

Luciane Aparecida Faine

EFEITOS DO AZEITE DE OLIVA E DE SEUS
COMPONENTES SOBRE OS LIPÍDIOS SÉRICOS,
EQUILÍBRIO OXIDANTE/ANTIOXIDANTE E
METABOLISMO ENERGÉTICO NO TECIDO CARDÍACO
DE RATOS SUBMETIDOS OU NÃO AO ESTRESSE
OXIDATIVO EXPERIMENTAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica, da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP para obtenção do Título de Doutor. Área : Cardiologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. **Ethel Lourenzi Barbosa
Novelli**

Botucatu – SP

2004

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ORIENTADOR

Prof^a. Dr^a. **Ethel Lourenzi Barbosa
Novelli**

Estudo realizado no Departamento de Química e
Bioquímica do Instituto de Biociências da
Universidade Estadual Paulista - UNESP - Botucatu.

Dedicatória

*Aos meus pais **Jorge** e
Vitalina, com carinho...*

Agradecimentos Especiais

À Prof^a. Dr^a. *Ethel Lourenzi Barbosa Novelli*

À minha orientadora, o meu respeito pela excelente profissional e o imenso carinho pela grande amiga...

Ao Prof. Dr. *Antonio Carlos Cicogna*

pelo incentivo e colaboração em todos os momentos.

*A minha família, **Regina** e **Nelson**, **Jorge Henrique** e **Felipe**, **Tatiane**, **Valdir** e **Lena**, que sempre torceram muito para que eu realizasse os meus sonhos.*

Agradecimientos

Às minhas amigas de sempre *Araris, Madileine e Naila*, que estiveram ao meu lado compartilhando as alegrias e ajudando a acertar os passos em todos os momentos.

Aos meus amigos *Hosana Rodrigues, Geovana Ebaid, Yeda Sant'Ana Novelli, Cristiano Galhardi e Regina Burneiko* do Laboratório de Bioquímica, UNESP, Botucatu, por toda a ajuda na realização deste trabalho e também pela grande amizade.

Ao Prof. Dr. *Carlos Roberto Padovani* do Departamento de Bioestatística, UNESP, Botucatu, pelos cuidados estatísticos.

A Prof^a. Dr^a. *Lea Silvia Sant'Ana*, do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Agrônomicas, UNESP, Botucatu, pela preciosa colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

À secretária da Pós-Graduação da Clínica Médica *Ana Maria Mengue* e aos funcionários da sessão de Pós-graduação da UNESP-Botucatu, *Regina Célia Spadin, Nathanael P Salles, Lílian Cristina B Nunes e Janete Herculano Nunes*, pela atenção e carinho que sempre demonstraram.

Ao *Guerino Santos Bianchi Filho, Fabio Henrique Fava e Júlio Catharino* do Departamento de Química e Bioquímica - IB, pela dedicação e auxílio técnico.

À **FAPESP** pelo apoio financeiro e incentivo ao desenvolvimento deste trabalho.

Sumário

CAPÍTULO 1	1
Modulação do Estresse Oxidativo e do Metabolismo Energético Miocárdico pelo Azeite de Oliva e seus Componentes, Ácido oléico e Polifenol.....	1
Introdução	3
Materiais e Métodos	5
Resultados	7
Discussão	19
Referências Bibliográficas	25
 CAPÍTULO 2	 30
Efeitos do Azeite de Oliva e de seus Componentes Ácido Oléico e Polifenol sobre o Metabolismo Energético e Equilíbrio Oxidante/Antioxidante no Miocárdio de Ratos Submetidos ao Estresse Oxidativo Experimental.....	30
Introdução	32
Materiais e Métodos	34
Resultados	37
Discussão	49
Referências Bibliográficas	55
 CAPÍTULO 3	 62
Considerações Finais	62

Abreviaturas

ATP - Trifosfato de adenosina
CS - Citrato sintase
CuZn-SOD - Cobre zinco-superóxido dismutase
DPE - 3,4-dihidroxifeniletanol
ERO - Espécie reativa de oxigênio
GSH - Glutathiona reduzida
GSH-Px - Glutathiona peroxidase
H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
HDL - Lipoproteína de elevada densidade
HP - Hidroperóxido de lipídio
LDH - Lactato desidrogenase
LDL - Lipoproteína de baixa densidade
MDA - Malondialdeído
Mn-SOD - Manganês-superóxido dismutase
O₂⁻ - Radical superóxido
OH[•] - Radical hidroxil
SOD - Superóxido dismutase
TG - Triacilglicerol
VLDL - Lipoproteína de densidade muito baixa

Capítulo 1

Modulação do Perfil Lipídico, Estresse Oxidativo e Metabolismo Energético Miocárdico pelo Azeite de Oliva e seus Componentes Ácido Oléico e Polifenol

RESUMO

Inúmeros estudos epidemiológicos sugerem que o azeite de oliva contribui significativamente para a diminuição da incidência de doenças cardiovasculares. Evidências recentes indicam que os efeitos benéficos do azeite de oliva não estão relacionados somente ao seu elevado conteúdo de ácido oléico, mas também às propriedades antioxidantes dos seus polifenóis. Tendo em vista o aumento no consumo de azeite de oliva em diversas populações e a falta de conhecimentos sobre a influência do azeite e de seus componentes sobre o tecido cardíaco, o presente trabalho teve por objetivo determinar os efeitos do azeite de oliva e de seus componentes ácido oléico e polifenol 3,4-dihidroxifeniletanol (DPE) sobre o estresse oxidativo e metabolismo energético no coração de ratos. Para tanto, 24 ratos, Wistar, 200g, foram divididos em 4 grupos com 6 ratos cada. Todos os animais receberam dieta basal e água *ad libitum*. O grupo C foi considerado controle. O grupo AO recebeu azeite de oliva extra-virgem (7,5mL/Kg/2x semana). O grupo AG foi tratado com ácido oléico (3,45 mL/Kg/2x semana). O grupo DPE recebeu o polifenol DPE (7,5mg/Kg/2x semana). Esses componentes foram administrados por gavagem, durante o período de 30 dias. Os resultados demonstraram que o azeite de oliva foi mais efetivo do que seus componentes isolados em melhorar o perfil lipídico, elevando a HDL e diminuindo a LDL-colesterol. O azeite de oliva induziu efeito antioxidante direto no miocárdio, desde que foi observada diminuição na atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase e redução da concentração de proteína carbonil. A ingestão isolada do polifenol do azeite (considerado potencial antioxidante), induziu elevação no metabolismo aeróbico e na concentração de triacilgliceróis e hidroperóxidos de lipídio no miocárdio, indicando atividade pró-oxidante deste polifenol no tecido cardíaco.

Palavras chave: azeite de oliva, ácido oléico, polifenóis, estresse oxidativo, metabolismo energético.

INTRODUÇÃO

Desde a Antigüidade, o óleo obtido do fruto da oliveira (*Olea europaea*) tem sido reconhecido por suas propriedades medicinais. Recentes estudos sobre o azeite de oliva têm sugerido que seus componentes secundários podem ter mais efeitos sobre a saúde do que se pensava anteriormente (Visioli et al., 1998; De La Cruz, 2000; Casalino et al., 2002).

A composição do azeite de oliva tem o ácido oléico como o principal ácido graxo monoinsaturado, compreendendo entre 55% e 85% do conteúdo total de ácidos graxos. Ácidos graxos monoinsaturados, por possuírem apenas uma dupla ligação em sua estrutura, são menos susceptíveis do que ácidos graxos poliinsaturados à lipoperoxidação provocada por radicais livres (Ruiz-Gutierrez et al., 1990).

Radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (ERO) são átomos ou moléculas com um ou mais elétrons não-pareados em sua última camada, sendo continuamente produzidas em organismos aeróbios (Droge, 2002). Na produção excessiva de radicais livres, ou redução das defesas antioxidantes, caracteriza-se o chamado "estresse oxidativo" (Nishiyama et al., 1998). Em proteínas, as ERO causam a peroxidação protéica, incorrendo em formação de proteína carbonil e alterações funcionais nas células (Sohal & Weindruch, 1996). Nos lipídios, a ação dos radicais livres resulta na peroxidação dos lipídios insaturados das membranas celulares, podendo levar à perda de função e lise celular (Gutteridge & Halliwell, 1990).

Dessa forma, quando incorporados nos fosfolipídios de

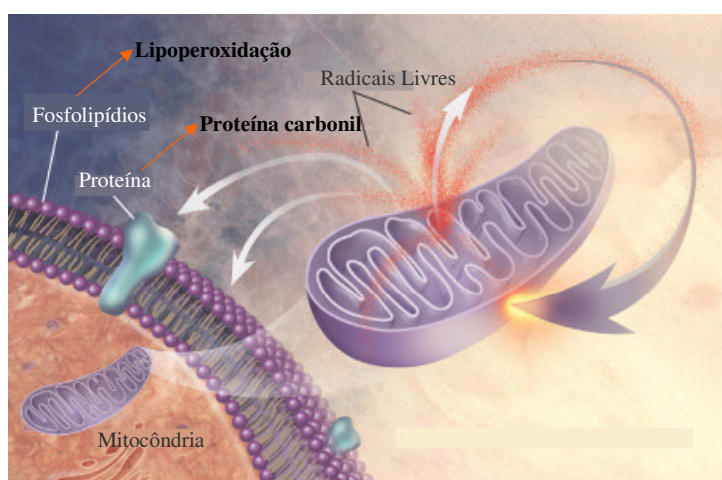


Figura 1. Ação das Espécies Reativas de Oxigênio nos componentes celulares.

membranas celulares, os ácidos graxos monoinsaturados provenientes do azeite de oliva podem diminuir a susceptibilidade das membranas à ação de espécies reativas de oxigênio (ERO). Essa observação é de especial importância para o miocárdio, que possui elevada taxa de

consumo de oxigênio (Henning et al., 1996), sendo mais susceptível ao estresse oxidativo.

Além do seu elevado conteúdo de ácido oléico, o azeite de oliva também é importante fonte de antioxidantes naturais, como os polifenóis. Os polifenóis são os responsáveis pela textura e aroma característico do azeite, conferindo à oliva elevada resistência à oxidação (Montedoro et al., 1992). O principal polifenol encontrado no azeite de oliva é o 3,4-dihidroxifeniletanol (DPE) (Montedoro et al., 1992). Nos últimos anos, muitos estudos têm sido realizados sobre a atividade biológica desse composto, entretanto, a maioria das pesquisas apresenta resultados *in vitro*, sendo que pouco é conhecido sobre a atividade desse componente *in vivo*.

Importantes propriedades antioxidantes têm sido atribuídas ao DPE, impedindo a ação dos radicais livres (Casalino et al., 2002; Erçok et al., 2003), incluindo diminuição da susceptibilidade de oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e no desenvolvimento da aterosclerose (Visioli et al., 1995).

Por outro lado, as atividades biológicas do DPE, bem como dos antioxidantes em geral, podem não estar somente relacionadas à sua capacidade de combater radicais livres. Na verdade, essas moléculas podem atuar nas células como moduladores na transdução de sinal (Ragione et al., 2002), podendo também interferir no metabolismo energético. Alterações no metabolismo energético têm sido relacionadas ao estresse oxidativo (Novelli et al., 2002; Diniz et al., 2002; Faine et al., 2003).

Apesar de existirem evidências científicas que fundamentam os efeitos benéficos da suplementação da dieta com azeite de oliva (Aviram & Eias, 1993; De La Cruz, 2000; Roche, 2000), o potencial antioxidante de seus componentes, bem como seus efeitos sobre o metabolismo energético, ainda não foram estabelecidos.

Considerando que o elevado consumo de azeite de oliva pode estar associado a atividades antioxidantes de seus componentes e a suas implicações no metabolismo energético, o presente trabalho teve por objetivo determinar os efeitos do azeite de oliva e de seus componentes, ácido oléico e polifenol DPE, sobre o estresse oxidativo e metabolismo energético no músculo cardíaco de ratos.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 24 ratos machos adultos *Wistar*, de peso médio 200 gramas. Os animais foram provenientes do Biotério Central da UNESP "campus de Botucatu" e transferidos para o "Laboratório de Bioquímica na Experimentação Animal" do Departamento de Química e Bioquímica, Instituto de Biociências, UNESP/Botucatu, onde permaneceram durante todo o período experimental, à temperatura de $22\pm 3^{\circ}\text{C}$, período claro/escuro de 12 horas.

Os animais foram mantidos em gaiolas de plástico individuais, recebendo dieta basal (Purina-Labina, 3074, SIF, Purina Ltd. Campinas, SP, Brasil) e água destilada *ad libitum*. Para permitir a aclimatação dos animais, os ratos permaneceram nas condições acima citadas por um período de 15 dias antes do início do experimento. Diariamente as gaiolas foram limpas.

Os animais foram divididos em 4 grupos com 6 ratos cada. Todos os animais receberam dieta basal e água *ad libitum*. O grupo C foi considerado controle, sendo tratado com NaCl 0,9%. Os animais do grupo AO receberam azeite de oliva extra-virgem (Colavita, Italia) (7,5mL/Kg/dia), correspondendo a suplementação de aproximadamente 4% da dieta. O grupo AG foi tratado com ácido oléico (Sigma, USA) (3,45 mL/Kg/dia). O grupo DPE recebeu o polifenol 3,4-dihidroxifeniletanol (DPE) (Cayman Chemical, USA) (7,5mg/Kg/dia). Esses componentes foram administrados por gavagem, como suplementação da dieta basal, duas vezes por semana, durante o período de 30 dias. Todos os animais foram pesados semanalmente.

O azeite de oliva utilizado no presente projeto foi de procedência comercial (Botucatu, São Paulo, Brasil) e amostras deste azeite foram utilizadas para análise cromatográfica de ácidos graxos (GC 17-A, Shimatzu, Japão). O azeite de oliva utilizado apresentou concentração de 46% de ácido oléico (Tabela1). A quantidade de ácido oléico administrada foi calculada para corresponder à sua concentração no azeite de oliva utilizado. A concentração do polifenol DPE que foi administrada, corresponde à concentração média

de polifenóis totais contida em azeite de oliva extra-virgem de alta qualidade (Montedoro et al., 1992).

Determinações Bioquímicas

Após 30 dias de tratamento, os animais foram sacrificados por fratura cervical e decapitação. O soro foi coletado através de decapitação e separado para as determinações das concentrações de proteína total (Lowry, 1951), colesterol total (Moura, 1982), triacilgliceróis (Moura, 1982), lipoproteína de elevada densidade (HDL)-colesterol (Lopes-Virella et al., 1977), lipoproteína de baixa densidade (LDL)-colesterol (Friedewald et al., 1972) e lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL)-colesterol (Friedewald et al., 1972).

O coração foi imediatamente retirado, lavado em solução salina gelada (NaCl 0.9%). O ventrículo esquerdo foi separado em duas porções de 200mg. As porções (I) foram retiradas, identificadas e mantidas a 4°C, em cuba de isopor com gelo picado, sendo posteriormente homogeneizadas em *Potter Elvehjem*, com pistilo de teflon, com 5 mL de tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,0. Os homogeneizados foram centrifugados a 10000 rpm por 15 minutos, em centrífuga refrigerada a -4°C. O sobrenadante foi utilizado para determinação da concentração de proteínas totais (Lowry, 1951), malondialdeído (MDA) (Sato, 1978), hidroperóxido de lipídio (HP) (Jiang et al., 1991), glutathiona reduzida (GSH) (Sedlak & Lindsay, 1968) e atividades das enzimas, glutathiona peroxidase (GSH-Px) (Nakamura et al., 1974), catalase (Aebi, 1974), superóxido dismutase total (SOD-total) (Pucheu, 1995) e as isoenzimas CuZn- superóxido dismutase (CuZn-SOD) (Weisiger & Fridovich, 1973) e Mn-superóxido dismutase (Mn-SOD) (Spitz & Oberley, 1989). A atividade da Mn-SOD foi estimada através da diferença entre SOD-total e CuZn-SOD. As porções (II) foram utilizadas para a determinação da concentração de proteína carbonil (Resnick & Packer, 1994). As leituras espectrofotométricas foram realizadas no espectrofotômetro Pharmacia Biotech (974213, Cambridge, England) e em leitor de microplaca (Bio-tech Instruments, USA). Todos os reagentes eram de procedência da Sigma (St. Louis, MO, USA).

