

Mônica Cristina Lopes do Carmo

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM SUCO DE ROMÃ SOBRE PARÂMETROS DE
ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDOS POR NATAÇÃO EXAUSTIVA EM RATOS**

Limeira

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Aplicadas

Mônica Cristina Lopes do Carmo

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM SUCO DE ROMÃ SOBRE
PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDOS POR NATAÇÃO
EXAUSTIVA EM RATOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Aplicadas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra na área de Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo.

Orientadora: Profa. Dra. Rosângela Maria Neves Bezerra

A handwritten signature in blue ink, corresponding to the name of the supervisor, Rosângela Maria Neves Bezerra.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA MÔNICA CRISTINA LOPES DO
CARMO E ORIENTADA PELA PROFA. DRA.
ROSÂNGELA MARIA NEVES BEZERRA.

Limeira

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
Sueli Ferreira Júlio de Oliveira - CRB 8/2380

C213e Carmo, Mônica Cristina Lopes, 1989-
CarEfeitos da suplementação com suco de romã sobre parâmetros de estresse oxidativo induzidos por natação exaustiva em ratos / Mônica Cristina Lopes do Carmo. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

CarOrientador: Rosângela Maria Neves Bezerra.
CarDissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

Car1. Romã. 2. Natação. 3. Antioxidantes. 4. Ratos. 5. Estresse oxidativo. I. Bezerra, Rosângela Maria Neves. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effects of supplementation with pomegranate juice about parameters from oxidative stress induced by exhaustive swimming in rats

Palavras-chave em inglês:

Pomegranate

Swimming

Antioxidants

Rats

Oxidative Stress

Área de concentração: Nutrição

Titulação: Mestra em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Banca examinadora:

Rosângela Maria Neves Bezerra [Orientador]

Ana Carolina Junqueira Vasques

Berenice Kussumoto de Alcântara

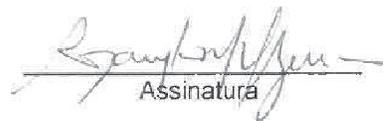
Data de defesa: 25-05-2014

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

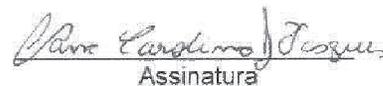
Limeira, 25 de Maio de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Rosângela Maria Neves Bezerra


Assinatura

Profa. Dra. Ana Carolina Junqueira Vasques


Assinatura

Profa. Dra. Berenice Kussumoto da Alcântara


Assinatura

RESUMO

O objetivo geral desta pesquisa foi avaliar o efeito da suplementação com o extrato etanólico de polpa da Romã (*Punica granatum* L.) na resposta antioxidante em ratos submetidos a exercício físico até a exaustão. Foram utilizados 39 ratos Wistar, machos, com 4 meses de vida e massa corporal de $404,32 \pm 18,17$ g. Os animais foram divididos em 4 grupos: CTL - 9 ratos não suplementados e não participantes do teste de exaustão; DI - 10 ratos pré-suplementados durante 21 dias com o extrato etanólico de polpa de romã na dose de 0,875 mmol de polifenóis/dia e submetidos a um teste de exaustão; DII - 10 ratos submetidos às mesmas condições que DI, porém recebendo a pré-suplementação na dose de 1,75 mmol de polifenóis/dia; NAT - 10 ratos submetidos ao mesmo protocolo que DI e DII, entretanto não suplementados. Os grupos DI, DII e NAT realizaram uma sessão aguda de natação até a exaustão. Foi observado que os animais suplementados conseguiram nadar por mais tempo que os animais que não receberam o extrato de polpa de romã; o grupo DI apresentou um aumento de 86,55% e DII de 64,86% em relação ao tempo de natação do grupo NAT. A suplementação proporcionou a diminuição dos valores de MDA e H_2O_2 no plasma e no gastrocnêmio. A atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD, GR e GST no grupo DI e DII se mostraram reduzidas no tecido hepático quando comparados ao NAT. Verificou-se que, o extrato preparado a partir da fruta de cultivo doméstico apresentou valores mais elevados de atividade antioxidante que a fruta de escala comercial avaliada pelos métodos de ORAC ($60,77 \pm 3,656$ μ mol Trolox/g polpa de romã liofilizada – fruta de escala comercial, $68,78 \pm 4,940$ μ mol Trolox/g polpa de romã liofilizada – fruta de cultivo doméstico), fenólicos totais ($8,123 \pm 0,225$ mg de eq. Ácido Gálico/g de polpa de romã liofilizada – fruta de cultivo doméstico, $6,815 \pm 0,121$ mg de eq. Ácido Gálico/g de polpa de romã liofilizada – fruta de escala comercial) e por ABTS⁺ ($31,786 \pm 0,326$ μ mol Trolox /g polpa de romã liofilizada – fruta de escala comercial, $43,151 \pm 0,652$ μ mol Trolox /g polpa de romã liofilizada – fruta de cultivo doméstico). A partir dos achados podemos concluir que a suplementação com o extrato de romã propiciou melhora no desempenho físico (tempo de natação) e favoreceu a proteção contra o excessivo ataque oxidativo. Os compostos bioativos da romã desempenharam um papel antioxidante.

Palavras-chave: Romã. Estresse Oxidativo. Antioxidantes. Natação. Ratos.

ABSTRACT

The overall objective of this research was to evaluate the effect of supplementation with ethanol extract of pulp of pomegranate (*Punica granatum L.*) in antioxidant response in rats submitted to exercise until exhaustion. Were used 39 male Wistar rats, 4 months of age and body weight of $404,32 \pm 18,17$ g. The animals were divided into 4 groups: CTL - 9 rats not supplemented and not participants of the exhaustion test, DI - 10 rats pre-supplemented for 21 days with the ethanol extract of pomegranate pulp at a dose of 0,875 mmol of polyphenols/day and subjected to a test of exhaustion; DII - 10 rats subjected to the same conditions DI, but getting the pre-supplementation at a dose of 1,75 mmol of polyphenols/day; NAT - 10 rats submitted the same protocol that DI and DII, however not supplemented. The groups DI, DII and NAT performed a session of swimming acute until exhaustion. It was observed that the supplemented animals could swim longer than animals that did not receive the extract of pomegranate pulp, the DI group showed an increase of 86,55 % and DII of 64,86 % in relation with time swimming of group NAT. The supplementation decreased the levels of MDA and H₂O₂ in plasma and gastrocnemius. The activity of antioxidant enzymes CAT, SOD, GR and GST in groups DI and DII showed reduced in liver when compared to NAT. It was found that the extract prepared from the fruit of domestic cultivation had higher values of the antioxidant activity that the fruit commercial scale assessed by methods ORAC ($60,77 \pm 3,656$ μ mol Trolox/g of lyophilized pulp pomegranate - fruit commercial scale; $68,78 \pm 4,940$ μ mol Trolox/g lyophilized pulp pomegranate - fruit of domestic cultivation), total phenolics ($8,123 \pm 0,225$ mg of eq. Gallic Acid/g lyophilized pulp pomegranate - fruit of domestic cultivation; $6,815 \pm 0,121$ mg eq Gallic Acid/g lyophilized pulp pomegranate - fruit commercial scale) and ABTS⁺ ($31,786 \pm 0,326$ 940 μ mol Trolox/g lyophilized pulp pomegranate - fruit commercial scale; $43,151 \pm 0,652$ 940 μ mol Trolox/g lyophilized pulp pomegranate - fruit of domestic cultivation). From the findings we can conclude that supplementation with pomegranate extract showed an improvement in physical performance (swimming time) and favored the protection against excessive oxidative attack. The bioactive compounds of pomegranate antioxidant played a role.

Keywords: Pomegranate. Oxidative Stress. Antioxidants. Swimming. Rats.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xxv
LISTA DE TABELAS	xxix
LISTA DE ABREVIATURAS	xxxI
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	34
2. JUSTIFICATIVA	36
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	39
3.1 ESTRESSE OXIDATIVO.....	40
3.2 RADICAIS LIVRES.....	41
3.3. RADICAIS LIVRES E EXERCÍCIO FÍSICO.....	43
3.4 RADICAIS LIVRES E SEUS EFEITOS.....	45
3.5 ESTRESSE OXIDATIVO E SUAS IMPLICAÇÕES NAS DOENÇAS.....	45
3.6 ORGANISMO E EQUILÍBRIO REDOX.....	47
3.7 ANTIOXIDANTES.....	47
3.7.1 ANTIOXIDANTES ALIMENTARES.....	53
3.8 COMPOSTOS FENÓLICOS.....	58
3.8.1 COMPOSTOS FENÓLICOS E SEUS EFEITOS.....	60
3.9 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE.....	60
3.9.1 DETERMINAÇÃO DA OXIDAÇÃO DE MOLÉCULAS.....	60
3.9.2 DETERMINAÇÃO DA CAPTURA DE RADICAIS LIVRES.....	61
3.9.3 MÉTODO DO RADICAL ABTS ⁺	61

3.9.4 MÉTODO ORAC.....	61
3.10 BIODISPONIBILIDADE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS.....	62
3.11 A ROMÃ.....	63
4. OBJETIVOS.....	70
5. MATERIAL E MÉTODO.....	72
5.1 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	72
5.2 TIPO DE DELINEAMENTO.....	72
5.3- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> DA POLPA DA ROMÃ.....	72
5.3.1 AMOSTRA.....	72
5.3.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DA POLPA DA ROMÃ....	74
5.3.3 QUANTIFICAÇÃO DOS FENÓLICOS TOTAIS.....	75
5.3.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO ABTS ⁺	76
5.3.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO ORAC (CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DO RADICAL DE OXIGÊNIO.....	78
5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VIVO</i>	79
5.4.1 AMOSTRA.....	79
5.4.2 RAÇÃO COMERCIAL.....	73
5.4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	80
5.4.4 PROTOCOLO DE ADAPTAÇÃO AO MEIO LÍQUIDO E AO EXERCÍCIO FÍSICO EXAUSTIVO.....	81
5.4.5 PROTOCOLO DE EXERCÍCIO FÍSICO EXAUSTIVO.....	83

5.4.6 EUTANÁSIA.....	84
5.4.7 COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	85
5.4.8 DETERMINAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO DE LIPÍDEOS E DOS NÍVEIS DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO DO TECIDO MUSCULAR E DO PLASMA.....	85
5.4.9 DETERMINAÇÃO DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES DO TECIDO HEPÁTICO.....	87
5.4.10 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM SISTEMA NÃO DESNATURANTE E POR ESPECTROFOTOMETRIA.....	88
5.4.10.1 ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) EM GEL NÃO DESNATURANTE (PAGE).....	89
5.4.10.2 ATIVIDADE DA CATALASE (CAT) EM GEL NÃO DESNATURANTE (PAGE).....	91
5.4.10.3 ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUTASE (GR) EM GEL NÃO DESNATURANTE (PAGE).....	92
5.4.10.4 ATIVIDADE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST) EM ESPECTROFOTÔMETRO.....	93
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	93
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	95
6.1 ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DAPRL.....	95
6.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO ABTS ⁺	98
6.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO ORAC (CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DO RADICAL OXIGÊNIO).....	101

6.4 CARACTERIZAÇÃO DA VARIÁVEL MASSA.....	103
6.5 SUPLEMENTAÇÃO X PERFORMANCE.....	104
6.6 RELAÇÃO DO MALONALDEÍDO (MDA) COM A SUPLEMENTAÇÃO DA PRL.....	106
6.7 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DAPRL NOS NÍVEIS DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO.....	110
6.8 EFEITO DAPRL NO SISTEMA DE DEFESA ENZIMÁTICO CONTRA O ESTRESSE OXIDATIVO.....	114
6.8.1 ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) EM ESPECTROFOTÔMETRO E PAGE.....	115
6.8.2 ATIVIDADE DA CATALASE (CAT) EM ESPECTROFOTÔMETRO E PAGE.....	118
6.8.3 ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUTASE (GR) EM ESPECTROFOTÔMETRO E PAGE.....	122
6.8.4 ATIVIDADE DA GLUTATIONA-S-TRANSFERASE (GST) EM ESPECTROFOTÔMETRO.....	124
7. CONCLUSÃO.....	128
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	130

À Profa. Rosângela pela orientação, pelo carinho com que ensina e pela oportunidade de conhecer e aprender com a mestra e pessoa que é, agradeço pela tolerância, carinho e compreensão sempre que precisei...

No decorrer deste trabalho as dificuldades não foram poucas, os desafios foram muitos, os obstáculos algumas vezes pareciam intransponíveis. O desânimo aparecia com força total, porém sempre havia uma palavra de conforto e incentivo, a vontade de vencer voltava à tona, impulsionando a retomada da caminhada.

Agora, ao olhar para trás, surge a sensação de dever cumprido, fazendo valer a pena as noites sem dormir (que não foram poucas), o cansaço da execução do experimento, a falta de jeito inicial no manuseio dos animais, as intermináveis buscas, planejamentos, redações, readaptações, a ansiedade de fazer tudo “pra ontem”, a ausência de férias, angústia e até decepções por não conseguir o que se almejava.

Agora sei que nada disso foi em vão. Cada coisa aconteceu a seu tempo, promovendo crescimento.

Hoje me apresento como sobrevivente de uma longa batalha, muito mais forte, hábil e corajosa. Cito então uma frase da obra “O Pequeno Príncipe”, de Antoine de Saint Exupéry:

“Foi o tempo que perdeste com a tua rosa, que fez a tua rosa tão importante.”

Agradeço a todos que participaram, direta ou indiretamente, desta etapa da minha vida acadêmica:

Primeiramente a Deus pela minha vida, por permitir cada passo dado, pela força, garra, dedicação e perseverança que diversas vezes nem eu mesma sabia que tinha.

Aos meus genitores, Paulo e Gê, por todo esforço realizado desde o início, muitas vezes deixando de lado seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus. Pelas palavras de sabedoria, paciência e mesmo o silêncio de algumas vezes. Pela atenção, amizade, amor e carinho incondicional quando eu achava que as minhas pernas já não dariam conta de terminar a caminhada. Meus sorrisos e minhas lágrimas por vocês eram acolhidos de uma maneira singular. Minhas noites mal dormidas foram assistidas com olhar sereno, refletindo a esperança de que tudo valeria à pena. E hoje, nesse momento em que este trabalho se concretiza, ofereço toda a minha gratidão e amor.

Ao meu irmão Ricardo (Meu Filhote), pelos momentos de alegria, pelas bagunças, discussões, carinho e o colo, independente de onde estivesse. Muitas vezes sem compreender minhas metas, conseguiu me apoiar e me fazer ir em frente.

MEUS PAIS E MEU IRMÃO, vocês me ensinaram a erguer a cabeça e ir em frente sempre, independente das dificuldades. Agradeço o modelo de esforço, competência e garra que tenho dentro de casa. Vocês são meu tesouro.

Ao meu esposo William, meu anjinho sem asas, pelo apoio em cada momento, vibração a cada conquista, paciência, o carinho e incentivo para que atingisse meus objetivos. Tenho certeza que Deus te usou para me colocar de volta nos trilhos, me rerepresentando o verdadeiro sentido da palavra FELICIDADE.

Aos demais familiares, por cada “alô”, “eu te amo”, “tenho saudades”, “vai em frente, tá acabando, você consegue!” Vocês não têm idéia do quanto isso me impulsionou e preencheu nos momentos de solidão.

Agradeço a amizade e o carinho de cada um.

A toda à equipe médica que me deu assistências nesse período: Dra Yvone minha psiquiatra, Dra Nídia minha psicóloga, Dr Fábio meu hematologista, Dr Balestrini meu proctologista, Dr Renato cirurgião, Dr Marco meu infectologista, Dr Célio meu gastro, Dr Finotti meu cardio, Dr Rubens meu nefro, enfim, agradeço a todos vocês do fundo do coração por todas as vezes que não hesitaram em me atender independente do dia ou da hora, agradeço as palavras de carinho comigo e com toda a minha família e agradeço também aos “puxões de orelha”...mas eu avisei que eu ia entregar essa dissertação para vocês completa e aqui está ela! Obrigada pela preocupação, mas eu tinha que me dar a chance de tentar.

À queridíssima Lucimaraque sempre nos ajudou nos experimentos e as ajudas on-line com intermináveis dúvidas. Tenho muito carinho por você Lu.

Ao prof. Ricardo Azevedo que nos recebeu de portas abertas em seu laboratório tornando possível a realização desta pesquisa.

À profa. Maria Esméria, sempre muito prestativa, nos ajudando quando tínhamos dúvidas e na participação dos experimentos.

À toda a equipe do laboratório do Prof Ricardo e do Prof Severino em especial a Berenice e a Salete que me ajudaram muito. Vocês são um doce meninas!

Aos meus amigos de sala: Pedro, Bruno, Sabrina, Tanya, Bruna e Diogo quantos momentos de risadas, conversas, orientações, desabafos e os choros que ouvíamos um do outro, mas sempre lembrando a famosa “louiz” no fim do túnel.

À Elaine do SAE que me ajudou muito quando eu precisei da bolsa alimentação e com os remédios que conseguiu para mim.

Aos coordenadores, professores e demais funcionários do Programa da Pós Graduação que sempre foram muito educados e prestativos em especial a Rosi guardinha que adorava brincar com os meus babies (Apolo e Zeus) aos domingos enquanto eu permanecia no biotério. Aos professores meus mais sinceros agradecimentos pela disponibilidade, atenção e pelas preciosas contribuições.

À CAPES, pelo auxílio financeiro concedido à pesquisa, auxiliando em parte do desenvolvimento do Projeto.

A todos eu deixo meu Muito Obrigado!

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Geração de ERO a partir da redução do oxigênio.
- Figura 2** Redução tetravalente do oxigênio molecular na mitocôndria até a formação de água.
- Figura 3** Mecanismos da síntese de ERO durante e após exercícios anaeróbios.
- Figura 4** Estrutura da superóxido dismutase-ferro de *Escherichia coli*.
- Figura 5** Estrutura da catalase do eritrócito humano.
- Figura 6** Estrutura da glutathione peroxidase do plasma humano.
- Figura 7** Esquema simplificado de biotransformação do benzo(a)pireno e uso de biomarcadores bioquímicos.
- Figura 8** Fórmula estrutural do ácido L-ascórbico.
- Figura 9** Fórmula estrutural do ácido L-desidroascórbico.
- Figura 10** Estrutura vitamina C.
- Figura 11** Estrutura química geral de um flavonóide: dois anéis aromáticos (A e B) e um anel intermediário (C).
- Figura 12** Compostos fitoquímicos presentes em alimentos vegetais.
- Figura 13** Redução do ABTS⁺ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.
- Figura 14** Flor de romãzeira (A), a romã (B), sementes de romã (C), fruto aberto e fechado com as sementes e albedo à mostra (D).
- Figura 15** Dante Gabriel Rossetti. *Perséfone*, 1877.
- Figura 16** Dante Gabriel Rossetti. *Vênus Verticórdia*, 1864-68.

- Figura 17** Sandro Botticelli. *A Madona da Romã*, 1487.
- Figura 18** Frutos provenientes do CEASA.
- Figura 19** Parte interna da fruta.
- Figura 20** Obtenção do extrato alcoólico.
- Figura 21** Curva de calibração do ácido gálico para o calculo do teor de compostosfenólicos totais.
- Figura 22** Curva de calibração do Trolox.
- Figura 23** Organograma demonstrativo da distribuição dos grupos experimentais.
- Figura 24** Sistema mini-gel vertical.
- Figura 25** Valores fenólicos totais de frutas selecionadas.
- Figura 26** Valores ORAC de frutas selecionadas.
- Figura 27** Efeito da suplementação com PRL no tempo de natação até a exaustão.
- Figura 28** Concentrações no músculo gastrocnêmio de MDA nos grupos CTL, DI, DII e NAT.
- Figura 29** Concentrações plasmáticas de MDA nos grupos CTL, DI, DII e NAT.
- Figura 30** Concentrações de MDA no músculo gastrocnêmio nos grupos corrigidos pelo tempo (MDA/ Δt natação).
- Figura 31** Concentrações de MDA no plasma nos grupos corrigidos pelo tempo (MDA/ Δt natação).
- Figura 32** Conteúdo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em tecido muscular.
- Figura 33** Conteúdo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) no plasma.
- Figura 34** Concentrações de peróxido de hidrogênio no músculo gastrocnêmio nos grupos corrigidos pelo tempo (MDA/ Δt natação).

- Figura 35** Concentrações de peróxido de hidrogênio no plasma nos grupos corrigidos pelo tempo (MDA/ Δt natação).
- Figura 36** Atividade específica da SOD em tecido hepático avaliado em PAGE.
- Figura 37** Atividade específica da SOD em tecido hepático em espectrofotômetro.
- Figura 38** Atividade específica da CAT em tecido hepático avaliado em PAGE.
- Figura 39** Atividade específica da CAT em tecido hepático em espectrofotômetro.
- Figura 40** Atividade específica da GR em tecido hepático em espectrofotômetro.
- Figura 41** Atividade específica da GR em tecido hepático avaliado em PAGE.
- Figura 42** Atividade específica da GST em tecido hepático em espectrofotômetro

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Principais condições clínicas associadas ao estresse oxidativo.
- Tabela 2** Propriedades e localização dos principais antioxidantes enzimáticos.
- Tabela 3** Propriedades e localização dos principais antioxidantes nãoenzimáticos
- Tabela 4** Especificações da ração comercial Nuvilab®.
- Tabela 5** Descrição dos grupos experimentais.
- Tabela 6** Protocolo de adaptação ao meio líquido.
- Tabela 7** Resultados da análise de fenólicos totais daPRL.
- Tabela 8** Atividade antioxidante equivalente ao Trolox nos extratos etanólicos das amostras pelo método do ABTS⁺.
- Tabela 9** Atividade antioxidante equivalente ao Trolox das frutas pelo método do ABTS⁺.
- Tabela 10** Atividade antioxidante equivalente ao Trolox nas polpas liofilizadas das amostras pelo método do ORAC.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AAPH - 2,2'- radical azobis amidinopropano
- ABTS - radical 2,2- azino-bis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfônico
- AFEI - ácidos fenólicos esterificados a compostos insolúveis
- AFES - ácidos fenólicos esterificados a compostos solúveis
- AFL - ácidos fenólicos livres
- ANOVA - Análise de variância
- ATP - Adenosina trifosfato
- BHA - butil-hidroxianisol
- BHT - butil-hidroxitolueno
- BSA - Soro de Albumina Bovino
- CAT - Catalase
- CTL - Grupo Controle (Não treinado)
- CDNB - 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
- CEUA - Comissão de ética no uso de animais
- DI - Grupo suplementado com uma dose de 0,875 mmol de polifenóis/dia
- DII - Grupo suplementado com uma dose de 1,75 mmol de polifenóis/dia
- DPPH - radical 1,1- diphenyl- 2- picryldrazyl
- DTNB - 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
- DTT - ditioneitol
- EDTA Ácido Etilenodiaminotetrácetico
- ERNs - Espécies reativas de nitrogênio
- EROs - Espécies reativas de oxigênio
- GPX - Glutathione peroxidase

GR - Glutathione redutase

GST - Glutathione-S-transferase

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

MDA - Malondialdeído

MTT - 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide

NAT - Grupo que realizou a natação

NBT - nitroblue tetrazolium

ORAC - *oxygen radical absorbance capacity* - capacidade de absorção de radicais de oxigênio

PRL - polpa de romã liofilizada

PVPP - polivinil polipirrolidona

RL - Radicais livres

SDS-PAGE – Sodium dodecyl sulphate- polyacrilamide gel electrophoresis

SOD - Superóxido dismutase

TBA - Ácido tiobarbitúrico

TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA - ácido tricloroacético

TEMED - Tetrametil diaminoetileno

1- INTRODUÇÃO

Desde tempos remotos, o homem busca na natureza recursos que possam melhorar sua condição de vida visando aumentar suas chances de sobrevivência pela melhoria de sua saúde e consequente qualidade de vida ¹.

O exercício físico está atrelado à melhora da saúde, entretanto, alguns estudos demonstram que se realizado de forma exaustiva e aguda pode induzir o aumento no consumo de oxigênio, e assim, a maior formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ERO's) ^{2,3}.

Devido a tantas controvérsias, nas últimas décadas os efeitos benéficos e nocivos do exercício físico têm sido alvo de discussão entre diversos pesquisadores ^{4,5}.

O termo “estresse oxidativo” é utilizado quando ocorre um desequilíbrio entre os sistemas pró e antioxidantes, sendo o primeiro sistema predominante. Quando a formação dos radicais livres (RL) excede a capacidade de defesa do organismo, observa-se dano às moléculas biológicas⁶.

A inibição de radicais livres é controlada nos seres vivos por diversos compostos antioxidantes, os quais podem ter origem endógena (enzima superóxido dismutase), ou serem provenientes da dieta alimentar. Destas últimas destacam-se os tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), polifenóis, selênio e carotenóides ⁷. Quando há limitação na disponibilidade de antioxidantes no organismo, podem ocorrer lesões oxidativas de caráter cumulativo. Os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais. Algumas pesquisas demonstraram alterações na atividade das enzimas antioxidantes em resposta à presença de espécies reativas de oxigênio ⁸⁻¹⁰.

A romã (*Punica granatum*, L.) é uma fruta originária do Oriente Médio, rica em compostos fenólicos, que exibem forte atividade antioxidante *in vitro*. Estudos mostram que o consumo do suco da fruta traz benefícios relacionados com ; o de processos oxidativos que começam com a participação de radicais livres .

2- JUSTIFICATIVA

Pesquisadores buscam compreender os mecanismos bioquímicos e fisiológicos envolvidos nas respostas agudas e crônicas ao exercício físico ¹³⁻¹⁸. Talvez um dos

maiores desafios das pesquisas atuais no assunto esteja relacionado à possibilidade de descobrir eventos que ocorrem durante a prática do exercício, visando assim potencializar a performance, o rendimento dos praticantes, e o ganho em qualidade de vida dos mesmos. Para isso, o entendimento do metabolismo do estresse oxidativo gerado pelo exercício exaustivo e como controlá-lo faz-se necessário. A avaliação das variáveis metabólicas envolvidas no metabolismo oxidativo pode contribuir para o entendimento dos fenômenos ocorridos durante ou após o exercício físico agudo, bem como a adaptação ao treinamento (efeito crônico)¹⁹.

Os efeitos benéficos do exercício físico regular e moderado são bastante conhecidos, é comum a busca de melhorias quanto à composição corporal e/ou condições de saúde através da prática de exercícios. Entretanto essa prática é frequentemente acompanhada de uma dieta desequilibrada, descontinuidade do exercício e de forma intensa quando realizado ²⁰. Os efeitos deletérios dessa associação, quando mantida por um longo prazo, precisam ser investigados, possivelmente relacionando-se com a produção exacerbada de RL e esgotamento das defesas antioxidantes do organismo. Ainda hoje as respostas existentes são bastante conflitantes, e pouco se sabe dos efeitos da intervenção com alimentos ricos em compostos com potencial antioxidante em parâmetros que reflitam a manifestação do estresse oxidativo em seres humanos fisicamente ativos²¹.

O estresse oxidativo é apontado como desencadeador de diversos eventos nosológicos, dentre eles: envelhecimento, mutações, câncer, doenças auto-imunes, aterosclerose, síndromes demenciais, disfunção renal, artrite reumatóide, enfisema, displasia bronco-pulmonar, entre outras que tanto atingem a população²².

Visto que o treinamento físico acompanhado de uma baixa ingestão de nutrientes antioxidantes representa ao esportista um período de maior vulnerabilidade ao estresse oxidativo, é interessante compreender os mecanismos que circundam o realizar do exercício, como isso afeta o homem e como barrar os eventos danosos²⁵⁻²⁷.

A investigação dos efeitos do consumo da romã em indicadores do estado antioxidante e do estresse oxidativo no plasma de animais que realizem a sessão aguda de natação fornecerá dados que facultem aos profissionais subsídios para o planejamento dietético, visando o controle adequado do estresse oxidativo associado

ao exercício, além de propiciar valor agregado à romã pelo seu potencial antioxidante, não só no quanto ao “estresse oxidativo relacionado ao exercício”, mas também na prevenção de patologias relacionadas ao desequilíbrio oxidativo.

3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1- Estresse Oxidativo

Quando a formação dos RL excede a capacidade de defesa do organismo, se observa dano às moléculas biológicas²⁸. As principais lesões observadas são: peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e danos ao DNA, que por sua vez ocasiona alteração da função celular²⁹.

A cadeia transportadora de elétrons mitocondrial pode ser uma das maiores fontes de agentes oxidantes. A hipótese de que a mitocôndria é o sítio primário da geração de ERO's durante o exercício é mantida por evidências indiretas de dano oxidativo mitocondrial pós exercício exaustivo, assim como a adaptação de enzimas mitocondriais antioxidantes, como a superóxido dismutase dependente de manganês⁸.

A realização de exercício físico agudo, principalmente se exaustivo e inabitual, agrava os níveis de estresse oxidativo, quer nos músculos esqueléticos recrutados ou em diferentes órgãos e tecidos associados com a regulação da homeostasia orgânica. A grandeza deste processo está intimamente dependente da duração, intensidade e do tipo de exercício efetuado³⁰. O mecanismo responsável pelo aumento dos níveis de estresse oxidativo inclui principalmente a elevação do consumo de oxigênio (O_2) (Figura 1)³¹.

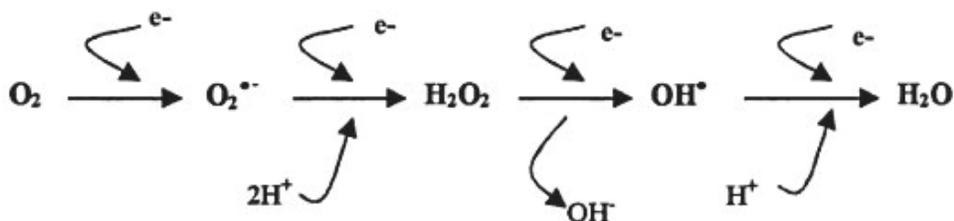


Figura 1 – Geração de ERO a partir da redução do oxigênio.

As ERO's são produzidas na membrana citoplasmática, no retículo endoplasmático, nos lisossomos, nas mitocôndrias, nos peroxissomos e no citosol. Sua produção é proporcional à quantidade de oxigênio consumida pelas mitocôndrias num determinado tempo e, por conseguinte, aumenta durante a atividade física³².

Apesar da atividade anaeróbia ser executada independente do aporte de oxigênio, a produção excessiva de ERO's tem sido observada durante o exercício. Neste, ocorre estresse metabólico com aumento da degradação de ATP, ativando o mecanismo xantina oxidase, com produção adicional de O₂³³.

O exercício físico inabitual e exaustivo induz mudanças estruturais, ultra-estruturais e bioquímicas de caráter focalizado e reversível. Estas alterações são características de uma patologia aguda denominada por miopatia do exercício³⁴.

Contudo, alguns autores sugerem que o principal efeito do estresse oxidativo se dá a longo prazo, na indução especialmente do "overreaching", que se trata do estado inicial da síndrome de "overtraining". O overreaching se caracteriza por um desbalanço metabólico, prejudicando principalmente a produção de ATP e a re-síntese de proteínas oxidadas, situação que, se mantida cronicamente, pode levar a síndrome de overtraining⁹.

3.2- Radicais Livres

Moléculas orgânicas e inorgânicas e átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados, com existência independente, podem ser classificados como radicais livres³⁵. Tal configuração faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, com meia-vida curta e quimicamente muito reativas (Figura 2). A presença dos radicais livres é crítica para a manutenção de muitas funções fisiológicas normais³⁶.

Radical superóxido (O₂)

É formado após a primeira redução do oxigênio e ocorre em quase todas as células aeróbicas, sendo produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos³⁷.

Radical hidroperoxila (HO₂)

Representa a forma protonada do radical superóxido, ou seja, possui o próton hidrogênio. Evidências indicam que o radical hidroperoxila é mais reativo que o superóxido, por sua maior facilidade em iniciar a destruição de membranas biológicas³⁸.

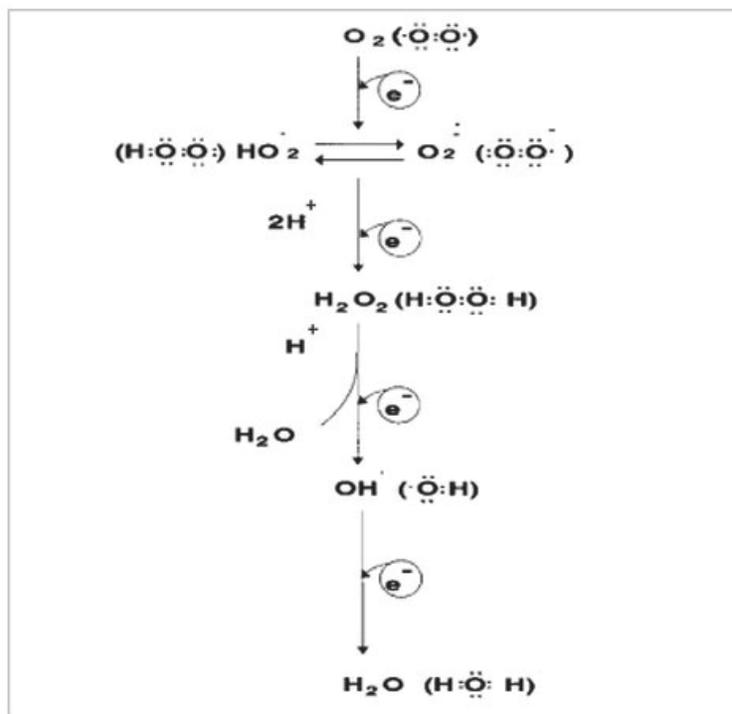


Figura 2 - Redução tetraivalente do oxigênio molecular na mitocôndria até a formação de água.

