

Universidade de Brasília  
Departamento de Nutrição  
Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana

**FORMAÇÃO DE RADICAIS LIVRES INDUZIDA POR  
CROMO TRIVALENTE (Cr<sup>3+</sup>) E HEXAVALENTE (Cr<sup>6+</sup>)**

**ANA CAROLINA DE FREITAS LOPES.**

Brasília  
2013

# **FORMAÇÃO DE RADICAIS LIVRES INDUZIDA POR CROMO TRIVALENTE ( $\text{Cr}^{3+}$ ) E HEXAVALENTE ( $\text{Cr}^{6+}$ )**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana do Departamento de Nutrição da Universidade de Brasília como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Nutrição Humana.

Aluna: **Ana Carolina de Freitas Lopes.**

Orientador: **Prof. Dr. Marcelo Hermes Lima.**

Linha de pesquisa: **BIOQUÍMICA NUTRICIONAL**

Brasília

2013

## BANCA EXAMINADORA

**Prof. Dr. Marcelo Hermes Lima. (Presidente)**

---

Departamento de Biologia Celular – CEL  
Instituto de Biologia – IB  
Universidade de Brasília - UnB

**Prof.<sup>a</sup> Dra. Sandra Fernandes Arruda.**

---

Departamento de Nutrição - NUT  
Universidade de Brasília – UnB

**Prof.<sup>a</sup> Dra. Élide Geralda Campos.**

---

Departamento de Biologia Celular – CEL  
Instituto de Biologia – IB  
Universidade de Brasília - UnB

**Prof.<sup>a</sup> Dra. Isa Gomes Jorge de Avellar. (Suplente)**

---

Instituto de Química - IQ  
Universidade de Brasília – UnB

*“You’ve gone too far for a wingless one”*

(LGR)

*À minha mãe.*

## AGRADECIMENTOS

---

*A minha mãe, a verdadeira responsável por tudo.*

*A minha família, especialmente a Paola e a Tia Tina, por acreditarem no meu trabalho mais que qualquer um, às tias Lídia e Rosa e aos primos Renato, Ricardo e Livia.*

*Aos amigos Luciana, Júlia, Ana Luísa, Carol, Eliza, Amanda, Luciano, Ítalo, Fábio e Bruno, que sempre compreenderam minhas ausências e me incentivaram a continuar.*

*Ao prof. Marcelo pela oportunidade e pelo aprendizado.*

*Ao amigo Thiago, que muito mais que treinamento, me contagiou com a empolgação pela ciência.*

*Aos amigos do laboratório: Luana, André, Daniel, Marcus, Marcos Burger, Roberto, Andressa, prof. Alexis, prof. Isa Avellar e prof. Vera Polez, pela ajuda nos experimentos, na discussão dos resultados e pela descontração do trabalho.*

*Ao prof. Antônio Alonso, pela colaboração e ajuda com os experimentos de EPR.*

*A Capes, CNPq e Milênio-Redoxoma e UnB pelo fomento e incentivo que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.*

## SUMÁRIO

---

Agradecimentos .....	6
Lista de Siglas e Abreviaturas .....	9
Listas de Imagens .....	11
Lista de Quadros .....	11
Lista de Tabelas .....	11
Lista de Esquemas .....	11
Lista de Figuras.....	12
Resumo .....	19
Abstract.....	20
Introdução.....	21
Revisão Bibliográfica .....	23
Radicais livres e Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) .....	23
Efeitos biológicos dos radicais livres .....	27
i. Proteínas.....	29
ii. Lipídios .....	30
iii. DNA.....	34
Mecanismos adaptativos ao estresse oxidativo.....	36
Ingestão dietética de Cromo .....	41
Cromo e o metabolismo de insulina .....	46
Cromo e a produção de radicais livres.....	49
Objetivos.....	57
Objetivo geral .....	57
Objetivos específicos .....	57
Métodos .....	58
Reagentes.....	58
Ensaio preliminares para a determinação do tampão.....	58
Formação de radical hidroxil ( $\bullet$ OH): .....	60
i. Método de Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR) .....	60
ii. Degradação oxidativa da 2-Desoxirribose (2-DR).....	62
iii. Hidroxilação do ácido tereftálico (método fluorimétrico) .....	63
iv. Oxidação do dimetilsulfóxido (DMSO) (análise espectrofotométrica de metanosulfonato) .....	64

Concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Oxidação do vermelho de fenol mediada pela <i>Horseradish</i> peroxidase dependente de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	65
Oxidação de proteínas: formação de proteínas carboniladas.....	69
Análise Estatística.....	72
Resultados e Discussão.....	73
Capítulo I – Formação de radicais livres mediada por Cr(III).....	73
Capítulo II – Formação de radicais livres mediada por Cr(VI) .....	100
Capítulo III – Mecanismo de formação de radical hidroxil (•OH) mediada por Cr(III) e Cr(VI) em interação com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	114
Conclusões e Perspectivas .....	121
Referências Bibliográficas.....	123
Apêndices .....	131
Apêndice A .....	131
Apêndice B .....	136
Apêndice C .....	137
Apêndice D .....	138
Apêndice E.....	139

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

---

<b>•OH</b>	Radical hidroxil
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	Oxigênio singlete, estado excitado do oxigênio molecular
<b>2-DR</b>	2-Desoxirribose
<b>8-OH-Gua</b>	8-hidroxi guanina
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>CAT</b>	Catalase
<b>Cr(III) ou Cr<sup>3+</sup></b>	Cromo trivalente
<b>Cr(VI) ou Cr<sup>3+</sup></b>	Cromo hexavalente
<b>DMPO</b>	5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido
<b>DMPO/•OH</b>	Aduto formado a partir da reação do radical hidroxil com o sequestrador DMPO
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>EPR</b>	Ressonância Paramagnética Eletrônica, do inglês <i>Electron Paramagnetic Resonance</i>
<b>EROs</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>Fe(II)</b>	Ferro bivalente (ferroso)
<b>Fe(III)</b>	Ferro trivalente (férico)
<b>GPx</b>	Glutaciona peroxidase
<b>GR</b>	Glutaciona redutase
<b>GSH</b>	Glutaciona reduzida
<b>GSSG</b>	Glutaciona oxidada
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogênio

<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub></b>	Ácido fosfórico
<b>HCl</b>	Ácido clorídrico
<b>HClO</b>	Ácido hipocloroso
<b>HEPES</b>	N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethane-sulfonic acid) – C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> SNa
<b>HNE</b>	4-hidroxinonenal
<b>HOO•</b>	Radical hidroperoxil
<b>HRPO</b>	<i>Horseradish</i> peroxidase
<b>Kpi</b>	Tampão fosfato
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baixa densidade
<b>LO•</b>	Radical alcolxil
<b>LOO•</b>	Radical peroxil
<b>LOOH</b>	Radical hidroperóxido
<b>MDA</b>	Malonildialdeído
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sódio
<b>PUFAs</b>	Ácidos graxos poli-insaturados, do inglês <i>Polyunsaturated Fatty Acids</i>
<b>SOD</b>	Superóxido dismutase
<b>TBA</b>	Ácido tiobarbitúrico
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético

## LISTAS DE IMAGENS

---

### Lista de Quadros

Quadro 1 - Ingestão adequada (AI) do micronutriente cromo de acordo com idade e sexo. Fonte: IOM, 2001. ....	43
--	----

### Lista de Tabelas

Tabela 1 - Espécies reativas de oxigênio (EROs) (Halliwell, et al., 2007) .....	23
Tabela 2 - Constantes de reação do radical hidroxil (Halliwell, et al., 2007) .....	25
Tabela 3 - Consumo de cromo em diversos países.....	43
Tabela 4 - Produção de MDA a partir da manipulação do tempo de incubação da 2-DR em meio reacional contendo Cr(III) e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . <i>Condições experimentais:</i> Kpi 5 mM, pH 7,2; 2-DR 5 mM; H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1 mM e Cr(III) 0,1 mM. N=6. ....	86
Tabela 5 - Componentes para formulação da pergunta e termos de busca.....	131
Tabela 6 - Estratégia de busca de evidências científicas. ....	132
Tabela 7 – Parâmetros de avaliação da qualidade da evidência das revisões sistemáticas selecionadas. ....	133
Tabela 8 – Resultados da revisão sistemática conduzida por Balk e colaboradores (2007).....	134
Tabela 9 - Resultados da revisão sistemática conduzida por Althuis e colaboradores (2002).....	135

### Lista de Esquemas

Esquema 1 – Etapas de redução do oxigênio molecular (O <sub>2</sub> ) com formação de espécies intermediárias mais reativas até a formação de H <sub>2</sub> O. ....	
Esquema 2 - Reação de Fenton/Haber-Weiss de geração de radicais livres dependente de metais de transição. ....	
Esquema 3 - Reações de peroxidação lipídica em três fases: iniciação, propagação e terminação (adaptado de Hermes-Lima, 2004). ....	

Esquema 4 - Mecanismo de dano oxidativo ao DNA induzido via reação de Fenton com metais de transição (adaptado de Hermes-Lima, 2004).....	35
Esquema 5 - Reação do radical hidroxil com o captador de <i>spin</i> DMPO, formando o radical nitróxido DMPO/•OH e seu espectro de EPR característico. ....	61
Esquema 6 - Degradação oxidativa da 2-Desoxirribose e formação do cromógeno TBA <sub>2</sub> -MDA. ....	62
Esquema 7 - Hidroxilação do ácido tereftálico (TPA) pelo radical hidroxil produzindo 2-hidroxitereftalato. ....	64
Esquema 8 - Produção de ácido metanosulfínico a partir da reação do DMSO com radical hidroxil e sua quantificação como diazossulfona após reação com <i>Fast Blue BB</i> .....	65
Esquema 9 - Reação entre a proteína carbonilada e a 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (Cayman Chemical Company, 2011). ....	70

## Lista de Figuras

Figura 1 – Modelo de progressão de geração de EROs e indução de estresse levando a respostas adaptativas necessárias e essenciais e, em caso extremo, a danos irreversíveis a biomoléculas (adaptado de Hamanaka, et al., 2010).....	28
Figura 2 - Principais aldeídos formados durante a terminação da peroxidação lipídica. 33	
Figura 3 - Principais antioxidantes não enzimáticos de baixo peso molecular (adaptado de Hermes-Lima, 2004). ....	
Figura 4 - Contribuição dos alimentos para a ingestão diária de Cr(III) por habitantes da cidade do Rio de Janeiro. Fonte: Santos, et al., 2004. ....	45
Figura 5 - Estrutura do picolinato de cromo (CrIII). ....	52
Figura 6–Ensaio preliminares de determinação do tampão: variação da concentração dos tampões HEPES (A) e fosfato (K <sub>pi</sub> ) (B) em pH 7,2 utilizando a metodologia de degradação oxidativa da 2-desoxirribose. (■) Com adição de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; (□) Sem adição de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . <i>Condições experimentais:</i> 2-DR 5 mM; Cr(VI) 0,1 mM e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1 mM. N=6.....	59
Figura 7 - Estrutura química do vermelho de fenol (Yamaguchi, et al., 1997).....	66
Figura 8 - Demonstração visual da mudança de coloração do vermelho de fenol com o aumento da concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> entre 0μM e 100 μM. <i>Condições experimentais:</i> 140 mM NaCl, 10 mM K <sub>pi</sub> , pH 7,2, 0,28 mM (0,1 g/L) vermelho de fenol e 8,5 U/mL (50 μg/mL) HRPO.....	66

- Figura 9 - Espectro de absorção de solução contendo vermelho de fenol (20 mg/L) e HRPO (8,5 U/mL) na presença e ausência de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM), em pH 12,5 e pH 7,2. Os espectros de absorção referem-se a média de três leituras para cada condição. Leituras superiores a 1,0 de absorbância foram obtidas a partir da diluição da amostra. .... 67
- Figura 10 - Curva padrão do ensaio de oxidação do vermelho de fenol pela *Horseradish* peroxidase com concentrações conhecidas de peróxido de hidrogênio, na presença (■) e ausência (□) de dextrose 5,5 mM. *Condições experimentais*: 140 mM NaCl, 10 mM Kpi, pH 7,2, 0,28 mM (0,1 g/L) vermelho de fenol e 8,5 U/mL (50 µg/mL) HRPO. Leituras superiores a 1,0 de absorbância a 610 nm foram obtidas a partir da diluição 1:1 da amostra. A) Variação da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entre 0 µM e 100 µM. B) Destaque para variação da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na faixa entre 0 µM e 20 µM. N=4. ....
- Figura 11 - Sinal de formação do complexo DMPO/•OH em EPR após 30 minutos de incubação com Cr(III) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Condições experimentais*: Kpi 5 mM, pH 7,2; DMPO 50 mM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM; Cr(III) 2 mM. .... 73
- Figura 12 - Formação de MDA pela degradação oxidativa da 2-Desoxirribose entre 0 e 24 horas de incubação com Cr(III) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Condições experimentais*: KPi 5 mM, pH 7,2; 2-DR 5 mM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM; Cr(III) 0,1 mM. N=6. .... 75
- Figura 13 - Formação de MDA pela degradação oxidativa da 2-Desoxirribose entre 24 e 240 horas de incubação com Cr(III) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Condições experimentais*: KPi 5 mM, pH 7,2; 2-DR 5 mM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM; Cr(III) 0,1 mM. N=6. .... 75
- Figura 14 - Velocidade de formação de MDA pela degradação oxidativa da 2-Desoxirribose entre 1 e 240 horas de incubação com Cr(III) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. .... 76
- Figura 15 - Hidroxilação do ácido tereftálico (TPA) mediada por Cr(III) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por até 72 horas (3 dias) de incubação. *Condições experimentais*: KPi 5 mM, pH 7,2; TPA 3 mM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 ou 100 µM; Cr(III) 5 ou 10 µM. N=6. .... 77
- Figura 16 - Oxidação do DMSO mediada por Cr(III) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> até 240 minutos. *Condições experimentais*: Kpi 5 mM, pH 7,2; DMSO 5%; *Fast Blue* BB 3 mM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM; Cr(III) 1 mM. N=3. .... 78
- Figura 17 - Formação de DMPO/•OH mediada por Cr(III) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em EPR. *Condições experimentais*: KPi 5 mM, pH 7,2; DMPO 50 mM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM; Cr(III) 2 mM. .... 79
- Figura 18 - Cinética de formação de DMPO/•OH por Cr(III) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> obtidas por Tsou & Yang (1996) (esquerda) e Shi e colaboradores (1993) (direita). *Condições experimentais*: KPi 10 mM, pH 7,5; DMPO 60 mM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM; Cr(III) 1 mM. ....

- Figura 19 - Efeito da variação da concentração de  $H_2O_2$  na oxidação da 2-DR em meios contendo Cr(III) após 4 horas de incubação. *Condições experimentais*: Kpi 5 mM, pH 7,2; 2-DR 5 mM; Cr(III) 0,1 mM. N=6..... 82
- Figura 20 - Efeito da variação da concentração de Cr(III) na oxidação da 2-DR em meios contendo  $H_2O_2$  após 4 horas de incubação. *Condições experimentais*: Kpi 5 mM, pH 7,2; 2-DR 5 mM;  $H_2O_2$  1 mM. N=9. .... 83
- Figura 21 - (A) Efeito da concentração de  $H_2O_2$  (0 a 500  $\mu$ M) na degradação oxidativa da 2-DR em meio contendo Fe(II) 30  $\mu$ M. A produção de MDA na ausência de Fe(II), com 500  $\mu$ M de  $H_2O_2$ , foi de 0,41 nmol.ml<sup>-1</sup>. (B) Efeito da concentração de Fe(II) (0 a 90  $\mu$ M) na degradação oxidativa da 2-DR em meio contendo  $H_2O_2$  100  $\mu$ M. A produção de MDA obtida nos controles sem a adição de 2-DR não foi estatisticamente diferente da obtida na ausência de Fe(II), com 100  $\mu$ M de  $H_2O_2$ . *Condições experimentais*: 2-DR 5 mM; Kpi 5 mM. N=8-12. Resultados obtidos por Avellar e colaboradores (2004). (C) Efeito da concentração de  $H_2O_2$  (0 a 1000  $\mu$ M) na degradação oxidativa da 2-DR em meio contendo Fe(II) 50  $\mu$ M; (D) Efeito da concentração de Fe(II) (0 a 400  $\mu$ M) na degradação oxidativa da 2-DR em meio contendo  $H_2O_2$  500  $\mu$ M. *Condições experimentais*: 2-DR 5 mM; Kpi 10 mM. N=10. Resultados obtidos por Genaro-Mattos e colaboradores (2009)..... 83
- Figura 22 - Representação visual das condições experimentais com manipulação do tempo de incubação da 2-Desoxirribose em meio reacional contendo Cr(III) e  $H_2O_2$ ..... 85
- Figura 23 - Velocidade de formação de MDA do sistema Cr(III) +  $H_2O_2$  a partir da 2-DR mantida de forma contínua (●) ou adicionada posteriormente e mantida por 24 horas (■). *Condições experimentais*: KPi 5 mM, pH 7,2; 2-DR 5 mM;  $H_2O_2$  1 mM; Cr(III) 0,1 mM. N=6. .... 87
- Figura 24 - Efeito da adição de Chelex® na produção de MDA em meios contendo Cr(III) e  $H_2O_2$  após quatro horas de incubação. *Condições experimentais*: Kpi 5 mM, pH 7,2; 2-DR 5 mM;  $H_2O_2$  1 mM; Cr(III) 0,1 mM. N=6. .... 88
- Figura 25 - Efeito da adição de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos na reação entre Cr(III) e  $H_2O_2$  na oxidação da 2-DR. *Condições experimentais*: KPi 5 mM, pH 7,2; 2-DR 5 mM;  $H_2O_2$  1 mM; Cr(III) 0,1 mM; Catalase 1000 U.ml<sup>-1</sup>; Superóxido dismutase 500 U.ml<sup>-1</sup>; Tiouréia 5 mM. N=6..... 90
- Figura 26 - Efeito da variação da concentração de Fe(II) no decaimento da concentração de  $H_2O_2$  em 10 minutos de incubação. *Condições experimentais*: Kpi 5 mM, pH 7,2;  $H_2O_2$  0,5 mM; Fe(II) entre 0 e 1 mM. N=6. .... 92
- Figura 27 - Efeito da variação da concentração de Cr(III) na concentração de  $H_2O_2$  em diferentes tempos de incubação. *Condições experimentais*: Kpi 5 mM, pH 7,2;  $H_2O_2$  0,5 mM; Cr(III) entre 0 e 1 mM. N=8. .... 93

- Figura 28 - Efeito do tempo no decaimento da concentração de  $H_2O_2$  em diferentes concentrações de Cr(III). *Condições experimentais*: KPi 5 mM, pH 7,2;  $H_2O_2$  0,5 mM; Cr(III) entre 0 e 1 mM. N=8. .... 93
- Figura 29 – Efeito de Fe(II) e Cr(III) na produção de proteínas carboniladas após 10 minutos de incubação a partir de albumina sérica bovina (BSA). *Condições experimentais*: KPi 5 mM, pH 7,2; BSA 1 mg.ml<sup>-1</sup> (15 μM);  $H_2O_2$  1 mM; Fe(II) 0,1 mM; Cr(III) 0,1 mM. N=3. Colunas pretas referem-se aos pontos experimentais conduzidos na presença de  $H_2O_2$ . Colunas hachuradas referem-se aos pontos conduzidos na ausência de  $H_2O_2$ . Coluna branca refere-se ao controle conduzido com BSA pura em meio tamponado. Letras diferentes referem-se a resultados estatisticamente diferentes com  $p < 0,05$ . Resultados expressos em concentração de proteínas carboniladas (nmol) por quantidade de proteína total (mg)..... 96
- Figura 30 - Efeito de Fe(II) e Cr(III) na produção de proteínas carboniladas após 4 horas de incubação a partir de albumina sérica bovina (BSA). *Condições experimentais*: KPi 5 mM, pH 7,2; BSA 1 mg.ml<sup>-1</sup> (15 μM);  $H_2O_2$  1 mM; Fe(II) 0,1 mM; Cr(III) 0,1 mM. N=3. Colunas pretas referem-se aos pontos experimentais conduzidos na presença de  $H_2O_2$ . Colunas hachuradas referem-se aos pontos conduzidos na ausência de  $H_2O_2$ . Coluna branca refere-se ao controle conduzido com BSA pura em meio tamponado. Letras diferentes referem-se a resultados estatisticamente diferentes com  $p < 0,05$ . Resultados expressos em concentração de proteínas carboniladas (nmol) por quantidade de proteína total (mg)..... 96
- Figura 31 - Efeito de Fe(II) e Cr(III) na produção de proteínas carboniladas após 10 minutos de incubação a partir de β-lactoglobulina. *Condições experimentais*: KPi 5 mM, pH 7,2; β-lactoglobulina 1 mg.ml<sup>-1</sup> (0,54 μM);  $H_2O_2$  1 mM; Fe(II) 0,1 mM; Cr(III) 0,1 mM. N=3. Colunas pretas referem-se aos pontos experimentais conduzidos na presença de  $H_2O_2$ . Colunas hachuradas referem-se aos pontos conduzidos na ausência de  $H_2O_2$ . Coluna branca refere-se ao controle conduzido com β-lactoglobulina pura em meio tamponado. Letras diferentes referem-se a resultados estatisticamente diferentes com  $p < 0,05$ . Resultados expressos em concentração de proteínas carboniladas (nmol) por quantidade de proteína total (mg). .... 97
- Figura 32 - Sinal de formação do complexo DMPO/•OH em EPR após 30 minutos de incubação com Cr(VI) e  $H_2O_2$ . *Condições experimentais*: Kpi 5 mM, pH 7,2; DMPO 50 mM;  $H_2O_2$  10 mM; Cr(VI) 2 mM. .... 100
- Figura 33 - Formação de MDA pela degradação oxidativa da 2-Desoxirribose após incubação com Cr(VI) por 10 minutos e 4 horas. *Condições experimentais*: KPi 5 mM, pH 7,2; 2-DR 5 mM;  $H_2O_2$  1 mM; Cr(VI) 0,1 mM. N=6. .... 101

- Figura 34 - Formação de DMPO/•OH mediada por Cr(VI) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em EPR. *Condições experimentais:* KPi 5 mM, pH 7,2; DMPO 50 mM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM; Cr(VI) 2 mM. .... 102
- Figura 35 - Efeito da variação da concentração de Cr(VI) na oxidação da 2-DR em meios contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em 10 minutos de incubação. *Condições experimentais:* Kpi 5 mM, pH 7,2; 2-DR 5 mM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM. N=9. .... 104
- Figura 36 - Efeito da variação da concentração de Cr(VI) na formação de DMPO/•OH em meio contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em EPR. *Condições experimentais:* KPi 5 mM, pH 7,2; DMPO 50 mM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM. N=3-6. .... 104
- Figura 37 - Efeito da variação da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na oxidação da 2-DR em meios contendo Cr(VI) após 10 minutos de incubação. *Condições experimentais:* Kpi 5 mM, pH 7,2; 2-DR 5 mM; Cr(VI) 0,1 mM. N=6. .... 105
- Figura 38 - Efeito da variação da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na formação de DMPO/•OH mediada por Cr(VI) em EPR. *Condições experimentais:* KPi 5 mM, pH 7,2; DMPO 50 mM; Cr(VI) 2 mM. N=3-6. .... 106
- Figura 39 - Efeito da variação da concentração de Cr(VI) na concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em diferentes tempos de incubação. *Condições experimentais:* Kpi 5 mM, pH 7,2; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM; Cr(VI) entre 0 e 1 mM. N=6. .... 107
- Figura 40 - Efeito da adição de Chelex® na produção de MDA em meios contendo Cr(VI) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> após 10 minutos de incubação. *Condições experimentais:* Kpi 5 mM, pH 7,2; 2-DR 5 mM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM; Cr(VI) 0,1 mM. N=6. .... 109
- Figura 41 - Efeito de Fe(II) e Cr(VI) na produção de proteínas carboniladas após 10 minutos de incubação a partir de albumina sérica bovina (BSA). *Condições experimentais:* KPi 5 mM, pH 7,2; BSA 1 mg.ml<sup>-1</sup> (15 μM); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM; Fe(II) 0,1 mM; Cr(VI) 0,1 mM. N=3. Colunas pretas referem-se aos pontos experimentais conduzidos na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Colunas hachuradas referem-se aos pontos conduzidos na ausência de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Coluna branca refere-se ao controle conduzido com BSA pura em meio tamponado. Letras diferentes referem-se a resultados estatisticamente diferentes com p < 0,005. Resultados expressos em concentração de proteínas carboniladas (nmol) por quantidade de proteína total (mg). .... 110
- Figura 42 - Efeito de Fe(II) e Cr(VI) na produção de proteínas carboniladas após 10 minutos de incubação a partir de β-lactoglobulina. *Condições experimentais:* KPi 5 mM, pH 7,2; β-lactoglobulina 1 mg.ml<sup>-1</sup> (0,54 μM); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM; Fe(II) 0,1 mM; Cr(VI) 0,1 mM. N=3. Colunas pretas referem-se aos pontos experimentais conduzidos na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Colunas hachuradas referem-se aos pontos conduzidos na ausência de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Coluna branca refere-se ao controle conduzido com β-lactoglobulina pura em meio tamponado. Letras diferentes referem-se a resultados estatisticamente diferentes com p < 0,05. Resultados

- expressos em concentração de proteínas carboniladas (nmol) por quantidade de proteína total (mg). ..... 111
- Figura 43 - Efeito da concentração de Cr(VI) na produção de proteínas carboniladas após 10 minutos de incubação a partir de albumina sérica bovina. *Condições experimentais:* KPi 5 mM, pH 7,2; BSA 1 mg.ml<sup>-1</sup> (15 μM); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM. N=5. Colunas pretas referem-se aos pontos experimentais conduzidos na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Colunas hachuradas referem-se aos pontos conduzidos na ausência de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Coluna branca refere-se ao controle conduzido com BSA pura em meio tamponado. Coluna com símbolo (\*) refere-se a um resultado estatisticamente diferente do par correspondente, com p<0,05. Resultados expressos em concentração de proteínas carboniladas (nmol) por quantidade de proteína total (mg)..... 112
- Figura 44 – Efeito da adição de Cr(III) e Cr(VI) no mesmo meio reacional na oxidação da 2-DR após 10 minutos de incubação em comparação com os danos individuais. *Condições experimentais:* Kpi 5 mM, pH 7,2; 2-DR 5 mM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM; Cr(III) 0,1 mM; Cr(VI) 0,1 mM. N=6. .... 115
- Figura 45 - Efeito da adição de Cr(III) e Cr(VI) no mesmo meio reacional na oxidação da 2-DR após 4 horas de incubação em comparação com os danos individuais. *Condições experimentais:* Kpi 5 mM, pH 7,2; 2-DR 5 mM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM; Cr(III) 0,1 mM; Cr(VI) 0,1 mM. N=9..... 116
- Figura 46 - Efeito da variação da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na oxidação da 2-DR em meios contendo Cr(III) após 10 minutos de incubação. *Condições experimentais:* Kpi 5 mM pH 7,2; 2-DR 5 mM; Cr(III) 0,1 mM. N=6. (\*) p < 0,001 em relação ao controle. (\*\*) p < 0,005 em relação ao controle. .... 136
- Figura 47 - Efeito da variação da concentração de Cr(III) na oxidação da 2-DR em meios contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> após 10 minutos de incubação. *Condições experimentais:* Kpi 5 mM pH 7,2; 2-DR 5 mM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM. N=9. (\*) p < 0,05 em relação às concentrações anteriores. .... 137
- Figura 48 - Efeito de Fe(II) e Cr(VI) na produção de proteínas carboniladas após 4 horas de incubação a partir de albumina sérica bovina (BSA). *Condições experimentais:* KPi 5 mM, pH 7,2; BSA 1 mg.ml<sup>-1</sup> (1,5 mM); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM; Fe(II) 0,1 mM; Cr(VI) 0,1 mM. N=3. Colunas pretas referem-se aos pontos experimentais conduzidos na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Colunas hachuradas referem-se aos pontos conduzidos na ausência de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Coluna branca refere-se ao controle conduzido com BSA pura em meio tamponado. Letras diferentes referem-se a resultados estatisticamente diferentes com p < 0,01. Resultados expressos em concentração de proteínas carboniladas (nmol) por quantidade de proteína total (mg)..... 138
- Figura 49 - Efeito da adição de Cr(III) e Cr(VI) no mesmo meio reacional na oxidação da 2-DR após 10 minutos de incubação em comparação com os danos

individuais. *Condições experimentais:* Kpi 5 mM, pH 7,2; 2-DR 5 mM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM; Cr(III) 0,05 mM; Cr(VI) 0,05 mM. N=6. .... 139

Figura 50-Efeito da adição de Cr(III) e Cr(VI) no mesmo meio reacional na oxidação da 2-DR após 10 minutos de incubação em comparação com os danos individuais. *Condições experimentais:* Kpi 5 mM, pH 7,2; 2-DR 5 mM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM; Cr(III) 0,05 mM; Cr(VI) 0,05 mM. N=6. .... 139

## RESUMO

---

Íons trivalente (3+) e hexavalente (6+) são os estados de oxidação mais estáveis do metal de transição cromo. Enquanto a forma  $\text{Cr}^{3+}$  é um micronutriente essencial para a adequada regulação da homeostase glicêmica,  $\text{Cr}^{6+}$  é reconhecidamente tóxico e carcinogênico. Estudos prévios tem indicado, entretanto, que ambas espécies de cromo podem ter em comum uma expressiva capacidade em gerar espécies reativas de oxigênio (EROs). Assim, procurou-se aprofundar o estudo da formação de EROs a partir da interação entre íons cromo e  $\text{H}_2\text{O}_2$  *in vitro* e as características dessa produção, a fim de contribuir com a discussão dos mecanismos químicos desse processo. Além disso, o efeito oxidativo em proteínas isoladas (albumina sérica bovina e  $\beta$ -lactoglobulina) também foi estudado. A presença de radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ) após incubação de  $\text{Cr}^{3+}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi identificada de forma direta em EPR com a formação característica do aduto DMPO/ $\bullet\text{OH}$ , e reiterada com os resultados de degradação oxidativa da 2-desoxirribose (2-DR), hidroxilação do ácido tereftálico (TPA) e oxidação de dimetilsulfóxido (DMSO). A formação de  $\bullet\text{OH}$  por  $\text{Cr}^{3+}$  mostrou-se dependente do tempo de incubação, com produção contínua por 10 dias no experimento de oxidação de 2-DR em temperatura ambiente ( $\text{Cr}^{3+}$  0,1 mM,  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM, 2-DR 5 mM, tampão fosfato 5 mM, pH 7,2). Foi descartada experimentalmente uma influência significativa da própria 2-DR ou de metais contaminantes durante essa produção contínua. A concentração de  $\text{Cr}^{3+}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  manteve relação direta com a formação de  $\bullet\text{OH}$  e é sugerido uma produção concomitante de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante a formação de  $\bullet\text{OH}$ , num processo de “reciclagem” de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Ocorre porém a decomposição espontânea dos níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ao longo do tempo. Não foi observada produção significativa de proteínas carboniladas a partir da oxidação de albumina ou  $\beta$ -lactoglobulina induzida por  $\text{Cr}^{3+}$  0,1 mM, mesmo na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . O cromo hexavalente também mostrou-se capaz de gerar  $\bullet\text{OH}$ , sendo neste caso um processo extremamente rápido (inferior a 10 min, possivelmente de segundos). A concentração de  $\text{Cr}^{6+}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  também influencia diretamente a produção de  $\bullet\text{OH}$ , sem interferência significativa de metais contaminantes, e da mesma forma sugere-se um mecanismo de reciclagem de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A oxidação de proteínas por  $\text{Cr}^{6+}$  foi significativa e mostrou-se independente da adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Os resultados sugerem ainda que os mecanismos de geração de  $\bullet\text{OH}$  mediados por  $\text{Cr}^{3+}$  e/ou  $\text{Cr}^{6+}$  sejam independentes e que não há oxidação/redução até a outra forma mais estável do metal. Os mecanismos sugeridos compreendem a formação de  $\bullet\text{OH}$  a partir de reação similar ao Fenton “clássico”, envolvendo as formas  $\text{Cr}^{3+}$  e  $\text{Cr}^{6+}$  e compostos intermediários (possivelmente radical superóxido e  $\text{O}_2$ ) em interação com o  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Dessa forma, atribui-se mais peso a evidência da capacidade tóxica do  $\text{Cr}^{6+}$  e alerta quanto a utilização terapêutica do  $\text{Cr}^{3+}$ , especialmente de forma crônica.