Análise Estatística

Os resultados obtidos foram expressos em média \pm desvio padrão. A comparação entre os grupos foi realizada por análise de variância (ANOVA) para experimentos inteiramente casualizados, complementada com o teste de Tukey. O nível de significância foi de 5% (Norman & Streiner, 1994).

RESULTADOS

Os tratamentos não induziram alterações no ganho de peso, peso corporal final, peso do coração (Tabela 2).

Administrações de azeite de oliva (AO) e polifenol (DPE) não induziram alterações nas concentrações de colesterol total e triacilgliceróis (TG) no soro. Animais que receberam suplementação com azeite de oliva apresentaram elevação na HDL-colesterol, diminuição na LDL-colesterol e redução no índice aterogênico. Animais tratados com ácido oléico apresentaram elevação na HDL-colesterol (Tabela 3).

A análise do sistema antioxidante no miocárdio (Tabela 4) demonstrou que as suplementações com azeite de oliva e ácido oléico induziram diminuição na atividade da SOD-total e em sua isoenzima Mn-SOD. Foi observada elevação nas atividades da CuZn-SOD nos grupos AO, AG e DPE. Azeite de oliva e ácido oléico não induziram alterações na relação HP/SOD (Tabela 5 e Figura 2). O grupo que recebeu o polifenol DPE apresentou diminuição significativa na atividade da SOD-total e Mn-SOD, e elevação na relação HP/SOD em relação a todos os demais grupos (Tabela 4 e Figuras 2 e 3). Não foram observadas alterações nas atividades da GSH-Px e na concentração de GSH entre os grupos. A atividade da catalase esteve diminuída no grupo tratado com polifenol DPE. Suplementação dietética com DPE induziu elevação no hidróperóxido de lipídio e diminuição nas concentrações de MDA no tecido cardíaco (Tabela 5). Azeite de oliva induziu diminuição nas concentrações de proteína carbonil no miocárdio dos animais (Tabela 5 e Figura 3). Concentrações de triacilgliceróis (Tabela 6 e Figuras 4 e 5) e atividade da enzima citrato sintase (Tabela 6 e Figura 4) estiveram elevadas no grupo que recebeu o polifenol. Não foram observadas

diferenças nas atividades da lactato desidrogenase entre os grupos (Tabela 6).

Ácidos graxos	Concentração (%)
C ₁₆ - palmítico	40,5
C _{16:1} - palmitoléico	0,7
C ₁₈ - esteárico	1,5
C _{18:1} - oléico	46
C _{18:2} - linoléico	10,3
C _{18:3} - linolênico	0,7
C _{20:1} - eicosaenóico	0,3
Total saturados	42
Total insaturados	58
Total monoinsaturados	47
Total ácido oléico	46

Tabela 1. Composição e concentração de ácidos graxos no azeite de oliva utilizado

Departamento de Tecnologia de Alimentos – Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, Botucatu.

Departamento de Tecnologia de Alimentos – Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, Botucatu.

Tabela 2. Peso inicial, ganho de peso total, peso corporal final e peso do coração nos grupos controle (C) e nos grupos suplementados com azeite de oliva (AO), ácido oléico (AG) e polifenol (DPE) durante 30 dias

Determinações Bioquímicas	GRUPOS				Conclusão Estatística
	C	AO	AG	DPE	
Peso inicial (g)	199,5 ± 9,9 ^a	200,6 ± 11,7 ^a	205,1 ± 6,6 ^a	209,5 ± 13,5 ^a	1,09 (p>0,05)

Ganho de peso (g)	151,5 ± 24,7 ^a	156,9 ± 18,5 ^a	156,4 ± 34,5 ^a	153,2 ± 19,9 ^a	2,44 (p>0,05)
Peso corporal final (g)	348,2 ± 27,1 ^a	357,6 ± 19,0 ^a	361,6 ± 36,0 ^a	362,7 ± 28,2 ^a	0,32 (p>0,05)
Peso coração (g)	1,2 ± 0,2 ^a	1,1 ± 0,1 ^a	1,0 ± 0,1 ^a	1,2 ± 0,1 ^a	3,14 (p>0,05)

Resultados são expressos como média ± desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças significantes entre grupos.

Tabela 3. Concentrações de colesterol total, lipoproteína de elevada densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), triacilgliceróis (TG) e índice aterogênico (colesterol total/HDL) no soro de animais controle (C), tratados com azeite de oliva (AO), ácido oléico (AG) e polifenol (DPE)

Determinações Bioquímicas	GRUPOS				Conclusão Estatística
	C	AO	AG	DPE	
Colesterol (mg/dL)	89,6 ± 19,4 ^{ab}	74,4 ± 13,3 ^a	105,8 ± 20,6 ^b	78,7 ± 9,0 ^a	4,42 (p<0,05)

HDL (mg/dL)	35,0 ± 5,4 ^a	53,6 ± 7,0 ^b	49,62 ± 13,8 ^b	43,9 ± 9,7 ^{ab}	4,31 (p<0,05)
LDL (mg/dL)	42,5 ± 8,4 ^b	25,5 ± 4,4 ^a	42,9 ± 8,9 ^b	40,0 ± 6,9 ^b	7,5 (p<0,01)
VLDL (mg/dL)	8,1 ± 2,4 ^a	10,2 ± 1,7 ^a	12,7 ± 4,1 ^a	10,3 ± 2,2 ^a	2,79 (p>0,05)
TG (mg/dL)	40,7 ± 12,1 ^a	51,2 ± 8,7 ^a	63,7 ± 20,4 ^a	51,5 ± 11,1 ^a	2,79 (p>0,05)
Colesterol/HDL	2,5 ± 0,34 ^b	1,5 ± 0,35 ^a	2,3 ± 0,56 ^b	2,1 ± 0,56 ^{ab}	5,45 (p<0,01)

Resultados são expressos como média ± desvio padrão. Letras distintas indicam diferenças significantes entre grupos.

Tabela 4. Atividades das enzimas SOD-total, CuZn-SOD, Mn-SOD, GSH-Px, catalase e concentrações de glutatona reduzida (GSH) e proteína no tecido cardíaco dos animais submetidos aos tratamentos controle (C), azeite de oliva (AO), ácido oléico (AG) e polifenol (DPE) durante 30 dias

Determinações Bioquímicas	GRUPOS				Conclusão Estatística
	C	AO	AG	DPE	
SOD-total (U/mgPt)	13,1 ± 1,8 ^c	9,1 ± 2,1 ^b	8,8 ± 2,6 ^b	3,2 ± 0,8 ^a	26,2 (p<0,0001)
CuZn-SOD (U/mgPt)	1,25 ± 0,27 ^a	1,5 ± 0,1 ^b	1,7 ± 0,07 ^b	1,7 ± 0,2 ^b	8,45 (p<0,01)
Mn-SOD (U/mgPt)	11,8 ± 2,1 ^c	7,6 ± 1,11 ^b	7,1 ± 1,2 ^b	2,4 ± 0,4 ^a	49,1 (p<0,0001)

GSH-Px (U/mgtec.)	59,1 ± 14,9 ^a	62,0 ± 17,7 ^a	51,0 ± 14,8 ^a	62,1 ± 15,8 ^a	0,65 (p>0,05)
GSH (μmol/g tec.)	3,0 ± 0,3 ^a	3,0 ± 0,2 ^a	3,2 ± 0,6 ^a	3,6 ± 0,7 ^a	1,95 (p>0,05)
Catalase (U/g tec.)	84,2 ± 14,8 ^b	105,9 ± 32,2 ^b	133,7 ± 36,2 ^b	39,1 ± 5,8 ^a	14,7 (p<0,0001)
Proteína (g%)	13,5 ± 2,3 ^{ab}	12,9 ± 1,7 ^{ab}	11,8 ± 1,8 ^a	15,3 ± 1,3 ^b	3,99 (p<0,05)

Resultados são expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significantes entre grupos.

Tabela 5. Concentrações de hidroperóxido de lipídio (HP), malondialdeído (MDA), relação HP/SOD e proteína carbonil no tecido cardíaco dos animais submetidos aos tratamentos controle (C), azeite de oliva (AO), ácido oléico (AG) e polifenol (DPE) durante 30 dias

Determinações Bioquímicas	GRUPOS				Conclusão Estatística
	C	AO	AG	DPE	
HP (nmol/g tec.)	119,4 ± 29,8 ^a	131,7 ± 51,9 ^{ab}	121,1 ± 47,6 ^a	185,3 ± 16,6 ^b	6,15 (p<0,05)
MDA (nmol/g tec.)	14,5 ± 1,2 ^b	11,1 ± 2,2 ^b	11,4 ± 4,3 ^b	10,4 ± 1,4 ^a	2,95 (p<0,05)
HP/SOD	9,1 ± 3,2 ^a	15,8 ± 8,1 ^a	14,8 ± 7,4 ^a	54,5 ± 9,7 ^b	46,4 (p<0,001)

Proteína Carbonil (nmol/mgPt)	5,6 ± 1,3 ^b	3,9 ± 0,4 ^a	4,5 ± 0,4 ^{ab}	4,5 ± 1,6 ^{ab}	2,7 (p<0,05)
----------------------------------	------------------------	------------------------	-------------------------	-------------------------	-----------------

Resultados são expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significantes entre grupos.

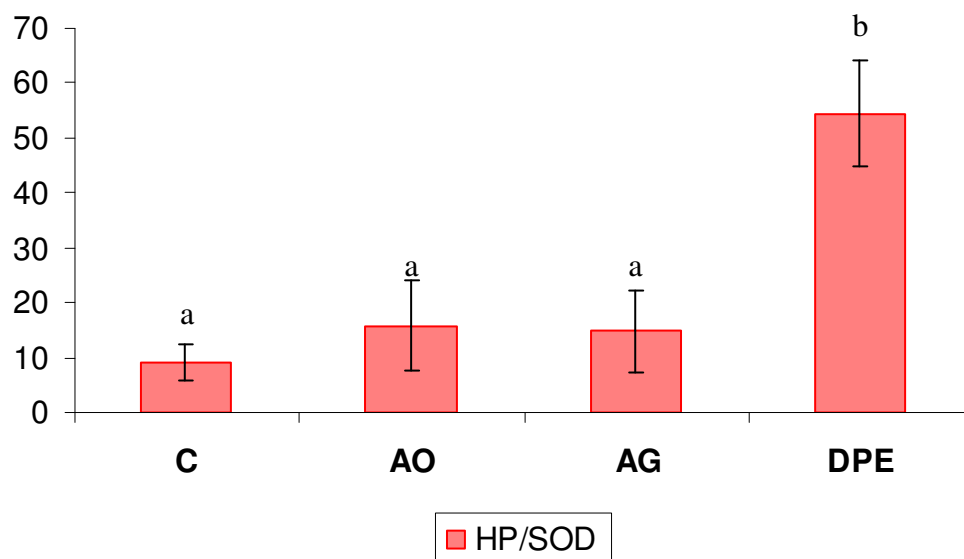
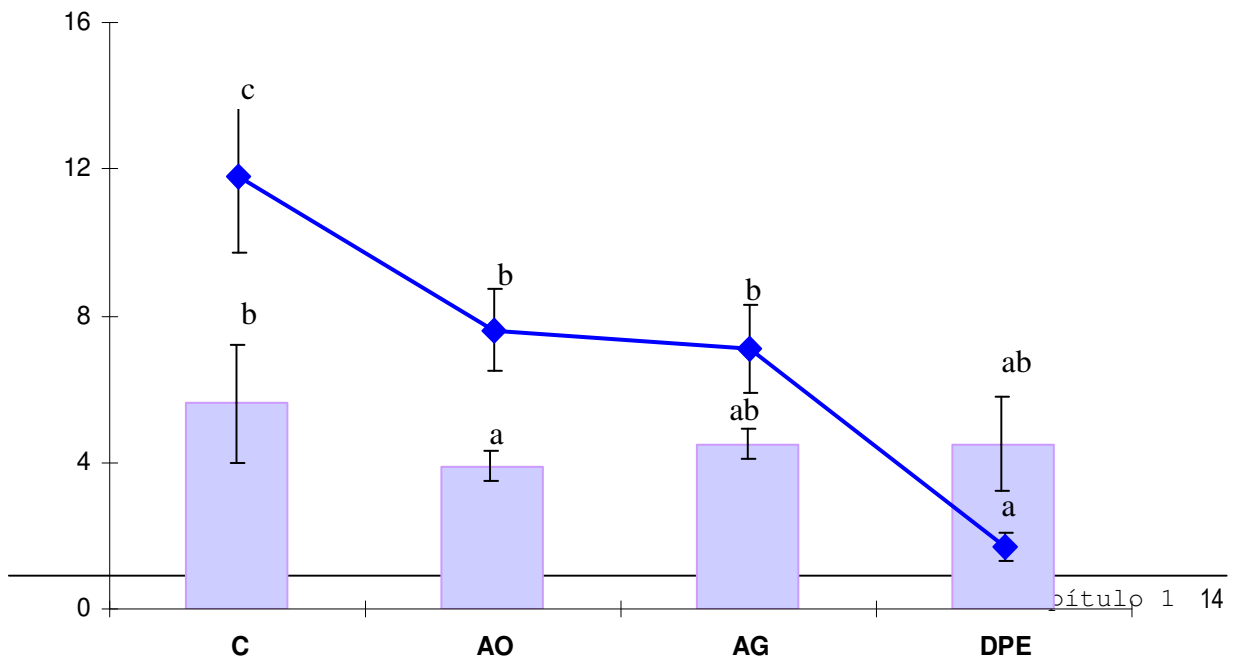


Figura 2. Relação HP/SOD no tecido cardíaco de ratos controle (C), tratados com azeite de oliva (AO), ácido oléico (AG) e polifenol (DPE). Valores em média \pm desvio padrão. Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).



— Proteínas carbonílicas (nmol/mg prot(ões)) — SOD (U/mg prot(ões))

Figura 3.Atividade da Mn-SOD e concentração de proteína carbonil no tecido cardíaco de ratos controle (C), tratados com azeite de oliva (AO), ácido oléico (AG) e polifenol (DPE). Valores em média \pm desvio padrão. Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Tabela 6. Concentração de triacilgliceróis e atividades das enzimas do metabolismo energético, lactato desidrogenase (LDH) e citrato sintase (CS) no tecido cardíaco dos animais submetidos aos tratamentos controle (C), azeite de oliva (AO), ácido oléico (AG) e polifenol (DPE) durante 30 dias

Determinações Bioquímicas	GRUPOS				Conclusão Estatística
	C	AO	AG	DPE	
TG (mg/g tec.)	4,1 \pm 0,6 ^a	4,3 \pm 0,6 ^a	4,6 \pm 0,2 ^a	6,0 \pm 0,5 ^b	16,66 ($p < 0,0001$)

LDH					2,27
(U/g tec.)	123,6 ± 6,3 ^a	132,9 ± 6,7 ^a	129,3 ± 10,5 ^a	133,8 ± 5,6 ^a	(p>0,05)
CS					17,51
(U/g tec.)	29,6 ± 4,2 ^a	32,3 ± 3,9 ^a	24,8 ± 8,2 ^a	44,9 ± 0,9 ^b	(p<0,0001)

Resultados são expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significantes entre grupos.