Fonte: Adaptado de Ferreira, (1997)²².

Radical hidroxila (OH)

É considerada a espécie reativa do metabolismo do oxigênio mais reativa do sistema biológico. A combinação rápida do OH com metais ou outros radicais no próprio sítio onde foi produzido confirma sua alta reatividade. Dessa forma, se a hidroxila for produzida próximo ao DNA e a este DNA estiver fixado um metal, poderão ocorrer modificações de bases purínicas e pirimidínicas, levando à inativação ou mutação do DNA. Além disso, a hidroxila pode inativar várias proteínas (enzimas e membrana celular), ao oxidar seus grupos sulfidrilas (-SH) a pontes dissulfeto (-SS). Também pode

iniciar a oxidação dos ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares (lipoperoxidação)³⁹.

Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Não é considerado um radical livre pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada. O H_2O_2 é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, pois participa da reação que produz o OH. O H_2O_2 tem vida longa, e é capaz de atravessar camadas lipídicas, reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao Fe^{++5} . Dessa forma é altamente tóxico para as células; esta toxicidade pode ser aumentada de dez para mil vezes quando em presença de ferro⁴⁰.

Oxigênio singlet (O_2)

É a forma excitada do oxigênio molecular. Não possui elétrons desemparelhados em sua última camada. O O_2 tem importância em certos eventos biológicos, mas poucas doenças foram relacionadas à sua presença³⁷.

Embora as espécies reativas de oxigênio possam ser mediadoras de doenças, sua formação nem sempre é deletéria, como na defesa contra a infecção, quando a bactéria estimula os neutrófilos a produzirem espécies reativas com a finalidade de destruir o microorganismo. Contudo, poderão ocorrer vários eventos nosológicos, se houver estímulo exagerado na produção dessas espécies, e se a ele estiver associada uma falha da defesa antioxidante^{41, 42}.

3.3- Radicais Livres e Exercício Físico

O organismo humano é dotado de uma incrível capacidade de se adaptar a variados estresses (internos e externos) aos quais é submetido, entretanto, se a exposição ao estímulo causador do estresse for frequente, o organismo sofre adaptações na tentativa de recuperar a dinâmica temporal dos sistemas orgânicos. Dessa forma, o exercício constitui um estresse e as correspondentes adaptações incluem: a melhora da função cardiovascular, as alterações da composição corporal e da pressão arterial, o aumento da tolerância à glicose e as alterações bioquímicas

celulares. A despeito do grande número de adaptações positivas que ocorrem como resultado da prática habitual de exercício físico, dados da literatura têm postulado que tal prática, em certos casos, pode gerar eventos danosos ao organismo, superando as adaptações positivas. Dentro desse contexto, a produção de radicais livres em excesso e potenciais danos celulares é um exemplo de efeito indesejável do exercício^{43, 44}.

Os radicais livres do oxigênio abarcam o radical superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila. A sua ativação pode causar processos traumáticos nos tecidos pelo desencadeamento de diversas cadeias de reações⁴⁵.

Já se sabe claramente que o exercício físico intenso e contínuo é acompanhado pela produção de radicais livres que causam alterações das membranas celulares, o que provoca uma lesão de fibras musculares, acompanhada por um processo inflamatório, conduzindo-o a uma redução da função muscular com a liberação de enzimas musculares, alterações histológicas evidentes e dor muscular⁴⁶.

Acredita-se em diferentes causas para explicar essas variações, o alto grau de estresse provocado pelo exercício, alterações da microcirculação, produção de metabólitos tóxicos, e depleção intramuscular dos substratos energéticos são alguns fatores investigados. O dano muscular inicial é seguido por alterações secundárias, entre as quais estão incluídos desequilíbrios eletrolíticos, desequilíbrios do metabolismo mineral, dos reguladores metabólicos (vitaminas) e uma resposta inflamatória celular⁴⁷.

Sabidamente as células dos organismos aeróbios são dotadas de mecanismos de defesa antioxidante, que possui a função de inibir ou atrasar a ação oxidativa dos radicais livres. A proteção do organismo dos efeitos deletérios da utilização do oxigênio no processo de respiração celular é feita através de um sistema antioxidante complexo, constituído de diversas enzimas e substâncias antioxidantes⁴⁸.

O principal sistema de defesa antioxidante é constituído por enzimas como: superóxidodismutase, catalase e glutathione peroxidase, para decomponem o ânion O_2^- , H_2O_2 e hidróxidos⁴⁹.

Espécies reativas de oxigênio são formadas durante o metabolismo normal por processos enzimáticos e não enzimáticos, e, continuamente, causam danos a lipídios, proteínas e ácidos nucleicos celulares³⁹.

Através da realização de exercícios regulares, diferentes componentes do sistema de defesa contra os radicais livres aumentam nos tecidos⁵⁰. Assim, a literatura demonstrou que o treinamento promove um aumento da atividade enzimática antioxidante muscular^{21, 45, 51}. Ainda não está bem elucidado qual é a duração e a intensidade ideais de exercício que conduzem à máxima estimulação dessas enzimas, o que se sabe é que o treinamento induz a produção das enzimas antioxidantes. Também, depois do exercício é observado um aumento plasmático de tocoferol, ácido úrico e ácido ascórbico, substâncias que possuem uma potencial atividade antioxidante⁵².

Portanto, o exercício físico é uma condição que exerce influência sobre o balanço entre o ataque oxidativo e mecanismos de defesa antioxidante, gerando durante o exercício físico, reações químicas que implicam na formação dos ERO's (Figura 3).

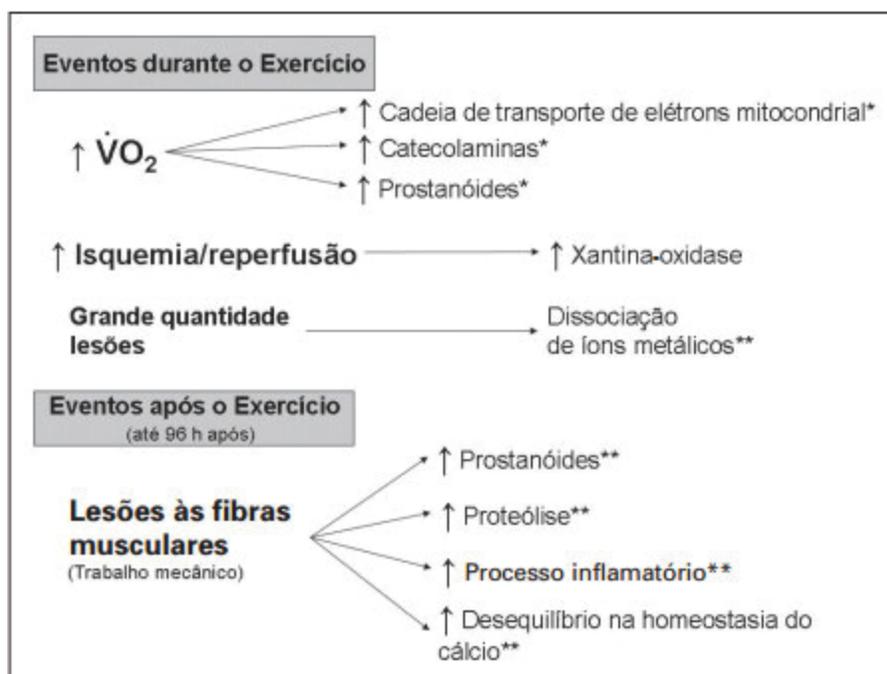


Figura 3– Mecanismos da síntese de ERO durante e após exercícios anaeróbios

Fonte: Adaptado de Cruzar, Rogero *et al.*, (2007)²¹.

3.4- Radicais Livres e Seus Efeitos

São exemplos de ERO's o ânion radical superóxido (O_2^-), o radical hidroxila (OH) e o radical peroxila (ROO). As espécies reativas do nitrogênio (ERN's) incluem os radicais peroxinitrito (ONOO), óxido nítrico (NO) e dióxido de nitrogênio (NO_2)⁵³.

Como foi dito anteriormente, os radicais livres são formados durante processos fisiológicos comuns, podendo as ERO's serem produzidas por leucócitos e também pelas mitocôndrias durante o processo respiratório, desempenhando papel de sinalizadores celulares. O desbalanceamento entre a produção de radicais livres e o sistema de defesa antioxidante pode conduzir a alguns estados patológicos^{54, 55}.

O alicerce do desenvolvimento de diversas doenças crônicas parece estar relacionado à quantidade de radicais livres presentes no organismo e os produtos subsequentes formados nas reações iniciadas por eles. Alterações nas membranas celulares podem levar a transtornos de permeabilidade, alterando o fluxo iônico e de substâncias, provocando dessa forma, a perda da seletividade para a entrada ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, alteração do DNA, e comprometimento dos componentes da matriz extracelular (proteoglicanos, colágeno e elastina)^{56, 57}.

3.5- Estresse oxidativo e suas implicações nas doenças

A lesão oxidativa à biomoléculas pelas ERO's e ERN's e demais radicais livres está relacionada com mecanismos patológicos e bioquímicos, implicados na origem ou no desenvolvimento de certas enfermidades crônicas não transmissíveis. Por conseguinte, há o aumentado risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (como arteriosclerose e infarto do miocárdio), de câncer, de envelhecimento precoce, de enfermidades oculares, dentre outras^{35, 58}.

Na tabela 1 encontram-se relacionadas as principais condições clínicas associadas ao estresse oxidativo.

Tabela 1 - Principais condições clínicas associadas ao estresse oxidativo.

Aterosclerose	Esclerose Múltipla
Câncer	Pancreatite
Disfunção Pulmonar	Doenças Inflamatórias Intestinais, Colite
Cataratas	Doença de Parkinson
Artrite e Doenças Inflamatórias	Oxidação Neonatal de Lipoproteínas
Diabetes	Reação à Drogas

Choque, Trauma e Isquemia	Lesões de Pele
Doença Renal e Hemodiálise	Envelhecimento
	AIDS

Fonte: Adaptado de Rebuglio Velloso, Chibinski Parabocz *et al.*,(2013) ⁵⁹.

Estudos epidemiológicos, clínicos, e de intervenção, demonstram cada vez mais, evidências de que os antioxidantes podem prevenir ou diminuir o desenvolvimento de muitas doenças^{38, 60, 61}.

3.6- Organismo e equilíbrio redox

Os efeitos deletérios causados pelo acúmulo de espécies reativas podem ser minimizados através da ação de compostos antioxidantes. Os compostos antioxidantes apresentam a capacidade de reagirem com os radicais livres e como resultado da reação, espécies estáveis e menos reativas são formadas, diminuindo os danos que podem suceder após o evento oxidativo. Além disso, os antioxidantes também podem participar de mecanismos diversificados como, por exemplo, na interação com os receptores celulares, na modulação de vias sinalizadoras, na ação sobre o ciclo celular, na expressão de genes supressores de tumor, na apoptose, na modulação da atividade das enzimas detoxificantes, dentre outros ^{62, 63}.

3.7- Antioxidantes

Um antioxidante é definido como uma substância que, em baixas concentrações, retarda ou previne a oxidação do substrato. Quando o mecanismo de ação do antioxidante se der através de sua reação com o radical livre, o novo radical formado deve ser estável e incapaz de propagar a reação ⁶⁴.

Os antioxidantes podem ser classificados como primários e secundários, de acordo com o mecanismo de combate aos radicais livres. Os antioxidantes primários atuam como doadores de prótons, impedindo o processo de iniciação desencadeado pelos radicais livres. Nesta classe de antioxidantes são encontrados os compostos fenólicos, tocoferol, aminoácidos, carotenóides e os antioxidantes sintéticos ⁶⁵. Já os antioxidantes secundários atuam no bloqueio da decomposição dos peróxidos e hidroperóxidos, convertendo-os na forma inativa por ação de agentes antioxidantes, bloqueando a reação em cadeia através da captura de intermediários reativos, como

os radicais peroxila e alcooxila. Nesta categoria encontram-se os antioxidantes sintéticos, os compostos fenólicos e as vitaminas A, C e E⁶⁶.

Outra classificação divide os antioxidantes em sintéticos e naturais. Os sintéticos são comumente usados na indústria alimentícia, para aumentar a vida de prateleira de alimentos lipídicos ou que contenham lipídeos em sua composição. São exemplos de antioxidantes sintéticos: obutilhidroxitolueno (BHT), o butilhidroxianisol (BHA), o propilgalato (PG) e oterciobutilhidroxinona (TBHQ). Já os antioxidantes naturais são aqueles formados pelo nosso organismo³.

Antioxidantes endógenos ou naturais

O organismo conta com um sistema endógeno de defesa contra os radicais livres, que é formado pelas enzimas catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase (GR), glutatona-s-transferase (GST) e superóxido dismutase (SOD)⁶⁷.

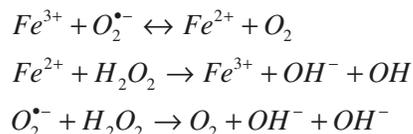
Essas enzimas atuam de forma coordenada entre si e a ação antioxidante no organismo depende do equilíbrio entre fatores que levam à sua ativação ou inativação. A defesa antioxidante endógena também é completada pela presença de compostos de baixo peso molecular (ácido úrico, bilirrubina, ubiquinona e albumina)⁶⁸.

Visando a proteção dos tecidos contra possíveis danos causados pelos ERO's, as enzimas antioxidantes como SOD, CAT, GPx, GST e GR, parecem responder de maneira adaptativa, elevando suas atividades nos tecidos e órgãos de indivíduos treinados, embora haja contradições^{69-71, 72}.

SOD

A superóxido dismutase (SOD) foi a primeira enzima antioxidante descoberta que metabolizava ERO's. (Figura 4)⁷³.

O termo superóxido dismutase tem sido usado para uma variedade de enzimas que catalisam a reação de dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular, $2O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$, e é considerada, juntamente com a catalase, como a primeira linha de defesa contra as ERO, influenciando a concentração de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , os dois substratos para a reação de Haber-Weiss²².



Em sistemas biológicos, o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) só pode ser formado na presença de oxigênio molecular (O_2), que é variável para os diferentes tipos de célula, pode-se esperar que o nível de SOD seja sensível ao grau de oxigenação. No entanto, não se sabe se o oxigênio molecular é o próprio indutor, ou se é o radical superóxido que serve de controle da função enzimática^{74, 75}.

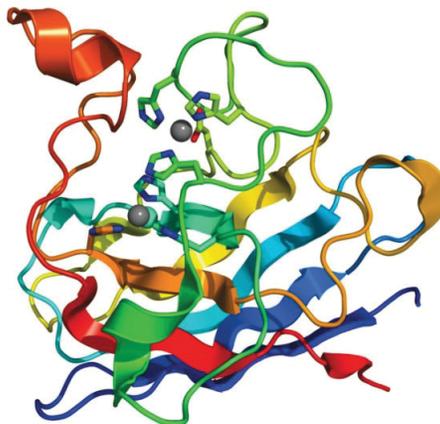


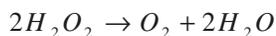
Figura 4 -Estrutura da superóxido dismutase-ferro de *Escherichia coli*.

Fonte: Salvador e Henriques, (2004)⁷⁶.

CAT

A catalase (CAT) é a segunda enzima que atua na desintoxicação celular (Figura 5). A CAT reduz o H_2O_2 em H_2O e O_2 . Tal enzima compartilha essa função com a glutationaperoxidase (GPx), embora a especificidade e afinidade com o substrato sejam diferentes⁴⁸.

A enzima catalase de vários organismos contém principalmente um grupo heme e sua localização subcelular, predominantemente nos mamíferos, é nos peroxissomos, onde catalisa a reação de dismutação do peróxido de hidrogênio, quando presente em altas concentrações, em água e oxigênio molecular⁷⁷.



Um papel antioxidante importante da catalase é diminuir o risco de formação do radical hidroxila pelo H_2O_2 via reação de Fenton catalisada por íons Cu e Fe ⁷⁷.



A catalase liga-se ao NADPH, o qual protege a enzima da inativação e aumenta sua eficiência ⁷⁸.

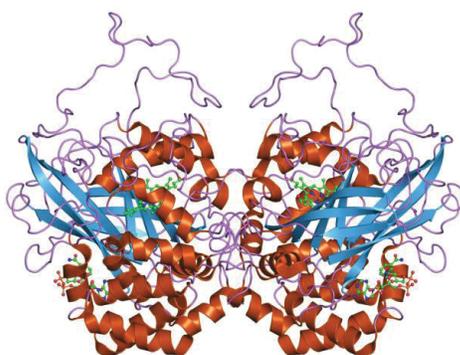


Figura 5 -Estrutura da catalase do eritrócito humano.

Fonte: Salvador e Henriques, (2004)⁷⁶.

GPx

A glutationaperoxidase (GPx) é uma enzima que catalisa a redução de H_2O_2 e hidroperóxidos orgânicos (ROOH) em H_2O e álcool respectivamente, usando a glutationa reduzida (GSH) como doadora de elétrons, que se transforma em glutationa oxidada (GSSG) (Figura 6) ⁷³.

Há pelo menos quatro isoformas da glutationa peroxidase em mamíferos, todas contendo selenocisteína ⁷⁹.

A glutathiona peroxidase presente no citosol e na mitocôndria tem um papel importante na decomposição do peróxido de hidrogênio e dos hidroperóxidos orgânicos utilizando o tripeptídeo glutathiona na sua forma reduzida (GSH) como substrato para as reações, resultando na forma oxidada da glutathiona (GSSG). Sua ação ocorre em conjunto com a glutathiona oxidase (GO), enzima que pertence à classe de sulfidril oxidase dependente de flavina, que catalisa a oxidação de proteínas e peptídios com a formação de dissulfetos e peróxido de hidrogênio^{80,81}.

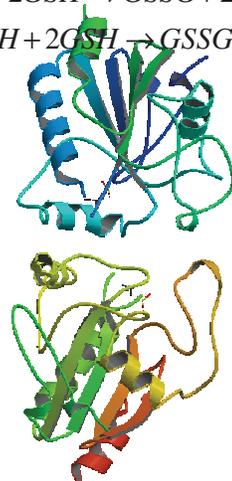


Figura 6 -Estrutura da glutathiona peroxidase do plasma humano.

Fonte: Salvador e Henriques⁷⁶.

GR

A glutathiona redutase é uma enzima auxiliar, contendo flavina envolvida na defesa antioxidante e tem como função reciclar a glutathiona, convertendo a forma oxidada deste composto (glutathiona dissulfeto, GSSG) em sua forma reduzida utilizando o poder redutor do NADPH, conforme a reação⁸⁰:



Essa enzima é considerada a principal redutora de GSSG dos mamíferos e age conjuntamente com a glutathiona peroxidase⁸². A recuperação da glutathiona em sua

forma reduzida é uma etapa essencial para manter o sistema de proteção celular perfeito em funcionamento⁸³.

GST

A glutiona-S-transferase (GST) é uma enzima essencial para a proteção aos danos de compostos potencialmente reativos, conjugando-os para posteriormente serem eliminados do organismo^{84, 85}.

A GST catalisa a conjugação da glutiona a uma gama de substratos hidrofóbicos eletrofílicos, durante a fase II da biotransformação (Figura 7). Diversas GST's foram caracterizadas em animais, associadas à metabolização de compostos xenobióticos e toxinas. Além de participarem em processos de desintoxicação por formação de conjugados com a glutiona reduzida (GSH), as GSTs possuem papel no metabolismo de produtos secundários, incluindo a estabilização de flavonóides, e atuam com a peroxidase na redução de hidroperóxidos a monohidróxi-álcool durante o estresse oxidativo⁸⁶. Estas enzimas são codificadas por uma família de genes, cada uma produzindo isoenzimas com ampla especificidade de substratos. Apesar de catalisarem reações similares, as GST's possuem pouca identidade de seqüência de aminoácidos, e estão presentes no citosol de muitas células catalisando a conjugação do tripeptídeo glutiona em uma variedade de compostos⁸⁷.

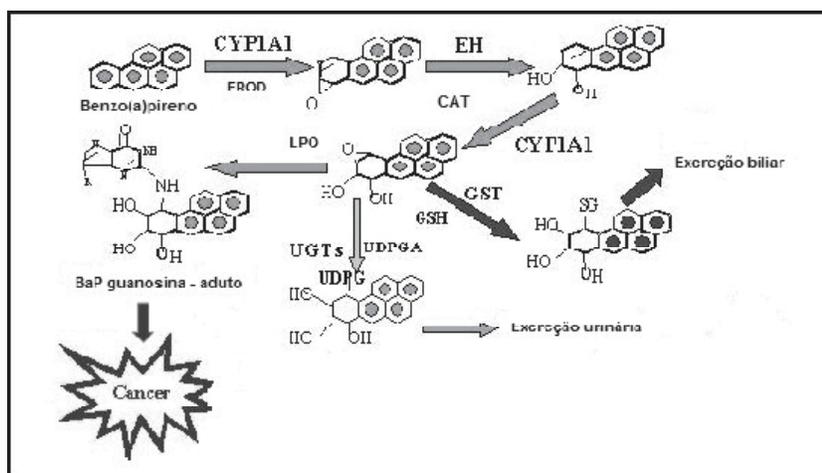


Figura 7. Esquema simplificado da biotransformação do benzo(a)pireno. **a)** Fase I: enzimas do citocromo P450, por exemplo, EROD iniciam processo de oxidação do xenobiótico. **b)** Durante o processo de biotransformação ocorre geração do íon superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que é dismutado gerando peróxido de hidrogênio (H_2O_2). **c)** A catalase (CAT) atua degradando o H_2O_2 formado. **d)** Fase II: reação enzimática, a qual se conjuga a glutatona utilizando, por exemplo a GST, para eliminação do organismo por excreção biliar, ou por excreção urinária, através de reação da substância a ser eliminada, com a uridilglucoronil transferase (UGT's). **e)** Em caso de deficiência do sistema antioxidante, pode ocorrer a peroxidação lipídica (LPO) com formação de hidroperóxidos. Como a substância formada é, normalmente, mais reativa que a original, como o benzo(a)pireno-7-8-diol9,10epóxido, pode ligar-se com o DNA e formar aduto (quebra) de DNA e desencadear o início do processo de formação do câncer.

Fonte: Adaptado de Lionel e Marta, (2003)⁸⁸.

3.7.1- Antioxidantes Alimentares

A hipótese de que a dieta afeta o dano oxidativo *in vivo* baseia-se no fato dos alimentos proporcionarem tanto substâncias antioxidantes, nutrientes ou não nutrientes, com capacidade para combater os radicais livres, como substratos oxidáveis (ácidos graxos poliinsaturados - PUFA) e traços de metais com ação catalítica (Fe_2^+ , Cu^+). Dessa forma, os alimentos podem exercer efeitos positivos e negativos no equilíbrio entre o dano oxidativo e a ação antioxidante⁸⁹.

Essa afirmação mostra-se muito simples diante da complexidade de funcionamento do organismo humano. Além do mais, existem algumas lacunas com relação aos antioxidantes, tais como: a inexistência de uma recomendação para cada antioxidante, a falta de padronização quanto ao real valor antioxidante dos alimentos, e os possíveis efeitos tóxicos da administração de elevadas doses de antioxidantes.

Na categoria dos antioxidantes alimentares encaixa-se os carotenóides e as vitaminas E e C, com reconhecida propriedade antioxidante entre os não nutrientes, citam-se os compostos polifenólicos⁹⁰.

Vitamina E

A vitamina E é um antioxidante lipofílico que pode reduzir radicais livres tais como os lipoperóxidos. Entretanto, altas doses de vitamina E são responsáveis pela

propagação da peroxidação lipídica, podendo inclusive diminuir a atividade das enzimas SOD e CAT⁷³.

Ocorre naturalmente em alimentos sob duas formas: a forma reduzida (geralmente designada como ácido ascórbico) e a forma oxidada (ácido desidroascórbico) (Figuras 8 e 9). Ambas são fisiologicamente ativas e podem ser encontradas nos tecidos orgânicos. Uma nova oxidação do ácido desidroascórbico para o ácido dicetogulônico produz uma inativação irreversível da vitamina⁹¹.

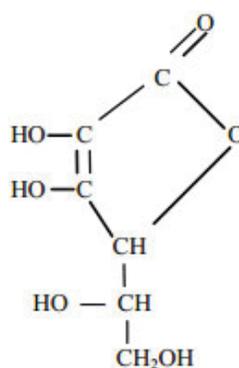


Figura 8 - Fórmula estrutural do ácido L-ascórbico.

Fonte: Bobbio e Bobbio, (2003)⁹².

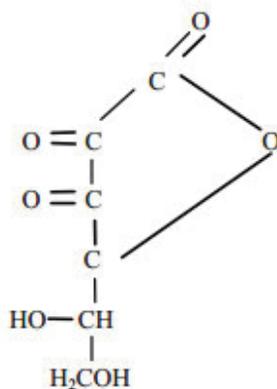


Figura 9 - Fórmula estrutural do ácido L-desidroascórbico.

Fonte: Bobbio e Bobbio, (2003)⁹².

A vitamina C é solúvel em água e desempenha um papel metabólico essencial *in vivo*. Está presente no compartimento citosólico da célula, servindo como um doador de elétrons para os radicais da vitamina E gerados na membrana celular durante o estresse oxidativo⁸. Essa vitamina é reconhecida como uma boa varredora de EROs, auxiliando na reciclagem da vitamina E *in vivo*. No entanto, na presença de metais de transição, como ferro e cobre, a vitamina C pode tornar-se um pró-oxidante, gerando EROs. Felizmente, como esses metais estão disponíveis em quantidades muito limitadas *in vivo*, as propriedades antioxidantes da vitamina C predominam sobre as oxidantes (Figura 10)⁹³.

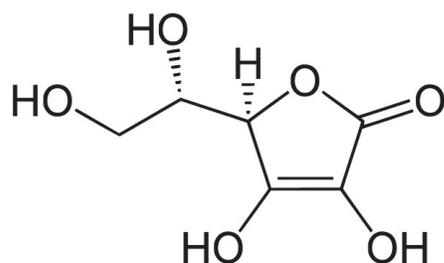


Figura 10 - Estrutura vitamina C.

Fonte: Rosa, Godoy *et al.*, (2007)⁹⁴.

Carotenóides

São pigmentos naturais que possuem um papel muito importante na fisiologia dos vegetais; conferindo-lhes cor e participando da fotossíntese, conjuntamente com a clorofila. Muitos dos carotenóides presentes nos vegetais apresentam atividade de pró-vitamina A e atividade antioxidante⁹⁵.

Podem capturar de forma eficiente radicais de oxigênio singlet e radicais peróxila⁹⁶.

3.8- Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos de plantas enquadram-se em diversas categorias como: fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas⁹⁷.

A estrutura básica de um flavonóide pode ser observada na Figura 11.

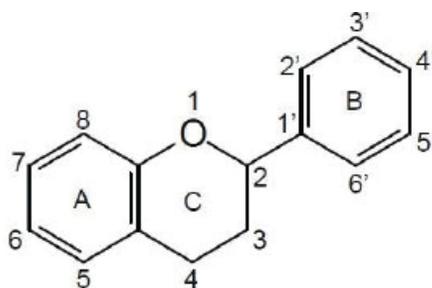


Figura 11 - Estrutura química geral de um flavonóide: dois anéis aromáticos (A e B) e um anel intermediário (C).

Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e alipooxigenase *in vitro*⁹⁸.

A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química (Figura 12). Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias⁹⁷.

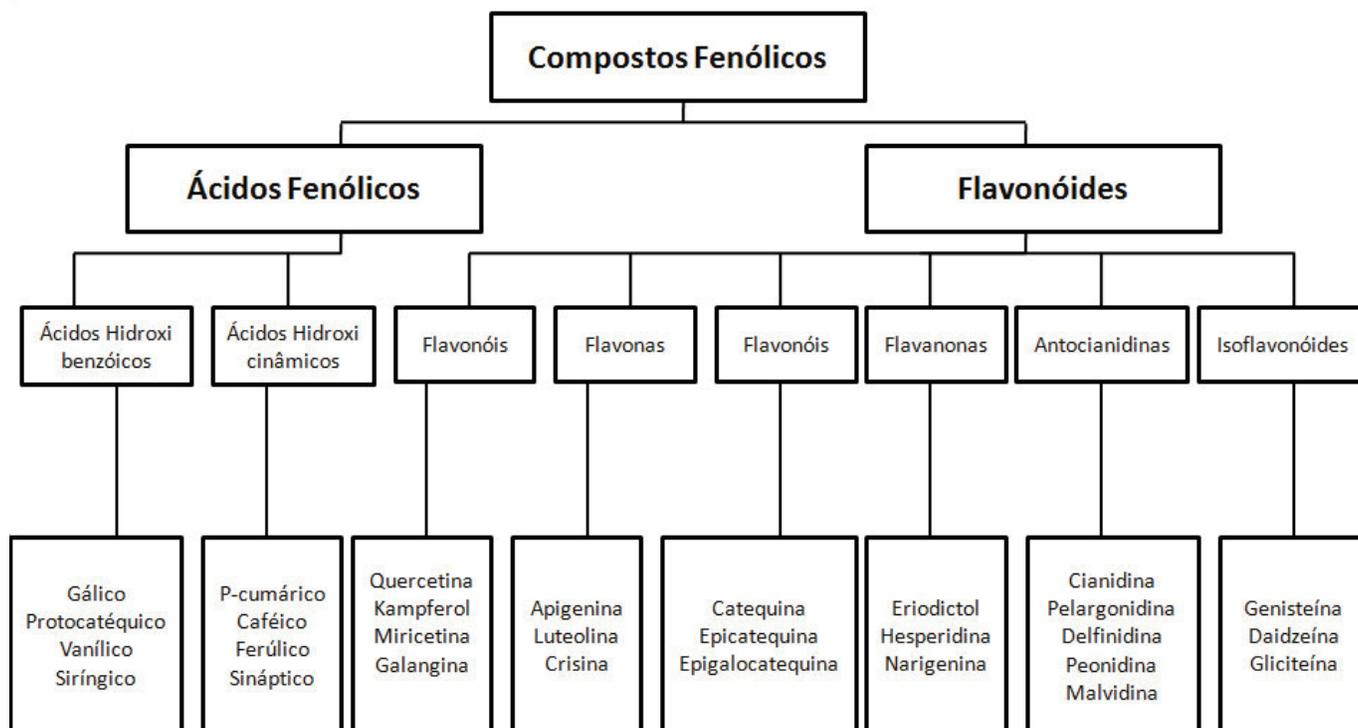


Figura 12 - Compostos fitoquímicos presentes em alimentos vegetais.

Fonte: Adaptada de Lima, (2008) ⁹⁹.

Na indústria alimentícia, a oxidação lipídica é inibida por sequestradores de radicais livres. Os compostos mais utilizados com esta finalidade são: o butil-hidroxi-anisol, butil-hidroxi-tolueno, terc-butil-hidroxi-quinona, tri-hidroxi-butil-fenona e galato de propila, conforme citados no item 3.7. Alguns estudos demonstraram a possibilidade destes antioxidantes apresentarem alguns efeitos tóxicos⁹⁷. Em função dos possíveis problemas provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, as pesquisas do ramo focam-se na tentativa de encontrar substitutos naturais com atividade antioxidante⁹⁷.

Os não flavonóides são compostos benzóicos e cinâmicos, chamados comumente de ácidos fenólicos, estes contêm um anel aromático com pelo menos um grupo hidroxila e com diferentes grupos funcionais (aldeídos, alcoóis ou ácidos) que podem formar ésteres com os ácidos orgânicos, ou unir-se a açúcares. Outros compostos de natureza fenólica são os estilbenos e lignanos, e de forma polimerizada os taninos e ligninas ¹⁰⁰.

Abaixo, nas Tabelas 2 e 3, é apresentada as funções e localização celular dos principais antioxidantes.

Tabela 2 - Propriedades e localização dos principais antioxidantes enzimáticos. Adaptada de Powers e Lennon *et al.*, (1999) ¹⁰.

Antioxidantes		
Enzimáticos	Localização Celular	Propriedades
Mn-SOD	Mitocôndria	Dismutação dos radicais superóxidos
Cu, Zn-SOD	Citosol	Dismutação dos radicais superóxidos
GSH peroxidase	Citosol e Mitocôndria	Remoção do H ₂ O ₂ e hidroperóxidos orgânicos
Catalase	Citosol e Mitocôndria	Remoção do H ₂ O ₂

Tabela 3 - Propriedades e localização dos principais antioxidantes não enzimáticos. Adaptada de Powers e Lennon *et al.*, (1999) ¹⁰.

