



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CHIARA CRISTINA BORTOLASCI

**“AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO CONSUMO DE CHÁ
VERDE E/OU AVEIA NO PERFIL LIPÍDICO E ESTRESSE
OXIDATIVO EM PACIENTES COM SÍNDROME
METABÓLICA”**

CHIARA CRISTINA BORTOLASCI

**“AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO CONSUMO DE CHÁ
VERDE E/OU AVEIA NO PERFIL LIPÍDICO E ESTRESSE
OXIDATIVO EM PACIENTES COM SÍNDROME
METABÓLICA”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Décio Sabbatini
Barbosa

Londrina
2012

CHIARA CRISTINA BORTOLASCI

**“AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO CONSUMO DE CHÁ VERDE E/OU
AVEIA NO PERFIL LIPÍDICO E ESTRESSE OXIDATIVO EM
PACIENTES COM SÍNDROME METABÓLICA”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa
UEL – Londrina - PR

Prof^a. Dr^a. Maria Victoria Eiras Grossmann
UEL – Londrina - PR

Prof^a. Dr^a. Rúbia Casagrande
UEL – Londrina - PR

Londrina, ____ de _____ de 2012.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua sensível presença em todos os momentos de minha vida.

Ao Profº Drº Décio Sabbatini Barbosa, pela confiança em mim e no meu trabalho. Pela oportunidade de vivenciar experiências tão ricas. Pela orientação, carinho e amizade durante todos esses anos. Um grande mestre e exemplo de ser humano, fundamental para essa conquista.

Às professoras Drª. Estefânia Gastaldello Moreira, Drª. Andréa Diniz, Drª. Clisia Mara Carreira, aos Dr. Emerson Sampaio e Dr. Ricardo Rodrigues, pelas valiosas contribuições, disponibilidade e colaboração, indispensáveis para a consecução deste trabalho.

À professora Maria Victoria Eiras Grossmann, por disponibilizar a utilização dos laboratórios de Tecnologia de Alimentos para o fracionamento da aveia.

Às amigas Karine Boll, Luciana Higachi, Denise Santiago, Alissana Camargo, Kamila Landucci e Carine Coneglian pela ajuda nos experimentos e por estarem sempre presentes nos momentos de alegrias e nas dificuldades. Pela paciência, carinho, amizade e convívio tão agradável que tornou a jornada muito mais prazerosa e divertida.

Às nutricionistas Daniele Cristine Fernandes, Gabriela Carloto Pickina, Renata Albieri e Yara Souza Mosmann, pelo auxílio no atendimento aos pacientes e por toda avaliação nutricional por elas realizadas.

Aos funcionários do Laboratório de Pós-Graduação, Laboratório de Bioquímica e Laboratório de Imunologia, Laboratório de Análise Sensorial, pelo companherismo e pelos serviços prestados, necessários para o desempenho das atividades. Pela paciência e disponibilidade no auxílio à realização de alguns testes.

Aos funcionários do Centro de Doenças do Coração, das Unidades Básicas de Saúde do Carnascialli, Vila Nova e Centro Social Urbano de Londrina e ao Centro de Referência de Especialidades Médicas de Ibiporã por nos acolherem e permitirem a realização deste projeto nas suas instalações.

Às funcionárias da Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciências de Saúde, pelo excelente serviço prestado durante o período.

Aos meus pais Pedro Bortolasci e Lúcia Rosária Gardin Bortolasci, exemplos vivos de sabedoria e perseverança. Obrigada por me ensinarem os valores fundamentais da minha vida.

Aos amigos e a minha família, pessoas especiais que mesmo sem estarem perto, estiveram muito presentes. Àqueles que estavam comigo, obrigada pela paciência, compreensão e apoio.

Ao CNPq pela bolsa concedida. À Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

*"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver ..."*
Martin Luther King

BORTOLASCI, Chiara Cristina. **Avaliação dos efeitos do consumo de chá verde e/ou aveia no perfil lipídico e estresse oxidativo em pacientes com síndrome metabólica.** 2012. 48 f. Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, 2012.

RESUMO

A síndrome metabólica é uma condição multifatorial que leva à aterosclerose acelerada, aumento do risco de diabetes e que tem alcançado proporções epidêmicas na última década. O objetivo desse trabalho foi avaliar o perfil lipídico e o estresse oxidativo de pacientes com síndrome metabólica após o consumo de aveia e chá verde durante 3 meses. Os indivíduos com síndrome metabólica foram selecionados de acordo com os critérios do NCEP-ATPIII. Um grupo (26 indivíduos) consumiu 30 g de farelo de aveia por dia e o outro (29 indivíduos) fez a associação de 30 g de farelo de aveia e 3 g de chá verde por dia sob a forma de infusão em 500 mL de água. No grupo que consumiu apenas a aveia, houve uma redução significativa nos níveis de triacilgliceróis, hidroperóxidos lipídicos, óxido nítrico; um aumento no potencial antioxidante total plasmático, na relação potencial antioxidante/hidroperóxidos e na relação potencial antioxidante/produtos de oxidação proteica. No grupo que fez a associação entre aveia e chá verde houve redução no colesterol total, lipoproteína de densidade baixa, insulina, hidroperóxidos lipídicos e óxido nítrico; um aumento no potencial antioxidante total plasmático e da relação potencial antioxidante/hidroperóxidos. O consumo de aveia isolada e sua associação com chá verde são capazes de melhorar o perfil lipídico e o estresse oxidativo em pacientes com síndrome metabólica.

Palavras-chave: Aveia. Chá verde. Estresse oxidativo. Perfil lipídico. Síndrome metabólica.

BORTOLASCI, Chiara Cristina. **Evaluation of the effects of green tea and / or oats consumption on lipid profile and oxidative stress in patients with Metabolic Syndrome.** 2012. 48 p. Dissertation (Master's Degree Dissertation) – State University of Londrina.

ABSTRACT

Metabolic syndrome is a multifactorial condition that leads to accelerated atherosclerosis and increased risk of diabetes, which has reached epidemic proportions in the last decade. The aim of this study was to evaluate the lipid profile and oxidative stress in patients with metabolic syndrome after consumption of green tea and oat bran. Individuals with metabolic syndrome were selected according to NCEP-ATPIII. One group (26 subjects) consumed 30 g of oat bran per day and the other (29 subjects) have the combination of 30 g of oat bran and 3 g of green tea per day in the form of infusion in 500 mL of water for both 3 months. In the group that consumed only oat bran, there was a significant reduction in levels of triglycerides, lipid hydroperoxides, nitric oxide; an increase in plasma total antioxidant potential, antioxidant potential/hydroperoxides index and antioxidant potential/products of protein oxidation index. In the group that used the combination of oat bran and green tea, there have been a reduction in total cholesterol, low density lipoprotein, insulin, lipid hydroperoxides and nitric oxide; an increase in plasma total antioxidant potential and antioxidant potential of the relationship / hydroperoxide. The consumption of oat bran by itself and in a association with green tea ameliorate the lipid profile and oxidative stress in patients with metabolic syndrome.

Key words: Green tea, Lipid profile, Metabolic syndrome, Oat, Oxidative stress.

LISTA DE ABREVIATURAS

AOPP	Produtos de oxidação proteica avançada
EC	Epicatequina
ECG	Epicatequina galato
EGC	Epigallocatequina
EGCG	Epigallocatequina galato
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
FOX	Hidroperóxidos lipídicos por quimiluminescência
FDA	Food and Drug Administration
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HDL-C	Lipoproteína de densidade alta
LDL-C	Lipoproteína de densidade baixa
LOOH	Hidroperóxidos lipídicos por quimiluminescência
MetS	Síndrome metabólica
NCEP-ATPIII	National Cholesterol Education Program - Adult Treatment Panel III
NOx	Metabólitos do óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato salino
QL	Quimiluminescência
TEP	1,1,3,3-Tetraetoxipropano
TRAP	Capacidade antioxidante total plasmática

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da β -glucana	14
Figura 2 – Principais polifenóis.....	16
Figura 3 – Reações químicas envolvidas na análise de NOx.....	23

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVO	18
2.1 GERAL	18
2.2 ESPECÍFICOS	18
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS	19
3.1 DELINEAMENTO.....	19
3.2 POPULAÇÃO	19
3.3 AMOSTRAGEM.....	20
3.4 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	21
3.5 DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA C REATIVA E DA INSULINA	21
3.6 DETERMINAÇÃO DE HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS POR ESPECTROFOTOMETRIA.....	21
3.7 DETERMINAÇÃO DE HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS POR QUIMILUMINESCÊNCIA	22
3.8 DETERMINAÇÃO DE METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO	22
3.9 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE TOTAL PLASMÁTICO.....	24
3.10 DETERMINAÇÃO DOS PRODUTOS DE OXIDAÇÃO PROTEICA AVANÇADA	24
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
REFERÊNCIAS	26
CONSIDERAÇÕES FINAIS	29
ANEXOS	30
ANEXO I - Termo de consentimento livre e esclarecido	31
ANEXO II - Termo de Aprovação de Pesquisa – Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos	32
ANEXO III - Determinação de LOOH - Espectrofotometria.....	36
ANEXO IV - Determinação de LOOH - Quimiluminescência.....	38
ANEXO V - Determinação de NOx.....	40
ANEXO VI - Determinação do TRAP	44
ANEXO VII - Determinação do AOPP.....	47

1 INTRODUÇÃO

A síndrome metabólica (SM) é uma condição multifatorial que leva à aterosclerose acelerada, aumento do risco de diabetes e que tem alcançado proporções epidêmicas na última década. A SM é caracterizada pela combinação de três ou mais fatores: obesidade abdominal, hipertensão, hiperglicemia e hiperlipemia (Cardona et al., 2008; Grattagliano et al., 2008). Além disso, outras comorbidades têm sido relatadas, entre elas: esteatose hepática, liberação de substâncias pró-inflamatórias pelos adipócitos, aumento da atividade dos fatores de coagulação, disfunção endotelial, inflamação e estresse oxidativo (Roberts e Sindhu, 2009).

