendo pacientes com doença de Alzheimer, moderada a severa, com uma ingestão de vitamina E ou placebo durante cerca de 2 anos, revelou um atraso na deterioração funcional dos neurónios, quando comparado com o placebo. Porém, os indivíduos que ingeriram vitamina E apresentaram maior número de quedas (Sano *et al.*, 1997).

Mais tarde, outro ensaio clínico avaliou mulheres com idade igual ou superior a 65 anos, na sua maioria saudáveis e com uma ingestão de vitamina E a cada 2 dias, durante um período inferior a 4 anos. Os resultados concluíram, no entanto, que os suplementos não exerceram efeitos benéficos na doença de Alzheimer ou a nível cognitivo (Kang *et al.*, 2006).

Recentemente, um grande estudo, envolvendo a administração de vitaminas C e/ou E, testou em indivíduos com mais de 65 anos e sem défice nas suas funções cognitivas, a capacidade destes antioxidantes diminuírem o risco de desenvolvimento de doença de Alzheimer. Os resultados indicaram que tanto a ingestão da combinação das duas vitaminas, como as administradas isoladamente, não alteraram significativamente o risco destes pacientes desenvolverem demência ou doença de Alzheimer (Firuzi *et al.*, 2011).

Desta forma, pode constatar-se que os suplementos mais tipicamente usados como preventivos da doença de Alzheimer (vitaminas E e C) não exercem uma ação benéfica, quer na prevenção, quer no desenvolvimento desta doença.

V. **Capítulo 4: Efeitos controversos do uso dos antioxidantes e possíveis razões para a sua ineficácia**

4.1. Efeitos provocados no indivíduo

A assimilação de antioxidantes no organismo a partir de fontes alimentares ou de suplementos, não traz apenas benefícios para a saúde humana. Atualmente, vários estudos têm tido, tal como apresentado anteriormente, resultados inconclusivos ou dados que demonstram falta de eficácia, no que diz respeito ao tratamento ou prevenção de várias doenças, criando alguma incerteza sobre o efeito dos antioxidantes no organismo.

Por norma, antioxidantes administrados em quantidades inferiores às doses máximas recomendadas, não exercem efeitos prejudiciais. No entanto, em doses elevadas são descritos vários efeitos secundários. Associado ao uso de antioxidantes, são ainda verificadas várias interações, o que pode comprometer ou agravar o estado de saúde da pessoa (HPRC, 2011).

Desta forma, os principais efeitos adversos e interações do consumo de alguns antioxidantes serão retratados a seguir.

A administração de **vitamina C** em excesso, não provoca graves efeitos adversos, uma vez que apresenta baixa toxicidade. No entanto, encontram-se descritas situações relacionadas com distúrbios gastrointestinais, como cólicas abdominais, diarreia e náuseas, pelo facto desta vitamina não ser absorvida no trato gastrointestinal e exercer um efeito osmótico local (Jacob e Sotoudeh, 2002; HPRC, 2011).

Tem também a capacidade de aumentar a produção de oxalato e diminuir a sua excreção renal, ao diminuir a sua solubilidade, potenciando a formação de cálculos renais, principalmente em indivíduos com transtornos renais e em situações de hiperoxalúria (Zadák *et al.*, 2009).

A alta ingestão de ácido ascórbico pode ainda causar a absorção de um excesso de ferro, devido a uma maior absorção intestinal de ferro não-heme. Esta situação é crítica em indivíduos com hemocromatose hereditária, uma vez que pode originar uma sobrecarga de ferro levando a danos teciduais. Também atua na destruição da vitamina B₁₂ levando à diminuição dos seus níveis séricos (Jacob e Sotoudeh, 2002; Zadák *et al.*, 2009).

Relativamente às interações farmacológicas, a vitamina C pode interferir menos regularmente com o paracetamol e com os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) e mais frequentemente com os agentes quimioterápicos, como a ciclofosfamida, com os estrogénios, nomeadamente anticoncepcionais orais, com as estatinas e com a varfarina. Alguns suplementos também podem interagir com a vitamina C, sendo exemplos o cromo, o cobre, o ferro e a vitamina B₁₂ (HPRC, 2011).

A **vitamina E**, à semelhança do antioxidante anterior exhibe pouca toxicidade. Porém, a ingestão de suplementos de vitamina E em excesso pode causar hemorragia, por inibir a agregação das plaquetas e antagonizar os fatores de coagulação dependentes da vitamina K, e aumentar o risco de ocorrer acidente vascular cerebral hemorrágico. São ainda relatadas náuseas, dor de cabeça, fadiga, fraqueza muscular, ligeira creatinúria e uma diminuição da mineralização óssea (Zadák *et al.*, 2009).

Devido aos efeitos adversos causados pela vitamina E, verificam-se certas interações farmacológicas, nomeadamente com a ingestão de anticoagulantes e antiagregantes plaquetares. O consumo simultâneo deste antioxidante com outros compostos antioxidantes, como a vitamina C, o selénio e o β -caroteno podem originar interações frequentes. As estatinas, as ciclosporinas e os agentes quimioterápicos conduzem a interações menos habituais (Brown *et al.*, 2001).

A ingestão de **carotenoides** em excesso também apresenta efeitos secundários, principalmente devido ao facto destes serem solúveis nas gorduras, dando-se assim a acumulação destes antioxidantes nas reservas lipídicas e no fígado.

A ingestão de vitamina A apresenta mais efeitos tóxicos que a ingestão da pró-vitamina A, através do β -caroteno. Assim, do excesso de ingestão de vitamina A é relatada a ocorrência de náuseas, dores de cabeça, dor nas articulações e nos ossos, aumento da pressão intracraniana, teratogenicidade e hipervitaminose A (Ross, 2010).

Por outro lado, a ingestão de β -caroteno não é conhecida por causar teratogenicidade. No entanto, em grandes quantidades causa carotenodermia, sendo reversível após o cessamento da ingestão deste antioxidante (Johnson e Russell, 2010).