Antioxidantes		
Não-enzimáticos	Localização Celular	Propriedades
Vitamina E	Membranas Celulares	Antioxidante mais atenuante contra a peroxidação lipídica
Vitamina C	Citosol	Elimina uma longa variedade de EROs da fase aquosa
GSH	Citosol e Mitocôndria	Remoção do H ₂ O ₂

Não existe uma recomendação para o consumo de compostos fenólicos, e há entraves para estimar o consumo, haja vista a ausência de tabelas em que constem dados da composição fenólica dos alimentos. Inexiste também uma uniformidade de metodologia para identificação e quantificação da atividade antioxidante desses compostos. Estima-se, entretanto, que o consumo mundial varie de 150 a 1000 mg/dia¹⁰¹.

3.8.1- Compostos Fenólicos e seus Efeitos

Dados da literatura mostram evidências que o consumo de compostos fenólicos traz benefícios ao organismo, e este fato estaria associado ao seu poder antioxidante. Podemos citar a ação dos fenólicos presentes no vinho tinto, que são capazes de inibir a oxidação da LDL *in vitro*. Este fato sustenta a explicação para o paradoxo francês, apesar do alto consumo de lípidos, a população estudada apresenta boa equalização

dos valores relativos às lipoproteínas, o que foi relacionado ao elevado teor de flavonóides provenientes da dieta¹⁰². Também o estudo epidemiológico intitulado “Zupthen” realizado na Holanda, mostrou a correlação inversa entre a incidência de risco de doença coronariana e o consumo diário de flavonóides¹⁰³. Os compostos fenólicos da dieta poderiam inibir a carcinogênese, afetando os eventos moleculares em todos os estágios do processo, resultando em uma redução potencial do risco de câncer de forma possivelmente mais efetiva do que quando aplicado topicamente ou injetado³⁸.

Devido a sua propriedade antioxidante os compostos fenólicos podem inativar as espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, que desempenham papel importante na carcinogênese. Outra forma de prevenção do processo carcinogênico se dá pela estimulação da excreção de substâncias xenobióticas e seus intermediários estranhos ao organismo, e por isso potencialmente carcinogênicas. Os fenólicos poderiam também ter um papel nos estágios mais avançados do desenvolvimento do câncer, se o dano foi causado e os mecanismos ativos de reparo do DNA falharem, a célula iniciada pode ser morta por apoptose. Tais compostos têm sido relatados como estimulantes da apoptose^{104, 105}.

Jardini, (2011) pôde observar em seu estudo uma redução na produção de espécies reativas intracelulares e efeitos sobre a proliferação e a viabilidade em 3 linhagens de células (Caco-2, HeLa e MDCK) quando tratadas com extrato aquoso da polpa de romã e também com a fração da polpa¹⁰⁶.

Estudos com frutas do cerrado englobando araticum, lobeira, cagaita, pequi e banha de galinha, mostraram altíssimos conteúdos de compostos fenólicos, dotados de alta capacidade em sequestrar radicais livres do meio^{107, 108}.

Embora tenham sido realizados diversos estudos comprobatórios da atividade antioxidante dos ácidos fenólicos *in vitro*, pouco se sabe a respeito do comportamento destas substâncias *in vivo*. Há poucas evidências que levam a crer na ação destas substâncias no sistema biológico de forma similar à vitamina C no processo de regeneração do α -tocoferol¹⁰⁹.

3.9- Métodos de Avaliação da Capacidade Antioxidante

Tendo em vista uma rápida avaliação da capacidade e eficácia antioxidante de compostos químicos ou extratos vegetais, bem como o estudo dos mecanismos de ação antioxidante, estão descritos na literatura diversos trabalhos^{38, 110-112}. Na maioria dos casos, correspondem a testes de estabilidade acelerados, em que se determina a extensão da oxidação de um lipídio usado como substrato¹¹³. A atividade antioxidante varia de acordo com o tipo de composto e sua concentração¹¹³.

A determinação da atividade antioxidante dos alimentos, além de prever o potencial antioxidante antes de ser ingerido, é essencial para avaliar a proteção contra a oxidação e a deterioração do mesmo, reações que podem levar à diminuição da sua qualidade e do seu valor nutricional¹¹⁴.

Os métodos que determinam a atividade antioxidante de alimentos são classificados em dois grupos, o primeiro se baseia na captura de radicais livres, e o segundo, na determinação da oxidação de uma molécula alvo¹¹³.

3.9.1- Determinação da oxidação de moléculas

A oxidação das proteínas pelos radicais livres leva à formação de grupos carbonila, que podem ser detectados pela reação com o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DPPH) ou por técnicas de ELISA⁹⁹.

As técnicas de determinação *in vitro* da oxidação lipídica têm sido muito estudadas. Os substratos lipídicos são diversos: o ácido linoléico, os ésteres metílicos dos ácidos graxos e a LDL, outro substrato muito empregado são os lipossomos. A oxidação pode ser iniciada pela adição de íons metálicos (Cu^+ , Fe_2^+), de AAPH [2,2-azobis(aminopropano)diidroclorido], de peróxido de hidrogênio, ou ainda pela aplicação de calor¹¹⁵.

A oxidação dos ácidos graxos insaturados leva à sua quebra, com consequente formação, dentre outros compostos, do malonaldeído (MDA), que pode ser determinado pelo método TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico), no qual se faz reagir o MDA com o ácido tiobarbitúrico para formar um pigmento rosado, que apresenta um máximo de absorção a 532-535 nm¹¹⁶.

3.9.2- Determinação da captura de radicais livres

Nos últimos anos, desenvolveu-se a técnica analítica de espectrometria de ressonância de spin de elétrons (ESR). A vida média dessas espécies é muito baixa (entre 10⁻⁹ e alguns segundos), dessa forma não se consegue realizar a medida de forma direta, que é feita acoplado o radical livre a um composto nitroso capaz de, com ele, formar um aduto¹¹⁵. O aduto é um complexo estável e pode ser detectado por ESR. Esse método ainda é pouco utilizado, em face do alto custo de instrumentação¹¹⁵.

3.9.3- Método do radical ABTS⁺

Consiste na produção do radical ABTS⁺ a partir do ácido 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfônico, que é seu precursor. Ele pode ser utilizado tanto para amostras hidrossolúveis quanto lipossolúveis, tornando-o um teste vantajoso e sendo empregado na análise de compostos extraídos de alimentos, e também em amostras biológicas (Figura 13)^{117, 118}.

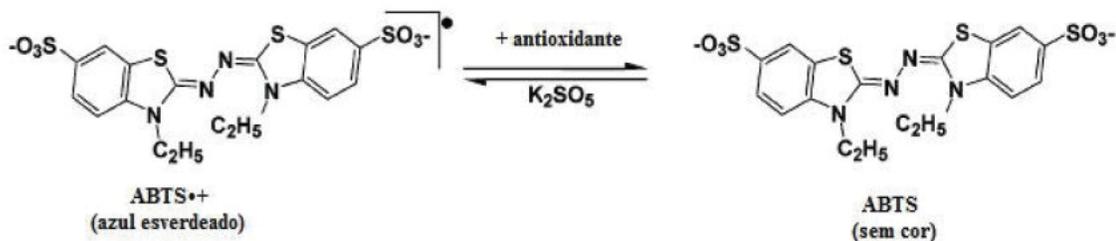


Figura 13 - Redução do ABTS por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.

Fonte: Huang, Ou *et al.*, (2005)¹¹⁹.

3.9.4- Método ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio)

O método ORAC (capacidade de absorção de radicais de oxigênio) foi desenvolvido por Cao, Alessio e Culter, (1993)¹²⁰ e utiliza como molécula alvo dos radicais livres de oxigênio as ficobiliproteínas β -ficoeritrinas ou ficoeritrina, que são altamente fluorescentes e contêm um pigmento vermelho fotoreceptor.

O fundamento do método consiste na medida do decréscimo da fluorescência das proteínas, como consequência da perda de sua conformidade ao sofrer um dano oxidativo. O AAPH é responsável pela geração do radical livre utilizado, a peroxila. O antioxidante padrão utilizado é o Trolox, um análogo hidrossolúvel da vitamina E¹²¹.

3.10- Biodisponibilidade dos Compostos Fenólicos

Biodisponibilidade é definido como “a fração de um composto, presente numa dose ingerida, que alcança a circulação sistêmica”¹²². Esta definição abarca os conceitos de absorção, metabolização, distribuição (tecidual e bioatividade) e de eliminação¹²³. Tal fração é obtida pela mensuração das concentrações no plasma e na urina dos compostos fenólicos puros ou provenientes de alimentos com composição fenólica conhecida. A estrutura química é um fator determinante da proporção e extensão da absorção e da natureza dos metabólitos circulantes no plasma¹²⁴.

No momento da ingestão não ocorre uma digestão prévia (as saliva não tem o poder de realizar essa ação sobre os compostos fenólicos). Alguns compostos, como oligômeros de proantocianidinas podem ser quebrados em moléculas menores (monômeros e dímeros de epicatequina) por ação do suco gástrico¹²⁵.

Absorção

A absorção é dependente do quão disponível o composto encontra-se para a liberação da matriz e ser absorvido no intestino delgado pelos enterócitos¹²⁶.

Nas células intestinais ocorrem duas importantes ações: a deglicosilação dos compostos ligados (pelas enzimas glicosidases presentes a mucosa intestinal) e a glicuronização do composto fenólico na forma livre a uma molécula de albumina, ação que influencia na sua capacidade de difusão através das membranas biológicas⁶².

Metabolização

Após a absorção, o composto é transportado para o fígado, onde ainda pode ocorrer a adição de um grupo sulfato ou metila, ou mesmo de ambos, por ação das enzimas catecol-o-metiltransferase e sulfotransferases, enzimas de fase I e II ou da UDP-glicuroniltransferase. Esta etapa tem a função de diminuir a toxicidade do composto e aumentar seu tempo de circulação pelo organismo antes da sua eliminação¹²⁷.

Os ácidos fenólicos são amplamente conjugados a sulfatos e glicuronatos. De acordo com a sua estrutura ocorre uma o-metilação e glicuronização¹²⁸.

O conhecimento da metabolização dos compostos fenólicos ainda não é dominado por completo. A presença do composto na corrente sanguínea, tal qual na forma ingerida, é muito baixa e os testes que permitem a sua mensuração no sangue ainda não são capazes de detectar com precisão os compostos em todas as formas metabolizadas. Este fator prejudica a avaliação do potencial do composto na ação antioxidante *in vivo* ¹²⁹.

Eliminação

A estrutura/tamanho da molécula possui influência na sua eliminação ¹³⁰.

Os compostos fenólicos com elevados pesos moleculares e alto grau de polimerização não sofrem ação enzimática no trato gastrointestinal e não são absorvidos no intestino delgado, passando ao cólon, onde são hidrolisados ou degradados pelas enzimas da microflora colônica a ácidos fenólicos mais simples. A eliminação dos compostos de menor peso molecular é realizada pela urina ou pela bile, via pela qual os compostos ainda podem chegar ao duodeno e sofrer ação das enzimas bacterianas (especialmente da β -glicuronidase) e serem reabsorvidos. Por fim, os compostos fenólicos resistentes à degradação pela microflora colônica (como os taninos insolúveis) são excretados nas fezes ¹³¹.

3.11- A Romã

Aromã, *Punica granatum*, ou popularmente denominada de romãzeira, pertencente à família Punicaceae, e consiste de uma árvore de pequeno porte caracterizada por um arbusto ramoso ou arvoreta de até 3 m de altura, com folhas simples, cartáceas, dispostas em grupos de 2 ou 3, e com 4-8 cm de comprimento. A romãzeira também possui flores constituídas de corola vermelho-alaranjada e um cálice esverdeado, duro e coriáceo. Os frutos, do tipo baga, globóides, medem até 12 cm, com numerosas sementes envolvidas por um arilo róseo, cheio de um líquido adocicado. A composição dos frutos é de aproximadamente 3% de sementes, 30% de polpa e 67% de casca (incluindo a rede de membranas internas) (Figura 14) ¹³².

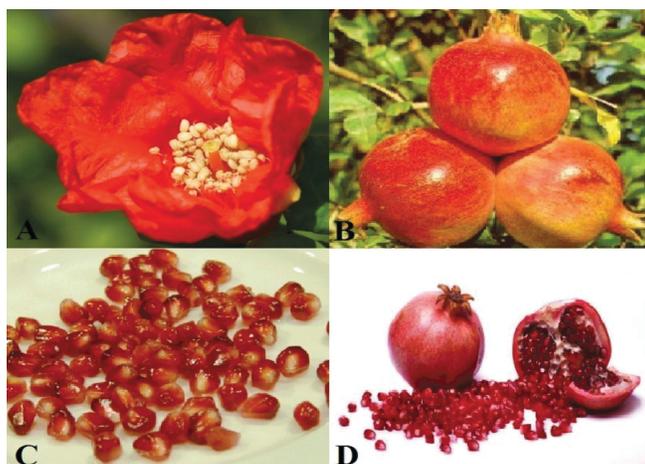


Figura 14 - Flor de romãzeira (A), a romã (B), sementes de romã (C), fruto aberto e fechado com as sementes e albedo à mostra (D).

Em relação à produção mundial os dados são escassos. O Irã, país situado na região de origem da fruta, contabilizou uma produção em 2004 de 570 toneladas da fruta, segundo o Departamento de Agricultura da Geórgia. O estado da Califórnia produziu 17 mil toneladas no mesmo ano¹³³. Segundo dados do CEAGESP da cidade de São Paulo, no Brasil foram comercializadas 165 toneladas da fruta em 2001, 232 toneladas em 2002, 219 toneladas no ano de 2003 e 187 toneladas em 2004. A fruta apresenta franca expansão na região semi-árida do país¹³⁴.

Tal fruta é conhecida desde os tempos mais remotos. *Punica granatum*, L., em latim, provém de *malus punica* (maçã de Cartago), e *granatum*, que significa "com muitos grãos". Sua origem é da região da Ásia Ocidental, de onde se espalhou para a região do Mediterrâneo, África e, posteriormente, para a América. A romãzeira cresce em regiões áridas, sua safra dá-se entre os meses de setembro a fevereiro. A fruta pode ser consumida tanto nas formas *in natura* quanto de produtos derivados processados como bebidas, doces e outros¹³⁵.

São encontrados cultivares de romã na China, Índia, Paquistão, sudoeste da América do Norte, Califórnia e México, mas também é cultivada como planta ornamental e medicinal em jardins e pomares, em praticamente todo o mundo¹³⁵.

Ela está associada à simbologia de vida, longevidade, saúde, feminilidade, fecundidade, conhecimento, imortalidade e espiritualidade, e o fruto apresenta conhecimento reconhecido por diversas propriedades terapêuticas (Figura 15). Na

Índia, a romã é usada no tratamento do diabetes *mellitus*, já no Brasil, em especial no Nordeste, a casca da romã é utilizada no tratamento de inflamações bucais e da garganta, e como vermífugo¹¹.

Além dos símbolos conferidos citados acima, no império romano a romã era tida como um símbolo de riqueza. Há algumas tradições e rituais ligadas à fruta em culturas judaicas, cristãs, budistas e outras (Figura 16 e 17)¹³⁶.

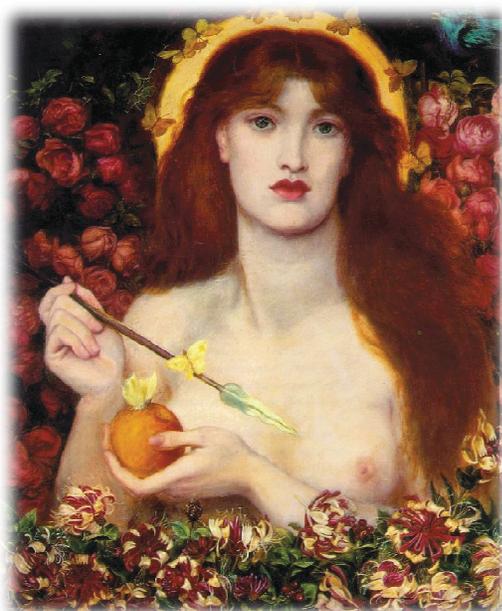


Figura 16 - Dante Gabriel Rossetti. *Vênus Verticórdia*, 1864-68.

Não se sabe ao certo a partir de que data a romã teve início no uso medicinal, porém, um texto cabalístico, intitulado *The Book of the Pomegranate* (O livro da Romã), equipara esta fruta ao aspecto feminino da Criação¹³⁷.



Figura 17–Sandro Botticelli. *A Madona da Romã*, 1487.

A romã apresenta diversos compostos bioativos, dentre os quais podemos citar: antocianinas, taninos (punicalagina), compostos fenólicos como delfinidina, cianidina e pelargonidina, quercetina, ácidos fenólicos (cafeico, catequínico, clorogênico, cumárico, elágico, gálico e quínico), compostos antioxidantes que apresentam na sua estrutura química deficiência de elétrons, captando facilmente os radicais livres¹³⁶.

As antocianinas estão presentes na romã em grande quantidade, o que confere à fruta uma coloração rosa característica. Das antocianinas encontradas, os glicósidos da cianidina e delfinidina estão presentes na mucilagem, e a pelargonidina é encontrada somente na casca da fruta. Também compõe o suco da fruta, grande quantidade dos ácidos galáico e elágico. Além das antocianinas a romã é rica em: ácido elágico, isômeros de punicalagina, diferentes flavonoides (catequinas e epicatequinas; galocatequinas e epigalocatequinas), ácido málico e ácido cítrico, assim como ácido oxálico, succínico e fumárico em menores teores¹³⁸.

Certos compostos bioativos da romã, como os isômeros de punicalagina, potente antioxidante, quando são metabolizados estão associados ao aumento de ácido elágico. O ácido elágico é metabolizado pela microflora humana e contribui para benefícios à saúde como composto antioxidante, além de apresentarem biodisponibilidade e natureza não tóxica quando consumidos como alimentos

processados, a exemplo de suco de romã. A punicalagina se destaca como uma promissora molécula multifuncional¹³⁹.

A casca de romã é rica em compostos fenólicos e as diferenças na sua atividade antioxidante em relação a outras partes da fruta podem ser devidas à distinta composição fenólica destas. Ácidos gálico, terc-gálico e elágico, já foram identificados em suco de romã e ácidos hidroxicinâmicos, catequinas e picatequinas, proantocianidinas e antocianidinas, quercetina, kaempferol, luteolina, naringina, pulicalina e punicalagina, em suco e casca de romã. Todos esses compostos possuem atividade antioxidante comprovada¹⁴⁰.

Diversos estudos *in vivo* comprovam a atividade antioxidante da romã e seus benefícios à saúde, incluindo: proteção da mucosa gástrica de ratos alterada por etanol e aspirina^{141, 142}; proteção do cérebro de ratos neonatais expostos a hipóxia¹⁴³; prevenção do tecido erétil de coelhos machos com disfunções¹⁴⁴; ações da glutathione reduzida, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase e glutathione-S-transferase¹⁴⁵; efeitos cardiovasculares do suco em homens, incluindo a redução de LDL e colesterol total¹⁴⁶; melhora da hipertensão sistólica¹⁴⁷, e redução da estenose da artéria carótida¹⁴⁸. É de saber que esta fruta também apresenta propriedades farmacológicas expressas como atividade anti-inflamatória e hepatoprotetora, por se tratar de uma fruta com atividade antioxidante elevada¹³⁹.

No ano de 1998 foi publicado o primeiro estudo de atividade antioxidante da romã *in vitro*, o mesmo Jornal agora cita 878 novos artigos científicos relacionados aos efeitos da romã na saúde. Novos trabalhos têm explorado as ações antioxidantes e a capacidade, da fruta e seus derivados, em combater bactérias e vírus. Muitas outras doenças impulsionaram estudos em que a ação antioxidante da romã constituiu o fio condutor dos efeitos benéficos observados. O entusiasmo da ação positiva ao organismo, pode ser parcialmente justificada pelos ensaios *in vivo* respeito da impotência, da proteção neurológica, na terapêutica do câncer, e seu efeito anti-aterogênico potencial¹¹.

À vista disso, observa-se nos últimos sete anos mais de dez vezes o número de publicações indexadas na Medline sobre a romã do que em todos os anos anteriores a eles, as ações farmacológicas dos componentes da *Punica granatum* sugerem uma

vasta gama de aplicações clínicas para o tratamento e prevenção de doenças em que se acredita que a inflamação crônica desempenhem um papel etiológico fundamental¹¹.

Atualmente muitos trabalhos científicos são feitos estudando as propriedades medicinais da romãzeira, entretanto, há ainda poucos estudos etnobotânicos, de farmacognosia e toxicológicos suficientes para elucidar os mecanismos de ação e efeitos dos constituintes químicos derivados da romã¹⁴⁹.

4- OBJETIVOS

O objetivo geral desta pesquisa foi avaliar o efeito da suplementação com o extrato etanólico de polpa da Romã (*Punica granatum*L.) na resposta antioxidante em ratos submetidos a exercício físico até a exaustão.

Os objetivos específicos foram:

- Quantificar o conteúdo de compostos redutores totais do extrato;
- Avaliar o potencial de inibição da oxidação destes compostos redutores utilizando dois diferentes sistemas *in vitro*: o teste do ABTS e o teste de capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC);
- Avaliar a ação antioxidante de duas doses do extrato na resposta antioxidante em animais submetidos à natação exaustiva;
- Avaliar a correlação dos marcadores de estresse oxidativo com a atividade antioxidante *in vitro* investigada.

5- MATERIAL E MÉTODO

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Alimentos Funcionais da Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA) do Departamento Nutrição da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e no Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas da Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo (USP) no período de Maio à Novembro de 2013.

5.1 – Aprovação do Comitê de Ética

Todos os procedimentos desse estudo foram submetidos ao Comitê de Ética na Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas, protocolado sob o número 2869-1 e conduzido em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, (2009)¹⁵⁰ (Anexo 01).

5.2 - Tipo de Delineamento

Este trabalho foi do tipo ensaio controlado e randomizado, por se tratar de um estudo em que a amostra sadia foi distribuída aleatoriamente para os grupos controle e de intervenção, descritos posteriormente ¹⁵¹.

5.3- Avaliação da Atividade antioxidante *in vitro* da polpa da romã

5.3.1– Amostra

Frutas

As frutas consideradas “comerciais” foram adquiridas no mês de Abril de 2013, na Central de Abastecimento de Campinas (CEASA) da cidade de Campinas, provenientes de um sítio próximo à cidade de Mirandópolis(Figura 18). O agricultor afirma plantar a fruta visando a comercialização, no sítio existem 8 romãzeiros. Já as romãs consideradas “de cultivo doméstico” foram doadas por um morador da cidade de Monte Verde-MG no mês de Maio do mesmo ano, o mesmo cultivava apenas um romãzeiro no pomar de sua casa.

Os frutos usados na suplementação dos animais foram os comerciais, e os de cultivo doméstico foram empregados na pesquisa apenas na avaliação da capacidade antioxidante para comparação entre os cultivos (doméstico e comercial).



Figura 18 - Frutos provenientes do CEASA.

Fonte: Dos autores, 2013.

Após a aquisição dos frutos, eles foram transportados em caixas isotérmicas para o Laboratório da UNICAMP do Departamento de Nutrição, Campus de Limeira-SP.

As romãs passaram por um processo de seleção manual e visual, com o objetivo de eliminar frutas estragadas e com estágio de maturação diferente do desejado(Figura 19).

As frutas selecionadas foram higienizadas mediante lavagem das mesmas em água potável corrente, e abertas à temperatura ambiente ($\pm 23^{\circ}\text{C}$), com a ajuda de facas, retirando-se a parte interna (polpa e semente) que foi colocada sobre uma peneira plástica, posicionada sobre um béquer de 500mL envolto em papel alumínio, protegendo-o da luz. O material foi friccionado contra a peneira com a ajuda de um pistilo, separando a polpa das sementes. A polpa foi congelada para posterior liofilização.



Figura 19 - Parte interna da fruta.

Fonte: Dos autores, 2013.

Liofilização

O processo de liofilização foi realizado em liofilizador sob pressão variável, na faixa de 200bar a uma temperatura de 60°C (liofilizador Edwards, modelo EC- Super Modulyo (Crawley- UK)) com duração média de 24 horas.

A polpa liofilizada foi acondicionada em congelador à temperatura de -18 °C em sacos de polietileno com revestimento de folha de alumínio visando à proteção da luz.

5.3.2-Preparação do extrato etanólico da polpa da romã

O extrato etanólico da polpa de romã comercial e doméstica foi preparado em tubos *falcon*, a partir de 3 gramas de cada PRL (polpa da romã liofilizada), com a adição de 30 mL de etanol (80%) nos respectivos tubos (um tubo para cada tipo de cultivo). A extração foi feita em banho de ultrassom a 39°C por 15 minutos. Em seguida, os extratos foram centrifugados (TDL80-2B, Centribio®) a 5000 rpm, durante 10 minutos à 4°C e posteriormente filtrados ao abrigo da luz para a obtenção do extrato alcoólico (Figura 20).

Em todos os métodos de avaliação da atividade antioxidante foi primeiro calculado o valor da atividade do extrato etanólico, e então corrigido o valor pelo fator

da extração (extrato foi feito com 1 g de polpa liofilizada em 30 ml de etanol 80%), e pelo fator da diluição do extrato utilizado nas análises.



Figura 20 - Obtenção do extrato alcoólico.

Fonte: Dos autores, 2013.

5.3.3- Quantificação dos fenólicos totais

Foi realizada a análise do teor de compostos fenólicos totais da polpa liofilizada, do cultivo doméstico e do cultivo comercial, pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton, Orthofer *et al.*, (1999)¹⁵². O reagente de Folin-Ciocalteu é uma solução complexa de íons poliméricos formados a partir de heteropoliácidos fosfomolibdicos e fosfotungsticos. Esse reagente oxida os fenolatos, reduzindo os ácidos a um complexo azul¹⁵³.

Os extratos obtidos foram diluídos na proporção de 1:50 e uma alíquota de 20 μL da amostra foi transferida para a microplaca e adicionado 100 μL da solução Folin-Ciocalteu diluído em água destilada na proporção de 1:10. A mistura permaneceu em repouso durante 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 75 μL da solução carbonato de sódio 4% e os tubos deixados em repouso por 2 horas, ao abrigo da luz. A

absorbância foi medida em espectrofotômetro (Spectronic® 20 Genesys TM (Rochester, USA)), a 740 nm. Uma amostra em branco foi conduzida nas mesmas condições. O ácido gálico foi utilizado como padrão nas concentrações de 20, 40, 60, 80, 100 e 120 ug/L para construir uma curva de calibração (Figura 21). A partir da reta obtida, foi realizado o cálculo do teor de fenólicos totais do extrato e convertido o valor para gramas de polpa liofilizada, os resultados foram expressos em equivalente de ácido gálico (mg AG/g polpa liofilizada).

Cuva Padrão

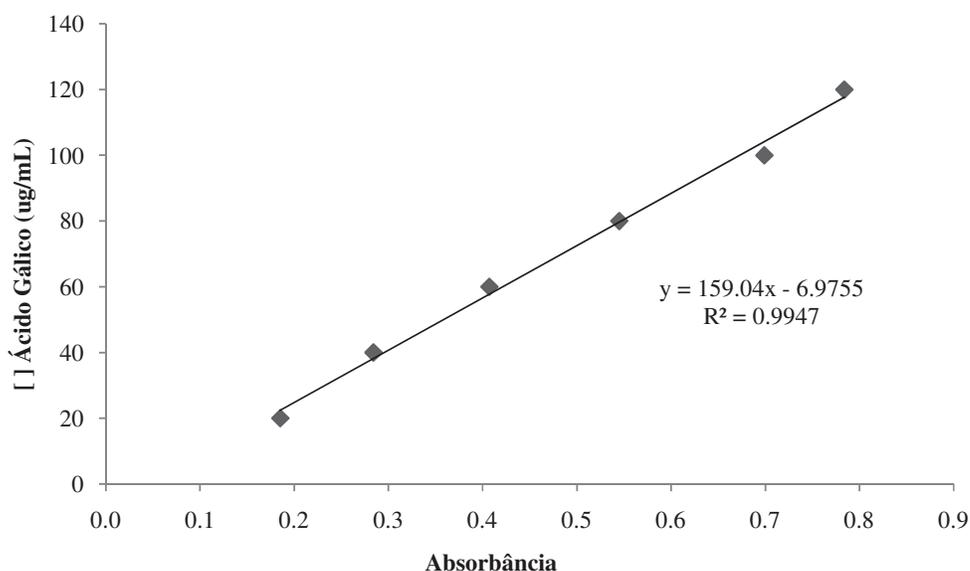


Figura 21 - Curva de calibração do ácido gálico para o cálculo do teor de compostos fenólicos totais.

5.3.4- Determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS⁺

Dentre os métodos químicos utilizados para se determinar a atividade antioxidante pelo sequestro de radicais livres, o método ABTS⁺ [2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] é um dos mais rápidos e que oferece resultados reprodutíveis, além de outras vantagens como oferecer vários máximos de absorção e boa solubilidade, permitindo a análise de compostos tanto de natureza lipofílica quanto hidrofílica¹⁵⁴. A metodologia usada foi conforme descrito por Re *et al.*, (1999)¹⁵⁵.

O radical $ABTS^+$ foi formado pela reação do $ABTS^+$ (7 mM) com persulfato de potássio (140 mM) e incubados a temperatura de 25 °C, no escuro, durante 12 horas. Uma vez formado, o radical foi diluído com etanol até a obtenção do valor de absorvância de 0,700 nm \pm 0,200 nm a 734 nm.

A partir de cada extrato etanólico da polpa (comercial e doméstica), foram preparadas três diluições diferentes (1:10, 1:50, 1:100) na tentativa de averiguar qual diluição se mostrava mais apropriada dentro da faixa linear do método, dessa forma optou-se por usar a diluição 1:100. Em ambiente escuro transferiu-se uma alíquota de 20 μ L de cada diluição de cada extrato para microplaca e foi adicionado 220 μ L do radical $ABTS^+$. As absorvâncias foram lidas a $\lambda=734$ nm, após 6 minutos da reação, utilizando o etanol como branco. Com os dados dos extratos foi calculado a atividade antioxidante da PRL.

Como referência utilizou-se o Trolox, um antioxidante sintético análogo a vitamina E, nas concentrações de 12,5 a 200 μ M (Figura 22). Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em TEAC (atividade antioxidante equivalente ao Trolox).

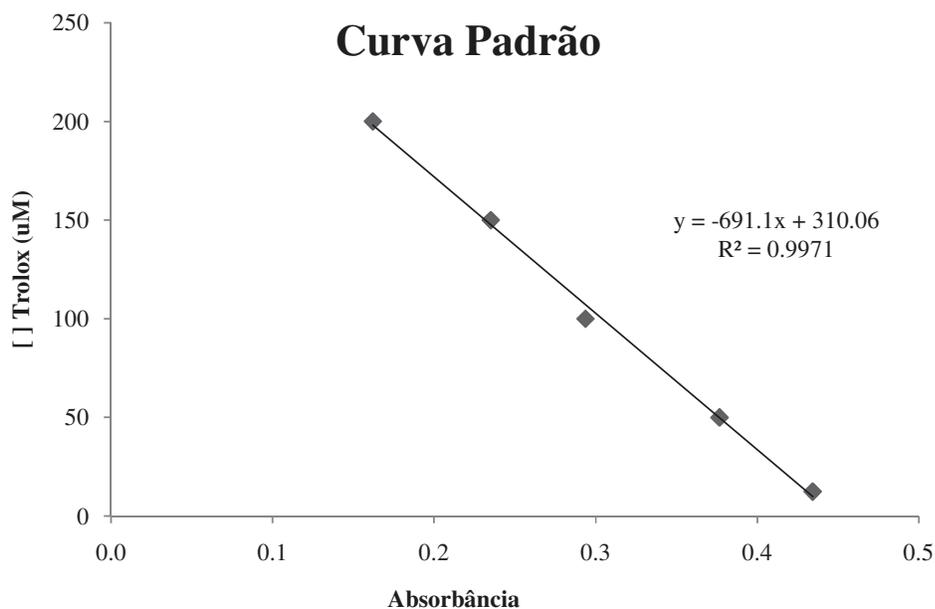


Figura 22 - Curva de calibração do Trolox.

5.3.5- Determinação da atividade antioxidante pelo método ORAC (capacidade de absorção do radical de oxigênio)

Foi desenvolvido por Cao e Prior, (1999) ¹⁵⁶ que se basearam no trabalho de Glazer, (1990) ¹⁵⁷. Tal método utiliza como molécula alvo dos radicais livres de oxigênio as ficobiliproteínas β -ficoeritrinas ou R- ficoeritrina, altamente fluorescentes, que contêm um pigmento vermelho fotorreceptor. O método baseia-se na medida do decréscimo da fluorescência das proteínas como consequência da perda de sua conformidade ao sofrer dano oxidativo ¹⁵⁸.

A fluoresceína foi preparada a partir da solução estoque de 15,3 mg/10 mL (4,066 nM). A partir dessa solução foi preparada a solução trabalho, diluída na proporção 1:80. Para o desenvolvimento dessa análise, foi feita uma solução tampão fosfato de concentração 75 mM, com pH igual a 7,4. Anterior ao ensaio final, foram realizados testes com 3 diluições (1:10, 1:50, 1:100) de cada extrato etanólico com o objetivo de obter a concentração no qual o método pudesse refletir a melhor sensibilidade ao método, sendo definida a diluição 1:100. A partir deste ensaio, em cada poço da microplaca (preta) foram colocados 20 μ L de cada extrato etanólico de polpa de romã (1:100), 60 μ L da solução trabalho de fluoresceína, 110 μ L da solução trabalho de AAPH na concentração de 76 mM e 10 μ L de tampão fosfato para completar o volume de 200 μ L. A leitura foi realizada em uma leitora de microplacas Spectra Max-M3 (Molecular Devices) durante uma hora e meia e em intervalos de 1 minuto.