Atualmente dispomos de três definições da síndrome metabólica. Uma foi publicada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Associação Americana de Diabetes, em 1998. De acordo com essa definição, são considerados portadores de síndrome metabólica indivíduos com intolerância à glicose, resistência à insulina ou diabetes e mais duas das seguintes alterações: uso de anti-hipertensivos e/ou pressão arterial elevada ($> 140/90$ mmHg), obesidade (índice de massa corpórea > 30 kg/m²) abdominal (relação cintura-quadril $> 0,90$ cm no homem e $> 0,80$ cm na mulher), níveis elevados de triacilgliceróis (> 150 mg/dL), lipoproteína de densidade alta (HDL-C) baixo (< 35 mg/dL no homem e < 39 mg/dL na mulher) e microalbuminúria (excreção urinária de albumina > 20 µg/min). A outra definição é do *National Cholesterol Evaluation Program for Adult Treatment Panel III* (NCEP-ATP III), publicada em 2001. Essa definição leva em conta critérios parecidos com os da OMS, como obesidade central (circunferência abdominal > 88 cm para as mulheres e > 102 cm para os homens), pressão arterial alta ($> 130/85$ mmHg), glicemia de jejum > 110 mg/dL, triacilgliceróis > 150 mg/dL, HDL-C baixo (< 40 mg/dL para os homens e < 50 mg/dL para as mulheres). Para ser considerado portador da síndrome, de acordo com o ATP III, o indivíduo deve apresentar três ou mais das alterações acima citadas. Uma terceira definição da síndrome metabólica foi descrita pela *American Association of Clinical Endocrinologists*. Essa definição leva em conta alguns aspectos da definição do NCEP-ATP III e outros da OMS.

A prevalência da síndrome metabólica tem sido descrita em diferentes grupos étnicos e populações de diferentes países. Existem, porém, poucos estudos com grandes amostras populacionais com diferentes grupos étnicos que possam representar melhor a população de cada país (Lopes, 2004). A

prevalência de SM aumenta com a obesidade, quando avaliado pelo índice de massa corporal ou pela circunferência da cintura (Park et al., 2003; Janssen, Katzmarzyk, Ross, 2004).

Evidências sugerem uma estreita ligação entre a síndrome metabólica, um estado crônico de baixo nível inflamatório e estresse oxidativo, sendo esse último um mecanismo importante na hipertensão, diabetes e obesidade associada à síndrome metabólica e suas complicações. A produção excessiva de radicais livres e danos oxidativos parece explicar, pelo menos em parte, a perpetuação da resistência à insulina, alterações na produção de energia, a disfunção endotelial e o aparecimento de complicações vasculares nesta síndrome (Assumpção et al., 2008). Evidências sugerem que espécies reativas de oxigênio (EROs) podem estar envolvidas na patogênese dessa síndrome e estão associadas com eventos cardiovasculares e alta taxa de mortalidade (Cardona et al., 2008)

Um radical livre é qualquer espécie química capaz de existir independentemente e que contenha um ou mais elétrons desemparelhados em sua camada de valência. As EROs incluem: ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (HO^{\cdot}), radical alquila (L^{\cdot}), alcóxila (LO^{\cdot}) e peróxila (LOO^{\cdot}). Nas espécies reativas do nitrogênio (ERN) estão incluídos o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$), o óxido nítrico ($^{\cdot}NO$) e o radical dióxido de nitrogênio ($^{\cdot}NO_2$). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio singlete (1O_2), e o ozônio (O_3) não são radicais livres, mas podem induzir reações radicalares no organismo, sendo por isso também considerados como espécies reativas (Lima e Abdalla, 2001).

Em termos gerais, o estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio entre a produção excessiva de radicais livres e a depleção de antioxidantes (Mathur, Devaraj e Jialal, 2002). Alguns antioxidantes são enzimáticos (intracelulares) e compreendem a superóxido dismutase, glutatona peroxidase e catalase. Outros antioxidantes, obtidos por meio de dieta, são as vitaminas A, C, E, carotenoides e polifenóis. Além disso, várias moléculas são sintetizadas dentro do organismo e possuem atividade antioxidante (glutatona e ácido úrico) (Duthie e Crozier, 2000; Ramakrishna e Jaikhan, 2007). Se o sistema antioxidante não inativar as EROs, elas podem reagir com macromoléculas e iniciar o processo de lipoperoxidação, causar dano ao DNA ou induzir modificações em proteínas e ácidos nucleicos (Roberts e Sindhu, 2009).

De acordo com o NCEP-ATPIII (2001), para os pacientes com SM, o principal objetivo a ser atingido é a redução da lipoproteína de densidade baixa (LDL-C).

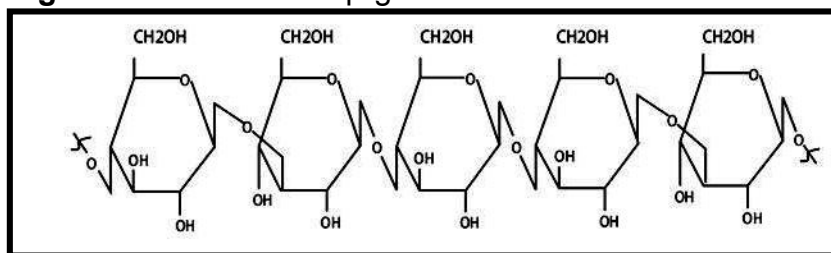
A composição da dieta humana exerce papel fundamental no manejo das concentrações de lipídeos no sangue (Kerckhoffs, Hornstra e Mensink, 2003). Há um grande interesse pelos chamados alimentos funcionais (definidos pela capacidade de exercer efeito potencialmente benéfico à saúde quando consumidos em níveis adequados, regularmente como parte de uma dieta variada) devido aos possíveis efeitos hipocolesteremiante, hipoglicemiante e hipotensor de alguns componentes destes alimentos (proteína de soja, flavonoides, isoflavona, β -glucana, etc) (Katz et al., 2004; Hasler e Brown, 2009).

As fibras podem ser classificadas em dois grupos de acordo com a solubilidade. Fibras solúveis em água possuem a capacidade de diminuir o colesterol total por um efeito específico na LDL-C e também reduzir os níveis de glicose. Geralmente as concentrações de HDL-C e triacilgliceróis não sofrem alterações. Vários mecanismos têm sido propostos para explicar esta ação que pode depender do tipo de fibra utilizado: (i) aumento da ligação de ácidos biliares no lúmen intestinal, diminuindo sua circulação enterohepática, causando um aumento na conversão de colesterol em ácidos biliares; (ii) aumento da viscosidade do bolo alimentar no intestino delgado, já que as fibras solúveis levam à formação de uma espessa camada de água junto a mucosa. Essa camada atua como uma barreira física à absorção de nutrientes e ácidos biliares; (iii) redução na absorção de glicose, gerando menor resposta glicêmica e menor concentração de insulina, levando à redução da síntese hepática de colesterol; (iv) bactérias colônicas, após fermentação das fibras solúveis, produzem ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato e butirato) que são absorvidos na veia portal e inibem a síntese hepática do colesterol (Kerckhoffs et al., 2002; Behall et al., 2006).

Uma grande fonte de fibras solúveis é a aveia. *Avena sativa L.* é a espécie mais importante entre as aveias cultivadas. Possui uma cultura anual e é utilizada tanto para a nutrição humana e animal. Antes de ser usado como um alimento foi utilizado para fins medicinais. Com o desenvolvimento no campo da nutrição, a aveia foi reconhecida como um alimento saudável em meados de 1980, uma substância que ajudou a diminuir riscos de doenças cardíacas e, portanto, se tornou mais popular para a nutrição humana. A aveia contém grandes quantidades

de nutrientes valiosos, tais como fibras solúveis, proteínas, ácidos graxos insaturados, vitaminas, minerais e fitoquímicos. A principal fibra solúvel presente na aveia é a β -glucana, distribuída através do endosperma e constituindo cerca de 75% da parede celular do mesmo. São polissacarídeos lineares, compostos por unidades de glicose (β -D-glicopiranosil) unidos por ligações glicosídicas β -1,4 e β -1,3 (Figura 1). O teor de β -glucana presente na aveia pode variar entre 2,3 a 8,5 g/100g (Butt et al., 2008).

Figura 1 - Estrutura da β -glucana



Fonte: Butt et al. (2008)

Farelos de aveia comercial de boa qualidade normalmente contém de 6-10% de β -glucana e os de cevada de 3-11%. Variações nas concentrações são encontradas não somente devido à diversidade do cultivo, mas também aos diferentes métodos de processamento do farelo da aveia que levam a diferentes rendimentos. A β -glucana é muito susceptível a despolimerização durante seu processamento. Isso pode causar redução da viscosidade e da atividade (Wursch e Pi-Sunyer, 1997).

Em 1997, o FDA (*Food and Drug Administration*) concluiu que devem ser consumidos pelo menos 3 g/dia de β -glucana para uma redução relevante nos níveis de colesterol total (Kerckhoffs et al., 2002).

Reduções nos níveis de glicose pós-prandial e de insulina são dependentes do peso molecular da β -glucana e da dose utilizada. O primeiro depende do tratamento tecnológico que deve solubilizá-la sem danificar sua estrutura. Na aveia, além das fibras solúveis, também fazem parte da sua estrutura os compostos fenólicos que são considerados antioxidantes devido ao seu papel na remoção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Alrahmany e Tsopmo, 2012).

Além da aveia, outro alimento que pode contribuir para a remoção de EROs no organismo são as bebidas ricas em polifenóis, entre elas, o chá. O chá,

originário da China, é uma das bebidas mais consumidas no mundo. É preparado com folhas de *Camellia sinensis* (família *Theaceae*) e sua composição varia de acordo com a estação, idade da folha, clima e modo de cultivo. Dependendo do processo de produção, os chás são classificados em três tipos: chá verde (produzido por secagem e estabilização das folhas frescas, inativando a polifenoloxidase e impedindo a oxidação das catequinas), oolong (as folhas frescas sofrem fermentação parcial antes da secagem) e o chá preto (as folhas passam por uma etapa de fermentação pós-colheita, de modo que as catequinas sofrem oxidação enzimática pelo oxigênio atmosférico com participação da enzima polifenoloxidase como catalisadora, antes da secagem e estabilização). A oxidação é responsável pelo desenvolvimento da cor e do sabor adstringente da bebida (Cabrera, Artacho e Giménez, 2006; Coimbra et al., 2006; Matsubara e Rodriguez-Amaya, 2006; Wang et al., 2010). O interesse crescente pela bebida deve-se principalmente a estudos que a mostram como fonte de flavonoides e que demonstram efeito cardioprotetor, antioxidante, antiobesidade e demonstram a relação inversa entre seu consumo e o risco de doenças degenerativas como câncer e doenças do coração (Matsubara e Rodriguez-Amaya, 2006, Basu et al., 2010).