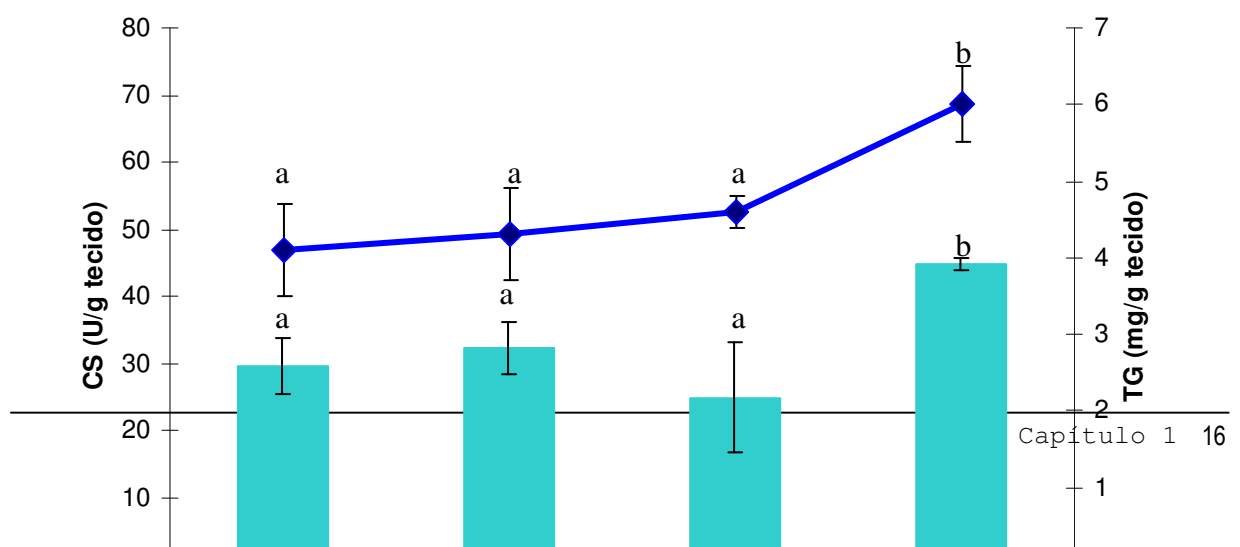


Figura 4. Atividades da citrato sintase (CS) e concentração de triacilgliceróis (TG) no tecido cardíaco de ratos controle (C), tratados com azeite de oliva (AO), ácido oléico (AG) e polifenol (DPE). Valores em média \pm desvio padrão. Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

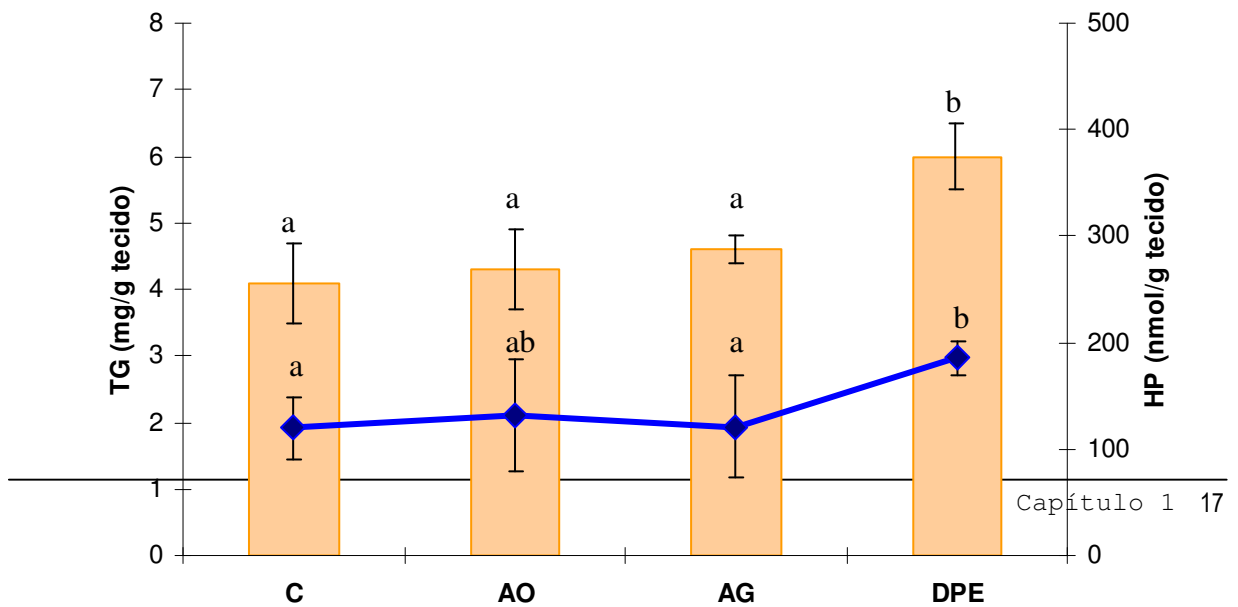


Figura 5. Concentração de triacilgliceróis (TG) e hidroperóxido de lipídio (HP) no tecido cardíaco de ratos controle (C), tratados com azeite de oliva (AO), ácido oléico (AG) e polifenol (DPE). Valores em média \pm desvio padrão. Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

A suplementação nutricional com azeite de oliva tem sido recomendada como intervenção terapêutica de importante papel na medicina preventiva, com o objetivo de elevar a relação entre ácidos graxos monoinsaturados e saturados nas dietas, diminuindo o colesterol sérico e, assim, indiretamente, prevenindo a aterosclerose (Kaur & Kapoor, 2001). Entretanto, os efeitos do azeite de oliva e de seus componentes sobre o estresse oxidativo e metabolismo energético no músculo cardíaco ainda não foram estabelecidos.

No presente estudo, os tratamentos com azeite de oliva e seus componentes, ácido oléico e DPE, não induziram alterações no ganho de peso e peso corporal final (Tabela 2), indicando que os efeitos dos tratamentos não estavam relacionados com variações no peso corporal.

Os efeitos benéficos do azeite de oliva sobre os lipídios séricos têm sido extensivamente demonstrados (Heyden, 1994; Baldioli et al., 1996; Visioli et al., 1998). No entanto, a determinação do principal agente, presente no azeite, responsável por esses efeitos ainda não foi esclarecida.

O tratamento com azeite de oliva não induziu alterações sobre as concentrações de colesterol total e triacilgliceróis (TG) no soro (Tabela 3). Entretanto, em vista do conhecido papel da LDL-colesterol na aterogênese e da ação da HDL-colesterol reduzindo o risco para doenças cardiovasculares, o azeite de oliva foi efetivo através da diminuição das concentrações de LDL e elevação na HDL-colesterol (Tabela 3).

O presente trabalho demonstrou que as suplementações com ácido oléico e com DPE não induziram efeitos sobre as concentrações de colesterol total. No entanto, as concentrações de HDL-colesterol estiveram elevadas nesses grupos (Tabela 3), indicando que os efeitos benéficos do azeite de oliva sobre os lipídios séricos podem estar relacionados a uma ação sinérgica de seus componentes, ácido oléico e o polifenol DPE.

O ácido oléico, por conter uma insaturação em sua estrutura química, ocupa maior espaço dentro das partículas de LDL do que ácidos graxos saturados, podendo, portanto, contribuir para a diminuição do colesterol-LDL. Os polifenóis do azeite também podem atuar na diminuição do colesterol através da inibição da enzima 3-hidroxi 3-metilglutaril Co-A, responsável pela sua síntese (Benkhalti et al., 2002). Partículas de LDL são conhecidas por interagirem com HDL, contribuindo para a diminuição do colesterol-HDL (Schaffer, 2003). Desse modo, as concentrações elevadas de HDL observadas em animais que receberam azeite podem ser atribuídas à diminuição da LDL-colesterol.

Raveh et al. (2001) observaram a interrelação entre a oxidação da HDL e LDL-colesterol sobre o estresse oxidativo. A LDL-colesterol é a principal carregadora de hidroperóxidos de lipídio no plasma (Zadeh et al., 1996) e HDL-colesterol inibe a oxidação da LDL (Raveh et al., 2001). Desse modo, a diminuição no índice aterogênico e a elevação nas concentrações de HDL nos animais do grupo AO, demonstraram claramente que o azeite de oliva extra-virgem induziu

efeitos benéficos não somente no perfil lipídico, mas também, indiretamente, no estado oxidante/antioxidante sérico.

A análise do estresse oxidativo no miocárdio demonstrou que a suplementação com azeite de oliva induziu diminuição na atividade da SOD-total, porém não alterou a relação HP/SOD (Tabelas 4 e 5 e Figura 2). A SOD corresponde a uma família de enzimas com papel antioxidante, que catalisa a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio. Existem duas formas de SOD: CuZn-SOD, presente principalmente no citosol, e Mn-SOD, localizada primariamente na mitocôndria (Ferreira & Matsubara, 1997). Animais dos grupos AO, AG e DPE apresentaram alterações nas atividades das enzimas SOD, CuZn-SOD e Mn-SOD. O grupo que recebeu azeite de oliva apresentou diminuição na atividade da Mn-SOD e redução na concentração de proteína carbonil (Tabelas 4 e 5 e Figura 3), indicando efeito antioxidante direto do azeite na diminuição da oxidação de proteína nesses animais.

Chetty et al. (1999) observaram que o azeite de oliva induzia redução nas concentrações de ferro sérico. Desde que o dano oxidativo em proteínas tem sido principalmente caracterizado como uma reação catalisada por metais, como o ferro (Fe^{2+}) (Resnick & Packer, 1994), podemos sugerir que o azeite de oliva diminuiu a oxidação de proteínas no miocárdio por reduzir as concentrações de ferro.

Suplementação dietética com ácido oléico induziu diminuição nas atividades da SOD-total, porém não alterou a relação HP/SOD (Tabela 5 e Figura 2). Desde que não foram observadas alterações nas concentrações de hidroperóxido de lipídio, MDA e proteína carbonil nesse grupo (Tabela 5 e Figura 3), pode-se sugerir que o ácido oléico apresentou menor efeito antioxidante do que o azeite de oliva.

Massaro et al. (2002) sugeriram que a atividade antioxidante do ácido oléico estava relacionada à prevenção da diminuição da concentração de GSH e à redução da produção de ERO intracelular. Não foram observadas alterações nas concentrações de GSH-Px e GSH nos grupos tratados (Tabela 4).

No grupo que recebeu o polifenol DPE, foi observada diminuição significativa na atividade da SOD-total e elevação na relação HP/SOD em relação aos demais grupos (Tabelas 4 e 5 e Figura

2). Não foram observadas alterações significantes na atividade da GSH-Px e na concentração de GSH no miocárdio dos grupos experimentais, entretanto, a atividade da catalase esteve significativamente diminuída no grupo tratado com o polifenol (Tabela 4). O elevado consumo da SOD e da catalase nesse grupo demonstrou a ação seqüencial do sistema antioxidante para controlar a produção de ERO (radical superóxido e peróxido de hidrogênio) formados durante o processo de produção de energia (Figura 6).

Figura 6. Ação do sistema antioxidante endógeno no combate às espécies reativas de oxigênio.

As quais são formados durante a oxidação de nutrientes e produção de energia na cadeia de transporte de elétrons (Gutteridge & Halliwell, 1990) e que Mn-SOD tem importante papel protetor contra o estresse oxidativo mitocondrial, as atividades diminuídas dessa isoenzima observadas no grupo suplementado com DPE sugerem que o polifenol isolado induziu alterações no metabolismo oxidativo e energético cardíaco. Polzonetti et al. (2004) sugeriram que polifenóis do azeite de oliva poderiam atuar como moduladores do metabolismo.

O metabolismo cardíaco é predominantemente aeróbico. As atividades da lactado desidrogenase (LDH), enzima que evidencia o metabolismo anaeróbico (Bass et al., 1969), não foram alteradas pelos tratamentos com azeite, ácido oléico e DPE (Tabela 6). As atividades da citrato sintase (CS), enzima marcadora do Ciclo do Citrato (Bass et al., 1969), estiveram elevadas no tecido cardíaco de animais que receberam DPE (Tabela 6 e Figura 4), sugerindo que o polifenol induziu aumento no metabolismo aeróbico cardíaco. Desde que os ácidos graxos constituem a principal fonte de energia para o coração, alteração na oxidação de ácidos graxos pode ter um impacto maior sobre a função cardíaca do que alterações em outras vias oxidativas (Carvajal & Sanchez, 2003).

No grupo tratado com DPE foi observada elevação na concentração de TG no tecido cardíaco (Tabela 6 e Figuras 4 e 5), indicando elevada disponibilidade de ácidos graxos para a produção de energia. Desse modo, a elevação no metabolismo aeróbico pode ter sido consequência da elevação de acetil coenzima-A proveniente da maior oxidação de ácidos graxos.

Quando há elevação de ácidos graxos livres no coração, o excesso de ácidos graxos e de acetil coenzima-A, que não é utilizado no processo de oxidação, é captado para a síntese de TG (Lewin & Coleman, 2003). O acúmulo de TG no tecido cardíaco tem sido associado a cardiomiopatias, sugerindo que o excesso de TG pode ser tóxico (Schaffer, 2003).

Desse modo, a elevação na concentração de TG e no metabolismo aeróbico induzida por DPE sugeriu maior produção de radicais livres no miocárdio, desde que 1 a 2% do oxigênio consumido na cadeia respiratória e transporte de elétrons resulta na formação do radical superóxido (O_2^-) (Feuers, 1998). Essa observação pode ser confirmada através das concentrações elevadas de hidroperóxido de lipídio (HP) no tecido cardíaco dos animais que receberam DPE (Tabela 5 e Figura 5), sugerindo elevação da peroxidação lipídica.

A lipoperoxidação é um processo em cascata desencadeado pelo ataque de radicais livres aos ácidos graxos das membranas biológicas. Esse processo envolve a retirada de um átomo de hidrogênio de um ácido graxo adjacente, formando dienos conjugados, que se oxidam em hidroperóxidos de lipídio (Parfitt et al., 1994). Através da clivagem do hidroperóxido é formado o malondialdeído (MDA) (Thérond et al., 2000), que aumenta consideravelmente a toxicidade dos radicais livres, sendo considerado como "segundo mensageiro de toxicidade" (Medeiros et al., 1995). Os aldeídos produzidos pela peroxidação lipídica são marcadores da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados. Esses produtos podem se ligar a apolipoproteína B-100 na superfície da LDL-colesterol, especificamente aos grupos amino, alterando a carga eletroforética e, assim, indicando modificação oxidativa da LDL (Cotelle, 2001). Portanto, elevadas concentrações de MDA induzem oxidação das lipoproteínas séricas, constituindo fator de risco para aterosclerose (Paolicchi et al., 1999).

A elevação no HP e diminuição no MDA observada no grupo DPE (Tabela 5) sugere que o polifenol pode ter atuado impedindo a clivagem do hidroperóxido de lipídio em MDA no miocárdio e interceptando o processo de peroxidação através da redução de radicais alcoxil ou peroxil em hidroperóxidos (Cotelle, 2001).

Foi observado que o polifenol DPE pode atuar na diminuição das concentrações de MDA em fígado de ratos intoxicados por cádmio (Casalino et al., 2002) e em células intestinais submetidas ao estresse oxidativo (Manna et al., 1997).