O comprimento de onda para a emissão foi de 528 nm, e o de excitação de 485 nm. O branco foi constituído de 200 μ L de etanol (80%), sendo que o controle foi feito com 20 μ L de etanol (80%), 10 μ L de tampão, 60 μ L de fluoresceína e 110 μ L de AAPH. Após isso, a área abaixo da curva (AUC) de cada poço foi calculada pela equação (1).

$$AUC = 1 + \left(\frac{f^1 + f^2 + f^3 + \dots + f^n}{f^0} \right) \quad (1)$$

Onde f_0 é a fluorescência relativa ao tempo 0, e f_i a fluorescência relativa ao tempo final de leitura. A AUC_{net} é calculada pela subtração da AUC do branco, do valor da AUC do extrato ou padrão, segundo a equação (2).

$$AUC_{net} = AUC_{extrato/padr\~ao} - AUC_{branco} \quad (2)$$

O valor ORAC foi calculado por meio da regressão linear e com base nos valores da AUC do Trolox e expresso em equivalentes ao Trolox (μmol de equivalentes de Trolox por grama de amostra). As análises foram realizadas em triplicata. O valor final ORAC do extrato foi corrigido pelo fator diluição e extração para chegar ao valor ORAC da PRL.

As amostras com maior valor ORAC apresentam maior capacidade antioxidante, sendo que seus índices estimam o conteúdo capaz de inativar os radicais livres ¹⁵⁹.

5.4- Avaliação da atividade antioxidante *in vivo*

5.4.1 – Amostra

Animais

Os animais foram recebidos, procedentes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas, com 29 dias de vida e então alocados em 5 animais por caixa. Quando completaram 3 meses de vida os mesmos foram separados em grupos na tentativa de obter pesos semelhantes, e então passaram a receber o tratamento, que será descrito mais adiante. Aos 4 meses de vida estes animais passaram pela adaptação ao meio líquido, seguida do teste de exaustão e então a eutanásia.

Condições de Manutenção dos Animais no Biotério

Os animais foram mantidos em gaiolas, dispostas em 3 níveis numa estante, sendo 2 gaiolas em cada nível, com uma distância de 20 cm entre si, em ambiente com temperatura controlada (22-24°C) e foto-período com ciclo normal de 12 horas (claro/escuro).

A troca do material de cama dos ratos acontecia a cada dois dias, a fim de garantir condições sanitárias adequadas.

Para todos os animais foi fornecida uma dieta equilibrada para ratos. Água e ração foram fornecidas *ad libitum* durante todo o experimento.

Peso Corporal

Os animais eram pesados semanalmente em balança semi-analítica estabilizada (Mettler MP 1210) para avaliar o ganho de peso durante todo o período experimental.

5.4.2 – Ração Comercial

Os animais receberam ração comercial para ratos da marca Nuvilab® *ad libitum*, assim como a água. A ração Nuvilab® é apropriada para a nutrição dos animais que foram utilizados neste experimento, sendo amplamente utilizada nos biotérios da UNICAMP. A tabela abaixo mostra as características nutricionais da ração:

Tabela 4 - Especificações da ração comercial Nuvilab®.

Níveis de garantia por quilograma do produto	Enriquecimento por quilograma do produto		
	Percentual	Elementos Minerais	Quantidade
Umidade (máx)	12,50 %	Ferro	50 mg
Proteína Bruta (min)	22,00%	Zinco	60 mg
Extrato Etéreo (min)	5,00%	Cobre	10 mg
Matéria Mineral (máx)	10,00%	Iodo	2 mg
Matéria Fibrosa (máx)	8,00%	Manganês	60 mg
Cálcio (máx)	1,40%	Selênio	0,05 mg
Fósforo (min)	0,60%	Cobalto	1,5 mg
		Vitaminas	Quantidade
		A	13.000 UI
		D3	2.000 UI
		B1	5 mg
		B12	22 mcg
		B2	6 mg
		B6	7 mg
		E	34 mg
		K3	3 mg

Niacina	60 mg
Biotina	0,05 mg
Ácido Fólico	1 mg
Ácido Pantotênico	21 mg
Colina	650 mg

Fonte: Nuvilab®, ração para animais de laboratório (embalagem 20 kg). Legenda: máx – máximo, min – mínimo, UI – unidades internacionais, mg – miligramas, g – gramas e mcg – microgramas.

5.4.3- Grupos Experimentais

Para o estudo foram utilizados 39 ratos adultos, machos, com idade de 4 meses de vida e massa corporal de $404,32 \pm 18,17$ g (média \pm desvio padrão)(Tabela 5).

Tabela 5 – Descrição dos grupos experimentais.

Grupos Experimentais	Descrição dos grupos experimentais		
	Adaptação ao meio líquido	Teste de exaustão	Número da Amostra
CTL	+	-	n=9
DI	+	+	n=10
DII	+	+	n=10
NAT	+	+	n=10

Fonte: Dos autores, 2013.

Legenda: (-) ausente (+) presente.

Foi feita a identificação com numeração nas costas do rato utilizando tinta para cabelo para facilitar o manejo dos dados (Figura 24). Os procedimentos e cuidados realizados tiveram como base o *Guide to the care and use of experimental animals*¹⁶⁰.

Os grupos experimentais que realizaram o teste de exaustão eram compostos por 10 ratos, e o grupo controle por 9 ratos, como segue abaixo:

- Grupo controle (CTL)- grupo que o fator testado não foi aplicado: os ratos não receberam a suplementação e não realizaram o teste de exaustão;

- Grupo (DI)- grupo suplementado com uma dose I por 15 dias: os ratos receberam suplementação com 0,875 mmol de polifenóis/dia diluído na água de consumo durante 15 dias consecutivos e realizaram o teste de exaustão;

- Grupo (DII)- grupo suplementado com uma dose II por 15 dias: os ratos receberam suplementação com 1,75 mmol de polifenóis/dia diluído na água de consumo durante 15 dias consecutivos e realizaram o teste de exaustão;

- Grupo natação (NAT)- os ratos não receberam a suplementação e realizaram o teste de exaustão.

A dose foi usada com base em estudos anteriores que demonstraram o efeito antioxidante do suco de romã ^{161, 162}. O volume de água de consumo dos animais foi definido em teste prévio que avaliou a ingestão de líquido noturna dos ratos. A dose de extrato etanólico de polpa de romã era ministrada no período noturno, momento de maior consumo de líquido dos animais. Dessa forma, era convertido a quantidade em mmol de polifenóis para ml de extrato e adicionado à água dos ratos às 18 horas. A cada manhã foi avaliado o consumo da água suplementada com o extrato e realizado o preenchimento dos bebedouros com água para o livre consumo.

O exercício de natação foi empregado na pesquisa visando avaliar os efeitos da suplementação do extrato de polpa de romã sobre estresse oxidativo induzido pelo exercício (Figura 23).

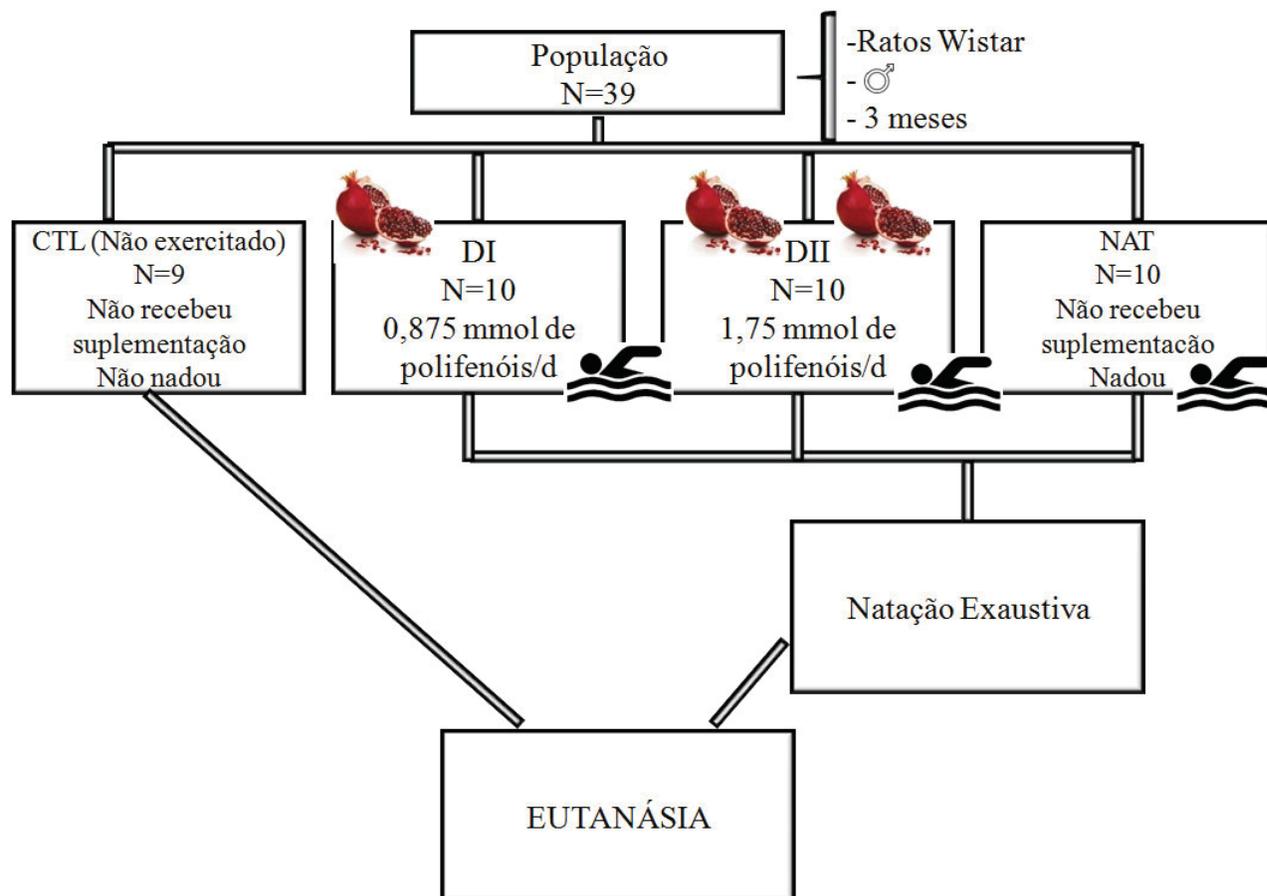


Figura 23 - Organograma demonstrativo da distribuição dos grupos experimentais.

Fonte: Dos autores, 2013.

5.4.4- Protocolo de adaptação ao meio líquido e ao exercício físico exaustivo

A adaptação ao meio líquido foi realizada com sete dias de antecedência ao teste de exaustão. Foi utilizado o protocolo adaptado de Gobatto *et al.*, (2001)¹⁶³ (Figura 26).

A atividade foi realizada em aquário de vidro de 55 cm x 41 cm (altura x diâmetro), dividido em 4 compartimentos, durante 7 dias, com carga adicional no último dia, com a prática de 1 animal por *container*, com temperatura da água de 31 ± 2 °C mantida por um ebulidor mergulhão (2000 W, 127 V, Cherubino®) (Tabela 6).

A temperatura da água foi mantida ao redor de 31 ± 2 °C, por ser considerada termicamente neutra para este modelo animal ¹⁶⁴.

Tabela 6 - Protocolo de adaptação ao meio líquido.

DIA	TEMPO DE ATIVIDADE (min)	PROFUNDIDADE (cm)	TEMPERATURA (°C)
1	5	5	31 ± 2
2	10	10	31 ± 2
3	15	40	31 ± 2
4	15	40	31 ± 2
5	15	40	31 ± 2
6	15	40	31 ± 2
7	15	40	31 ± 2

Fonte: Dos autores, 2013.

Legenda: min – minutos; cm – centímetros; °C – graus Celsius.

As sessões de adaptação foram realizadas sempre no mesmo período do dia, entre 10 e 11 horas da manhã. Todos os animais passaram pela adaptação, inclusive os controles.

5.4.5- Protocolo de exercício físico exaustivo

O protocolo de exercício exaustivo foi aplicado nos grupos DI, DII e NAT, 24 horas após o término do último dia de adaptação ao meio líquido, e realizado no período da manhã (10 e 11 horas da manhã), horário este que os animais já estavam habituados a realizarem o manejo.

Foi utilizado o protocolo modificado, descrito por Araújo *et al.*, (2007)¹⁶⁵. Era preso à cauda dos ratos anéis de chumbo com 3% do seu peso corporal, e após, os mesmos foram colocados em um tanque de natação (aquário de vidro - 55 cm x 41 cm (altura x diâmetro) subdividido em 4 compartimentos individualizados com 40 cm de profundidade da água para impedir que os animais se apoiassem no fundo do aquário) com água fresca e pré-aquecida (Figura 27).

A temperatura da água foi de 31 ± 2 °C, mantida por um ebulidor mergulhão (2000 W, 127 V, Cherubino®), como o realizado no protocolo de adaptação. A

temperatura ao redor de 31 ± 2 °C, considerada por termicamente neutra, evita que a imersão em água fria amenize a elevação da temperatura que acompanha o exercício ou que o estresse térmico possa interferir nos resultados, conforme já verificado em outros estudos^{166, 167, 160}.

O nível de exaustão foi definido pela incapacidade de manutenção do animal na superfície com as narinas fora da água por dez segundos¹⁶⁷. Os ratos foram removidos, após o período de esgotamento. Este procedimento foi realizado sempre pelo mesmo avaliador.

5.4.6-Eutanásia

Após o término da determinação do nível de exaustão, os animais foram imediatamente retirados da água com uma peneira, secos, e então transferidos para uma sala com temperatura controlada (28 ± 2 °C), evitando assim o estresse do animal pela diferença de temperatura da água. Nesta sala os animais permaneciam por uma hora.

Posteriormente estes eram anestesiados com a administração de uma associação de cloridrato de Ketamina (Dopalen, Vetbrands®) e cloridrato de Xilazina (Anasedan, Vetbrands®), nas dosagens 60 mg/kg e 40 mg/kg, respectivamente, por via intraperitoneal no quadrante inferior direito visando alcançar rapidamente o estado de inconsciência e assegurar a insensibilidade máxima do animal à dor durante todo o procedimento^{168, 169}.

Ao se constatar a ausência do reflexo córneo-palpebral e do reflexo de retirada ao estímulo doloroso por preensão da pata traseira, foi considerado que o animal está anestesiado segundo Bento *et al.*, (2002)¹⁷⁰.

Vale ressaltar que a eutanásia do grupo não treinado (CTL) foi conduzida um dia após os grupos que realizaram o teste de exaustão, com o intuito de otimizar o tempo total do procedimento.

5.4.7- Coleta e preparo das amostras biológicas

Inicialmente foi realizada anti-sepsia com álcool a 70% na região anterior do abdômen¹⁷⁰ (Figura 28).

O sangue foi coletado por punção na veia cava inferior, com uma seringa previamente rinçada com heparina sódica 5.000UI mL^{-1} (Liquemine[®]) de 10 ml, e, após 1 hora da coleta, o mesmo era centrifugado (TDL80-2B, Centribio[®]) a 5000 rpm, durante 10 minutos à 4°C para separação do soro. O sobrenadante, correspondente ao plasma sanguíneo, foi aliqotado em tubos de eppendorfs (Eppendorf AG, modelo 5418R) e armazenados a -80°C para posteriores análises.

O músculo gastrocnêmio das patas direita e esquerda foi coletado em todos os animais. Após a anti-sepsia com álcool 70% das patas traseiras, a exposição do músculo foi feita através de uma incisão longitudinal anterior na pata do animal, desde o 1/3 médio da perna até a região inguinal direita. Após a visualização era realizada a dissecação do gastrocnêmio desde a origem até a inserção (Figura 29).

O tecido foi então lavado em solução salina 0,9%, embrulhado em papel alumínio, armazenado à -80°C e destinado à posterior dosagem dos parâmetros bioquímicos¹⁷¹.

O mesmo procedimento de coleta e armazenamento ocorreu com o fígado (Figura 30).

5.4.8- Determinação da peroxidação de lipídeos e dos níveis de peróxido de hidrogênio do tecido muscular e do plasma

Determinação da peroxidação de lipídeos

A peroxidação de lipídeos foi determinada através da produção de metabólitos reativos ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), principalmente o malonaldeído (MDA), segundo Heath e Packer, (1968)¹⁷². Amostras contendo 0,3 g de músculo gastrocnêmio ou 0,3 ml de plasma foram maceradas em Polytron PTA 20S (modelo PT 10/35, Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA), no caso do plasma foram homogeneizadas, em 5 mL de TCA (ácido tricloroacético) 0,1%, e após a completa homogeneização, foram transferidas para tubos e centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos a 4°C . Do sobrenadante, foram retirados 250 μL e transferidos para outros tubos juntamente com 1 mL de solução contendo TCA 20% e TBA 0,5%. A mistura foi colocada em banho-seco por 30 minutos, a 95°C e resfriada em banho de gelo, na sequência. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm para retirar a

espuma. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Lambda 40, Perkin Elmer) a 535 e 600 nm. A concentração de MDA, em $\eta\text{mol/g}$ de massa fresca, foi calculada de acordo com o coeficiente de extinção da reação:

$$\eta\text{molMDA} = [(A_{535} - A_{600})/155000] * 10^6$$

Determinação dos níveis de peróxido de hidrogênio

O conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi determinado através da reação com iodeto de potássio (KI), segundo Alexieva *et al.*, (2001)¹⁷³. As amostras, (músculo gastrocnêmio e plasma) passaram pelo mesmo processo da determinação de peroxidação de lipídeos até a centrifugação a 10.000 rpm por 15 minutos, a 4°C. Do sobrenadante, foram retirados 200 μL aos quais foram adicionados 200 μL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 800 μL de solução 1 M de KI. O branco consistiu na mesma mistura descrita acima, porém, ao invés do sobrenadante da amostra, colocou-se 200 μL de TCA 0,1%. Os tubos com a reação foram colocados em banho de gelo e permaneceram no escuro durante uma hora. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Lambda 40, Perkin Elmer) a 390 nm. A quantidade de H_2O_2 foi expressa em $\mu\text{mol/g}$ de tecido fresco utilizando-se da curva de calibração com concentrações conhecidas de peróxido de hidrogênio.

5.4.9- Determinação das enzimas antioxidantes do tecido hepático

Extração de proteínas solúveis totais

As amostras do tecido hepático congelado foram maceradas (3 g) e homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (100 mg de tecido/mL de tampão fosfato de potássio) 100 mM, pH 7,5, contendo 1 mM EDTA e 3 mM DTT¹⁷⁴. O homogeneizado foi centrifugado à 10.000 rpm por 30 minutos à 4°C (J2-MC, Beckman). O sobrenadante foi coletado, aliquoteado e estocado em freezer -80°C até o momento das análises.

Determinação de proteína solúveis totais

A concentração das proteínas solúveis totais da amostra foi determinada espectrofotometricamente a 595 nm (Lambda 40, Perkin Elmer), segundo o método de Bradford, (1976) ¹⁷⁵, utilizando-se o BSA (*bovine serum albumin*) como padrão. Os resultados foram expressos em mg proteínas/mL.

Atividade das enzimas antioxidantes

Para os ensaios enzimáticos foram utilizados extratos protéicos provenientes dos tecido hepático estocados em freezer a -80°C. Foram realizados ensaios de atividade específica das enzimas: Superóxido Dismutase (SOD), Isoformas da SOD, Catalase (CAT), e Glutathione Redutase (GR) em géis de poliacrilamida não desnaturantes (PAGE),e, Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione Redutase (GR) e Glutathione-S-Transferase (GST) em espectrofotômetro.

5.4.10 - Eletroforese em gel de poliacrilamida em sistema não desnaturante e por espectrofotometria

Perfil Isoenzimático

Os perfis eletroforéticos foram realizados segundo Alfenas,(2006)¹⁷⁶ usando géis de poliacrilamida e as revelações foram específicas para cada enzima deste estudo. As análises de eletroforese foram feitas em sistemas de tampão descontínuo baseados no método de Laemmli (1970) ¹⁷⁷ utilizando-se o sistema mini-gel vertical (8,3 x 10,2 cm) (Figura 24).



Figura 24 - Sistema mini-gel vertical.

Fonte: Dos autores, 2013.

O sistema para gel não desnaturante foi constituído por um gel de corrida de percentual variante dependente da enzima analisada e outro de empacotamento com concentração de 5%. Como catalisador da reação de polimerização foi usado 25 μ L de TEMED (Invitrogen) e 50 μ L de persulfato de amônio (PA) a 10%. O tampão de corrida foi constituído por Tris 25 mM e glicina 192 mM¹⁷⁶.

5.4.10.1 Atividade da superóxido dismutase (SOD) em gel não desnaturante (PAGE)

A atividade da SOD foi determinada em gel não desnaturante (PAGE) através dos extratos do tecido hepático, cujas proteínas foram separadas por eletroforese em gel a 12% de poliacrilamida. Foi utilizado o sistema Mini Protean II (Bio-Rad). O gel possuía espessura de 1,5 mm, altura de 6,5 cm e largura 7,3 cm. Para a confecção de um mini gel foram utilizados 3,0 mL de uma solução 12% de acrilamida, 2,5 mL de

tampão Tris 3 M com pH 8,9, e 4,5 mL de água deionizada. Como catalisadores foram utilizados 19 μ L de TEMED e 25 μ L de PA 1%.

Após a polimerização desse gel de resolução (cerca de 30 minutos), foi aplicado o gel de empacotamento segundo o protocolo: 500 μ L de acrilamida a 12%, 1,25 mL tampão Tris 500 mM, pH 6,7, e 2,75 mL de água deionizada. Para a polimerização foram utilizados 10 μ L de TEMED e 50 μ L de PA 1%¹⁷⁷.

A eletroforese foi realizada a 4°C em corrente constante de 15 mA/gel. O tampão de eletrodo constituiu da mistura entre Tris 25 mM, pH 8,3 e glicina 192 mM. Para cada gel foram aplicadas amostras de padrão de SOD de fígado de boi (Sigma) (2 unidades) e 50 μ g de proteína do extrato hepático de cada amostra referente a cada tratamento. Após a separação das proteínas por eletroforese, a atividade da SOD foi determinada de acordo com Beuchamp e Fridovich, (1971)¹⁷⁸.

Revelação dos géis: posteriormente à corrida eletroforética, os géis foram lavados rapidamente em água deionizada e incubados no escuro à temperatura ambiente em uma mistura contendo tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,8, EDTA 1 mM, riboflavina 0,05 mM, NBT 0,1 mM e 0,3% TEMED. Ao final de 30 minutos, a mistura de reação foi descartada, os géis passados em água deionizada e colocados diretamente sob iluminação por alguns minutos até o aparecimento de bandas brancas sob fundo roxo. Nestas condições ocorre a fotoxidação do gel. A riboflavina, por fotólise, é reduzida na presença do TEMED (substância oxidante), em seguida, providencia um elétron para o O₂, resultando em íon superóxido, O₂⁻, o qual atua como redutor do composto NBT (incolor) para o *blue formazana*¹⁷⁶. Com isto, ocorre a formação de uma coloração púrpura no gel e as bandas correspondentes à atividade da SOD pela eliminação do radical superóxido, permanecem sem coloração (ou sem se fotoxidar), promovendo uma revelação negativa. A fotoxidação foi interrompida mergulhando-se o gel em solução de ácido acético (7%) por 15 minutos¹⁷⁷. Os géis foram documentados no Image Scanner (Amersham Biosciences).

Atividade da SOD em espectrofotômetro

A atividade da SOD foi determinada como descrito por Giannopolitis & Ries, (1977)¹⁷⁹.

Em espectrofotômetro (Lambda 40, Perkin Elmer), a atividade da SOD foi determinada pela adição de 50 µL do extrato enzimático bruto a 5 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹, pH 7,8, contendo metionina 13 mmol.L⁻¹, NBT 75 µmol.L⁻¹, EDTA 0,1 mmol.L⁻¹ e riboflavina 2 µmol.L⁻¹. A reação foi conduzida a 25 °C, numa câmara de reação, sob iluminação de lâmpada fluorescente de 15 W, mantida no interior de uma caixa coberta com papel alumínio. Após 5 minutos de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e o composto *blue formazana*, produzido pela fotorredução do NBT, foi medido a 560 nm. Um meio de reação exatamente igual ao anterior, mas mantido no escuro por igual período, serviu de branco e foi subtraído da leitura da amostra que recebeu iluminação. Os resultados foram expressos em U SOD/mg de proteína.

5.4.10.2 Atividade da catalase (CAT) em gel não desnaturante (PAGE)

A atividade da CAT foi determinada em gel não desnaturante (PAGE) através dos extratos do tecido hepático para determinar o perfil isoenzimático desta enzima.

Foi adicionado tampão de amostra (0,3M Tris, 28% glicerol 0,036% azul de bromofenol) ao extrato (50 µg de proteína do extrato hepático) na proporção 4:1. A eletroforese foi realizada a 4°C em corrente constante de 20 mA por placa num gel a 8% de concentração. Para cada gel foi aplicado um padrão de CAT de fígado bovino (2 unidades). A revelação para atividade de CAT foi realizada após a lavagem do gel em água deionizada (3 x 15 minutos) e incubação do mesmo por 10 minutos em H₂O₂ 0,003%, a temperatura ambiente, com agitação suave e constante. Após este período, o gel foi rapidamente lavado em água deionizada e colocado por 10 minutos em uma solução de FeCl₃ 1% (P/V) e K₂Fe(CN)₆ 1% (P/V) sempre com agitação suave. Em seguida, a solução foi retirada e o gel lavado com água deionizada. A fixação foi realizada com solução de ácido acético (7%)¹⁸⁰.

Os géis foram documentados no Image Scanner (Amersham Biosciences).

Atividade da catalase (CAT) em espectrofotômetro

A atividade da CAT foi determinada como descrito por Mickerse e Fletcher, (1995)¹⁸¹ com algumas modificações conforme Azevedo *et al.*, (1998)¹⁸².

Em espectrofotômetro (Lambda 40, Perkin Elmer), a atividade da catalase foi determinada a 25°C em solução de reação formada por 10 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 25 µL de peróxido de hidrogênio (solução de 0,25%) preparada imediatamente antes do uso. A reação foi iniciada pela adição de 25 µL do extrato protéico (hepático) à mistura de reação e a atividade enzimática foi determinada seguindo a decomposição de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por 1 minuto, através das alterações na absorbância a 240 nm em cubetas de quartzo. Os resultados foram expressos em µmol/minuto/mg de proteína.

5.4.10.3 Atividade da glutathiona redutase (GR) em gel não desnaturante (PAGE)

A revelação para atividade de GR foi determinada como descrito por Gomes Junior *et al.*, (2006)¹⁸³. Foi feita a eletroforese em PAGE não desnaturante (9%) utilizando como padrão 0,25 unidades de GR Bovino. A eletroforese foi desenvolvida a corrente constante de 20 mA por placa, os géis foram lavados com água destilada e incubados a temperatura ambiente, em uma solução de 0,25 M de TRIS em pH 7,5; 0,5 mM de MTT; 0,7 mM de DPIP; 3,4 mM GSSG e 0,5 mM NADPH. Após o aparecimento das bandas a reação foi interrompida mergulhando o gel em uma solução de ácido acético a 7%.

Os géis foram documentados no Image Scanner (Amersham Biosciences).

Atividade da glutathiona redutase (GR) em espectrofotômetro

A atividade da GR foi determinada como descrito por Gomes-Junior *et al.*, (2006)¹⁸³ com algumas modificações.

Em espectrofotômetro (Lambda 40, Perkin Elmer), a atividade da GR foi determinada a 30°C em uma mistura de reação consistindo de 1 mL tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), 500 µL de DTNB 1 mM, 100 µL de GSSG 1 mM e 100 µL de NADPH 0,1 mM. A reação foi iniciada pela adição de 50 µL do extrato protéico hepático à mistura de reação e monitorada por 1 minuto através da redução da glutathiona oxidada a 412 nm. A glutathiona reduzida, por sua vez, reduz o composto DTNB,

que constitui um cromóforo amarelo, dando a coloração característica do ensaio. Os valores de atividade da GR foram expressos em $\mu\text{mol}/\text{minuto}/\text{mg}$ de proteína.

5.4.10.4- Atividade da Glutathione S-Transferase (GST) em espectrofotômetro

A atividade da glutathione-S-transferase foi medida espectrofotometricamente em 340 nm, de acordo com Habig, Keen *et al.*, (1975)¹⁸⁴. As GSTs catalisam a reação de conjugação do substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com a glutathione reduzida (GSH), formando um tioéter que pode ser medido pelo aumento de absorvância através da leitura em cubetas de quartzo.

A amostra foi adicionada em um meio contendo CDNB (0,1 M), GSH (0,1 M), e tampão fosfato (0,1 M e pH 7,0), sendo que na cubeta de referência o volume de amostra foi substituído por tampão fosfato 0,1 M com pH 7,0.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro em triplicatas com comprimento de onda de 340nm, durante 3 minutos. Para o cálculo da atividade foi utilizado o coeficiente de extinção molar (ϵ) de $9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e a atividade enzimática foi expressa em μmol de CDNB conjugado/min/mg proteína (1 unidade GST = 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$).

5.5-Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão.

Os valores obtidos foram tabulados através do programa Excel e testados para diferença entre as médias pelo teste *t* para amostras não pareadas com pós-teste de ANOVA.

Foi previamente estabelecido o nível de significância $\alpha=0,05$, portanto admitiu-se a margem de erro de 5% e a confiabilidade de 95% na tomada de decisão de rejeitar a hipótese nula.

Para as análises dos dados foi empregado o *software* de análise estatística Sigma StatStat 3.5.

6- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análises *in vitro* da atividade antioxidante da Polpa de Romã Liofilizada(PRL)

6.1- Análise de compostos fenólicos totais daPRL

Com o objetivo de estimar a presença de compostos com capacidade redutora, foi realizado o ensaio com o reagente de Folin Ciocalteau. Os resultados do ensaio são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Resultados da análise de fenólicos totais daPRL.

Fenólicos Totais		
(Equivalentes Ácido Gálico - mg/g de PRL)		
	Média	DP
Escala Comercial	6,815*	0,121
Cultivo Doméstico	8,123	0,225

Resultados expressos em média \pm desvio-padrão, n = 6.

* Amostras diferem entre si estatisticamente (P<0,05) (P = 0,003).

De acordo com os resultados, a polpa de romã liofilizada (PRL) das frutas de cultivo doméstico apresentaram conteúdo significativamente maior de compostos redutores ($8,123 \pm 0,225$ mg de eq. Ácido Gálico/g de PRL) em relação à fruta produzida em escala comercial ($6,815 \pm 0,121$ mg de eq. Ácido Gálico/g de PRL).