O chá verde é composto por proteínas (15–20% do peso seco), cujas enzimas constituem uma fração importante; aminoácidos (1– 4% do peso seco) como teanina, ácido glutâmico, triptofano, glicina, serina, ácido aspártico, tirosina, valina, leucina, treonina, arginina, lisina; carboidratos (5–7% do peso seco) como celulose, pectina, glicose, frutose; lipídeos como ácido linoleico e linolênico; esteróis; vitaminas (B, C, E); cafeína e teofilina; pigmentos como clorofila e carotenoides; compostos voláteis como aldeídos, álcoois, ésteres, lactonas, entre outros; minerais e oligoelementos (5% do peso seco) como cálcio, magnésio, cromo, manganês, ferro, cobre, zinco, selênio, sódio, potássio, cobre, níquel (Cabrera, Artacho e Giménez, 2006).

Os chás, dentre todas as bebidas, apresentam a maior quantidade de polifenóis (Barreiros et al., 2006).

Catequinas são um grupo de polifenóis presentes nas folhas de *Camellia sinensis*. São compostos incolores e hidrossolúveis que compreendem cerca de 30% do peso seco total. Os principais polifenóis no chá verde são: epicatequina (EC), epigalocatequina (EGC), epicatequina galato (ECG) e epigalocatequina galato (EGCG) (Figura 2). O chá verde também contém ácido

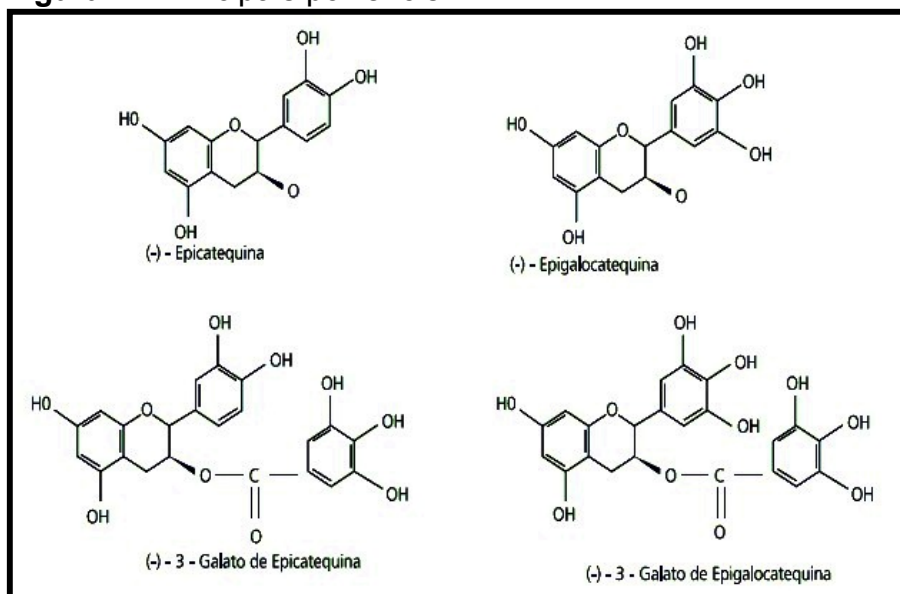
gálico, ácido clorogênico, ácido cafeico, quercetina, miricetina e kaempferol (Ioannides e Yoxall, 2003).

As catequinas possuem papel importante na remoção de radicais livres como hidroxil, peroxil, ânion superóxido e óxido nítrico. Vários estudos relataram a efetividade das catequinas em suprimir a lipoperoxidação. Elas agem também como quelantes de íons metálicos, prevenindo assim a formação de espécies radicalares catalisadas por metais (Duthie e Crozier, 2000; Yokozawa et al., 2000; Anderson e Polansky, 2002). Essa atividade antioxidante observada tanto *in vitro* quanto *in vivo* está diretamente relacionada à redução do risco de várias doenças, incluindo problemas renais, diabetes *mellitus*, cardiopatias, aterosclerose e inflamação causadas por peroxidação lipídica e produção excessiva de radicais livres (Halliwell e Gutteridge, 1990).

Estudos progressos indicaram que o chá e principalmente a EGCG possuem propriedades antimutagênicas e antiinflamatórias por interceptar agentes carcinogênicos e por reduzir espécies oxidantes antes que essas danifiquem o DNA (Dufresne e Farnworth, 2000).

A EGCG é a catequina presente em maior quantidade tanto no chá verde quanto no chá preto, representando entre 50-60% do total de catequinas. Além disso, possui a maior capacidade antioxidante, quando comparada as outras catequinas (Yokozawa et al., 2000; Coimbra et al., 2006).

Figura 2 - Principais polifenóis



Fonte: Lamarão e Fialho (2009)

Os determinantes estruturais mais importante para se obter o efeito antioxidante parecem ser a configuração e as hidroxilas das posições 3' e 4' do anel B. Acredita-se que a adição de uma hidroxila na posição 5' leva a um aumento na atividade antioxidante. A capacidade de sequestro dos radicais livres é atribuída principalmente a alta reatividade das hidroxilas que participam da seguinte reação: $F-OH + R^{\bullet} \rightarrow FO^{\bullet} + RH$. As hidroxilas doam um hidrogênio para os radicais hidroxil, peroxil e peroxinitrito, estabilizando-os e gerando um radical flavonoide relativamente estável (Duthie e Crozier, 2000; Yokozawa et al., 2000; Heim et al., 2002).

Tendo em vista a prevalência, as tendências futuras, o impacto clínico e o significado econômico da síndrome metabólica, essa desordem constitui grande problema de saúde atualmente e em longo prazo e há um enorme apelo médico e socioeconômico para identificar mecanismos, marcadores e terapias alternativas para a síndrome metabólica a fim de auxiliar no combate à progressão desta doença. Em função dos diferentes mecanismos de ação dos componentes da aveia e do chá verde em nível de dislipidemias e estresse oxidativo e por desconhecermos outros trabalhos que apresentem tal associação como terapia alternativa para essa doença, justificamos esse trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar o potencial antioxidante e hipolipemiante da aveia quando utilizada isolada ou em associação com chá verde em pacientes com síndrome metabólica.

2.2 ESPECÍFICOS

1. Caracterizar o perfil lipídico e os níveis plasmáticos de glicose, ácido úrico, proteína C reativa e insulina de indivíduos com síndrome metabólica antes e após a intervenção com aveia e aveia/chá verde;
2. Avaliar o estresse oxidativo plasmático nos pacientes por meio da quantificação do potencial antioxidante total plasmático (TRAP), dos níveis de metabólicos do óxido nítrico (NOx), hidroperóxidos lipídicos por quimiluminescência (LOOH) e espectrofotometria (FOX) e produtos oxidação proteica avançada (AOPP) antes e após a intervenção.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO

Ensaio clínico aleatorizado cego.

3.2 POPULAÇÃO

Todos os pacientes foram esclarecidos sobre os procedimentos do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo I). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, sob Parecer PF N.º 212/09 - Folha de Rosto N.º 288326 (Anexo II).

Os grupos de pacientes foram compostos por indivíduos entre 18 a 75 anos. Os participantes foram recrutados por meio de uma busca de indivíduos com síndrome metabólica, seguindo os critérios do NCEP-ATPIII (2001):

- * Obesidade abdominal – homens >102 cm
– mulheres >88 cm
- * Triacilgliceróis \geq 150 mg/dL
- * HDL-C – homens <40 mg/dL
– mulheres <50 mg/dL
- * Pressão arterial \geq 130/85 mmHg
- * Glicose \geq 110 mg/dL

Essa busca ocorreu nas unidades básicas de saúde de Londrina e Ibiporã, em algumas clínicas particulares de Londrina e por meio da divulgação do projeto em reportagens de jornais locais.

Pacientes em uso de suplementos com propriedades antioxidantes, medicamentos hipolipemiantes, hipoglicemiantes, fumantes, com câncer, doenças infectocontagiosas ou distúrbios hormonais que alterem o metabolismo lipídico foram excluídos do estudo.

3.3 AMOSTRAGEM

O estudo contou com um total de 96 pacientes com síndrome metabólica, dentre os quais, 25 pacientes não se encaixaram nos critérios necessários e 16 desistiram durante a intervenção. Portanto, 26 indivíduos fizeram parte do grupo aveia e 29 do grupo associação. Um grupo consumiu 30 g de farelo de aveia (~3g β -glucana) por dia e o outro fez a associação de 30 g de farelo de aveia e 3 g de chá verde (~145mg de EGCG) por dia sob a forma de infusão em 500 mL de água, ambos durante 3 meses.

Os pacientes foram acompanhados durante os 3 meses do estudo, com intervenções a cada 30 dias para medida da pressão arterial, do peso corpóreo e entrega da aveia e da aveia/chá para o consumo durante o próximo mês. A avaliação do estado nutricional foi realizada para garantir que não houve mudança nos hábitos alimentares durante a participação no estudo.

As coletas de sangue e a avaliação do estado nutricional ocorreram em dois momentos. O primeiro se deu antes do início do consumo dos alimentos funcionais e o segundo após 3 meses da utilização dos mesmos.

Para a dosagem da glicose foram coletados 5 mL de sangue em tubos com vácuo (vacutainer®) contendo EDTA como anticoagulante e fluoreto de sódio como inibidor da glicólise. Também foram coletados 20 mL de sangue em tubos com vácuo (vacutainer®) sem anticoagulante para alguns parâmetros bioquímicos quantificados de rotina além da PCR, dosagem de LOOH, TRAP, AOPP, NOx. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm (EVLAB®, Londrina, PR, Brasil). Após a realização dos exames bioquímicos, o soro foi aliquoteado em criotubos e armazenado em freezer -70°C (Kendro®, Asheville, NC, EUA) para a realização dos testes que avaliam o estresse oxidativo.

A avaliação nutricional, bem como as intervenções no decorrer do estudo ocorreram na Clínica Centro de Doenças do Coração e em algumas Unidades Básicas de Londrina e Ibiporã. Os exames e demais testes foram realizados no Hospital Universitário de Londrina.

3.4 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

O doseamento de colesterol total, HDL-C, triacilgliceróis, glicose e ácido úrico foram realizados utilizando o sistema bioquímico automatizado Dimension[®] RxL (Deerfield, IL, EUA). O LDL-C foi obtido por meio da equação de Friedewald.

3.5 DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA C REATIVA E DA INSULINA

A Proteína C Reativa foi avaliada por imunonefelometria (Siemens System BNTMII[®], Deerfield, IL, EUA). A insulina foi quantificada por meio de uma metodologia de quimiluminescência por micropartículas (Architect i2000SR, Abbott, IL, USA).