Embora o DPE tenha induzido diminuição nas concentrações de MDA, a elevação na relação HP/SOD e a diminuição acentuada nas atividades da enzima antioxidante catalase, bem como a elevação nas concentrações de TG e no metabolismo aeróbico cardíaco, podem ser indicativos de que o DPE apresentou ação pró-oxidante no miocárdio desses animais.

A propriedade antioxidante do polifenol DPE tem sido geralmente associada a sua habilidade para formar radicais estáveis a partir de compostos reativos, devido aos grupos hidroxil em sua estrutura química (Erçok et al., 2003). Entretanto, esses processos oxidativos (ou auto-oxidação) podem ser acompanhados por produção de moléculas pró-oxidantes, como espécies reativas de oxigênio (ânion superóxido) ou radicais secundários, que conseqüentemente podem propagar reações em cadeia, constituindo um indesejável efeito pró-oxidante dos polifenóis (Cotelle, 2001).

Estudos recentes determinaram que a atividade antioxidante do DPE, bem como sua absorção no organismo é dose-dependente (Manna et al., 1997; Manna et al., 2000). Visioli et al. (2000) observaram que a quantidade de DPE excretada na urina de animais suplementados com o polifenol não correspondia totalmente à ingerida, sugerindo que exposição contínua aos polifenóis do azeite de oliva poderia levar a acúmulo no organismo em longo prazo. Estudos *in vitro* determinaram citotoxicidade do DPE apenas em concentrações excessivamente maiores do que as encontradas no consumo habitual de azeite de oliva (Babich & Visioli, 2003). D'Angelo et al. (2001) não observaram efeitos adversos para concentrações elevadas como 2gDPE/Kg administrada em dose única. Em nosso estudo, foi determinado o efeito da ingestão crônica do DPE em concentrações menores (7,5mg DPE/Kg) duas vezes por semana. O

potencial biológico dos polifenóis do azeite de oliva foi observado *in vitro*. Evidências do mesmo efeito antioxidante *in vivo* necessitam esclarecimentos.

As diferenças encontradas na atividade do azeite de oliva sobre o estresse oxidativo e metabolismo energético, quando comparadas à atividade de seus componentes isolados, também foram observadas por outros pesquisadores em trabalhos com extratos de plantas e seu princípio ativo isolado (Repetto & Llesuy, 2002), sugerindo que no azeite de oliva, a existência de outros compostos secundários, além dos polifenóis, atua modulando sua capacidade antioxidante.

Dessa forma, a habilidade dos polifenóis em prevenir a ação de radicais livres sobre a superfície das membranas biológicas (Erçok et al., 2003) e a propriedade do ácido oléico de incorporar-se nos fosfolipídios de membrana demonstraram que o azeite de oliva pode exercer atividade antioxidante direta. Nossos dados demonstraram que suplementação dietética com azeite de oliva exerceu o efeito protetor mais efetivo sobre os parâmetros séricos, elevando as concentrações de HDL e diminuindo o colesterol-LDL, e sobre o músculo cardíaco, diminuindo o dano oxidativo em proteínas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

*International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted journal. N Engl J Med 1007; 336: 309-315.

Aebi H. Methods of enzymatic analysis. 2^a ed. (New York):Bergmeyer H. V. Editor Verlag Chemie Weinheim, 1974; 1-4.

Aviram M, Elias K. Dietary olive oil reduces low density lipoprotein uptake by macrophages and decreases the susceptibility of the lipoprotein to undergo lipid peroxidation. Ann Nutr Metab 1993; 37: 75-84.

Baldioli M, Servili M, Perreti G, Montedoro GF. Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. J Am Chem Soc 1996; 73:1589-1593.

- Benkhalti F, Prost J, Paz E, Perez-Jimenez F, El Modafar C, Boustani E. Effects of feeding virgin olive oil or their polyphenols on lipid of rat liver. *Nutr Res* 2002; 22:1067-1075.
- Carvajal K, Sánchez RM. Heart metabolic disturbances in cardiovascular diseases. *Arch Med Res* 2003; 34:89-99.
- Casalino E, Calzaretti G, Sblano C, Landriscina V, Tecce M F, Landriscina C. Antioxidant effect of hidrxytyrosol (DPE) and Mn²⁺ in liver of cadmium-intoxicated rats. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 2002; 133:625-632.
- Chetty KN, Conway R, Harris KC, Dorsey WC, Hill D, Chetty S, Yerrapragada R, Jain S. Dietary supplementation with olive oil influences iron concentrations in rats. *Nutr Res* 1999; 19:1665-1670.
- Babich H, Visioli F. In vitro citotoxicity to human cells in culture of some phenolics from olive oil. *Il Farmaco* 2003; 58:403-407.
- Bass A, Brdicka PE, Eyer P, Hofer S, Pette D. Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level of enzymatic organization. *Eu J Biochem* 1969;10:198-206.
- Cotelle N. Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Topics Med Chem* 2001; 1: 569-590.
- D'Angelo S, Manna C, Migliardi V, Mazzoni O, Morrica P, Capasso G, Pontoni G, Galletti P, Zappia V. Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil. *Drug Metabol Dispos* 2001; 29:1492-1498.
- De La Cruz JP, Quintero L, Villalobos MA, De La Cuesta F S. Lipid peroxidation and glutathione system in hyperlipidemic rabbits: influence of olive oil administration. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1485: 36-44.
- Diniz YS, Faine LA, Almeida JA, Silva MDP, Ribas BO, Novelli ELB. Toxicity of dietary restriction of fat enriched diets on cardiac tissue. *Food Chem Toxicol* 2002;40:1893-1899.
- Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82:47-95.
- Erçok F, Keskin N, Erçok S. Theoretical investigation of hydroxytyrosol and its radicals. *J Mol Structure* 2003; 625:87-94.
- Faine LA, Cicogna AC, Diniz YS, Almeida JA, Burneiko RC, Rodrigues HG, Novelli ELB. Dietary restriction: metabolic shifting for cardiac health. *J Nutr Envir Med* 2003; 13: 25-31.

- Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Rev Med Ass Brasil 1997; 43:61-68.
- Feuers RJ. The effects of dietary restriction on mitochondrial dysfunction in aging. Ann NY Acad Sci 1998; 854:192-201.
- Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson D S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clin Chem 1972; 18:499-502.
- Gutteridge JMC, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. Trends Biomed Sci 1990; 15:129-135.
- Henning SI, Wambolt RB, Schonckess BO. Contribution of glycogen to aerobic myocardial glucose utilization. Circ 1996; 93:1549-1555.
- Heyden S. Polyunsaturated and monounsaturated fatty acids in the diet to prevent coronary heart disease via cholesterol reduction. Ann Nutr Metab 1994; 38:117-122.
- Jiang ZY, Woollard ACS, Wolf S. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with TBA assay and on iodometric method. Lipids 1991; 26:853-856.
- Kaur C, Kapoor HC. Antioxidants in fruits and vegetables - the millennium's health. Int J Food Sci Tech 2001; 36:703-725.
- Lewin TM, Coleman RA. Regulation of myocardial triacylglycerol synthesis and metabolism. Biochim Biophys Acta 2003; 1694:63-75.
- Lopes-Virella M, Stone P, Ellis S, Cowell JA. Cholesterol determination in high-density lipoprotein separated by three methods. Clin Chem 1977; 23:882-884.
- Lowry OH, Rosebrough NL, Farr AL, Randall RJ. Protein mensurement with the Folin-phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193:265-275.
- Manna C, Galletti P, Cucciolla V, Moltedo O, Leone A, Zappia V. The protective effect of the olive oil polyphenol (3,4-dihydroxyphenyl)-ethanol counteracts reactive oxygen metabolite-induced cytotoxicity in Caco-2 cells. J Nutr 1997; 127:286-292.
- Manna C, Galletti P, Maisto G, Cucciolla V, D'Angelo S, Zappia V. Transport mechanism and metabolism of olive oil hydroxytyrosol in Caco-2 cells. FEBS Letters 2000; 470:341-344.
- Massaro M, Carluccio MA, Paolicchi A, Bosetti F, Solaini G, De Caterina R. Mechanisms for reduction of endothelial activation by

- oleate: inhibition of nuclear factor- κ B through antioxidants effects. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 2002; 67: 175-181.
- Medeiros MHG, Carvalho UB, Farias, LP, Loureiro, APM. DNA damage induced by secondary lipid oxidant products. *Cienc Cult* 1995; 47:336-339.
- Montedoro G, Servili M, Baldioli M, Miniati E. Simple and hidrolisable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation, and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *J Agric Food Chem* 1992; 40:1571-1576.
- Moura RA. *Técnicas de laboratório* 1982; São Paulo: Atheneu Editora, 822p.
- Nakamura W, Hojoda S, Hayashi K. Purification and properties of rat liver glutathione peroxidase. *Biochem Biophys Acta* 1974; 358:251-261.
- Nishiyama Y, Ikeda , Haramaki N, Yoshida N, Imaizumi T. Oxidative stress is related to exercise intolerance in patients with heart failure. *Am Heart J* 1998; 135:115-120.
- Norman GR, Streiner DL. *Biostatistics - The bare essentials* 1994; St. Louis: Ed. Mosby Book, 260p.
- Novelli ELB, Fernandes AAH, Diniz YS, Almeida JA, Faine LA, Ribas BO. The adverse effect of a high-energy dense diet on cardiac tissue. *J Nutr Environ Med* 2002; 12:287-294.
- Paolicchi A, Minotti G, Tonarelli P, Tongiani R, Cesare D, Mezzetti A, Dominici S, Comporti M, Pompella A. Gama-glutamyl transpeptidase-dependent iron reduction and LDL oxidation-a potential mechanism in atherosclerosis. *J Invest Med* 1999; 47:151-160.
- Parffit VJ, Rubba P, Bolton C, Marotta G, Hartog M, Mancini M. A comparison of antioxidant status and free radical peroxidation of plasma lipoproteins in healthy young persons from Naples and Bristol. *Eur Heart J* 1994; 15:871-876.
- Polzonetti V, Egidi D, Vita A, Vincenzetti S, Natalini P. Involvement of oleuropein in (some) digestive metabolic pathways. *Food Chem* 2004; 88: 11-15.
- Pucheu S, Coudray C, Tresallet N, Favier A, Leiris J. Effect of dietary antioxidant trace element supply on cardiac tolerance to ischemia-reperfusion in the rat. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27:2303-2014.

- Ragione FD, Cucciolla V, Criniti, V, Indaco S, Borriello A, Zappia V. Antioxidant induce different phenotypes by a distinct modulation of signal transduction. *FEBS Letters* 2002; 532:289-294.
- Raveh O, Pinchuk I, Fainaru M. And Lichtenberg, D. Kinetics of lipid peroxidation in mixtures of HDL and LDL, mutual effects. *Free Rad Biol Res* 2001; 31:1486-1497.
- Repetto MG, Llesuy SF. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Braz J Med Biol Res* 2002; 35:523-534.
- Resnick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzimol* 1994; 233:357-363.
- Roche HM, Gibney MJ, Kafatos A, Zampelas A, Williams CM. Beneficial properties of olive oil. *Food Res International* 2000; 33:227-231.
- Ruiz-Guttierrez V, Molina MT, Vázquez CM. Comparative effects of feeding different fats on fatty acid composition of major individual phospholipids of rat hearts. *Ann Nutr Metab* 1990; 34:350-358.
- Satoh, K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a colorimetric method. *Clin Chim Acta* 1978; 90:37-43.
- Schaffer JE. Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr Opin Lipodol* 2003; 14:281-287.
- Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and non-protein sulphhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochem* 1968; 25:192-205.
- Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction and aging. *Science* 1996; 273:59-63.
- Spitz DR, Oberley LW. An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. *Anal Biochem* 1989; 179:8-18.
- Therond P, Rousselot D, Spraul A, Conti M, Legrand A. Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. *Curr Opinion Clin Nutr Met Care* 2000; 3:373-384.
- Visioli F, Bellomo G, Galli C. Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem Biophys Res Comm* 1998; 247:60-64.
- Visioli F, Bellomo G, Montedoro G, Galli C. Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. *Atherosclerosis* 1995; 117:25-32.

Visioli F, Galli C, Bornet F, Mattei A, Patelli R, Galli G, Caruso D. Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. FEBS Letters 2000; 468:159-160.

Weisiger RA, Fridovich I. Superoxide dismutase. Organelle specificity. J Biol Chem 1973; 248:3582-3592.

Wickman-Coffelt J, Parmley WW, Mason DT. The cardiac hypertrophy process. Analysis of determining pathological vs. physiological development. Cir Res 1979; 45:697-707.

Zadeh JN, Sarmadi JT, Ling E, Wolf SP. Low-density lipoprotein is the major carries of lipid hydroperoxides in plasma. Biochem J 1996; 313:781-786.

Capítulo 2

Efeitos do Azeite de Oliva e de seus Componentes sobre o Perfil Lipídico, Metabolismo Energético e Equilíbrio Oxidante/Antioxidante no Miocárdio de Ratos Submetidos ao Estresse Oxidativo Experimental

RESUMO

Inúmeras condições patológicas estão associadas ao estresse oxidativo. A maioria dessas alterações desenvolve-se lentamente tornando-se manifestas quando clinicamente instaladas. A ingestão de azeite de oliva, rico em polifenóis e ácidos graxos monoinsaturados, tem aumentado nos últimos anos, na maioria das populações. Deste modo, o estudo do mecanismo de ação e a determinação das propriedades antioxidantes dos componentes do azeite sobre o metabolismo oxidativo e energético miocárdico, em condições de estresse oxidativo, são de grande interesse.

No presente trabalho foi determinado o efeito do azeite de oliva e de seus componentes sobre o músculo cardíaco de animais submetidos ao estresse oxidativo (EO) experimental. Para tanto, foram utilizados 30 ratos machos, *Wistar*, 200 g, divididos em 5 grupos (n=6). O grupo C foi considerado controle. O grupo sob estresse oxidativo (EO) recebeu butil hidroxitolueno (BHT) (0,044g/dia/rato) via intraperitoneal, duas vezes por semana. Os animais do grupo EO-AO foram submetidos ao estresse oxidativo e receberam azeite de oliva extra-virgem (7,5mL/Kg/2x semana). O grupo EO-AG foi submetido ao estresse oxidativo e foi tratado com ácido oléico (3,45 mL/Kg/2x semana). O grupo EO-DPE recebeu o BHT, para a indução do estresse oxidativo, e o polifenol DPE (7,5mg/Kg/2x semana). Esses componentes foram administrados por gavagem, durante o período de 30 dias.

Animais do grupo EO apresentaram estresse oxidativo caracterizado por diminuição no peso corporal e peso do coração, elevação da concentração de lipoperóxidos e alteração nas defesas antioxidantes do miocárdio. Os tratamentos com azeite de oliva, ácido oléico e DPE não induziram melhora no perfil lipídico dos animais submetidos ao EO experimental. Suplementação com azeite de oliva induziu elevação nas defesas antioxidantes superóxido-dismutase (SOD)-total, Mn-SOD, catalase e glutathiona reduzida (GSH) no miocárdio de ratos com estresse oxidativo. Ácido oléico elevou as defesas antioxidantes SOD-total, CuZn-SOD, Mn-SOD e GSH. Embora não tenham sido observadas alterações nas concentrações dos marcadores de dano oxidativo, hidroperoxido de lipídio, malondialdeído e proteína carbonil nos grupos EO-AO e EO-AG, o azeite de oliva e o ácido oléico foram benéficos, elevando a defesa antioxidante do tecido cardíaco sob

estresse oxidativo. Administração do polifenol DPE induziu aumento na concentração de GSH e na atividade das enzimas antioxidantes SOD-total, CuZn-SOD e Mn-SOD, porém elevou as concentrações de hidroperóxido de lipídio, triacilgliceróis e o metabolismo aeróbico no miocárdio de animais sob estresse oxidativo experimental.