O estudo de Jardini e Mancini Filho,(2007) ¹³⁵ determinou $64,09\% \pm 1,16$ de umidade na polpa. Assim, o teor calculado em base seca da polpa liofilizada em pó apresenta maior concentração de calorias, fibras, carboidratos totais, lipídeos, proteínas e também de compostos antioxidantes, como os fenólicos. Istose deve a concentração dos nutrientes devido à retirada da água¹⁸⁵. Considerando tal estudo, a polpa desta pesquisa apresenta-se 2,78 vezes mais concentrada que a polpa fresca. O mesmo estudo de Jardini e Mancini Filho,(2007) ¹³⁵ obteve como resultados dos conteúdos de compostos fenólicos da polpa de romã comercialde $12,14 + 1,02$ mg de eq. Ácido

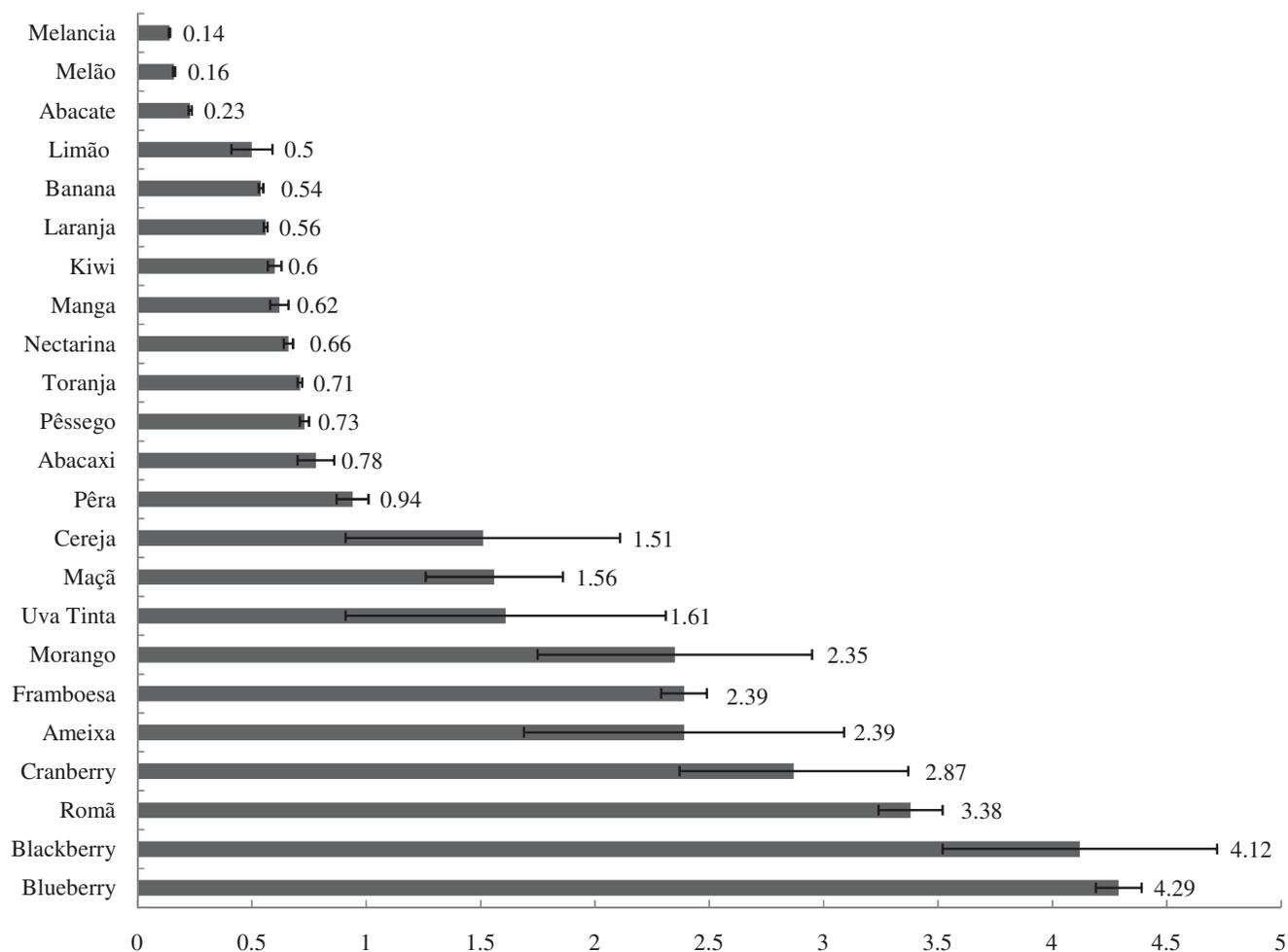
Gálico/g de polpa fresca, valor superior ao encontrado neste estudo. Já no estudo de Gil, Tomás-Barberán *et al.*, (2000) ¹⁸⁶, que comparava os fenólicos totais do suco industrializado e o obtido manualmente, os valores obtidos foram de 2,56 mg de eq. Ácido Gálico/L e 2,11 mg de eq. Ácido Gálico/L de suco, respectivamente. O suco obtido manualmente utilizou, para 1 litro, 15,5 g de polpa, portanto apresentou 0,03 mg de eq. Ácido Gálico/g de polpa, já o industrial, originalmente apresentava 65% de polpa, mas foi reconstituído por adição de água até atingir 16,3% de sólidos solúveis, dessa forma por grama de polpa o valor achado é de 0,04 mg de eq. Ácido Gálico. Caso a polpa fosse liofilizada, concentrando os teores de fenólicos, o valor seria em torno de 0,11 Ácido Gálico/g de polpa liofilizada, e o suco obtido manualmente apresentaria um valor próximo de 0,08 mg de eq. Ácido Gálico, considerando 64,09% de umidade ¹³⁵. O maior valor de fenólicos no suco de romã obtido em suco industrializado foi atribuído ao processo de extração, em que a casca e o albedo (partes adstringentes e ricas em taninos, compostos fenólicos altamente hidroxilados), não são removidos durante o processamento pela marca do suco em questão.

Na revisão realizada por Balasundram, Sundram *et al.*, (2006) ¹⁸⁷, que investigava os compostos fenólicos de frutas e suas bebidas, encontraram como resultados mais expressivos os sucos de: framboesa (5,27mg de eq. Ácido Gálico/L), maçã (2,96mg de eq. Ácido Gálico/L), blueberry (2,70mg de eq. Ácido Gálico/L) e goiaba branca (2,47 mg de eq. Ácido Gálico/L), dentre outras. A quantidade em gramas de fruta para a confecção do suco foi variante entre os tipos analisados.

Devido à diversidade de estruturas dos ácidos fenólicos, cada composto pode contribuir de maneira peculiar na atividade antioxidante, que, por sua vez, é uma reação complexa, envolvendo etapas de iniciação, propagação e estabilização dos radicais formados ¹⁸⁸.

A figura 25 descreve os valores de fenólicos totais encontrados por Wolfe, Kang *et al.*, (2008) ⁶³ de certas frutas por eles avaliados. Entre essas frutas, o blueberry, blackberry e cranberry tiveram os maiores teores de fenólicos totais ($4,29 \pm 0,1$; $4,12 \pm 0,06$; e $2,87 \pm 0,05$ mg eq Ácido Gálico/g de polpa fresca respectivamente) e o romã apresentou $3,38 \pm 0,14$ mg eq Ácido Gálico/g de polpa, valor este superior ao nosso

achado para a polpa comercial e doméstica quando subtraído o teor de umidade. A polpa liofilizada do estudo de Wolfe teria aproximadamente 9,39 mg eq Ácido Gálico/g.



Fenólicos Totais
(mg eq. Ác. Gálico/g fruta)

Figura 25 - Valores fenólicos totais de frutas selecionadas.

Os valores são expressos como média \pm DP. n=3 (* P <0,05).

Fonte: Adaptado de Wolfe, Kang *et al.*, (2008)⁶³.

De forma a complementar os estudos envolvendo compostos fenólicos da romã foi abordado o trabalho de Gözlekçi, Saraçoğlu *et al.*,(2011)¹⁸⁹ que trata a distribuição dos compostos fenólicos totais do suco, casca, e extrato aquoso de semente de quatro cultivares de romã, sendo eles: "Lefan", "Katirbasi", "Cekirdeksiz-IV" e "Asinar". Os

resultados mostraram que os níveis desses compostos variam de acordo com o tipo de cultivar e a parte extraída da fruta. Entre os cultivares, os maiores teores de fenólicos totais foi obtido a partir do extrato da casca, representando cerca de 67% do montante total de fenólicos da fruta. O teor de fenólicos totais variaram de 1775,4 (Asinar) a 3547,8 mg eq. Ácido Gálico/L (Lefan) entre os cultivares. Além disso, o teor de fenólicos totais do suco de romã e o extrato da semente variou 784,4 (Cekirdeksiz-IV) a 1551,5 mg eq. Ácido Gálico/L (Lefan) e 117,0 (Cekirdeksiz-IV) a 177,4 mg eq. Ácido Gálico/L (Asinar), respectivamente. "Lefan" apresentou a maior quantidade de fenólicos totais entre os quatro cultivares populares da Turquia testados. Para os cálculos da determinação do conteúdo de fenólicos o autor utilizou 200 g de cada parte avaliada da fruta para 1 litro de suco, por conseguinte, o cultivar Asinar, que teve o menor teor de fenólicos totais, apresentaria por grama de fruta fresca 8,877 mg eq. Ácido Gálico e 25,476 mg eq. Ácido Gálico/g de polpa liofilizada, e os valores do cultivar Lefan seriam de 17,739 mg eq. Ácido Gálico/g de polpa fresca, e 49,314 mg eq. Ácido Gálico/g de polpa liofilizada¹⁸⁹.

As diferenças observadas entre os estudos pode ser explicados por fatores como: grau de maturação, região de cultivo, diferença entre espécies da fruta, e a presença de algumas vitaminas (especialmente a vitamina C) e açúcares redutores que podem participar do valor total, quando é utilizado o reagente de Folin-Ciocalteu¹⁵². É importante lembrar que a maioria dos compostos fenólicos são metabólitos secundários sintetizados pelos vegetais como respostas às diferentes condições de estresse ou ataque de patógenos, o que faz com seus teores não apresentem valores constantes, podendo apresentar algumas variações de acordo com as condições climáticas e ambientais que a planta é submetida¹⁹⁰.

6.2- Determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS⁺

Na Tabela 8 estão apresentados os resultados obtidos pelo método ABTS⁺ das polpas de romã liofilizadas na variedade comercial e de cultivo doméstico.

A maior atividade antioxidante dentre as polpas analisadas foi da fruta cultivada em pequena escala, cultivo doméstico, ($43,151 \pm 0,652 \mu\text{mol Trolox/g de PRL}$), cujo valor foi significativamente maior, em comparação com a fruta que é cultivada com o princípio

de venda em larga escala ($31,786 \pm 0,326$ $\mu\text{mol Trolox/g}$ de PRL). A polpa liofilizada de cultivo doméstico apresentou valor 26% superior à polpa da fruta comercial.

Tabela 8 - Atividade antioxidante equivalente ao Trolox nas polpas liofilizadas das amostras pelo método do ABTS⁺

Romã	TEAC	
	Média	DP
	(μmol Trolox /g de PRL)	
Comercial	31,786*	0,326
"Cultivo doméstico"	43,151	0,652

Resultados expressos em média \pm desvio-padrão, n = 6.

* Amostras diferem entre si estatisticamente ($P < 0,05$).

Os autores Da Silva, Mansano *et al.*, (2012)¹⁹¹ observaram no extrato etanólico da polpa de romã uma atividade antioxidante de 37,98 $\mu\text{mol Trolox/ml}$ de extrato. Já Gil, Tomás-Barberán *et al.*, (2000)¹⁸⁶ determinaram no suco concentrado de romã cerca de 20 $\mu\text{moles de Eq. Trolox/ml}$ de suco, valor este superior ao vinho tinto, que apresenta cerca de 7 $\mu\text{moles de Eq. Trolox/g}$ e ao chá verde que mostrou valores de 4,4 $\mu\text{moles de Eq. Trolox/g}$ de amostra. Estas duas últimas bebidas são consideradas referência de alta capacidade antioxidante.

Comparando os dados obtidos com a pesquisa de Thaipong, Boonprakob *et al.*, (2006)¹⁹² em diferentes frutas pelo método ABTS⁺, verifica-se que a polpa de romã liofilizada de cultivo doméstico apresentou valor próximo ao encontrado pelos autores com blueberry (45,9 $\mu\text{M de Eq Trolox/g}$ de fruta) e a goiaba (32,25 $\mu\text{M de Eq Trolox/g}$ de fruta), a segunda fruta com maior atividade antioxidante do estudo, valor próximo ao da polpa de romã comercial. Entretanto, o estudo avalia a polpa *in natura*, em que é somado ao peso da fruta a água que a compõe. Caso os autores mensurassem a atividade antioxidante da polpa liofilizada os valores encontrados seriam certamente maiores a depender da umidade do blueberry e da goiaba. Segundo Moraes *et al.*, (2007)¹⁹³ o blueberry, mais conhecido no Brasil como mirtilo, apresenta cerca de $83 \pm 0,6$ de umidade a variar entre os tipos de cultivares, assim, o blueberry liofilizado

apresentaria 270 μM de Eq Trolox/g, valor superior ao da PRL de ambos tipos de cultivos (doméstica e comercial).

Um estudo que avaliou capacidade antioxidante por diferentes métodos dos 50 alimentos mais consumidos nos Estados Unidos incluindo: 18 frutas, 13 tipos de legumes e 19 bebidas, os autores observaram pelo método ABTS⁺ valores que variaram de 65,52 μM de Eq Trolox/ g de fruta fresca de blueberry a 0,82 μM de Eq Trolox/ g de sumo de limão ¹⁹⁴. Esta variação entre diferentes frutas também foi observada por Pellegrini *et al.*, (2003) ¹⁹⁵, que encontrou os maiores valores para blackberry (20,24 μmol Trolox /g de polpa fresca), enquanto a blueberry mostrou valores intermediários de 7,43 μmol Trolox /g da polpa fresca) e os menores valores foram observados na melancia (0,69 μmol Trolox /g da polpa fresca)(Tabela 9).

Tabela 9 - Atividade antioxidante equivalente ao Trolox das frutas pelo método do ABTS⁺.

	TEAC	
	Valor	Ranking
(μmol Trolox/g da polpa fresca)		
Blackberry	20.24	1
Ameixa	16.79	2
Framboesa	14.05	3
Morango	10.94	4
Abacaxi	9.91	5
Laranja	8.74	6
Blueberry	7.43	7
Tangerina	4.16	8
Uva Tinta	3.85	9
Toranja	3.05	10
Cereja	2.69	11
Uva Verde	2.48	12
Figo	2.47	13
Kiwi	2.28	14
Pêra	2.19	15
Pêssego	1.67	16
Maçã Vermelha	1.59	17
Damasco	1.44	18
Maçã Verde	1.31	19
Melão	1.2	20

Nêspera	0.75	21
Melancia	0.69	22
Banana	0.64	23

Os valores representam médias n=10

Fonte: Adaptado de Pellegrini, Serafini *et al.*,(2003) ¹⁹⁵.

Os resultados obtidos para atividade antioxidante mostraram tendência semelhante aos teores de fenólicos entre os dois tipos de frutos utilizados neste estudo. Uma vez que os frutos de origem comercial apresentam tratos culturais que reduzem as condições de estresse e ataque de patógenos, é possível explicar os maiores valores observados neste teste para os frutos de cultivo doméstico. Analisando estes valores em conjunto com os maiores teores de fenólicos observados, explicados pelo aumento da defesa dos frutos às condições adversas que são submetidos, podemos sugerir que qual seja o fruto utilizado os benefícios antioxidantes estarão presentes.

6.3- Determinação da atividade antioxidante pelo método ORAC (capacidade de absorção do radical oxigênio)

Para avaliar o potencial antioxidante da PRL contra os radicais peroxila presentes no organismo, a polpa liofilizada foi analisado pelo método ORAC.

A PRL proveniente da fruta comercial do presente estudo apresentou valores de $60,77 \pm 3,656$ $\mu\text{mol eq. Trolox/g}$ de PRL, e a PRL da romã doméstica apresentou valores de $68,78 \pm 4,940$ eq. Trolox/g de PRL (diluição de 1:100), dados estes já corrigidos pelo fator diluição e extração do extrato etanólico (Tabela 10).

Em extrato metanólico da polpa da romã na diluição de 1:70 Wolfe, Kang *et al.*, (2008)⁶³ encontrou o valor de $44,79 \pm 3,78$ $\mu\text{mol eq. Trolox/ml}$ de extrato. Outros frutos também foram avaliados, os maiores resultados foram encontrados no blueberry selvagem ($96,21 \pm 10,8$ $\mu\text{mol eq. Trolox/g}$), cranberry ou uva-do-monte ($83,94 \pm 14,05$), morango ($83,48 \pm 8,88$), blackberry doméstico ($62,21 \pm 0,43$), cereja ($59,45 \pm 9,78$), ameixa ($56,61 \pm 4,4$), framboesa ($52,92 \pm 8,77$), romã ($44,79 \pm 3,78$), blueberry comercial ($48,26 \pm 6,49$) e maçã ($45,92 \pm 2,01$)(Figura 26)⁶³.

Tabela 10 - Atividade antioxidante equivalente ao Trolox nas polpas liofilizadas das amostras pelo método do ORAC.

Romã	Equivalente Trolox	
	Média	DP
Comercial	60,77	3,656
"Cultivo Doméstico"	68,78	4,940

Resultados expressos em média \pm desvio-padrão, n = 6.

* Amostras diferem entre si estatisticamente ($P < 0,05$).

Os dados expressos de ORAC correspondem bem com os relatados pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos ^{63, 196}

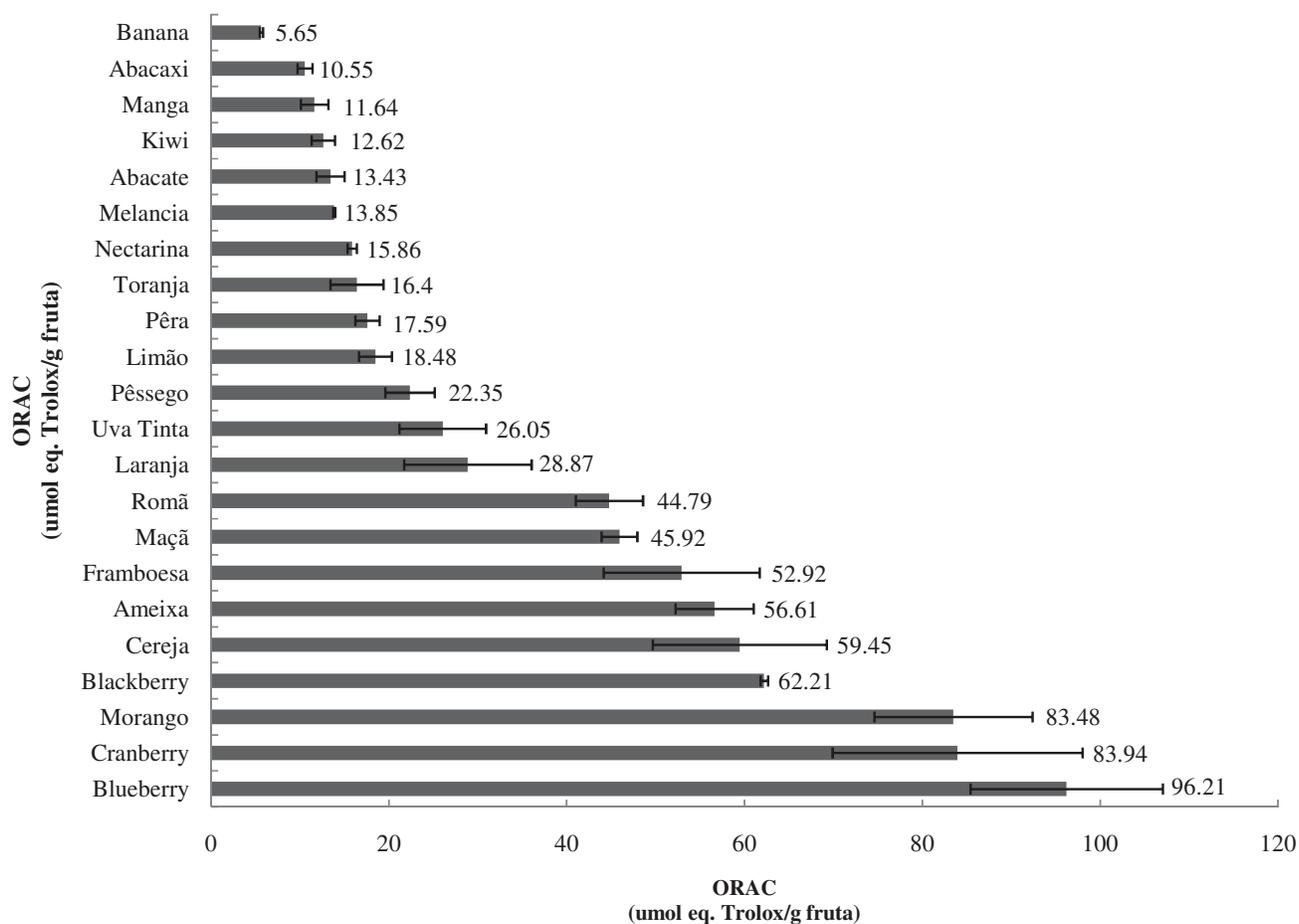


Figura 26 - Valores ORAC de frutas selecionadas.

Os valores são expressos como média \pm DP. n=3 (* $P < 0,05$).

Fonte: Adaptado de Wolfe, Kang *et al.*,(2008) ⁶³.

Punicalaginas são taninos elágicos que estão presentes de forma abundante na romã e contribuem grandemente para suas propriedades biológicas, desempenhando inúmeras funções benéficas ao organismo, e entre elas a atividade antioxidante ¹⁹⁷. Aqil, Munagala *et al.*, (2012) ¹⁹⁸ isolou alguns compostos da romã, e avaliou a atividade antioxidante pelo método ORAC, obtendo resultados de 1556 ± 79 μmol de eq. Trolox/g para a punicalagina e 1333 ± 56 μmol de eq. Trolox/g para o seu metabólito ativo, o ácido elágico. Estes dados são consistentes com valores relatados anteriormente ¹⁹⁹, ²⁰⁰.

Para avaliar o potencial antioxidante “*in vivo*” do extrato da romã, Mertens-Talcott *et al.*,(2006) ²⁰¹ estudaram a atividade antioxidante pelo método de ORAC em humanos após o consumo de extrato de romã. Treze homens com idade entre $37,6 \pm 3,6$ anos e IMC de $32,6 \pm 0,98$ compunham a amostra. Para o estudo os indivíduos tiveram de abster-se de alimentos que contêm polifenóis por 3 dias e dormir pelo menos 6 horas por dia; na noite anterior ao estudo era necessário o jejum de 8 horas. No quarto dia os indivíduos receberam duas cápsulas (uma tomada pela manhã e outra a noite) contendo 400 mg de extrato de romã cada, e vinte e quatro horas após o consumo da última cápsula foram avaliados a resposta antioxidante pelo método de ORAC no plasma dos indivíduos. A avaliação da atividade antioxidante do plasma mostrou um aumento de 2,5 vezes do valor ORAC, demonstrando seu papel protetor na circulação sanguínea. Estes resultados sugerem que o consumo da polpa da romã apresenta efeitos benéficos que podem ajudar no combate de várias alterações patológicas onde os radicais livres representam um dos fatores desencadeadores.

Análises *in vivo* da atividade antioxidante da PRL

6.4- Caracterização da variável Massa

Durante todo o período experimental e ao final do experimento (anteriormente ao teste de exaustão) os animais foram pesados para ratificar a homogeneidade da amostra e verificar se a suplementação teria algum efeito no ganho de peso dos

animais. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos, mostrando que a suplementação com ambas doses do extrato de polpa não teve efeito no peso dos animais (Tabela 10). O mesmo foi observado por outros estudos, mostrando que a suplementação com a polpa de romã não leva a alterações nos mecanismos envolvidos no ganho de peso dos animais ^{162, 202-204}.

6.5-Suplementação x Performance

Todos os animais do experimento foram submetidos a uma única sessão de exercício exaustivo (natação). Os ratos nadaram até a exaustão, apresentando tempo de natação entre 16 (mínimo) e 252 (máximo) minutos, sendo que a medida de tendência central foi determinada em $73,33 \pm 64,62$ minutos (Figura 27).

Os dois grupos suplementados com aPRL apresentaram valores superiores ao grupo não suplementado. O tempo de natação aumentou em 86,55% no grupo DI e 64,86% no grupo DII quando comparados ao grupo NAT. Estes dados foram estatisticamente significativos.

Nota-se, portanto, que a suplementação foi eficaz no retardo da fadiga, ou seja, contribuiu para que os animais persistissem por mais tempo na execução da atividade, o que para atletas se tornaria um grande auxílio no desempenho, e na melhora da performance.

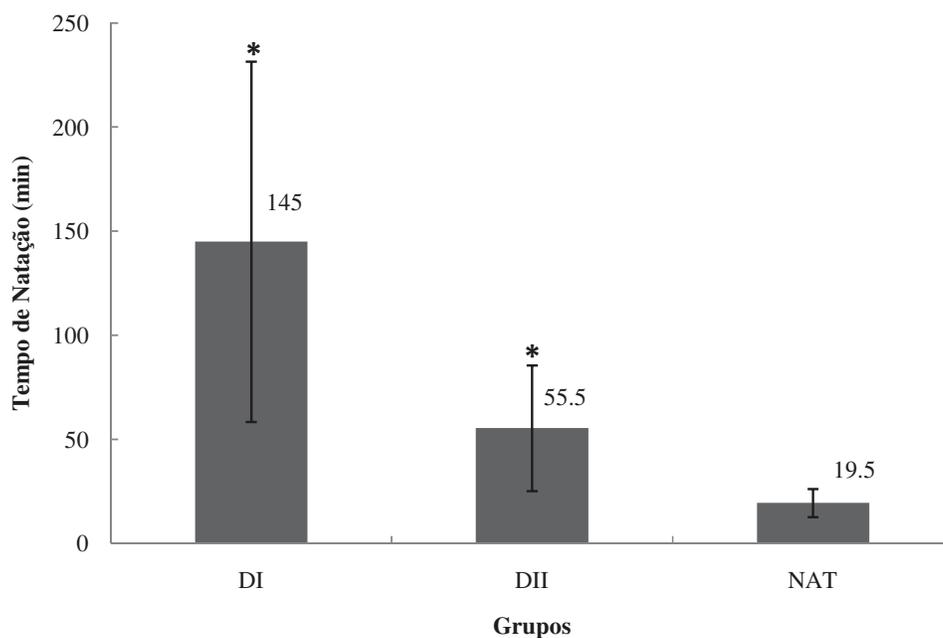


Figura 27- Efeito da suplementação com PRL no tempo de natação até a exaustão.

Os valores são expressos como média \pm DP.

* Amostra difere estatisticamente ($P < 0,05$) em relação ao grupo NAT.

Atualmente não há dados na literatura que descrevam qualquer associação do consumo de romã com o exercício físico. Em estudo conduzido por Nunes *et al.*, (2011)²⁰⁵ com ratos que foram suplementados com extrato de *Panax ginseng* não foi observada diferença significativa no tempo de exercício até a exaustão entre os grupos suplementados e não suplementados. A suplementação com maltodextrina também não foi eficaz no desempenho físico na pesquisa de Ruffo, (2004)²⁰⁶, embora o grupo suplementado com solução placebo tenha apresentado valores inferiores aos comparados com os grupos suplementados com a solução carboidratada (maltodextrina), embora não estatisticamente significativos. Todavia, Rodbari e Amirinia, (2011)²⁰⁷ analisou a performance pelo tempo de nado em ratos suplementados com blueberry, e concluiu que houve melhora no condicionamento aeróbio dos animais, resultados que corroboram com este estudo.

Os resultados obtidos neste estudo são muito promissores, e devem ser avaliados os efeitos da suplementação com PRL em outras condições de exercício para avaliar se os mesmos efeitos podem ser observados e correlacionados com a resposta antioxidante.

6.6-Relação do Malondialdeído (MDA) com a suplementação da PRL

A avaliação do marcador molecular de peroxidação lipídica mostrou que a suplementação com PRL diminuiu os valores de MDA no músculo gastrocnêmio (Figura 28).

Os níveis de MDA no gastrocnêmio dos grupos suplementados foram significativamente menores do que os níveis do grupo exercitado não suplementado ($P < 0,05$). Quando comparado os grupos exercitados com o grupo não treinado não houve diferenças estatísticas ($P = 0,707$), o mesmo foi observado entre as duas doses de suplementação (DI, $P = 0,107$ e DII, $P = 0,144$). Os resultados obtidos neste estudo demonstram que o tempo de natação dos animais não suplementados não gerou alterações significativas na peroxidação lipídica medidos através das concentrações de

MDA,entretanto, a suplementação com aPRLem ambas doses mostrou participar de forma significativa nos mecanismos de proteção contra a ação das ERO's à membrana lipídica das células, preservando sua estrutura molecular no músculo esquelético.

Na concentração plasmática, embora tenha havido diminuição dos níveis de MDA dos animais suplementados em comparação ao grupo NAT e aos animais sedentários, estes valores não apresentaram diferença significativa (Figura 29).

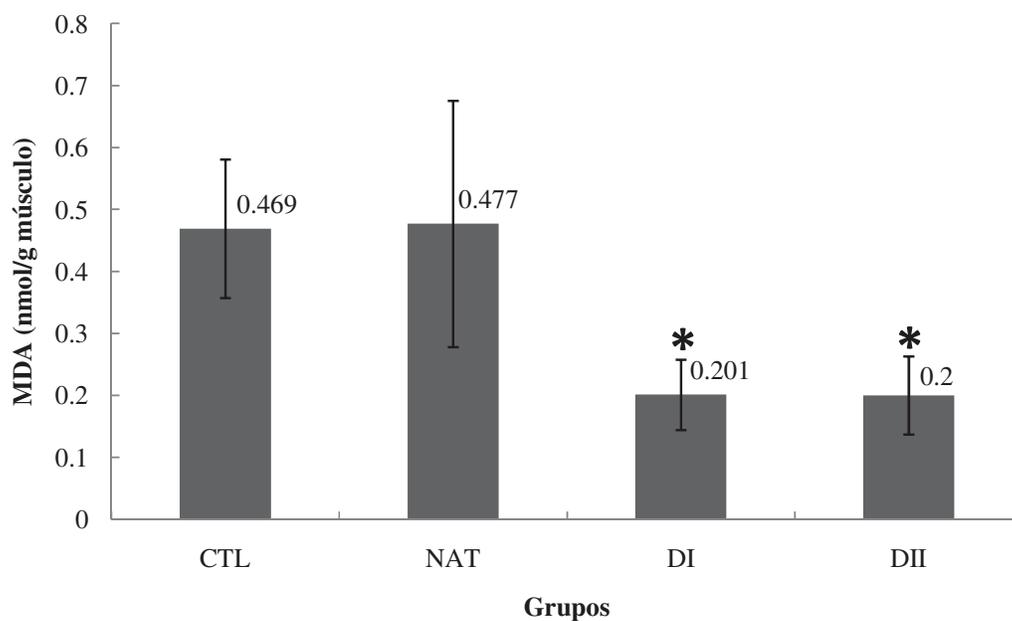


Figura 28 - Concentrações no músculo gastrocnêmio de MDA nos grupos CTL, DI, DII e NAT.

Os valores são expressos como média \pm DP.

* Amostra difere estatisticamente ($P < 0,05$) em relação ao grupo NAT e CTL.

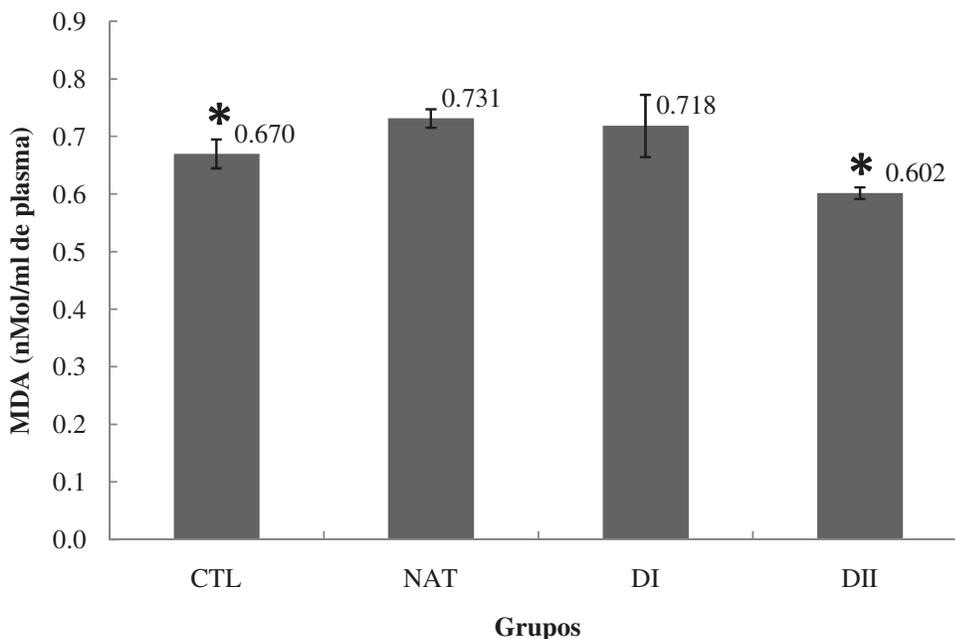


Figura 29 - Concentrações plasmáticas de MDA nos grupos DI, DII, NAT e CTL.

Os valores são expressos como média \pm DP.

* Amostra difere estatisticamente ($P < 0,05$) em relação ao grupo NAT e CTL.

As variáveis tempo de exercício físico e peroxidação lipídica não são diretamente proporcionais, todavia estão associadas positivamente em condições de exercício exaustiva sem prévio condicionamento físico^{51, 208}.

Avaliando os dados obtidos com a correção do tempo de natação do grupo em questão (MDA/ Δt natação), os resultados demonstraram diferença estatisticamente significativa (Figura 30 e 31). Os níveis no músculo gastrocnêmio apresentaram redução de 96,72% para DI e de 86% para DII, enquanto que, na concentração plasmática de MDA dos grupos DI e DII ocorreu uma redução de 91,57% e 81,67% respectivamente quando comparada ao grupo NAT. A presença de maior teor de compostos fenólicos pode explicar os menores valores observados de MDA para os animais suplementados com aPRL na dose II²⁰⁹.