Relativamente às interações ocorridas com administração de carotenoides, verifica-se uma diminuição da absorção de vitamina A e do β -caroteno, e a consequente diminuição dos níveis plasmáticos destes antioxidantes, com a administração conjunta de orlistato. Outra interação é constatada com a administração simultânea de outros retinoides, podendo verificar-se um aumento do risco de hipervitaminose A (Johnson e Russell, 2010).

A quercetina é um exemplo de **flavonoides** apresentando como efeitos adversos, dor de cabeça, de estômago e lesões nos rins.

A quercetina pode interagir com certos fármacos, podendo alterar o metabolismo de certas substâncias ativas e a atividade de algumas enzimas principais nos processos de metabolização. Assim, se administrada com agentes anticoagulantes, como por exemplo com o clopidogrel ou a aspirina, potencia os seus efeitos, aumentando o risco de hemorragia. Com agentes quimioterápicos, aumenta os efeitos da cisplatina, aumenta o tempo de permanência dos corticosteroides no organismo e interfere com a absorção da ciclosporina (Skibola e Smith, 2000; University of Maryland Medical Center, 2011).

A administração em excesso de **selênio** traduz-se em perda de cabelo, em deformação e fragilidade das unhas, hálito com odor a alho e gosto metálico, lesões na pele, náuseas, diarreia, fadiga, erupções cutâneas, irritabilidade e alterações do sistema nervoso, como neuropatia periférica. Pode também induzir enfarte do miocárdio, tremores, insuficiência renal e cardíaca e mesmo provocar a morte em casos raros (Zadák *et al.*, 2009).

A cisplatina pode interagir com o selênio e diminuir os níveis deste no cabelo e no soro, levando ao desenvolvimento dos efeitos secundários acima relatados. No entanto, estudos que envolvem a suplementação com selênio têm demonstrado diminuir a toxicidade da cisplatina e conseqüentemente da quimioterapia (Hu *et al.*, 1997).

4.2. Dosimetria estabelecida para administração de antioxidantes

Pelo facto dos antioxidantes não apresentarem apenas efeitos benéficos para a saúde humana, foram desenvolvidos valores limites de ingestão destas substâncias.

Assim, a Food and Nutrition Board (FNB) desenvolveu recomendações para a ingestão de vários antioxidantes. Desta forma, foram criadas designações para serem usadas como referência no consumo de antioxidantes, sendo elas (The National Academies, 2000; The National Academies, 2001a):

- RDA (Recommended Dietary Allowance), que compreende o nível médio de ingestão diária suficiente para satisfazer as necessidades nutricionais da maioria dos indivíduos saudáveis;
- UL (Tolerable Upper Intake Level), diz respeito à ingestão diária máxima que não deve causar efeitos prejudiciais à saúde.

Para cada tipo de antioxidante existem, portanto, valores tabelados para uma ingestão diária recomendada (RDI) e um limite máximo de ingestão tolerável, em função do sexo e da idade (Anexo 3). No entanto, alguns antioxidantes, como por exemplo os carotenoides ainda não têm os seus valores limites estabelecidos, tanto o UL como o RDA, e como tal não se encontram nas tabelas em anexo (The National Academies, 2001a).

Mediante cada antioxidante, estes valores permitem que haja uma maior gestão nas suas administrações, de forma a minimizar os efeitos secundários mais comuns e referidos anteriormente.

No entanto, apesar de existirem valores de UL de referência para cada antioxidante, existem estudos que demonstram a ocorrência de mortalidade com doses inferiores aos valores de UL estabelecidos.

Um destes casos verifica-se com a vitamina E que, quando administrada numa dosagem de cerca de 100,5 mg, ou superior, demonstra um aumento progressivo da mortalidade. Porém, esta dosagem encontra-se muito abaixo do valor de UL estabelecido (1 000 mg) e como tal não deveria de causar efeitos letais no organismo (Miller *et al.*, 2005).

Desta forma, é fundamental que os valores de UL sejam reajustados a fim de se evitar efeitos tóxicos para o organismo.

4.3. Possíveis razões para a ineficácia dos antioxidantes

Apesar dos antioxidantes exercerem uma ação de neutralização perante espécies reativas, nem todos os estudos clínicos analisados concluíram um efeito benéfico dos antioxidantes na diminuição do risco de várias doenças.

Nos ensaios analisados verificou-se resultados negativos ou inconclusivos. Porém, a evidência de que o *stress* oxidativo está associado à patogénia de diversas doenças é cada vez menos incontestável.

A incapacidade dos ensaios clínicos em comprovar que as terapias antioxidantes são eficazes, torna-se numa razão para a sua ineficácia.

De uma forma geral são várias as razões envolvidas para a falta de eficácia dos antioxidantes, nomeadamente: i) o *stress* oxidativo não ser a principal e/ou única causa da doença; ii) os pacientes não beneficiarem igualmente da terapia antioxidante; iii) a molécula antioxidante ter baixa biodisponibilidade e/ou ser utilizada na dosagem errada; iv) o tempo e a duração da terapia não ser o ideal; v) o *stress* oxidativo ser difícil de ultrapassar em certas doenças; vi) o antioxidante ter pouca especificidade para as células alvo; vii) os produtos da reação do antioxidante serem tóxicos; viii) um único

antioxidante não ser suficiente para superar o *stress* oxidativo; ix) os mecanismos fisiológicos impedirem a presença de altos níveis de antioxidantes nos tecidos; x) a molécula antioxidante despoletar efeitos nocivos que mascaram a ação antioxidante benéfica; xi) certos antioxidantes não serem efetivos em populações bem nutridas e xii) o alvo não ser bem selecionado (Brewer, 2010; Firuzi *et al.*, 2011).

Assim, torna-se fundamental ter em conta todas estas razões para não se obter resultados erróneos ou inconclusivos.

Para contrariar estas causas convém que haja (Firuzi *et al.*, 2011):

- Seleção de doenças, nas quais o *stress* oxidativo esteja provado como desencadeador da patologia;
- Utilização de agentes antioxidantes multifuncionais, os quais atuam por diversas vias, aumentando as hipóteses de sucesso. Alternativamente, pode proceder-se à combinação de vários antioxidantes entre si ou à associação de antioxidantes com fármacos;
- Distinção dos pacientes em estudo, mediante o uso de biomarcadores de *stress* oxidativo, para identificar os que possuem maior nível de *stress* oxidativo;
- Otimização da molécula antioxidante e do tempo e duração da terapia;
- Biomarcadores para monitorizar a resposta à terapia antioxidante;
- Utilização de antioxidantes específicos;
- Escolha do alvo apropriado.