Palavras chave: Azeite de oliva, ácido oléico, polifenóis, miocárdio, estresse oxidativo experimental, metabolismo energético.

INTRODUÇÃO

O azeite de oliva é a principal fonte de gordura na dieta Mediterrânea, sendo conhecido por seu elevado conteúdo de ácido graxo monoinsaturado, o ácido oléico (Vicario et al., 1998; Serra-Majem et al., 2003). A propriedade antioxidante do ácido oléico tem sido atribuída principalmente à sua estrutura química. Desde que possui apenas uma dupla ligação, o ácido oléico é menos susceptível ao ataque dos radicais livres e à lipoperoxidação do que ácidos graxos poliinsaturados (Abuja & Albertini, 2001).

A atividade antioxidante do azeite de oliva, particularmente do conhecido como azeite extra-virgem, também tem sido relacionada a sua elevada concentração de antioxidantes naturais, os polifenóis (Wiseman et al., 1995). Desde que no processamento para a produção, o azeite de oliva extra-virgem não sofre lavagens sucessivas e não é submetido a períodos de intenso aquecimento e resfriamento, este azeite retém a maioria dos componentes do fruto original, incluindo os polifenóis (Baldioli et al., 1996; Visioli & Galli, 1998).

O principal polifenol encontrado no azeite de oliva é o 3,4-dihidroxifeniletanol (DPE) (Montedoro et al., 1992). Estudos da atividade desse componente *in vitro* demonstraram capacidade de inibição da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL)-colesterol (Visioli et al., 1995), redução na citotoxicidade induzida pelo etanol (Wickamasingue et al., 1996) e indução de apoptose (Ragione et al., 2002). Entretanto, poucos estudos têm sido desenvolvidos sobre a ação do DPE *in vivo*, não havendo informação sobre os efeitos da ingestão crônica deste polifenol como medida terapêutica na diminuição do estresse oxidativo.

A associação do estresse oxidativo à aterosclerose e disfunções vasculares, bem como a alterações estruturais no miocárdio (Ferrari et al., 1998; Yue et al., 1999; Droge, 2002; Ceconi et al., 2003; Novelli et al., 2002) tem estimulado o consumo de diferentes variedades de azeite de oliva (Serra-Majem et al., 2003), independente do conhecimento de suas reais propriedades antioxidantes. Embora os países Mediterrâneos sejam responsáveis pela produção de mais de 95% do azeite de oliva consumido em todo o mundo, muitas propriedades benéficas podem ser destruídas durante o processo de envasamento e refinamento.

Espécies reativas de oxigênio (ERO), ou radicais livres, são essenciais para o fornecimento de energia, sinalização química, detoxificação e função imune e, como consequência, são continuamente produzidas no organismo (Droge, 2002). Na maior parte das reações fisiológicas, a produção de radicais livres é controlada. Entretanto, a produção excessiva desses compostos, sua exposição a oxidantes externos ou diminuição dos mecanismos de defesa antioxidante pode resultar em dano no DNA, lipídios e proteínas, caracterizando o chamado "estresse oxidativo" (Nishiyama et al., 1998). Durante o estresse oxidativo, espécies reativas de oxigênio, tais como ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxil (OH^\cdot) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) podem produzir danos nos tecidos, como a peroxidação de lipídios das membranas celulares. Lipoperoxidação é uma reação em cascata provocada pela ação de radicais livres. Desde que uma vez iniciada, propaga-se continuamente levando a destruição celular. Desta forma, a lipoperoxidação e consequente formação de hidroperóxidos de lipídios depende da presença de defesas antioxidantes (Gutteridge & Halliwell, 1990).

O dano produzido pelos radicais livres nas biomoléculas tem sido associado ao risco elevado para o desenvolvimento de doenças crônicas, como câncer e doenças cardiovasculares (Droge, 2002). Evidências recentes têm sugerido que ERO podem ser importantes fatores relacionados à disfunção cardíaca (Ferrari et al., 1998; Novelli et al., 2002; Faine et al., 2002; Diniz et al., 2003). Ruiz-Guttierrez et al. (1990) observaram elevadas concentrações de lipoperóxidos em pacientes com dano cardíaco. Estudos recentes têm sugerido que o estresse oxidativo poderia apresentar importante papel na hipertrofia do miocárdio e no

aparecimento da insuficiência cardíaca (Polidori et al., 2004; Manna et al., 2004).

O miocárdio contém grande quantidade de mitocôndrias e possui elevada taxa de consumo de oxigênio (Henning et al., 1996), indicando maior susceptibilidade do músculo cardíaco ao estresse oxidativo e a importância do metabolismo energético cardíaco na produção de radicais livres.

A importância do metabolismo energético no músculo cardíaco tem sido freqüentemente estudada, entretanto, os efeitos da ingestão de azeite de oliva, bem como de seus componentes, ácido oléico e polifenol DPE, sobre o metabolismo energético cardíaco e sua relação com o equilíbrio oxidante/antioxidante em condições de estresse oxidativo ainda não foram estabelecidos.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 30 ratos machos, adultos, *Wistar*, de peso médio 200 gramas. Os animais foram provenientes do Biotério Central da UNESP "campus de Botucatu" e transferidos para o "Laboratório de Bioquímica na Experimentação Animal" do Departamento de Química e Bioquímica, Instituto de Biociências, UNESP/Botucatu, onde permaneceram durante todo o período experimental, à temperatura de $22\pm 3^{\circ}\text{C}$, período claro/escuro de 12 horas.

Os animais foram mantidos em gaiolas de plástico individuais, recebendo dieta basal (Purina-Labina, 3074, SIF, Purina Ltd. Campinas, SP, Brasil) e água destilada *ad libitum*. Para permitir a aclimatação dos animais, os ratos permaneceram nas condições acima citadas por um período de 15 dias antes do início do experimento. Diariamente as gaiolas foram limpas.

Os animais foram divididos em 5 grupos com 6 ratos cada. ~~Todos os animais receberam dieta basal e água *ad libitum*. O grupo C~~ foi considerado controle, sendo tratado com salina (NaCl 0,9%). O grupo submetido ao estresse oxidativo experimental (EO) recebeu injeção intraperitoneal de butil hidroxitolueno (BHT) (0,044g/rato), dissolvido em etanol 10%, duas vezes por semana. Os animais do grupo

EO-AO receberam azeite de oliva extra-virgem (Colavita, Italia) (7,5mL/Kg/dia). O grupo EO-AG foi tratado com ácido oléico (Sigma, USA) (3,45 mL/Kg/dia). O grupo EO-DPE recebeu o polifenol 3,4-dihidroxifeniletanol (DPE) (Cayman Chemical, USA) (7,5mg/Kg/dia). Esses componentes foram administrados por gavagem, como suplementação da dieta basal, duas vezes por semana, durante o período de 30 dias. Os grupos EO-AO, EO-AG e EO-DPE foram submetidos ao estresse oxidativo experimental como no grupo EO. Todos os animais foram pesados semanalmente.

O azeite de oliva utilizado no presente projeto foi de procedência comercial (Botucatu, São Paulo, Brasil) e amostras deste azeite foram utilizadas para análise cromatográfica de ácidos graxos (GC 17-A, Shimatzu, Japão). O conteúdo de ácido oléico foi 46% (Tabela 1). A quantidade de ácido oléico administrada foi calculada para corresponder à sua concentração no azeite de oliva utilizado. A concentração do polifenol DPE que foi administrada corresponde à concentração média de polifenóis totais contida em azeite de oliva extra-virgem de alta qualidade (Montedoro et al., 1992).

Determinações Bioquímicas

Após 30 dias de tratamento, os animais foram sacrificados por fratura cervical e decapitação. O soro foi coletado através de decapitação e separado para as determinações das concentrações de proteína total (Lowry, 1951), colesterol total (Moura, 1982), triacilgliceróis (Moura, 1982), lipoproteína de elevada densidade (HDL)-colesterol (Lopes-Virella et al., 1977), lipoproteína de baixa densidade (LDL)-colesterol (Friedewald et al., 1972) e lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL)-colesterol (Friedewald et al., 1972).

O coração foi imediatamente retirado, lavado em solução salina gelada (NaCl 0.9%). O ventrículo esquerdo foi separado em duas porções de 200mg. As porções (I) foram retiradas, identificadas e mantidas a 4°C, em cuba de isopor com gelo picado, sendo posteriormente homogeneizadas em *Potter Elvehjem*, com pistilo de teflon, com 5 mL de tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,0. Os homogeneizados foram centrifugados a 10000 rpm por 15 minutos, em centrífuga refrigerada a -4°C. O sobrenadante foi utilizado para

determinação da concentração de proteínas totais (Lowry, 1951), triacilgliceróis (Moura, 1982), malondialdeído (MDA) (Satoh, 1978), hidroperóxido de lipídio (Jiang et al., 1991), glutathiona reduzida (GSH) (Sedlak & Lindsay, 1968) e atividades das enzimas, glutathiona peroxidase (GSH-Px) (Nakamura et al., 1974), catalase (Aebi, 1974), superóxido dismutase (SOD-total) (Pucheu, 1995) e as isoenzimas CuZn-superóxido dismutase (CuZn-SOD) (Weisiger & Fridovich, 1973) e Mn-superóxido dismutase (Mn-SOD) (Spitz & Oberley, 1989). As atividades da Mn-SOD foram estimadas através da diferença entre SOD-total e CuZn-SOD. As porções (II) foram utilizadas para a determinação da concentração de proteína carbonil (Resnick & Packer, 1994). As leituras espectrofotométricas foram realizadas no espectrofotômetro Pharmacia Biotech (974213, Cambridge, England) e em leitor de microplaca (Bio-tech Instruments, USA). Todos os reagentes eram de procedência da Sigma (St. Louis, MO, USA).

Análise Estatística

Os resultados obtidos foram expressos em média \pm desvio padrão. A comparação entre os grupos foi realizada por análise de variância (ANOVA) para experimentos inteiramente casualizados, seguida do teste de Tukey. Dados expressos como mediana \pm semi-amplitude total foram comparados através de análise de variância não-paramétrica e respectivo teste de comparações múltiplas. O nível de significância foi de 5% (Norman & Streiner, 1994).

RESULTADOS

Os efeitos adversos do estresse oxidativo nos animais que receberam BHT (grupo EO) foi caracterizado pela diminuição no ganho de peso, peso corporal e peso do coração (Tabela 2), elevação na concentração de TG, VLDL e na relação TG/HDL no soro (Tabela 3), elevação na concentração de HP e alteração nas atividades das enzimas antioxidantes GSH-Px, SOD-total, CuZn-SOD e Mn-SOD (Tabela 4 e Figura 1).

Os tratamentos com azeite de oliva (EO-AO), com ácido oléico (EO-AG) e com o polifenol (EO-DPE) em animais submetidos ao estresse oxidativo experimental não induziram alterações no ganho de peso, peso corporal final, peso do coração e relação peso coração/peso corporal (Tabela 2).

Não foram observadas alterações significantes nas concentrações de colesterol total, nas lipoproteínas HDL, LDL e índice aterogênico entre os grupos. DPE elevou as concentrações de TG e VLDL no soro de animais submetidos ao estresse oxidativo (Tabela 3).

A suplementação dietética com azeite de oliva extra-virgem em ratos submetidos ao estresse oxidativo cardíaco induziu elevação nas atividades das enzimas antioxidantes SOD-total, Mn-SOD, catalase e nas concentrações de GSH, comparada ao grupo EO (Tabela 4 e Figuras 1 e 2). Ratos com estresse oxidativo que receberam ácido oléico apresentaram elevação nas atividades da SOD-total, CuZn-SOD e Mn-SOD e nas concentrações de GSH em relação aos grupos EO e EO-AO (Tabela 4 e Figuras 1 e 2). Também foi observada elevação nas atividades da SOD-total e Mn-SOD nos animais do grupo EO-AG em relação ao grupo EO-AO. Administração de azeite de oliva e ácido oléico não alterou as concentrações de HP, MDA e proteína carbonil no miocárdio dos animais submetidos ao estresse oxidativo experimental (Tabela 4). DPE induziu elevação acentuada nas atividades das enzimas SOD-total, CuZn-SOD e Mn-SOD em relação aos demais grupos (Tabela 4 e Figuras 1 e 2). DPE elevou as concentrações de HP (Tabela 5).

Na Tabela 6 estão apresentadas as determinações associadas ao metabolismo energético no miocárdio. DPE elevou as concentrações de triacilgliceróis (Tabela 6 e Figura 3) no miocárdio dos animais. Azeite de oliva e ácido oléico não induziram alterações nas atividades das enzimas LDH e CS no tecido cardíaco. Administração oral de DPE elevou a atividade da CS no tecido cardíaco dos animais (Tabela 6 e Figura 4).

Tabela 1. Composição e concentração de ácidos graxos no azeite de oliva utilizado

Ácidos graxos	Concentração (%)
C ₁₆ - palmítico	40,5
C _{16:1} - palmitoléico	0,7
C ₁₈ - esteárico	1,5
C _{18:1} - oléico	46
C _{18:2} - linoléico	10,3
C _{18:3} - linolênico	0,7
C _{20:1} - eicosaenóico	0,3
Total saturados	42
Total insaturados	58
Total monoinsaturados	47
Total ácido oléico	46

Departamento de Tecnologia de Alimentos – Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, Botucatu.

Tabela 2. Peso inicial, ganho de peso absoluto (GP), peso corporal final (PCF), peso do coração e peso do coração/ peso total (PC/PT) no grupo controle (C), submetido ao estresse oxidativo (EO), com EO e dieta suplementada com azeite de oliva (EO-AO), com EO e ácido oléico (EO-AG) e com EO e polifenol (EO-DPE)

Parâmetros	GRUPOS					Conclusão Estatística
	C	EO	EO-AO	EO-AG	EO-DPE	
Peso Inicial (g)	199,5± 9,9 ^a	198,9 ±5,8 ^a	201,1± 5,1 ^a	197,9 ± 7,0 ^a	201,8 ± 7,9 ^a	0,46 (P>0,05)
GP (g)	151,5 ± 24,7 ^b	112 ± 23,2 ^a	91,1 ± 31,1 ^a	89,2 ± 25,4 ^a	85,2 ± 25,4 ^a	6,7 (P<0,01)
PCF (g)	348,2±27,1 ^b	311,5± 4,6 ^a	292,2±33,1 ^a	286,6 ± 19,1 ^a	288,4±24,1 ^a	5,9 (P<0,05)
Peso Coração (g)	1,2± 0,2 ^b	0,98 ±0,07 ^a	0,93 ± 0,14 ^a	0,91 ± 0,05 ^a	0,92± 0,06 ^a	6,27 (P<0,05)
PC/PT (mg/g)	3,2 ± 0,2 ^a	3,2 ± 0,1 ^a	3,2 ± 0,3 ^a	3,2 ± 0,1 ^a	3,2 ± 0,2 ^a	0,00 (P>0,05)

Resultados são expressos como média ± desvio padrão. Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos.