Os compostos fenólicos mais considerados por inibirem o processo de peroxidação lipídica são: o ácido caféico, o ácido gálico e o ácido elágico³⁸. Esses compostos sequestram os radicais livres e inibem a peroxidação lipídica, agindona

proteção celular das macromoléculas celulares, incluindo o DNA, dos danos oxidativos

210

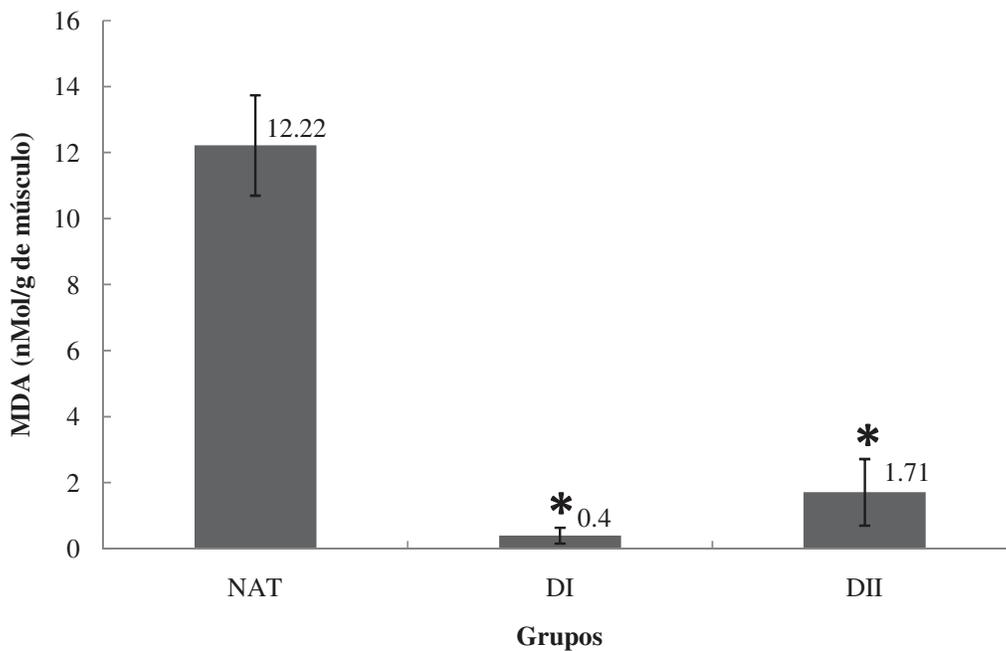


Figura 30 - Concentrações de MDA no músculo gastrocnêmio nos grupos corrigidos pelo tempo (MDA/ Δt natação).

Os valores são expressos como média \pm DP.

* Amostra difere estatisticamente ($P < 0,05$) em relação ao grupo NAT.

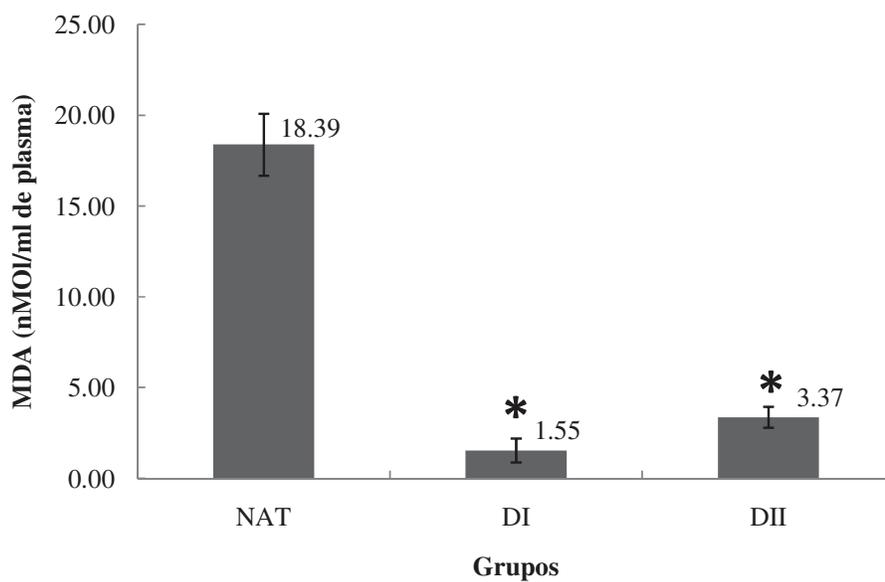


Figura 31 - Concentrações de MDA no plasma nos grupos corrigidos pelo tempo (MDA/ Δt natação).

Os valores são expressos como média \pm DP.

* Amostra difere estatisticamente ($P < 0,05$) em relação ao grupo NAT.

Na linha destes achados, Mcanulty *et al.*, (2005) ²¹¹ estudaram o efeito do exercício exaustivo em ratos treinados e não treinados, cuja avaliação dos biomarcadores do estresse oxidativo (atividade antioxidante enzimática e MDA) foi realizada em homogenado de coração de ratos. Os autores observaram uma redução na atividade antioxidante dos animais não treinados, embora sem a presença de dano oxidativo no tecido cardíaco, sugerindo que o miocárdio possui reserva que podem agir na proteção deste tecido²¹¹.

Neste trabalho foram observados resultados estatisticamente significantes da associação inversa entre o biomarcador MDA no músculo gastrocnêmio e plasma sanguíneo, o exercício exaustivo e a suplementação com PRL. Outros estudos evidenciaram a elevação do MDA pós-exercício físico exaustivo em ratos jovens e velhos ²¹²; em ratos treinados e não treinados, com elevações significantes de MDA entre controle (não exercitados) e exercitados, porém sem diferenças no tecido muscular entre treinados e não treinados submetidos à exaustão²¹³; em ratos expostos a exercícios (4 semanas, 1 vez ao dia) com sobrecarga ²¹⁴; imediatamente após o exercício exaustivo etambém 3 horas após a exaustão²¹⁵.

Kostrzycki *et al.*, (2013) verificou que 4 horas após uma única sessão de exercício físico com duração de 60 minutos, não houve aumento de MDA muscular ²¹⁶. Da mesma forma, em outra pesquisa, o treinamento de natação por seis semanas com sessão de exercício uma vez ao dia e duração de 60 minutos, não foi capaz de produzir modificações no MDA muscular imediatamente após ou 24 horas após a última sessão de treinamento ²¹⁷. Deminice *et al.*, (2009) não encontrou correlações entre a variação nos biomarcadores de peroxidação lipídica e performance²¹⁸.

6.7- Avaliação dos efeitos daPRL nos níveis de peróxido de hidrogênio

Durante o metabolismo celular, a maior parte do oxigênio molecular sofre completa redução à água. Contudo uma pequena parte do O_2 é convertida a produtos parcialmente reduzidos, como o radical ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila. Essas espécies, radicalares ou não, são oxidantes potentes e podem causar danos teciduais²¹⁹. Assim como o MDA, a concentração de peróxido de hidrogênio foi determinada como indicador da resposta celular às condições oxidativas presentes em situações normais ou de estresse oxidativo.

Neste estudo o conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) presente no tecido muscular e plasma mostrou que os animais tratados com aPRL diferiram significativamente dos animais que não foram suplementados.

A peroxidação lipídica e a concentração de peróxido de hidrogênio estão intimamente relacionadas, já que o peróxido de hidrogênio na célula pode ser convertido à radical hidroxila, altamente reativo e iniciador do processo de peroxidação lipídica²²⁰. Dessa forma, pôde-se observar semelhante tendência na quantificação de MDA e peróxido de hidrogênio, em que os grupos NAT e CTL (não suplementados) exibiram as maiores concentrações de peróxido de hidrogênio e, conseqüentemente, aumento na peroxidação lipídica no tecido muscular e no plasma. Já os animais tratados com o extrato apresentaram resultados inferiores a estes grupos na avaliação de H_2O_2 e MDA. Os níveis de peróxido de hidrogênio no gastrocnêmio apresentaram uma redução, significativa estatisticamente, de 66,04% para a DI e de 54,11% para DII em relação ao grupo NAT. E comparando os dados com o grupo que não realizou o teste de exaustão (CTL) houve ainda assim uma diminuição de 27,91% e 46,66% para DI e DII respectivamente, entretanto, tais valores de peróxido de hidrogênio apresentaram diferença estatística apenas entre os grupos CTL e DI (Figura 32).

Quando analisados os resultados em relação ao plasma nota-se que a DII foi mais efetiva na redução dos níveis de peróxido de hidrogênio. Em relação ao grupo que realizou a natação (NAT) os valores de diminuição em percentual foram de 21,72 em DI e 78,93 para DII. Quando comparado com o grupo CTL houve uma diminuição de 46,41% em DII e um aumento de 49,77% para DI, lembrando que o grupo CTL não realizou o exercício agudo da natação (Figura 33). Tais resultados não foram estatisticamente significantes entre os grupos analisados.

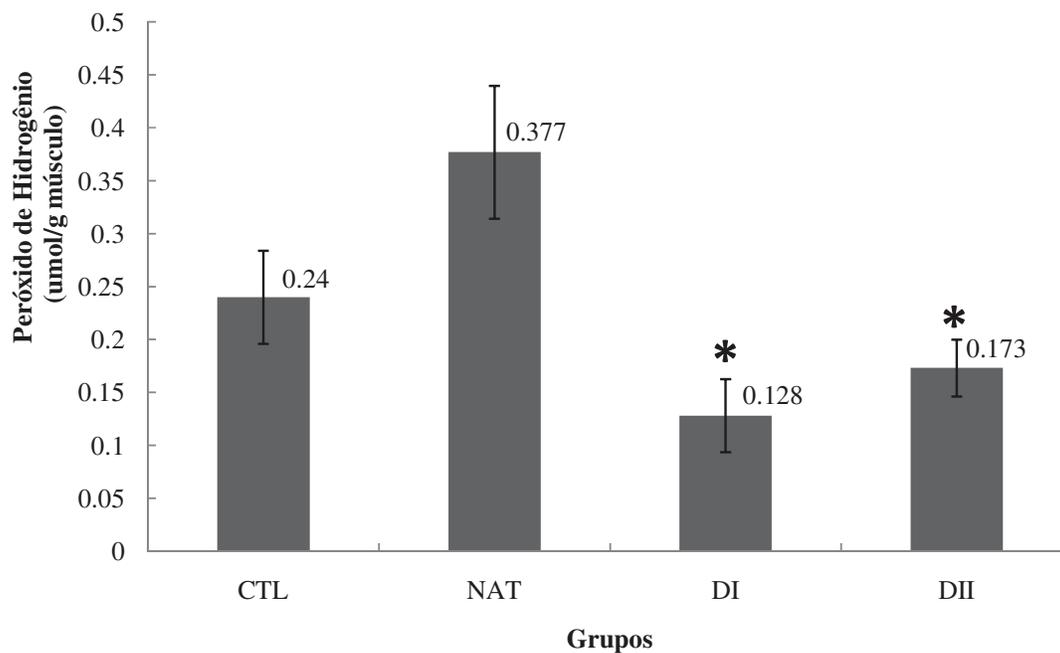


Figura 32 - Conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em tecido muscular.

Os valores são expressos como média \pm DP.

* Amostra difere estatisticamente ($P < 0,05$) em relação ao grupo NAT.

Assim como na avaliação do MDA no plasma, no parâmetro peróxido de hidrogênio, DII foi mais eficaz que DI.

No plasma, os teores de peróxido de hidrogênio se mostraram mais elevados que os observados no tecido muscular, o que sugere que neste modelo experimental os maiores danos decorrentes da produção de ERO's são observados no plasma. Matsuda e Shimomura, (2013) ²²¹ obtiveram a maior produção de H_2O_2 no tecido adiposo de animais obesos e sugeriram que este tecido seria a principal fonte de aumento das ERO's no plasma, uma vez que em outros tecidos, como fígado, músculo e aorta, os autores observaram valores inferiores.

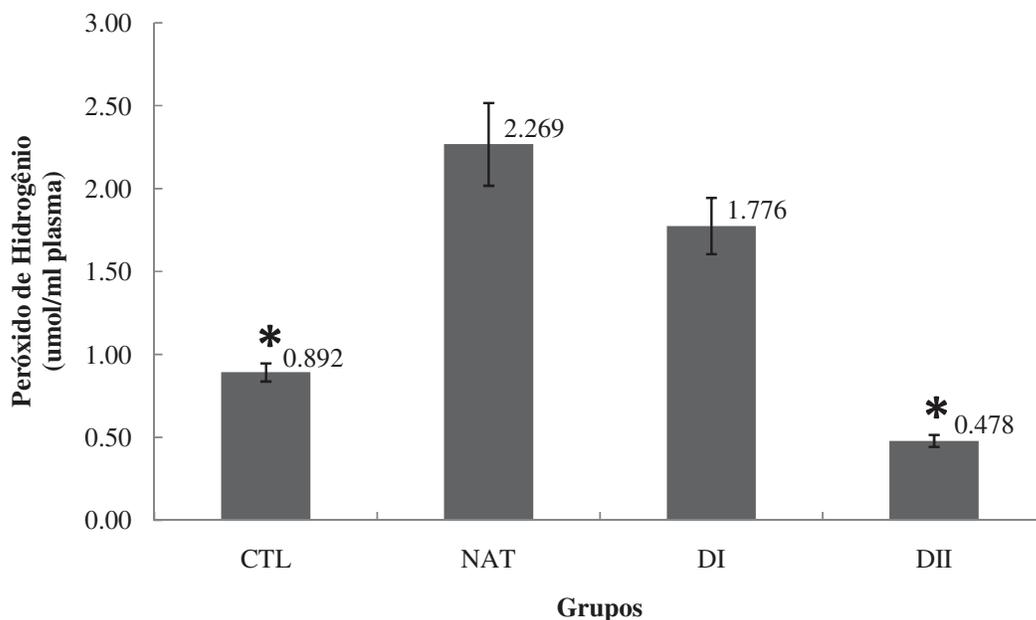


Figura 33 - Conteúdo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) no plasma.

Os valores são expressos como média \pm DP.

* Amostra difere estatisticamente ($P < 0,05$) em relação ao grupo NAT.

Em estudo conduzido por Caetano *et al.*, (2010)²²² os animais com obesidade induzida por dieta hiperlipídica tratados com fenil éster do ácido caféico (composto fenólico presente em própolis) durante 15 e 22 dias, mostraram que a suplementação não foi capaz de reduzir significativamente os níveis de peróxido de hidrogênio no tecido hepático e adiposo quando comparado aos animais controle com dieta comercial.

O exercício intenso é descrito como capaz de causar isquemia fazendo com que o ATP seja convertido em ADP, AMP, inosina e hipoxantina. Sob tais condições a enzima xantina desidrogenase intracelular é convertida em xantina oxidase, que utiliza o O₂ como aceptor de elétrons, gerando diretamente peróxido de hidrogênio⁵¹. Sob tais condições, o tempo de nado dos ratos pode ter causado diferentes aumentos de peróxido de hidrogênio, já que os animais suplementados nadaram significativamente durante mais tempo. Assim, abaixo segue os gráficos da concentração de peróxido com a correção pelo tempo de nado (Figura 34 e 35).

Ao realizar a correção dos níveis de peróxido de hidrogênio pelo tempo de natação dos animais do grupo, os resultados obtidos mostraram valores significativamente inferiores para os animais que receberam suplementação nas duas doses utilizadas de PRL, no músculo gastrocnêmio e no plasma.

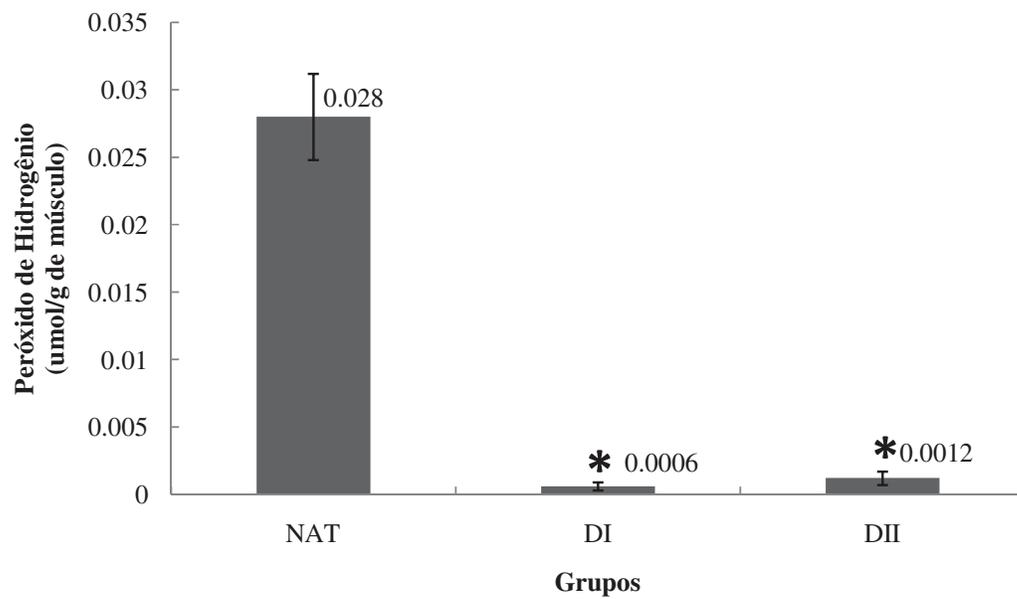


Figura 34 - Concentrações de peróxido de hidrogênio no músculo gastrocnêmio nos grupos corrigidos pelo tempo (MDA/ Δt natação).

Os valores são expressos como média \pm DP.

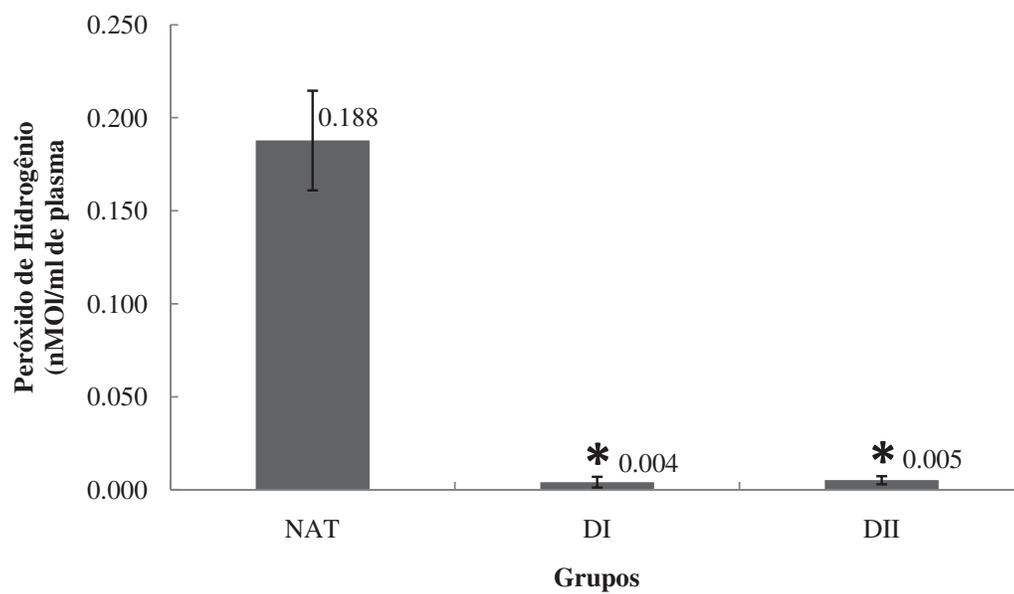


Figura 35 - Concentrações de peróxido de hidrogênio no plasma nos grupos corrigidos pelo tempo (MDA/ Δ t natação).

Os valores são expressos como média \pm DP.

* Amostra difere estatisticamente ($P < 0,05$) em relação ao grupo NAT.

A distorção da associação entre a produção de metabólitos e duração do exercício seria corrigida pela inserção de um tempo fixo de exercício, porém, dessa forma não poderia ter sido avaliado o efeito da suplementação na resistência à fadiga, por isso optou-se pelo teste de exaustão com tempo indeterminado, que permitiu observar o efeito positivo da PRL nos parâmetros avaliados, não necessitando de um protocolo de tempo fixo que provasse seu efeito protetor antioxidante. Nakamura *et al.*, (2005)²²³ concluiu que o esforço percebido em um tempo fixo de testes exaustivos não poderia ser considerado um indicador de capacidade aeróbia, pois não prediz a tolerância ao esforço individual, o grau de ativação neuromuscular intra-individual, relacionado à fadiga.

6.8- Efeito da PRL no sistema de defesa enzimático contra o estresse oxidativo

6.8.1 Atividade da superóxido dismutase (SOD) em espectrofotômetro e PAGE

Para avaliar a resposta antioxidante dos animais suplementados com a polpa de romã, foi analisada a ativação da enzima superóxido dismutase no fígado dos grupos experimentais. Os resultados apresentados na Figura 50 mostram que os animais tratados com a PRL nas duas doses tiveram uma ativação da SOD semelhante aos animais que não realizaram o teste de exaustão (CTL), mostrando que nesses animais a atividade da enzima foi reduzida de forma significativa se comparado ao grupo que realizou o exercício físico e não recebeu a suplementação (grupo NAT). Quando avaliado o efeito das duas doses de suplementação, a atividade da SOD não apresentou diferença significativa, mostrando que, nestas condições experimentais, ambas

concentrações de fenólicos utilizadas foram capazes de sequestrar ou inativar os radicais superóxidos gerados durante o exercício.

A atividade da SOD também foi determinada pelo método de gel de atividade ou PAGE, visando a comparação entre os tratamentos. Analisando os resultados obtidos (Figura 36) com amostras dos 4 grupos experimentais em função da intensidade das bandas, verifica-se que o grupo NAT apresentou uma maior ativação da SOD em relação aos grupos CTL, DI e DII, que não apresentaram diferenças evidentes. Tais resultados estão em concordância com os valores desta enzima obtidos pelo método espectrofotométrico (Figura 37), em que os resultados mostraram que as duas concentrações de extrato etanólico de polpa de romã foram capazes de agir com antioxidante externo, poupando os mecanismos de defesa enzimático.

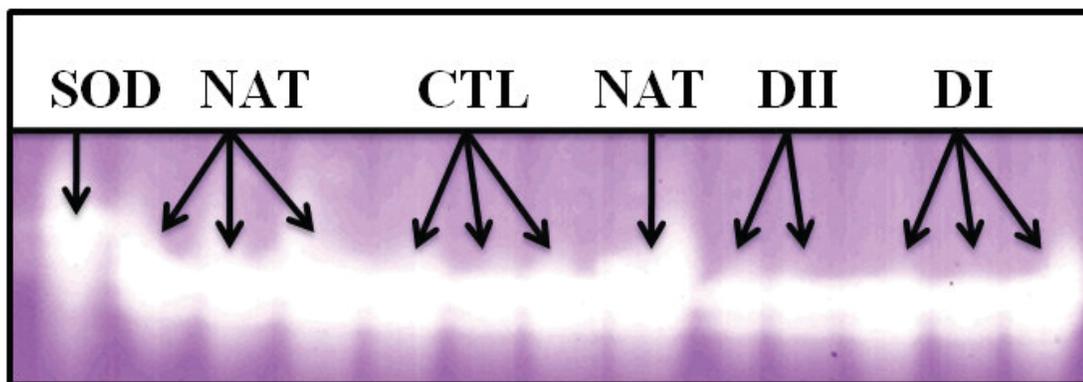


Figura 36 -Atividade específica da SOD em tecido hepático avaliado em PAGE.

O mesmo comportamento foi observado em estudo com ratos diabéticos que foram tratados com extrato aquoso de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), no qual os autores observaram uma redução significativa da atividade enzimática da SOD no tecido hepático e cerebral quando comparados ao grupo diabético que recebeu água¹⁵⁹. A patologia *diabetes mellitus* está associada ao aumento de radicais livres, demonstrando que a presença de compostos com atividade antioxidante cooperam ao tratamento da doença, participando na resposta antioxidante celular²²⁴.

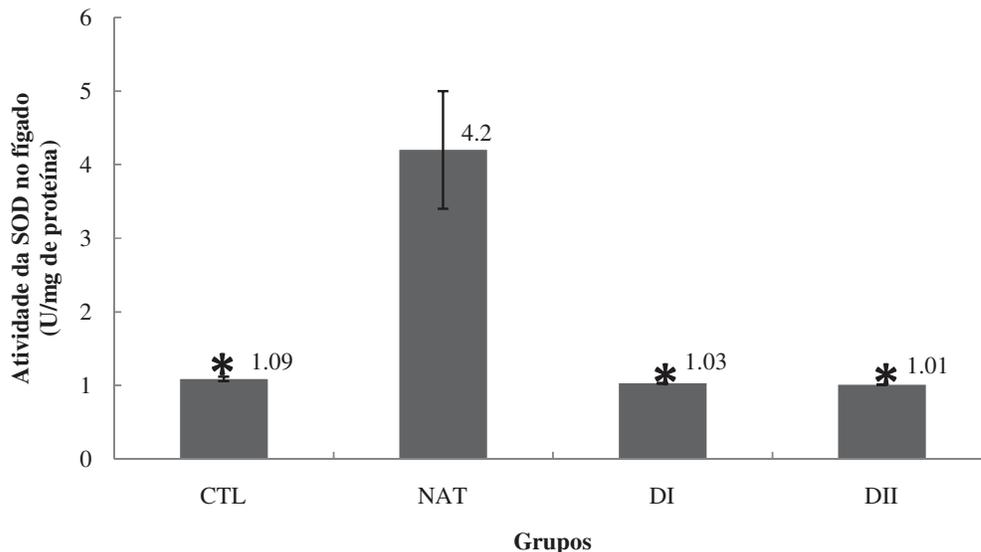


Figura 37 - Atividade específica da SOD em tecido hepático em espectrofotômetro.

Os valores são expressos como média \pm DP.

* Amostra difere estatisticamente ($P < 0,05$) em relação ao grupo NAT.

Ajaikumar, Asheef *et al.*, (2005)¹⁴² investigaram a capacidade anti-inflamatória da casca do fruto romã na forma de extrato etanólico administrado em duas doses (250 mg/kg peso e 500 mg) com uma hora de antecedência à indução da úlcera gástrica e verificaram que no grupo dos ratos tratados, os níveis das enzimas antioxidantes, incluindo a SOD, reduziram de maneira significativa, e também a área da lesão nesses animais se mostrou menor¹⁴². Em modelo animal de úlcera gástrica, Shu, Qixin *et al.*, (2009)²²⁵ analisaram o efeito anti-ulceroso da suplementação com extrato etanólico de romã nas doses distintas de taninos: 50, 150 e 500 mg/kg peso/dia. Os resultados mostraram uma inibição significativa da formação de ulceração gástrica, avaliada pelos danos à mucosa gástrica, mas também a inibição, estatisticamente significativa, da elevação da atividade específica da SOD na mucosa gástrica, demonstrando que os taninos desempenharam um efeito protetor anti-úlceroso o que pode estar associado ao poder inibidor na propagação da geração de radicais livres derivados do oxigênio.

Em modelo de infarto induzido por isoproterenol, ratos Wistar tratados previamente com extrato da semente ou de sua fração butanólica de romã nas doses de 100 ou 300 mg/kg/dia por 21 dias, apresentaram redução no ritmo cardíaco, nos

níveis de creatina quinase no soro e da lactato desidrogenase e a diminuição da atividade das enzimas SOD e CAT no coração²²⁶.

Com uma pesquisa semelhante, Dong, Tong *et al.*, (2012)²²⁷ observaram o efeito protetor dos polifenóis de romã sobre a função cardíaca em ratos com infarto isquemia/reperfusão (I/R). As doses de polifenóis de romã ministradas foram de 150, 300 e 600 mg / kg, e os ratos foram sujeitos a 45 minutos de oclusão da artéria coronária principal seguido de 180 minutos de reperfusão para induzir lesão I/R no miocárdio. Os resultados obtidos mostraram que os três grupos que receberam polifenóis da romã tiveram melhora significativa na função cardíaca, diminuição do conteúdo plasmáticos de lactato desidrogenase, creatina quinase e malondialdeído, diminuição da atividade da SOD e o tamanho da área do enfarte. Em síntese, os polifenóis da romã neste estudo puderam proteger a função cardíaca de ratos com I/R provavelmente em associação com suas ações na melhora da atividade sequestradora de radicais livres de oxigênio, diminuindo assim o dano causado pelos radicais e ERO's no miocárdio.

Apesar de muitos estudos mostrarem efeitos reduzindo atividade enzimática para o uso de extratos de plantas e frutos com atividade antioxidante, alguns autores como Arouca, (2012)²²⁸, observou o aumento significativo da enzima antioxidante SOD no grupo suplementado com *Eleutherococcus senticosus* (ginseng Siberiano) no tecido muscular de ratos quando comparado com o grupo não suplementado. Resultado semelhante foi observado na administração de ácido ferúlico (10mg/kg) em ratos por 45 dias²²⁹.

Quando avaliado os resultados para a atividade da SOD entre os grupos não treinados (CTL) e exercitados (NAT), observa-se um aumento significativo no grupo ligado ao exercício físico, sendo a única diferença entre os grupos o fato de ter realizado o exercício ou não. É possível explicar a diferença observada pela maior demanda de geração de energia pela mitocôndria para realização da atividade física²³⁰. Amorim, (2007)²³¹ fazendo uso de protocolo semelhante ao do presente estudo, também verificou que a atividade SOD no músculo gastrocnêmio foi significativamente maior nos animais exercitados em relação ao grupo controle.

Rossi, (2001) ²³² avaliou a atividade da SOD nos músculos gastrocnêmio e sóleo e verificou valores significativamente maiores nos grupos exercitados. Há uma grande diferença entre a atividade da SOD dos animais não treinados e exercitados, tendo em vista que a maior atividade desta enzima nos grupos exercitados pode significar uma resposta adaptativa à exposição exacerbada aos radicais O₂ provenientes da atividade física realizada²¹. A atenuação de dano muscular pelo exercício físico está fortemente ligada à capacidade antioxidante aumentada do músculo e a sua habilidade em modular o estresse oxidativo proporcionado pelo exercício físico ²³³. Em nosso estudo, o que foi observado é que a suplementação com PRL foi capaz de agir como agente antioxidante exógeno, poupando a ativação da enzima SOD no ataque a geração aumentada de superóxidos causada no exercício exaustivo a que foi submetido os grupos.

6.8.2- Atividade da catalase (CAT) em espectrofotômetro e PAGE

Nas etapas da cascata de reações que ocorrem nos tecidos como mecanismo de defesa contra o excesso de radicais ou EROs gerados no metabolismo ou em condições adversas, a enzima catalase está no grupo de enzimas de segunda linha de defesa²².

A análise da atividade da catalase no fígado dos animais nos quatro grupos mostrou valores semelhantes entre os grupos não treinados e suplementados, e significativamente elevados para os animais que realizaram a natação e não foram suplementados (Figura 38 e 39), dados que apresentaram comportamento semelhante ao observado para a enzima SOD. O grupo NAT apresentou um aumento de 90,22% em relação a DI, de 93,18% em relação a DII e de 90,9% em relação ao CTL. A ativação da catalase não apresentou diferença significativa entre os grupos suplementados e sedentário. Em termos absolutos, a atividade da CAT no grupo NAT apresentou valores de 10,23 a 14,66 vezes maiores em comparação à sua atividade no grupo DI e DII respectivamente. Estes resultados foram observados nos dois métodos utilizados para avaliação da atividade da CAT, seja por espectrometria ou gel de atividade por PAGE.

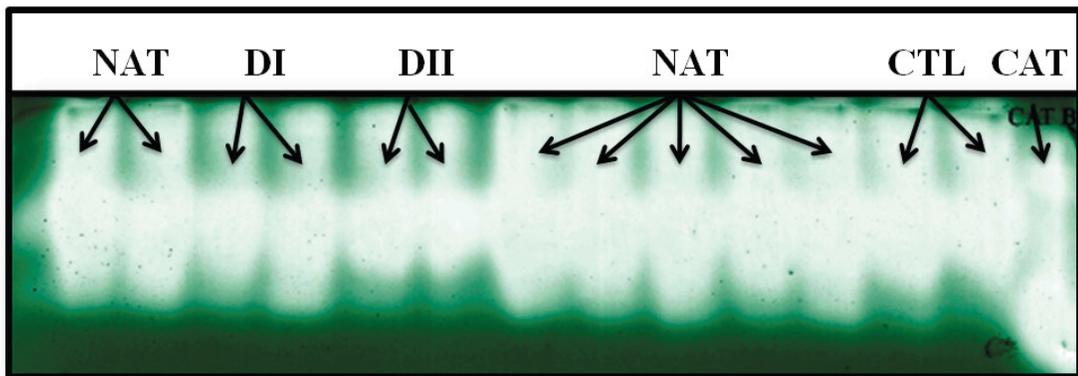


Figura 38 - Atividade específica da CAT em tecido hepático avaliado em PAGE.

O tecido hepático dos animais suplementados nas doses utilizadas mostrou uma melhor proteção antioxidante comparado aos grupos que não receberam aPRL, o que pode ser devido aos compostos antioxidantes presentes nos extratos, agindo de forma coadjuvante à enzima CAT e levando a uma redução significativa da atividade desta quando comparado ao grupo NAT. Mesmo com maiores tempos de exercício físico os grupos que receberam o tratamento mostraram-se mais protegidos de possíveis danos oxidativos.