A combinação destes fatores conduz a resultados mais direcionados para a doença em questão e consequentemente mais precisos e credíveis.

VI. Conclusão geral

O *stress* oxidativo induzido pelos diversos radicais livres é o desencadeador de inúmeras doenças, sendo as doenças cardiovasculares, o cancro, as doenças oculares e a doença de Alzheimer, as que têm maior incidência e, em parte, as causadoras de maior número de mortes.

O próprio organismo possui defesas antioxidantes que ao neutralizarem a ação dos radicais livres, impedem que haja dano celular. No entanto, devido ao facto dos antioxidantes se encontrarem em baixas quantidades no organismo, a sua eficácia não é na totalidade, permanecendo radicais livres no organismo.

Assim, torna-se fundamental complementar as defesas endógenas com substâncias antioxidantes exógenas. Estas podem ser assimiladas através da ingestão de vários alimentos, como fonte da dieta, ou através de suplementos.

Devido às suas propriedades estruturais, modo de ação, solubilidade, tempo de permanência no organismo e toxicidade, cada vez mais são realizados estudos no sentido de avaliar a ação destes agentes exógenos e, assim, permitir correlacioná-los com a uma ação preventiva de uma dada doença.

A grande maioria dos estudos epidemiológicos revela que estas substâncias exercem uma ação benéfica em todas as doenças analisadas neste trabalho (doenças cardiovasculares, cancro, doenças oculares e doença de Alzheimer). No entanto, grande parte dos estudos clínicos realizados recentemente não corrobora esta informação.

Assim, relativamente aos estudos analisados é possível concluir que, de uma forma geral, os antioxidantes mais regularmente associados à prevenção das doenças acima mencionadas, nomeadamente, a vitaminas C e E, β -caroteno, selénio e zinco não exercem um efeito preventivo significativo na iniciação ou progressão destas patologias. Constatou-se, inclusive, que certos antioxidantes, como a vitamina E e o β -caroteno chegam mesmo a aumentar a mortalidade cardiovascular.

Desta forma, o consumo destes suplementos antioxidantes para a prevenção destas doenças deixa de ser aconselhado. No entanto, uma forma de atuar preventivamente nas doenças relacionadas com as lesões oxidativas passa pela ingestão de uma dieta equilibrada e variada e na ausência da exposição a fatores oxidantes, indutores da formação de espécies reativas.

Considera-se essencial que futuramente existam mais pesquisas sobre a ação e o efeito dos antioxidantes nas mais diversas doenças para se colmatar a falta de informação que ainda se verifica.

Assim, deverão efetuar-se estudos mais detalhado da etiopatogenia das doenças, a fim de se conseguir selecionar, para a análise dos antioxidantes, a amostra da população correta, a duração e o tempo do tratamento mais indicado e o alvo específico de atuação dos antioxidantes. É ainda importante que se façam mais pesquisas ao nível das dosagens recomendadas para a ingestão, com o objetivo de se minimizar efeitos nocivos para o indivíduo.

VII. Referências bibliográficas

Aruoma, O. I. (1998). Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(2), pp. 199-212.

Asplund, K. (2002). Antioxidant vitamins in the prevention of cardiovascular disease: a systematic review. *Journal of Internal Medicine*, 251, pp. 372-392.

Bailey, A. E. (1996). *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. New York, John Wiley.

Barbosa, K. B. F., *et al.* (2010). Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. *Revista de Nutrição*, 23(4), pp. 629-643.

Barreiros, A. L. B. S., David, J. M., David, J. P. (2006). Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, 29(1), pp. 113-123.

Bianchi, M. D. L. P., Antunes, L. M. G. (1999). Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista Nutrição*, 12(2), pp. 123-130.

Birben, E., Erzurum, S. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization*, 5, pp. 9-19.

Bjelakovic, G., *et al.* (2008). Antioxidant supplements for preventing gastrointestinal cancers. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 3. pp. CD 004183.

Blot, W.J., *et al.* (1993). Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. *Journal of the National Cancer Institute*, 85, pp. 1483-1491.

Brewer, J. G. (2010). Why vitamin E therapy fails for treatment of Alzheimer disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 19(1), pp. 27-30.

Brown, B.G., *et al.* (2001). Simvastatin and niacin, antioxidant vitamins, or the combination for the prevention of coronary disease. *New England Journal of Medicine*, 345, pp. 1583-1592.

Campos, E. B. P., Yoshida, W. B. (2004). O papel dos radicais livres na fisiopatologia da isquemia e reperfusão em retalhos cutâneos: modelos experimentais e estratégias de tratamento. *Jornal Vasculoso Brasileiro*, 3(4), pp. 357-366.

Catania, A. S., Barros, C. R. D., Ferreira, S. R. G. (2009). Vitamins and minerals with antioxidant properties and cardiometabolic risk: controversies and perspectives. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, 53(5), pp. 550-559.

Cerqueira, F. M., Medeiros, M. H. G. D., Augusto, O. (2007). Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Química Nova*, 30(2), pp. 441-449.

Chakraborty, P., *et al.* (2009). Role of antioxidants in common health diseases. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 2(2), pp. 238-244.

Chew, E. Y. (2013). Nutrition effects on ocular diseases in aging eye. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 54(14), pp. 42-47.

Chong, E. W. *et al.* (2007). Dietary antioxidants and primary prevention of age related macular degeneration: systematic review and meta-analysis. *British Medical Journal*, 335, pp. 1-8.

Cook, N. R., *et al.* (2008). A randomized factorial trial of vitamins C, E, and beta-carotene in the secondary prevention of cardiovascular events in women: results from the Women's Antioxidant Cardiovascular Study (WACS). *Archives of Internal Medicine*, 167(15), pp. 1610-1618.

Degáspari, C. H., Waszczynskyj, N. (2004). Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. *Visão Acadêmica*, 5 (1), pp. 33-40.