**Palavras-chave:** cromo trivalente; cromo hexavalente; estresse oxidativo; radical hidroxil; reação de Fenton.

## ABSTRACT

---

Trivalent (3+) and hexavalent (6+) ions are the most stable forms of the transition metal chromium. Whereas  $\text{Cr}^{3+}$  is an essential nutrient for the accurate regulation of glycaemia homeostasis,  $\text{Cr}^{6+}$  is acknowledged as toxic and carcinogenic. Previous studies have indicated that both chromium species might have in common a significant ability of generating reactive oxygen species (ROS). Thus, we sought to deepen the study of the formation of ROS from the interaction between chromium and  $\text{H}_2\text{O}_2$  in vitro and the characteristics of this production, in order to contribute to the discussion of the chemical mechanisms of this process. Moreover, the oxidative effect in isolated proteins (bovine serum albumin and  $\beta$ -lactoglobulin) is also presented. The presence of hydroxyl radical after incubation of  $\text{Cr}^{3+}$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  was directly identified on EPR by the characteristic adduct DMPO/ $\bullet\text{OH}$ , and confirmed with results from oxidative degradation of 2-deoxyribose (2-DR), hydroxylation of terephthalic acid (TPA) and oxidation of dimethylsulfoxide (DMSO). The formation of OH-radical by  $\text{Cr}^{3+}$  was dependent on incubation time, with persistent production even after 10 days on the experiment with 2-DR at room temperature (0.1 mM  $\text{Cr}^{3+}$ , 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 5 mM 2-DR, 5 mM phosphate buffer, pH 7.2). It was experimentally ruled out a significant influence of 2-DR or contaminant metals during the continuous production of OH-radical. Concentration of  $\text{Cr}^{3+}$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  was directly related with OH-radical formation and it is suggested a production of  $\text{H}_2\text{O}_2$  during free radical production, in a  $\text{H}_2\text{O}_2$  “recycle” process. Spontaneous decay of  $\text{H}_2\text{O}_2$  do occurs over time. It was not observed significant production of carbonyl protein from the oxidation of albumin and  $\beta$ -lactoglobulin induced by 0.1 mM  $\text{Cr}^{3+}$ , even in the presence of  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Hexavalent chromium also proved capable of generating OH-radical, but extremely rapid (less than 10 min, possibly seconds). Concentration of  $\text{Cr}^{6+}$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  also directly influenced the production of OH-radical, without significant interference of contaminant metals, and similarly it is suggested a mechanism with  $\text{H}_2\text{O}_2$  recycle. Oxidation of proteins was significant by  $\text{Cr}^{6+}$  and it was independent on the addition of  $\text{H}_2\text{O}_2$ . The results suggest the mechanisms of generation of OH-radical mediated by  $\text{Cr}^{3+}$  and/or  $\text{Cr}^{6+}$  are independent and there is no oxidation / reduction to the other stable form of the metal. The suggested mechanisms of OH-radical formation is similar to the “classic” Fenton reaction, involving  $\text{Cr}^{3+}$  and  $\text{Cr}^{6+}$  forms and its intermediate compounds (possibly superoxide radical and  $\text{O}_2$ ) in interaction with  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Thus, more weight is assign to the evidence of the toxic ability of  $\text{Cr}^{6+}$  and warning about the therapeutic use of  $\text{Cr}^{3+}$ , especially in a chronic routine.

**Keywords:** trivalent chromium; hexavalent chromium; oxidative stress; hydroxyl radical; Fenton reaction.

## INTRODUÇÃO

---

Cromo é um elemento químico encontrado em múltiplas valências, com diferenças marcantes entre elas. Os dois estados mais estáveis são cromo trivalente - Cr(III) e cromo hexavalente - Cr(VI). É amplamente conhecido na literatura que Cr(VI) pode gerar efeitos deletérios à saúde, sendo reportado como tóxico e indutor de diversos tipos de câncer. Entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos químicos dessa toxicidade e se a forma Cr(III) também é capaz de gerar os mesmos efeitos (Bagchi, et al., 2002).

Sabe-se que Cr(III) é um micronutriente essencial na alimentação humana por auxiliar a manutenção da glicemia em condições de resistência a insulina. Esse micronutriente seria responsável por aumentar a translocação de transportadores de glicose Glut4 na membrana plasmática, melhorando sua captação (Hummel, et al., 2007); (Hua, et al., 2012). A quantidade de cromo nos alimentos, entretanto, sofre grande variabilidade, sendo influenciada pelo modo de produção e processamento dos produtos. As maiores fontes seriam carnes, laticínios e preparações feitas com trigo integral e açúcar mascavo (Institute of Medicine, 2001); (Stoecker, 2007).

Estudos em diversos países apontam uma média de ingestão de cromo de 65 µg/dia. Baseado na ingestão de indivíduos saudáveis e com boa alimentação, o Instituto de Medicina americano estabeleceu o parâmetro de 35 µg/dia para homens e 25 µg/dia para mulheres adultos jovens em termos de Ingestão Adequada (AI – *Adequate Intakes*) (Institute of Medicine, 2001).

Os benefícios da suplementação de Cr(III), tanto em indivíduos saudáveis quanto com *Diabetes Mellitus* e resistência a insulina, apesar de alegados por muitos, ainda não foram comprovados, com doses que vão até 1 mg/dia (Balk, et al., 2007); (Althuis, et al., 2002); (Hua, et al., 2012). Por outro lado, a partir da década de noventa foram sugeridos efeitos tóxicos ao Cr(III), podendo inclusive ligar-se diretamente ao DNA ou promover ligações cruzadas DNA-DNA, interferindo em sua replicação (Bagchi, et al., 2002); (Figgitt, et al., 2010).

Um dos possíveis aspectos relacionados a essa toxicidade seria a capacidade de íons cromo em gerar radicais livres, tanto por meio da forma Cr(III) quanto da forma Cr(VI) (Bagchi, et al., 2002); (Shi, et al., 1993); (Tsou & Yang, 1996).

As características dos radicais livres conferem a esses um alto poder reativo, o que é indispensável como parte de processos essenciais a vida, mas também é o causador de danos irreversíveis a biomoléculas, como destruição de membranas biológicas, alterações de função e atividade enzimática, mutações genéticas e outros processos, em um estado de estresse oxidativo (Hamanaka, et al., 2010); (Lushchak, 2011); (Pamplona, et al., 2011). Essas alterações estão comumente associadas aos processos carcinogênicos e de envelhecimento, além de doenças cardiovasculares, Alzheimer e Parkinson, entre outras (Radak, et al., 2011).

O radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ), espécie com maior poder oxidativo em sistemas biológicos, é formado principalmente a partir da reação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  com metais de transição, via reação de Fenton. Os principais metais catalisadores são ferro e cobre, mas o cromo compõe o mesmo grupo (Freinbichler, et al., 2011).

Diante desse cenário, justificam-se e fazem-se imprescindíveis iniciativas que se voltem ao estudo aprofundado dos possíveis efeitos do cromo na saúde humana, em especial sua capacidade oxidativa e de geração de radicais livres (Stoecker, 2007).

### Radicais livres e Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

O ponto de partida para o estudo desenvolvido nesse trabalho está na compreensão e preocupação com os radicais livres, sua definição, formas de geração, possíveis danos e benefícios, defesas orgânicas e a possível relação que um micronutriente essencial, o cromo, poderia ter nesse processo. Assim, inicialmente vimos definir um radical livre como qualquer espécie capaz de manter existência independente possuindo um ou mais elétrons desemparelhados em sua camada de valência, sendo o elétron desemparelhado aquele que ocupa sozinho um orbital atômico ou molecular (Halliwell, et al., 2007). Os radicais livres são representados por um ponto (•) ao lado de sua fórmula química.

A presença de elétrons desemparelhados confere a eles um alto poder reativo e o fato de serem atraídos por um campo magnético, ou seja, de serem paramagnéticos<sup>1</sup>. Entretanto, existem outras espécies reativas, mas não radicalares e igualmente importantes, como o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), o ácido hipocloroso (HClO), o oxigênio singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub> - estado excitado do oxigênio molecular) e peróxidos orgânicos derivados de lipídios ou de poluentes e medicamentos, os quais tomados como um conjunto são chamados de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Tabela 1) (Augusto, 2006); (Hermes-Lima, 2004).

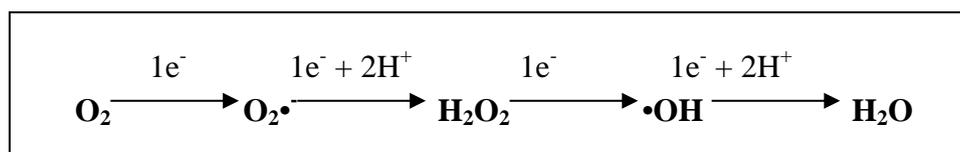
Tabela 1 - Espécies reativas de oxigênio (EROs) (Halliwell, et al., 2007)

Radicalares	Não-radicalares
Superóxido (O <sub>2</sub> •)	Peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )
Hidroxil (•OH)	Oxigênio singlete ( <sup>1</sup> O <sub>2</sub> )
Peroxil (ROO•)	Ozônio (O <sub>3</sub> )
Alcoxil (RO•)	Ácido hipocloroso (HClO)

---

<sup>1</sup> A característica de paramagnetismo dos radicais livres possibilitou o desenvolvimento de uma metodologia de identificação direta de sua geração por meio da Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR, do inglês *Electron Paramagnetic Resonance*), utilizada nesse trabalho e explicada em detalhes na seção Métodos.

O oxigênio molecular é um radical livre, pois possui dois elétrons desemparelhados em diferentes orbitais  $\pi$  anti-ligantes, mas é pouco reativo. Esses elétrons, entretanto, apresentam spins paralelos ( $\uparrow\uparrow$ ), o que determina que receba apenas um elétron por vez (e não um par). Esse processo, apresentado no Esquema 1, promove a geração de espécies intermediárias de oxigênio com maior reatividade e responsáveis pelos efeitos tóxicos provocados pelo oxigênio em organismos vivos, até a formação de  $\text{H}_2\text{O}$  (Freinbichler, et al., 2011); (Halliwell, et al., 2007).



Esquema 1 – Etapas de redução do oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ) com formação de espécies intermediárias mais reativas até a formação de  $\text{H}_2\text{O}$ .

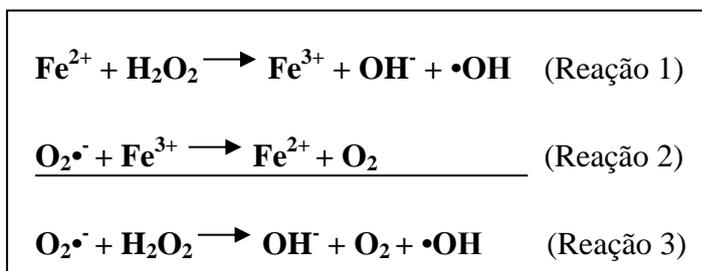
Os radicais livres podem ser formados pela perda ou ganho de um elétron por um elemento não radicalar (Equações 01 e 02) ou por fissão homolítica quando a quebra de uma ligação covalente resulta em cada elemento com um dos elétrons compartilhados (Equação 03). Neste caso há a necessidade de uma grande quantidade de energia, provida por calor, radiação eletromagnética e outros. É o caso da homólise da água, com formação de radical hidrogênio ( $\text{H}\cdot$ ) e radical hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ) (Hermes-Lima, 2004).



Outro importante mecanismo de formação de radicais livres é a partir de metais de transição (Freinbichler, et al., 2011). De fato, pela definição inicial, quase todos esses elementos, localizados na primeira linha do bloco D da tabela periódica, contém elétrons desemparelhados e podem em si ser classificados como radicais livres,

com a exceção do zinco. Nesse caso também seus importantes efeitos biológicos envolvem sua grande capacidade redox, de doar e receber elétrons. Fazem parte desse grupo: escândio (Sc), titânio (Ti), vanádio (V), cromo (Cr), manganês (Mn), ferro (Fe), cobalto (Co), níquel (Ni) e cobre (Cu) (Halliwell, et al., 2007).

O radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ), espécie com maior poder oxidativo em sistemas biológicos, é formado principalmente a partir da reação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  com alguns desses metais, notadamente ferro e cobre, via reação de Fenton (Reação 1), ou pela reação do radical superóxido ( $\text{O}_2\bullet^-$ ) com  $\text{H}_2\text{O}_2$  na presença de ferro, pela reação de Haber-Weiss (Freinbichler, et al., 2011); (Pamplona, et al., 2011). Classicamente essas reações são apresentadas de forma acoplada conforme o Esquema 2.



Esquema 2 - Reação de Fenton/Haber-Weiss de geração de radicais livres dependente de metais de transição.

A relevância biológica do radical hidroxil está em sua capacidade de reagir com todas as biomoléculas encontradas em organismos vivos: carboidratos, aminoácidos, lipídios e DNA, além de poder reagir com quase todos os tipos de moléculas, com constantes de reação que variam, em geral, entre  $10^9$  e  $10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (Tabela 2). Assim, sua capacidade reativa depende apenas da taxa de difusão do meio, reagindo de forma indiscriminada com a primeira molécula que encontrar em seu sítio de formação (Halliwell, et al., 2007).

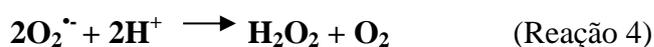
Tabela 2 - Constantes de reação do radical hidroxil (Halliwell, et al., 2007)

Molécula	Constante de reação ( $\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )
Adenina	$3,0 \times 10^9$
Adenosina	$2,5 \times 10^9$
Albumina plasmática	Maior que $10^{10}$
Citosina	$2,9 \times 10^9$
Desoxirribose	$3,1 \times 10^9$
DMSO	$3,5 \times 10^9$

<b>Etanol</b>	$7,2 \times 10^8$
<b>Fe<sup>2+</sup></b>	$3,5 \times 10^8$
<b>Fenilalanina</b>	$3,5 \times 10^9$
<b>Glicose</b>	$1,0 \times 10^9$
<b>Guanina</b>	$1,0 \times 10^{10}$
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	$4,5 \times 10^7$
<b>HEPES</b>	$5,1 \times 10^9$
<b>Metionina</b>	$5,1 \times 10^9$
<b>Ribose</b>	$1,2 \times 10^9$
<b>Timina</b>	$3,1 \times 10^9$
<b>Tiuréia</b>	$4,7 \times 10^9$
<b>Triptofano</b>	$8,5 \times 10^9$

Além disso, sua formação é facilitada pela disponibilidade dos reagentes necessários no meio celular. O radical superóxido é formado principalmente a partir da redução incompleta do oxigênio molecular pela respiração mitocondrial a partir de cerca de 0,15 % a 2,0 % do O<sub>2</sub> consumido. Sua reatividade é seletiva, o que confere a ele a capacidade de difundir-se com mais facilidade no meio celular (Hamanaka, et al., 2010).

Após formado, a dismutação<sup>2</sup> do O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ainda no ambiente mitocondrial ou no citosol é a principal fonte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vivo* (Reação 4), seja de forma espontânea, com constante de reação de  $4,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , ou catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD), passando para  $1,6 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . A baixa reatividade e alta estabilidade do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> também facilitam sua difusão através das membranas biológicas, podendo mover-se pelos demais compartimentos celulares (Hamanaka, et al., 2010); (Pamplona, et al., 2011).



Assim, a formação de radical hidroxil é finalmente garantida pela presença abundante dos íons de metais de transição no organismo. Os íons metálicos são adquiridos fundamentalmente por meio da dieta, em especial os micronutrientes ferro, cobre, e cromo, e constituem os sítios funcionais de diversas proteínas e enzimas. São exemplos a ligação do ferro à hemoglobina e ferritina e do cobre à superóxido

<sup>2</sup>Dismutação é um tipo de reação em que dois radicais livres iguais reagem formando produtos não radiculares (Hermes-Lima, 2004).

dismutase, deixados disponíveis em diversas situações (como inflamação), além de estarem ligados diretamente ao DNA (Hermes-Lima, 2004).

## **Efeitos biológicos dos radicais livres**

Espécies reativas são produzidas continuamente em sistemas biológicos, seja por processos endógenos ou a partir da exposição a fatores externos, como radiação, drogas e poluentes, e ainda de forma deliberada ou acidental. Apesar de reconhecido tardiamente (final dos anos 1990), o poder reativo dos radicais livres e EROs é utilizado pelo organismo em processos fisiológicos e essenciais a vida (Hawkins, et al., 2009); (Hamanaka, et al., 2010); (Radak, et al., 2011); (Lushchak, 2011); (Pamplona, et al., 2011).

Neutrófilos e macrófagos são especializados em gerar quantidades maciças de radical superóxido,  $H_2O_2$  e ácido hipocloroso com finalidade microbicida durante o processo de fagocitose de microrganismos invasores (Kryston, et al., 2011). A hidroxilação de xenobióticos (compostos exógenos, como poluentes, medicamentos e drogas) pelo oxigênio molecular auxilia no processo de detoxificação no sistema do citocromo P450, tornando-os mais solúveis em água, facilitando sua excreção. O óxido nítrico ( $NO^*$ ), uma espécie reativa de nitrogênio, é um mensageiro celular liberado pelas células endoteliais com ação vasodilatadora nas paredes internas dos vasos sanguíneos, sendo responsável pelo controle da pressão arterial (Radak, et al., 2011).

A ação dos EROs como sinalizadores celulares também imprime uma ação protetora, como uma resposta adaptativa ao estresse (Pamplona, et al., 2011); (Radak, et al., 2011). O conceito de hormese pode ser aplicado aos EROs como uma dose de estresse não letal, mas capaz de induzir respostas adaptativas e efeitos benéficos ao organismo (Hamanaka, et al., 2010). Assim, quando exposto a um estresse suave, como o exercício físico moderado, o organismo promove uma resposta adaptativa baseada na transdução de sinal para um aumento da expressão de proteínas antioxidantes e outras proteínas de defesa, tornando os sistemas de reparo mais eficientes a insultos maiores futuros.

De acordo com o modelo proposto por Hamanaka e colaboradores (2010) (Figura 1), a presença de EROs em níveis adequados no ambiente mitocondrial é

essencial para certos desfechos biológicos. Níveis baixos seriam necessários em processos celulares de proliferação e diferenciação. Um aumento discreto levaria a programações adaptativas que incluem a regulação transcricional de genes antioxidantes. Níveis maiores podem iniciar o processo de senescência e apoptose celular. Apenas condições de extrema geração de EROs seriam capazes de gerar danos irreversíveis a biomoléculas, como destruição de membranas biológicas, alterações de funções e atuação enzimática, mutações genéticas e outros processos, em um estado de estresse oxidativo (Hamanaka, et al., 2010); (Radak, et al., 2011).

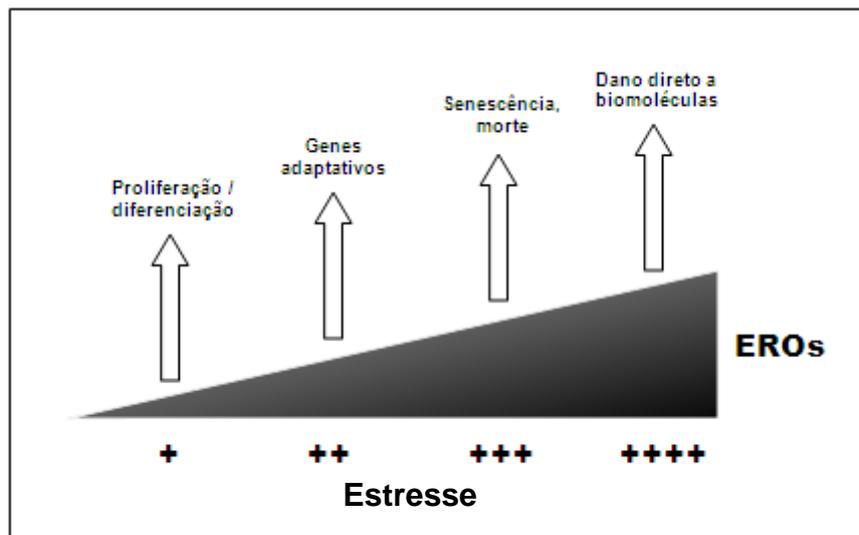


Figura 1 – Modelo de progressão de geração de EROs e indução de estresse levando a respostas adaptativas necessárias e essenciais e, em caso extremo, a danos irreversíveis a biomoléculas (adaptado de Hamanaka, et al., 2010).

Pamplona e colaboradores (2011) ressaltam ainda que o estresse oxidativo poderia representar a pressão universal para a evolução da vida, um modulador do desenvolvimento fenotípico e ainda um correlativo fisiológico da diferença do comportamento entre os indivíduos. Assim, o estresse oxidativo tem funcionado como uma importante pressão seletiva, motivo pelo qual o reino animal desenvolveu um vasto e complexo sistema de regulação e ajuste do balanço redox (Pamplona, et al., 2011); (Radak, et al., 2011).

## **i. Proteínas**

Proteínas são alvo fácil ao dano oxidativo devido a sua abundância nos sistemas biológicos, constituindo cerca de 70 % da composição celular, além de presentes no plasma e na maioria dos tecidos (Hawkins, et al., 2009). A oxidação protéica promove perda de importantes receptores, enzimas, transdutores de sinal, proteínas transportadoras, entre outros, e ainda contribui com dano secundário a outras biomoléculas (Radak, et al., 2011).

Os produtos protéicos oxidados podem ser reconhecidos como antígenos pelo sistema imunológico, ativando a formação de anticorpos e possível reação autoimune; o dano a enzimas reparadoras do DNA, como endonucleases e ligases, pode aumentar a taxa de DNA oxidado e a frequência de mutações. Danos a polimerases do DNA podem implicar na diminuição da fidelidade no momento da replicação (Freinbichler, et al., 2011).

Um exemplo dos possíveis efeitos que os produtos da oxidação de proteínas estão relacionados é a recente proposição com a doença de Alzheimer, a partir da acumulação de agregados beta-amilóides. A oxidação causada por EROs modifica a estrutura primária da proteína e pode ter efeitos significativos também na secundária e terciária. Tais modificações podem, assim, ser reconhecidas pelos sistemas proteolíticos intracelulares, podendo levar ao aumento da degradação protéica e sua acumulação na forma desses agregados (Shrivastava, et al., 2000).

A ligação de proteínas a íons metálicos, especialmente ferro e cobre, e a subsequente exposição a  $H_2O_2$ , gera radical hidroxil, que reage seletivamente com resíduos de aminoácidos no local da ligação, especialmente os de arginina, prolina e lisina (Hawkins, et al., 2009). Quando uma proteína sofre dano, é comumente marcada pelo sistema proteolítico de degradação e conseqüente remoção, aumentando, desse modo, o *turnover* protéico de células expostas a estresse oxidativo. A oxidação de resíduos de metionina, entretanto, pode ser revertida mediante atuação da enzima metionina sulfóxido redutase (Radak, et al., 2011).

A oxidação de resíduos de lisina, arginina, prolina e treonina gera derivados carbonilados, com aumento exponencial com o envelhecimento natural, assim como em diversas patologias, como artrite reumatóide, fibrose cística, lúpus eritematoso sistêmico e diabetes. Dessa forma, devido a sua facilidade de detecção e associação com

essas patologias, as proteínas carboniladas são comumente utilizadas com marcadores de estresse oxidativo em proteínas (Radak, et al., 2011)<sup>3</sup>.

A oxidação de proteínas (e formação de proteínas carboniladas) pode ocorrer por ataque direto de EROs ou por danos secundários envolvendo produtos da peroxidação lipídica, como o malonildialdeído (MDA) e o 4-hidroxinonenal (HNE), e por reações de glicação (Hawkins, et al., 2009); (Moskovitz, et al., 2010).

## ii. Lipídios

O processo de peroxidação lipídica, muito estudado pela indústria alimentícia para o controle da rancificação de óleos e gorduras, é também de elevada importância para a biologia e medicina, uma vez que é considerada a maior causa de dano e morte celular em organismos vivos. Seus danos causados a membranas biológicas podem variar de alteração de fluidez até ruptura da bicamada lipídica, alteração do fluxo de cálcio no citoplasma pelos danos a membrana do retículo endoplasmático e sarcoplasmático e, caso a membrana alvo seja a mitocondrial, pode haver alterações na respiração celular e produção de ATP (Radak, et al., 2011).

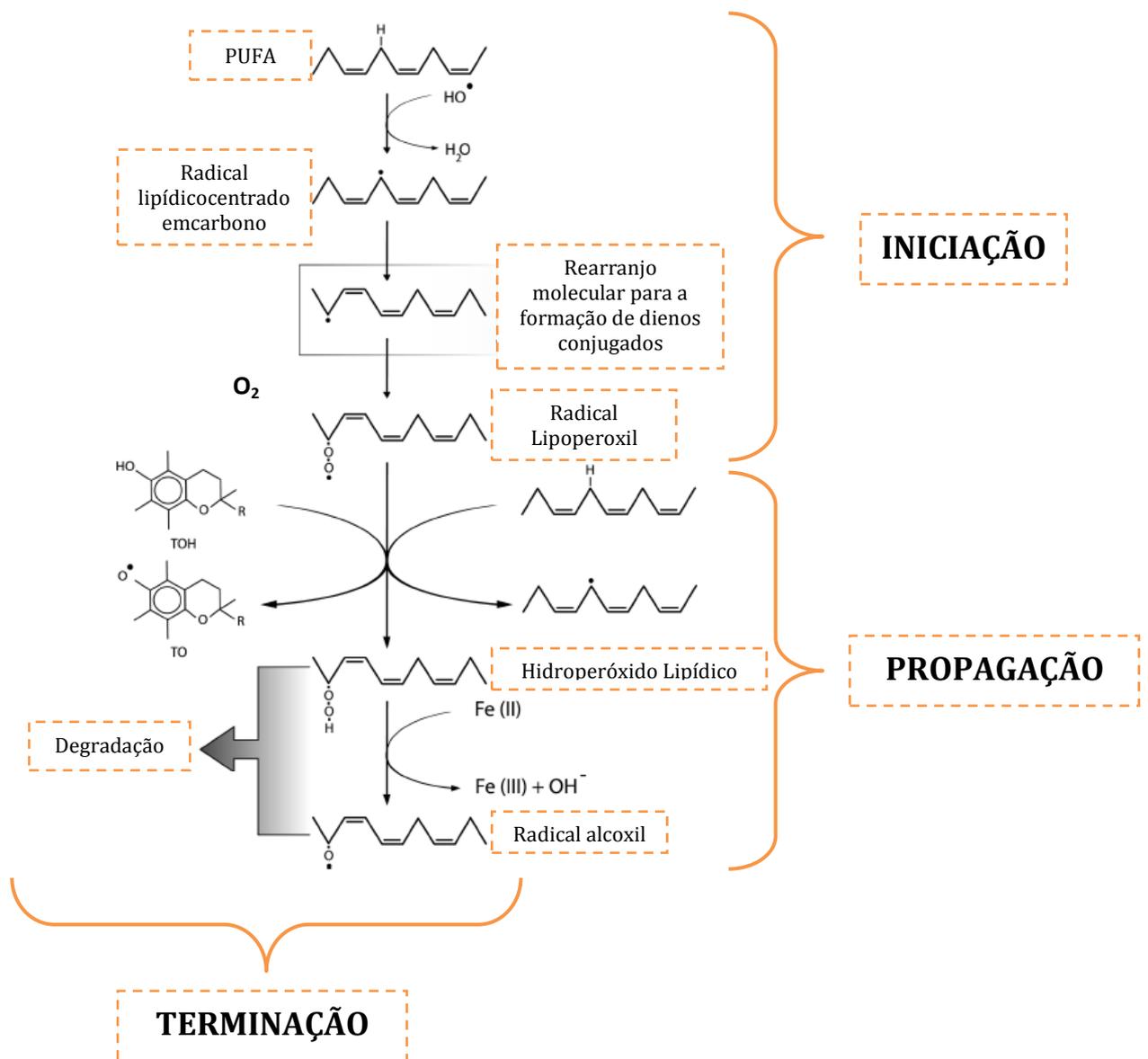
Consequências secundárias também podem ser a ativação ou desativação de enzimas, com possível degradação do DNA, alteração da permeabilidade celular, com influência no funcionamento adequado de receptores hormonais e proteínas de membrana envolvidas na transdução de sinais (Hermes-Lima, 2004).

Trata-se de uma reação em cadeia, na maioria dos casos catalisada por íons de metais de transição, em que fortes agentes oxidantes provocam a ruptura da membrana fosfolipídica, que contém ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs, do inglês *Polyunsaturated Fatty Acids*). Quanto maior o número de insaturações, maior a suscetibilidade dos ácidos graxos em sofrer peroxidação (Freinbichler, et al., 2011).

Didaticamente a peroxidação lipídica é dividida em três fases: iniciação, propagação e terminação. A iniciação é a fase lenta, também chamada de fase lag, seguida de uma fase rápida, de propagação ou fase log, finalizando com a fase de terminação (Esquema 3).

---

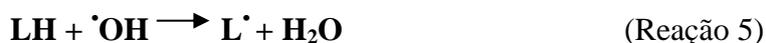
<sup>3</sup> O conteúdo de proteínas carboniladas foi utilizado neste trabalho para o estudo dos danos a proteínas mediados por cromo, sendo sua quantificação detalhada na seção Métodos.



Esquema 3 - Reações de peroxidação lipídica em três fases: iniciação, propagação e terminação (adaptado de Hermes-Lima, 2004).

O radical hidroxil, com sua alta constante de reação a membranas lipídicas (Tabela 2), é considerado a espécie mais importante para a iniciação da peroxidação lipídica. Assim, inicialmente ocorre a abstração de um átomo de hidrogênio de um grupo metileno da molécula lipídica (LH), formando um radical lipídico centrado em carbono ( $\text{L}^\bullet$ ) (Reação 5). Após sua formação, o radical lipídico tende a estabilizar-se por ressonância eletrônica formando um dieno conjugado (Reação 6), com posterior reação com o oxigênio molecular, formando o radical lipoperóxil ( $\text{LOO}^\bullet$ ) (Reação 7).

Este é o radical responsável por alimentar a propagação da peroxidação lipídica (Radak, et al., 2011).



A propagação ocorre quando o radical lipoperoxil ( $\text{LOO}\cdot$ ) reage com uma nova molécula de ácido graxo poliinsaturado não oxidado, formando um hidroperóxido lipídico ( $\text{LOOH}$ ) e outro radical lipídico centrado em carbono ( $\text{L}\cdot$ ) (Reação 8). O novo  $\text{L}\cdot$  pode reagir com o oxigênio molecular, dando prosseguimento a reação em cadeia (Radak, et al., 2011).

Além de importantes na iniciação da peroxidação lipídica, os íons de ferro e cobre também podem participar da propagação, reagindo com  $\text{LOOH}$  e produzindo lipoperoxil ( $\text{LOO}\cdot$ ) ou alcóxil ( $\text{LO}\cdot$ ) para a continuação da reação (Reação 9) (Halliwell, et al., 2007).



Finalmente, a terminação ocorre por (i) reação entre duas espécies de radicais lipídicos com formação de produtos estáveis (Reação 10), (ii) decomposição de  $\text{LOOH}$ ,  $\text{LOO}\cdot$  e  $\text{LO}\cdot$  formando vários subprodutos, incluindo aldeídos, cetonas e hidrocarbonetos (Reação 11), ou (iii) presença de compostos antioxidantes ( $\text{AH}$ ) fenólicos lipofílicos, como  $\alpha$ -tocoferol que, ao reagirem com o lipoperoxil ( $\text{LOO}\cdot$ ) formam  $\text{LOOH}$  e um radical fenólico mais estável (Reação 12) (Hermes-Lima, 2004).



Dentre os subprodutos formados a partir da peroxidação lipídica, os aldeídos são a maior classe quantitativamente. Dentre eles, destacam-se o malonildialdeído (MDA), 4-hidroxinonenal (HNE) e acroleína (Figura 2), todos com natureza altamente tóxica. Eles são capazes de fazer ligações cruzadas com proteínas de membrana e modificar enzimas solúveis, comprometendo as funções metabólicas normais, levando a disfunção celular e morte. Podem ainda reagir com o DNA, especialmente as bases guanina, formando adutos estáveis que comprometem as propriedades físico-químicas do DNA e perdem o modelo para a atividade da RNA polimerase, com possíveis consequências mutagênicas e carcinogênicas (Radak, et al., 2011).