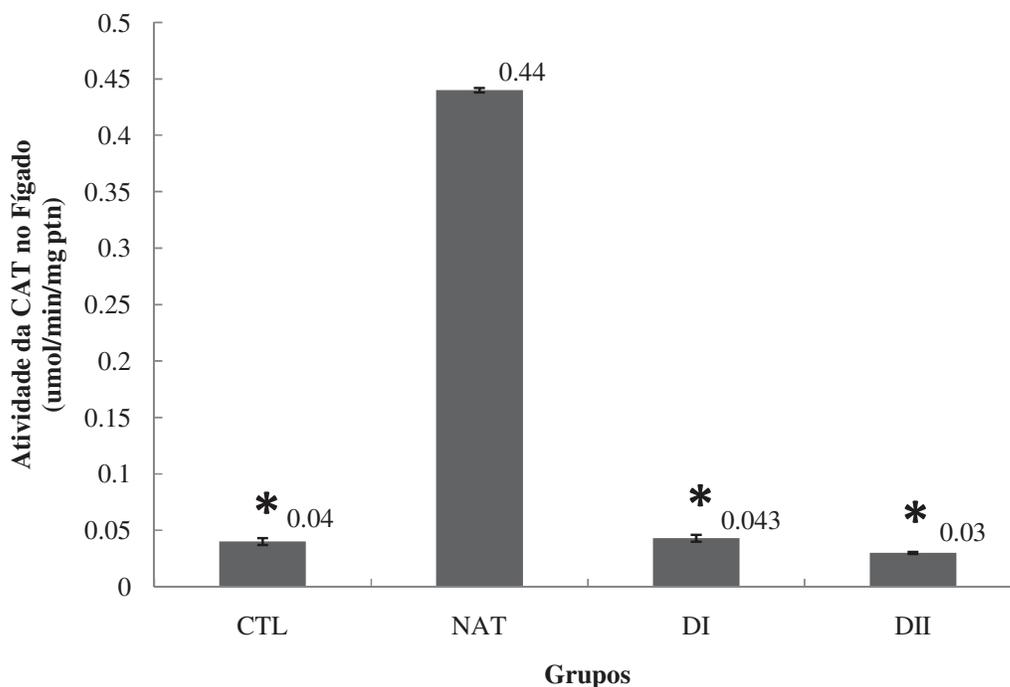


Figura 39 - Atividade específica da CAT em tecido hepático em espectrofotômetro.

Os valores são expressos como média \pm DP.

* Amostra difere estatisticamente ($P < 0,05$) em relação ao grupo NAT.

Os resultados existentes na literatura sobre como a atividade da CAT é afetada pelo exercício físico são contraditórios. Alguns estudos mostram aumento da atividade da CAT após o exercício físico^{234, 235}. Outros estudos, não apresentam alteração na CAT após o exercício²³⁶⁻²³⁸. Enquantoque alguns estudos mostram queda na atividade da CAT após a atividade física^{171, 239}. O exercício físico interfere no equilíbrio do sistema defensivo antioxidante, de forma que quando a fração antioxidante é comprometida há um aumento à suscetibilidade ao dano muscular²⁴⁰.

A atividade física regular pode influenciar positivamente as defesas antioxidantes e promover melhoria da função cardíaca. Entretanto, o exercício realizado de modo exacerbado resulta em maior formação de radicais livres, podendo levar a um estado de estresse oxidativo, de forma adaptativa o organismo aumenta a atividades das enzimas antioxidantes visando minimizar os efeitos do estresse oxidativo²⁴¹. O aumento da atividade celular e do ataque oxidativo, ocasionado pelo exercício, é menos deletério quando compensado por uma elevação da atividade dos mecanismos celulares de defesa antioxidante²⁴².

As respostas das enzimas antioxidantes parecem ser dependentes do ergômetro utilizado: natação²⁴³, corrida em esteira^{244, 245} ou corrida em roda de atividade espontânea²⁴⁶, do protocolo de exercício contínuo²⁴⁴ ou intermitente²⁴⁷, assim como do tipo de fibra muscular²⁴⁸ e da espécie estudada: rato²⁴⁴, camundongos²⁴⁹ ou outros mamíferos²⁴⁶.

A suplementação com compostos bioativos em modelos de exercício físico relacionado ao dano oxidativo foi visto por Dunlap *et al.*, (2006)²⁵⁰ que suplementou cães de trenó com blueberry orgânica selvagem durante 2 meses com 2% do peso corporal (cerca de 20 g). Os cães de trenó correram por 7 quilômetros. O estudo demonstrou que a dieta com blueberry aumentou a quantidade de antioxidantes disponíveis no plasma dos animais quando comparado aos animais do grupo controle, aumentando a proteção das células contra os possíveis danos gerados pelas ERO's.

Em outros modelos animais de aumento da geração de radicais livres e ERO's, o uso de compostos isolados ou extrato de frutos e partes de alimentos mostraram efeitos favoráveis na resposta do organismo contra os efeitos deletérios⁵¹. Neste sentido, Yilmaz *et al.*, (2004)²⁵¹ demonstraram que a suplementação com fenil éster do ácido caféico na dosagem de 10 µM.mL⁻¹.kg⁻¹ foi capaz de reduzir a atividade da enzima CAT do fígado de ratos diabéticos. Um estudo com extrato etanólico da casca da romã em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina obteve resultados semelhantes. Os animais tratados com extrato etanólico da casca da romã (10 e 20 mg/kg peso corporal de extrato etanólico da casca da romã por 4 semanas) por via intraperitoneal tiveram diminuição significativamente da atividade da CAT no fígado e rins de ratos diabéticos, mostrando claramente o efeito protetor como antioxidante²⁵².

Chidambara *et al.*, (2002)²⁵³ destacou o poder antioxidante do extrato etanólico da casca da romã em ratos com estresse oxidativo induzido por tetracloreto de carbono (CCl₄). Os animais receberam pré-tratamento de 7 dias com 50 mg/kg peso/dia de extrato etanólico da casca da romã e posterior tratamento com CCl₄, e observaram valores de CAT semelhantes ao grupo controle. Os dados histopatológicos do fígado, visando determinar o efeito hepatoprotetor do extrato casca romã, demonstrou que o grupo que recebeu o tratamento com o extrato teve menos efeitos danosos induzido pelo tetracloreto de carbono, sendo capazes de restaurar a arquitetura hepática normal ao contrário do grupo controle experimental.

Sudheesh e Vijayalakshmi,²⁵⁴ conduziu um estudo em que os ratos saudáveis eram gavados com uma dosagem de 10 mg/kg peso corporal/dia de extrato etanólico de romã durante 45 dias, demonstrando um potencial efeito antioxidante. As concentrações da enzima CAT apresentaram diminuição significativa, acompanhadas também de outras enzimas avaliadas como a SOD, GPX e GR.

6.8.3- Atividade da glutathiona redutase (GR) em espectrofotômetro e PAGE

A glutathiona redutase (GR) age de maneira indireta no combate das ERO's, regenerando a GSH a partir da sua forma oxidada (GSSG)³.

Essa enzima foi estudada por espectrofotômetro e também por PAGE, calculada com base na quantificação das proteínas totais e comparado os resultados com o gel. Os resultados estão demonstrados nas figuras (Figura 40 e 41).

Os tratamentos apresentaram diferenças significativas na atividade da GR quando comparados os grupos CTL e DII, e NAT e DII. A DII foi capaz de reduzir a atividade específica da GR em comparação aos grupos CTL, NAT e DI. Já a DI não apresentou diferença entre NAT e CTL.

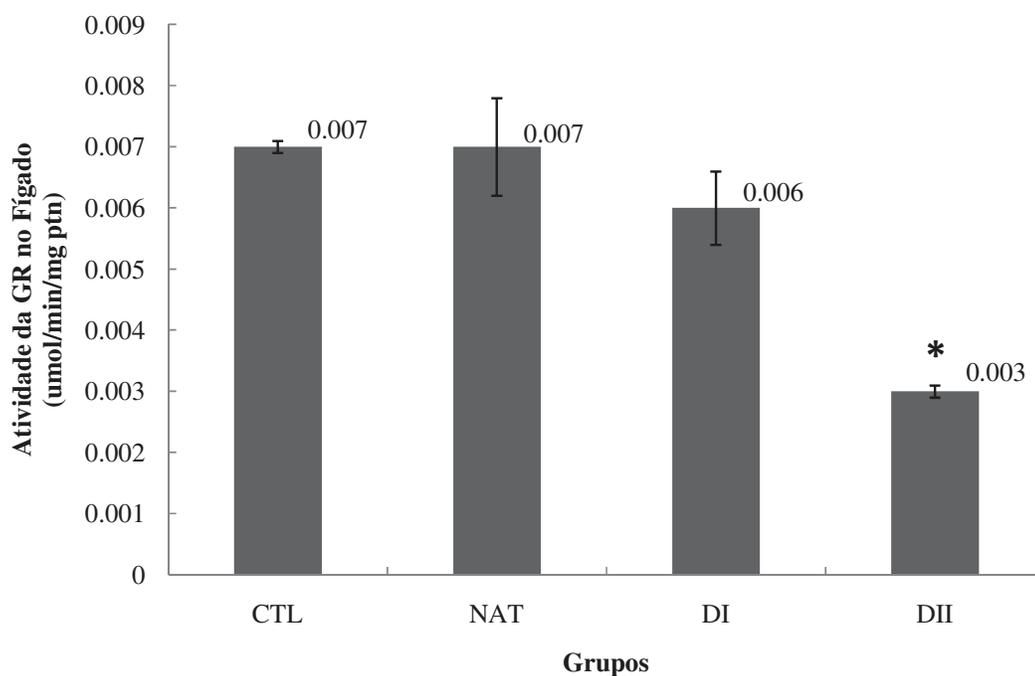


Figura 40 - Atividade específica da GR em tecido hepático em espectrofotômetro.

Os valores são expressos como média \pm DP.

* Amostra difere estatisticamente ($P < 0,05$) em relação ao grupo NAT e CTL.

Esses dados mostram que o tratamento com PRL na dose de 1,75 mmol de polifenóis/dia contribui de maneira efetiva para melhorar a resposta aos radicais e ERO's gerados no tecido hepático dos animais não treinados e que efetuaram o teste de exaustão.

A GR, responsável por regenerar a GSSG ao seu estado reduzido (GSH) através da oxidação do NADPH, tem sua ação antioxidante de forma indireta ao agir como

coadjuvante no processo de defesa⁸¹. Os grupos não tratados com a polpa de romã apresentaram as maiores atividades específicas, podendo estar associadas a ação de outras enzimas, como a glutathiona peroxidase e glutathiona oxidase, todas pertencentes à família da glutathiona. Do mesmo modo, a atividade da GR está aumentada no grupo DI, esta dose possivelmente foi baixa para agir como antioxidante nesta etapa do mecanismo de defesa.

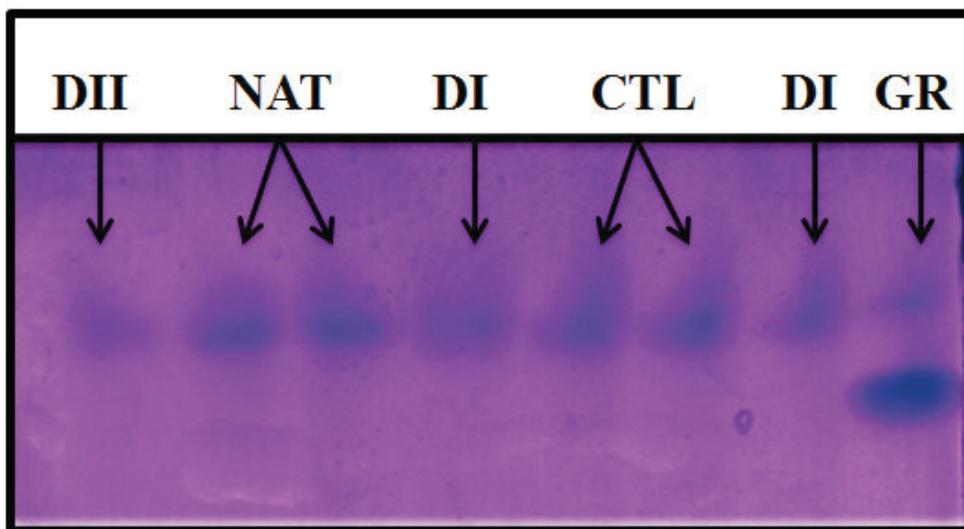


Figura 41 - Atividade específica da GR em tecido hepático avaliada em PAGE.

Souza, Ebaid *et al.*, (2008)²⁵⁵ avaliaram a atividade da GR em ratos submetidos à dieta rica em sacarose que foram tratados com N-acetilcisteína. Os animais foram divididos em 3 grupos com 6 animais cada e receberam 2 mg/grupo de N-acetilcisteína diluído na água de consumo durante 22 dias. Este composto é um organosulfurado presente no alho com propriedades antioxidantes, e não observou diferença significativa com o grupo não tratado. Por outro lado, Gaurava, Shyam *et al.*, (2001)²⁵⁶ avaliaram o potencial antioxidante do suco de romã obtido por compressão da polpa em ratos expostos à altitude simulada de 6.096 m (condição de hipóxia). Os ratos expostos à hipóxia e tratados previamente com suco concentrado de romã (0,1 ml/rato/dia por 15 dias) tiveram uma redução de 49,4% da atividade específica da enzima GR no músculo e fígado, confirmando a hipótese da propriedade antioxidante da polpa da romã.

Efeito semelhante foi observado em estudo com extrato da casca da romã com ratos com diabetes induzida por aloxana. Os animais que receberam o tratamento com 200 mg/kg peso/dia, após 15 dias revelaram uma diminuição das enzimas SOD, CAT e GR no tecido hepático em comparação com o grupo diabético que não recebeu o extrato. Os autores associaram o potencial antioxidante do fruto ao teor de polifenóis totais contidos na casca da romã, fato que o mesmo trabalho evidenciou realizando análises no extrato da casca²⁵⁷.

6.8.4- Atividade da glutathione-S-transferase (GST) em espectrofotômetro

A GST é uma enzima que catalisa a conjugação de glutathione com outras moléculas, assim, funcionando como um passo intermediário na desintoxicação de diversas substâncias tóxicas²⁵⁸.

Neste estudo, os animais que receberam a suplementação com PRL apresentaram valores de ativação da GST significativamente menores que os animais que não foram tratados com PRL.

Analisando os dados dos animais suplementados foi observado, como na enzima GR, que a DII foi mais eficiente na redução da atividade da GST que DI. Quando comparados estes valores aos observados para os animais do grupo CTL e NAT, o tratamento com PRL na dosagem de 1,75 mmol de polifenóis/dia mostrou uma redução, significativa estatisticamente, de ativação na GST de 68,68% e 63,95% comparados respectivamente ao grupo NAT e CTL (Figura 42).

Em estudo realizado por Reddy e Fernandes,(1999)²⁴⁹ foi observado que o treinamento físico, de modo intermitente e de alta intensidade, elevou a atividade da enzima GST no rim, fígado, coração e musculatura esquelética de camundongos. Além disso, nesse mesmo estudo, o treinamento físico elevou os níveis de glutathione peroxidase e glutathione total. Esses resultados indicam que o exercício realizado de maneira regular é benéfico no sentido de diminuir os níveis de peroxidação lipídica e elevar a atividade das enzimas atioxidantes, entretanto, quando o mesmo é realizado de modo casual e com alta intensidade pode ser prejudicial ao organismo.

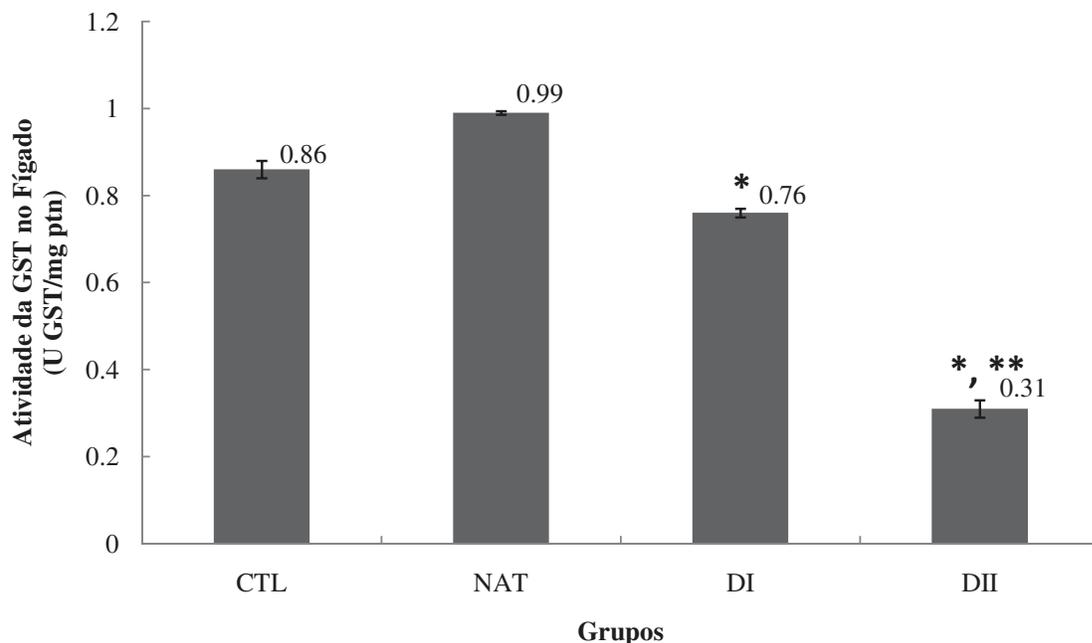


Figura 42 - Atividade específica da GST em tecido hepático em espectrofotômetro.

Os valores são expressos como média \pm DP.

* Amostra difere estatisticamente ($P < 0,05$) em relação ao grupo NAT.

** Amostra difere estatisticamente ($P < 0,05$) em relação ao grupo CTL.

Sotelo-Felix *et al.*, (2002) ²⁵⁹ estudando o efeito do extrato de alecrim administrado por via oral em ratos na concentração de 200mg/kg peso corporal/dia, durante cinco dias, observaram um efeito hepatoprotetor contra o estresse agudo provocado por tetracloreto de carbono. O alecrim atuou como antioxidante, eliminando os radicais triclorometilperoxil formados pela metabolização hepática do agente químico agressor, e diminuiu significativamente a atividade do sistema de desintoxicação dependente da GST no tecido hepático.

Em um estudo sobre a doença de Alzheimer que objetivou avaliar o efeito do extrato etanólico de sementes de romã sobre o desempenho cognitivo de camundongos com idade induzida por escopolaminapôde-se notar que a administração crônica durante 21 dias do extrato etanólico de sementes de romã inverteu a idade induzida e os déficits de retenção de memória. O extrato foi capaz também de reduzir os níveis de peroxidação lipídica e da atividade da enzima glutationa-s-transferase nos tecidos cerebrais ²⁶⁰.

Faria *et al.*, (2007) ²⁶¹ pesquisou sobre o efeito do suco de romã no estresse oxidativo em tecido hepático, para este propósito os camundongos consumiram o suco por 4 semanas prévias a análise. O suco era substituído pela água no período noturno e cada animal bebia em média 13,5 ml de suco/noite. Posteriormente os marcadores celulares oxidativos foram verificados e notou-se que os níveis de glutathione peroxidase, redutase e s-transferase tiveram sua atividade diminuída quando comparada ao grupo dos camundongos controle que receberam apenas água e ração.

A redução da enzima GST também foi demonstrada por Moneim *et al.*, (2011) ²⁶² que teve como objetivo investigar as propriedades antioxidantes da romã em tecidos hepáticos e renais de ratos. O grupo controle recebeu soro fisiológico (0,2 ml de solução salina /rato) por via oral através de um tubo epigástrico, o segundo grupo recebeu por administração oral também 3 ml/kg peso corporal e o terceiro grupo recebeu 200 mg de extrato metanólico da casca da romã/kg peso corporal por 21 dias. Os dados demonstraram que tanto o grupo que recebeu o extrato como o grupo que recebeu o suco reduziram a atividade das enzimas antioxidantes, incluindo a GST, no tecido renal.

7. CONCLUSÃO

A partir dos achados, podemos concluir que:

- APRL, seja de cultivo doméstico ou comercial, apresenta teores de compostos fenólicos totais próximos ao de frutas consideradas como tendo alto poder antioxidante;
- A atividade antioxidante pelos métodos ABTS e ORAC da PRL apresenta potencial antioxidante semelhante a frutos considerados como agentes que combatem radicais livres gerados em condições de estresse físico;
- A suplementação com extrato etanólico de polpa de romã nas doses de 0,875 mmol de polifenóis totais/dia e 1,75 mmol de polifenóis/dia mostrou, em ensaio *in vivo*, ser capaz de aumentar o tempo de natação em ratos Wistar sem treinamento;
- Os compostos bioativos presentes na PRL participaram como agentes antioxidantes não enzimáticos no combate aos radicais livres gerados no

exercício exaustivo, sendo a dose de 1,75 mmol de polifenóis/dia que apresenta o maior potencial *in vitro* e *in vivo*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Heidemann IT, Boehs AE, Fernandes GCM, Wosny AdM, Marchi JG. Promoção da saúde e qualidade de vida: concepções da Carta de Ottawa em produção científica. doi: 10.4025/ciencucuidsaude. v11i3. 13554. *Ciência, Cuidado e Saúde*. 2013;11(3):613-9.
2. Atoui AK, Mansouri A, Boskou G, Kefalas P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*. 2005;89(1):27-36.
3. Barreiros A, David JM, David JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*. 2006;29(1):113.
4. Carvalho Td, Nóbrega Ad, Lazzoli JK, Magni JRT, Rezende L, Drummond FA, et al. Posição oficial da Sociedade Brasileira de Medicina do Esporte: atividade física e saúde. *Rev Bras Med Esporte*. 1996;2(4):79-81.
5. Heinzelman FL, von Muhlen BK, dos Santos Schleiniger C, Leite MDP, Strey MN. Corpos em revista: a construção de padrões de beleza na Vogue Brasil. *Psicologia em Revista*. 2013;18(3):470-89.
6. Gupte AA, Lyon CJ, Hsueh WA. Nuclear Factor (Erythroid-Derived 2)-Like-2 Factor (Nrf2), a Key Regulator of the Antioxidant Response to Protect Against Atherosclerosis and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Current diabetes reports*. 2013:1-10.
7. Haslam E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of natural products*. 1996;59(2):205.
8. Ji LL. Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrients. *Free Radical Biology and Medicine*. 1995;18(6):1079-86.
9. Tiidus PM. Radical species in inflammation and overtraining. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 1998;76(5):533-8.
10. Powers SK, Lennon SL, editors. *Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle* 1999: Cambridge Univ Press.

11. Lansky EP, Newman RA. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of ethnopharmacology*. 2007;109(2):177-206.
12. Jurenka J. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): a review. *Alternative medicine review*. 2008;13(2):128-44.
13. Holloszy JO. Biochemical adaptations in muscle effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry*. 1967;242(9):2278-82.
14. Gollnick P, Piehl K, Saltin B. Selective glycogen depletion pattern in human muscle fibres after exercise of varying intensity and at varying pedalling rates. *The Journal of physiology*. 1974;241(1):45-57.
15. Essen B, Kaijser L. Regulation of glycolysis in intermittent exercise in man. *The Journal of physiology*. 1978;281(1):499-511.
16. Sahlin K, Tonkonogi M, Söderlund K. Energy supply and muscle fatigue in humans. *Acta physiologica scandinavica*. 1998;162(3):261-6.
17. Zoll J, Sanchez H, N'Guessan B, Ribera F, Lampert E, Bigard X, et al. Physical activity changes the regulation of mitochondrial respiration in human skeletal muscle. *The Journal of physiology*. 2002;543(1):191-200.
18. Higgins JPT, Green S, Collaboration C. *Cochrane handbook for systematic reviews of interventions*: Wiley Online Library; 2008.
19. Tumas R, Cardoso AL, Damiani D. Síndrome metabólica em adolescentes com sobrepeso e obesidade. *Rev paul pediatr*. 2007;25(3):214-20.
20. Kleiner SM, Greenwood-Robinson M. *High-performance nutrition: the total eating plan to maximize your workout*: J. Wiley; 1996.
21. Cruzat VF, Rogero MM, Borges MC, Tirapegui J. Aspectos atuais sobre estresse oxidativo, exercícios físicos e suplementação. *Rev Bras Med Esporte*. 2007;13(5):336-42.
22. Ferreira A, Matsubara L. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 1997;43(1):61-8.

23. Santos MCBd, Vieira JAdM, César BN, Novaes MRCG. Hábitos e perfil socioeconômico do paciente aterosclerótico no Brasil; Habits and socioeconomic profile of the atherosclerotic patient in Brazil. *Comun ciênc saúde*. 2012;22(3):247-56.
24. Scherr C, Ribeiro JP. Influência do modo de preparo de alimentos na prevenção da aterosclerose. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 2013;59(2):148-54.
25. Burrell K, Allen S, Bramson G, Brooks N, Callis R, Carlstrom T, et al. Confinement physics of H-mode discharges in DIII-D. *Plasma Physics and Controlled Fusion*. 1989;31:1649.
26. Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, et al. Mediation of poly (ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science's STKE*. 2002;297(5579):259.
27. Wozniak AL, Bulayeva NN, Watson CS. Xenoestrogens at picomolar to nanomolar concentrations trigger membrane estrogen receptor- α -mediated Ca^{2+} fluxes and prolactin release in GH3/B6 pituitary tumor cells. *Environmental health perspectives*. 2005;113(4):431.
28. Vieira Junior RC, Silva CMS, Araújo MBd, Garcia A, Voltarelli VA, Reis Filho ADd, et al. Aerobic swimming training increases the activity of antioxidant enzymes and the glycogen content in the skeletal muscle of rats. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. 2013;19(3):204-8.
29. Schneider CD, Silveira MM, Moreira JCF, Belló-Klein A, Oliveira AR. Efeito do exercício de ultrarresistência sobre parâmetros de estresse oxidativo; Effect of the ultra-endurance exercise on oxidative stress parameters. *Rev bras med esporte*. 2009;15(2):89-92.
30. Schneider CD, Oliveira AR. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Rev Bras Med Esporte*. 2004;10(4):308-13.
31. Vancini RL, Lira CAB, Aboulafia J, Nouailhetas VLA. Radical livre, estresse oxidativo e exercício. *Centro de Estudos de Fisiologia do Exercício da Universidade Federal de São Paulo*. 2005:1-10.

32. Duarte J, Appell H, Carvalho F, Bastos M, Soares J. Endothelium-derived oxidative stress may contribute to exercise-induced muscle damage. *International journal of sports medicine*. 1993;14:440-.
33. Childs A, Jacobs C, Kaminski T, Halliwell B, Leeuwenburgh C. Supplementation with vitamin C and N-acetyl-cysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle injury induced by eccentric exercise. *Free Radical Biology and Medicine*. 2001;31(6):745-53.
34. Voltarelli VA, Bechara LRG, Brum PC. Efeitos dos treinamentos físicos aeróbicos e resistido sobre a atrofia muscular esquelética na insuficiência cardíaca. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo*. 2013;23(1, supl. A):3-6.
35. Halliwell B, Aeschbach R, Löliger J, Aruoma O. The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*. 1995;33(7):601-17.
36. Pompella A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. *International journal for vitamin and nutrition research Internationale Zeitschrift fur Vitamin-und Ernährungsforschung Journal international de vitaminologie et de nutrition*. 1997;67(5):289.
37. Halliwell B, Gutteridge J. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in enzymology*. 1990;186:1.
38. Bianchi MdLP, Antunes LMG. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev Nutr*. 1999;12(2):123-30.
39. Halliwell B, Gutteridge J. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1986;246(2):501-14.
40. Eaton J. Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: mysteries of the bestiary. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1991;118(1):3-4.
41. Floyd RA. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *The FASEB journal*. 1990;4(9):2587-97.
42. Hatherill J, Till GO, Ward PA. Mechanisms of oxidant-induced changes in erythrocytes. *Inflammation Research*. 1991;32(3):351-8.

43. Nowak JZ. Oxidative stress, polyunsaturated fatty acids-derived oxidation products and bisretinoids as potential inducers of CNS diseases: focus on age-related macular degeneration. *Pharmacological Reports*. 2013;65(288):288-304.
44. Moraes MSd, Priuli RMA, Chiaravalloti RM. Health and the young migrant. *Cadernos Saúde Coletiva*. 2013;21(3):332-7.
45. Córdova A, Navas FJ. Os radicais livres eo dano muscular produzido pelo exercício: papel dos antioxidantes. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. 2000;6(5):204-8.
46. Dekkers JC DL, Kemper HCG. The Roc of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. *Sports Med* 1996;21:213-38.
47. Kuipers H. Exercise-induced muscle damage. *Int J Sports Med*. 1994;15:132-5.
48. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*. 2002;82(1):47-95.
49. Liu Y, Imlay JA. Cell death from antibiotics without the involvement of reactive oxygen species. *Science*. 2013;339(6124):1210-3.
50. Sahlin K EK, Cizinsky S. . Changes in plasma hypoxanthine and free radical markers during exercise in man. *Acta Physiol Scand* 1991;142:275-81.
51. Schneider CD, Oliveira Ad. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Rev Bras Med Esporte*. 2004;10(4):308-13.
52. Meydani M EW, Handelman G, et al. Protective effect of vitamin E on exercise-induced oxidative damage in young and older adults. *J Physiol*. 1993;264:992-8.
53. Karakaya SE, AA Tas, S. Antioxidant activity of some foods containing phenolic compounds. *International journal of food sciences and nutrition*. 2001;52(6):501-8.
54. Berger MM. Can oxidative damage be treated nutritionally? *Clinical nutrition*. 2005;24(2):172-83.
55. Mathew S, Abraham TE. Studies on the antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts, through various in vitro models. *Food Chemistry*. 2006;94(4):520-8.

56. Milligan C, Rees DC, Ellory JC, Osei A, Browning JA, Hannemann A, et al. A non-electrolyte haemolysis assay for diagnosis and prognosis of sickle cell disease. *The Journal of physiology*. 2013;591(6):1463-74.
57. Hardin CC, Rajendran K, Manomohan G, Tambe DT, Butler JP, Fredberg JJ, et al. Glassy Dynamics, Cell Mechanics and Endothelial Permeability. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2013.
58. Diplock AT. Antioxidants and disease prevention. *Molecular aspects of medicine*. 1994;15(4):293.
59. Rebuglio Velloso JC, Chibinski Parabocz G, Manente FA, Tonin Ribas J, Werle Lima L. Alterações metabólicas e inflamatórias em condições de estresse oxidativo. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. 2013;34(3):305-12.
60. Sarmiento RA, Silva FM, Sbruzzi G, Schaan BDA, de Almeida JC. Micronutrientes Antioxidantes e Risco Cardiovascular em Pacientes com Diabetes: Uma Revisão Sistemática. *Arq Bras Cardiol*. 2013;101(3):240-8.
61. Novaes GM, Silva MJDS, Achkar MT, Vilegas W. Compostos antioxidantes e sua importância nos organismos *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*. 2014;11(2):535-9.
62. Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American journal of clinical nutrition*. 2001;74(4):418-25.
63. Wolfe KL, Kang X, He X, Dong M, Zhang Q, Liu RH. Cellular antioxidant activity of common fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008;56(18):8418-26.
64. Shahidi F, Janitha P, Wanasundara P. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*. 1992;32(1):67-103.
65. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*. 1998;56(11):317-33.
66. Donnelly JK, Robinson DS. Invited Review Free Radicals in Foods. *Free radical research*. 1995;22(2):147-76.
67. Azevedo RRdS, Almeida VGA, Silva EMF, Silva AdL, Gomes NRdS, Matias TMdS, et al. Potencial Antioxidante e Antibacteriano do Extrato Etanólico de Plantas Usadas como Chás. *Revista Semente*. 2013;6(6).

68. Júnior LR, Höehr NF, Vellasco AP, Kubota LT. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Quim Nova*. 2001;24(1):112-9.
69. Reddy ACP, Fernandes G. Modulation of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in salivary gland and other tissues in mice by moderate treadmill exercise. *Aging (Milan, Italy)*. 1999;11(4):246.
70. Jenkins R. Free radical chemistry. Relationship to exercise. *Sports medicine (Auckland, NZ)*. 1988;5(3):156.
71. Pereira B, Rosa LFBP, Bechara EJH, Curi R. Antioxidant enzyme activities in the lymphoid organs and macrophages of rats trained to perform moderate exercise. *Ciênc cult(São Paulo)*. 1996;48(1/2):43-6.
72. Araújo MB, Prada FJA, Mello MAR. Estresse oxidativo no exercício, modelos animais e intensidade do esforço. *Motriz Revista de Educação Física UNESP*. 2007;12(3):307-12.
73. Gate L, Paul J, Ba GN, Tew K, Tapiero H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 1999;53(4):169-80.
74. Hassan H, Fridovich I. Regulation of the synthesis of superoxide dismutase in *Escherichia coli*. Induction by methyl viologen. *Journal of Biological Chemistry*. 1977;252(21):7667-72.
75. Gregory EM, Goscin SA, Fridovich I. Superoxide dismutase and oxygen toxicity in a eukaryote. *Journal of bacteriology*. 1974;117(2):456-60.
76. Salvador M, Henriques JAP. *Radicais Livres E a Resposta Celular Ao Estresse Oxidativo*. Canoas: Editora ULBRA; 2004.
77. Fridovich I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;893(1):13-8.
78. Kirkman HN, Gaetani GF. Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1984;81(14):4343-7.
79. Brigelius-Flohé R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999;27(9):951-65.