3.6 DETERMINAÇÃO DE HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS POR ESPECTROFOTOMETRIA

Para a quantificação do FOX foi utilizada uma adaptação da técnica descrita por Jiang et al. (1991) (Anexo III). O método é baseado na oxidação de íons ferrosos para íons férricos sob condições ácidas pelos peróxidos, que reagem com o corante indicador (xylenol orange) e produzem um complexo colorido. O Reagente FOX foi preparado dissolvendo 10 mL ácido sulfúrico (H₂SO₄) 250 mM; 88 mg de BHT; 7,6 mg de xylenol orange e 9,8 mg de sulfato ferroso amoniacal em 90 mL de metanol. Partindo de um Padrão 1,1,3,3-Tetraetóxiopropano (TEP) 4 mM realizou-se uma diluição seriada para obter as concentrações de 2,0; 1,0; 0,5 e 0,25 mM.

A curva de calibração foi preparada misturando-se 100 µL de cada um dos padrões citados com 900 µL do Reagente FOX e para as amostras 100 µL de plasma foram misturadas com 900 µL do Reagente FOX. Ambos foram incubados à temperatura ambiente durante 30 minutos. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos EVLAB[®] (Londrina, PR, Brasil) e em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro Helios α Thermo Spectronic[®] (Waltham, MA, EUA) em comprimento de onda de 560 nm.

3.7 DETERMINAÇÃO DE HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS POR QUIMILUMINESCÊNCIA

A avaliação da produção de LOOH por quimiluminescência (QL) foi realizada utilizando uma adaptação da técnica descrita por Flecha et al. (1990) (Anexo IV).

Os frascos de cintilação foram armazenados ao abrigo da luz até o momento do uso.

Em cada frasco foi adicionado 250 μ L de soro, 1730 μ L de tampão cloreto de potássio e 20 μ L de Terc-butil obtendo concentração final de 3 mM. Paralelamente, em outro frasco (branco) foi adicionado 250 μ L de soro, 1730 μ L de tampão cloreto de potássio, sendo imediatamente introduzidos no aparelho de quimiluminescência (contador β Beckman[®] LS 6000 (Fullerton, CA, EUA), em faixa de contagem não coincidente com a resposta entre 300 a 620 nm. Todo experimento foi realizado ao abrigo da luz para evitar a fosforescência dos frascos, a 30°C, durante 120 minutos. Os resultados foram expressos em cintilações por minuto.

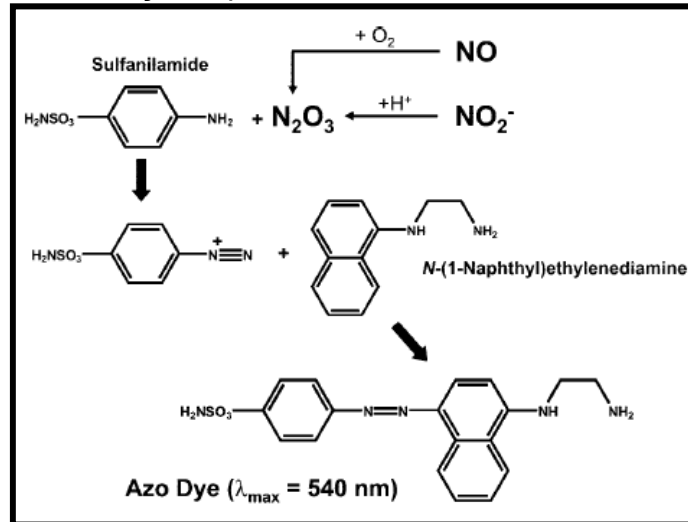
3.8 DETERMINAÇÃO DE METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO

Os níveis de óxido nítrico foram avaliados indiretamente por meio da determinação da concentração de nitritos plasmáticos, utilizando uma adaptação da técnica descrita por Navarro-Gonzalez et al. (1998) (Anexo V). O método baseia-se na redução de nitrato a nitrito mediada por reações de oxirredução ocorridas entre o nitrato presente na amostra e o sistema cádmio-cobre dos reagentes, com posterior diazotação e detecção colorimétrica do azocomposto formado pela complexação com o reagente de Griess no comprimento de onda de 550 nm (Figura 3).

A primeira etapa, realizada em microtubos, consistiu na desproteinização de 60 μ L de plasma adicionando 60 μ L de sulfato de zinco 75 mmol/L. Os tubos foram agitados durante 30 segundos em um agitador de tubos tipo vórtex. Em seguida foram centrifugados a 10000 rpm por 2 minutos à temperatura ambiente em uma centrifuga refrigerada Hettich Rotina 46R[®] (Tuttlingen, Alemanha) e posteriormente adicionados 70 μ L de hidróxido de sódio 55 mmol/L. Os tubos foram novamente agitados por 30 segundos e centrifugados a 10000 por 5 minutos.

Logo após, 150 µL do sobrenadante foram recuperados em tubos de ensaio e diluídos com 50 µL de tampão glicina 45 g/L, pH 9,7.

Figura 3 – Reações químicas envolvidas na análise de NOx.



Fonte: Tarpey, Wink, Grisham (2003).

Para uma avaliação mais precisa, é necessário reduzir os íons nitrato presentes em íons nitrito. Esta transformação foi realizada por meio do tratamento da amostra com grânulos de cádmio. Os grânulos de cádmio, depois de lavados 3 vezes com água deionizada, foram colocados em contato com uma solução de sulfato de cobre 5mmol/L em tampão glicina (15 g/L, pH 9,7) por 5 min com agitação manual. Os grânulos ativados devem ser utilizados dentro de 10 minutos, de modo que grânulos de cádmio foram adicionados às amostras desproteinizadas nos tubos de ensaio. Estes então foram deixados em agitação contínua por 10 minutos em agitadores do tipo Kline.

Em seguida, 100 µL da solução foram transferidos para microplaca para a determinação dos nitritos e os grânulos foram lavados e armazenados em uma solução de H₂SO₄, pois eles podem ser regenerados para repetir essas etapas. Para a determinação de nitritos utiliza-se o Reagente 1, preparado dissolvendo-se 2 g de Sulfanilamida em 100 mL de Ac. Fosfórico 5%, e o Reagente 2, preparado dissolvendo-se 200 mg de dicloreto de N-(1-naftil)-etilenodiamina em 100 mL de água destilada. Nos poços contendo as amostras foram adicionado 50 µL do Reagente 1 e 50 µL do Reagente 2 e foram incubados por 10 minutos a temperatura ambiente. O Padrão Estoque 100 mM foi preparado dissolvendo 69 mg de nitrito de sódio em 10 mL de água deionizada. A partir do Padrão Estoque realizou-se uma

diluição seriada para obter as concentrações de 125; 62,5; 31,25; 15,625 e 7,8125 $\mu\text{mol/L}$. A curva de calibração recebeu o mesmo tratamento que as amostras. A quantificação de Óxido Nítrico foi feita em uma leitora de microplaca Asys Expert Plus Biochrom® (Holliston, MA, EUA) em comprimento de onda de 540nm.

3.9 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE TOTAL PLASMÁTICO

O TRAP foi avaliada por QL em uma adaptação do método da técnica descrita por Repetto et al. (1996) (Anexo VI). Esta metodologia detecta antioxidantes hidro e/ou lipossolúveis presentes no plasma.

Ao meio de reação (1,8 mL de tampão glicina 0,1 M, pH 8,6) foram acrescentados 100 μL de luminol em solução aquosa 200 μM , 5 μL de plasma diluído 50% em tampão glicina e 100 μL de solução aquosa de 2,2' azo-bis (2-amidinopropano) 200 mM. O 2,2' azo-bis gera radicais peroxil rapidamente, via interação com radicais centrados em carbono e oxigênio molecular (Yokozawa, 2000). Estes radicais livres reagem com o luminol (que atua como um amplificador de sinal), produzindo QL. Esta reação é inibida pela superóxido dismutase, catalase e análogos da vitamina E.

A adição de plasma também diminui a QL em níveis basais por um período (tempo de indução t_i) proporcional à concentração plasmática de antioxidantes até que os radicais livres sejam regenerados, restituindo-se os níveis iniciais de QL. O sistema foi calibrado com análogo de vitamina E (Trolox), 100 μL na concentração de 20 μM em tampão glicina pH 8,6. Uma comparação do tempo de indução depois da adição de concentrações conhecidas de Trolox e plasma permite obter valores de TRAP em equivalentes de Trolox.

Este experimento foi conduzido em um contador β marca Beckman® LS 6000 (Fullerton, CA, EUA), em um modo de contagem não coincidente por 25 minutos e uma faixa de resposta entre 300 a 620nm.

3.10 DETERMINAÇÃO DOS PRODUTOS DE OXIDAÇÃO PROTEICA AVANÇADA

Para a quantificação de AOPP no plasma foi utilizado o método descrito por Witko-Sarsat et al. (1998) (Anexo VII). O método baseia-se na reação

das proteínas oxidadas com o iodeto de potássio em meio ácido. As amostras foram diluídas 1:5 em tampão fosfato salino (PBS) onde foram adicionados 100 µL de ácido acético e 50 µL de Iodeto de Potássio 1,16 M. A curva de calibração foi obtida a partir da Solução Estoque Cloramina T 1 mM diluída com PBS e a diluição seriada foi realizada para obter-se as concentrações de 100; 50; 25; 12,5; e 6,25 µM. Após isso, os padrões receberam o mesmo tratamento que as amostras.

A absorvância da reação foi imediatamente lida em espectrofotômetro Helios α Thermo Spectronic® (Waltham, MA, EUA) a 340 nm contra um branco contendo 1000 µL de PBS, 100 µL de ácido acético e 50 µL de iodeto de potássio. A concentração de AOPP foi expressa em µmoles/L de equivalente de cloramina T.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise exploratória foi realizada por meio do teste de Shapiro-Wilk para avaliar se as variáveis apresentavam distribuição normal. A análise da idade dos indivíduos foi realizada utilizando-se o teste T de Student (resultados apresentados em média e desvio padrão) para o grupo associação e pelo teste de Wilcoxon para o grupo aveia (resultados apresentados em mediana, mínimo e máximo). As outras variáveis não apresentaram distribuição normal e foram analisadas pelo teste de Wilcoxon (resultados apresentados em mediana e interquartis). As análises foram realizadas no SPSS 15.0 para Windows (Chicago, IL, USA). O nível de significância estabelecido foi $p < 0,05$.