Devasagayam, T. P., *et al.* (2004). Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *Journal of Association of Physicians of India*, 52, pp. 794-804.

Direção Geral da Saúde. (2012). Programa Nacional para as Doenças Cérebro-Cardiovasculares. [Em linha]. Disponível em <http://www.portaldasaude.pt/NR/rdonlyres/DC769325-E684-460D-B166-0F38A74972B0/0/programa_nacional_cerebro_cardiovasculares.pdf>. [Consultado em 2/06/2014].

Ehrlich, S. D. (2012). Beta-carotene. [Em linha]. Disponível em <<https://umm.edu/health/medical/altmed/supplement/betacarotene>>. [Consultado em 13/05/2014].

Emily, Y., *et al.* (2013). Lutein/zeaxanthin for the treatment of age-related cataract: AREDS2 randomized trial report nº 4. *Journal of the American Medical Association Ophthalmology*, 131(7), pp.843-850.

Fang, Y. Z., Yang, S., Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10), pp. 872-879.

Ferreira, A. L. A., Matsubara, L. S. (1997). Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 43(1), pp. 61-68.

Firuzi, O., *et al.* (2011). Antioxidant therapy: current status and future prospects. *Current Medicinal Chemistry*, 18(25), pp. 3871-3888.

Fuchs-Tarlovsky, V. (2013). Role of antioxidants in cancer therapy. *Nutrition*, 29, pp. 15-21.

Garcez, M., *et al.* (2004). Radicais livres e espécies reativas. *In: Salvador, M., Henriques, J.A.P. (Ed.). Radicais Livres E a Resposta Celular Ao Estresse Oxidativo.* 1ª Edição. Canoas, Ed ULBRA, pp. 13-34.

Gene, B. (2009). Eye disorders. *Huntington College of Health Sciences*, pp. 1-4.

Gerschman, R., *et al.* (1954). Oxygen poisoning and x-irradiation - a mechanism in common. *Science*, 119, pp. 623-626.

Guaratini, T., Medeiros, M. H., Colepicolo, P. (2007). Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. *Química Nova*, 30(1), pp. 206-213.

Guyton, A.C., Hall, J. E. (1997). A célula e o seu funcionamento. *In: Guyton, A.C., Hall, J. E. (Ed.). Tratado de Fisiologia Médica.* 9ª Edição. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, pp. 8-14.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine*, 18, pp. 125-126.

Hamid, A. A., *et al.* (2010). Antioxidants: Its medicinal and pharmacological applications. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 4(8), pp. 142-151.

Hamilton, C. A., *et al.* (2004). Strategies to reduce oxidative stress in cardiovascular disease. *Clinical Science*, 106, pp. 219-234.

Harman, D. (1956). Aging - a theory based on free-radical and radiation-chemistry. *Journal of Gerontology*, 11, pp. 298-300.

Hercberg, S., *et al.* (2004). The SU.VI.MAX Study: a randomized, placebo-controlled trial of the health effects of antioxidant vitamins and minerals. *Archives of Internal Medicine*, 164(21), pp. 2335-2342.

Hercberg, S., *et al.* (2007). Antioxidant supplementation increases the risk of skin cancers in women but not in men. *Journal of Nutrition*, 137(9), pp. 2098-2105.

Hercberg, S., *et al.* (2010). Incidence of cancers, ischemic cardiovascular diseases and mortality during 5-year follow-up after stopping antioxidant vitamins and minerals supplements: a postintervention follow-up in the SU.VI.MAX Study. *International Journal of Cancer*, 127(8), pp. 1875-1881.

HPRC. (2011). Vitamin C, Vitamin E, and Zinc as Antioxidants. [Em linha]. Disponível em <<http://hprc-online.org/dietary-supplements/dietary-supplement-classification-system-1/class-5-supplements/branched-chain-amino-acids>>. [Consultado em 1/06/2014].

Hu, Y. J., *et al.* (1997). The protective role of selenium on the toxicity of cisplatin-contained chemotherapy regimen in cancer patients. *Biological Trace Element Research*, 56, pp. 331-341.

Jacob, R. A., Sotoudeh, G. (2002). Vitamin C function and status in chronic disease. *Nutrition in Clinical Care*, 5, pp. 66-74.

Jialal, I., Devaraj, S. (2000). Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. *New England Journal of Medicine*, 342, pp. 154-160.

Johnson, E. J., Russell, R. M. (2010). Beta-Carotene. *In*: Coates, P. M., *et al.* (Ed.). *Encyclopedia of Dietary Supplements*. 2ª Edição. London and New York: Informa Healthcare, pp. 115-120.

Junior, D., *et al.* (2005). Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 31(1), pp. 60-68.

Kang, J. H., *et al.* (2006). A randomized trial of vitamin E supplementation and cognitive function in women. *Archives of Internal Medicine*, 166, pp. 2462-2468.

Klein, E. A., *et al.* (2011) Vitamin E and the risk of prostate cancer: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *Journal of the American Medical Association*, 306(14), pp. 1549-1556.

Knekt, P., *et al.* (2004). Antioxidant vitamins and coronary heart disease risk: a pooled analysis of 9 cohorts. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80(6), pp. 1508-1520.

Kumar, S. V., Saritha, G., Fareedullah, M. (2010). Role of antioxidants and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Annals of Biological Research*, 1(3), pp. 158-173.

Kunwar, A., Priyadarsini, K. I. (2011). Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. *Journal of Medical & Allied Sciences*, 1(2), pp. 53-60.

Lee, I-M. *et al.* (2005). Vitamin E in the primary prevention of cardiovascular disease and cancer the women's health study: a randomized controlled trial. *Journal American Medical Association*, 294(1), pp. 56-65.

Li, F. J., Shen, L., Ji, H. F. (2012). Dietary intakes of vitamin E, vitamin C, and β -carotene and risk of Alzheimer's disease: a meta-analysis. *Journal of Alzheimer's Disease*, 31(2), pp. 253-258.

Lippman, S. M., *et al.*, (2009). Effect of selenium and vitamin e on risk of prostate cancer and other cancers - The selenium and vitamin e cancer prevention trial (SELECT). *Journal American Medical Association*, 301(1), pp. 39-51.

Lobo, V., *et al.* (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), pp. 118-126.