Tabela 3. Concentrações de colesterol total, lipoproteína de elevada densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), triacilgliceróis (TG) e relação TG/HDL no soro de animais submetidos ao estresse oxidativo (EO) e tratados com EO e azeite de oliva (EO-AO), com EO e ácido oléico (EO-AG) e com EO e polifenol (EO-DPE)

Determinações Bioquímicas	GRUPOS					Conclusão Estatística
	C	EO	EO-AO	EO-AG	EO-DPE	
Colesterol (mg/dL)	89,6±19,4 ^a	96,2±14,1 ^a	93,5±20,9 ^a	93,3±15,5 ^a	102,0±20,1 ^a	0,31 (P>0,05)
HDL (mg/dL)	35,0±5,4 ^a	29,1±7,6 ^a	28,6±7,6 ^a	27,2±6,5 ^a	32,3±7,3 ^a	0,52 (P>0,05)
LDL (mg/dL)	42,5±8,4 ^a	53,7±6,4 ^a	51,9±13,5 ^a	47,8±9,6 ^a	44,7±14,9 ^a	0,73 (P>0,05)
VLDL* (mg/dL)	7,6±3,7 ^a	15,5±11,3 ^b	16,7±9,4 ^{bc}	17,8±4,8 ^{bc}	24,4±5,8 ^c	14,8 (P<0,01)
TG* (mg/dL)	38,2±18,5 ^a	77,7±56,8 ^b	83,7±47,4 ^{bc}	89,2±23,9 ^{bc}	122,1±29,4 ^c	6,7 (P<0,01)
TG/HDL	1,16±0,16 ^a	2,8±0,9 ^b	3,2±1,12 ^b	3,3±0,6 ^b	3,8±0,7 ^b	11,4 (P<0,0001)

Resultados são expressos como média ± desvio padrão. Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos.*Valor expresso como mediana ± semi-amplitude total.

Tabela 4. Atividades das enzimas superóxido dismutase total (SOD-total), CuZn-superóxido dismutase (CuZn-SOD), Mn-superóxido dismutase (Mn-SOD), glutatona peroxidase (GSH-Px), catalase e concentrações de glutatona reduzida (GSH) e proteína no tecido cardíaco dos animais controles (C), submetidos ao estresse oxidativo experimental (EO), com EO e tratados com azeite de oliva (EO-AO), com EO e ácido oléico (EO-AG) e com EO e polifenol (EO-DPE)

Determinações Bioquímicas	GRUPOS					Conclusão Estatística
	C	EO	EO-AO	EO-AG	EO-DPE	
SOD-total (U/mg prot.)	13,1±1,8 ^a	28,3±6,2 ^b	49,5±14,7 ^c	79,9±11,4 ^d	107,1±14,2 ^e	74,2 (P<0,0001)
CuZn-SOD (U/mg prot.)	1,25±0,3 ^a	1,7±0,1 ^b	1,9±0,3 ^{bc}	2,2±0,2 ^{cd}	2,4±0,16 ^d	23,53 (P<0,0001)
Mn-SOD (U/mg prot.)	11,8±2,1 ^a	26,6±6,2 ^b	47,5±14,5 ^c	77,6±11,5 ^d	104,5±14,4 ^e	71,94 (P<0,0001)
GSH-Px (U/mg tec.)	59,1±14,9 ^b	37,2±9,4 ^a	33,5±4,4 ^a	39,0±8,5 ^a	28,6±9,2 ^a	8,39 (P<0,01)
Catalase (U/g tec.)	84,2±14,8 ^a	68,9±25,1 ^a	139,4±54,2 ^b	68,6±28,4 ^a	42,1±15,2 ^a	8,13 (P<0,01)
GSH (μmol/g tec.)	3,0±0,3 ^a	3,5±0,3 ^a	4,6±0,6 ^b	6,3±1,1 ^c	5,4 ±1,4 ^{bc}	14,7 (P<0,001)
Proteína (g%)	13,5 ± 2,25 ^a	10,9 ± 0,6 ^a	11,9 ± 1,2 ^a	12,3 ± 1,7 ^a	12,2 ± 1,1 ^a	1,66 (P>0,05)

Resultados são expressos como média ± desvio padrão. Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos.

Tabela 5. Concentrações de hidroperóxido de lipídio (HP), malondialdeído (MDA) e proteína carbonil no tecido cardíaco dos animais controles (C), submetidos ao estresse oxidativo experimental (EO), com EO e tratados com azeite de oliva (EO-AO), com EO e ácido oléico (EO-AG) e com EO e polifenol (EO-DPE)

Determinações Bioquímicas	GRUPOS					Conclusão Estatística
	C	EO	EO-AO	EO-AG	EO-DPE	
HP (nmol/g tec.)	119,4±29,8 ^a	172,9±32,7 ^b	181,4±11,1 ^b	200,4±54,9 ^b	312,9±54,7 ^c	14,09 (P<0,0001)
MDA (nmol/g tec.)	14,5±1,2 ^{ab}	17,3±3,7 ^{ab}	15,7±4,6 ^{ab}	22,0±5,5 ^b	14,7±3,5 ^a	3,24 (P<0,05)
Proteína Carbonil (nmol/mg prot.)	5,6±1,4 ^a	4,4±0,8 ^a	4,1±1,2 ^a	5,8±1,6 ^a	5,4±0,4 ^a	2,56 (P>0,05)

Resultados são expressos como média ± desvio padrão. Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos.

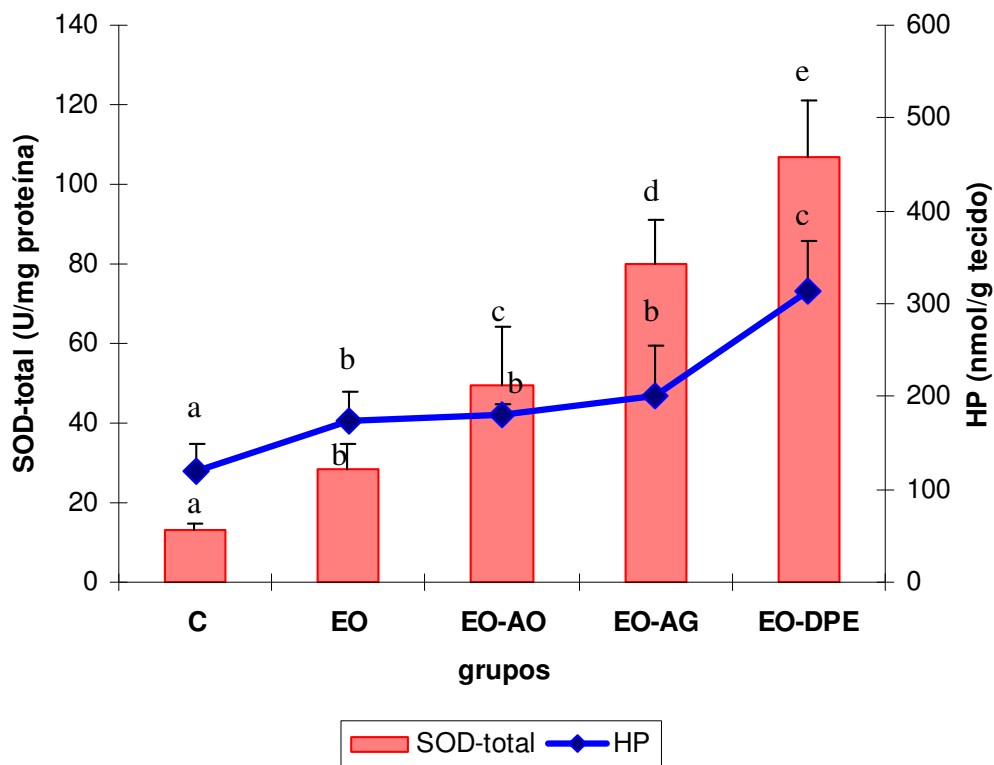


Figura 1. Atividades da SOD-total e concentrações de hidróperóxido de lipídios (HP) no miocárdio de animais controle (C), submetidos ao estresse oxidativo (EO), submetidos ao EO e tratados com azeite de oliva (EO-AO), submetidos ao EO e tratados com ácido oléico (EO-AG) e submetidos ao EO e tratados com DPE (EO-DPE) durante 30 dias. Valores em média \pm desvio padrão. Letras distintas indicam diferença significativa entre grupos ($p < 0,05$).

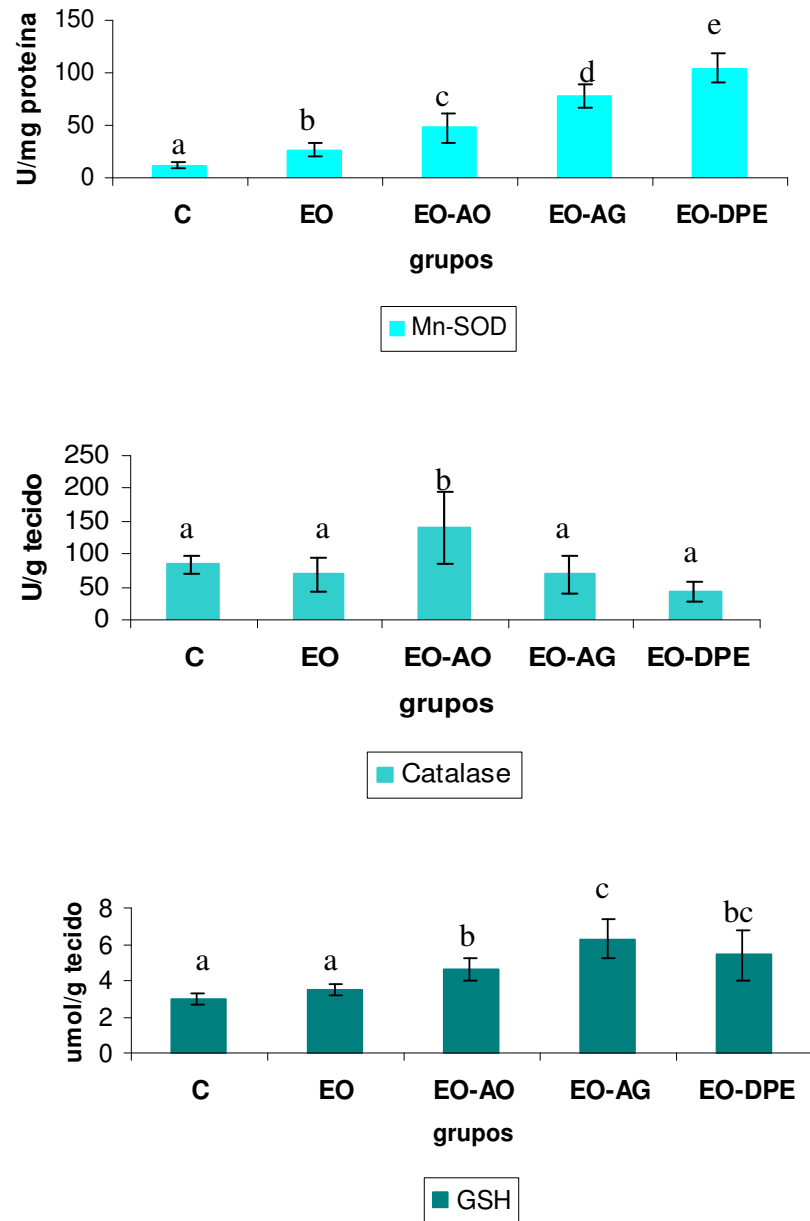


Figura 2. Atividades da Mn-SOD, catalase e concentrações de glutatona reduzida (GSH) no miocárdio de animais controle (C), submetidos ao estresse oxidativo (EO), submetidos ao EO e tratados com azeite de oliva (EO-AO), submetidos ao EO e tratados com ácido oléico (EO-AG) e submetidos ao EO e tratados com DPE (EO-DPE) durante 30 dias. Valores em média \pm desvio padrão. Letras distintas indicam diferença significativa entre grupos ($p < 0,05$).

Tabela 6. Concentrações de triacilgliceróis (TG) e atividades das enzimas lactato desidrogenase (LDH) e citrato sintase (CS) no tecido cardíaco dos animais controle (C), submetidos ao estresse oxidativo experimental (EO), com EO e tratados com azeite de oliva (EO-AO), com EO e ácido oléico (EO-AG) e com EO e polifenol (EO-DPE)

Determinações Bioquímicas	GRUPOS					Conclusão Estatística
	C	EO	EO-AO	EO-AG	EO-DPE	
TG (mg/g tecido)	4,1 ± 0,6 ^a	4,8 ± 0,7 ^a	5,4 ± 0,4 ^a	5,1 ± 0,4 ^a	7,1 ± 1,5 ^b	10,9 (P<0,0001)
LDH (U/g.tecido)	123,6 ± 6,3 ^a	144,8 ± 20,7 ^a	146,7 ± 17,3 ^a	152,1 ± 23,8 ^a	161,7 ± 6,5 ^a	1,03 (P>0,05)
CS (U/g.tecido)	29,6 ± 4,2 ^a	27,3 ± 4,5 ^a	28,6 ± 7,9 ^a	21,8 ± 5,3 ^a	46,6 ± 2,3 ^b	23,9 (P<0,0001)

Resultados são expressos como média ± desvio padrão. Letras distintas indicam diferença significativa entre os grupos.

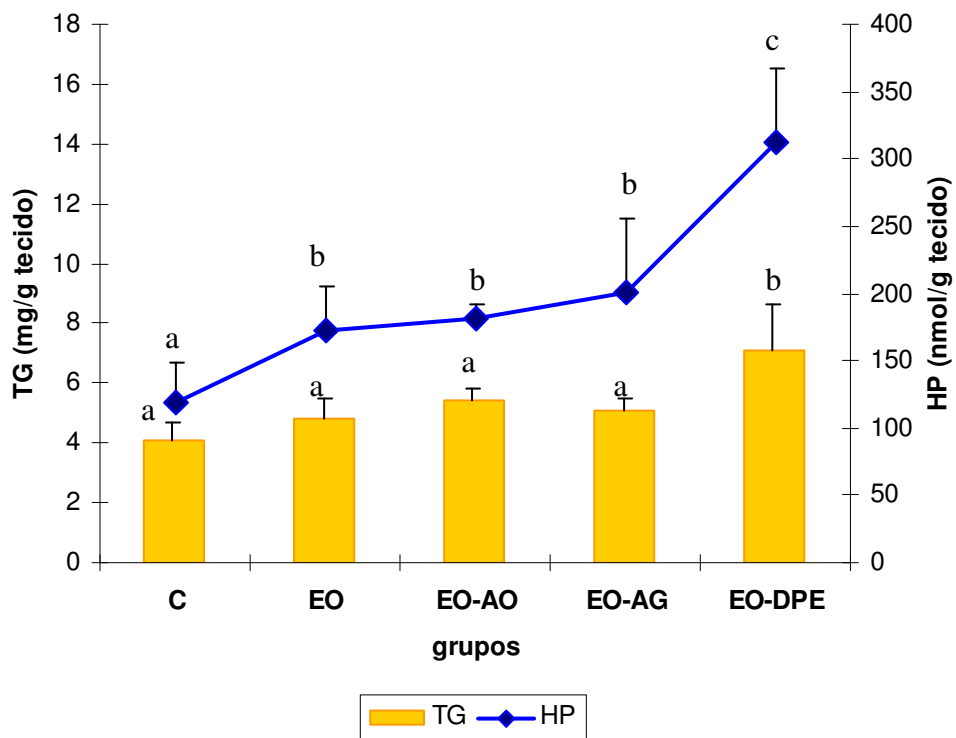


Figura 3. Concentrações de hidroperóxido de lipídio (HP) e triacilgliceróis (TG) no miocárdio de animais controle (C), submetidos ao estresse oxidativo (EO), submetidos ao EO e tratados com azeite de oliva (EO-AO), submetidos ao EO e tratados com ácido oléico (EO-AG) e submetidos ao EO e tratados com DPE (EO-DPE) durante 30 dias. Valores em média \pm desvio padrão. Letras distintas indicam diferença significativa entre grupos ($p < 0,05$).