REFERÊNCIAS

- Alrahmany R, Tsopmo A. Role of carbohydrases on the release of reducing sugar, total phenolics and on antioxidant properties of oat bran. *Food Chem.* 2012;132:413-18.
- Anderson RA, Polansky MM. Tea enhances insulin activity. *J Agric Food Chem.* 2002;50:7182-86.
- Assumpção CR, Brunini TMC, Matsuura C, Resende AC, Mendes-Ribeiro AC. Impact of the L-arginine-nitric oxide pathway and oxidative stress on the pathogenesis of the metabolic syndrome. *Open Biochem J.* 2008;2:108-15.
- Barreiros ALBS, David JM, David JP. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim Nova.* 2006;29(1):113-23.
- Basu A, Sanchez K, Leyva M, Wu M, Betts N, Aston CE et al. Green tea supplementation affects body weight, lipids and lipid peroxidation in obese subjects with metabolic syndrome. *J Am Coll Nutr.* 2010; 29(1),31-40.
- Behall KM, Scholfield DJ, Hallfrisch JG, Liljeberg-Elmstahl HG. Consumption of Both Resistant Starch and B-Glucan Improves Postprandial Plasma Glucose and Insulin in Women. *Diabetes Care.* 2006;29:976-81.
- Butt MS, Tahir-Nadeem M, Khan MKI, Shabir R, Butt MS. Oat: unique among the cereals. *Eur J Nutr.* 2008;47:68 -79.
- Cabrera C, Artacho R, Giménez R. Beneficial effects of green tea - a review. *J Am Coll Nutr.* 2006;25(2):79-99.
- Cardona F, Túnez I, Tasset I, Montilla P, Collantes E, Tinahones FJ. Fat overload aggravates oxidative stress in patients with the metabolic syndrome. *Eur J Clin Invest.* 2008;38(7):510-15.
- Coimbra S, Castro E, Rocha-Pereira P, Rebelo I, Rocha S, Santos-Silva A. The effect of green tea in oxidative stress. *Clin Nutr.* 2006;25:790-96.
- Dufresne C, Farnworth E. Tea, kombucha and health: a review. *Food Res Int.* 2000;33(6):409-21.
- Duthie G, Crozier A. Plant-derived phenolic antioxidants. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2000; 3:447-51.
- Flecha BG, Llesuy S, Boveris A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. *Free Radic Biol & Med.* 1991;10:93-100.
- Grattagliano I, Palmieri VO, Portincasa P, Moschetta A, Palasciano G. Oxidative stress-induced risk factors associated with the metabolic syndrome: a unifying hypothesis. *J Nutr Biochem.* 2008;19:491–504.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods Enzymol.* 1990;186:1-85.

Hasler CM, Brown AC. Position of the American Dietetic Association: functional foods. *J Am Diet Assoc.* 2009;109(4):735-46.

Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem.* 2002;13:572-84.

Ioannides C, Yoxall V. Antimutagenic activity of tea: role of polyphenols. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2003;6:649-56.

Janssen I, Katzmarzyk PT, Ross R. Waist circumference and not body mass index explains obesity-related health risk. *Am J Clin Nutr.* 2004;79:379-84.

Jiang Z, Woollard ACS, Wolff SP. Lipid Hydroperoxide Measurement by Oxidation of Fe²⁺ in the Presence of Xylenol Orange. Comparison with the TBA Assay and an Iodometric Method. *Lipids.* 1991;26:853-56.

Katz DL, Evans MA, Chan W, Nawaz H, Comerford BP, Hoxley ML. Oats, Antioxidants and Endothelial Function in Overweight, Dyslipidemic Adults. *J Am Coll Nutr.* 2004; 23(5):397-403.

Kerckhoffs, DAJM, Brouns F, Hornstra G, Mensink, RP. Effects on the human serum lipoprotein profile of β -glucan, soy protein and isoflavones, plant sterols and stanols, garlic and tocotrienols. *J Nut.* 2002;132:2494-505.

Kerckhoffs, DAJM, Hornstra G, Mensink, RP. Cholesterol-lowering effect of β -glucan from oat bran in mildly hypercholesterolemic subjects may decrease when β -glucan is incorporated into bread and cookies. *Am J Clin Nutr.* 2003;78:221-27.

Lamarão RC, Fialho E. Aspectos funcionais das catequinas do chá verde no metabolismo celular e sua relação com a redução da gordura corporal. *Rev Nutr.* 2009;22(2):257-69.

Lima ES, Abdalla DSP. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Bras J of Pharm Sci.* 2001;37(3):293-303.

Lopes HF. Síndrome metabólica: Aspectos históricos, prevalência e morbidade e mortalidade. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo.* 2004;4:539-53.

Mathur S, Devaraj S, Jialal I. Accelerated atherosclerosis, dyslipidemia and oxidative stress in end-stage renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2002;11:141-47.

Matsubara S, Rodriguez-Amaya DB. Teores de catequinas e teaflavinas em chás comercializados no Brasil. *Ciênc Tecnol Aliment.* 2006;26(2):401-7.

Navarro-González JA, García-Benayas C, Arenas J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin Chem.* 1998;44:679-81.

Park YW, Zhu S, Palaniappan L, Heshka S, Carnethon MR, Heymsfield SB. The metabolic syndrome: prevalence and associated risk factor findings in the US

population from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1994. *Arch Intern Med.* 2003;163:427-36.

Ramakrishna V, Jaikhanani R. Evaluation of oxidative stress in insulin dependent diabetes mellitus (IDDM) patients. *Diagn Pathol.* 2007;2:22.

Repetto M, Reides C, Carretero MLG. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clin Chim Acta.* 1996;255:107-17.

Roberts CK, Sindhu KK. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sci.* 2009;84:705–12.

Tarpey MM, Wink DA, Grisham MB. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004;286:431-44.

The Third Report of the National Cholesterol Education Program (NECP). Expert Panel on Detection, Evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA.* 2001;285(19):2486-97.

Wang H, Wen Y, Du Y, et al. Effects of Catechin Enriched Green Tea on Body Composition. *Obesity.* 2010;18:773-79.

Witko-Sarsat V, Friedlander M, Khoa TN, Capeillere-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S, Dayer JM, Jungers P, Drueke T, Descamps-Latscha B. Advanced Oxidation Protein Products as Novel Mediators of Inflammation and Monocyte Activation in Chronic Renal Failure. *J Immunol.* 1998;161:2524-32.

Wursch P, Pi-Sunyer FX. The Role of Viscous Soluble Fiber in the Metabolic Control of Diabetes: A review with special emphasis on cereals rich in beta-glucan. *Diabetes Care.* 1997;20(11):1774-80.

Yokozawa T, Cho EJ, Hara Y, et al. Antioxidative activity of green tea treated with radical initiator 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride. *J Agric Food Chem.* 2000;48:5068-73.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram a atividade hipolipemiante tanto do farelo de aveia isoladamente bem como da associação aveia/chá verde. Da mesma forma, observou-se também a redução do estresse oxidativo, evidenciado pela diminuição da atividade pró-oxidante e aumento da capacidade antioxidante.

ANEXOS

ANEXO I

Termo de consentimento livre e esclarecido

O Sr.(a) está sendo convidado (a) a participar do estudo: “Avaliação dos efeitos do consumo de chá verde e/ou aveia no perfil lipídico e estresse oxidativo em pacientes com síndrome metabólica”.

Este projeto tem o objetivo de verificar se o consumo de chá verde e/ou aveia promove a redução dos níveis de gordura no sangue. Para isso, será necessário o consumo de 20g de aveia e/ou 3g de chá verde por dia durante 3 meses com acompanhamento mensal realizado pela equipe do estudo. Duas coletas de sangue serão realizadas durante o estudo, sendo uma antes e outra após o consumo do chá verde e/ou aveia. Serão coletados 30 mL de sangue em cada momento para as análises laboratoriais.

Este estudo é realizado sob a supervisão e responsabilidade do prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa e da Farmacêutica Chiara Cristina Bortolasci, que estarão disponíveis para fornecer informações e esclarecimentos adicionais ao longo do estudo.

Informo que, ao participar desta pesquisa, pode ou não haver benefícios em relação ao nível de gordura no sangue dos voluntários. Por outro lado, também informo dos possíveis desconfortos e riscos do estudo como, por exemplo, a intolerância ao uso do chá verde e/ou farelo de aveia.

Este estudo garante privacidade quanto aos dados obtidos, sendo os mesmos utilizados apenas para fins científicos com garantia do anonimato e de que a retirada do consentimento pode ser realizada a qualquer momento, sem prejuízo do atendimento neste hospital.

Enfim, tendo sido orientado quanto ao conteúdo aqui apresentado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido estudo, o voluntário manifesta livre consentimento em participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, pela participação.

Este documento está em duas vias de igual teor, sendo que uma ficará com o voluntário a outra será guardada pelos pesquisadores.

Londrina, ____ de _____ de 2010.

(Assinatura do paciente)

Nome: _____

Sabbatini Barbosa

Prof. Dr. Décio

Cristina Bortolasci

Chiara

Chiara Cristina Bortolasci: (043) 9953-8326 e-mail: chibortolasci@gmail.com
Comitê de Ética: (43) 3371 2490

Anexo II

Termo de Aprovação de Pesquisa – Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná
Registro CONEP 268

Parecer P1 Nº 212/09 CAAE Nº 0157.0268.000-09 FOLHA DE ROSTO Nº	Londrina, 9 de novembro de 2009.
<p align="center">PESQUISADOR: DÉCIO SABATTINI BARBOSA CCS/DPACT</p>	
<p align="center">Prezado Senhor:</p> <p align="center">O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná" (Registro CONEP 268) – de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:</p> <p align="center">"AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO CONSUMO DE CHÁ VERDE E/OU AVEIA NO PERFIL LIPÍDICO E ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM SÍNDROME METABÓLICA"</p>	

PARECER CONSUBSTANCIADO

Trata-se de um ensaio clínico aleatorizado cego da área da farmácia no qual será avaliado, no início do estudo e três meses após o início do mesmo, o estado nutricional de 100 indivíduos no total, divididos em quatro grupos. Serão feitas também medidas antropométricas, análise de parâmetros bioquímicos, determinação de Proteína C reativa, análise de viabilidade de celular em neutrófilos, análise de quantidade de radicais livre, determinação da intensidade de peroxidação lipídica, quantificação do hidroperóxido lipídico e de óxido nítrico, quantificação do potencial antioxidante total plasmático, e finalmente será feita a avaliação de oxidação protéica (AOPP).