Lonn, E., *et al.* (2005). Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer: a randomized controlled trial. *Journal of the American Medical Association*, 293, pp. 1338-1347.

Macedo, M. E., *et al.* (2007). Prevalência, conhecimento, tratamento e controlo da hipertensão em Portugal - Estudo PAP. *Revista Portuguesa de Cardiologia*, 26(1), pp. 21-39.

McCord, J. M., Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, 244(22), pp. 6049-6055.

McEwen, M. L., *et al.* (2011). Targeting mitochondrial function for the treatment of acute spinal cord injury. *The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 8, pp. 168-179.

Miller, E. R., *et al.* (2005). Meta-analysis: high-dosage vitamin e supplementation may increase all-cause mortality. *Annals of Internal Medicine*, 142, pp. 37-46.

Myung, S-K., *et al.* (2010). Effects of antioxidant supplements on cancer prevention: meta-analysis of randomized controlled trials. *Annals of Oncology*, 21(1), pp. 166-179.

Myung, S-K., *et al.* (2013). Efficacy of vitamin and antioxidant supplements in prevention of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *British Medical Journal*, 346, pp. 1-22.

Nelson, D.L., Cox, M.M. (2002). Fosforilação oxidativa e fotofosforilação. *In*: Nelson, D.L., Cox, M.M. (Ed.). *Lehninger Principios de Bioquímica*. 3ª Edição. Brasil, CLR Balieiro Editores, pp. 515-539.

Oduntan, O. A., Mashige, K. P. (2011). A review of the role of oxidative stress in the pathogenesis of eye diseases. *The South African Optometrist*, 70(4), pp. 191-199.

Oliveira, A. C., *et al.* (2009). Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova*, 32(3), pp. 689-702.

Osganian, S. K., *et al.* (2003). Vitamin C and risk of coronary heart disease in women. *Journal of the American College of Cardiology*, 42(2), pp. 246-252.

Pala, F. S., Gürkan, H. (2008). The role of free radicals in ethiopathogenesis of diseases. *Advances in Molecular Biology*, 1, pp. 1-9.

Perry, A., Rasmussen, H., Johnson, E. J. (2008). Xanthophyll (lutein, zeaxanthin) content in fruits, vegetables and corn and egg products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, pp. 9-15.

Pham-Huy, L. A., He, H., Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science*, 4(2), pp. 89-96.

Porporato, P. E., *et al.* (2014). A Mitochondrial Switch Promotes Tumor Metastasis. *Cell Reports*, 8, pp. 754-766.

Qiao, Y. L., *et al.* (2009). Total and cancer mortality after supplementation with vitamins and minerals: follow-up of the Linxian General Population Nutrition Intervention Trial. *Journal of the National Cancer Institute*, 101(7), pp. 507-518.

Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*, 2(2), pp. 219-236.

Ramalho, V. C., Jorge, N. (2006). Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, 29(4), pp. 755-760.

Ribeiro, S. M. R., *et al.* (2005). A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigénio no meio biológico. *Bioscience Journal*, 21(3), pp. 133-149.

Ross, C. A. (2010). Vitamin A. *In: Coates, P. M., et al. (Ed.). Encyclopedia of Dietary Supplements*. 2ª Edição. London and New York: Informa Healthcare, pp. 778-791.

Sano, M., *et al.* (1997). A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*, 336, pp. 1216-1222.

Seeley R., Stephens T., Tate P. (2005). Os sentidos especiais. *In: Seeley R., Stephens T., Tate P. (Ed.). Anatomia e Fisiologia*. 6ª Edição. Lusociência, pp. 513-555.

Sen, S., Chakraborty, R. (2011). The role of antioxidants in human health. *In: Andreescu, S., et al. (Ed.). In oxidative stress: Diagnostics, prevention, and therapy*. Washington, DC, American Chemical Society, pp. 1-37.

Sesso, H. D., *et al.* (2009). Vitamins E and C in the prevention of cardiovascular disease in men: the physicians' health study II randomized trial. *Journal of the American Medical Association*, 300(18), pp. 1-22.

Sesso, H. D., *et al.* (2013). Multivitamins in the prevention of cardiovascular disease in men: the physicians' health study II randomized controlled trial. *Journal of the American Medical Association*, 308(17), pp. 1-23.

Shalaby, E. A., Shanab, S. M. M. (2013). Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 7(10), pp. 528-539.

Sies, H. (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(9), pp. 916-921.

Singal, P. K., *et al.* (1998). The role of oxidative stress in the genesis of heart disease. *Cardiovascular Research*, 40, pp. 426-432.

Skibola, C. F., Smith, M. T. (2000). Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radical Biology & Medicine*, 29(3/4), pp. 375-383.

Stamfer, M. J., *et al.* (1993). Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. *New England Journal of Medicine*, 328, pp.1444-1449.

Tedesco, A. C., Martínez, L., González, S. (1997). Photochemistry of UV-induced erythema: Studies on free radical generation and the production of ROS. [Em linha]. Disponível em http://www.biology-online.org/user_files/Image/Medicine/actinic%20erythema%20m02.gif. [Consultado em 24/01/2014].

Teixeira, M. S. S. R. (2013). Stress oxidativo e dano no DNA na doença inflamatória intestinal. *Arquivos de Medicina*, 27(6), pp. 248-255.

Telesi, M., Machado, F. A. (2008). A influência do exercício físico e dos sistemas antioxidantes na formação de radicais livres no organismo humano. *SaBios-Revista de Saúde e Biologia*, 3(1), pp. 40-49.

The National Academies. (2000). Dietary reference intakes (DRIs): recommended dietary allowances and adequate intakes, elements. [Em linha]. Disponível em [http://iom.edu/Activities/Nutrition/SummaryDRIs/~media/Files/Activity%20Files/Nutrition/DRIs/RDA%20and%20AIs_Vitamin%20and%20Elements.pdf](http://iom.edu/Activities/Nutrition/SummaryDRIs/~/media/Files/Activity%20Files/Nutrition/DRIs/RDA%20and%20AIs_Vitamin%20and%20Elements.pdf). [Consultado em 29/07/2014].