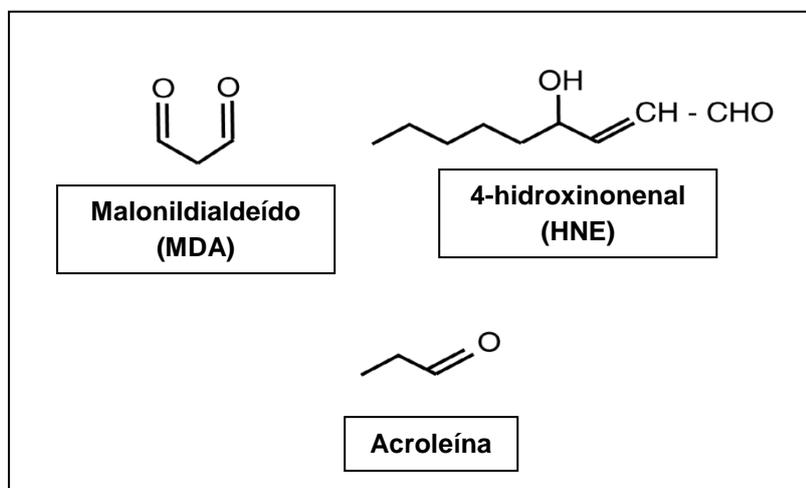


Figura 2 - Principais aldeídos formados durante a terminação da peroxidação lipídica.

A peroxidação lipídica está relacionada com a etiologia ou agravamento de diversas doenças, como a cirrose hepática causada por hemocromatose, uma condição genética causada pelo acúmulo de ferro no fígado e coração por uma perda da regulação de sua absorção. Além disso, a peroxidação de lipoproteínas como o LDL no organismo humano é a responsável pelo desenvolvimento das placas de ateroma que culminam no estabelecimento da aterosclerose (Halliwell, et al., 2007).

### iii. DNA

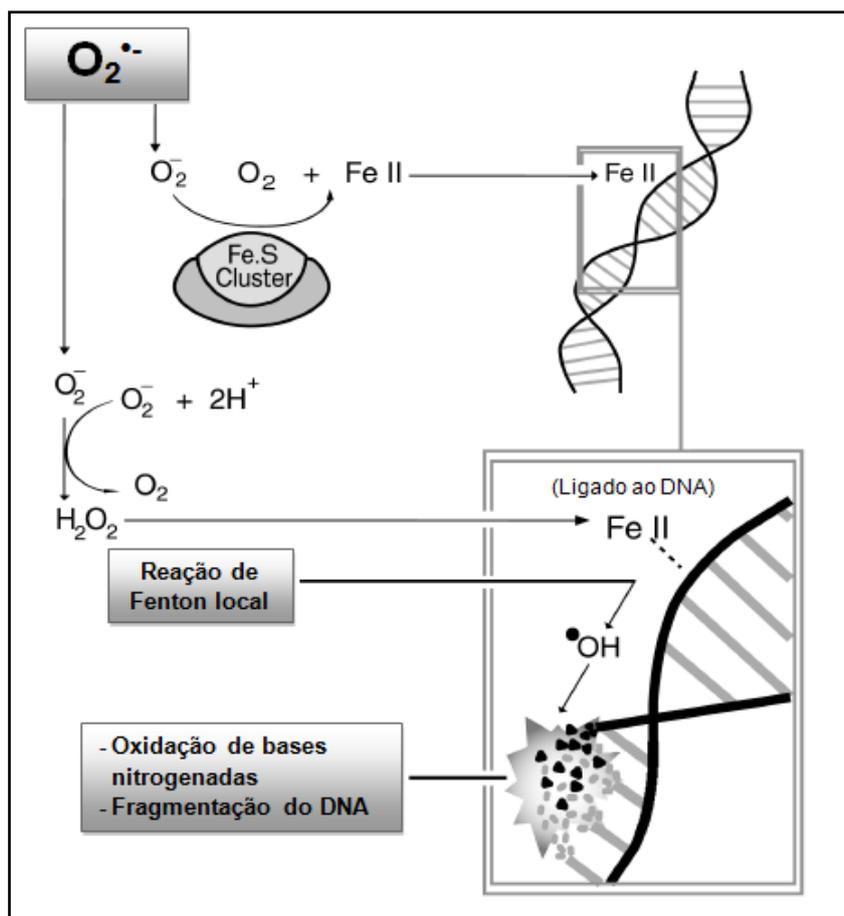
Danos oxidativos ao DNA estão associados tipicamente a desaminação das bases nitrogenadas (sítios apurínicos/apirimidínicos), oxidação das purinas e pirimidinas e quebra de fitas simples e dupla (Kryston, et al., 2011). Esses danos compõem importantes fatores para apoptose, carcinogênese e envelhecimento (Ziech, et al., 2011). Dentre as espécies reativas de oxigênio, o radical superóxido e o peróxido de hidrogênio não estão diretamente envolvidos com esses danos em condições fisiológicas. Entretanto, sua interação com metais de transição provoca a formação de radical hidroxil, capaz de provocar quebra da dupla-fita e modificações nas bases nitrogenadas, com constantes de reação na ordem de  $10^9$  a  $10^{10} \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (Tabela 2) (Halliwell, et al., 2007).

Assim, o radical superóxido formado por suas diferentes fontes celulares (principalmente mitocondrial) geraria  $\text{H}_2\text{O}_2$  via dismutação e ainda seria responsável por liberar  $\text{Fe}^{2+}$  de aglomerados protéicos de ferro-enxofre (conhecidos como *clusters*) localizados principalmente no núcleo (Freinbichler, et al., 2011). O  $\text{Fe}^{2+}$  então livre pode ligar-se ao DNA, carregado negativamente devido aos seus grupamentos fosfato, e reagir com o  $\text{H}_2\text{O}_2$  formando  $\cdot\text{OH}$  via reação de Fenton, provocando danos oxidativos locais ao DNA (Esquema 4) (Kryston, et al., 2011).

As consequências e produtos formados pelo ataque radicalar ao DNA são diversos. A adição do radical hidroxil na posição C8 da guanina, a base de maior sensibilidade a este ataque, provoca principalmente a formação de 8-hidroxi-guanina (8-OH-Gua), considerado hoje um dos mais populares indicadores de dano oxidativo ao DNA. A fragmentação da desoxirribose da cadeia açúcar-fosfato gera uma série de subprodutos, incluindo o MDA<sup>4</sup>, e pode causar quebra das fitas. Outra consequência pode ser a formação de ligações cruzadas entre bases do DNA e resíduos de aminoácidos, que interfere na abertura da cromatina, reparo do DNA, replicação e transcrição (Radak, et al., 2011).

---

<sup>4</sup>Produtos da degradação oxidativa da desoxirribose são utilizados neste trabalho para a determinação da produção de radical hidroxil mediada por cromo. Detalhes sobre essa metodologia podem ser encontrados na seção Métodos.



Esquema 4 - Mecanismo de dano oxidativo ao DNA induzido via reação de Fenton com metais de transição (adaptado de Hermes-Lima, 2004).

Em geral, as bases desemparelhadas, oxidadas ou desanimadas por este ataque são removidas do DNA por enzimas reparadoras. Endonucleases inespecíficas podem remover um trecho de DNA que contém bases oxidadas, enquanto glicosilases são capazes de remover uma base oxidadada específica (Kryston, et al., 2011).

O estado de estresse oxidativo também é capaz de gerar danos indiretos ao DNA por aumentar a concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , ativando endonucleases dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  no núcleo, que fragmentam o DNA. Esse dano, entretanto, não envolve alterações químicas nas bases (Radak, et al., 2011). Radicais peroxil formados durante a peroxidação lipídica também podem mediar danos ao DNA e carcinogênese, especialmente na presença de oxigênio (Kryston, et al., 2011).

## Mecanismos adaptativos ao estresse oxidativo

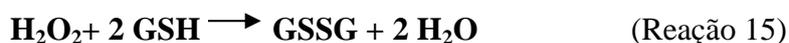
Considerando a presença de  $O_2$  como fator suficiente para a geração de EROs, todas as formas de vida aeróbicas desenvolveram defesas contra eles (Pamplona, et al., 2011). Pamplona e colaboradores (2011) definem antioxidante como “qualquer mecanismo, estrutura e/ou substância que previne, retarda, remove ou protege contra modificações químicas oxidativas não enzimáticas (dano) a uma molécula alvo”. Didaticamente os antioxidantes costumam ser divididos em quatro grupos:

- 1) Defesa antioxidante primária: enzimática ou não enzimática, que interagem diretamente com os EROs;
- 2) Defesas antioxidantes auxiliares: dão suporte as atividades da defesa primária, com por exemplo a partir da reciclagem ou síntese de substratos para as enzimas antioxidantes;
- 3) Proteínas/enzimas complexadoras de metal (exemplo: ferritina e transferrina) e compostos de baixo peso molecular: previnem ou minimizam a participação de metais de transição na formação de radicais livres via reação de Fenton;
- 4) Sistemas enzimáticos de reparo: restauram biomoléculas danificadas por EROs.

As principais defesas enzimáticas incluem superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). A SOD é responsável por catalisar a dismutação do  $O_2^{\cdot-}$  em  $O_2$  e  $H_2O_2$  (Reação 4), espécies consideravelmente menos reativas. Em pH neutro, a dismutação espontânea, sem a participação da enzima, é de  $4,5 \times 10^5 M^{-1}.s^{-1}$ , passando a  $1,6 \times 10^9 M^{-1}.s^{-1}$  com o catalisador, permitindo o efetivo controle dos níveis ideais de  $O_2^{\cdot-}$  intracelular; (Halliwell, et al., 2007); (Pamplona, et al., 2011).

A CAT e a GPx participam da decomposição do  $H_2O_2$  (Reação 14), eliminando de forma coordenada o  $H_2O_2$  produzido tanto pela SOD quanto por outras fontes potenciais. Para isso, a GPx utiliza o tripeptídeo glutathione na sua forma reduzida (GSH) como cosubstrato (Reação 15), além de também catalisar a decomposição de hidroperóxidos orgânicos (Reação 16). Em geral a catalase apresenta maior atuação durante picos de produção e acumulação de  $H_2O_2$ , agindo melhor em altas taxas de  $H_2O_2$  mas com baixa afinidade. GPx, por outro lado, age de forma complementar,

decompondo o  $\text{H}_2\text{O}_2$  de forma lenta e com alta afinidade, sendo portanto mais expressiva no controle do  $\text{H}_2\text{O}_2$  produzido continuamente e fisiologicamente na célula (Pamplona, et al., 2011).



Além de cosubstrato da GPx, a glutationa (GSH) também exerce atividade como antioxidante não enzimático devido ao seu grupamento tiol reduzido em seu resíduo de cisteína. Essa característica permite que ela reaja com diversos radicais livres centrados em carbono, oxigênio singlete,  $\cdot\text{OH}$  e espécies reativas de nitrogênio, estando incluída no grupo dos metabólitos antioxidantes de baixo peso molecular (Halliwell, et al., 2007).

Outro antioxidante com atividade relacionada ao grupamento tiol é a proteína tioredoxina. Seu sítio ativo possui um dissulfido/ditiol capaz de regular fatores transcricionais como NF- $\kappa$ B (fator nuclear *kappa* B). Além destes, o organismo também é capaz de sintetizar melatonina, melanina e ácido úrico, que também possuem capacidade antioxidante (Hermes-Lima, 2004).

Outros antioxidantes, entretanto, não são produzidos no organismo humano e devem ser consumidos pela dieta. Entre eles estão a vitamina C (ácido ascórbico, presente em frutas e hortaliças), vitamina E (principalmente  $\alpha$ -tocoferol, encontrado em óleos vegetais, castanhas e gérmen de trigo), carotenóides (como o  $\beta$ -caroteno, precursor da vitamina A, que tem os vegetais amarelos, ovos e miúdos como fonte) e polifenóis (presentes em frutas, hortaliças, chás, café e vinho, principalmente) (Halliwell, et al., 2007). A Figura 4 apresenta uma seleção dos principais antioxidantes de baixo peso molecular.

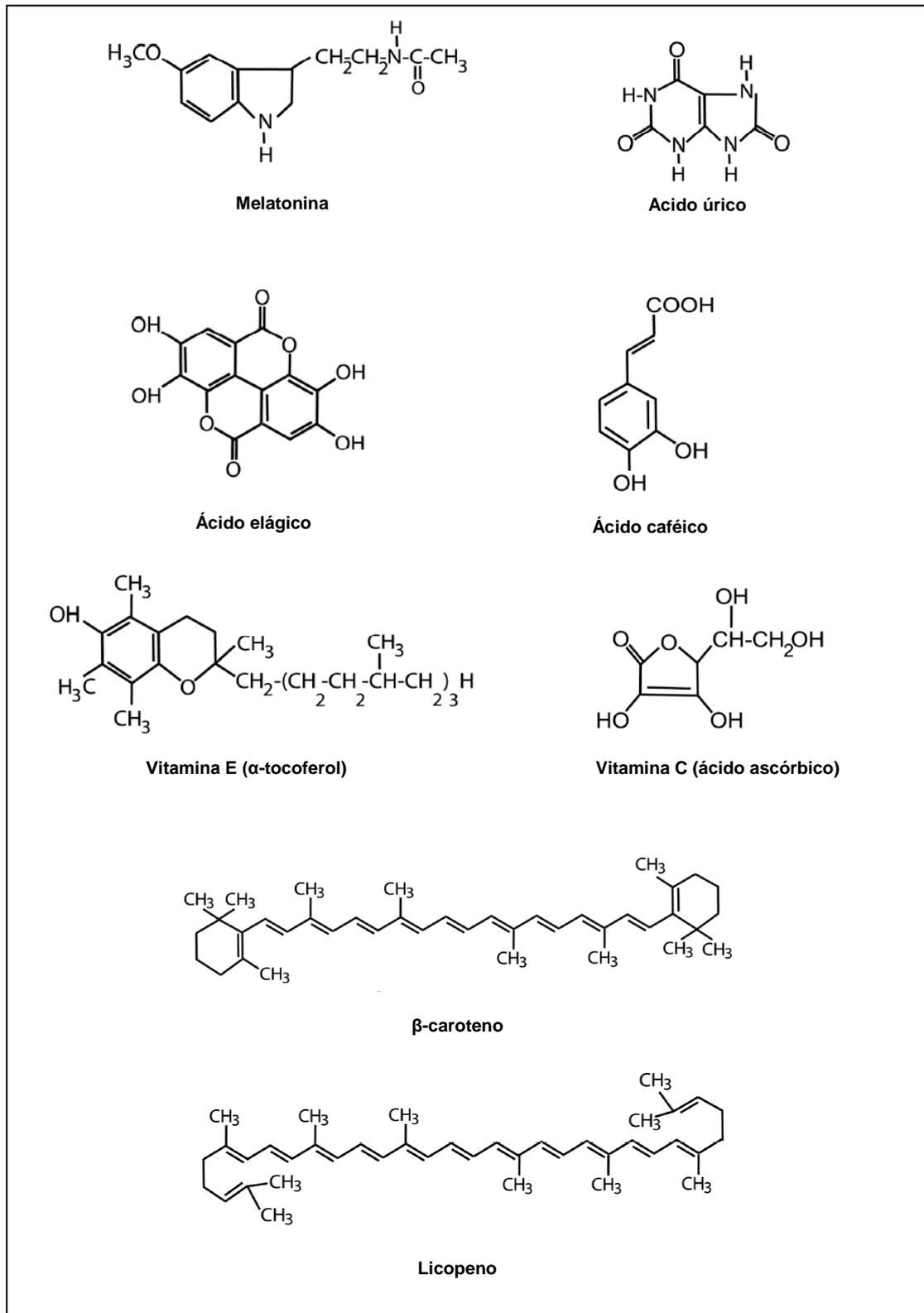


Figura 3 - Principais antioxidantes não enzimáticos de baixo peso molecular (adaptado de Hermes-Lima, 2004).

Os flavonóides, uma das classes dos polifenóis, podem tanto inibir quanto favorecer a formação de radical hidroxil por reações tipo Fenton, dependendo da sua atividade redox e da natureza do íon metálico gerador de  $\cdot\text{OH}$ . Os flavonóides podem participar como quelantes de metal ou sequestradores de  $\cdot\text{OH}$ . Da mesma forma, o ácido ascórbico também pode ser considerado pró-oxidante devido a sua capacidade de reciclar o ferro férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ ) para o estado ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ ), este sim capaz de participar da reação de Fenton (Genaro-Mattos, 2009).

Por outro lado, os carotenóides podem ainda atuar sinergeticamente com o  $\alpha$ -tocoferol e o ácido ascórbico de forma a prover uma defesa antioxidante eficiente de forma integrada. Por esse mecanismo os carotenóides reciclariam o  $\alpha$ -tocoferol, ao passo que o radical carotenóide formado poderia ser regenerado pelo ácido ascórbico (Albanes, et al., 1994).

Apesar de essenciais, a evidência de necessidade de suplementação desses componentes dietéticos para a prevenção de doenças ainda é fraca. Muitos ensaios com suplementação de carotenóides ou outras vitaminas antioxidantes (C e E) não foram capazes de assegurar a prevenção de doenças ou do envelhecimento. Ao contrário, passaram a contribuir para a mortalidade dos participantes dos estudos (Albanes, et al., 1994); (Omenn, et al., 1996).

Foi o caso de dois grandes estudos randomizados, duplo-cego, placebo controlados, conduzidos para avaliar o efeito da suplementação de  $\beta$ -caroteno no risco de desenvolvimento de câncer de pulmão. Acreditava-se que o  $\beta$ -caroteno era o responsável pela consistente evidência epidemiológica de associação inversa entre consumo de frutas e hortaliças e menor risco de desenvolvimento de câncer (Albanes, et al., 1994); (Omenn, et al., 1996).

O primeiro estudo trata-se do “ $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -caroteno Estudo de Prevenção ao Câncer” (do inglês, ATBC) conduzido na Finlândia com 29.133 fumantes do sexo masculino com suplementação de 20 mg de  $\beta$ -caroteno. Ao contrário do esperado, os participantes que receberam  $\beta$ -caroteno apresentaram maior incidência de câncer de pulmão (18 % superior) e maior índice de mortalidade do que os que não receberam, sugerindo pela primeira vez seu possível efeito nocivo quando suplementado (Albanes, et al., 1994).

Apesar de inicialmente desacreditada pela crítica, o “Ensaio de Eficácia de  $\beta$ -caroteno e Vitamina A” (do inglês, CARET) veio reiterar essa evidência. A

suplementação nesse caso consistia na combinação de 30 mg de  $\beta$ -caroteno e 25.000 UI de vitamina A ou placebo ingeridos por 18.314 homens e mulheres com alto risco de desenvolvimento de câncer de pulmão (fumantes ou expostos a amianto). Este estudo foi interrompido 21 meses antes do término previsto devido a confirmação de que o grupo suplementado já apresentava 28 % mais casos de câncer de pulmão e 17 % mais mortes que o grupo placebo. Os autores concluem enfaticamente que a segurança e eficácia de qualquer suplemento nutricional devem ser largamente demonstradas antes que seja recomendado seu uso em qualquer população (Omenn, et al., 1996).

Além dessa abordagem tradicional, entretanto, evidências recentes consideram outras adaptações desenvolvidas pelos animais para a proteção celular contra os danos oxidativos dentro do grupo de defesa antioxidante. Uma dessas adaptações refere-se a suscetibilidade inerente das macromoléculas ao dano oxidativo, conforme proposto por Pamplona e colaboradores (2011).

De acordo com esses autores, intermediários glicolíticos (os mais instáveis e reativos monossacarídeos) aparecem no organismo em concentrações micromolares, enquanto o mais abundante e estável, a glicose, é a principal fonte de energia. Ácidos graxos altamente insaturados (mais que duas insaturações) são em média os menos abundantes nas membranas celulares e com menor expressão em espécies com maior expectativa de vida. Guanina, a base nitrogenada mais facilmente oxidável do DNA, é também a menos abundante. Da mesma forma, a metionina é o aminoácido com menor percentual de participação entre as proteínas celulares e a mais suscetível a oxidação por radicais livres. Esses fatos sugerem que a vida aeróbica evoluiu por meio da redução dos componentes estruturais mais suscetíveis aos danos oxidativos (Pamplona, et al., 2011).

Por essa linha de raciocínio, a importância da dieta no balanço do sistema redox não é apenas como fonte de antioxidantes essenciais. A dieta é também a fonte de nutrientes, como ácidos graxos, aminoácidos e monossacarídeos, responsáveis por expor o organismo a ameaças oxidativas. Esse efeito é particularmente observado em situações com alta concentração intracelular de glicose e ácidos graxos, isto é, em estados hiperglicêmicos como diabetes e resistência a insulina (Pamplona, et al., 2011).

## **Ingestão dietética de Cromo**

O cromo trivalente (Cr(III) ou Cr<sup>3+</sup>) é a forma presente na dieta e considerado um micronutriente. Quando não há casos de contaminação, o cromo hexavalente (Cr(VI) ou Cr<sup>6+</sup>) nos alimentos ou na água de forma natural é facilmente reduzido pelo meio ácido estomacal, prevenindo a presença sistêmica desse metal tóxico (Guallar, et al., 2005); (Institute of Medicine, 2001). Cr(III) tem como função fisiológica a participação ativa no metabolismo da insulina e, conseqüentemente, também no dos macronutrientes (Stoecker, 2007).

A distribuição de cromo nos alimentos sofre uma grande variabilidade e enfrenta a dificuldade da mensuração. Além de não existir ainda um método que ofereça com segurança esses dados, há também o grande risco de contaminação durante a coleta e análise dos alimentos, o que não era observado até um passado recente (Hummel, et al., 2007). Atualmente, o método de dupla análise química de amostras de alimentos tem sido o que provê dados mais confiáveis e precisos, geralmente por espectrometria de absorção atômica (Roussel, et al., 2007); (Guallar, et al., 2005); (Garcia, et al., 2001); (Haro, et al., 2001); (Institute of Medicine, 2001).

Alguns estudos, utilizando essa metodologia, têm apontado uma baixa concentração de cromo nos alimentos, sendo mais presente em carnes, laticínios e preparações feitas com trigo integral e açúcar mascavo. Em geral há pouca participação das frutas e hortaliças na contribuição para o cromo dietético (Hummel, et al., 2007); (Roussel, et al., 2007); (Guallar, et al., 2005); (Garcia, et al., 2001); (Haro, et al., 2001). Contudo, esse micronutriente não está contemplado na atual Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO (Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação - NEPA/UNICAMP, 2011).

O conteúdo de cromo pode ser muito influenciado pelos meios em que os alimentos são transportados, seu processamento e fortificação, com perdas consideráveis durante o refinamento. Há também variabilidade entre safras, lotes e fatores geoquímicos. Durante o preparo, os utensílios utilizados também podem favorecer o aporte de cromo. A liga utilizada na elaboração do aço inoxidável (inox) é uma combinação de ferro (50 a 88%), cromo (11 a 30%) e níquel (0 a 31 %) e a utilização de utensílios com esse material pode contribuir com cerca de 0,01 a 0,31mg/l de cromo no alimento preparado (Guallar, et al., 2005); (Quintaes, 2000).

A absorção estimada de Cr(III) é de 0,4 a 2,5% do ingerido, baseado em estudos metabólicos ou por excreção urinária com ingestão fisiológica (Lau, et al., 2008); (Institute of Medicine, 2001); (Mohamedshah, et al., 1998). Em geral, o aumento no consumo ou a suplementação provoca um aumento na excreção e não na absorção (Mohamedshah, et al., 1998). Alguns fatores têm sido apontados como interferentes na absorção: ácido ascórbico melhoraria, enquanto fibras, fitatos e açúcar simples teriam um efeito adverso, assim como a ingestão habitual de antiácidos (Institute of Medicine, 2001); (Hummel, et al., 2007).

Os mecanismos intracelulares após a absorção de cromo ainda não estão elucidados. Entretanto, sabe-se que seu transporte dá-se ligado à transferrina, uma proteína plasmática responsável principalmente pelo transporte do ferro (Lau, et al., 2008). Essa competição pelos sítios de ligação sugere uma possível interação entre os dois metais (Institute of Medicine, 2001).

De fato, a prevalência de 53% de homeostase glicêmica alterada e de 7 a 40% de diagnóstico de Diabetes Mellitus entre pacientes com hemocromatose (patologia caracterizada pelo armazenamento alterado do ferro) (American Diabetes Association, 2011) levantam a hipótese de que o excesso de ferro dificultaria o transporte de cromo, levando a um quadro semelhante ao da deficiência desse mineral, e não apenas pelo dano pancreático direto provocado pelo ferro (Institute of Medicine, 2001); (Sargent, et al., 1979).

Por todas essas dificuldades ainda não foi possível estabelecer uma recomendação dietética que satisfaça com segurança as necessidades da população em termos de Necessidade Média Estimada (EAR – *Estimated Average Requirement*). Dessa forma, o que temos ainda é uma estimativa como Ingestão Adequada (AI – *Adequate Intake*)<sup>5</sup>. Os valores atuais estão apresentados no quadro 01. Esses valores foram determinados com base na ingestão de indivíduos saudáveis e com boa alimentação (Institute of Medicine, 2001).

Antes das atuais DRIs, a RDA estabelecida para o cromo em 1989 era de 50 a 200 µg/dia para adultos, o que já naquela época foi considerado pelo *National Research Council* como sendo possível por meio de uma dieta variada e balanceada

---

<sup>5</sup>Ingestão adequada (AI – *Adequate Intake*): “consumo diário médio de recomendação de um nutriente baseado em observações ou aproximações experimentais ou estimado a partir da ingestão de um grupo (ou grupos) de indivíduos saudáveis que é considerada como adequada” (Institute of Medicine, 2001 – tradução livre).

(Garcia, et al., 2001). Alguns estudos de consumo vinham sendo realizados isoladamente em diversos países. Os dados disponíveis estão apresentados na Tabela 3.

<b>Sexo</b>	<b>Idade</b>	<b>AI</b>
<b>Masculino</b>	19 a 50 anos	35µg/dia
	> 50 anos	30µg/dia
<b>Feminino</b>	19 a 50 anos	25µg/dia
	> 50 anos	20µg/dia

Quadro 1 - Ingestão adequada (AI) do micronutriente cromo de acordo com idade e sexo. Fonte: IOM, 2001.

Tabela 3 - Consumo de cromo em diversos países.

<b>País</b>	<b>Consumo de cromo (µg/d)</b>	<b>Referência</b>
<b>Espanha</b>	Homens: 84,5 Mulheres: 93,5	(Garcia, et al., 2001)
<b>Estados Unidos</b>	Média: 25 - 37 Homens: 38,8 Mulheres: 23,1	(Kozlovsky, et al., 1985)
<b>Finlândia, Suíça e Suécia</b>	Média: ~ 50	(Kumpulaine, 1992)
<b>Bélgica</b>	Média: 53	(Van Cauwenbergh, et al., 1996)
<b>Polônia</b>	Média: 60-90	(Marzec, 2004)
<b>Canadá</b>	Mulheres: 96,4	(Gibson, et al., 1985)
<b>Grécia</b>	Média: 143	(Bratakos, et al., 2002)
<b>Inglaterra</b>	Média: 24,5	(Bunker, et al., 1984)
<b>Áustria</b>	Média: 34,5 Homens: 37,6 Mulheres: 31,4	(Wilplinger, et al., 1996)

As variações encontradas entre os países podem ser resultantes de diferentes ingestões energéticas, assim como diferenças metodológicas na coleta e análise das dietas. Analisando esses resultados questionou-se a recomendação com limite inferior de 50 µg/dia da RDA de 1989, uma vez que estudos de consumo utilizando indivíduos saudáveis apresentavam limites inferiores mais baixos, de cerca de 25µg/dia. Esse fato contribuiu para a mudança na recomendação (Institute of Medicine, 2001).

Entretanto, são necessários estudos mais atuais devido às constantes modificações dos produtos que compõem a dieta atual, globalizada e cada vez mais industrializada e processada.

No Brasil foi realizado um único estudo sobre a composição de cromo nos alimentos e estimativa da ingestão, considerando apenas a cidade do Rio de Janeiro. Este estudo foi publicado na *Science of the Total Environment* em 2004 e também analisou outros elementos-traço (Santos, et al., 2004). Para o desenvolvimento desse trabalho foram selecionados os alimentos mais consumidos pelos brasileiros de acordo com dados do IBGE. As amostras foram adquiridas em diferentes centros comerciais, considerando diferentes classes sociais, e dois períodos sazonais diferentes: chuvoso e seco (Santos, et al., 2004).

Os alimentos escolhidos foram: feijão preto, arroz, batata, cenoura, cebola, mandioca (macaxeira), tomate, chuchu, abóbora, alface, agrião, repolho, couve-flor, couve, espinafre, laranja, banana, maçã, abacaxi, mamão, farinha de trigo, farinha de milho, farinha de mandioca (macaxeira), macarrão, açúcar, café, frango, peixe, carne bovina e leite (Santos, et al., 2004).

Os alimentos que apresentaram as maiores concentrações de cromo foram banana (230µg/kg) e café (200µg/kg), sendo este analisado em sua forma “pronta para consumo”, ou seja, após infusão. Para todos os tipos de alimentos, entretanto, foi encontrada uma grande variabilidade nas concentrações dos metais analisados, inclusive entre o mesmo tipo de alimento (Santos, et al., 2004).

A média de ingestão estimada para cromo foi de 23µg/d, o que não difere expressivamente dos valores encontrados em outros países. Os alimentos que mais contribuíram nessa ingestão foram carnes (23%), banana (20%), arroz (13%), laranja (10%) e café (8%) (Santos, et al., 2004) (Figura 4).

Os autores apontam ainda para a inexistência de um limite máximo de tolerância recomendado pelo Brasil para cromo, assim como para alumínio, magnésio, níquel e urânio (Santos, et al., 2004).

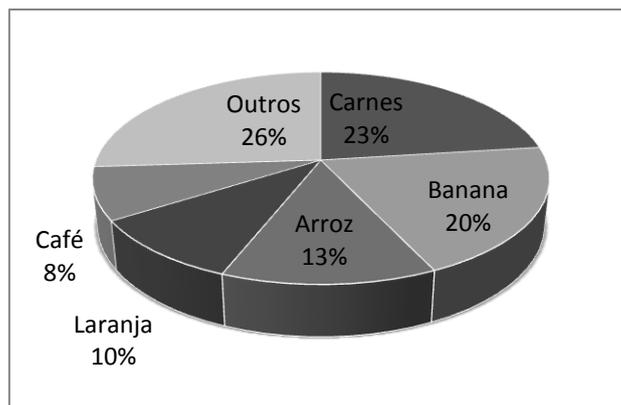


Figura 4 - Contribuição dos alimentos para a ingestão diária de Cr(III) por habitantes da cidade do Rio de Janeiro. Fonte: Santos, et al., 2004.

A deficiência de cromo não é muito comum ou é subrelatada. As possíveis causas para a deficiência seriam: infecção intestinal, desordens metabólicas ou ingestão inadequada, devido ao seu baixo conteúdo nas dietas ou o alto consumo de alimentos altamente processados (Guallar, et al., 2005).

Deficiência de cromo foi reportada apenas para pacientes recebendo dieta parenteral total sem a devida suplementação. Um estudo de caso publicado no *The American Journal of Clinical Nutrition* em 1977 relatou o caso de uma paciente que após três anos em terapia parenteral total apresentou 15% de perda de peso, nefropatia periférica e intolerância a glicose, mesmo com o devido aporte calórico (Jeejeebhoy, et al., 1977). Foi verificada pelo quociente respiratório uma baixa utilização de carboidratos para produção de energia, apesar dos constantes aumentos no aporte de glicose para manter o peso. A fim de manter a glicemia normal foram feitas infusões de insulina, mas o teste de tolerância a glicose e o quociente respiratório não se alteraram (Jeejeebhoy, et al., 1977).