Foi apresentada autorização (declaração de ciência) assinada pelo chefe de divisão do Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas (LAC) do HURNP, no qual afirma-se que não haverá prejuízo para o normal funcionamento do setor no atendimento aos pacientes da unidade. Para a análise inicial dos sujeitos da pesquisa e a análise no mês 3 será feita coleta de sangue, contudo, não fica claro se haverá formação de banco de material biológico. ✓

As técnicas necessárias para toda esta avaliação esta bem detalhada no corpo do projeto. Cada um dos quatro grupos irá receber dieta específica, ou seja, grupo 1 consumirá chá verde, grupo 2 consumirá farelo de aveia, grupo 3 fará associação de ambos e grupo 4 receberá dieta hipolipemiante padronizada. O pesquisador não apresenta plano para oferecimento do produtos testados ao grupo que recebe dieta hipolipemiante padronizada após o estudo, caso os mesmos tenham resultados positivos. ✓

O pesquisador não apresenta avaliação de risco/benefício aos sujeitos. ✓

De acordo com a Folha de Rosto, o local de realização da pesquisa seria a Universidade Estadual de Londrina, contudo, os sujeitos serão recrutados na rede básica de saúde. É necessário esclarecimento do pesquisador quanto a este item.

Nos procedimentos metodológicos, não há descrição da forma de recrutamento dos voluntários (como, em que momento, por quem, etc.). ✓

Não foi apresentado orçamento de gastos do projeto. Segundo o pesquisador, não haverá captação de recursos, já que os insumos para análises bioquímicas provirão do próprio Laboratório de Pesquisa e



Pós-Graduação do HU, equipamentos e reagentes para o perfil lipídico e PCR, entre outros procedimentos, estão disponíveis no mesmo laboratório.

É informado que haverá doação de kits para análise dos parâmetros bioquímicos e PCR fornecidos pela empresa Ehlke & Cia. Ltda., que o chá verde será doado pela Midori Ltda. e a aveia pela SL Cereais e alimentos Ltda. No caso das doações, sugiro que seja esclarecido o interesse da empresa no projeto, a forma de publicação dos resultados e apresentado acordo de publicação entre as partes, e acordo comercial, caso haja. No caso de divulgação dos resultados da pesquisa na mídia, recomenda-se que o CEP seja consultado antecipadamente, e que seja seguida a legislação sanitária vigente relativa à promoção de alimentos com propriedades funcionais.

O TCLE está escrito de maneira clara, contudo, não atente a todos os requisitos da Resolução 196/96. O pesquisador apresenta o objetivo do projeto, contudo, descreve apenas a dieta referente aos sujeitos incluídos no grupo que associa as dietas, não informa riscos e benefícios, e não está redigido na forma de convite, e sim na forma de uma declaração do sujeito. ✓

Situação do Projeto: **PENDÊNCIA**

Solicitações:

- Esclarecer se a pesquisa será feita no HU ou nas Unidades Básicas de Saúde e anexar autorização do responsável pelo serviço.
- Incluir descrição da forma de recrutamento
- Apresentar avaliação de risco benefício ao sujeito em relação ao consumo dos produtos
- Esclarecer se haverá formação de banco de material biológico coletado para análise. Informar destino do material coletado.
- Incluir plano de oferecimento do produto pós estudo.
- Incluir orçamento detalhado da pesquisa, inclusive material para coleta de material biológico, informando quem financiará estes itens.
- Esclarecer a questão relativa às doações das empresas citadas no projeto.
- Informar se há, e apresentar acordo de publicação caso afirmativo
- Informar se há, e apresentar acordo comercial caso afirmativo
- Elaborar novo TCLE seguindo orientações da Resolução CNS 196/96. Sugerimos que a redação seja feita na forma de convite. Deverá constar a assinatura do pesquisador e do voluntário e ser elaborado em duas vias, sendo uma delas entregue ao voluntário.
- Atentar para possíveis publicações na mídia. Sugerimos o fazer-lo após apreciação pelo CEP.

Aguardamos envio de resposta à(s) pendência(s) num prazo de 60 dias, após o qual seu projeto será arquivado neste Comitê e o registro excluído do SISNEP.

Atenciosamente,

Prof. Dra. Ester M.O. Dalla Costa
 Coordenadora
 Comitê de Ética em Pesquisa-CEP/UEL

A Professora Ester M. O. Dalla Costa

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP/UEL

Em atenção ao parecer P1 nº 212/09, emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina referente ao Projeto de Pesquisa "Avaliação dos efeitos do consumo de chá verde e/ou aveia no perfil lipídico e estresse oxidativo em pacientes com síndrome metabólica", gostaríamos de esclarecer que:

1. O local de realização da pesquisa em nível de contato direto com os pacientes será o Hospital Universitário (H.U.) de Londrina. Os pacientes serão selecionados a partir de consulta dos exames laboratoriais (perfil lipídico) no sistema da rede municipal (WebSaúde). A Secretaria de Saúde de Londrina autorizou a pesquisa no WebSaúde, conforme carta em anexo.
2. Os pacientes serão recrutados a partir das Unidades Básicas de Saúde, através de pesquisa no sistema da rede municipal (sistema WebSaúde). Os pacientes que se encaixarem nos critérios de inclusão serão convidados por telefone a participarem do projeto. Este contato telefônico será feito pela acadêmica Chiara Cristina Bortolasci. Após este contato inicial, na primeira consulta com o clínico do projeto no H.U., lhes será explicado pormenorizadamente o teor deste projeto e, caso haja concordância por parte destes pacientes, o termo de consentimento livre e esclarecido será assinado.
3. Em se tratando de produtos alimentícios que são normalmente consumidos por nossa população, não há nenhum risco à saúde em potencial. Caso haja intolerância por parte dos pacientes aos produtos utilizados, imediatamente estes serão excluídos do projeto. Os benefícios serão avaliados, na verdade, após o término do trabalho. Em tese, podemos esperar que o consumo regular desses alimentos possa melhorar o perfil lipídico desses pacientes bem como aumentar suas defesas antioxidantes.
4. Não haverá formação de banco de material biológico coletado para análise, conforme podemos observar nos objetivos do projeto. O material coletado será processado e analisado no mesmo dia. O material biológico dos testes que forem feitos posteriormente serão armazenados em freezer -70°C. Caso após a publicação dos resultados deste trabalho sobrar algum tipo deste material colhido, este será descartado.
5. Nosso grupo não possui a menor condição monetária para, no caso de evidenciarmos benefícios aos pacientes, em continuar a oferecer os produtos pós estudo.

6. Conforme consta na página 25 do Projeto enviado:

“Para o desenvolvimento deste projeto, parte dos insumos necessários serão provenientes do próprio Laboratório de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital Universitário obtidos de verbas de projetos aprovados em agências de fomento à pesquisa e parte será obtida através de doações. Todos os reagentes e equipamentos, bem como materiais para coleta necessários para a realização dos testes para avaliação da glicemia, perfil lipídico e PCR, bem como os que avaliam o estresse oxidativo e o burst respiratório estão disponíveis no Laboratório de Pesquisa e Pós-Graduação HU/UEL, não sendo necessária a compra de nenhum material para esta finalidade.

Os kits para doseamento dos parâmetros bioquímicos e PCR serão doados pela empresa J.R. Ehlke & Cia. LTDA. de Curitiba.

O chá verde e a aveia que os participantes consumirão durante o estudo serão doados, respectivamente pela Midori Indústria de Chá LTDA e pela SL Cereais e Alimentos LTDA.

Quaisquer outras despesas serão de responsabilidade do pesquisador.”

Desta forma, entendemos que a Instituição não será lesada em seu patrimônio.

7. As empresas citadas no projeto serão parceiras no mesmo, ou seja, doarão os kits para algumas determinações laboratoriais, bem como a aveia e o chá verde sem nenhum acordo prévio para benefício destas.

8. Não há nenhum acordo prévio entre o pesquisador responsável e as referidas empresas no sentido de condicionar a cessão de kits, aveia e chá verde com a publicação de artigo científico em periódico especializado. Há, porém, um entendimento do pesquisador responsável que tais empresas sejam citadas no artigo como fornecedoras de tais produtos, como já feito anteriormente e pode ser constatado no artigo em anexo.

9. Não há nenhum tipo de acordo comercial firmado entre as partes.

10. Em Anexo.

11. Caso haja exposição deste trabalho junto à mídia, iremos fazer uma consulta prévia ao CEP.

ANEXO III

Determinação de LOOH - Espectrofotometria

REAGENTES

- H₂SO₄ 250mM (PM: 98)

Em um balão de 10mL colocar um pouco de água (em torno de 2mL). Adicionar 245µL de H₂SO₄ e completar o resto do balão com de água.

- Padrão: 1,1,3,3 tetraethoxypropane (TEP) 4mM (PM: 220,3)
Em um balão de 50mL colocar um pouco de água (em torno de 20mL). Adicionar 48µL de TEP - Sigma® (St Louis, MO, EUA) e completar o resto do balão com de água.

- Reagente de

FOX:

90mL de metanol puro - Vetec® (Rio de Janeiro, RJ, Brasil)

10mL de H₂SO₄ 250mM - Synth® (Diadema, SP, Brasil)

88mg de BHT - Vetec® (Rio de Janeiro, RJ, Brasil)

7,6mg de xylenol Orange - Acros® (New Jersey, EUA)

9,8mg de sulfato de ferro amoníaco hexahidratado - Synth® (Diadema, SP, Brasil)

Em um frasco que comporte 100mL iremos adicionar os reagentes acima **na ordem correta**. Primeiro colocaremos 90mL metanol puro e adicionaremos em seguida 10mL de H₂SO₄ 250mM (preparado conforme item acima). Após esta fase colocaremos o 88mg BHT seguido de 7,6mg de xylenol orange. Para terminar o reagente adicionamos 9,8mg de sulfato de ferro amoníaco hexahidratado.

CURVA DE CALIBRAÇÃO

Reagentes	P1	P2	P3	P4	P5
Concentração (mM)	4,0	2,0	1,0	0,500	0,250
H ₂ O Dest (µL)	-	100	100	100	100
Padrão (µL)	100	100P1	100P2	100P3	100P4

Para a realização da curva padrão iremos selecionar 5 tubo de ensaio em marcar cada uma com um P(P1, P2, P3, P4 e P5). Após todos os tubos estarem nomeados colocaremos 100µL de água destilada nos tubos P2, P3, P4 e P5. Adicionaremos ao tubo P2

100µL de padrão TEPmM, conforme descrito acima, e este estará pronto. Para o preparo do P3 teremos que adicionar 100µL da reação já pronta do P2. Para o preparo do P4 teremos que adicionar 100µL da reação já pronta do P3 e para o preparo do P5 teremos que adicionar 100µL da reação já pronta do P4. Após estes procedimentos os tubos P3, P4 e P5 também estarão prontos. Por fim prepararemos o P1 que consiste apenas em colocar 100µL de TEP 4mM e finalizaremos a curva padrão.