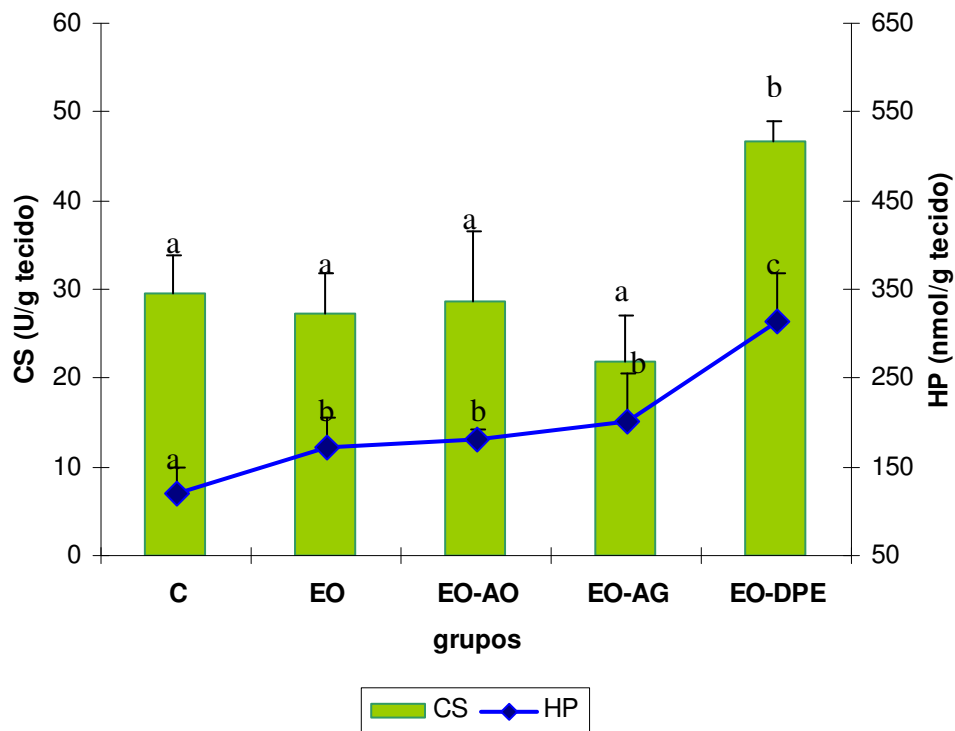


Figura 4. Concentrações de hidróperóxido de lipídio (HP) e atividades da citrato sintase (CS) no miocárdio de animais controle (C), submetidos ao estresse oxidativo (EO), submetidos ao EO e tratados com azeite de oliva (EO-AO), submetidos ao EO e tratados com ácido oléico (EO-AG) e submetidos ao EO e tratados com DPE (EO-DPE) durante 30 dias. Valores em média \pm desvio padrão. Letras distintas indicam diferença significativa entre grupos ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

O desenvolvimento de inúmeras condições patológicas, incluindo diabetes, dano renal, enfisema pulmonar, artrite reumatóide e doenças cardiovasculares tem sido relacionado à produção elevada de lipoperóxidos e alteração na atividade de enzimas antioxidantes (Ferreira & Matsubara, 1997; Abuja & Albertini, 2001; Doi et al., 2001; Ceconi et al., 2003). Nessas condições, compostos das dietas, como o azeite de oliva, bem como seus componentes menores, que possuem atividade antioxidante, poderiam exercer efeitos benéficos, aumentando as defesas celulares contra o dano oxidativo.

No presente trabalho, animais do grupo EO apresentaram diminuição do ganho de peso, peso corporal final e peso do coração em relação ao grupo controle (Tabela 2).

O estresse oxidativo miocárdico foi caracterizado pela diminuição da atividade da GSH-Px e elevação nas concentrações de hidroperóxido de lipídio (HP) e nas atividades da SOD (Tabelas 4 e 5 e Figura 1). O BHT administrado duas vezes por semana pelo período de 30 dias constituiu um agente estressor em longo prazo, permitindo a adaptação do tecido cardíaco à elevação do estado oxidante. Essa adaptação do sistema antioxidante no miocárdio pode estar relacionada à ação das espécies reativas de oxigênio como sinalizadores celulares, interferindo em fatores de transcrição que regulam os mecanismos de defesa antioxidante (Chen et al., 2003).

Tem sido demonstrado que embora o BHT possa apresentar atividade antioxidante (Babich, 1982), quando administrado em doses elevadas, pode exercer efeito pró-oxidante no organismo (Nakagawa, 1987; Sokolove et al., 1996). Desse modo, animais do grupo EO apresentaram elevação nas concentrações de HP, independente da alteração na atividade da enzima antioxidante SOD, caracterizando uma situação de elevação nos sistemas oxidantes no miocárdio desses animais. Além disso, a atividade da GSH-Px esteve diminuída, enquanto a catalase não se alterou (Tabela 4 e Figura 2) no miocárdio dos animais do grupo EO em relação ao grupo controle, sugerindo diminuição da relação entre os sistemas antioxidante/oxidante, podendo resultar no acúmulo de intermediários tóxicos no tecido cardíaco do grupo EO. Portanto, a administração de

BHT serviu aos propósitos do trabalho, induzindo estresse oxidativo no miocárdio dos animais.

Também foram observadas alterações no perfil lipídico sérico de animais do grupo EO em relação aos animais controles, através da elevação nas concentrações de TG, VLDL e na relação TG/HDL (Tabela 3), as quais constituem fatores de risco para alterações cardiovasculares (Amaganijan e Batlouni, 2000; Abuja e Albertini, 2001). Estudos recentes têm demonstrado que o tamanho da LDL está inversamente associado à concentração de triacilgliceróis (Bloomgarden, 2002). Partículas de LDL ricas em triacilgliceróis têm menor tamanho e são mais suscetíveis à oxidação (Brizzi et al., 2003). Essas observações sugerem que o EO experimental induziu maior susceptibilidade de oxidação da LDL, através do aumento da concentração de TG.

A associação do estresse oxidativo com doenças cardiovasculares tem elevado a procura de agentes antioxidantes naturais (Ng et al., 1999). Antioxidantes são substâncias capazes de prevenir os efeitos deletérios da oxidação, inibindo o início da lipoperoxidação, seqüestrando radicais livres e/ou quelando íon metálicos (Abuja & Albertini, 2001).

O consumo de azeite de oliva tem sido elevado na maioria das populações para prevenção das doenças cardiovasculares devido ao seu elevado conteúdo de antioxidantes naturais (polifenóis) e ácidos graxos monoinsaturados (ácido oléico) (Wiseman et al., 1996; Lima et al., 2000; Serra-Majem et al., 2003). Inúmeros estudos têm apresentado os efeitos benéficos do azeite de oliva sobre os lipídios séricos (Aviram & Eias, 1993; Wiseman et al., 1996; Nicolaiew et al., 1998), porém, pouco é conhecido sobre os efeitos do azeite de oliva e de seus componentes em condições de estresse oxidativo.

A suplementação com azeite de oliva e seus componentes não alterou o ganho de peso, peso final e peso do coração dos animais sob estresse oxidativo (Tabela 2).

Na Tabela 3 pode-se observar que os tratamentos com azeite de oliva e ácido oléico não alteraram o perfil lipídico sérico, enquanto o DPE agravou a elevação de TG e VLDL induzida pelo estresse oxidativo experimental nesses animais.

A análise do sistema antioxidante no miocárdio dos animais demonstrou que as suplementações com azeite de oliva e ácido oléico elevaram as atividades da SOD-total e de suas isoenzimas CuZn-SOD e Mn-SOD (Tabela 4 e Figuras 1 e 2).

A SOD corresponde a uma família de enzimas com papel antioxidante, responsável por catalisar a dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio. Suas principais isoformas, CuZn-SOD e Mn-SOD, estão localizadas no citosol e na mitocôndria, respectivamente (Ferreira & Matsubara, 1997). Desde que a cadeia respiratória mitocondrial é a principal fonte intracelular de ânions superóxido, a atividade da Mn-SOD é de grande importância na regulação dos níveis de superóxido mitocondrial (Chen et al., 2003). Doi et al (2001) sugeriram que atividades diminuídas de Mn-SOD no tecido cardíaco de animais diabéticos poderiam ser um fator-chave para o desenvolvimento de disfunções cardíacas. Desse modo, a elevação da atividade da Mn-SOD em corações de animais submetidos ao estresse oxidativo (Tabela 4 e Figura 2) constituiu efeito benéfico da ingestão de azeite de oliva e de ácido oléico.

Animais que receberam azeite de oliva e animais tratados com ácido oléico não apresentaram alterações na atividade da GSH-Px e demonstraram elevação na concentração de GSH (Tabela 4 e Figura 2).

A glutathiona (GSH) é conhecida como o principal antioxidante de baixo peso molecular no citoplasma (De La Lastra et al., 2002; Rebrin et al., 2003). Além de atuar na detoxificação de espécies reativas de oxigênio, a glutathiona reduzida é coenzima para a atividade da GSH-Px, enzima de papel essencial contra o estresse oxidativo (Therond et al., 2000).

Diminuição nas concentrações de GSH tem sido observada no envelhecimento (Rebrin et al., 2003) e na isquemia miocárdica, associada à diminuição na atividade da Mn-SOD (Ceconi et al., 2003).

Desde que o estresse oxidativo pode ser evidenciado pelo acúmulo celular de hidroperóxidos de lipídios ou por produtos intermediários como o malondialdeído (MDA), e pelo estado redox da glutathiona (GSH) (Ceconi et al., 2003), a redução da peroxidação lipídica pelo azeite de oliva tem sido atribuída não somente à redução de lipoperóxidos, como também à elevação da defesa antioxidante do sistema glutathiona (De La Cruz, 2000; De La Lastra,

2002). Massaro et al. (2002) observaram efeito benéfico do ácido oléico na prevenção da diminuição de GSH intracelular. Desse modo, apesar de não terem sido observadas alterações nas concentrações de HP, MDA e de proteína carbonil nos grupos EO-AO e EO-AG (Tabela 5), o azeite de oliva e o ácido oléico induziram efeitos benéficos, através da melhora do sistema antioxidante no miocárdio sob estresse oxidativo. Além da elevação na GSH e SOD, o azeite de oliva induziu elevação na atividade da catalase (Tabela 4), uma das enzimas responsáveis pela conversão de peróxido de hidrogênio em água (Therond et al., 2000), promovendo assim, melhor resposta antioxidante do que a ingestão de ácido oléico.

Suplementação com azeite de oliva tem sido relacionada à diminuição da lipoperoxidação em lesões gástricas (De La Lastra, 2002) e em coelhos hiperlipêmicos (De La Cruz et al., 2000). Inúmeros estudos têm atribuído esses efeitos benéficos do azeite de oliva sobre a lipoperoxidação à sua elevada concentração de polifenóis, especialmente o 3,4-dihidroxifeniletanol (DPE) (Manna et al., 1997; Baldioli et al., 1996; Visioli et al., 1998; Visioli & Galli, 1998; Tuck & Hayball, 2002). Esses fitoquímicos podem atuar através da modulação de enzimas antioxidantes (Ferrari & Torres, 2003).

Nossos resultados demonstraram que a suplementação com DPE elevou a atividade das enzimas antioxidantes SOD-total, CuZn-SOD e Mn-SOD em comparação com os grupos EO e EO-AO (Tabela 4 e Figuras 1 e 2). Apesar da elevação no sistema antioxidante, foi observada concentração elevada de HP no miocárdio de animais que receberam DPE (Tabela 5 e Figura 1), indicando que o polifenol também atuou elevando a lipoperoxidação no tecido cardíaco dos animais sob estresse oxidativo.

A propriedade antioxidante do polifenol DPE tem sido geralmente associada a sua habilidade para formar radicais estáveis a partir de compostos reativos, devido aos grupos hidroxil em sua estrutura química. Entretanto, esses processos oxidativos (ou auto-oxidação) podem ser acompanhados por produção de moléculas pró-oxidantes, como espécies reativas de oxigênio ou radicais secundários, os quais são mais reativos do que os radicais primários, que conseqüentemente podem propagar reações em cadeia,

constituindo um indesejável efeito pró-oxidante dos polifenóis (Cotelle, 2001).

Embora DPE não tenha alterado as concentrações de MDA e de proteína carbonil (Tabela 5), a elevação nas defesas antioxidantes e de hidroperóxido de lipídio é indicativo de que o polifenol DPE atuou elevando a carga oxidativa no tecido cardíaco dos animais sob estresse oxidativo.

Essas observações podem ser comprovadas através da determinação do metabolismo energético cardíaco (Tabela 6). O azeite de oliva e o ácido oléico não induziram alterações nas concentrações de TG e nas atividades das enzimas das vias metabólicas.

No grupo que recebeu DPE foi observada elevação na concentração de triacilgliceróis no tecido cardíaco (Tabela 6 e Figura 3) e nas atividades da CS (Tabela 6 e Figura 4). Através da β -oxidação na matriz mitocondrial, a cadeia de carbonos dos ácidos graxos provenientes dos triacilgliceróis é progressivamente degradada em moléculas de acetil coenzima-A, que são completamente metabolizadas no ciclo do citrato (Carvajal & Sanchez, 2003). Quando a concentração de acetil coenzima-A excede a capacidade de metabolização pelo ciclo do citrato, ou quando a velocidade desta via é limitada pela elevação no ATP, moléculas de acetil coenzima-A são transportadas para o citosol pela carnitina translocase (Sabbah & Stanley, 2002; Lewin & Coleman, 2003). No citosol, elevadas concentrações de acetil coenzima-A ativam a acetil coenzima-A carboxilase, favorecendo a síntese de malonil Co-A, que controla a entrada de ácidos graxos ativados para a matriz mitocondrial (Sabbah & Stanley, 2002). Os ácidos graxos no citosol permanecem estocados como triacilgliceróis, sendo passíveis de sofrer a ação de ERO, aumentando a susceptibilidade à oxidação (Schaffer, 2003). Estas observações poderiam explicar a elevação nas atividades da CS e o aumento nas concentrações de HP nos animais do grupo EO-DPE (Tabelas 5 e 6 e Figura 4).

O metabolismo oxidativo dos nutrientes e produção de energia na mitocôndria constitui a principal fonte de radicais livres (~~Gutteridge & Halliwell, 1990; Feuers, 1998~~). O acúmulo de triacilgliceróis no tecido cardíaco tem sido relacionado a cardiomiopatias e toxicidade (Schaffer, 2003). Dessa forma, os resultados obtidos sugerem que o DPE apresentou efeito pró-oxidante

no miocárdio de animais sob estresse oxidativo, através da elevação do metabolismo aeróbico, da concentração de triacilgliceróis e da elevação da lipoperoxidação cardíaca.

Embora muitos estudos tenham demonstrado a atividade antioxidante do DPE em sistemas biológicos, a maioria dessas pesquisas foi realizada *in vitro*, ou verificando o efeito da administração de dose única do DPE (Babich & Visioli, 2003; Tuck & Hayball, 2002; D'Angelo et al., 2001). Desde que a atividade antioxidante do DPE, bem como sua absorção no organismo é dose-dependente (Manna et al., 1997; Manna et al., 2000) e que, portanto, exposição contínua aos polifenóis do azeite de oliva pode levar a acúmulo no organismo em longo prazo (Visioli et al., 2000), estudos que evidenciem o efeito da ingestão crônica desse polifenol são de grande importância. Em nosso estudo foram administradas quantidades de DPE correspondentes às contidas no azeite de oliva rico em polifenóis. O potencial biológico dos polifenóis do azeite de oliva foi demonstrado *in vitro*. Evidências do mesmo efeito antioxidante *in vivo* necessitam ainda esclarecimentos.

As diferenças encontradas na atividade antioxidante do azeite de oliva, quando comparada à atividade de seus componentes separados também foram observadas por outros pesquisadores em pesquisas realizadas com extratos de plantas e seu princípio ativo isolado (Repetto & Llesuy, 2002).