Os médicos responsáveis pela paciente verificaram um balanço negativo de cromo por meio de sua concentração no plasma e no cabelo de acordo com os parâmetros da época. Diante disso, os médicos responsáveis cessaram a infusão de insulina e passaram a administrar 250µg de cromo diariamente por duas semanas. Após esse período, o teste de tolerância a glicose e o quociente respiratório voltaram ao normal. A insulina não foi mais necessária e o aporte de glicose foi diminuído para evitar o ganho excessivo de peso. A neuropatia periférica e o bem-estar da paciente também tiveram melhora significativa (Jeejeebhoy, et al., 1977).

Esse estudo de caso trouxe um grande peso e importância para a necessidade de cromo no metabolismo de macronutrientes e ação da insulina, o que vinha sendo sugerido desde 1959 por Mertz e Schwarz (Schwarz, et al., 1959). Além disso, surgiu a teoria de que uma baixa ingestão de cromo pode ser a causa subclínica de resistência a insulina e perfil lipídico alterado em populações ocidentais. Entretanto, existem poucos estudos epidemiológicos testando essa causalidade, devido principalmente a falta de dados sobre composição de cromo nos alimentos e mecanismos de mensuração de consumo e exposição (Guallar, et al., 2005); (Institute of Medicine, 2001).

### **Cromo e o metabolismo de insulina**

A função biológica e nutricional do cromo está relacionada a sua participação ativa no metabolismo da insulina. Em tecidos musculares esqueléticos, o receptor de insulina (RI) é composto por duas subunidades: a subunidade  $\alpha$  está localizada na parte externa da célula e é responsável por inibir a atividade tirosina quinase da subunidade  $\beta$ , localizada na parte interna da célula. A ligação da insulina a subunidade  $\alpha$  provoca a autofosforilação da subunidade  $\beta$  intracelular, ativando seu domínio tirosina quinase (Nelson, et al., 2008); (Saltiel, et al., 2001).

Uma vez ativado, o RI é capaz de fosforilar múltiplos resíduos de tirosina nas proteínas substrato do receptor de insulina (IRS-1 e 2, principalmente). Uma vez fosforilado, o IRS-1 liga-se a enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), responsável pela conversão do fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato para fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato. Esses eventos levam a fosforilação da proteína quinase B (PKB ou Akt), que inicia o processo de translocação dos transportadores de glicose Glut4 das vesículas internas até a membrana plasmática, estimulando a captação de glicose da corrente sanguínea (Saltiel, et al., 2001); (Nelson, et al., 2008); (Hua, et al., 2012).

Neste contexto, sabe-se que o cromo é responsável por aumentar a translocação dos transportadores de glicose Glut4 (dependentes de insulina) das vesículas citosólicas para a membrana plasmática em condições de resistência a insulina, ou seja, mesmo quando em altas concentrações a insulina deixa de ser eficiente na captação de glicose via Glut4. Os mecanismos que provocam esse efeito, entretanto,

ainda não foram elucidados. Contudo, alguns resultados observados em estudos *in vitro* ou *in vivo* sugerem o envolvimento dos seguintes processos (Hummel, et al., 2007); (Hua, et al., 2012):

- 1) Demonstrações *in vivo* apresentam:
  - a. Aumento do nível de fosforilação dos resíduos de tirosina dos substratos do receptor de insulina IRS-1;
  - b. Maior atividade da PI3K;
  - c. Maior fosforilação do Akt;
- 2) Resultados *in vitro* não confirmam esses mecanismos e sugerem outros:
  - a. Aumento da fluidez da membrana por diminuir seu conteúdo de colesterol;
  - b. Regulação negativa de proteínas envolvidas com a resistência a insulina, como PTP-1B e JNK, que aumentam a fosforilação da serina do IRS-1 suprimindo a sinalização da insulina;
  - c. Redução do estresse do retículo endoplasmático, condição com crescentes evidências de envolvimento na resistência a insulina.

Esses mecanismos ainda não foram esclarecidos, mas é apontado que a sinalização da insulina não é alterada pelo cromo em situações basais, sem resistência a insulina. Sendo o mais potente hormônio anabólico conhecido, alterações no metabolismo da insulina seriam capazes de produzir efeitos não apenas no metabolismo dos carboidratos, mas também na síntese e armazenamento de lipídios e proteínas, assim como inibir sua degradação e liberação na corrente sanguínea (Saltiel, et al., 2001); (Hua, et al., 2012).

Uma vez influenciando na resistência a insulina, o cromo teria papel fundamental na prevenção da síndrome metabólica. Essa condição compreende o agrupamento de diversos fatores de risco para anomalias metabólicas, como obesidade, dislipidemia, hipertensão e hiperglicemia e da qual a resistência a insulina apresenta-se como fator central. Dessa forma, diversos estudos buscaram encontrar a relação entre o cromo e o metabolismo dos macronutrientes e suas consequências, com possível melhora nos quadros de excesso de peso e prognósticos em doenças cardiovasculares e diabetes (Hummel, et al., 2007); (Lau, et al., 2008).

A prevalência de Diabetes Mellitus atingiu 173 milhões em todo o mundo em 2002, com projeção de chegar a 300 milhões em 2030 (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2009). A Sociedade Brasileira de Diabetes divulgou recentemente que o número estimado de diabéticos no Brasil é de 12 milhões de pessoas (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2012). Esses números reiteram a importância de estudos de mecanismos e comportamentos que auxiliem no combate a essa condição com alta morbi-mortalidade.

Apesar do grande número (616 resultados no *Medline/Pubmed* com o descritor “*chromium and diabetes*” em 06 de fevereiro de 2013), poucos são os trabalhos com qualidade metodológica suficiente para a conclusão sobre os efeitos do cromo no diabetes. Duas revisões sistemáticas com meta-análises foram conduzidas para avaliar os estudos disponíveis sobre os efeitos de suplementos nutricionais a base de cromo em pacientes diabéticos ou com resistência a insulina<sup>6</sup> (Althuis, et al., 2002); (Balk, et al., 2007). Mesmo nessas revisões sistemáticas os artigos incluídos foram considerados pelos autores como de qualidade questionável. Esse fato dificulta a realização de estimativas de precisão do conjunto de resultados pela insuficiência do número de sujeitos incluídos nas pesquisas (Althuis, et al., 2002); (Balk, et al., 2007).

Além disso, há ainda uma grande heterogeneidade entre os trabalhos, seja pela população avaliada (ocidentais vs orientais) ou pela formulação e dose dos suplementos a base de cromo (cloreto de cromo, levedo de cerveja enriquecido com cromo, nicotinato de cromo, cromo ligado a niacina e picolinato de cromo). Como consequência, há uma grande variabilidade entre os desfechos encontrados nesses estudos (Althuis, et al., 2002); (Balk, et al., 2007).

As estimativas de precisão dos efeitos da suplementação de cromo em pacientes diabéticos ou com resistência a insulina, a partir da análise da diferença de risco e intervalos de confiança, demonstraram que foi observado efeito positivo apenas em uma das revisões (Balk, et al., 2007). Neste trabalho foi observado efeito protetor, com diminuição da hemoglobina glicada no conjunto de suplementos avaliados (diminuição de 0,6 %, com intervalo de confiança entre -0,9 a -0,2) e da glicemia em

---

<sup>6</sup>A revisão da literatura acerca dos efeitos da suplementação de Cr(III) foi conduzida de acordo com a metodologia proposta pelo material Diretrizes Metodológicas: Elaboração de Pareceres Técnico-Científicos (Brasil, 2011), com a descrição do processo apresentada no Apêndice A, incluindo os tipos de estudos, população, intervenção (formas de cromo e concentrações utilizadas), desfechos e resultados.

jejum após a administração de levedo de cerveja enriquecido com cromo (diminuição de 1,1 mmol/L, com intervalo de confiança entre -1,6 a -0,6) e picolinato de cromo (diminuição de 0,8 mmol/L, com intervalo de confiança entre -1,2 a -0,3) apenas em pacientes diabéticos (Balk, et al., 2007).

Para todos os demais parâmetros, ou seja, glicemia pós-prandial, sensibilidade a insulina e lipoproteínas, e outras populações avaliadas, como indivíduos com intolerância a glicose ou com tolerância normal a glicose, não foram encontradas alterações significativas ou foram inconclusivos por insuficiência de informações metodológicas dos estudos (Balk, et al., 2007). Ainda assim, a revisão conduzida por Balk e colaboradores (2007) de uma maneira geral apresenta limitações quanto ao detalhamento da busca por trabalhos relevantes e avaliação dos selecionados, o que dificulta a comprovação dos seus resultados e diminui a qualidade de sua evidência.

Na revisão conduzida por Althuis e colaboradores (2002), independente da população analisada, da intervenção aplicada e dos desfechos avaliados, não foram encontrados resultados significativos sobre o efeito da suplementação de cromo, sugerindo que não há qualquer implicação, benéfica ou maléfica, comprovada. Destaca-se ainda que o único trabalho de boa qualidade metodológica que conseguiu resultados positivos foi conduzido na China e questiona-se sua aplicabilidade em populações ocidentais (Althuis, et al., 2002).

Dessa forma, ainda é fraca a recomendação de utilização de suplementos nutricionais a base de cromo em pacientes diabéticos ou com resistência a insulina visando o controle da glicemia, da insulinemia ou melhoria dos níveis de hemoglobina glicada e lipoproteínas. Evidencia-se ainda a grande necessidade de estudos primários com boa qualidade metodológica para fornecer peso a essa evidência.

## **Cromo e a produção de radicais livres**

Mesmo para um micronutriente como o Cr(III) é importante que suas potencialidades tóxicas também sejam estudadas. Diversos são os exemplos em nutrição em que situações de desequilíbrio nas concentrações de nutrientes no organismo são capazes de transformar nutrientes essenciais em tóxicos.

Para os metais isso também ocorre com frequência, como o ferro, cobre e cobalto. Grande parte dos efeitos maléficos provocados em situações de desequilíbrio

está na participação desses metais em ciclos redox com excessiva produção de EROs, gerando um quadro de estresse oxidativo (Jomova, et al., 2011).

Cr(VI) possui uma reconhecida capacidade em levar a citotoxicidade. Assim, ele foi a primeira espécie de cromo a ser alvo de investigações sobre a possível mediação na geração de radicais livres. Dessa forma, existem maiores evidências de que ele pode induzir estresse oxidativo, além de provocar danos ao DNA, apoptose celular e alteração da expressão gênica (Bagchi, et al., 2002).

Nesse estado de oxidação – 6+ – o cromo é capaz de entrar facilmente nas células por canais iônicos, sem gasto energético. Parte de sua detoxificação ocorre pela redução intracelular a Cr(III) por agentes redutores como ascorbato, glutatona e cisteína. Entretanto, esse processo provoca a geração de espécies intermediárias de cromo – Cr<sup>5+</sup> e Cr<sup>4+</sup> – consideravelmente mais reativas e capazes de produzir EROs (Jomova, et al., 2011).

Diversos autores, como Shi & Dalal (1989, 1990), Liu & Shi (2001), Bagchi e colaboradores (2002) e Borthiry e colaboradores (2007) acreditam que o Cr(V) produzido a partir da redução de Cr(VI) reage com o peróxido de hidrogênio gerando radical hidroxil via reação tipo Fenton. Essa poderia ser a fase inicial dos eventos que levam a citotoxicidade e carcinogenicidade induzidas por Cr(VI) (Shi, et al., 1989); (Shi, et al., 1990); (Liu, et al., 2001); (Bagchi, et al., 2002); (Borthiry, et al., 2007).

Cr(III) seria o principal desses metabólitos de Cr(VI) nas células e já foi demonstrado que pode ligar-se diretamente ao DNA *in vitro*, formando adutos Cr-DNA e ligações cruzadas DNA-DNA. Assim, também o Cr(III) passou a ter sua segurança questionada, com a proposição de que apresentaria uma capacidade oxidativa semelhante ao Cr(VI) (Tsou, et al., 1996).

A primeira demonstração dessa capacidade oxidativa e consequente possibilidade de produção de radicais livres por Cr(III) ocorreu em 1993 por Shi e colaboradores. Esse grupo verificou a geração de radical hidroxil e radicais livres derivados de hidroperóxidos lipídicos em meios contendo cloreto de cromo e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizando a técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica (do inglês, EPR) (Shi, et al., 1993). Neste caso, a intensidade do sinal, diretamente proporcional à produção de radical hidroxil, praticamente não foi afetada com a adição dos antioxidantes cisteína, glutatona reduzida (GSH) ou nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) (2 mM). Os autores não chegaram a descrever um mecanismo para explicar o fenômeno observado.

Entretanto, seu trabalho foi inovador, uma vez que ocorreu de forma concomitante com a vertiginosa procura por suplementos nutricionais a base de cromo (Shi, et al., 1993).

Posteriormente, Tsou e colaboradores (1996) procuraram elucidar os mecanismos e componentes envolvidos no dano ao DNA provocado por cloreto de cromo(III) e  $H_2O_2$ . Foi utilizado o ensaio de relaxamento do DNA plasmidial da forma super-enovelada para a forma circular aberta por degradação oxidativa, além de também conduzir ensaios com EPR.

O relaxamento do DNA, observado em pH 7,5, foi dependente das concentrações de Cr(III) e  $H_2O_2$  (observada até relação Cr(III) :  $H_2O_2$  igual a 1:1). O dano provocado por 10  $\mu$ M de Cr(III) mais 0,5 mM de  $H_2O_2$  foi quase completamente inibido pelos antioxidantes manitol, azida sódica, Tris-HCl e catalase, sugerindo tratar-se de fato de um dano provocado por EROs (Tsou, et al., 1996). Superóxido dismutase, por outro lado, não provocou qualquer inibição no dano provocado por Cr(III) e  $H_2O_2$ . O tratamento com EDTA em meio contendo Cr(III) por 30 minutos antes da adição de  $H_2O_2$  provocou inibição do dano ao DNA a partir da relação EDTA : Cr igual a 30, sugerindo que o EDTA pode ligar-se ao Cr(III) formando um complexo inerte em relação a sua capacidade redox. Utilizando o sequestrador de radicais livres ascorbato, uma diminuição no dano também foi observada, embora sem inibição completa (Tsou, et al., 1996).

A técnica de EPR foi conduzida para investigar a formação de radical hidroxil e oxigênio singlete por Cr(III) +  $H_2O_2$  com a utilização de DMPO como sequestrador. Foi verificada uma grande produção de DMPO/ $\bullet$ OH de forma tempo-dependente em solução aquosa contendo Cr(III) 1 mM,  $H_2O_2$  10 mM e DMPO 60 mM em tampão fosfato 10 mM, pH 7,5. Maior quantidade foi gerada nesse sistema entre 50 e 70 minutos após o início da reação. A produção de DMPO/ $\bullet$ OH também foi linearmente crescente com o aumento da concentração de Cr(III). Não foi verificado sinal de DMPO/ $\bullet$ OH com a incubação independente de Cr(III) ou  $H_2O_2$  (na presença de um e ausência do outro). Utilizando o sequestrador TEMP, específico para oxigênio singlete, foi verificada maior produção entre 4 e 14 minutos após o início da reação (Tsou, et al., 1996).

Nas mesmas concentrações, Cr(III) foi mais efetivo na produção de DMPO/ $\bullet$ OH e na geração de danos ao DNA do que Cr(VI). A adição de ascorbato ao meio também provocou expressiva diminuição na intensidade de DMPO/ $\bullet$ OH, além de

permitir detectar a presença de Cr(V), que não foi visualizado em meios sem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou sem ascorbato (Tsou, et al., 1996).

Considerando os resultados obtidos com os sequestradores de radicais livres utilizados, sugeriu-se que •OH seja de fato a maior espécie reativa de oxigênio responsável por gerar danos ao DNA em soluções de Cr(III) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A presença de Cr(V) não foi inteiramente compreendida pelos autores, que sugerem uma possível interação entre o radical ascorbato ou deidroascorbato com Cr(IV), ou ainda que haveria pequenas quantidades de Cr(V) e Cr(VI) presentes nesse meio. Dessa forma, o ascorbato funcionaria apenas como um ligante melhor que NADPH e GSH em estabilizar essa menor porção de Cr(V) gerada (Tsou, et al., 1996).

Analisando seus dados, os autores propõem que a produção de •OH e o dano ao DNA provocado por Cr(III) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> são gerados mediante uma reação tipo Fenton, conforme reproduzida abaixo (Tsou, et al., 1996).



Após essas descobertas iniciais, e a partir do surgimento de relatos de casos de efeitos colaterais por suplementação de cromo na mesma década de noventa, a produção científica voltou-se ao estudo dos efeitos deletérios provocados especificamente pelo picolinato de cromo (Figura 5). Este é o suplemento a base de Cr(III) de maior disseminação e utilização com os alegados benefícios no controle da glicemia e composição corporal (Vincent, 2004).

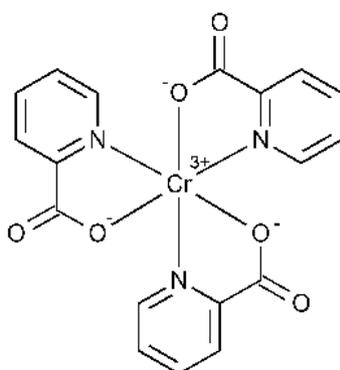


Figura 5 - Estrutura do picolinato de cromo (CrIII).

Os relatos iniciais envolveram estudos de caso com desenvolvimento de nefrite e falência renal crônica após 1,2 a 2,4 mg/dia de picolinato de cromo por 4 a 5 meses com a intenção de perda de peso (Cerulli, et al., 1998); (Wasser, et al., 1997); outros relataram dermatite crônica sistêmica (Fowler, 2000) e piora progressiva nos sentidos cognitivos, perceptivos e motores após ingestão de 200 µg e 400 µg de picolinato de cromo (Huszonek, 1993).

Com os avanços nessa área, foi demonstrada grande capacidade genotóxica e mutagênica do picolinato de cromo, com significativa morte celular. Nas mesmas concentrações, cloreto de cromo e nicotinato de cromo não apresentam os mesmos efeitos tóxicos (Stearns, et al., 2002); (Bagchi, et al., 2002). Em geral creditam-se esses efeitos ao ácido picolínico ao qual o cromo é veiculado e, dessa forma, consideram as demais, como o cloreto de cromo e cromo ligado a niacina, seguras (Lau, et al., 2008).

Especificamente em relação à investigação sobre estresse oxidativo, um trabalho submeteu ratos a doses crônicas de picolinato de cromo, em concentrações baixa (2,7 µg/kg), média (5,3 µg/kg) e alta (10 µg/kg) por 21 dias. Os resultados demonstraram um aumento na peroxidação lipídica nos rins e fígado em todos os grupos tratados. Além disso, a atividade de superóxido dismutase (SOD), glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona reduzida (GSH) nos tecidos hepáticos também diminuíram em todos os que receberam suplementação, enquanto que a catalase (CAT) diminuiu apenas no grupo com maior concentração. SOD e CAT nos tecidos renais também diminuíram em todos os grupos tratados, enquanto GSH e glutaciona redutase (GR) foram reduzidas nas doses média e alta (Mahboob, et al., 2002).

Também já foi demonstrado que picolinato de cromo pode gerar radical hidroxil em reação com peróxido de hidrogênio via reações tipo Haber-Weiss ou Fenton. Devido a composição do complexador do metal (ácido picolínico) e o potencial redox resultante, esse complexo poderia ser prontamente reduzido por agentes biológicos e gerar radical hidroxil (Bagchi, et al., 2002).

Diante da capacidade oxidativa similar entre Cr(VI) e Cr(III), um estudo realizado por Bagchi e colaboradores (2002) teve por objetivo determinar comparativamente os efeitos das duas formas em aumentar o estresse oxidativo a partir da observação da produção de ânion superóxido, radical hidroxil, excreção urinária de metabólitos lipídicos (incluindo MDA), peroxidação lipídica, fragmentação do DNA e

apoptose celular em modelos *in vitro* (cultura de células) e *in vivo* (ratos). Foram avaliadas administrações agudas e crônicas de Cr(VI) e dois suplementos comuns de Cr(III) – picolinato de cromo e cromo ligado a niacina (Bagchi, et al., 2002).

Os resultados mostram uma citotoxicidade induzida por estresse oxidativo mais pronunciada por Cr(VI) em relação a Cr(III) para todos os parâmetros, em concentrações equimolares. Esse comportamento mantém-se mesmo em baixas doses, em administrações agudas ou crônicas, sendo dependente do tempo e da concentração de cromo. Cr(III) apresentou-se menos tóxico que Cr(VI) (cerca de 1000 vezes menos), mas também pode causar toxicidade em altas concentrações e/ou dependendo do ligante ao qual é veiculado. No caso estudado, picolinato de cromo exibiu maior produção de ânion superóxido e maior fragmentação do DNA comparado ao cromo ligado à niacina (Bagchi, et al., 2002).

Os autores concluem que Cr(VI) é mediador na formação de EROs, incluindo ânion superóxido, radical hidroxil e óxido nítrico. É ainda responsável pela diminuição da viabilidade celular, aumento na fragmentação de DNA, dano à membrana celular e apoptose. Esses resultados estão em consonância com observações anteriores em relação ao envolvimento com estresse oxidativo e modulação do gene p53 de regulação da apoptose celular na toxicidade e carcinogenicidade de Cr(VI). Em relação ao Cr(III), eles consideram relativamente não tóxico e benéfico à saúde humana, embora com ressalvas para a segurança da forma picolinato de cromo (Bagchi, et al., 2002).

A capacidade de íons cromo em gerar estresse oxidativo em humanos tem sido estudada a partir de estudos transversais em populações com exposição crônica. Trabalhadores de indústrias de curtimento do couro estão constantemente expostos a Cr(III), enquanto Cr(VI) está presente em soldagens e na fabricação de aço inoxidável. Ao estudar esses trabalhadores em comparação a indivíduos não expostos, Goulart e colaboradores (2005) verificaram que a concentração do metal no plasma e urina foi cerca de duas vezes maior que o encontrado nos indivíduos controles. Os grupos consistiam de 33 indivíduos expostos a Cr(III), 16 expostos a Cr(VI) e 30 controles. A excreção urinária de malonildialdeído (MDA), indicando os níveis de peroxidação lipídica e conseqüentemente de estresse oxidativo, foi significativamente maior nos grupos expostos tanto a Cr(III) quanto a Cr(VI) em comparação com os controles. Apenas para Cr(VI), entretanto, esse aumento apresentou correlação positiva com a concentração plasmática de cromo. Adicionalmente, trabalhadores expostos a

Cr(VI) apresentaram diminuição da concentração intracelular (linfócitos) de GSH, mas não de cisteína, seu precursor, enquanto a exposição a Cr(III) não alterou esses parâmetros (Goulart, et al., 2005).

A exposição a Cr(III) foi analisada também por Khan e colaboradores (2012) a partir de um grupo maior de estudo (100 expostos e 100 não expostos). A concentração plasmática de Cr(III) foi mais expressiva, sendo três vezes maior nos expostos do que nos controles. A análise de estresse oxidativo, a partir da peroxidação lipídica pela concentração plasmática de MDA, foi significativamente maior nos indivíduos expostos. Neste caso foi observada correlação positiva entre níveis de MDA e concentração de Cr(III). Também foi possível observar significativa redução da GSH plasmática nos indivíduos expostos, mantendo correlação negativa com a concentração de Cr(III). Adicionalmente foram analisados a atividade da SOD e danos ao DNA (ensaio do cometa), os quais se apresentaram significativamente maiores nos indivíduos expostos em comparação aos controles e com correlação positiva com a concentração de Cr(III). A análise da prevalência de morbidades entre os grupos revelou ainda que o grupo exposto apresentou maior frequência de diabetes (15%) em comparação com os não expostos (7%) (Khan, et al., 2012).

Dessa forma, embora ainda não esteja comprovada uma relação causal, esses resultados sugerem que a exposição a íons cromo está relacionada a um aumento dos níveis de estresse oxidativo e resposta antioxidante adaptativa em humanos.

Um estudo piloto, randomizado, duplo-cego, placebo controlado, procurou investigar os efeitos da suplementação de Cr(III) na forma de um complexo com L-cisteína (Cr(III)-Cis) para verificar se a presença do antioxidante poderia interferir no estresse oxidativo e na resistência a insulina em indivíduos com diabetes tipo 2 (Jain, et al., 2012). Foi analisada de forma comparativa a suplementação com 400 µg/dia de Cr(III) na forma Cr(III)-Cis (n = 24) e picolinato de cromo (n = 25) por 3 meses. Verificou-se que os níveis de insulina e a própria resistência a insulina foram diminuídas no grupo Cr(III)-Cis após o tratamento, embora sem repercussões na glicemia e hemoglobina glicada. A produção de proteínas carboniladas, indicativo de estresse oxidativo, também foi menor nesse grupo. A suplementação com picolinato de cromo não provocou qualquer alteração em todos os parâmetros analisados, assim como o placebo. Biomarcadores hepáticos não revelaram toxicidade associada a qualquer suplementação (Jain, et al., 2012).

Estudos de longo prazo e de maior proporção ainda são necessários para revelar os efeitos desse novo complexo de Cr(III). Entretanto, a suplementação associada a um antioxidante configura-se como uma boa perspectiva futura que alia os benefícios da melhoria da resistência a insulina com o controle dos níveis de estresse oxidativo que possivelmente possam ser induzidos pelo próprio Cr(III).

## OBJETIVOS

---

### Objetivo geral

Investigar o potencial do micronutriente cromo(III), na forma de cloreto de cromo, e da forma tóxica, Cr(VI), em mediar a formação de radicais livres *in vitro*.

### Objetivos específicos

- i. Identificar a espécie radicalar produzida pela interação entre Cr(III) e Cr(VI) com  $H_2O_2$  *in vitro*;
- ii. Apontar e analisar fatores que influenciem a geração de radicais livres mediada por Cr(III) e Cr(VI) em interação com  $H_2O_2$ ;
- iii. Investigar a capacidade oxidativa de Cr(III) e Cr(VI) em proteínas;
- iv. Contribuir para a discussão do mecanismo envolvido na produção de radicais livres mediada por Cr(III) e Cr(VI).

## MÉTODOS

---

Trata-se de um estudo *in vitro* desenvolvido no Laboratório de Radicais Livres do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília. Os experimentos foram conduzidos em temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ ) e sem controle de oxigenação. Os resultados foram obtidos a partir de pelo menos três experimentos independentes.

### Reagentes

A forma Cr(III) utilizada foi a de cloreto de cromo hexaidratado ( $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) e Cr(VI) como dicromato de potássio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ). As soluções de metais e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , presentes em todos os ensaios, foram preparadas imediatamente antes do início de cada experimento, em solução aquosa. As soluções de ácido tereftálico (TPA), dimetilsulfóxido (DMSO), ácido tiobarbitúrico (TBA), solução de vermelho de fenol tamponada (PRS), 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), albumina sérica bovina (BSA) e  $\beta$ -lactoglobulina, quando necessárias, foram preparadas no dia de cada experimento.

As soluções de DMPO (5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido), 2-Desoxirribose, tampões fosfato e HEPES (N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid] –  $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_4\text{SNa}$ ), ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), hidróxido de sódio (NaOH), vermelho de fenol, *horseradish* peroxidase (HRPO), *Fast Blue* BB, cloreto de sódio (NaCl), ácido clorídrico (HCl), ácido tricloroacético (TCA) e cloreto de guanidina foram preparadas como solução estoque e utilizadas em todos os ensaios de uma mesma metodologia.

Todas as soluções foram preparadas a partir de reagentes puros obtidos dos representantes Sigma ou Merck sendo homogeneizados em meio aquoso.

### Ensaios preliminares para a determinação do tampão

O tampão utilizado nos experimentos foi determinado por meio de ensaios preliminares utilizando HEPES e fosfato, ambos em pH 7,2. Foi escolhida a metodologia de degradação oxidativa da 2-Desoxirribose (2-DR) em meio contendo Cr(VI) e  $\text{H}_2\text{O}_2$  para a realização desses testes (para mais detalhes sobre essa

metodologia, vide sessão Degradação oxidativa da 2-Desoxirribose (2-DR)). Todos os reagentes, na presença de cada tampão, foram incubados por 10 minutos e os resultados estão apresentados na Figura 6.

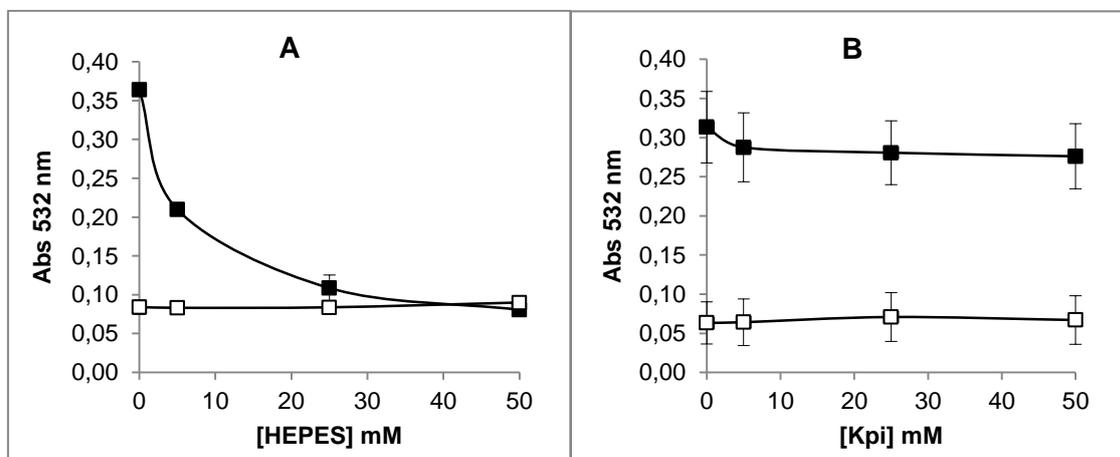


Figura 6–Ensaio preliminares de determinação do tampão: variação da concentração dos tampões HEPES (A) e fosfato (Kpi) (B) em pH 7,2 utilizando a metodologia de degradação oxidativa da 2-desoxirribose. (■) Com adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; (□) Sem adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Condições experimentais: 2-DR 5 mM; Cr(VI) 0,1 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM. N=6.

Com o aumento da concentração de HEPES sua característica de sequestrador de radicais livres ficou bastante pronunciada (Figura 6, A). Esse fato foi previamente demonstrado por Halliwell e colaboradores (2007) em um sistema de geração de •OH contendo Fe(III)-EDTA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e ascorbato em pH 7,4, na mesma metodologia (Halliwell, et al., 2007).

A constante de reação entre HEPES e •OH é dada pela Equação 04, onde A refere-se a absorbância obtida na presença de HEPES a uma dada concentração e A<sup>0</sup> refere-se a absorbância obtida na ausência do sequestrador. O valor da constante  $\kappa_{2-DR}$  é  $3,1 \times 10^9 \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (Halliwell, et al., 2007).

$$\frac{1}{A} = \frac{1}{A^0} \left[ 1 + \frac{\kappa_h[\text{HEPES}]}{\kappa_{2-DR}[2-DR]} \right] \quad \text{Equação 04}$$

É possível perceber que no sistema contendo cromo o tampão HEPES também demonstra uma boa capacidade sequestradora de radicais livres, apresentando constante de reação com o radical hidroxil igual a  $1,08 \times 10^9 \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . Com o tampão fosfato a constante de reação é de  $4,15 \times 10^7 \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , o que sugere capacidade

sequestradora fraca, ou seja, pouca interferência no •OH produzido pelo sistema. Dessa forma, e considerando a característica mais fisiológica do tampão fosfato (Nelson, et al., 2008), optou-se por manter sua utilização em todos os experimentos, em pH 7,2.