PROCEDIMENTO

Reagentes	Branco	Padrão	Amostra
Padrão (µL)	-	100	-
Amostra (µL)	-	-	100
Reagente de FOX (µL)	900	900	900

Para a realização do procedimento iremos selecionar tubos de ensaio em quantidade apropriada para realizamos a técnica. Após todos os tubos estarem nomeados colocaremos 900µL do reagente de FOX, preparado conforme descrito acima, em todos os tubos de ensaio. O tubo branco já estará pronto para uso. Para preparar os tubos padrão (P1, P2, P3, P4 e P5) adicionaremos 100µL dos padrões, preparados acima, aos 900µL do reagente de FOX. Para preparar as amostras adicionaremos 100µL das amostras aos 900µL do reagente de FOX. Após este procedimento agitaremos todos os tubos e deixaremos em repouso durante 30 minutos. Ao final do tempo estabelecido vamos ler o resultado em um aparelho espectrofotômetro, acertando o comprimento de onda em 560nm, zerando o aparelho com o branco. A cor é estável durante uma noite.

Obs.: Fator +/- 6.

ANEXO IV

Determinação de LOOH - Quimiluminescência

Programação do aparelho

- ✓ Main Menu – sel Review and Edit User Program
- ✓ Review/Edit – sel Luminescencia
- ✓ Review/Edit – sel Counting time: 0,5min
 - Edit Other Parameters
- ✓ Edit Other Parameters – sel Data Calculation
- ✓ Data Calculation – sel number of data points: 5
 - sel count time/data point: 0,10
 - sel count sample set: 1
 - sel factor: 1
- ✓ Voltar ao menu principal
- ✓ Automatic start (quando a rack já estiver dentro do aparelho)

Técnica

- 1) Programar o aparelho
- 2) Pegar papel alumínio e cortar no tamanho das tampas dos frascos de cintilação
- 3) Colocar o papel nas tampas (pode deixar pronto antes de começar)
- 4) Colocar os tubos na rack (vazios) para fazer a pré-leitura e escolher os melhores frascos (12) – aqueles com leituras basais parecidas

Obs.: Manipular os frascos no escuro!

Reação

- ➔ 6 primeiros frascos : Estimulados
 - ✓ 1730 µL de tampão fosfato KCl) – Reagen® (Rio de Janeiro, RJ, Brasil)
 - ✓ 250 µL de plasma
 - ✓ 20 µL de T-butil (diluído) - Acros® (New Jersey, EUA)
- ➔ 6 últimos frascos : Brancos
 - ✓ 1730 µL de tampão fosfato KCl
 - ✓ 250 µL de plasma

Diluição do T-butil

386 μL de t-butil + 9614 μL de água destilada

- * t-butil fica na geladeira!
- * Deixar o tubo coberto com papel alumínio/ Armazenar na geladeira
- * Usar o t-butil até um mês

Observações

- * Sempre trabalhar no escuro
- * Adicionar o t-butil por último, já dentro do aparelho
- * Não colocar o carrinho vermelho (stop), só quando passar as 12 rodadas para terminar de vez a reação
- * Manter a temperatura do aparelho (OUT) entre 29 e 31° C
- * Marcar horário – em torno de 2 horas = 12 leituras

Cálculo

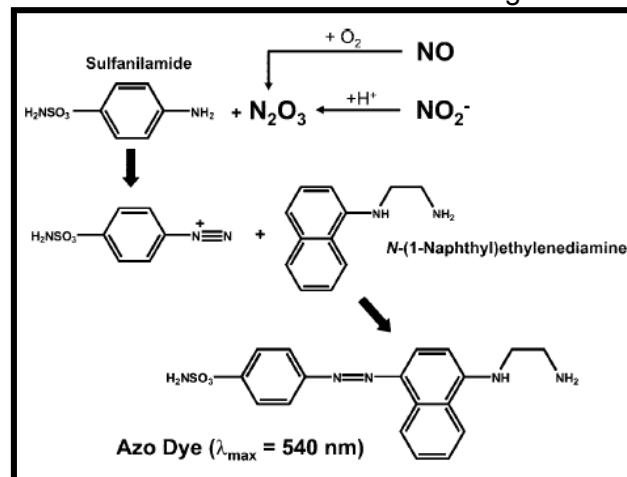
- Em cada leitura: Calcular a média de cada paciente desprezando o 1º valor, calcular a média dos tubos brancos, desprezando o 1º valor também
- Diminuir a média dos tubos brancos dos tubos estimulados correspondentes
- Calcular a média das 12 leituras

ANEXO V

Determinação de NOx

A estimativa da concentração de NO nas amostras foi realizada pela técnica descrita por Navarro-González e colaboradores (1998) adaptada. O método baseia-se na redução de nitrato a nitrito mediada por reações de óxi-redução ocorridas entre o nitrato presente na amostra e o sistema cádmio-cobre dos reagentes, com posterior diazotação e detecção colorimétrica do azocomposto formado pela adição do reagente de Griess a 550 nm (GRIESS, 1879), conforme mostra a figura abaixo:

Figura 2 – Esquema global das reações envolvidas na determinação de nitrito plasmático empregando-se o método de Cádmio-Cobre seguido da reação de Griess.



REAGENTES

1- Sulfato de Zinco (ZnSO₄) 75mmol/L - Vetec® (Rio de Janeiro, RJ, Brasil)

2,156g _____ 100mL H₂O destilada

Pesar 2,156g de Sulfato de Zinco, adicionar em balão volumétrico de 100mL, dissolver com um pouco de água destilada e completar o volume para 100mL.

Armazenar em geladeira.

2- Hidróxido de Sódio (NaOH) 55mmol/L - Nuclear® (Diadema, SP, Brasil)

220mg _____ 100mL H₂O destilada

Pesar 220mg de Hidróxido de Sódio, adicionar em balão volumétrico de 100mL, dissolver com um pouco de água destilada e completar o volume para 100mL.

Armazenar em geladeira.

3- Tampão Glicina (45g/L, pH 9,7) - Sigma® (St. Louis, MO, EUA)

4,5g _____ 100mL H₂O destilada

Pesar 4,5g de tampão glicina, adicionar em balão volumétrico de 100mL, dissolver com um pouco de água destilada e completar o volume para 100mL.

Armazenar em geladeira.

- 4- Tampão Glicina-NaOH (15g/L, pH 9,7) - Sigma® (St. Louis, MO, EUA)**
 1,5g _____ 100mL H₂O destilada
 Pesar 1,5g de tampão glicina, adicionar em balão volumétrico de 100mL, dissolver com um pouco de água destilada e completar o volume para 100mL. Acertar o pH em 9,7 utilizando NaOH.
 Armazenar em geladeira.
- 5- Sulfato de cobre (CuSO₄) 5mmol/L em Tampão Glicina-NaOH (15g/L, pH 9,7)**
 62,42mg _____ 50mL de tampão Glicina-NaOH
 Pesar 62,42mg de Sulfato de cobre – Reagen® (Rio de Janeiro, RJ, Brasil), adicionar em balão volumétrico de 50mL, dissolver com um pouco de tampão glicina 15g/L e completar o volume para 50mL.
 Preparado no dia de uso.
- 6- Ácido Sulfúrico (H₂SO₄) 100mmol/L - Synth®(Diadema, SP, Brasil)**
 1,4mL H₂SO₄ _____ 250mL H₂O destilada
 Adicionar um pouco de água destilada em um balão volumétrico de 250mL, pipetar 1,4mL de Ácido sulfúrico e completar o volume para 250mL.
 Preparar o reagente em capela.
 Armazenar em temperatura ambiente.
- 7- Sol. Estoque Padrão NaNO₂ 100mM - Synth®(Diadema, SP, Brasil)**
 69,00mg _____ 10mL H₂O destilada
 Pesar 69mg de NaNO₂ e adicionar em um tubo de vidro. Adicionar 10 mL de água destilada. Tampar tudo com parafilm e verter para dissolver.
 Armazenar em geladeira e ao abrigo da luz.
- 8- Reagente 1 – Sulfanilamida - Acros® (New Jersey, EUA)**
 2,0g Sulfanilamida _____ 100mL de Ácido Fosfórico 5% - Synth® (Diadema, SP, Brasil)
 Pesar 2g de Sulfanilamida, adicionar em balão volumétrico de 100mL, dissolver com um pouco de ácido fosfórico 5% e completar o volume para 100mL.
 Armazenar em geladeira e ao abrigo da luz.
- 9- Reagente 2 – N-naphthylethylenediamine dihydrochloride(NEDD) - Sigma® (St. Louis, MO, EUA)**
 200mg NEDD _____ 100mL H₂O destilada
 Pesar 200mg de NEDD, adicionar em balão volumétrico de 100mL, dissolver com um pouco de água destilada e completar o volume para 100mL.
 Armazenar em geladeira e ao abrigo da luz.

DESPROTEINIZAÇÃO

- ✓ Adicionar, em eppendorf, em triplicata, 60µL de amostra + 60µL de 75mmol/L ZnSO₄;
- ✓ Agitar 30sec no vórtex;
- ✓ Centrifugar por 2min a 10000rpm a temperatura ambiente;
- ✓ Após centrifugar, adicionar 70µL de 55mmol/L NaOH;
- ✓ Agitar 30sec no vórtex (não precisa quebrar o sedimento)

- ✓ Centrifugar por 5min a 10000rpm a temperatura ambiente;
- ✓ Transferir 150µL do sobrenadante para tubo de ensaio de vidro pequeno (sobrenadante não deve estar turvo);
- ✓ Adicionar 50µL de tampão glicina (45g/L, pH 9,7).

ATIVAÇÃO DOS GRÂNULOS DE CÁDMIO - Sigma® (St. Louis, MO, EUA)

Para esta técnica utiliza-se 2 grânulos pequenos.

- ✓ Grânulos ficam estocados em H₂SO₄ 100 mmol/L
- ✓ Em capela, lavar os grânulos que serão utilizados com H₂O destilada 3 vezes (com auxílio de um béquero e uma peneira)
- ✓ Colocar a solução de CuSO₄ 5mmol/L em um pote e adicionar os grânulos previamente lavados. São então, deixados em contato por 5min.
- ✓ Os grânulos ativados devem então ser usados dentro de 10min.
- ✓ Retirar os grânulos da solução e adicionar a quantidade necessária em cada vial.
- ✓ Após o uso, os grânulos são lavados e estocados em 100mmol/L de H₂SO₄.
- ✓ Os grânulos que ficarem pretos mesmo após serem lavados com H₂SO₄ devem ser descartados.