The National Academies. (2001a). Dietary reference intakes (DRIs): tolerable upper intake levels, elements. [Em linha]. Disponível em <http://iom.edu/Activities/Nutrition/SummaryDRIs/~media/Files/Activity%20Files/Nutrition/DRIs/ULs%20for%20Vitamins%20and%20Elements.pdf>. [Consultado em 29/07/2014].

The National Academies. (2001b). Dietary reference intakes: vitamins. [Em linha]. Disponível em <http://www.iom.edu/Global/News%20Announcements/~//media/474B28C39EA34C43A60A6D42CCE07427.ashx>. [Consultado em 29/07/2014].

University of Maryland Medical Center. (2011). Quercetin. [Em linha]. Disponível em <http://umm.edu/health/medical/altmed/supplement/quercetin>. [Consultado em 1/06/2014].

Valavanidis, A., *et al.* (2013). Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer: respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10, pp. 3886-3907.

Valko, M., *et al.* (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, pp. 44-84.

Vivekananthan, D. P., *et al.* (2003). Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of randomised trials. *The Lancet*, 361, pp. 2017-2023.

Volp, A. C. P., *et al.* (2008). Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*, 23(2), pp. 141-149.

Waring, W.S. (2002). Uric acid: an important antioxidant in acute ischaemic stroke. *An International Journal of Medicine*, 95, pp. 691-693.

Willcox, J. K., Ash, S. L., Catignani, G. L. (2004). Antioxidants and prevention of chronic disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, pp. 275-295.

Ye, Z., Song, H. (2008). Antioxidant vitamins intake and the risk of coronary heart disease: meta-analysis of cohort studies. *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation*, 15(1), pp. 26-34.

Zadák, Z. *et al.*, (2009). Antioxidants and vitamins in clinical conditions. *Physiological Research*, 58, pp. S13-S17.

Zhang, S., *et al.* (1999). Dietary carotenoids and vitamins A, C, and E and risk of breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 91(6), pp. 547-556.

Anexos

Anexo 1: Resultados da eficácia dos suplementos vitamínicos e antioxidantes na prevenção de episódios cardiovasculares (Retirado de: Myung *et al.*, 2013).

Factor	No of trials	Relative risk (95% CI)
All	50	1.00 (0.98 to 1.02)
Prevention:		
Primary	30	1.01 (0.98 to 1.03)
Secondary	20	1.00 (0.97 to 1.03)
Type of supplement:		
Vitamins only	39	0.99 (0.97 to 1.01)
Low quality trials	17	0.99 (0.96 to 1.02)
High quality trials	22	0.99 (0.94 to 1.05)
Antioxidants only	22	0.98 (0.96 to 1.02)
Low quality trials	11	0.99 (0.96 to 1.03)
High quality trial	9	0.97 (0.91 to 1.02)
Vitamin A	2	0.98 (0.45 to 2.16)
Low dose (10 000 IU/day)	1	0.63 (0.37 to 1.07)
High dose (25 000 IU/day)	1	1.41 (1.15 to 1.73)*
Vitamin B ₆	16	0.96 (0.92 to 1.01)
Low dose (3-25 mg/day)	8	0.92 (0.85 to 0.99)*
Low quality trials	3	0.76 (0.61 to 0.94)*
High quality trials	5	0.94 (0.87 to 1.02)
High dose (40-100 mg/day)	8	0.99 (0.94 to 1.05)
Vitamin B ₁₂	17	0.99 (0.95 to 1.02)
Low dose (6 µg-0.5 mg/day)	11	0.96 (0.90 to 1.02)
High dose (1-2 mg/day)	6	1.00 (0.96 to 1.05)
Folic acid	21	0.99 (0.95 to 1.02)
Low dose (500 µg-5 mg/day)	17	0.99 (0.96 to 1.03)
High dose (10-40 mg/day)	4	0.89 (0.78 to 1.03)
Vitamin C†	7	0.99 (0.94 to 1.04)
Low dose (120-250 mg/day)	3	0.99 (0.94 to 1.04)
High dose (500-1000 mg/day)	4	0.98 (0.94 to 1.12)
Vitamin D	7	1.02 (0.98 to 1.07)
Low dose (120-250 mg/day)	2	1.05 (0.99 to 1.12)
High dose (500-1000 mg/day)	5	0.94 (0.86 to 1.03)
Vitamin E†	17	0.97 (0.94 to 1.01)
Low dose (60 IU-250 mg/day)	13	0.96 (0.92 to 1.01)
High dose (500-600 mg/day)	4	0.84 (0.52 to 1.35)
β carotene	11	1.04 (0.96 to 1.12)
Low dose (6-25 mg/day)	6	0.99 (0.95 to 1.03)
High dose (30-50 mg/day)	5	1.14 (0.96 to 1.35)
Selenium	7	0.91 (0.77 to 1.06)
Low dose (50-100 µg/day)	5	0.85 (0.70 to 1.04)
High dose (122-200 µg/day)	2	0.57 (0.10 to 3.16)

NA=not applicable.
 *P≤0.05.
 †For subgroup meta-analysis of vitamin C and vitamin E, we used data from 2008 PHS2 article

Anexo 2: Compilação de ensaios clínicos para a catarata e a DMRI (Adptado de: Chew, 2013).

Study	Participants	Nutrients Evaluated	Study Results
Randomized, double-masked, placebo-controlled cataract trials			
Physicians' Health Study Follow-up: 8 y	11,545 male physicians, ≥50 y	Vitamin E (440 IU every other day)/vitamin C (500 mg daily)	<u>Vitamin E</u> : RR 0,99 CI 95 %, 0,88-1,11 <u>Vitamin C</u> : RR 1,02 CI 95 %, 0,91-1,14 for incident cataract
Physicians' Health Study Follow-up: 12 y	22,071 male physicians, ≥50 y	Beta-carotene (50 mg every other day)	RR 1,00, CI 95 %, 0,91-1,09 for incident cataract RR 1,00, CI 95 %, 0,89-1,12 for cataract surgery
Women's Health Study Follow-up: 9,7 y	39,876 female health professionals ≥45 y	Vitamin E (600 IU every other day)	RR 0,96, CI 95 %, 0,88-1,04 for incident cataract
Randomized, double-masked, placebo-controlled age-related macular degeneration trials			
Randomized trial of Zinc Follow-up: 12–24 m	151 with early AMD, 42–89 y	Zinc sulfate (100 mg); equivalent to 80 mg of elemental zinc	Visual acuity change (final compared to baseline vision) was significantly less likely to deteriorate in the zinc treated group
Women's Antioxidant and Folic Acid Cardiovascular Study Follow-up: 7,3 y	5,205 female health care professionals at risk or with preexisting cardiovascular disease ≥ 40 y	Folic acid 2,5 mg, pyridoxine hydrochloride or B ₆ 50 mg, cyanocobalamin or B ₁₂ 1 mg	RR 0,66, CI 95 %, 0,47-0,93 for development of advanced