## **Formação de radical hidroxil (•OH):**

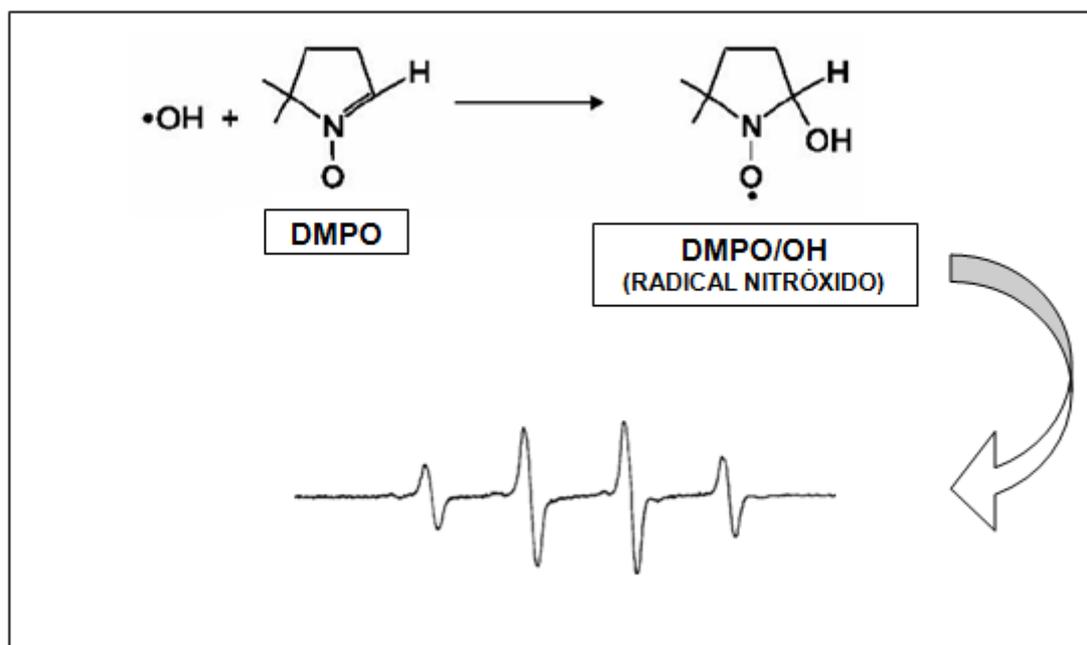
### **i. Método de Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)**

Na técnica de Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (do inglês *Electron Paramagnetic Resonance* – EPR), elétrons desemparelhados sofrem ressonância quando submetidos a um campo magnético de acordo com o momento magnético de *spin* do elétron livre. Assim, o equipamento utilizado provê um campo magnético externo a amostra, a partir de um ímã, e fornece a energia necessária para a ressonância em microondas. Cada radical livre absorve uma quantidade específica e característica de energia, que pode ser medida e demonstrada na forma de um espectro único. Trata-se do único método direto de detecção de radicais livres (Halliwell, et al., 2007).

A maioria dos radicais livres, entretanto, possui meia vida muito curta (estima-se de  $10^{-6}$  segundos para o radical hidroxil), tanto em condições experimentais quanto fisiológicas, dificultando que as concentrações mínimas de detecção do aparelho sejam atingidas (de  $10^{-9}$  M a  $10^{-6}$  M) (Halliwell, et al., 2007). Desse modo, são utilizados captadores de *spin* (sequestradores, *spin trapping*) a fim de transformá-los em radicais livres mais estáveis. Assim, sua estabilidade garante que se acumule, atingindo concentrações detectáveis pelo aparelho (Weil, et al., 1994); (Halliwell, et al., 2007); (Nakamura, et al., 2010); (Freinbichler, et al., 2011).

Para a detecção do radical hidroxil foi utilizado o captador de *spin* DMPO. O produto da sua reação com •OH é o radical nitróxido DMPO/•OH, que possui espectro de EPR característico, com 4 linhas (Esquema 5). Esse sinal é resultante do acoplamento hiperfino do elétron livre do grupo nitróxido do captador de *spin* com o hidrogênio  $\beta$ , mantendo uma proporção entre as linhas de 1:2:2:1 ( $A_N \cong A_{\beta H} = 15$  G) (Nakamura, et al., 2010). Há uma relação direta entre a intensidade do sinal (tamanho) e

sua concentração na amostra (Genaro-Mattos, 2009). Essa técnica permite verificar diretamente a produção de  $\bullet\text{OH}$  pelos íons  $\text{Cr(III)}$  (Shi, et al., 1993); (Tsou, et al., 1996).



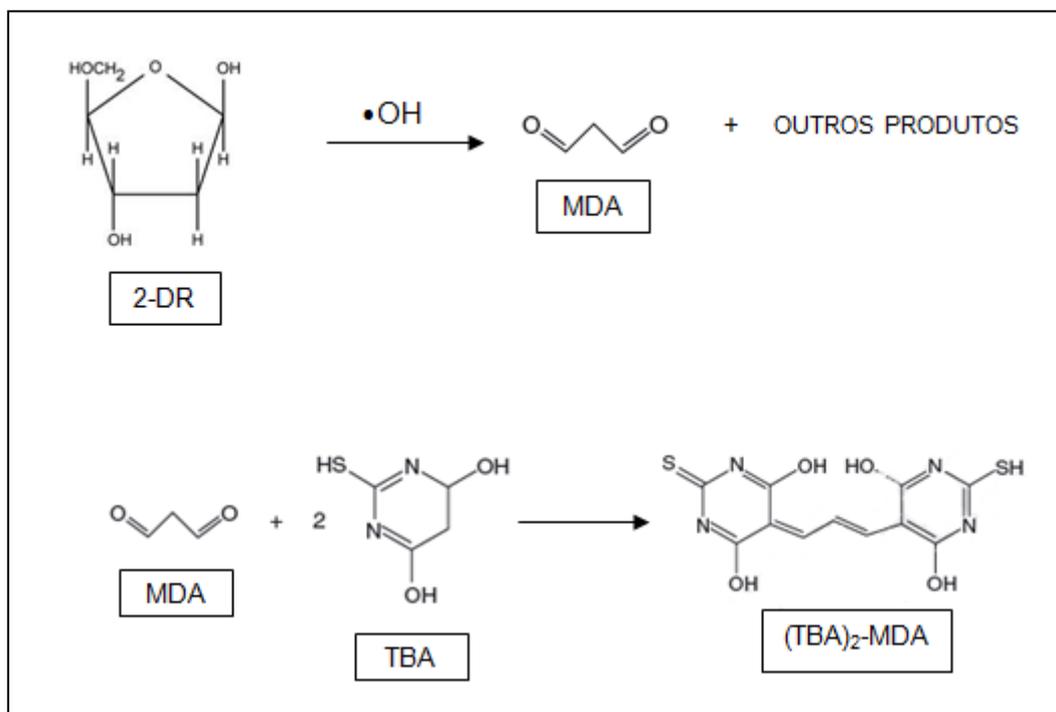
Esquema 5 - Reação do radical hidroxil com o captador de *spin* DMPO, formando o radical nitróxido DMPO/ $\bullet\text{OH}$  e seu espectro de EPR característico.

Foi utilizado o equipamento Bruker ESP 300 com frequência de microonda de 9,81 GHz, frequência de modulação de 100 KHz, amplitude de modulação de 0,359 G, potência de 0,2 mW e ganho de  $1 \times 10^5$ . As condições experimentais padrão consistiram de meio aquoso tamponado pH 7,2, temperatura ambiente ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ), 5 mM de tampão fosfato (Kpi), 2 mM de  $\text{Cr(III)}$  ou  $\text{Cr(VI)}$ , 10 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e 50 mM de DMPO, com tempo de incubação de 30 minutos após a adição do DMPO. Os espectros obtidos foram analisados com o auxílio do software WINEPR® para sistema operacional Windows® e estão apresentados em termos dos valores de amplitude da linha mais intensa (tamanho) em unidades arbitrárias (U.A.).

Todos os experimentos foram realizados em colaboração com o prof. Dr. Antônio Alonso do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás (IF – UFG) e do Mestre em Química (UnB) Thiago C. Genaro Mattos.

## ii. Degradação oxidativa da 2-Desoxirribose (2-DR)

O método de degradação oxidativa da 2-Desoxirribose é um dos mais populares para a determinação de radicais hidroxil e atividade anti e pró-oxidante de compostos *in vitro* devido a sua simplicidade e baixo custo (Hermes-Lima, 2004). A oxidação da 2-DR pelo  $\bullet\text{OH}$  produz, dentre outros compostos, malonildialdeído (MDA). A adição de ácido tiobarbitúrico (TBA), em meio ácido e após aquecimento, forma um cromógeno de coloração rosa  $(\text{TBA})_2\text{-MDA}$ , que pode ser quantificado por espectrofotometria em 532 nm (Esquema 6) (Cheeseman, et al., 1988); (Lopes, et al., 1999); (Genaro-Mattos, et al., 2009).



Esquema 6 - Degradação oxidativa da 2-Desoxirribose e formação do cromógeno  $\text{TBA}_2\text{-MDA}$ .

O sistema gerador de  $\bullet\text{OH}$  neste trabalho consistiu de reação tipo Fenton, na presença de um metal e  $\text{H}_2\text{O}_2$ . As condições experimentais padrão foram, na ordem de adição, tampão fosfato (K $\pi$ i) 10 mM (pH 7,2), água deionizada, 2-Desoxirribose 5 mM,  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM e metal (ferro ou cromo) 0,1 mM em 0,5 mL de volume final. Após a incubação (tempo variável, indicado em cada resultado), as reações foram interrompidas com a adição de 0,5 mL de ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) 4 % e 0,5 mL de TBA 1% preparado em hidróxido de sódio (NaOH) 50 mM. As amostras foram então aquecidas

sob imersão em água a temperatura de ebulição (~ 98°C) por 15 minutos com posterior determinação da absorbância em espectrofotômetro (532 nm) após retorno a temperatura ambiente.

Os resultados foram expressos em termos de concentração de MDA em nmol.ml<sup>-1</sup> com a utilização do coeficiente de extinção molar de 153 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>, calculada a partir da Equação 05 (Avellar, et al., 2004).

$$[\text{MDA}]_{\text{nmol.ml}^{-1}} = \frac{A_{532\text{ nm}} \times 1000}{153} \quad \text{Equação 05}$$

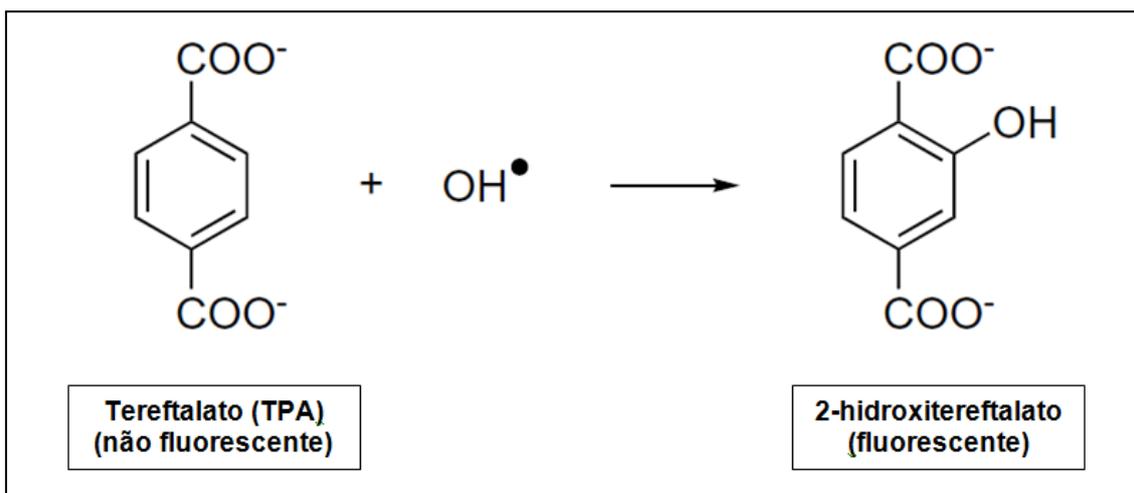
Essa técnica permite a detecção indireta da formação do radical •OH e o efeito do Cr(III) em uma biomolécula, o carboidrato 2-DR.

### iii. Hidroxilação do ácido tereftálico (método fluorimétrico)

O método de hidroxilação do ácido tereftálico (TPA) faz parte de uma classe de métodos de detecção de radicais livres baseados em hidroxilação aromática. Nesses métodos é pré-requisito a presença de um sequestrador de radicais livres efetivo, bioquimicamente inerte e específico para o radical que se pretende medir, função desempenhada neste caso pelo TPA (Freinbichler, et al., 2011).

O ensaio escolhido é comumente utilizado para detectar especificamente radical hidroxil formado tanto pela interação entre metais de transição e peróxido de hidrogênio via reação de Fenton como de outros processos, incluindo, por exemplo, a radiólise da água. A reação entre o •OH e o tereftalato produz o 2-hidroxitereftalato, por uma constante de reação de  $3,3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , a partir de hidroxilação aromática, em que um hidrogênio do anel aromático é abstraído e substituído por um grupo hidroxil (Esquema 7) (Saran, et al., 1999); (Barreto, et al., 1995).

O produto dessa reação, 2-hidroxitereftalato, é intensamente fluorescente, enquanto o reagente utilizado, tereftalato, não apresenta fluorescência. Esse produto é o único isômero formado, uma vez que a molécula de tereftalato é simétrica em relação ao anel de hidroxilação. É ainda estável por horas, podendo ser quantificado por fluorímetros padrão (Saran, et al., 1999); (Freinbichler, et al., 2008).



Esquema 7 - Hidroxilação do ácido tereftálico (TPA) pelo radical hidroxil produzindo 2-hidroxitereftalato.

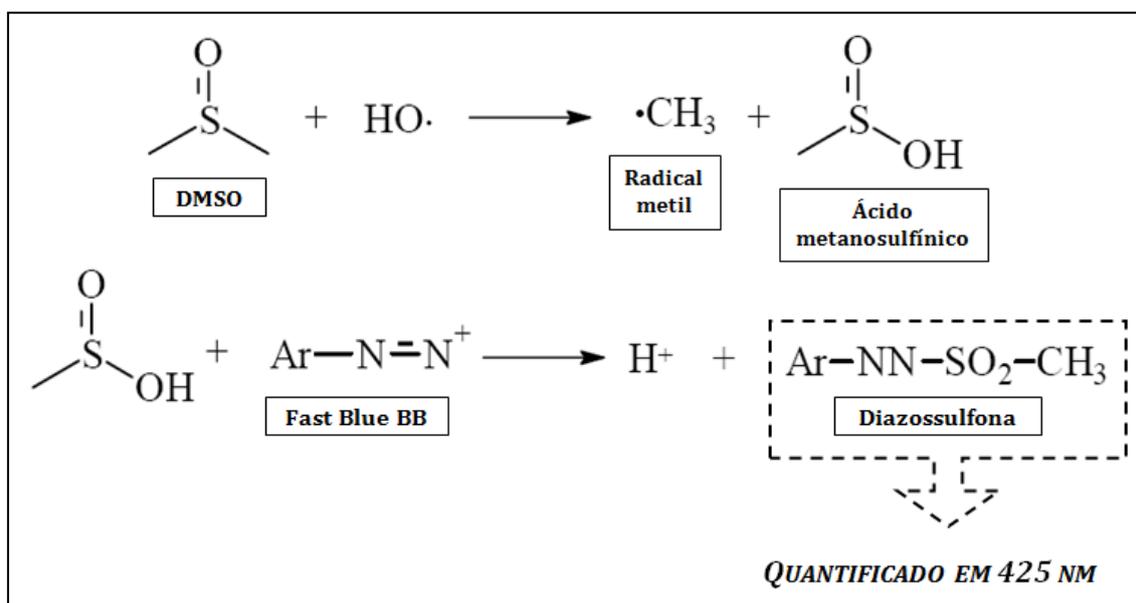
As condições experimentais consistiram de, em ordem de adição, tampão fosfato 5mM pH 7,2, água deionizada suficiente para atingir o volume final, TPA 3 mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 μM ou 100 μM, e Cr(III) 5 μM ou 10 μM. Foi mantido um curso temporal de até 72 horas com leituras realizadas nos comprimentos de onda de 309 nm de excitação e 412nm de emissão. Foram conduzidos controles na ausência de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou Cr(III).

Apesar de também detectar radical hidroxil de forma indireta, a utilização de fluorescência é muito mais sensível que absorvância, o que permite a utilização de baixas concentrações de reagentes e ajuda a minimizar possíveis interferências (Freinbichler, et al., 2011).

#### **iv. Oxidação do dimetilsulfóxido (DMSO) (análise espectrofotométrica de metanosulfinato)**

A reação do radical hidroxil com o dimetilsulfóxido (DMSO) causa a geração de ácido metanosulfínico como principal produto, com característica estável e covalente, cuja acumulação relaciona-se com a taxa de geração de •OH. Esta reação produz radical metil de forma secundária. A quantificação de metanosulfinato pode ser feita de forma simples por colorimetria a partir da sua reação com um sal de diazônio (*Fast Blue* BB) produzindo uma diazossulfona, que pode ser quantificada

espectrofotometricamente em 425nm (Esquema 8) (Steiner, et al., 1990); (Scaduto, 1995); (Avellar, et al., 2004).



Esquema 8 - Produção de ácido metanosulfínico a partir da reação do DMSO com radical hidroxil e sua quantificação como diazossulfona após reação com *Fast Blue BB*.

O meio reacional foi composto por tampão fosfato 5 mM, pH 7,2, água deionizada, DMSO 5%, *Fast Blue BB* 3 mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM e Cr(III) 1 mM. Esse meio foi mantido por até 240 minutos de incubação, com leituras parciais, e um controle sem a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi conduzido nos pontos 0 e 240 minutos. Peróxido de hidrogênio puro não é capaz de oxidar o DMSO e produzir ácido metanosulfínico (Steiner, et al., 1990).

### **Concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Oxidação do vermelho de fenol mediada pela *Horseradish* peroxidase dependente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

O método para a mensuração da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi utilizado a partir da adaptação da proposta inicial de Pick e Keisari (1980). Trata-se de um método baseado na oxidação da fenolsulfoftaleína (ou vermelho de fenol) (Figura 7) mediada pela enzima *Horseradish* peroxidase (HRPO) dependente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O composto resultante apresenta um espectro de absorção no UV diferente do vermelho de fenol reduzido, indo do rosa ao roxo com o aumento da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 8). Seu

pico de absorção ocorre em 610 nm, podendo então ser quantificado espectrofotometricamente.

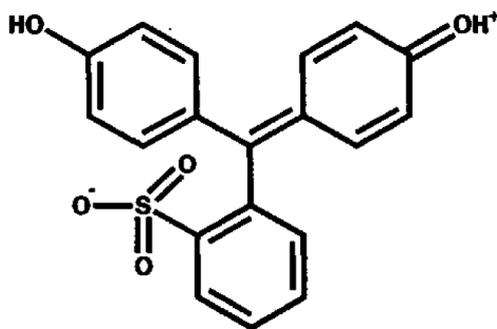


Figura 7 - Estrutura química do vermelho de fenol (Yamaguchi, et al., 1997).



Figura 8 - Demonstração visual da mudança de coloração do vermelho de fenol com o aumento da concentração de  $H_2O_2$  entre  $0\mu M$  e  $100\mu M$ . Condições experimentais: 140 mM NaCl, 10 mM Kpi, pH 7,2, 0,28 mM ( $0,1\text{ g/L}$ ) vermelho de fenol e 8,5 U/mL ( $50\mu\text{g/mL}$ ) HRPO.

Outro substrato comumente utilizado é a escapoletina, baseado na diminuição da fluorescência do composto. Entretanto, a técnica com o vermelho de fenol apresenta vantagens por (1) não necessitar de fluorímetro; (2) permitir a análise de um número maior de amostras por experimento; (3) a produção de  $H_2O_2$  pode ser acompanhada em intervalos de 5 a 60 minutos sem ser necessário restituir o substrato oxidado pelo  $H_2O_2$  (Pick, et al., 1980). Por outro lado, o método com vermelho de fenol apresenta menor sensibilidade, não detectando concentrações menores que  $1\mu M$  de  $H_2O_2$ . No sistema gerador de  $H_2O_2$  estudado neste trabalho isso não representa uma

limitação, uma vez que as variações observadas são consideravelmente maiores que 1  $\mu\text{M}$ .

Inicialmente foi realizado um espectro de absorção, entre 320 nm e 720 nm, de solução contendo 20 mg/L (0,056 mM) de vermelho de fenol e 8,5 U/mL (50  $\mu\text{g/mL}$ ) de HRPO na presença e ausência de 1 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Esse espectro foi conduzido assim como descrito na publicação original, em pH alcalino, pela adição de NaOH 1 N até atingir pH 12,5. Adicionalmente foi conduzido também em pH fisiológico (7,2), no qual todos os demais experimentos deste trabalho foram realizados. A esta condição foi acrescentado tampão fosfato 10 mM ao início da pipetagem e não foi adicionado NaOH.

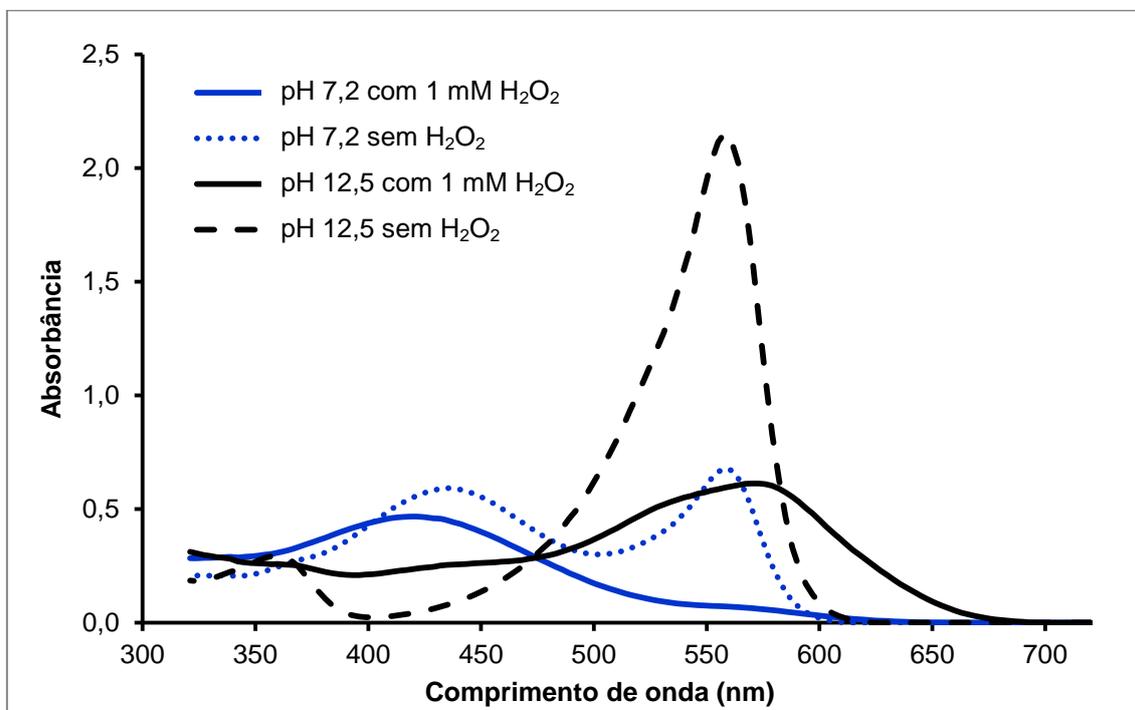


Figura 9 - Espectro de absorção de solução contendo vermelho de fenol (20 mg/L) e HRPO (8,5 U/mL) na presença e ausência de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mM), em pH 12,5 e pH 7,2. Os espectros de absorção referem-se a média de três leituras para cada condição. Leituras superiores a 1,0 de absorbância foram obtidas a partir da diluição da amostra.

Os espectros de absorção, apresentados na Figura 9, demonstram a reprodução do método original, em que a região entre 600 nm e 610 nm apresenta a maior diferença mensurável entre o vermelho de fenol oxidado e não oxidado. Em pH 7,2, entretanto, não há reprodução do padrão de absorção. Assim, determinou-se que a fase experimental seria mantida em pH 7,2 mas a fase de leitura seria conduzida após elevação do pH 12,5 com adição de NaOH.

O método original utiliza em todos os ensaios uma solução de vermelho de fenol tamponada (PRS, do inglês *phenol red solution*) contendo 140 mM de NaCl, 10 mM de tampão fosfato, pH 7,0; 5,5 mM de dextrose, 0,28 mM (0,1 g/L) de vermelho de fenol e 8,5 U/mL (50 µg/mL) de HRPO. Entretanto, foi conduzida uma padronização para verificar a dependência da dextrose na relação entre oxidação do vermelho de fenol e concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, uma vez que o meio reacional estudado aqui pressupõe a geração de radicais livres potencialmente reativos a biomoléculas como esse açúcar.

Assim, foi produzida uma curva padrão para estabelecer o valor da absorbância obtida a 610 nm de soluções com concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> conhecida (entre 0 µM e 100 µM), na presença e ausência de dextrose 5,5 mM. O pH da solução de PRS foi fixado em 7,2 e as concentrações dos demais reagentes permaneceram inalteradas. Após a adição de PRS a reação foi mantida por cinco minutos em temperatura ambiente (25°C ± 1) com posterior adição de NaOH 1 N.

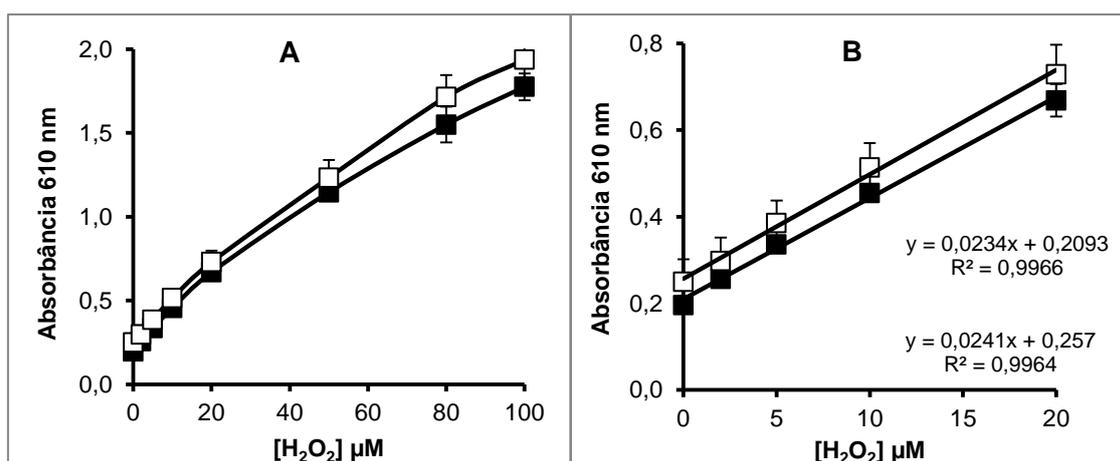


Figura 10 - Curva padrão do ensaio de oxidação do vermelho de fenol pela *Horseradish* peroxidase com concentrações conhecidas de peróxido de hidrogênio, na presença (■) e ausência (□) de dextrose 5,5 mM. *Condições experimentais*: 140 mM NaCl, 10 mM Kpi, pH 7,2, 0,28 mM (0,1 g/L) vermelho de fenol e 8,5 U/mL (50 µg/mL) HRPO. Leituras superiores a 1,0 de absorbância a 610 nm foram obtidas a partir da diluição 1:1 da amostra. A) Variação da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entre 0 µM e 100 µM. B) Destaque para variação da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na faixa entre 0 µM e 20 µM. N=4.

É possível observar pela Figura 10 que há uma relação linear entre a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a absorbância a 610 nm, especialmente na faixa entre 2 µM e 20 µM, com valores de absorbância obtidos dentro da precisão do espectrofotômetro, obedecendo a lei de Lambert-Beer. A relação é mantida com a mesma linearidade tanto na ausência quanto na presença de dextrose. Assim, foram obtidas as equações preditivas da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de acordo com a leitura obtida (para nossas

condições experimentais), sendo utilizada a opção de solução de PRS sem dextrose para os demais experimentos Equação 06.

$$[\text{H}_2\text{O}_2] \mu\text{M} = \frac{(\text{Abs}_{610\text{nm}} - 0,257)}{0,024} \quad \text{Equação 06}$$

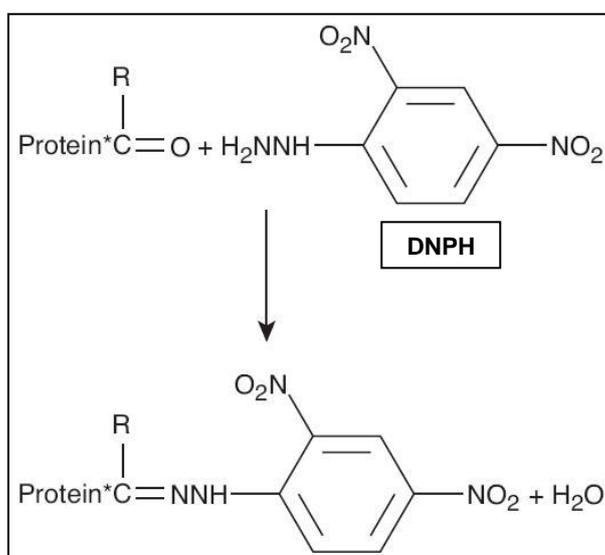
Para a série de experimentos posteriores foram feitas soluções estoque de HRPO 0,5 mg/mL em tampão fosfato 0,05 M armazenadas em alíquotas individuais para cada experimento em -20 °C. A solução estoque de vermelho de fenol 10 g/L foi armazenada a 4 °C coberta com papel alumínio. Para NaCl 0,5 M e tampão fosfato 0,5 M, as soluções foram armazenadas a 4°C. Todas as soluções foram mantidas por no máximo dois meses. A solução de PRS contendo estes reagentes era preparada no dia do ensaio.

A condição experimental padrão continha, em ordem, tampão fosfato 10 mM, água deionizada (suficiente para completar o volume final), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1mM e o metal estudado (ferro e ou cromo) em concentrações variáveis de acordo com o objetivo do experimento. Após o tempo de incubação foi retirada uma alíquota de 10 µL deste meio reacional e adicionado 1mL de PRS (concentração final 140 mM NaCl, 10 mM Kpi, 0,28 mM vermelho de fenol e 8,5 U/mL HRPO) e mantido por cinco minutos com posterior adição de 10 µL de NaOH 1 N. As leituras no espectrofotômetro foram realizadas em 610 nm utilizando água deionizada como branco.

### **Oxidação de proteínas: formação de proteínas carboniladas**

A presença de proteínas carboniladas em células e tecidos é considerada um importante biomarcador de estresse oxidativo. Sua determinação foi conduzida conforme proposto por Levine e colaboradores (1990) e descrito por Zhu e colaboradores (2002). O método é baseado na reação dos resíduos carbonílicos, resultado da ação do radical hidroxil nas moléculas de proteínas, com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), formando uma hidrazona que pode ser quantificada espectrofotometricamente (Esquema 9).

Foram utilizadas proteínas purificadas (albumina sérica bovina – BSA – e β-lactoglobulina) como alvo de radicais livres produzidos *in vitro*. Tem-se destacado a utilização de albumina em estudos de bioquímica e biofísica por ser a proteína mais abundante no sistema circulatório, podendo portanto entrar facilmente em contato com íons metálicos (Shrivastava, et al., 2000); (Zhang, et al., 2009). Por outro lado, a β-lactoglobulina foi utilizada para garantir a reprodutibilidade dos resultados, de forma a não serem restritos às estruturas e características inerentes apenas a um tipo de proteína.



Esquema 9 - Reação entre a proteína carbonilada e a 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (Cayman Chemical Company, 2011).

O meio reacional gerador do dano a proteína consistiu de tampão fosfato 10 mM, pH 7,2, água deionizada (suficiente para completar 1 mL de volume final), proteína purificada (BSA ou β-lactoglobulina) 1 mg/mL (equivalente a 1,5 mM de BSA ou 0,54 μM de β-lactoglobulina), metal (ferro ou cromo) 0,1 mM e  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM. A solução estoque de proteína foi feita a 60 mg/mL e mantida a  $-20^\circ\text{C}$  por no máximo uma semana. A diluição dessa solução e o preparo de todas as demais eram realizados no dia de cada experimento. O meio reacional foi incubado por dez minutos ou quatro horas, de acordo com o objetivo do experimento, em temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C} \pm 1$ ).

Após esse período foi adicionado 0,5 mL de DNPH 10 mM (solução preparada em HCl 2 M) e mantido por uma hora em temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C} \pm 1$ ) com agitação vigorosa em vórtex imediatamente após a adição de DNPH e 30 minutos depois. A cada condição experimental foi feito um controle com a adição de apenas HCl

2 M em substituição ao DNPH. Após esse período foi adicionado 0,5 mL de TCA 20 % (p/v) e mantido em gelo por 10 minutos após agitação vigorosa (vórtex) para a precipitação das proteínas. Posteriormente essa solução foi centrifugada a 10.000xg por cinco minutos, seguido do descarte do sobrenadante.