REDUÇÃO DO NITRATO A NITRITO

- ✓ 2 grânulos são adicionados ao tubo de ensaio contendo a amostra e o tampão glicina.
Procurar utilizar os grânulos com tamanhos próximos!
- ✓ Deixar em agitação contínua por 10min em agitador tipo Kline;
- ✓ Transferir 100µL de cada amostra para a microplaca para a determinação de nitritos.

CURVA DE CALIBRAÇÃO (triplicata)

Fazer a diluição dos padrões na própria microplaca antes de adicionar qualquer reagente.

1. Preparar a Solução de Uso NaNO₂ 125µmol/L (P5): Em um balão volumétrico de 100mL dissolver 125µL de Solução Estoque Padrão NaNO₂ 100mM
2. Adicionar 100µL de água destilada nos poços A1, A2, A3 (brancos)
3. Adicionar 100µL Solução de Uso NaNO₂ 125µmol/L no poço B1, B2, B3 (primeiro ponto)
4. Adicionar 100µL de água destilada nos poços C1, C2, C3, D1, D2, D3, E1, E2, E3, F1, F2, F3
5. Adicionar 100µL Solução de Uso NaNO₂ 125µmol/L no poço C1 e homogeneizar com a própria pipeta.
6. Transferir 100µL da solução C1 para o poço D1 e homogeneizar com a própria pipeta.
7. Transferir 100µL da solução D1 para o poço E1 e homogeneizar com a própria pipeta.

8. Transferir 100µL da solução E1 para o poço F1 e homogeneizar com a própria pipeta.
9. Retirar 100µL do poço F1 e descartar.
10. Repetir o mesmo procedimento (a partir do passo 5) para as outras duas curvas de calibração (Coluna 2 e 3)

QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE NITRITOS

- Após a adição das amostras e da diluição seriada do padrão na microplaca, adiciona-se 50 µL do Reagente 1 e 50 µL do Reagente 2 a cada poço
 - Incubar por 10min a temperatura ambiente;
 - Leitura em leitor de microplaca – 550nm
-
- **IMPORTANTE:** Toda solução que entrou em contato com o cádmio deve ser descartada como resíduo tóxico (armazenar em potes de plástico para descarte adequado)

CÁLCULO DO FATOR:

$$\text{Fator} = \frac{\text{Concentração do padrão}}{\text{Leitura do espectrofotômetro}}$$

CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA:

$$\text{Concentração} = \text{fator} \times \text{leitura da amostra}$$

$$\text{Concentração de Óxido Nítrico} - \mu\text{mol/L}$$

Obs.: Fator +/- 65.

ANEXO VI

Determinação do TRAP

REAGENTES

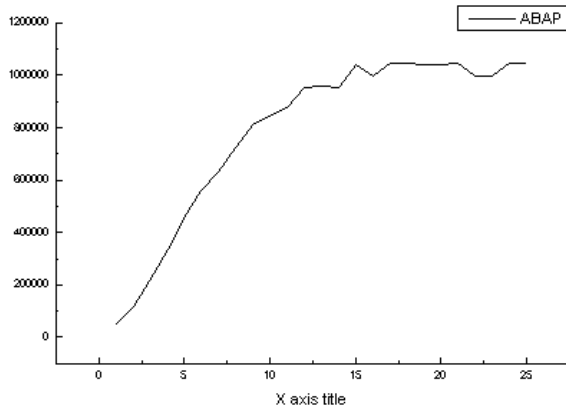
- 1. ABAP** (azobis, PM = 271,2) 200mM - **Aldrich® (Milwaukee, WI, EUA)**
Pesar 54,24mg de ABAP e dissolver em 1mL H₂O destilada
Agitar no vórtex e preparar no dia de uso.
Proteger o tubo com papel alumínio
Manter no gelo
- 2. Luminol** (PM = 199,1) – **Solução mãe – Sigma® (St. Louis, MO, EUA)**
Pesar 3,98mg de Luminol e dissolver em 10mL H₂O destilada
Agitar em vórtex
Forma corpo de fundo
Proteger o tubo com papel alumínio
Conservar em geladeira
- 3. Luminol – Solução de trabalho**
Preparar no dia do uso
A partir da Solução Mãe, agitar o tubo e pipetar 100µL LUMINOL – SOL. MÃE e diluir com 900µL de H₂O destilada
Proteger o tubo com alumínio
Agitar em vórtex
- 4. TROLOX** (PM = 250,29) - **Solução mãe (20µM) - Acros® (New Jersey, EUA)**
Pesar 5mg e dissolver em 10mL Tampão Glicina pH=8,6
Proteger com papel alumínio
Agitar em vórtex
Conservar em geladeira
- 5. TROLOX - Solução de trabalho – PREPARO NO DIA DE USO**
Agitar e pipetar 4µL TROLOX SOL. MÃE e diluir com 796µL de Tampão Glicina pH = 8,6
Manter no gelo
- 6. Tampão glicina - Sigma® (St. Louis, MO, EUA)**
Pesar 3,75g de glicina dissolver com ±400mL H₂O destilada em béquer de vidro
Acertar pH em 8,6 com KOH 1M
Transferir o tampão para balão volumétrico de 500mL e completar o volume
Transferir o tampão para frasco de vidro identificado e conservar em geladeira

PROCEDIMENTO

- ✓ Antes de iniciar as reações com soro, fazer as curvas ABAP e com TROLOX

Curva ABAP

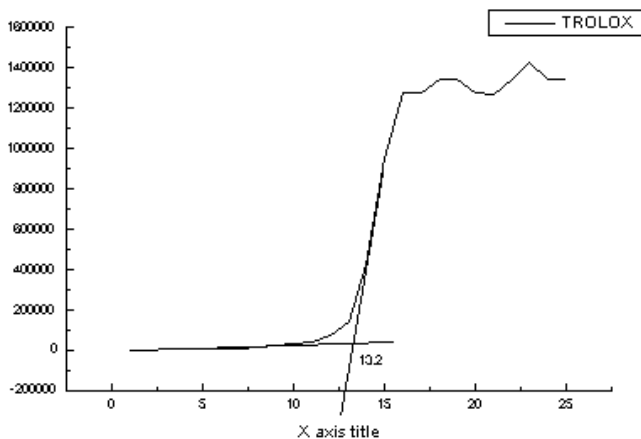
Tampão Glicina _____ 1,8mL
 Luminol _____ 0,1mL
 ABAP _____ 0,1mL



Curva Trolox

Tampão Glicina _____ 1,8mL
 Luminol _____ 0,1mL
 Trolox _____ 0,1 mL
 ABAP _____ 0,1mL

Tempo da curva Trolox entre 12 e 14 min



Trolox entre 12 e 14 min

Reação com Soro

Tampão Glicina _____ 1,8mL
 Luminol _____ 0,1mL
 Soro diluído 1 :2 c H₂O__ 5 uL
 ABAP _____ 0,1mL

PROGRAMAÇÃO DO APARELHO

- ✓ Main Menu – sel review and edit user program
- ✓ Review/Edit – sel luminescencia
- ✓ Review/Edit – sel counting time:25min
 - Edit Other Parameters
- ✓ Edit Other Parameters – sel data calculation
- ✓ Data calculation – sel number of data points: 25
 - sel count time/data point: 0,10
 - sel count sample set: 1
 - sel factor: 0,01
- ✓ Voltar ao menu principal: sel count single rack
- ✓ Count single rack: sel select user program
- ✓ User selection: sel luminescencia
- ✓ Count single rack: sel count with program user: 1
- ✓ Count single rack: sel [START]

Selecionar previamente os passos acima e deixar a tela start até que a rack contendo o frasco esteja na posição

CÁLCULO

$$\text{TRAP} = 802 \times \frac{\text{Tempo da amostra}}{\text{Tempo de trolox}} = \text{cpm}$$

ANEXO VII

Determinação do AOPP

REAGENTES

- **KI (Iodeto de Potássio) 1,16M – MPI (Santo Amaro, SP, Brasil)** - preparar a quantidade de uso, não tem definido a validade após preparado.
 - 1- Pesar reagente
0,962g _____ 5mL de H₂O destilada
 - 2- Colocar reagente em tubo de vidro (10 mL)
 - 3- Adicionar 5 mL de H₂O destilada
 - 4- Tampar tubo com parafilm e agitar

- **Padrão Estoque Cloramina T - 1mM - Fluka® (St. Louis, MO, EUA)**– validade: até 3 meses em 4°C
 - 1- Pesar o padrão
28,17mg _____ 100mL H₂O destilada
 - 2- Colocar o padrão em balão volumétrico de 100 mL
 - 3- Adicionar 80 mL de H₂O destilada
 - 4- Dissolver o padrão
 - 5- Completar o volume para 100 mL

- **Ácido Acético PA - Dinâmica® (Diadema, SP, Brasil)**
Usar o reagente comercial.

AMOSTRAS

- Plasma diluído 1:5 com PBS
 - 1- em tubos diluir as amostras da seguinte maneira:

200 uL de plasma + 800 uL de PBS

PROCEDIMENTO

- Diluição Padrão:
 - 1- Em tubos de vidro de 10 mL, fazer a diluição dos padrões antes de adicionar qualquer reagente.
 - 2- Identificar 5 tubos, de P1 ate P5
 - 3- No tubo P1:
P1 - 500µL Padrão Estoque + 4,5mL PBS
 - 4 – No tubo P2:

P2 – 1mL P1 + 1mL PBS

4- No tubo P3:
P3 – 1mL P2 + 1mL PBS

5- No tubo P4:
P4 – 1mL P3 + 1mL PBS

6- No tubo P5:
P5 – 1mL P4 + 1mL PBS

7- Para a reação seguir o esquema abaixo, identificando os tubos e adicionando os reagentes na ordem

	BRANCO	P1	P2	P3	P4	P5	AMOSTRA
[] μM		100	50	25	12,5	6,25	
PBS (μL)	1000						
PADRÃO (μL)		1000	1000	1000	1000	1000	
AMOSTRA (μL)							1000
Ác Acético PA (μL)	100	100	100	100	100	100	100
KI (μL)	50	50	50	50	50	50	50

- Leitura em 340nm
- Ler imediatamente

Calculo do fator:

$$\text{FATOR} = \frac{\text{CONCENTRAÇÃO DO PADRÃO}}{\text{LEITURA DO ESPECTROFOTOMETRO}}$$

Calculo da concentração da amostra:

$$\text{CONCENTRAÇÃO} = \text{FATOR} \times \text{LEITURA DA AMOSTRA}$$

[Concentração] AOPP – μmoles/L de equivalente de cloramina T

Obs.: Fator +/- 50