Anexo 3: Referências da ingestão diária (RDA) de vários antioxidantes e respetivos limites máximos toleráveis (UL) (Retirado de: The National Academies, 2000; The National Academies, 2001a; The National Academies, 2001b).

Nutrient	Function	Life Stage Group	RDA/AI*	UL ^a		
Vitamin C <u>Also known as:</u> Ascorbic acid Dehydroascorbic acid (DHA)	Cofactor for reactions requiring reduced copper or iron metalloenzyme and as a protective antioxidant	Infants 0–6 mo 7–12 mo	(mg/d) 40* 50*	(mg/d) ND ^b ND		
		Children 1–3 y 4–8 y	15 25	400 650		
		Males 9–13 y 14–18 y 19–30 y 31–50 y 50–70 y > 70 y	45 75 90 90 90 90	1,200 1,800 2,000 2,000 2,000 2,000		
		Females 9–13 y 14–18 y 19–30 y 31–50 y 50–70 y > 70 y	45 65 75 75 75 75	1,200 1,800 2,000 2,000 2,000 2,000		
		Pregnancy ≤ 18 y 19–30y 31–50 y	80 85 85	1,800 2,000 2,000		
		Lactation ≤ 18 y 19–30y 31–50 y	115 120 120	1,800 2,000 2,000		
		Vitamin A Includes provitamin A carotenoids that are dietary precursors of retinol. Note: Given as retinol activity equivalents (RAEs). 1 RAE = 1 µg retinol, 12 µg β-carotene, 24 µg α-carotene, or 24 µg β-cryptoxanthin. To calculate RAEs from REs of provitamin A carotenoids in foods, divide the REs by 2. For preformed vitamin A in foods or supplements and for provitamin A carotenoids in supplements, 1 RE = 1 RAE.	Required for normal vision, gene expression, reproduction, embryonic development and immune function	Infants 0–6 mo 7–12 mo	(µg/d) 400* 500*	(µg/d) 600 600
				Children 1–3 y 4–8 y	300 400	600 900
				Males 9–13 y 14–18 y 19–30 y 31–50 y 50–70 y > 70 y	600 900 900 900 900 900	1,700 2,800 3,000 3,000 3,000 3,000
				Females 9–13 y 14–18 y 19–30 y 31–50 y 50–70 y > 70 y	600 700 700 700 700 700	1,700 2,800 3,000 3,000 3,000 3,000
				Pregnancy ≤ 18 y 19–30y 31–50 y	750 770 770	2,800 3,000 3,000
				Lactation ≤ 18 y 19–30y 31–50 y	1,200 1,300 1,300	2,800 3,000 3,000

O uso de antioxidantes na prevenção da doença

Nutrient	Function	Life Stage Group	RDA/AI*	UL ^a
Vitamin E <u>Also known as:</u> α-tocopherol Note: As α-tocopherol. α-Tocopherol includes RRR-α-tocopherol, the only form of α-tocopherol that occurs naturally in foods, and the 2R-stereoisomeric forms of α-tocopherol (RRR-, RSR-, RRS-, and RSS-α-tocopherol) that occur in fortified foods and supplements. It does not include the 2S-stereoisomeric forms of α-tocopherol (SRR-, SSR-, SRS-, and SSS-α-tocopherol), also found in fortified foods and supplements.	A metabolic function has not yet been identified. Vitamin E's major function appears to be as a non-specific chain-breaking antioxidant.	Infants 0–6 mo 7–12 mo	(mg/d) 4* 5*	(mg/d) ND ^b ND
		Children 1–3 y 4–8 y	6 7	200 300
		Males 9–13 y 14–18 y 19–30 y 31–50 y 50–70 y > 70 y	11 15 15 15 15 15	600 800 1,000 1,000 1,000 1,000
		Females 9–13 y 14–18 y 19–30 y 31–50 y 50–70 y > 70 y	11 15 15 15 15 15	600 800 1,000 1,000 1,000 1,000
		Pregnancy ≤ 18 y 19–30y 31–50 y	15 15 15	800 1,000 1,000
		Lactation ≤ 18 y 19–30y 31–50 y	19 19 19	800 1,000 1,000

Dietary Reference Intakes (DRIs): Recommended Dietary Allowances and Adequate Intakes, Elements
 Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academies