O precipitado foi então lavado com 1mL de solução de etanol e acetato de etila (na proporção 1:1) por três vezes, seguida de agitação vigorosa (vórtex) e centrifugação a 10.000xg por cinco minutos a cada lavagem. Essa ação busca eliminar o excesso de DNPH não ligado a proteínas e demais corantes interferentes. O precipitado lavado foi então dissolvido em 1 mL de cloreto de guanidina 6 M, pH 2,3, e novamente centrifugado por cinco minutos a 10.000xg.

A leitura em espectrofotômetro foi conduzida com 0,8 mL do sobrenadante, utilizando o cloreto de guanidina como branco. Os controles com HCl foram lidos em 280 nm para a determinação da concentração de proteínas. Para este cálculo, os coeficientes de extinção molar ( $\epsilon_{280\text{ nm}}^{1\%}$ ) utilizados para as proteínas de referência foram de 6,6 para a BSA (Fonseca, 2009) e de 0,118 para a  $\beta$ -lactoglobulina (Ye, et al., 2000) e calculados de acordo com as Equações 07 e 08.

$$\text{BSA (mg.mL}^{-1}\text{)} = \frac{(\text{Abs}_{280\text{ nm}} \times 10)}{6,6} \quad \text{Equação 07}$$

$$\beta\text{-lactoglobulina (mg.mL}^{-1}\text{)} = \frac{(\text{Abs}_{280\text{ nm}} \times 10)}{0,118} \quad \text{Equação 08}$$

Os pontos experimentais foram lidos em 370 nm para a determinação da concentração de proteínas carboniladas. O coeficiente de absorção do complexo proteína-DNPH é de  $2,2 \times 10^4 \text{ nmol.mL}^{-1}$ . Assim, o cálculo da concentração de proteínas carboniladas em  $\text{nmol.mL}^{-1}$  foi realizado a partir da Equação 09.

$$[\text{Proteínas carboniladas}] (\text{nmol.mL}^{-1}) = \frac{(\text{Abs}_{370\text{ nm}} \times 10^2)}{2,2} \quad \text{Equação 09}$$

Os resultados finais foram expressos em termos de concentração de proteínas carboniladas por concentração de proteína pura.

## **Análise Estatística**

A análise estatística foi conduzida quando a diferença entre pontos apresentou-se indispensável para a discussão. Nesses casos, foi aplicada uma análise de variância simples (ANOVA) para dados com distribuição normal. Nos eventos que se apresentaram diferentes estatisticamente, foi ainda aplicado o teste *Student Newman Keuls* (SNK) pós-ANOVA para a comparação entre as múltiplas médias. A análise foi conduzida com o auxílio do software MYNOVA® para DOS.

### Capítulo I - Formação de radicais livres mediada por Cr(III)

#### A. Identificação do radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ) produzido pelo sistema $\text{Cr(III)} + \text{H}_2\text{O}_2$

A capacidade de uma molécula em gerar radicais livres ou, como nesse caso, de um metal de transição em catalisar sua formação, pode ser verificada por diversos métodos hoje disponíveis, com diferentes especificidade e sensibilidade. Devido a alta instabilidade dessas espécies, entretanto, apenas o método de EPR é capaz de detectar de forma direta sua produção e ainda identificar a molécula formada (Halliwell, et al., 2007); (Nakamura, et al., 2010).

Assim, a partir dos sinais obtidos com o captador de *spin* DMPO (50 mM) foi possível confirmar a capacidade de íons Cr(III) (2 mM) em gerar radicais livres na forma de radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ) na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10 mM) após 30 minutos de incubação. Na ausência dos reagentes, Cr(III) ou  $\text{H}_2\text{O}_2$ , não é observada a formação de qualquer espécie radicalar detectável nas condições do equipamento. A identificação do  $\bullet\text{OH}$  dá-se pela formação característica do sinal com quatro linhas do DMPO/ $\bullet\text{OH}$  observado na Figura 11.

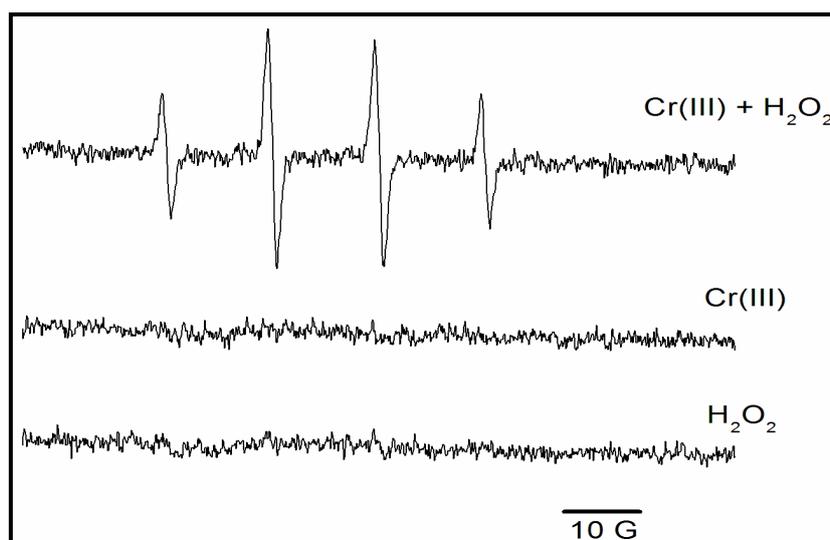


Figura 11 - Sinal de formação do complexo DMPO/ $\bullet\text{OH}$  em EPR após 30 minutos de incubação com Cr(III) e  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Condições experimentais: K<sub>pi</sub> 5 mM, pH 7,2; DMPO 50 mM;  $\text{H}_2\text{O}_2$  10 mM; Cr(III) 2 mM.

Esta confirmação reitera os resultados inicialmente propostos por Shi e colaboradores (1993), com a utilização de DMPO 60 mM, Cr(III) 1 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM (Shi, et al., 1993), e posteriormente confirmados por Mattagajasingh e colaboradores (2008) com DMPO 40 mM, Cr(III) 0,1 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3 mM (Mattagajasingh, et al., 2008). Todos comprovaram ainda que Cr(III) ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> individualmente não são capazes de produzir •OH (Shi, et al., 1993); (Mattagajasingh, et al., 2008).

### **B. Cinética de formação de radical hidroxil (•OH) pelo sistema Cr(III) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

O curso temporal de formação do radical •OH, mediada pelo sistema Cr(III) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foi verificado inicialmente com o método de degradação oxidativa do açúcar 2-DR. A cinética foi conduzida com 0,1 mM de Cr(III) e 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incubados por até 240 horas (10 dias). A apresentação do resultado foi dividida entre a cinética obtida no período de 0 a 24 horas (Figura 12) e de 24 a 240 horas (Figura 13) para melhor visualização e análise. Em ambos estão apresentados os controles conduzidos na ausência de Cr(III) e na ausência de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Observa-se que nos dois períodos analisados a incubação de Cr(III) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provocou uma degradação crescente da 2-DR, mesmo com 10 dias de incubação em condições ambientais de temperatura e oxigenação. O dano oxidativo acumulado após 240 horas produziu  $11,5 \pm 1,03$  nmol.ml<sup>-1</sup> de MDA. A produção de MDA induzida apenas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, na ausência de Cr(III), foi em média de  $0,274 \pm 0,033$  nmol.ml<sup>-1</sup>, independente do tempo de incubação. Cr(III), por outro lado, apresentou produção de MDA média de  $0,109 \pm 0,021$  nmol.ml<sup>-1</sup> quando incubado na ausência de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

O dano provocado apenas por Cr(III) assemelha-se ao obtido a partir da degradação natural da 2-DR pura, em meio contendo apenas 2-DR 5 mM, tampão fosfato 5 mM, pH 7,2 e água deionizada pelos 10 dias de incubação, com produção média de MDA de apenas  $0,106 \pm 0,026$  nmol.ml<sup>-1</sup> (série não inserida nos gráficos). Esses valores são 100 vezes menores que o obtido pela série experimental na presença de Cr(III) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, destacando novamente a dependência de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para gerar oxidação da 2-DR mediada pelo metal Cr(III).

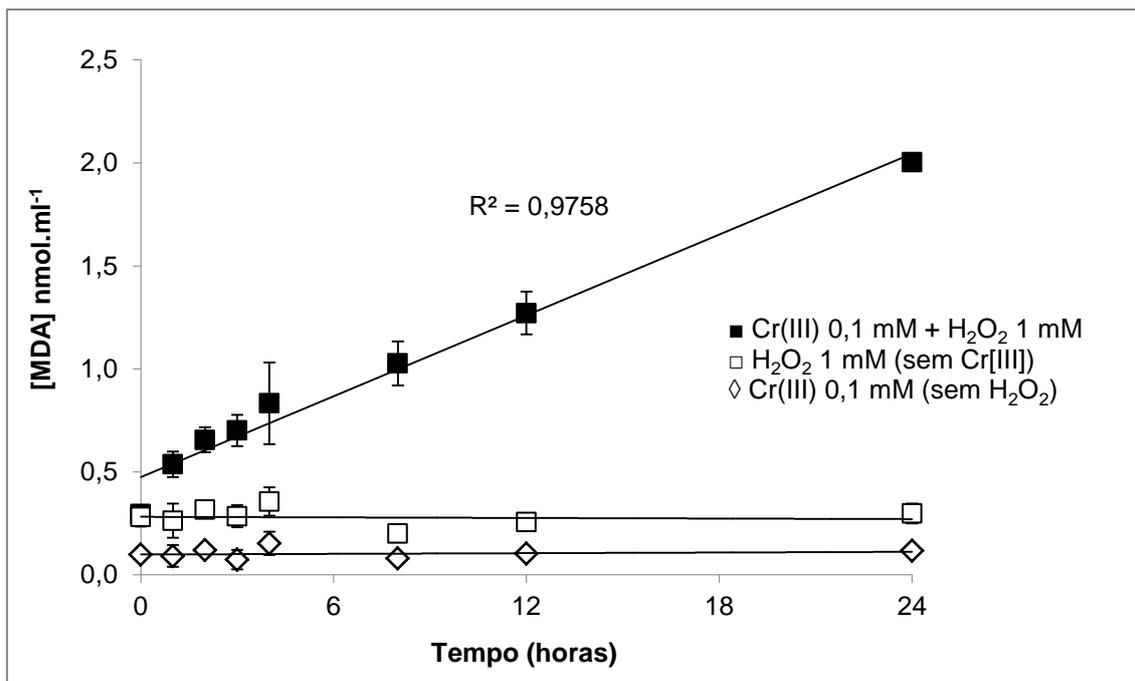


Figura 12 - Formação de MDA pela degradação oxidativa da 2-Desoxirribose entre 0 e 24 horas de incubação com Cr(III) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Condições experimentais: KPi 5 mM, pH 7,2; 2-DR 5 mM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM; Cr(III) 0,1 mM. N=6.

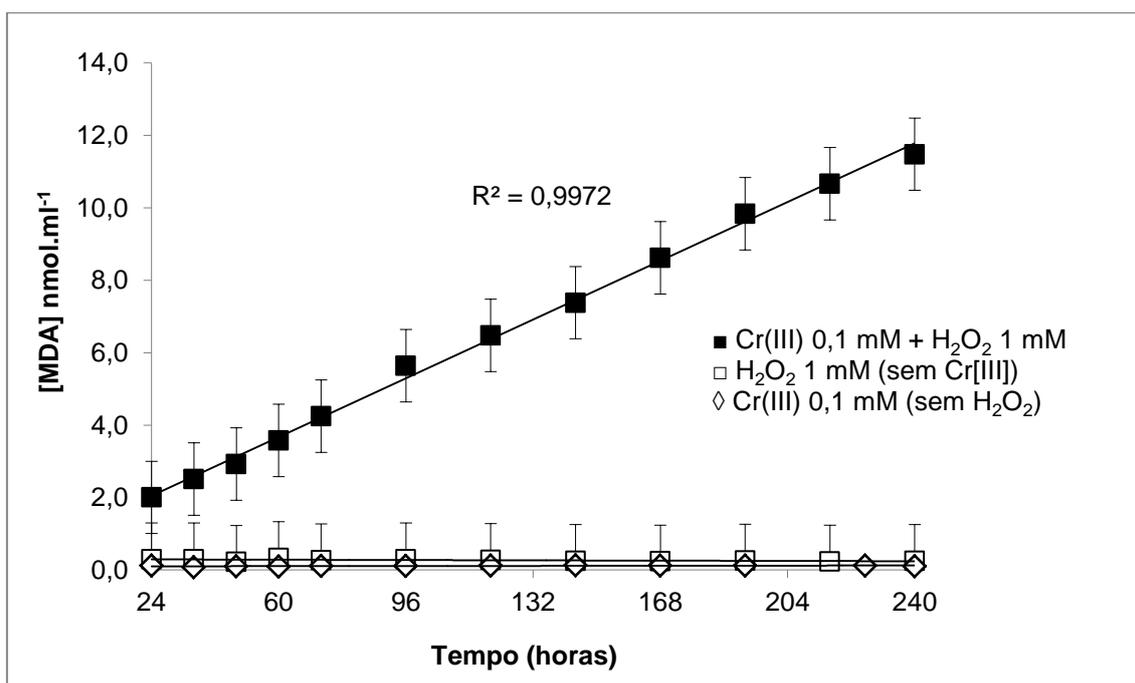


Figura 13 - Formação de MDA pela degradação oxidativa da 2-Desoxirribose entre 24 e 240 horas de incubação com Cr(III) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Condições experimentais: KPi 5 mM, pH 7,2; 2-DR 5 mM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM; Cr(III) 0,1 mM. N=6.

O comportamento de produção contínua de •OH mediada por Cr(III) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> difere do observado com o Fe(II), em que uma incubação de 10 minutos é suficiente para a saturação da reação na metodologia da 2-DR (Avellar, et al., 2004);

(Genaro-Mattos, et al., 2009). Essa extensa duração de uma reação radicalar, como a observada nesses resultados com o Cr(III), ainda não havia sido verificada até o momento por nenhum outro metal.

Mesmo após esse longo período de incubação, ainda não foi possível observar o momento em que esse sistema finaliza a produção de todos os seus efeitos potenciais. Uma análise da velocidade de produção de MDA por esse período revela que há uma maior produção de  $\bullet\text{OH}$  na primeira hora de incubação, seguida de uma desaceleração pelas 48 horas seguintes (Figura 14). A partir de então a reação atinge o equilíbrio e passa a manter uma velocidade constante até o final do período analisado.

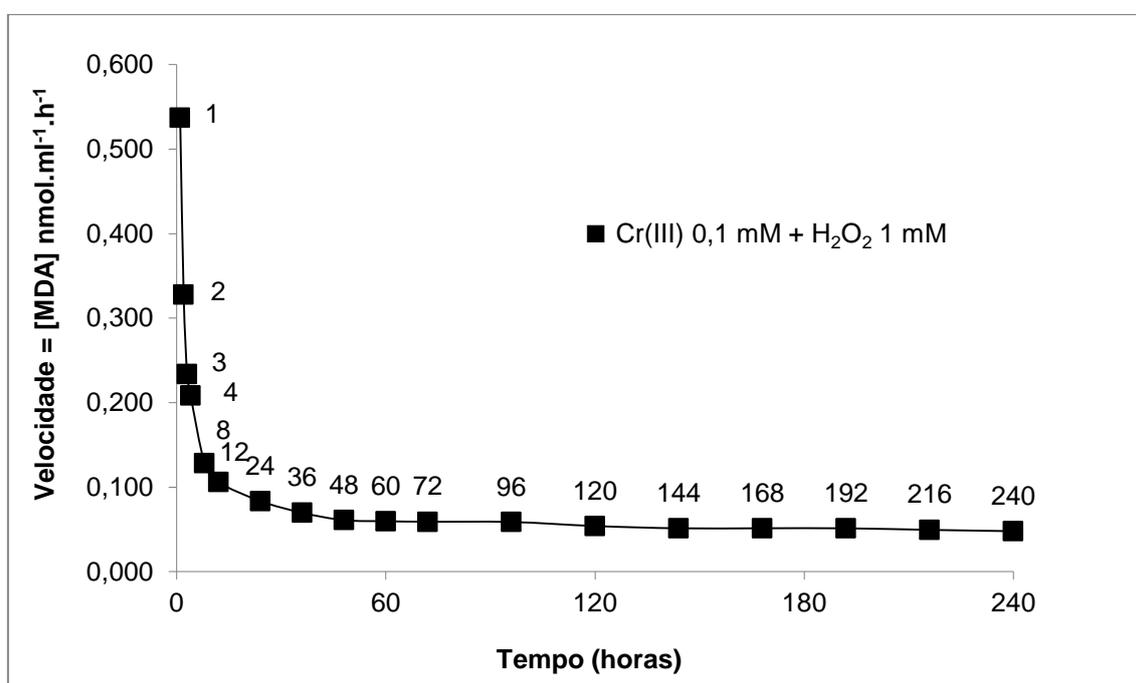


Figura 14 – Velocidade de formação de MDA pela degradação oxidativa da 2-Desoxirribose entre 1 e 240 horas de incubação com Cr(III) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

A utilização de outro método de detecção de radical hidroxil, a partir da hidroxilação do ácido tereftálico (TPA), demonstrou novamente a capacidade de íons Cr(III) em manter-se reagindo com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e produzindo  $\bullet\text{OH}$  de forma contínua por até 72 horas (3 dias), tempo em que a reação foi mantida. A Figura 15 demonstra que as séries experimentais assemelham-se em linearidade com o método da 2-DR. Foi mantida a mesma proporção dos reagentes Cr(III) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> igual a 1:10 em relação a metodologia anterior.

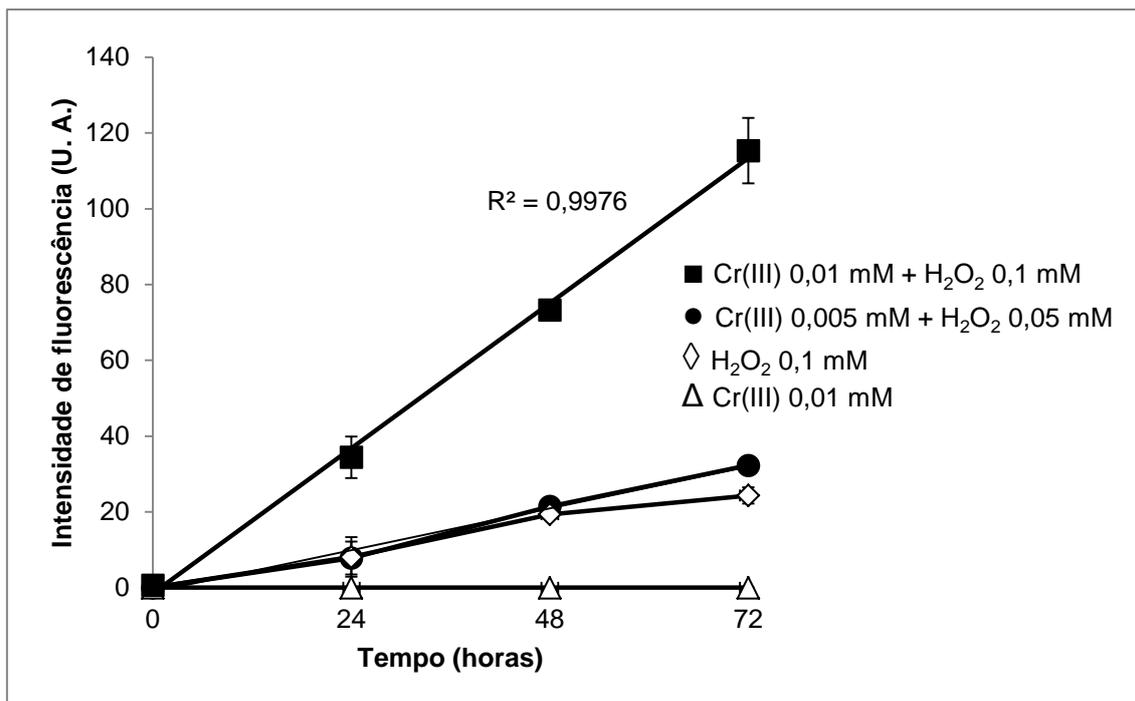


Figura 15 - Hidroxilação do ácido tereftálico (TPA) mediada por Cr(III) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por até 72 horas (3 dias) de incubação. Condições experimentais: KPi 5 mM, pH 7,2; TPA 3 mM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 ou 100 μM; Cr(III) 5 ou 10 μM. N=6.

Nesse caso, também foi possível verificar com maior expressão a capacidade do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em também produzir •OH, mesmo na ausência de Cr(III).

A capacidade do Cr(III) em manter-se reagindo continuamente para gerar radical hidroxil foi verificada, portanto, por dois métodos com características distintas. Uma delas refere-se ao princípio para a detecção de •OH: um a partir da degradação oxidativa de um açúcar e outro por hidroxilação aromática de um composto fluorescente. Outra característica diferenciada entre essas metodologias é a sensibilidade: enquanto o método da 2-DR apresenta seus resultados em termos de absorvância, o método de hidroxilação do tereftalato é observado em fluorescência, muito mais sensível (Freinbichler, et al., 2008). Ainda assim, mesmo com essas diferenças entre os métodos, seu comportamento foi reiterado.

Outra metodologia utilizada para o acompanhamento da cinética foi a de oxidação do dimetilsulfóxido (DMSO). Nesse caso, Cr(III) 1 mM foi incubado na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM, mantendo-se a proporção inicial dos reagentes, por até 240 minutos. A quantificação da diazossulfona foi realizada em 425 nm em espectrofotômetro. O controle, na ausência de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foi verificado no início (antes do

contato do Cr(III) com o DMSO) e ao final do período. Não houve diferença significativa entre os dois pontos de leitura do controle, mais uma vez reiterando que Cr(III), como metal isolado, não causa formação de  $\bullet\text{OH}$  (Figura 16).

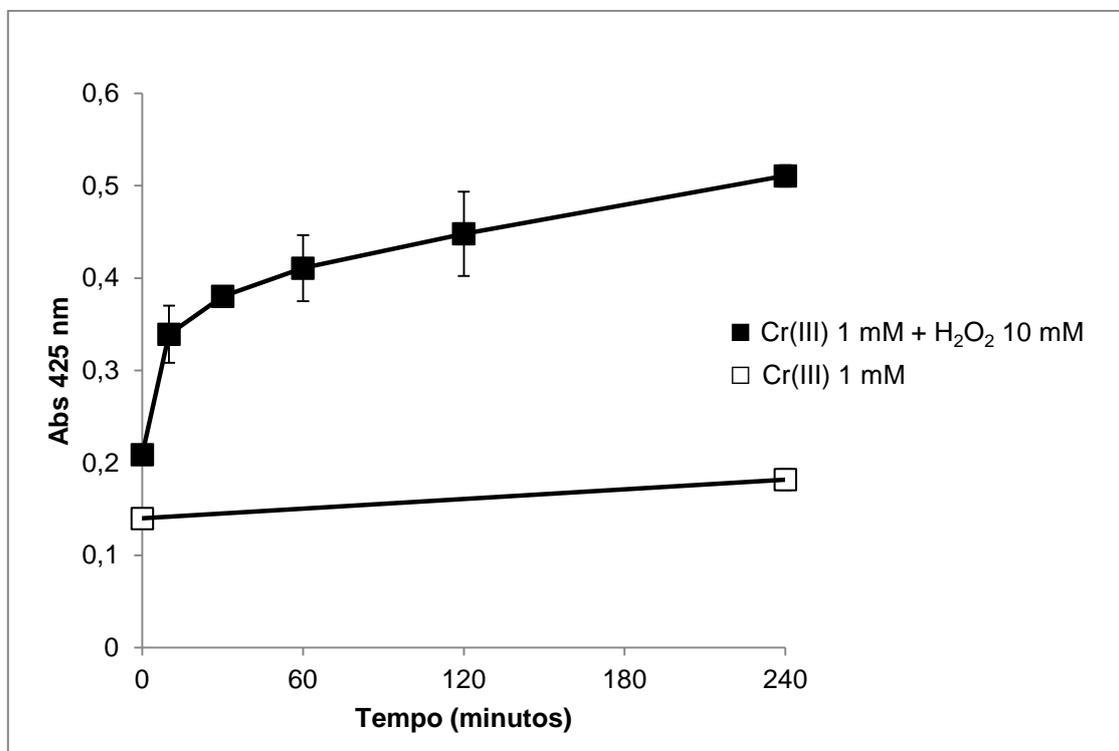


Figura 16 - Oxidação do DMSO mediada por Cr(III) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> até 240 minutos. Condições experimentais: Kpi 5 mM, pH 7,2; DMSO 5%; Fast Blue BB 3 mM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM; Cr(III) 1 mM. N=3.

O contato inicial dos reagentes, na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, já demonstra sua capacidade em gerar  $\bullet\text{OH}$  em poucos minutos. Com a evolução da cinética, observa-se a retomada do comportamento de produção contínua de radicais livres, apresentando a formação de diazossulfona (indicativo da presença de  $\bullet\text{OH}$ ) crescente até o tempo avaliado. Mais uma vez demonstra-se o desempenho distinto do sistema Cr(III) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em comparação ao Fe(II) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Diferem das metodologias anteriores, entretanto, a extensão e a linearidade da reação, não sendo possível concluir se perduraria também por dias. A condução desse experimento, contudo, não seria possível por limitações metodológicas. De acordo com Steiner e colaboradores (1990), o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode reagir com o radical metil, produzido de forma menos expressiva pela reação do  $\bullet\text{OH}$  com o DMSO. Segundo os autores, essa reação entre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e metil ocorreria a partir de cerca de 40 minutos após a adição de todos os reagentes (Steiner, et al., 1990). O resultado seria uma redução na

produção de ácido metanosulfínico, que é o produto de fato mensurado por este método como indicador de  $\bullet\text{OH}$ . Assim, ocorreria uma subestimação da produção de  $\bullet\text{OH}$  em períodos extensos de incubação (Steiner, et al., 1990). Além disso, períodos extensos também podem acarretar a oxidação do metanosulfinato a metanosulfonato pelo próprio  $\bullet\text{OH}$ , o que também resulta em subestimação (Scaduto, 1995).

A cinética mediada por Cr(III) também foi observada na técnica de EPR. A Figura 17 refere-se a um meio reacional contendo Cr(III) 2 mM e  $\text{H}_2\text{O}_2$  10 mM. Pontos com o mesmo símbolo referem-se a um único curso temporal, em que cada ponto indica uma leitura individual. Cr(III) ou  $\text{H}_2\text{O}_2$  individualmente não produzem sinal detectável (controles conduzidos mas não inseridos no gráfico).

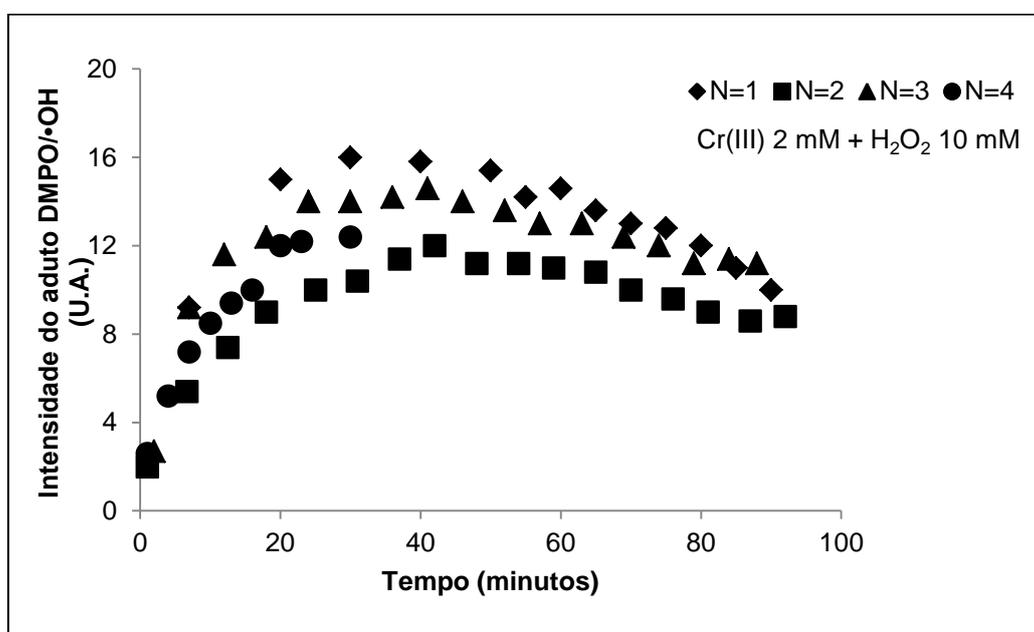


Figura 17 - Formação de DMPO/ $\bullet\text{OH}$  mediada por Cr(III) e  $\text{H}_2\text{O}_2$  em EPR. Condições experimentais: KPi 5 mM, pH 7,2; DMPO 50 mM;  $\text{H}_2\text{O}_2$  10 mM; Cr(III) 2 mM.

É possível observar uma produção crescente de  $\bullet\text{OH}$  apenas até 30 minutos, aproximadamente. A partir desse ponto ela estabiliza-se e logo inicia seu decaimento. Apesar de esse resultado diferir das metodologias anteriores, essa limitação da cinética está em consonância com o encontrado por Tsou & Yang (1996) e Shi e colaboradores (1993) com a mesma metodologia (Shi, et al., 1993); (Tsou, et al., 1996). Os resultados obtidos por esses autores estão reproduzidos na Figura 18.

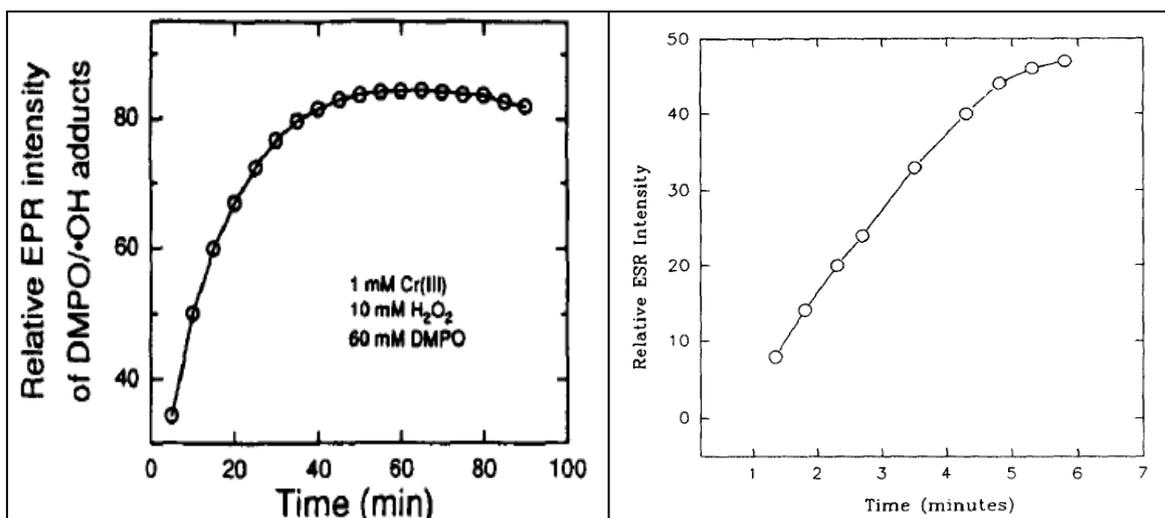


Figura 18 - Cinética de formação de DMPO•OH por Cr(III) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> obtidas por Tsou & Yang (1996) (esquerda) e Shi e colaboradores (1993) (direita). Condições experimentais: KPi 10 mM, pH 7,5; DMPO 60 mM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM; Cr(III) 1 mM.