No presente trabalho, o azeite de oliva foi o mais efetivo promovendo o melhor efeito sobre o equilíbrio oxidante/antioxidante no miocárdio dos animais sob estresse oxidativo. Diferenças no potencial antioxidante do azeite de oliva e de seus componentes isolados podem ser atribuídas à existência de compostos secundários no azeite, capazes de modular sua capacidade antioxidante. É conhecido o fato que antioxidantes naturais são encontrados na natureza em várias combinações, diferindo no tipo e quantidade de antioxidantes. Fatos como estes permitem a atuação conjunta de diferentes antioxidantes, aumentando consideravelmente a eficácia da resposta contra o estresse oxidativo (Fuhrman & Aviram, 2001).

Os resultados obtidos demonstraram que o polifenol DPE induziu elevação no sistema oxidante no miocárdio de animais submetidos ao estresse oxidativo. As suplementações dietéticas com

azeite de oliva e ácido oléico não induziram melhora na dislipidemia induzida pelo estresse oxidativo. O azeite de oliva induziu a melhor resposta antioxidante no miocárdio de animais sob estresse oxidativo experimental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- *International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted journal. N. Engl. J. Med 1007; 336: 309-315.
- Abuja PM, Albertini R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. Clin Chim Acta 2001; 306:1-17.
- Amaganijan D, Batlouni M. Impacto dos fatores de risco tradicionais na aterosclerose. Rev Soc Cardiol Est São Paulo 2000; 10:686-693.
- Aebi H. Methods of enzymatic analysis. 2ªed (New York): Bergmeyer HV. Ed Verloy Chemia Weinheim 1974; 1-4.
- Aviram M, Eias K. Dietary olive oil reduces low density lipoprotein uptake by macrophages and decreases the susceptibility of the lipoprotein to undergo lipid peroxidation. Ann Nutr Metab 1993; 37: 75-84.
- Babich H. Butylated hydroxytoluene (BHT): a Review. Environ Res 1982; 29:1-29.
- Babich H, Visioli F. In vitro citotoxicity to human cells in culture of some phenolics from olive oil. Il Farmaco 2003; 58:403-407.
- Baldioli M, Servili M, Perreti G, Montedoro GF. Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. J Am Chem Soc 1996; 73:1589-1593.
- Bloomgarden Z. Obesity, hypertension and insulin resistance. Diabetes 2002; 25:2088-2097.
- Brizzi P, Tonoio G, Carusillo F, Malaguarnera M, Maioli M, Musumeci S. Plasma lipid composition and LDL oxidation. Clin Chem Lab Med 2003; 41:56-60.
-
- Carvajal K, Sánchez RM. Heart metabolic disturbances in cardiovascular diseases. Arch Med Res 2003; 34:89-99.
- Ceconi C, Boraso A, Cargnoni A, Ferrari R. Oxidative stress in cardiovascular disease: myth or fact? Arch Biochem Biophys 2003; 420:217-221.

- Chen K, Thomas SR, Keaney Jr JF. Beyond LDL oxidation: ROS in vascular signal transduction. *Free Rad Biol Med* 2003; 35:117-32.
- Cotelle N. Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Topics Med Chem* 2001; 1: 569-590.
- D'Angelo S, Manna C, Migliardi V, Mazzoni O, Morrica P, Capasso G, Pontoni G, Galletti P, Zappia V. Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil. *Drug Metabol Dispos* 2001; 29:1492-1498.
- De La Cruz JP, Quintero L, Villalobos MA, De La Cuesta F S. Lipid peroxidation and glutathione system in hyperlipidemic rabbits: influence of olive oil administration. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1485: 36-44.
- De La Lastra AC, Barranco MD, Martin MJ, Herrerias J, Motilva V. Extra-virgin olive oil-enriched diets reduce indomethacin-induced gastric oxidative damage in rats. *Digest Dis Sci* 2002; 47:2783-2790.
- Diniz YS, Cicogna AC, Padovani CR, Silva MDP, Galhardi CM, Rodrigues HG, Novelli ELB. Dietary fibre supplementation: oxidative stress and metabolic shifting for cardiac health. *Can J Physiol Pharmacol* 2003; 81:1042-1048.
- Doi K, Sawada F, Toda G, Yamachika S, Seto S, Urata Y, Ihara Y, Sakata N, Taniguchi N, Kondo T, Yano K. Alteration of antioxidants during the progression of heart disease in streptozotocin-induced diabetic rats. *Free Rad Res* 2001; 34:251-261.
- Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82:47-95.
- Faine LA, Diniz YS, Almeida JA, Novelli ELB, Ribas BO. Toxicity of ad. lib. overfeeding: effects on cardiac tissue. *Food Chem Toxicol* 2002; 40:663-668.
- Ferrari R, Agnoletti L, Comini L, Gaia G, Bacchetti T, Cargnoni A, et al. Oxidative stress during myocardial ischaemia and heart failure. *Eur Heart J* 1998;19 Suppl B:B2-B11.
- Ferrari CKB, Torres EAFS. Biochemical pharmacology of functional foods and prevention of chronic diseases of aging. *Biomed Pharmacoth* 2003; 57:251-260.
- Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Med Ass Brasil* 1997; 43:61-68.

- Feuers RJ. The effects of dietary restriction on mitochondrial dysfunction in aging. *Ann NY Acad Sci* 1998; 854:192-201.
- Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson D S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18:499-502.
- Funabiki R, Takeshita K, Miura Y, Shibasato M, Nagasawa T. Dietary supplement of G-rutin reduces oxidative damage in the rodent model. *J Agric Food Chem* 1999; 47:1078-1082.
- Fuhrman B, Aviram M. Flavonoids protect LDL from oxidation and attenuate atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2001; 12:41-48.
- Gutteridge JMC, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biomed Sci* 1990; 15:129-135.
- Henning SI, Wambolt RB, Schonckess BO. Contribution of glycogen to aerobic myocardial glucose utilization. *Circ* 1996; 93:1549-1555.
- Jiang ZY, Woollard ACS, Wolf S. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with TBA assay and on iodometric method. *Lipids* 1991; 26:853-856.
- Lewin TM, Coleman RA. Regulation of myocardial triacylglycerol synthesis and metabolism. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1694:63-75.
- Lima FEL, Menezes TN, Tavares MP, Szarfacs SC, Fisberg RM. Ácidos graxos e doenças cardiovasculares: uma revisão. *Rev Nutr Campinas* 2000; 13:73-80.
- Lopes-Virella M, Stone P, Ellis S, Cowell JA. Cholesterol determination in high-density lipoprotein separated by three methods. *Clin Chem* 1977; 23:882-884.
- Lowry OH, Rosebrough NL, Farr AL, Randall RJ. Protein mensurement with the Folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-275.
- Manna C, Galletti P, Cucciolla V, Moltedo O, Leone A, Zappia V. The protective effect of the olive oil polyphenol (3,4-dihydroxyphenyl)-ethanol counteracts reactive oxygen metabolite-induced cytotoxicity in Caco-2 cells. *J Nutr* 1997; 127:286-292.
- Manna C, Galletti P, Maisto G, Cucciolla V, D'Angelo S, Zappia V. Transport mechanism and metabolism of olive oil hydroxytyrosol in Caco-2 cells. *FEBS Letters* 2000; 470:341-344.

- Manna C, Migliardi V, Golino P, Scognamiglio A, Galletti P, Chiariello M, Zappia V. Oleuropein prevents oxidative myocardial injury induced by ischemia and reperfusion. *J Nutr Biochem* 2004; 15:461-466.
- Massaro M, Carluccio MA, Paolicchi A, Bosetti F, Solaini G, De Caterina R. Mechanisms for reduction of endothelial activation by oleate: inhibition of nuclear factor- κ B through antioxidants effects. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 2002; 67: 175-181.
- Montedoro G, Servili M, Baldioli M, Miniati E. Simple and hidrolysable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation, and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *J Agric Food Chem* 1992; 40:1571-1576.
- Moura RA. *Técnicas de laboratório* 1982; São Paulo: Atheneu Editora, 822p.
- Nakagawa, Y. Effects of buthionine sulfoximine and cysteine on the hepatotoxicity of butylated hydroxytoluene in rats. *Toxicol Letters* 1987; 37:251-256.
- Nakamura W, Hojoda S, Hayashi K. Purification and properties of rat liver glutathione peroxidase. *Biochem Biophys Acta* 1974; 358:251-261.
- Ng TB, Liu F, Wang ZT. Antioxidative activity of natural products of plants. *Life Sci* 2000; 66:709-723.
- Nicolaiew N, Lemort N, Adorni L, Berra B, Montorfano G, Rapelli S, Cortesi N, Jacotot B. Comparison between extra-virgin olive oil and oleic acid rich sunflower oil: effects on post prandial lipemia and LDL susceptibility to oxidation. *Ann Nutr Metab* 1998; 42:251-260.
- Nishiyama Y, Ikeda , Haramaki N, Yoshida N, Imaizumi T. Oxidative stress is related to exercise intolerance in patients with heart failure. *Am Heart J* 1998; 135:115-120.
- Norman GR, Streiner DL. *Biostatistics - The bare essentials* 1994; St. Louis: Ed. Mosby Book, 260p.
- Novelli ELB, Fernandes AAH, Diniz YS, Almeida JA, Faine LA, Ribas BO. The adverse effect of a high-energy dense diet on cardiac tissue. *J Nutr Environ Med* 2002; 12:287-94.
- Polidori MC, Praticó D, Savino K, Rokach J, Stahl W, Mecocci P. Increased F2 isoprostane plasma levels in patients with congestive

- Herat failure are correlated with antioxidant status and disease severity. *J Card Failure* 2004; 10: 334-338.
- Pucheu S, Coudray C, Tresallet N, Favier A, Leiris J. Effect of dietary antioxidant trace element supply on cardiac tolerance to ischemia-reperfusion in the rat. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27:2303-2014.
- Ragione FD, Cucciolla V, Criniti, V, Indaco S, Borriello A, Zappia V. Antioxidant induce different phenotypes by a distinct modulation of signal transduction. *FEBS Letters* 2002; 532:289-294.
- Rebrim I, Kamzalov S, Sohal R. Effects of age and caloric restriction on glutathione redox state in mice. *Free Rad Biol Med* 2003; 35:626-635.
- Repetto MG, Llesuy SF. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Braz J Med Biol Res* 2002; 35:523-534.
- Resnick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzimol* 1994; 233:357-363.
- Ruiz-Guttierrez V, Molina MT, Vázquez CM. Comparative effects of feeding different fats on fatty acid composition of major individual phospholipids of rat hearts. *Ann Nutr Metab* 1990; 34:350-358.
- Sabbah HN, Stanley CW. Partial fatty acid oxidation inhibitors: a potentially new class of drugs for heart failure. *Eur J Heart Fail* 2003; 4: 3-6. Editorial.
- Satoh, K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a colorimetric method. *Clin Chim Acta* 1978; 90:37-43.
- Schaffer JE. Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr Opin Lipodol* 2003; 14:281-87.
- Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and non-protein sulphhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochem* 1968; 25:192-205.
-
- Serra-Majem L, Cruz N, Ribas L, Tur JA. Olive oil and the mediterranean diet: beyond the rhetoric. *Eur J Clin Nutr* 2003; 57:S2-S7.
- Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction and aging. *Science* 1996; 273:59-63.

- Sokolove PM, Haley LM. Butylated hidroxytoluene and inorganic phosphate plus Ca⁺ increase mitochondrial permeability via mutually exclusive mechanisms. *J Bioenerg Biomemb* 1996; 28:199-206.
- Spitz DR, Oberley LW. An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. *Anal Biochem* 1989; 179:8-18.
- Therond P, Rousselot D, Spraul A, Conti M, Legrand A. Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. *Curr Opin Clin Nutr Met Care* 2000; 3:373-384.
- Tuck KL, Haybal PJ. Major phenolic compounds in olive oils: metabolism and health effects. *J Nutr Biochem* 2002; 13:636-644.
- Vicario IM, Malkova D, Lund EK, Johnson I. Olive oil supplementation in healthy adults: effects in cell membrane fatty acid composition and platelet function. *Ann Nutr Metab* 1998; 42:160-169.
- Visioli F, Bellomo G, Galli C. Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem Biophys Res Comm* 1998; 247:60-64.
- Visioli F, Bellomo G, Montedoro G, Galli C. Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. *Atherosclerosis* 1995; 117:25-32.
- Visioli F, Galli C. The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings. *Nutr Rev* 1998; 56:142-147.
- Visioli F, Galli C, Bornet F, Mattei A, Patelli R, Galli G, Caruso D. Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. *FEBS Letters* 2000; 468:159-160.
- Weisiger RA, Fridovich I. Superoxide dismutase. Organelle specificity. *J Biol Chem* 1973; 248:3582-3592.
- Wickramasingue SN, Hasan R, Khalpey Z. Differences in the serum levels of acetadehyde and cytotoxic acetaldehyde-albumin complexes after the consumption of red and white wine: in vitro effects of flavonoids, vitamin E, and other dietary antioxidants on cytotoxic complexes. *Alcohol Clin Exp Res* 1996; 20:799-803.
- Wiseman SA, Mathot JNNJ, Fouw NJ, Tijburg LBM. Dietary non-tocopherol antioxidants present in extra virgin olive oil increase the resistance of low-density lipoproteins to oxidation in rabbits. *Atherosc* 1996; 120:15-23.
- Yue TL, Ruffolo RR, Feuerstein G. Antioxidant action of carvedilol: a potential role in treatment of heart failure. *Heart Failure* 1999; 4:39-51.

Capítulo 3

Considerações Finais

Por muitos anos, o azeite de oliva tem sido aceito pelos pesquisadores e pelas populações como promotor de diversos efeitos benéficos, sendo, portanto, recomendado tanto na prevenção como durante o tratamento de doenças cardiovasculares.

Alterações cardiovasculares, assim como a maioria das condições patológicas, são conhecidas por suas implicações no equilíbrio do sistema oxidante/antioxidante celular. No presente estudo, foi confirmada a ação benéfica do azeite de oliva sobre a lipídemia, como meio de prevenção de doenças cardiovasculares. Entretanto, em condições de alteração do sistema oxidante/antioxidante, o azeite de oliva não foi suficiente para induzir melhora no perfil lipídico.

No tecido cardíaco, o azeite de oliva apresentou ação antioxidante direta em ratos normais e elevação do sistema antioxidante endógeno em ratos submetidos ao estresse oxidativo. Estas observações indicam que o azeite de oliva poderia ser utilizado na prevenção de doenças cardiovasculares e como medida auxiliar no tratamento de patologias cardíacas.

O efeito antioxidante do azeite de oliva extra-virgem pode ser atribuído em parte à sua elevada concentração de ácidos graxos monoinsaturados. O ácido oléico induziu efeitos benéficos sobre a lipídemia e o tecido cardíaco de animais normais e sob estresse oxidativo, porém, o conjunto de efeitos mais seguro e efetivo foi alcançado através da ingestão do azeite de oliva. Esse resultado sugere que os polifenóis têm um importante papel nos efeitos do azeite de oliva.

A ciência médica tem demonstrado grande interesse sobre os polifenóis do azeite, devido ao potencial antioxidante desses componentes. Recentemente, o DPE, também conhecido por hidroxitirosol, tem sido comercializado para as populações como suplemento dietético, embora a maioria das pesquisas sobre este composto compreenda apenas efeitos agudos sobre marcadores de estresse oxidativo e colesterolemia. Neste estudo, a administração crônica do DPE induziu efeitos prejudiciais ao tecido cardíaco, evidenciados pela ação sobre o metabolismo energético. O consumo crônico de DPE agravou os efeitos prejudiciais induzidos pelo estresse oxidativo experimental no coração, demonstrando ser ainda

prematura a recomendação do consumo desse componente isolado para a população.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)