Life Stage Group	Calcium (mg/d)	Chromium (µg/d)	Copper (µg/d)	Fluoride (mg/d)	Iodine (µg/d)	Iron (mg/d)	Magnesium (mg/d)	Manganese (mg/d)	Molybdenum (µg/d)	Phosphorus (mg/d)	Selenium (µg/d)	Zinc (mg/d)	Potassium (g/d)	Sodium (g/d)
Infants														
0 to 6 mo	200*	0.2*	200*	0.01*	110*	0.27*	30*	0.003*	2*	100*	15*	2*	0.4*	0.12*
6 to 12 mo	260*	5.5*	220*	0.5*	130*	11	75*	0.6*	3*	275*	20*	3	0.7*	0.37*
Children														
1–3 y	700	11*	340	0.7*	90	7	80	1.2*	17	460	20	3	3.0*	1.0*
4–8 y	1,000	15*	440	1*	90	10	130	1.5*	22	500	30	5	3.8*	1.2*
Males														
9–13 y	1,300	25*	700	2*	120	8	240	1.9*	34	1,250	40	8	4.5*	1.5*
14–18 y	1,300	35*	890	3*	150	11	410	2.2*	43	1,250	55	11	4.7*	1.5*
19–30 y	1,000	35*	900	4*	150	8	400	2.3*	45	700	55	11	4.7*	1.5*
31–50 y	1,000	35*	900	4*	150	8	420	2.3*	45	700	55	11	4.7*	1.5*
51–70 y	1,000	30*	900	4*	150	8	420	2.3*	45	700	55	11	4.7*	1.3*
> 70 y	1,200	30*	900	4*	150	8	420	2.3*	45	700	55	11	4.7*	1.2*
Females														
9–13 y	1,300	21*	700	2*	120	8	240	1.6*	34	1,250	40	8	4.5*	1.5*
14–18 y	1,300	24*	890	3*	150	15	360	1.6*	43	1,250	55	9	4.7*	1.5*
19–30 y	1,000	25*	900	3*	150	18	310	1.8*	45	700	55	8	4.7*	1.5*
31–50 y	1,000	25*	900	3*	150	18	320	1.8*	45	700	55	8	4.7*	1.5*
51–70 y	1,200	20*	900	3*	150	8	320	1.8*	45	700	55	8	4.7*	1.3*
> 70 y	1,200	20*	900	3*	150	8	320	1.8*	45	700	55	8	4.7*	1.2*
Pregnancy														
14–18 y	1,300	29*	1,000	3*	220	27	400	2.0*	50	1,250	60	12	4.7*	1.5*
19–30 y	1,000	30*	1,000	3*	220	27	350	2.0*	50	700	60	11	4.7*	1.5*
31–50 y	1,000	30*	1,000	3*	220	27	360	2.0*	50	700	60	11	4.7*	1.5*
Lactation														
14–18 y	1,300	44*	1,300	3*	290	10	360	2.6*	50	1,250	70	13	5.1*	1.5*
19–30 y	1,000	45*	1,300	3*	290	9	310	2.6*	50	700	70	12	5.1*	1.5*
31–50 y	1,000	45*	1,300	3*	290	9	320	2.6*	50	700	70	12	5.1*	1.5*

NOTE: This table (taken from the DRI reports, see www.nap.edu) presents Recommended Dietary Allowances (RDAs) in bold type and Adequate Intakes (AIs) in ordinary type followed by an asterisk.

O uso de antioxidantes na prevenção da doença

Dietary Reference Intakes (DRIs): Tolerable Upper Intake Levels, Elements
Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academies

Life Stage Group	Arsenic ^a	Boron (mg/d)	Calcium (mg/d)	Chromium	Copper (µg/d)	Fluoride (mg/d)	Iodine (µg/d)	Iron (mg/d)	Magnesium (mg/d) ^b	Manganese (mg/d)	Molybdenum (µg/d)	Nickel (mg/d)	Phosphorus (g/d)	Selenium (µg/d)	Silicon ^c	Vanadium (mg/d) ^d	Zinc (mg/d)
Infants																	
0 to 6 mo	ND ^e	ND	1,000	ND	ND	0.7	ND	40	ND	ND	ND	ND	ND	45	ND	ND	4
6 to 12 mo	ND	ND	1,500	ND	ND	0.9	ND	40	ND	ND	ND	ND	ND	60	ND	ND	5
Children																	
1-3 y	ND	3	2,500	ND	1,000	1.3	200	40	65	2	300	0.2	3	90	ND	ND	7
4-8 y	ND	6	2,500	ND	3,000	2.2	300	40	110	3	600	0.3	3	150	ND	ND	12
Males																	
9-13 y	ND	11	3,000	ND	5,000	10	600	40	350	6	1,100	0.6	4	280	ND	ND	23
14-18 y	ND	17	3,000	ND	8,000	10	900	45	350	9	1,700	1.0	4	400	ND	ND	34
19-30 y	ND	20	2,500	ND	10,000	10	1,100	45	350	11	2,000	1.0	4	400	ND	1.8	40
31-50 y	ND	20	2,500	ND	10,000	10	1,100	45	350	11	2,000	1.0	4	400	ND	1.8	40
51-70 y	ND	20	2,000	ND	10,000	10	1,100	45	350	11	2,000	1.0	4	400	ND	1.8	40
> 70 y	ND	20	2,000	ND	10,000	10	1,100	45	350	11	2,000	1.0	3	400	ND	1.8	40
Females																	
9-13 y	ND	11	3,000	ND	5,000	10	600	40	350	6	1,100	0.6	4	280	ND	ND	23
14-18 y	ND	17	3,000	ND	8,000	10	900	45	350	9	1,700	1.0	4	400	ND	ND	34
19-30 y	ND	20	2,500	ND	10,000	10	1,100	45	350	11	2,000	1.0	4	400	ND	1.8	40
31-50 y	ND	20	2,500	ND	10,000	10	1,100	45	350	11	2,000	1.0	4	400	ND	1.8	40
51-70 y	ND	20	2,000	ND	10,000	10	1,100	45	350	11	2,000	1.0	4	400	ND	1.8	40
> 70 y	ND	20	2,000	ND	10,000	10	1,100	45	350	11	2,000	1.0	3	400	ND	1.8	40
Pregnancy																	
14-18 y	ND	17	3,000	ND	8,000	10	900	45	350	9	1,700	1.0	3.5	400	ND	ND	34
19-30 y	ND	20	2,500	ND	10,000	10	1,100	45	350	11	2,000	1.0	3.5	400	ND	ND	40
61-50 y	ND	20	2,500	ND	10,000	10	1,100	45	350	11	2,000	1.0	3.5	400	ND	ND	40
Lactation																	
14-18 y	ND	17	3,000	ND	8,000	10	900	45	350	9	1,700	1.0	4	400	ND	ND	34
19-30 y	ND	20	2,500	ND	10,000	10	1,100	45	350	11	2,000	1.0	4	400	ND	ND	40
31-50 y	ND	20	2,500	ND	10,000	10	1,100	45	350	11	2,000	1.0	4	400	ND	ND	40

NOTE: A Tolerable Upper Intake Level (UL) is the highest level of daily nutrient intake that is likely to pose no risk of adverse health effects to almost all individuals in the general population. Unless otherwise