Em um sistema aquoso contendo 1 mM Cr(III), 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 60 mM DMPO em tampão fosfato 10 mM, pH 7,5, Tsou & Yang (1996) verificaram que a intensidade do sinal foi crescente de forma tempo-dependente, mas com estabilização entre 50 e 70 minutos após o início da reação (Figura 18 - esquerda). Shi e colaboradores (1993), entretanto, observaram intensidade máxima do sinal produzido pelo DMPO•OH em apenas 6 minutos de incubação, com posterior estabilização (Figura 18 - direita) (Shi, et al., 1993); (Tsou, et al., 1996).

O decaimento observado e o tempo reduzido de incubação em relação ao encontrado nas metodologias anteriores, entretanto, podem ser explicados pela saturação do DMPO e/ou pela degradação do produto DMPO•OH (Nakamura, et al., 2010). Mesmo que o radical hidroxil seja gerado continuamente, o DMPO é capaz de trapear apenas uma quantidade limitada, de acordo com a concentração inicial adicionada. Quando ocorre essa saturação, em que é atingida a capacidade máxima de detecção do sequestrador, a intensidade do sinal permanece estacionária (Nakamura, et al., 2010); (Yoo, et al., 2005).

Por outro lado, a degradação do DMPO•OH pode ocorrer por intervenção dos demais constituintes do meio reacional: o oxigênio dissolvido, os demais reagentes adicionados (incluindo o próprio DMPO), os produtos da reação ou mesmo de forma espontânea (Nakamura, et al., 2010). Sendo também um radical livre, DMPO•OH possui meia-vida limitada, variando entre 20 e 60 minutos dependendo do

meio reacional e da quantidade produzida, em soluções aquosas, de acordo com a literatura (Nakamura, et al., 2010); (Buettner, 1993); (Mojovic, et al., 2005). É possível, ainda, a reação entre moléculas de DMPO/•OH, gerando dímeros não detectáveis (Nakamura, et al., 2010). Dessa forma, o tempo de vida do DMPO/•OH pode influenciar consideravelmente a análise quantitativa e o acompanhamento da cinética de formação de radical hidroxil (Nakamura, et al., 2010) (Yoo, et al., 2005).

Dessa forma, observamos que o acompanhamento da cinética do sistema Cr(III) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sofre interferência do método utilizado para sua mensuração. Conforme demonstrado, métodos em que o produto quantificável é mais estável (MDA) ou restrito (2-hidroxitereftalato) demonstram uma produção de •OH contínua e linear até o tempo máximo analisado (240 horas ou 10 dias). Por outro lado, quando o produto formado é instável (DMPO/•OH) ou pode seguir vias com formação de produtos secundários não quantificáveis (produtos da oxidação do DMSO), a quantificação da produção de •OH demonstra-se limitada a poucos minutos e com menor linearidade.

Não obstante, o que fica demonstrado é que a cinética do sistema Cr(III) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para a produção de •OH ocorre de forma diferente do que a literatura científica apresenta para reações de formação de radicais livres clássicas, mediadas por Fe(II), podendo durar de minutos a dias, dependendo do método.

### **C. Efeito da concentração de Cr(III) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para a formação de radical hidroxil (•OH)**

Como forma de caracterizar a formação de •OH mediada pelo sistema Cr(III) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, procurou-se estudar a influência da concentração dos principais reagentes. Para isso, foi utilizada a metodologia de degradação oxidativa da 2-DR. O experimento de variação da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi conduzido com meios reacionais entre zero e 5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, contendo Cr(III) 0,1 mM, mantidos por 4 horas de incubação<sup>7</sup>. Da mesma forma, também foi verificada a relação entre a concentração de Cr(III) e produção de •OH. Com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em concentração fixa de 1 mM, o meio reacional

---

<sup>7</sup>Os experimentos de variação da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e de Cr(III) também foram conduzidos com dez minutos de incubação, sendo apresentados no Apêndice B e Apêndice C.

foi mantido por quatro horas de incubação com concentrações crescentes de Cr(III), entre zero e 0,2 mM.

A Figura 19 mostra que o aumento da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> promove uma produção também crescente de MDA, tanto na presença de Cr(III) quanto na ausência, comprovando a relação direta entre concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e produção de •OH. Na Figura 20 também é possível visualizar uma relação direta entre concentração do metal e produção de •OH.

Condições experimentais de reação de Fenton clássica, contendo Fe(II) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, também são caracterizadas pela relação direta entre produção de •OH e concentração dos reagentes, conforme observado por Avellar e colaboradores (2004) e Genaro-Mattos e colaboradores (2009) e representado na Figura 21.

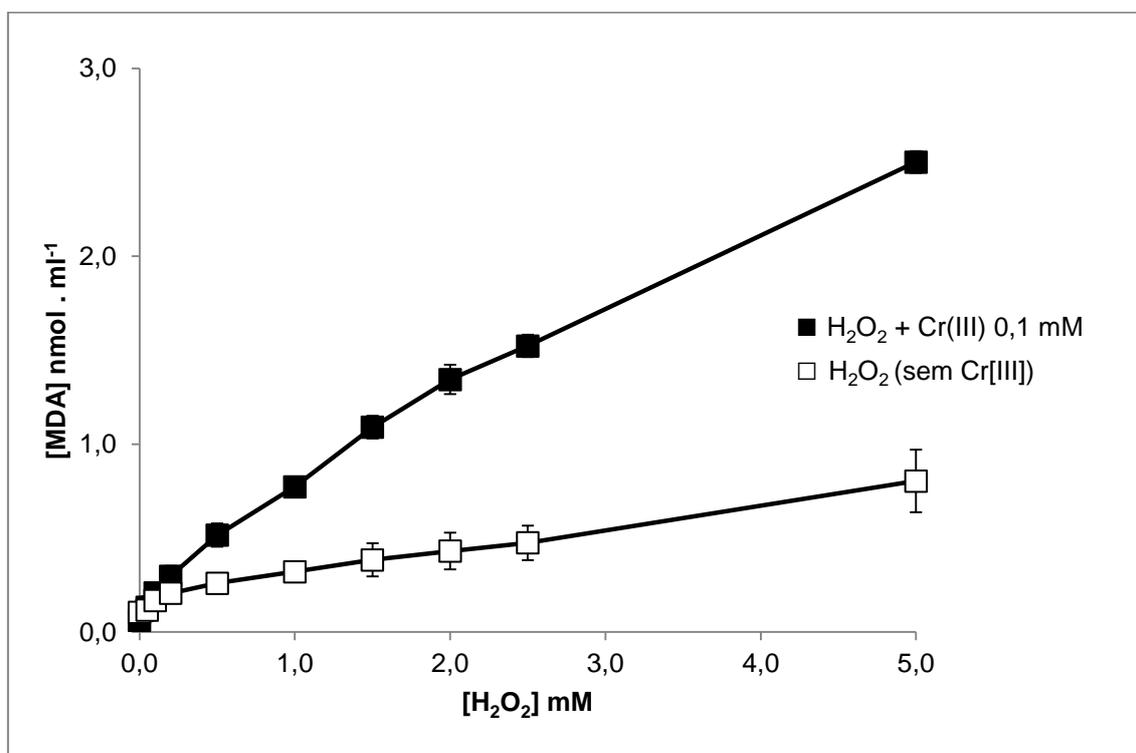


Figura 19 - Efeito da variação da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na oxidação da 2-DR em meios contendo Cr(III) após 4 horas de incubação. Condições experimentais: Kpi 5 mM, pH 7,2; 2-DR 5 mM; Cr(III) 0,1 mM. N=6.

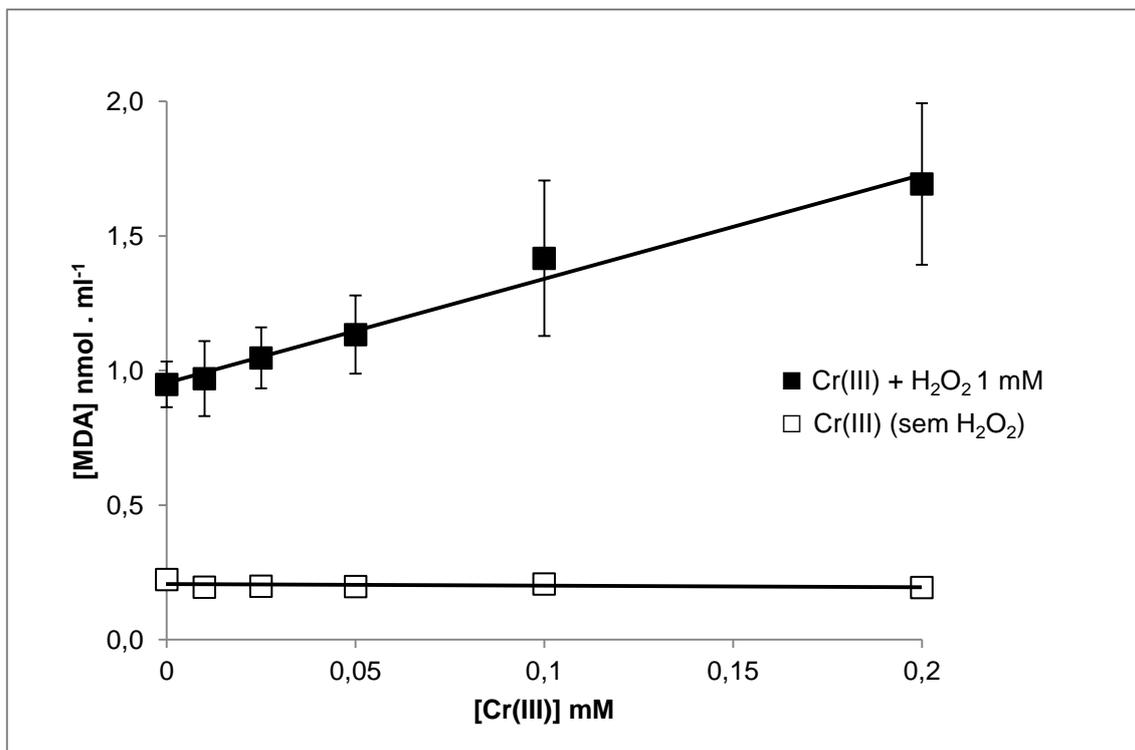


Figura 20 - Efeito da variação da concentração de Cr(III) na oxidação da 2-DR em meios contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> após 4 horas de incubação. Condições experimentais: Kpi 5 mM, pH 7,2; 2-DR 5 mM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM. N=9.

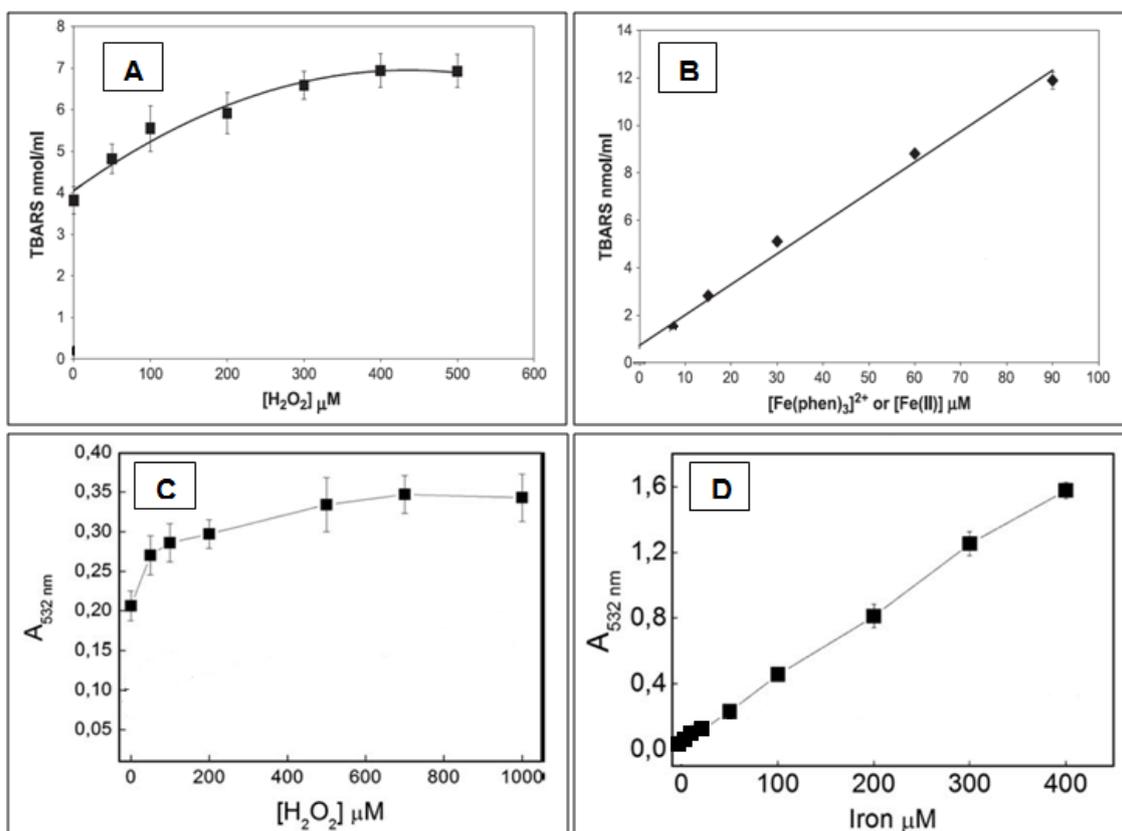


Figura 21 - (A) Efeito da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0 a 500 μM) na degradação oxidativa da 2-DR em meio contendo Fe(II) 30 μM. A produção de MDA na ausência de Fe(II), com 500 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foi de 0,41 nmol.ml<sup>-1</sup>. (B) Efeito

da concentração de Fe(II) (0 a 90  $\mu\text{M}$ ) na degradação oxidativa da 2-DR em meio contendo  $\text{H}_2\text{O}_2$  100  $\mu\text{M}$ . A produção de MDA obtida nos controles sem a adição de 2-DR não foi estatisticamente diferente da obtida na ausência de Fe(II), com 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . *Condições experimentais*: 2-DR 5 mM; Kpi 5 mM. N=8-12. Resultados obtidos por Avellar e colaboradores (2004). (C) Efeito da concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0 a 1000  $\mu\text{M}$ ) na degradação oxidativa da 2-DR em meio contendo Fe(II) 50  $\mu\text{M}$ ; (D) Efeito da concentração de Fe(II) (0 a 400  $\mu\text{M}$ ) na degradação oxidativa da 2-DR em meio contendo  $\text{H}_2\text{O}_2$  500  $\mu\text{M}$ . *Condições experimentais*: 2-DR 5 mM; Kpi 10 mM. N=10. Resultados obtidos por Genaro-Mattos e colaboradores (2009).

Outra observação importante é que a produção de  $\bullet\text{OH}$  foi significativa também na ausência de Cr(III) (Figura 19). Isso sugere a presença de metais contaminantes, como Fe(III), que mantém-se em solução após deionização da água utilizada nos experimentos, mesmo que em concentrações mínimas (Hermes-Lima, et al., 1994). Uma forma de assegurar sua remoção da solução é pela adição de quelantes de metais de transição. Essa hipótese foi testada e seu resultado está apresentado na próxima seção.

#### **D. Diminuindo interferentes do sistema Cr(III) + $\text{H}_2\text{O}_2$ para a formação de radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ )**

##### *a) Interferência da 2-DR na produção de $\bullet\text{OH}$*

Diante do prolongamento da reação do sistema Cr(III) +  $\text{H}_2\text{O}_2$  na 2-DR, procurou-se esclarecer sobre a presença de interferentes no meio reacional que pudessem contribuir, aumentando ou prolongando o dano. Assim, uma das hipóteses seria a atuação de produtos da degradação da 2-DR, de forma a “catalisar” a reação entre Cr(III) e  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Por esse raciocínio, a reação radicalar seria dependente da própria 2-DR para que durasse por tantos dias. Dessa forma, foram conduzidas incubações com e sem 2-DR, mantendo todos os reagentes inalterados, por diferentes tempos.

A Figura 22 apresenta uma representação visual de como foram conduzidos esses experimentos, indicando o momento e o período de incubação com a 2-DR. Em todas as condições a reação foi iniciada no tempo zero com a adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e Cr(III). Nas condições de 1 a 4 a 2-DR também foi adicionada no tempo zero e mantida pelo período de incubação indicado. Nas condições de 5 a 7 a reação entre Cr(III) e  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi mantida sem a 2-DR pelo período hachurado branco. Sem

interromper a reação, a 2-DR foi adicionada e mantida por 24 horas (período hachurado cinza).

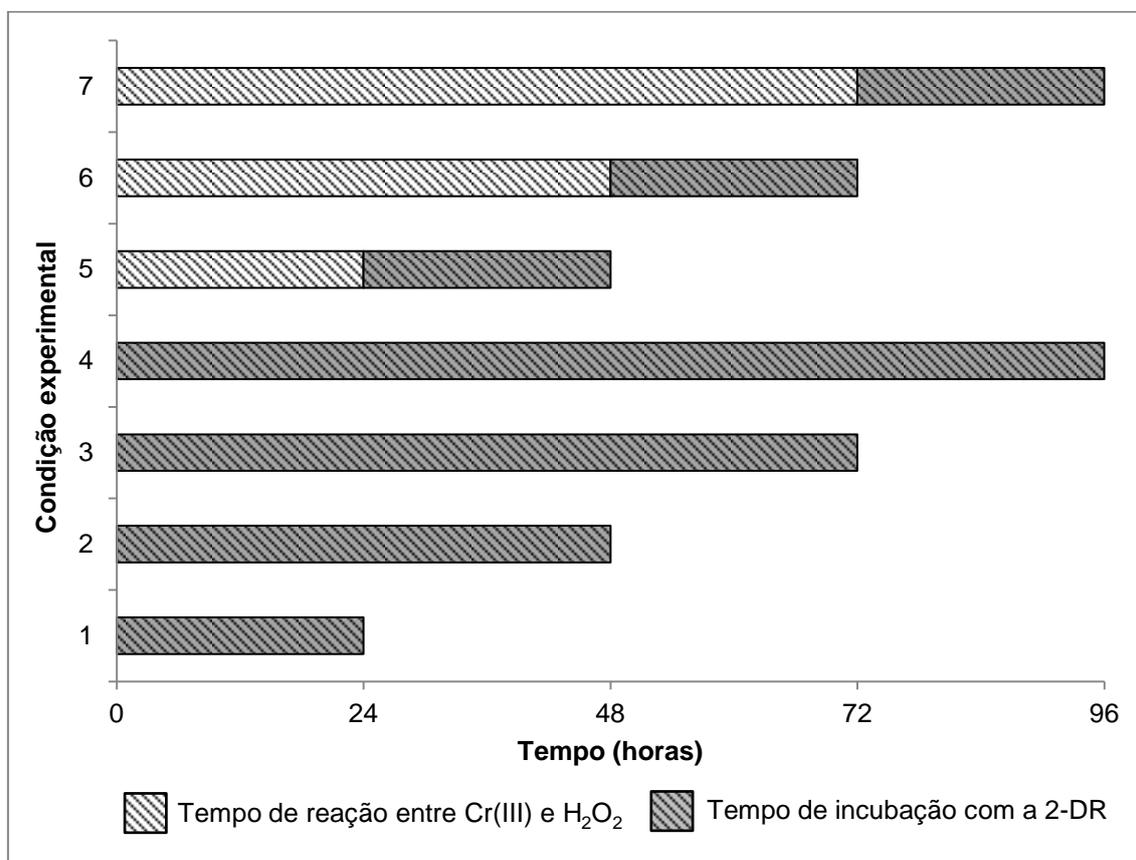


Figura 22 - Representação visual das condições experimentais com manipulação do tempo de incubação da 2-Desoxirribose em meio reacional contendo Cr(III) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

A Tabela 4 e a Figura 23 apresentam os resultados obtidos nesses experimentos. Na Tabela 4 constam a concentração de MDA (com desvio padrão) e velocidade de formação de MDA em relação ao tempo de exposição com a 2-DR. Também estão apresentados os controles conduzidos na ausência de Cr(III) ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e o “Branco”. O controle denominado “Branco” refere-se a adição de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> e TBA antes dos demais reagentes (Cr[III], H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 2-DR), de modo a considerar o efeito do metal diretamente na 2-DR durante o período de fervura, independente de dano radicalar (Genaro-Mattos, et al., 2009).

O gráfico apresentado na Figura 23 compara a velocidade de formação de MDA entre as condições com 2-DR desde o início (condições de 1 a 4, inseridas como “2-DR contínua”) e as condições em que sua adição ocorreu com a reação entre Cr(III)

e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> já em curso (condições de 5 a 7, inseridas como “2-DR adicionada posteriormente”).

Tabela 4 - Produção de MDA a partir da manipulação do tempo de incubação da 2-DR em meio reacional contendo Cr(III) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Condições experimentais:* K<sub>pi</sub> 5 mM, pH 7,2; 2-DR 5 mM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM e Cr(III) 0,1 mM. N=6.

Condição experimental		MDA (nmol.ml <sup>-1</sup> )	Desvio Padrão	Velocidade MDA/hora
Branco		0,512	0,237	
Controle sem Cromo		0,466	0,178	0,005
Controle sem H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		0,221	0,022	0,002
1	24 horas de reação e de incubação com a 2-DR	1,666	0,370	0,069
2	48 horas de reação e de incubação com a 2-DR	2,525	0,262	0,053
3	72 horas de reação e de incubação com a 2-DR	3,022	0,522	0,042
4	96 horas de reação e de incubação com a 2-DR	3,414	0,541	0,036
5	24 horas de reação sem a 2-DR + 24 horas de reação e de incubação com a 2-DR	1,416	0,140	0,059
6	48 horas de reação sem a 2-DR + 24 horas de reação e de incubação com a 2-DR	1,347	0,184	0,056
7	72 horas de reação sem a 2-DR + 24 horas de reação e de incubação com a 2-DR	1,380	0,314	0,058

Assim como apresentado inicialmente na Figura 14, a formação de MDA ocorreu de forma mais rápida nas primeiras horas de contato entre os reagentes, uma vez que a velocidade obtida com 24 horas de reação e incubação com a 2-DR (condição experimental 1) foi a maior entre as séries analisadas.

Ainda de acordo com o resultado da Figura 14, após 48 horas a reação atinge o equilíbrio, em que a produção de •OH mantém-se constante, sem alterações significativas ou interrupção, por todo o período de 240 horas analisado. Essa inferência advém da velocidade constante de formação de MDA. No presente resultado verificamos que as velocidades obtidas nas condições 5, 6 e 7 mantém a mesma similaridade, reiterando o equilíbrio (Tabela 4 e série “2-DR adicionada posteriormente” da Figura 23). Nessas condições experimentais é verificado um tempo total de reação de 48 horas, 72 horas e 96 horas, respectivamente. Considerando o

tempo de meia vida de cerca de  $10^{-6}$  segundos do  $\bullet\text{OH}$ , infere-se que sua produção antes da inserção da 2-DR não seria mensurada, pois o  $\bullet\text{OH}$  já teria reagido com outros componentes (os próprios reagentes ou outros subprodutos) no meio reacional. Assim, com a inserção posterior da 2-DR, com o sistema gerador de ROS em curso, foi possível verificar que no momento específico da leitura ainda há  $\bullet\text{OH}$  sendo produzido.

Além disso, se mesmo na ausência da 2-DR a reação atinge o mesmo equilíbrio após 48 horas observado no experimento completo (com sua incubação desde o início da reação), infere-se que a formação constante de  $\bullet\text{OH}$  não seja por participação da 2-DR em sua geração. Ao contrário, verifica-se que nas condições em que a 2-DR está constantemente presente (1 a 4) há uma nítida desaceleração da reação (série “2-DR contínua” da Figura 23). Sugere-se que nesse caso a 2-DR ou seus produtos de degradação tenham um efeito inibidor na reação, diminuindo a formação de MDA a medida que esses produtos sejam acumulados. O mecanismo por meio do qual ocorreria essa inibição ainda demanda maior aprofundamento de estudo.

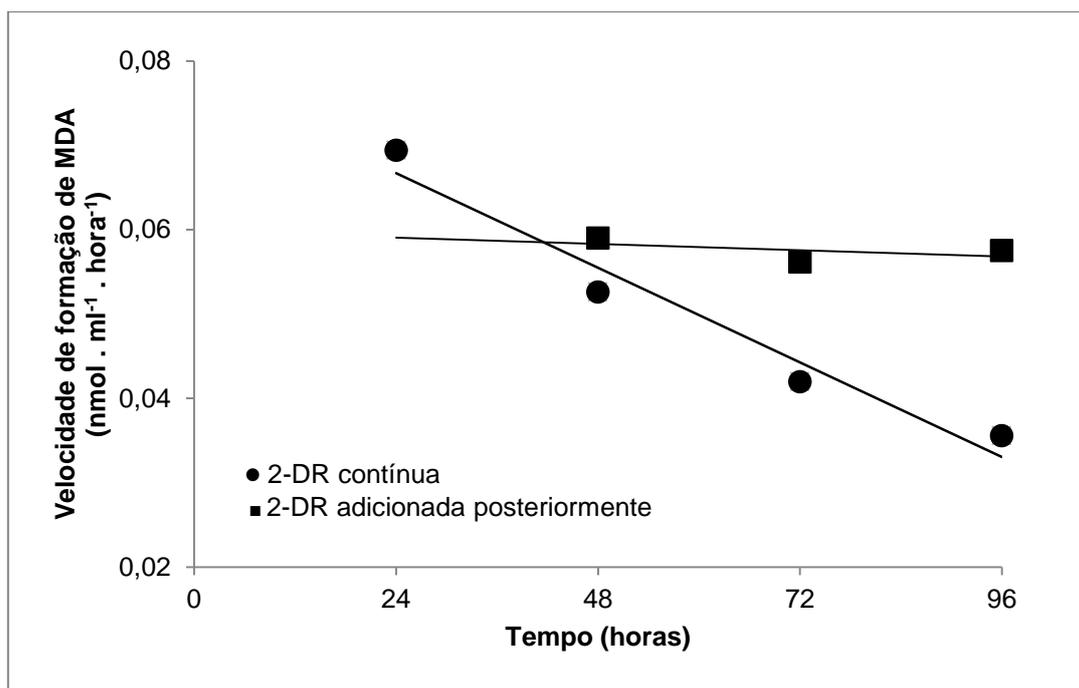


Figura 23 - Velocidade de formação de MDA do sistema  $\text{Cr(III)} + \text{H}_2\text{O}_2$  a partir da 2-DR mantida de forma contínua (●) ou adicionada posteriormente e mantida por 24 horas (■). Condições experimentais: KPi 5 mM, pH 7,2; 2-DR 5 mM;  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM;  $\text{Cr(III)}$  0,1 mM. N=6.

### b) Interferência de metais contaminantes na produção de $\bullet\text{OH}$

Além da interferência da 2-DR, suscitou-se a possibilidade de que metais contaminantes poderiam ser co-responsáveis pela produção de  $\bullet\text{OH}$ , uma vez que mesmo na ausência de Cr(III) a produção de  $\bullet\text{OH}$  foi expressiva quando se aumentou a concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  no meio (Figura 19). Para verificar essa hipótese foi adicionada uma resina quelante (Chelex®) nas soluções utilizadas nos experimentos, além da utilização de reagentes puros e água deionizada como método padrão. Essa resina liga-se a metais contaminantes, com alta seletividade para íons bivalentes, sem alterar a concentração de íons não metálicos (Walsh, et al., 1991).

A resina foi utilizada durante o ensaio da 2-DR e adicionada às soluções estoque com no mínimo 24 horas de antecedência (tampão e 2-DR), assim como à água que seria utilizada para o preparo das soluções diárias (Cr[III] e  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e utilizada no experimento. O meio reacional contendo 0,1 mM de Cr(III) e 1 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , assim como os controles, na ausência de cada reagente, foram mantidos por quatro horas de incubação em meio tamponado contendo 5 mM de 2-DR. A Figura 24 apresenta uma comparação entre a concentração de MDA obtida sem a utilização da resina (colunas pretas) e com a sua utilização (colunas brancas).

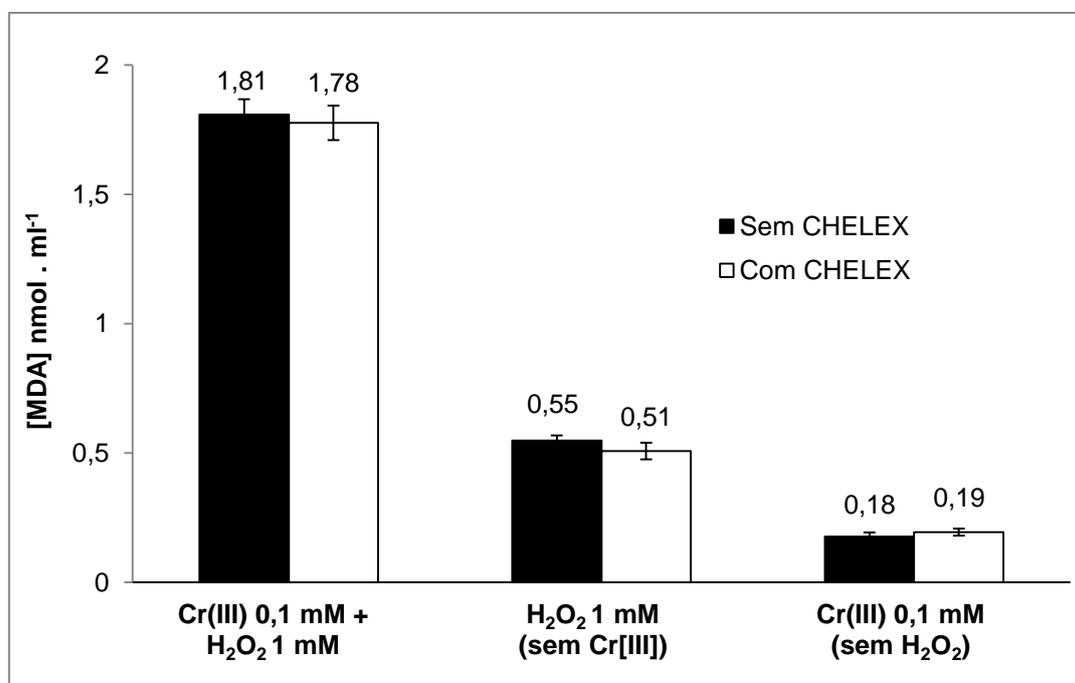


Figura 24 - Efeito da adição de Chelex® na produção de MDA em meios contendo Cr(III) e  $\text{H}_2\text{O}_2$  após quatro horas de incubação. Condições experimentais: Kpi 5 mM, pH 7,2; 2-DR 5 mM;  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM; Cr(III) 0,1 mM. N=6.

É possível verificar que a utilização da resina não alterou os resultados obtidos, mantendo-se os mesmos tanto na ausência quanto na presença de Chelex®, inclusive para os controles. Esse resultado descarta uma participação significativa de metais contaminantes no sistema Cr(III) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como causadores do dano oxidativo provocado a 2-DR na condição analisada. Entretanto, o resultado de produção significativa de •OH na ausência de Cr(III) pode indicar que a participação dos metais contaminantes pode vir a ser significativa se a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for maior que 1 mM.

Nesse caso, sugere-se que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inicialmente promoveria a redução do Fe(III) a Fe(II), com posterior participação em uma reação de Fenton formadora de •OH (Hermes-Lima, et al., 1994). Entretanto, a adição intencional e expressiva de um metal de transição, como é o caso do Cr(III), provoca de fato uma produção mais expressiva de •OH, conforme largamente apresentado pela literatura (Freinbichler, et al., 2011); (Pamplona, et al., 2011) e nos resultados já apresentados neste trabalho.

#### **E. Efeito de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos na formação de •OH pelo sistema Cr(III) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Uma vez verificada a capacidade de íons Cr(III) em gerar radicais livres, faz-se necessário também o estudo do efeito dos antioxidantes nesse sistema a fim de identificar mecanismos que possam contrapor esse efeito. Além disso, a especificidade dos substratos e moléculas alvo pode auxiliar a identificação dos compostos que participam do mecanismo de geração de espécies reativas mediada por Cr(III) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Assim, foram selecionados os antioxidantes enzimáticos catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), e o não enzimático tiouréia. As enzimas CAT e SOD compõem o sistema de defesa antioxidante primário no organismo humano. A CAT é responsável pela decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O e a SOD catalisa a dismutação do O<sub>2</sub><sup>•-</sup> em O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hermes-Lima, 2004). A tiouréia é uma molécula com capacidade sequestradora de radicais livres seletiva para radical hidroxil, sendo largamente utilizada no estudo dos efeitos biológicos da produção de •OH mediada por metais (Zhu, Antholine e Frei, 2002).