80. Hermes-Lima M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. *Functional metabolism: Regulation and adaptation*. 2004;1:319-66.
81. Huber PC, Almeida WP, de Fátima Â. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova*. 2008;31(5):1170-9.
82. Otto EPP, Rudolf L, Albrecht W. The Refined Structure of the Selenoenzyme Glutathione Peroxidase at 0.2-nm Resolution. *European Journal of Biochemistry*. 2005;133(1):51-69.
83. Nordberg J, Arnér ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*. 2001;31(11):1287-312.
84. George SG. Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic-conjugating enzymes in fish. *Aquatic toxicology*. 1994;4:37-85.
85. Marionnet D, Deschaux P, Reynaud S. Possible implication of macrophages in the regulation of cytochrome P450 activities in carp (*Cyprinus carpio*). *Fish & Shellfish Immunology*. 2006;21(1):80-91.
86. Dixon DP, Laphorn A, Edwards R. Plant glutathione transferases. *Genome Biol*. 2002;3(3):3004.1-.10.
87. Melgar Riol M, Valiñas N, Fernández Ga, Pérez López M. Glutathione-s-transferases from rainbow trout liver and freshly isolated hepatocytes: purification and characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2001;128(2):227-35.
88. Lionel G, Marta A. Genomics and proteomics offers new hopes towards a personalized approach to lung cancer prevention and treatment. *Electron Biot*. 2003;6:168-73.
89. Melo MSOM, Mancini Filho J. Antioxidantes naturais do fruto do dendezeiro (*Elaeis guineensis*, Jacq); Natural antioxidants from palm fruit (*Elaeis guineensis*, Jacq). *Rev farm bioquim Univ São Paulo*. 1989;25(2):147-57.
90. Giada R, de Lourdes M. Avaliação da capacidade antioxidante dos compostos fenólicos do cotilédono da semente de girassol (*Helianthus annuus* L.) rajada; Evaluation of the antioxidant capacity of phenolic compounds of the sunflower cotyledon

(*Helianthus annuus* L.): Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas; 2006.

91. de Almeida JN, dos Santos GR, Beteto FM, de Medeiros LG, Oba A, Shimokomaki M, et al. Suplementação de selênio quelatado na ração e qualidade da carne de frango. *Semina: Ciências Agrárias*. 2013;33:3117-22.

92. Bobbio FO, Bobbio PA. *Introdução à química de alimentos*: Livraria Varela São Paulo; 2003.

93. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition reviews*. 1994;52(8):253-65.

94. Rosa J, Godoy R, Oiano Neto J, Campos R, Matta V, Freire CA, et al. Desenvolvimento de um método de análise de vitamina C em alimentos por cromatografia líquida de alta eficiência e exclusão iônica. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2007;27:787-92.

95. Rodríguez H, Landete JM, Rivas Bdl, Muñoz R. Metabolism of food phenolic acids by *Lactobacillus plantarum*. *Food Chemistry*. 2008;107(4):1393-8.

96. Di Mascio P, Devasagayam T, Kaiser S, Sies H. Carotenoids, tocopherols and thiols as biological singlet molecular oxygen quenchers. *Biochem Soc Trans*. 1990;18(6):1054-6.

97. Sousa CMM, Silva HR, Vieira-Jr GM, Ayres MCC, Costa C, Araújo DS, et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*. 2007;30(2):351-5.

98. Soares SE. Ácidos fenólicos como antioxidantes; Phenolic acids as antioxidants. *Rev Nutr*. 2002;15(1):71-81.

99. Lima A. Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.). 2008. 219f: Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)—Universidade de São Paulo, São Paulo; 2008.

100. Vancini RL, Lira CAB, Júnior DPG, Silva AC, Nouailhetas VLA. Influência do exercício sobre a produção de radicais livres. *Rev Bras Ativ Fis Saúde*. 2005;10:47-58.

101. Lima A, Mancini-Filho J. Compostos com atividade antioxidante no fruto Pequi (*Caryocar brasiliense*, L). *Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição (NUTRIRE)*, São Paulo. 2005;30:310.
102. Giehl MR, Dal Bosco SM, Laflor CM, Weber B. Eficácia dos flavonóides da uva, vinho tinto e suco de uva tinto na prevenção e no tratamento secundário da aterosclerose. *Sci med*. 2007;17(3):145-55.
103. Halliwell B. Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health? *Cardiovascular research*. 2007;73(2):341-7.
104. Yang CS, Landau JM, Huang M-T, Newmark HL. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual review of nutrition*. 2001;21(1):381-406.
105. Giada MdLR. Importância dos compostos fenólicos da dieta na promoção da saúde humana. *Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde*. 2009;12(4).
106. Jardim FA, Lima A, Mendonça R, Pinto R, Mancini D, Mancini-Filho J. Compostos fenólicos da polpa e sementes de romã (*Punica granatum*, L.): atividade antioxidante e protetora em células MDCK Phenolic compounds from pulp and seeds of pomegranate (*Punica granatum*, L.): antioxidant activity and protection of MDCK. *Alimentos e Nutrição Araraquara*. 2011;21(4):509-18.
107. Roesler R, Malta LG, Carrasco LC, Holanda RB, Sousa CAS, Pastore GM. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2007;27(1):53-60.
108. Rocha WS, Lopes RM, Silva D, Vieira R, Silva J, Agostini-Costa T. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. *Rev Bras Frut, Jaboticabal*. 2011;33(4):1215-21.
109. Nardini M, D'Aquino M, Tomassi G, Gentili V, Di Felice M, Scaccini C. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives. *Free Radical Biology and Medicine*. 1995;19(5):541-52.
110. Soares SE. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Rev nutr*. 2002;15(1):71-81.
111. Cerqueira FM, de Medeiros MHG, Augusto O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Química Nova*. 2007;30(2):441.
112. Leite HP, Sarni RS. Radicais livres, antioxidantes e nutrição. *Rev Bras Nutr Clin*. 2003;18(2):60-5.

113. Silva FA, Borges MFM, Ferreira MA. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Química Nova*. 1999;22(1):94-103.
114. Barroso AKM, Torres AG, Branco VNC, Ferreira A, Finotelli PV, Freitas SP, et al. Brown and golden flaxseed: chemical and functional properties of the seeds and the cold-pressed oils. *Ciência Rural*. 2014;44(1):181-7.
115. Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*. 2001;127(1):183-98.
116. Sánchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1999;76(2):270-6.
117. Scalfi L, Fogliano V, Pentangelo A, Graziani G, Giordano I, Ritieni A. Antioxidant activity and general fruit characteristics in different ecotypes of Corbarini small tomatoes. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2000;48(4):1363-6.
118. Mazza G, Kay CD, Cottrell T, Holub BJ. Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2002;50(26):7731-7.
119. Huang D, Ou B, Ronald L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2005;53(6):1841-56.
120. Cao G, Alessio HM, Cutler RG. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*. 1993;14(3):303-11.
121. Prior RL, Cao G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999;27(11):1173-81.
122. Cozzolino SMF. Biodisponibilidade de minerais. *Rev nutr PUCAMP*. 1997;10(2):87-98.
123. Stahl W, van den Berg H, Arthur J, Bast A, Dainty J, Faulks RM, et al. Bioavailability and metabolism. *Molecular aspects of medicine*. 2002;23(1-3):39.
124. Germano M, d'Angelo V, Biasini T, Sanogo R, De Pasquale R, Catania S. Evaluation of the antioxidant properties and bioavailability of free and bound phenolic acids from *Trichilia emetica* Vahl. *Journal of ethnopharmacology*. 2006;105(3):368-73.
125. Manach C, Mazur A, Scalbert A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current opinion in lipidology*. 2005;16(1):77-84.

126. Grüdtner VS, Weingrill P, Fernandes AL. Aspectos da absorção no metabolismo do cálcio e vitamina D. *Rev Bras Reumatol*. 1997;37(3):143-52.
127. Holst B, Williamson G. Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Current opinion in biotechnology*. 2008;19(2):73-82.
128. Nardini M, Natella F, Scaccini C, Ghiselli A. Phenolic acids from beer are absorbed and extensively metabolized in humans. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2006;17(1):14-22.
129. Manach C, Donovan JL. Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free radical research*. 2004;38(8):771.
130. Cozzolino SMF. Biodisponibilidade de Micronutrientes: Sao Paulo: MANOLE, 878p; 2005.
131. Rahman I, Biswas SK, Kirkham PA. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochemical pharmacology*. 2006;72(11):1439-52.
132. Barros ZMP. Cascas de frutas tropicais como fonte de antioxidantes para enriquecimento de suco pronto. Piracicaba: Dissertação de Mestrado. Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade de São Paulo (USP). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz; 2011.
133. Sousa CAC, Santos I, Silva LD. Apropriação de concepções de Neuman e Braden na prevenção de úlceras de pressão; Appropriation of Neuman and Braden conceptions for the prevention of pressure sores. *Rev Enferm UERJ*. 2004;12(3):280-5.
134. Patricio FB, Silveira MSS, Coelho MdFB, Pereira BC, Porfírio GI. Propagação vegetativa de romã em diferentes substratos. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*. 2012;6(4).
135. Jardini FA, Mancini Filho J. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e sementes da romã (*Punica granatum*, L.). *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2007;43(1):137-47.
136. Werkman C, Granato D, Kerbauy W, Sampaio F, Brandão A, Rode S. Aplicações terapêuticas da *Punica granatum* L.(romã). *Rev Bras PI Med, Botucatu*. 2008;10(3):104-11.
137. Wolfson ER, Moses BST. *The book of the pomegranate*: Scholars Pr; 1988.
138. Fleuriet A, Billot J. *Fruit phenolics*: CRC press; 1990.

139. González-Molina E, Moreno DA, García-Viguera C. A new drink rich in healthy bioactives combining lemon and pomegranate juices. *Food Chemistry*. 2009;115(4):1364-72.
140. Singh R, Chidambara Murthy K, Jayaprakasha G. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002;50(1):81-6.
141. Khenouf S, Gharzouli K, Amira S, Gharzouli A. Effects of *Quercus ilex* L. and *Punica granatum* L. polyphenols against ethanol-induced gastric damage in rats. *Die Pharmazie*. 1999;54(1):75.
142. Ajaikumar K, Asheef M, Babu B, Padikkala J. The inhibition of gastric mucosal injury by *Punica granatum* L. (pomegranate)methanolic extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005;96(1):171-6.
143. Loren DJ, Seeram NP, Schulman RN, Holtzman DM. Maternal dietary supplementation with pomegranate juice is neuroprotective in an animal model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Pediatric research*. 2005;57(6):858-64.
144. Azadzi KM, Schulman RN, Aviram M, Siroky MB. Oxidative stress in arteriogenic erectile dysfunction: prophylactic role of antioxidants. *The Journal of urology*. 2005;174(1):386-93.
145. Kaur G, Jabbar Z, Athar M, Alam MS. *Punica granatum* (pomegranate) flower extract possesses potent antioxidant activity and abrogates Fe-NTA induced hepatotoxicity in mice. *Food and Chemical Toxicology*. 2006;44(7):984-93.
146. Esmailzadeh A, Tahbaz F, Gaieni I, Alavi-Majd H, Azadbakht L. Concentrated pomegranate juice improves lipid profiles in diabetic patients with hyperlipidemia. *Journal of Medicinal Food*. 2004;7(3):305-8.
147. Aviram M, Dornfeld L. Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. *Atherosclerosis*. 2001;158(1):195-8.
148. Aviram M, Rosenblat M, Gaitini D, Nitecki S, Hoffman A, Dornfeld L, et al. Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clinical Nutrition*. 2004;23(3):423-33.

149. Machado JGCF. Estratégias de marketing na indústria de amendoim: um estudo em empresas da Alta Paulista. *Latin American Journal of Business Management*. 2013;3(2).
150. Cobeia. Legislação & Ética. Disponível em: <http://vsites.unb.br/ib/ceua/COBEA.htm> 2009 [06 de Agosto de 2012].
151. Katz DL. Revisão em epidemiologia, bioestatística e medicina preventiva; *Epidemiology biostatistics and preventive medicine review*: Revinter; 2001.
152. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*. 1999;299:152-78.
153. Stieven A, Moreira J, Silva C. Óleos essenciais de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess.): avaliação das atividades microbiana e antioxidante. *Eclética Química*. 2009;34(3):7-13.
154. Kuskoski EM, Asuero AG, Troncoso AM, Mancini-Filho J, Fett R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2005;25(4):726-32.
155. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999;26(9):1231-7.
156. Cao G, Prior RL. [5] Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. *Methods in enzymology*. 1999;299:50-62.
157. Glazer AN. [14] Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species. *Methods in enzymology*. 1990;186:161-8.
158. Prior RL, Cao G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods¹. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999;27(11-12):1173-81.
159. Silva AMdO, Andrade-Wartha ERSd, Carvalho EBTd, Lima Ad, Novoa AV, Mancini-Filho J. Effect of aqueous rosemary extract (*Rosmarinus officinalis* L.) on the oxidative stress of diabetic rats. *Revista de Nutrição*. 2011;24(1):121-30.
160. Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA. *Guide to the care and use of experimental animals*: Canadian Council on Animal Care Ottawa; 1993.

161. Aviram M, Dornfeld L, Rosenblat M, Volkova N, Kaplan M, Coleman R, et al. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *The American journal of clinical nutrition*. 2000;71(5):1062-76.
162. Kaplan M, Hayek T, Raz A, Coleman R, Dornfeld L, Vaya J, et al. Pomegranate juice supplementation to atherosclerotic mice reduces macrophage lipid peroxidation, cellular cholesterol accumulation and development of atherosclerosis. *The Journal of nutrition*. 2001;131(8):2082-9.
163. Gobatto CA, de Mello MAR, Sibuya CY, de Azevedo JRM, dos Santos LA, Kokubun E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 2001;130(1):21-7.
164. Nascimento Ed, Leandro CVG, Amorim MAF, Palmeiras A, Ferro TC, Castro CMMBd, et al. Efeitos do estresse agudo de contenção, do estresse crônico de natação e da administração de glutamina sobre a liberação de superóxido por macrófagos alveolares de ratos. *Revista de Nutrição*. 2007;20(4):387-96.
165. de Araujo GG, Papoti M, de Barros Manchado F, de Mello MAR, Gobatto CA. Protocols for hyperlactatemia induction in the lactate minimum test adapted to swimming rats. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 2007;148(4):888-92.
166. Fehrenbach E, Passek F, Niess AM, Pohla H, Weinstock C, Hans-Herrmann D, et al. HSP expression in human leukocytes is modulated by endurance exercise. *Medicine and science in sports and exercise*. 2000;32(3):592-600.
167. Rogero MM, Tirapegui J, Pedrosa RG, Castro I, Pires I, Oliveira AAM, et al. Efeito da suplementação com L-alanil-L-glutamina sobre a resposta de hipersensibilidade do tipo tardio em ratos submetidos ao treinamento intenso. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2002;38(4).
168. Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA, Care CCoA. Guide to the care and use of experimental animals: Canadian Council on Animal Care Ottawa, Ontario, Canada; 1993.

169. Souza N. Eutanásia. In: Comissão de Ensino do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Manual para técnicos em biotérismo. 2 ed. São Paulo 1996. 171-7 p.
170. Moreira MB, Montero EFS, Fagundes DJ, Chida VV, Ramalho CEB, Juliano Y. A função renal de ratos espontaneamente hipertensos submetidos ao pneumoperitônio. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2002;17(3):168-80.
171. Prada FJA, Voltarelli FA, Oliveira Cd, Gobatto CA, Macedo DV, Mello MAR. Condicionamento aeróbio e estresse oxidativo em ratos treinados por natação em intensidade equivalente ao limiar anaeróbio. *Rev Bras Cien Mov*. 2004;12:29-34.
172. Heath RL, Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1968;125(1):189-98.
173. Alexieva V, Sergiev I, Mapelli S, Karanov E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell & Environment*. 2001;24(12):1337-44.
174. Gomes-Junior RA, Gratão PL, Gaziola SA, Mazzafera P, Lea PJ, Azevedo RA. Selenium-induced oxidative stress in coffee cell suspension cultures. *Functional Plant Biology*. 2007;34(5):449-56.
175. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976;72(1):248-54.
176. Alfenas A. Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos. 2ª Edição. Editora da UFV. 2006.
177. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
178. Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry*. 1971;44(1):276-87.
179. Giannopolitis CN, Ries SK. Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. *Plant physiology*. 1977;59(2):309-14.

180. Fuentefria DB, Einsfeld A, Corção G. Análise da diversidade fenotípica e genotípica de *Enterococcus* spp. isolados de fezes de suínos. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2008;36(2):107-11.
181. Paliyath G, Fletcher R. Paclbutrazol treatment alters peroxidase and catalase activities in heat-stressed maize coleoptiles. *Physiol Mol Biol Plants*. 1995;1:171-8.
182. Azevedo R, Alas R, Smith R, Lea P. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiologia Plantarum*. 1998;104(2):280-92.
183. Gomes-Junior RA, Moldes CA, Delite FS, Pompeu GB, Gratão PL, Mazzafera P, et al. Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. *Chemosphere*. 2006;65(8):1330-7.
184. Habig WH, Keen JH, Jakoby WB. Glutathione S-transferase in the formation of cyanide from organic thiocyanates and as an organic nitrate reductase. *Biochemical and biophysical research communications*. 1975;64(2):501-6.
185. Nicoli M, Anese M, Parpinel M. Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. *Trends in Food Science & Technology*. 1999;10(3):94-100.
186. Gil MI, Tomás-Barberán FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000;48(10):4581-9.
187. Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 2006;99(1):191-203.
188. Cantín CM, Moreno MaA, Gogorcena Y. Evaluation of the antioxidant capacity, phenolic compounds, and vitamin C content of different peach and nectarine [*Prunus persica* (L.) Batsch] breeding progenies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009;57(11):4586-92.
189. Gözlekçi Ş, Saraçoğlu O, Onursal E, Özgen M. Total phenolic distribution of juice, peel, and seed extracts of four pomegranate cultivars. *Pharmacognosy magazine*. 2011;7(26):161.

190. Ferreira ICM, Silva GSd, Nascimento FS. Effect of aqueous extracts of Asteraceae species on *Meloidogyne incognita*. *Summa Phytopathologica*. 2013;39(1):40-4.
191. da Silva N, Mansano M, Nogueira R, Freitas S. Obtenção e Caracterização de Óleo de Semente de Romã (*Punica Granatum*) por Prensagem a Frio. XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química COBEQ 2012 UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro 2012.
192. Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Hawkins Byrne D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2006;19(6):669-75.
193. Moraes JO, Pertuzatti PB, Fernanda Villar Corrêa, Salas-Mellado MdLM. Study of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei* Reade) in the process of food products. *Food Science and Technology (Campinas)*. 2007;27:18-22.
194. Floegel A, Kim D-O, Chung S-J, Koo SI, Chun OK. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2011;24(7):1043-8.
195. Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M, et al. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *The Journal of nutrition*. 2003;133(9):2812-9.
196. Haytowitz D, Bhagwat S, Prior R, Wu X, CHILDRENS A, Gebhardt S, et al. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of selected foods-2007. *Nutr Data Lab ARS USDA*. 2007.
197. Seeram NP, Zhang Y, Reed JD, Krueger CG, Vaya J. *Pomegranate phytochemicals*: Taylor and Francis: Boca Raton, FL; 2006.
198. Aqil F, Munagala R, Vadhanam MV, Kausar H, Jeyabalan J, Schultz DJ, et al. Anti-proliferative activity and protection against oxidative DNA damage by punicalagin isolated from pomegranate husk. *Food Research International*. 2012.
199. Pfundstein B, El Desouky SK, Hull WE, Haubner R, Erben G, Owen RW. Polyphenolic compounds in the fruits of Egyptian medicinal plants (*Terminalia bellerica*,

- Terminalia chebula and Terminalia horrida): Characterization, quantitation and determination of antioxidant capacities. *Phytochemistry*. 2010;71(10):1132-48.
200. Halvorsen BL, Carlsen MH, Phillips KM, Bøhn SK, Holte K, Jacobs DR, et al. Content of redox-active compounds (ie, antioxidants) in foods consumed in the United States. *The American journal of clinical nutrition*. 2006;84(1):95-135.
201. Mertens-Talcott SU, Jilma-Stohlawetz P, Rios J, Hingorani L, Derendorf H. Absorption, metabolism, and antioxidant effects of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenols after ingestion of a standardized extract in healthy human volunteers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006;54(23):8956-61.
202. de Nigris F, Balestrieri ML, Williams-Ignarro S, D'Armiento FP, Fiorito C, Ignarro LJ, et al. The influence of pomegranate fruit extract in comparison to regular pomegranate juice and seed oil on nitric oxide and arterial function in obese Zucker rats. *Nitric oxide*. 2007;17(1):50-4.
203. Lei F, Zhang X, Wang W, Xing D, Xie W, Su H, et al. Evidence of anti-obesity effects of the pomegranate leaf extract in high-fat diet induced obese mice. *International Journal of Obesity*. 2007;31(6):1023-9.
204. Al-Muammar MN, Khan F. Obesity: The preventive role of the pomegranate (*Punica granatum*). *Nutrition*. 2012;28(6):595-604.
205. Nunes LAS, Silva FOCd, Ceglie AC, Venturini TdS. Efeitos da Suplementação com *Panax ginseng* Sobre Parâmetros de Estresse Oxidativo e Lesão Muscular Induzidos por Exercício Exaustivo Agudo em Ratos/Effects of *Panax ginseng* Supplementation upon Oxidative Stress and Skeletal Muscle Damage Biomarkers Induce. *Revista Ciências em Saúde*. 2011;1(1):59-66.
206. Ruffo AM. Efeitos da suplementação de diferentes concentrações de maltodextrina em ratos submetidos a exercício contínuo e prolongado: Dissertação de Mestrado. Curitiba: Universidade Federal do Paraná–UFPR; 2004.
207. Rodbari Z, Amirinia C. Blueberries extract supplementation improves physical performance and decreases oxidative stress in mice. *African Journal of Biotechnology*. 2011;10(60):12999-3003.

208. Souza Jr Td, Oliveira Pd, Pereira B. Exercício físico e estresse oxidativo: efeitos do exercício físico intenso sobre a quimioluminescência urinária e malondialdeído plasmático. *Rev Bras Med Esporte*. 2005;11(1):91-6.
209. Budni P, Petronilho FC, Citadini-Zanette V, Marcondes C, Zoch A, Reginatto FH, et al. Estudos preliminares da atividade antioxidante do extrato hidroetanólico de folhas jovens e adultas de *Tabebuia heptaphylla* (Vell.) Toledo (ipê-roxo). *Latin American Journal of Pharmacy*. 2007;26(3):394.
210. Kunchandy E, Rao M. Oxygen radical scavenging activity of curcumin. *International Journal of Pharmaceutics*. 1990;58(3):237-40.
211. McAnulty SR, McAnulty LS, Nieman DC, Morrow JD, Shooter LA, Holmes S, et al. Effect of alpha-tocopherol supplementation on plasma homocysteine and oxidative stress in highly trained athletes before and after exhaustive exercise. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2005;16(9):530-7.
212. Bejma J, Ji L. Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle. *Journal of applied physiology*. 1999;87(1):465-70.
213. Venditti P, Di Meo S. Antioxidants, tissue damage, and endurance in trained and untrained young male rats. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1996;331(1):63-8.
214. Neto JMFA, Pereira-da-Silva L, de Macedo DV. "Proteínas de estresse" hsp70" atuam como marcadoras de estresse oxidativo em ratos" wistar" submetidos a treinamento intermitente de corrida para indução de overreaching. *Brazilian Journal of Biomotricity*. 2008;2(3):160-75.
215. Alves AA. Marcadores de estresse oxidativo induzido pelo exercício físico e tecnologia para sua quantificação. Universidade Estadual de Campinas: Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular. Instituto de Biologia 2002.
216. Kostycki IM, Goettems PB, Salamoni B, Sulzbacher M, Dos Santos AB, Heck TG. Efeito da temperatura sobre o dano oxidativo em ratos submetidos ao exercício e ao teste de tolerância a glicose. *Salão do Conhecimento*. 2013;1(01).
217. Radák Z, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Ohno H, Sasvári M, et al. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal

muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999;27(1):69-74.

218. Deminice R, Degiovanni GC, Garlipp-Picchi MR, Nóbrega MT, Teixeira M, Jordão AA. Evolution of oxidative stress biomarkers and correlation with competitive performance in two moments of the swimming training season. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. 2009;15(4):277-81.

219. Silva C, Braga MA, Sobral VRV, Martinez CAR, Carvalho P. Avaliação da atividade antioxidante in vitro dos chás mate e verde antes e após a biotransformação por lipases. Evaluation of in vitro antioxidant activity of mate and green teas before and after biotransformation by lipases. *Alimentos e Nutrição Araraquara*. 2013;23(4).

220. Rodrigues ACF, da Costa JF, Silva FRG, Azevedo RRdS, do Nascimento EP, Silva AdL, et al. Atividade Antibacteriana, Antioxidante e Toxicidade e Extrato Etanólico de *Senna obtusifolia*. *Revista Semente*. 2013;6(6).

221. Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity: Implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. *Obesity Research & Clinical Practice*. 2013.

222. Caetano AC. Fenil éster do ácido caféico melhora a resposta ao estresse oxidativo em modelo animal de obesidade induzida por dieta hiperlipídica. Piracicaba: Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo (USP). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz; 2010.

223. Nakamura FY, Brunetto AF, Hirai DM, Roseguini BT, Kokubun E. O limiar de esforço percebido (LEP) corresponde à potência crítica e a um indicador de máximo estado estável de consumo de oxigênio. *Rev Bras Med Esporte*. 2005;11(3):197-202.

224. Reis JS, Veloso CA, Mattos RT, Purish S, Nogueira-Machado JA. Estresse oxidativo: revisão da sinalização metabólica no diabetes tipo 1. *Arq bras endocrinol metab*. 2008;52(7):1096-105.

225. Shu L, QiXin Z, Ying Z, JingChuan S, Tao Y. Effects of pomegranate tannins on experimental gastric damages. *China Journal of Chinese Materia Medica*. 2009;34(10):1290-4.

226. Mohan M, Patankar P, Ghadi P, Kasture S. Cardioprotective potential of Punica granatum extract in isoproterenol-induced myocardial infarction in Wistar rats. *Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics*. 2010;1(1):32.
227. Dong S, Tong X, Liu H, Gao Q. Protective effects of pomegranate polyphenols on cardiac function in rats with myocardial ischemia/reperfusion injury. *Journal of Southern Medical University*. 2012;32(7):924.
228. Arouca AB. O efeito do extrato padronizado de *Eleutherococcus senticosus* sobre a performance em ratos adaptados e submetidos a treinamento de corrida em esteira. Campinas, SP. : Instituto de Biologia Nível: Dissertação (mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular. Universidade Estadual de Campinas; 2012.
229. Balasubashini M, Rukkumani R, Viswanathan P, Menon VP. Ferulic acid alleviates lipid peroxidation in diabetic rats. *Phytotherapy Research*. 2004;18(4):310-4.
230. Curi R, Lagranha CJ, Pithon-Curi TC, Lancha Jr AH, Pellegrinotti ÍL, Procopio J. Ciclo de Krebs como fator limitante na utilização de ácidos graxos durante o exercício aeróbico. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2003;47(2):135-43.
231. Amorim AG. Efeito da deficiência dietética de magnésio no metabolismo oxidativo de tecidos de ratos submetidos a protocolo de treinamento periodizado; Effect of the dietetic deficiency of magnesium in the oxidative metabolism of tissues of rats submitted to physical training protocol: Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas; 2007.
232. Rossi L. Efeitos da suplementação com aminoácidos de cadeia ramificada e sua relação com a fadiga periférica e central. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental; 2001.
233. de Araujo JA, Falavigna G, Rogero MM, Pires IS, Pedrosa RG, Castro IA, et al. Effect of chronic supplementation with branched-chain amino acids on the performance and hepatic and muscle glycogen content in trained rats. *Life sciences*. 2006;79(14):1343-8.
234. Ji LL. Exercise induced modulation of antioxidant defense. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2002;959(1):82-92.

235. Gunduz F, Senturk U, Kuru O, Aktekin B, Aktekin M. The effect of one year swimming exercise on oxidant stress and antioxidant capacity in aged rats. *Physiological Research*. 2004;53(2):171-6.
236. Chaves EA, Pereira-Junior PP, Fortunato RS, Masuda MO, de Carvalho ACC, de Carvalho DP, et al. Nandrolone decanoate impairs exercise-induced cardioprotection: role of antioxidant enzymes. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2006;99(4):223-30.
237. Morton JP, MacLaren DP, Cable NT, Bongers T, Griffiths RD, Campbell IT, et al. Time course and differential responses of the major heat shock protein families in human skeletal muscle following acute nondamaging treadmill exercise. *Journal of applied physiology*. 2006;101(1):176-82.
238. Khassaf M, Child RB, McArdle A, Brodie DA, Esanu C, Jackson MJ. Time course of responses of human skeletal muscle to oxidative stress induced by nondamaging exercise. *Journal of applied physiology*. 2001;90(3):1031-5.
239. Moran M, Delgado J, Gonzalez B, Manso R, Megias A. Responses of rat myocardial antioxidant defences and heat shock protein HSP72 induced by 12 and 24-week treadmill training. *Acta physiologica scandinavica*. 2004;180(2):157-66.
240. Sen CK. Oxidants and antioxidants in exercise. *Journal of applied physiology*. 1995;79(3):675-86.
241. Gul M, Demircan B, Taysi S, Oztasan N, Gumustekin K, Siktar E, et al. Effects of endurance training and acute exhaustive exercise on antioxidant defense mechanisms in rat heart. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 2006;143(2):239-45.
242. Pinho WL, da Silva APR. Efeitos do exercício físico sobre a formação de espécies reativas de oxigênio e os compostos antioxidantes da dieta. *RBNE-Revista Brasileira de Nutrição Esportiva*. 2013;7(37).
243. Pereira B, Costa Rosa L, Safi D, Medeiros M, Curi R, Bechara E. Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities in muscle and lymphoid organs of sedentary and exercise-trained rats. *Physiology & behavior*. 1994;56(5):1095-9.

244. Alessio HM, Goldfarb AH. Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptive response to training. *Journal of applied physiology*. 1988;64(4):1333-6.
245. Smolka MB, Zoppi CC, Alves AA, Silveira LR, Marangoni S, Pereira-Da-Silva L, et al. HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2000;279(5):R1539-R45.
246. Selman C, McLaren JS, Collins AR, Duthie GG, Speakman JR. Antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation, and DNA oxidative damage: the effects of short-term voluntary wheel running. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2002;401(2):255-61.
247. Atalay M, Seene T, Hänninen O, Sen C. Skeletal muscle and heart antioxidant defences in response to sprint training. *Acta physiologica scandinavica*. 1996;158(2):129-34.
248. Powers SK, Criswell D, Lawler J, Ji L, Martin D, Herb RA, et al. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 1994;266(2):R375-R80.
249. Reddy AC, Fernandes G. Modulation of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in salivary gland and other tissues in mice by moderate treadmill exercise. *Aging (Milan, Italy)*. 1999;11(4):246.
250. Dunlap KL, Reynolds AJ, Duffy LK. Total antioxidant power in sled dogs supplemented with blueberries and the comparison of blood parameters associated with exercise. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 2006;143(4):429-34.
251. Yilmaz HR, Uz E, Yucel N, Altuntas I, Ozcelik N. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat liver. *Journal of biochemical and molecular toxicology*. 2004;18(4):234-8.
252. Althunibat OY, Al-Mustafa AH, Tarawneh K, Khleifat KM, Ridzwan B, Qaralleh HN. Protective role of *Punica granatum* L. peel extract against oxidative damage in experimental diabetic rats. *Process Biochemistry*. 2010;45(4):581-5.

253. Chidambara Murthy KN, Jayaprakasha GK, Singh RP. Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract using in vivo models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002;50(17):4791-5.
254. Sudheesh S, Vijayalakshmi N. Flavonoids from *Punica granatum*-potential antiperoxidative agents. *Fitoterapia*. 2005;76(2):181-6.
255. Souza GA, Ebaid GX, Seiva FR, Rocha KH, Galhardi CM, Mani F, et al. N-Acetylcysteine an *Allium* plant compound improves high-sucrose diet-induced obesity and related effects. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*. 2008;2011:30.
256. Gaurava P, Shyam R, Suri S, Kumria M, Sridharan K, Sharma P, et al. Effect of Pomegranate (*Punica granatum* L) Juice on changes in tissue glutathione levels of Rats Exposed to high altitude hypoxia. *Ancient science of life*. 2001;21(2):75.
257. Parmar HS, Kar A. Antidiabetic potential of *Citrus sinensis* and *Punica granatum* peel extracts in alloxan treated male mice. *Biofactors*. 2007;31(1):17-24.
258. Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*. 2001;31(11):1287-312.
259. Sotelo-Felix J, Martinez-Fong D, Muriel P, Santillan R, Castillo D, Yahuaca P. Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in the rat. *Journal of Ethnopharmacology*. 2002;81(2):145-54.
260. Kumar S, Maheshwari KK, Singh V. Protective effects of *Punica granatum* seeds extract against aging and scopolamine induced cognitive impairments in mice. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*. 2009;6(1):49.
261. Faria A, Monteiro R, Mateus N, Azevedo I, Calhau C. Effect of pomegranate (*Punica granatum*) juice intake on hepatic oxidative stress. *European journal of nutrition*. 2007;46(5):271-8.
262. Moneim AEA, Mohamed AD, Al-Quraishy S. Studies on the effect of pomegranate (*Punica granatum*) juice and peel on liver and kidney in adult male rats. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011;5(20):5083-8.