O efeito da adição desses antioxidantes foi verificado em relação ao dano oxidativo provocado na 2-DR. O sistema gerador de radicais livres composto por Cr(III) 0,1 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM foi mantido por 24 horas de incubação na presença de 2-DR 5 mM. Após esse período foram adicionados 1000 U.ml<sup>-1</sup> de CAT, 500 U.ml<sup>-1</sup> de SOD ou 5 mM de tiouréia, em meios de reação independentes, e mantidos por mais 24 horas, com seus efeitos observados após esse período. O resultado está apresentado na Figura 25. É possível observar que o meio sem a adição dos antioxidantes, representado pela série com quadrado fechado, permanece crescente. Essa série é acompanhada por aquela que teve a adição de SOD, sem alteração significativa. Com catalase (●) e tiouréia (X) há inibição da oxidação da 2-DR pelos reagentes.

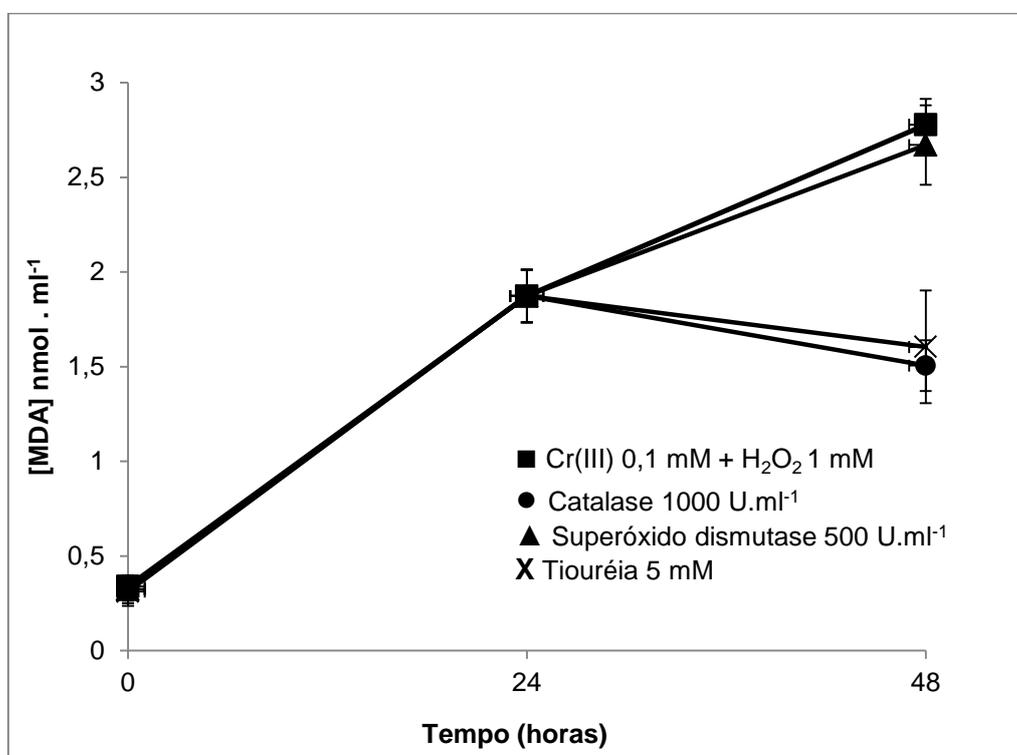


Figura 25 - Efeito da adição de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos na reação entre Cr(III) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na oxidação da 2-DR. *Condições experimentais:* KPi 5 mM, pH 7,2; 2-DR 5 mM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM; Cr(III) 0,1 mM; Catalase 1000 U.ml<sup>-1</sup>; Superóxido dismutase 500 U.ml<sup>-1</sup>; Tiouréia 5 mM. N=6

Inicialmente a falta de interferência da SOD pode sugerir que o O<sub>2</sub><sup>•-</sup> não participa desse mecanismo, uma vez que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gerado a partir de sua dismutação favoreceria a reação e aumentaria o dano oxidativo a 2-DR.

A inibição provocada pela tiouréia reforça que há produção específica de •OH e sua capacidade seqüestradora é eficiente nesse meio reacional. A proteção

semelhante conferida pela CAT também reitera resultados anteriores: a participação efetiva de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para que o  $\bullet\text{OH}$  seja gerado e assim provoque o dano oxidativo.

A proteção conferida pela catalase por meio da remoção do  $\text{H}_2\text{O}_2$  sugere que mesmo após 24 horas esse composto permanece disponível no meio reacional. Esse resultado foi considerado inesperado, uma vez que se previa que a exposição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por esse período acarretaria sua degradação por decomposição espontânea ou seu consumo na reação, conforme procurou-se esclarecer a seguir.

#### **F. Equilíbrio entre consumo e produção de $\text{H}_2\text{O}_2$ na reação com Cr(III) para a formação de radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ )**

Os resultados obtidos com os antioxidantes indicaram uma nova abordagem do  $\text{H}_2\text{O}_2$  nesse sistema. Sua presença é essencial para que o radical hidroxil seja produzido, conforme reiterado por todos os métodos apresentados. Entretanto, a forma como sua concentração é alterada por essa reação pode auxiliar na explicação do mecanismo pelo qual o  $\bullet\text{OH}$  é produzido.

Dessa forma, a concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi acompanhada a partir da oxidação do vermelho de fenol mediada pela enzima *horseradish* peroxidase (HRPO) dependente de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Inicialmente procurou-se esclarecer o comportamento clássico da concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  na reação de Fenton mediada por Fe(II), sendo conduzido o controle apresentado na Figura 26. Assim, com a adição inicial de 0,5 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , seu consumo foi monitorado a partir do aumento da concentração de Fe(II), de zero a 1 mM, com incubação de 10 minutos.

A Figura 26 representa esse controle em termos de percentual de decaimento da concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pela concentração de Fe(II). A ausência de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi representada como 100 % de decaimento. É possível observar que com o aumento da concentração de Fe(II) o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é consumido de forma proporcional na reação, com desaparecimento total quando a concentração de Fe(II) é o dobro da concentração inicial de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

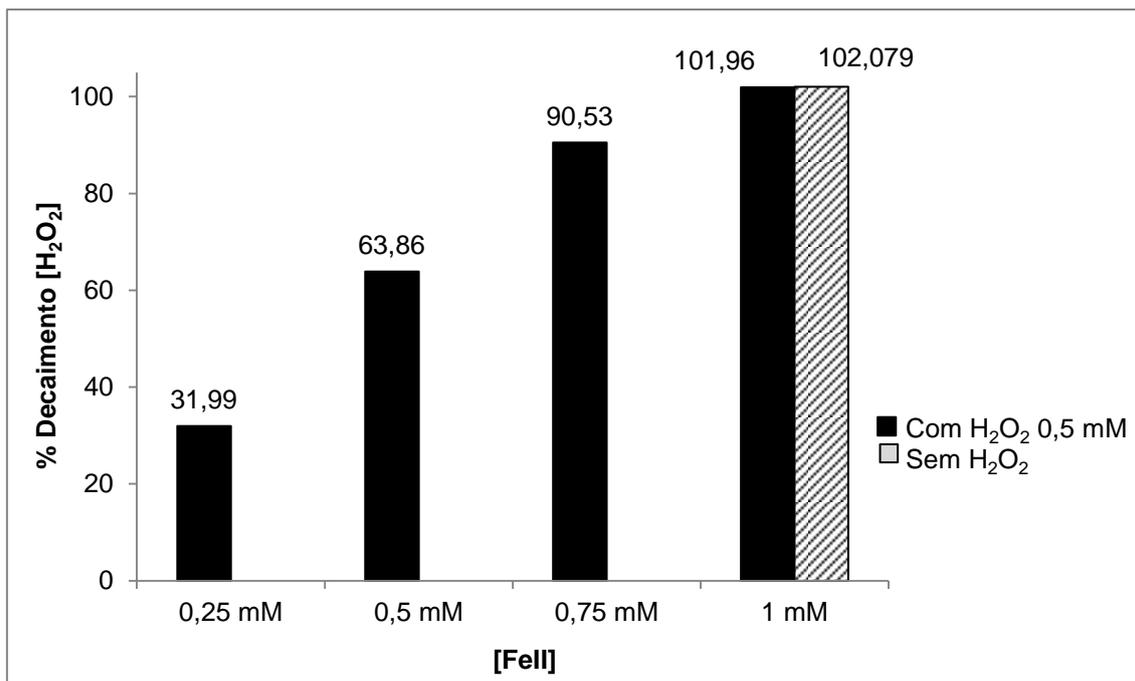


Figura 26 - Efeito da variação da concentração de Fe(II) no decaimento da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em 10 minutos de incubação. Condições experimentais: K<sub>pi</sub> 5 mM, pH 7,2; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM; Fe(II) entre 0 e 1 mM. N=6.

O mesmo procedimento foi conduzido com a adição inicial de 0,5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e acompanhado a partir de concentrações crescentes de Cr(III) (entre zero e 1 mM). Neste caso, devido a comprovada dependência do tempo para a reação entre eles, a variação da concentração de Cr(III) foi realizada em diferentes tempos de incubação, entre 10 minutos e 50 horas (Figura 27 e 28).

Novamente o comportamento apresentado pelo Cr(III) difere da forma clássica com Fe(II). Conforme observado nas Figura 27 e 28, a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é alterada apenas pelo tempo de incubação e não pelo cromo. Vê-se que quando mantido puro por 8 horas, por exemplo, a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cai de 0,5 mM para 0,44 mM. Na presença de Cr(III) 1 mM a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cai para 0,435 mM, ou seja, não difere do decaimento natural, embora com esse tempo de incubação já haja uma produção de •OH expressiva por Cr(III) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O decaimento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> atinge a metade da concentração inicial em aproximadamente 43h (Figura 28).

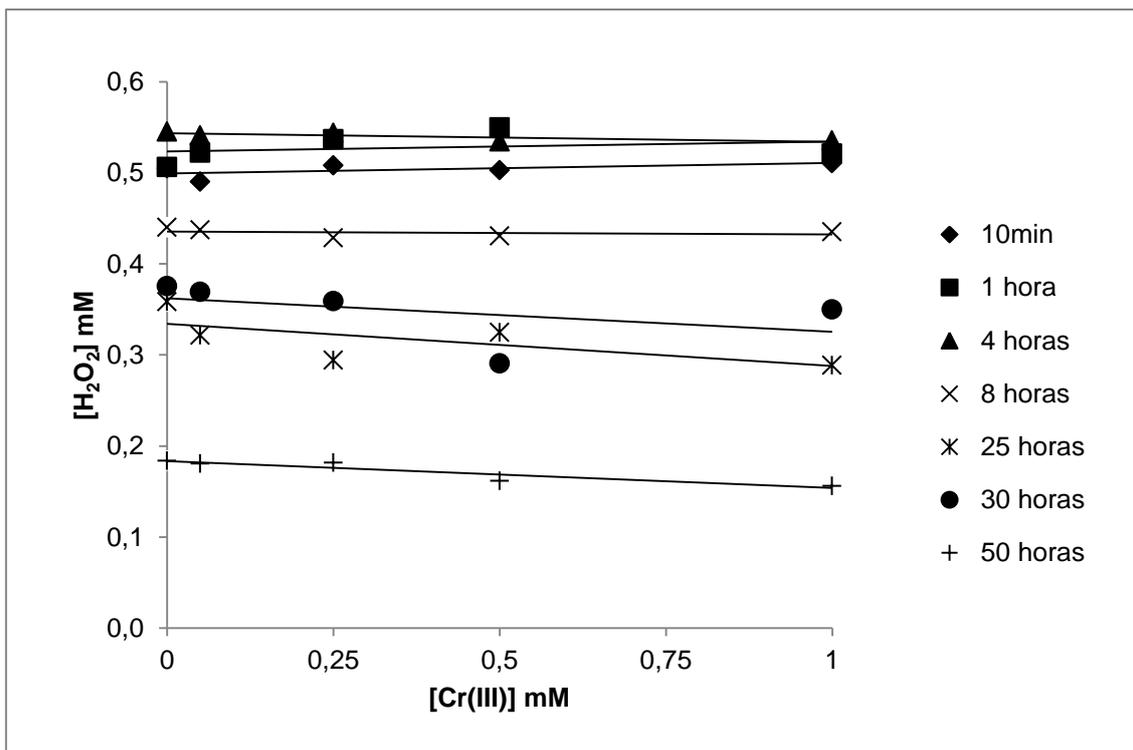


Figura 27 - Efeito da variação da concentração de Cr(III) na concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em diferentes tempos de incubação. Condições experimentais: Kpi 5 mM, pH 7,2; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM; Cr(III) entre 0 e 1 mM. N=8.

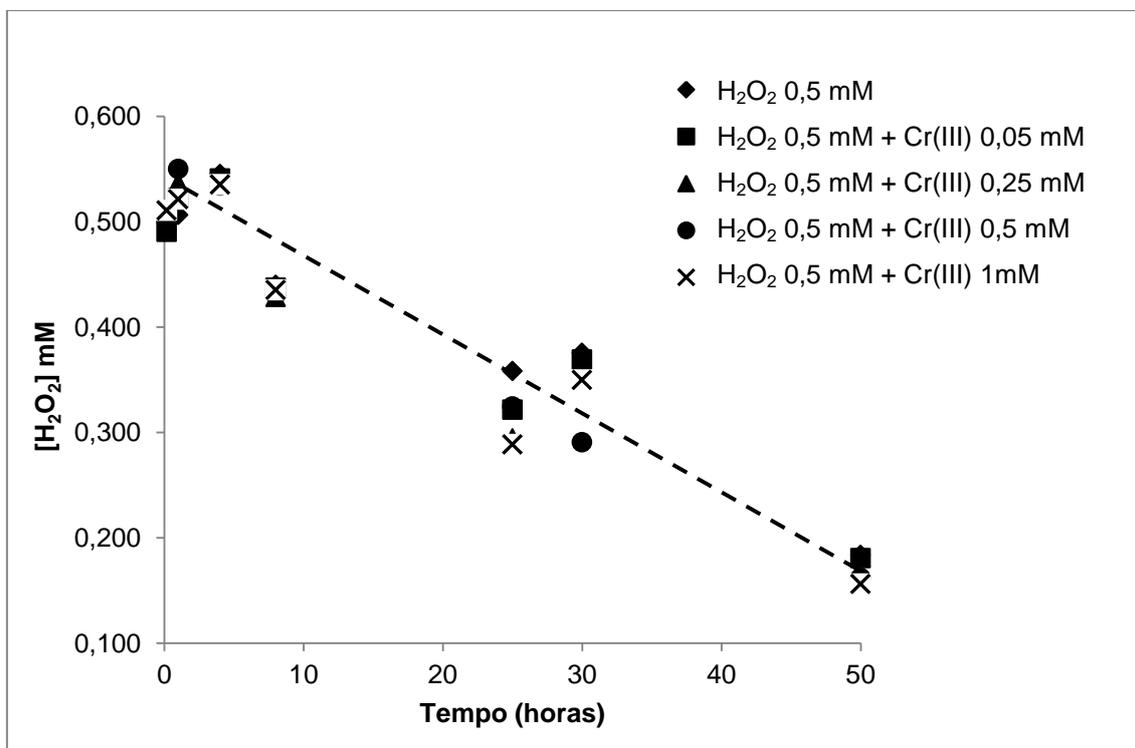


Figura 28 - Efeito do tempo no decaimento da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em diferentes concentrações de Cr(III). Condições experimentais: Kpi 5 mM, pH 7,2; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM; Cr(III) entre 0 e 1 mM. N=8.

Esses resultados, em que não é observado consumo direto de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante a reação com Cr(III), sugerem que pode haver uma produção concomitante de  $\text{H}_2\text{O}_2$  envolvida no mecanismo de geração de  $\bullet\text{OH}$ . Assim, inicialmente ele seria consumido como reagente indispensável à geração de  $\bullet\text{OH}$ . Em seguida, reações de oxidação-redução entre os produtos dessa primeira etapa poderiam, por sua vez, levar a produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . De tal modo, formar-se-ia um equilíbrio entre produção e consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , diminuindo a variação de sua concentração.

Assim como em sistemas *in vivo*, a dismutação de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  poderia ser a fonte de  $\text{H}_2\text{O}_2$  nesse sistema. Na medida em que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é consumido a partir da reação com o Cr(III), seria gerado  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e este reverteria, parcialmente, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  inicial. Esse é um fator que ajuda a explicar o porquê de a reação entre  $\text{H}_2\text{O}_2$  e Cr(III) permanecer constante. A disponibilidade de um dos reagentes indispensáveis à reação estaria garantida mesmo após longos períodos de incubação, conforme observado nos resultados de cinética. Faz-se necessário, portanto, que o envolvimento do  $\text{O}_2^{\bullet-}$  seja melhor elucidado e sugere-se a utilização de métodos de consumo de oxigênio para essa finalidade.

A adição de SOD seria responsável pelo aumento da velocidade dessa dismutação. Entretanto, como sua adição não provocou aumento na produção de  $\bullet\text{OH}$ , quando adicionada durante o método da 2-DR (Figura 25), sugere-se que durante 24 horas de incubação (condição daquele sistema) o  $\text{H}_2\text{O}_2$  já estaria em um ciclo redox de produção e consumo em que seu equilíbrio estaria mantido e a produção de  $\bullet\text{OH}$  continuaria constante. Já em equilíbrio, esse comportamento seria mantido com ou sem SOD.

### **G. Efeito do sistema Cr(III) + $\text{H}_2\text{O}_2$ em Proteínas**

Após a comprovação da capacidade do micronutriente Cr(III) em gerar radicais livres, mais especificamente o radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ), é de interesse investigar as repercussões que esse comportamento pode gerar em biomoléculas, em sistemas que mimetize um meio biológico. Foi mantido o modelo *in vitro* para simular o contato dos produtos formados pela reação entre Cr(III) e  $\text{H}_2\text{O}_2$  com a biomolécula alvo.

A reação dos radicais livres com aminoácidos provoca a formação de resíduos carbonílicos, considerados um importante biomarcador de estresse oxidativo

(Hermes-Lima, 2004). Íons metálicos, quando liberados de seus carreadores, podem ligar-se a proteínas de tecidos ou fluidos intersticiais. Dessa forma, a interação entre eles e o possível dano protéico são importantes para a compreensão da biotoxicidade de íons metálicos (Shi, et al., 1993); (Shrivastava, et al., 2000).

Os experimentos conduzidos visaram observar os efeitos oxidativos produzidos por Cr(III) em comparação ao Fe(II) (reação de Fenton clássica). Foram mantidas as condições padrão utilizadas nos resultados anteriores: 0,1 mM de metal, 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 10 mM de tampão fosfato, pH 7,2, com a utilização de albumina sérica bovina (BSA) e β-lactoglobulina 1 mg.ml<sup>-1</sup> como alvos protéicos.

No primeiro experimento foi utilizada a BSA e um tempo de incubação de 10 minutos. A Figura 29 resultante demonstra a presença de compostos carbonilados naturalmente na amostra na ordem de 2,8 nmol.mg<sup>-1</sup> em média, valor similar ao apontado na literatura, de 2 nmol.mg<sup>-1</sup> (Hermes-Lima, 2004). A inércia do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diante da BSA, mantendo-se também nessa faixa de concentração, também confirmou os dados da literatura, sugerindo que sua baixa capacidade reativa não é capaz de gerar danos oxidativos em proteínas (Halliwell, et al., 2007).

Além disso, o gráfico mostra a diferença de produção de proteínas carboniladas a partir de Fe(II), na presença e ausência de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Na ausência de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a produção de grupos carbonilados é menor do que quando o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> está presente, mas ainda é cerca de o dobro do valor da BSA pura (6,0 nmol.mg<sup>-1</sup>). Nessas condições, o Fe(II) sofre autoxidação (FeII + O<sub>2</sub>) e também produz ROS (Genaro-Mattos, et al., 2009).

Com Cr(III), nas duas condições analisadas (presença e ausência de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), os valores de carbonil não diferiram dos níveis basais. Entretanto, havia aqui o viés do tempo de incubação muito pequeno. Dessa forma, foi realizada também uma incubação de quatro horas, cujo resultado está apresentado na Figura 30. Entretanto, os valores são essencialmente os mesmos da incubação por 10 minutos, representando novamente que o Cr(III), nas condições analisadas, não apresenta efeito em albumina.

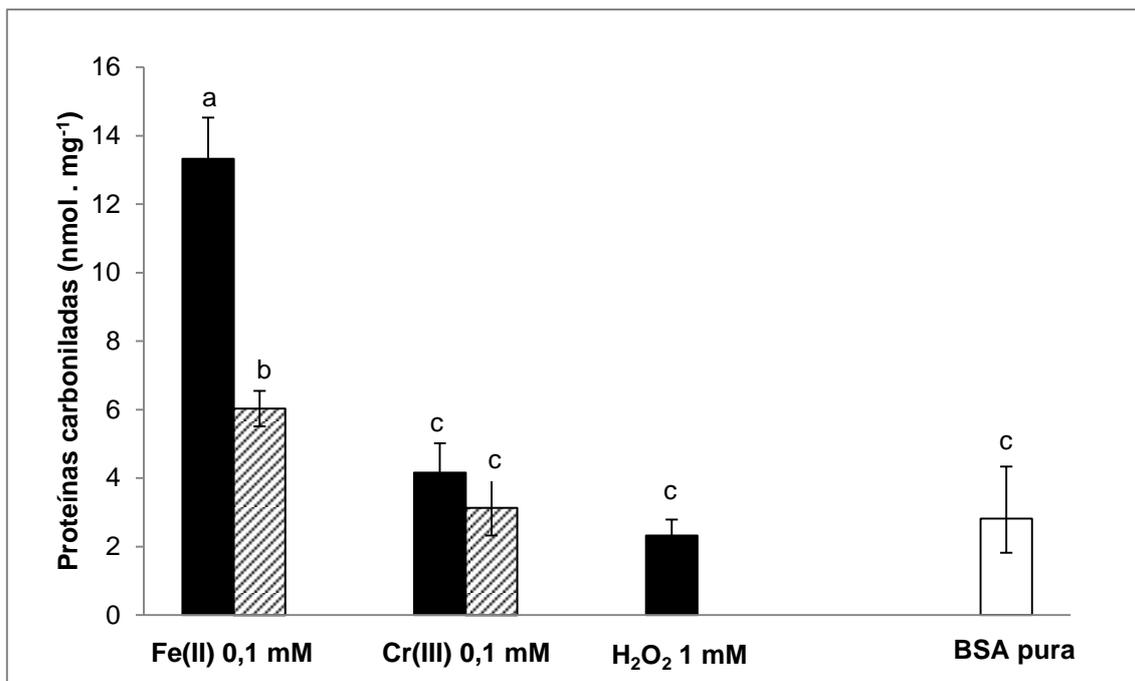


Figura 29 – Efeito de Fe(II) e Cr(III) na produção de proteínas carboniladas após **10 minutos** de incubação a partir de albumina sérica bovina (BSA). *Condições experimentais:* KPi 5 mM, pH 7,2; BSA 1 mg.ml<sup>-1</sup> (15 μM); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM; Fe(II) 0,1 mM; Cr(III) 0,1 mM. N=3. Colunas pretas referem-se aos pontos experimentais conduzidos na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Colunas hachuradas referem-se aos pontos conduzidos na ausência de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Coluna branca refere-se ao controle conduzido com BSA pura em meio tamponado. Letras diferentes referem-se a resultados estatisticamente diferentes com p < 0,05. Resultados expressos em concentração de proteínas carboniladas (nmol) por quantidade de proteína total (mg).

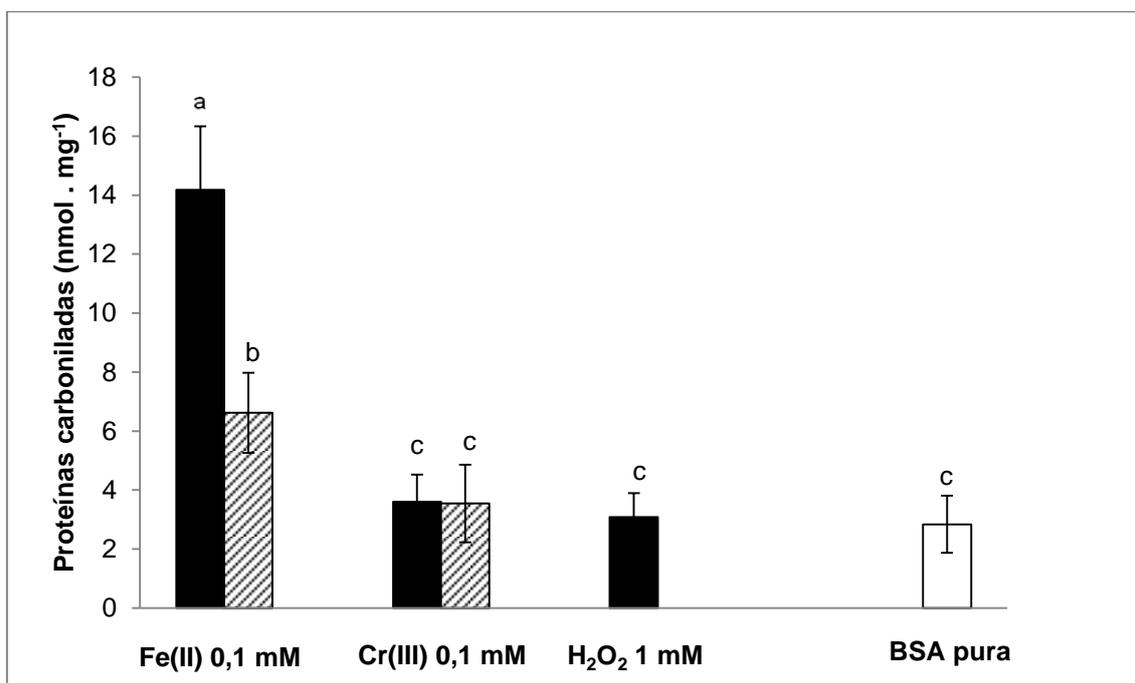


Figura 30 - Efeito de Fe(II) e Cr(III) na produção de proteínas carboniladas após **4 horas** de incubação a partir de albumina sérica bovina (BSA). *Condições experimentais:* KPi 5 mM, pH 7,2; BSA 1 mg.ml<sup>-1</sup> (15 μM); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM; Fe(II) 0,1 mM; Cr(III) 0,1 mM. N=3. Colunas pretas referem-se aos pontos experimentais conduzidos na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Colunas hachuradas referem-se aos pontos conduzidos na ausência de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Coluna branca refere-se ao controle conduzido com BSA pura em meio tamponado. Letras diferentes referem-se a resultados estatisticamente diferentes com p < 0,05. Resultados expressos em concentração de proteínas carboniladas (nmol) por quantidade de proteína total (mg).

Assim, o experimento com a proteína  $\beta$ -lactoglobulina foi conduzido apenas até 10 minutos de incubação. O resultado, apresentado na Figura 31, guarda estreita similaridade com os anteriores com BSA, qualitativa e proporcionalmente, apenas com valores de carbonil ligeiramente menores. O maior dano é observado na presença de  $\text{Fe(II)} + \text{H}_2\text{O}_2$ , enquanto o  $\text{Cr(III)}$  não provoca formação significativa de proteínas carboniladas, na presença ou ausência de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

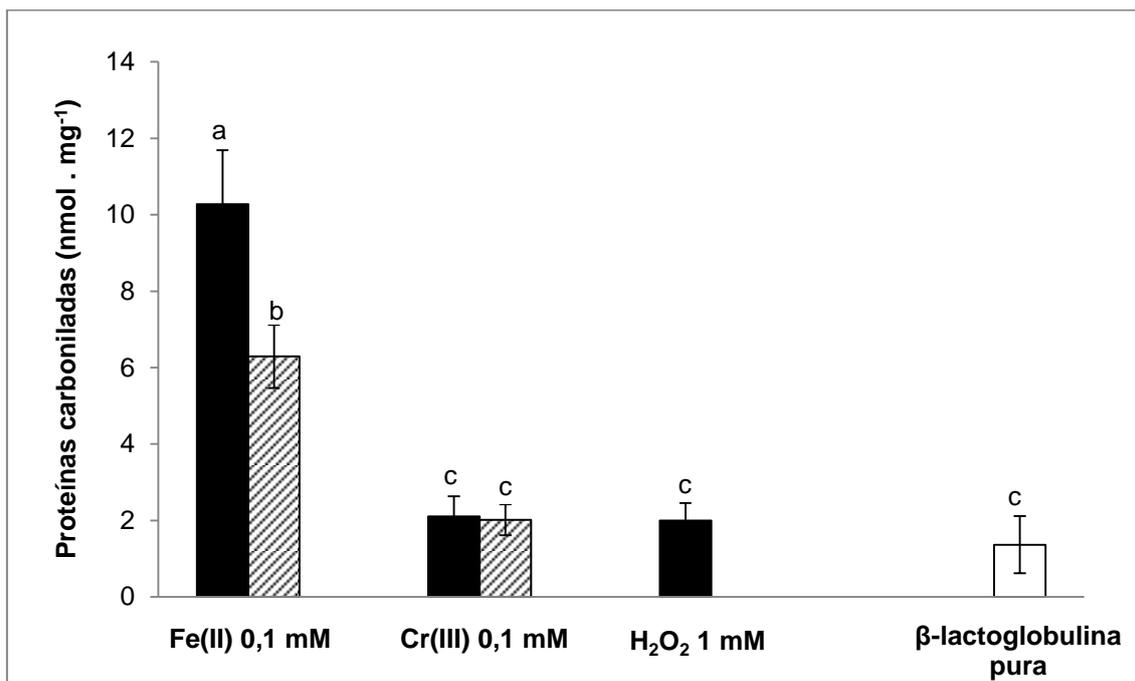


Figura 31 - Efeito de  $\text{Fe(II)}$  e  $\text{Cr(III)}$  na produção de proteínas carboniladas após 10 minutos de incubação a partir de  $\beta$ -lactoglobulina. *Condições experimentais:*  $\text{KPi}$  5 mM, pH 7,2;  $\beta$ -lactoglobulina 1  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  (0,54  $\mu\text{M}$ );  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM;  $\text{Fe(II)}$  0,1 mM;  $\text{Cr(III)}$  0,1 mM.  $N=3$ . Colunas pretas referem-se aos pontos experimentais conduzidos na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Colunas hachuradas referem-se aos pontos conduzidos na ausência de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Coluna branca refere-se ao controle conduzido com  $\beta$ -lactoglobulina pura em meio tamponado. Letras diferentes referem-se a resultados estatisticamente diferentes com  $p < 0,05$ . Resultados expressos em concentração de proteínas carboniladas (nmol) por quantidade de proteína total (mg).

Sabe-se que íons ferro e cobre podem ligar-se em pequenas quantidades à estrutura da proteína, de forma a causar danos nos sítios locais (Hermes-Lima, 2004). A ligação de íons cromo à BSA também foi sugerida a partir de ligações eletrostáticas, tanto para  $\text{Cr(III)}$  como  $\text{Cr(VI)}$  (Zhang, et al., 2009). Com cloreto de cromo(III) essa interação é lenta e aumenta com o tempo, até 24 horas (Zhang, et al., 2009).  $\text{Cr(VI)}$ , por outro lado, é capaz de induzir a formação de proteínas carboniladas, conforme será apresentado e discutido no Capítulo II.

Shrivastava e Nair (2000) estudaram o efeito do Cr(III) em BSA a partir do complexo formado com três quelantes (ligantes) diferentes: EDTA, salicilaldeído (Salen) e etilenodiamina (En). Além da própria natureza do ligante, cada complexo apresenta carga elétrica diferente, sendo  $[\text{Cr(III)-EDTA}]^{-1}$ ,  $[\text{Cr(III)-Salen}]^{+1}$  e  $[\text{Cr(III)-En}]^{+3}$ , e diferentes capacidades de interagir em meio aquoso, o que tende a afetar sua interação com proteínas (Shrivastava e Nair, 2000). A análise estequiométrica e a constante de ligação da relação proteína-cromo, mensurada por espectrofluorimetria, revelou que a quantidade de Cr(III) ligado a proteínas segue a proporção  $[\text{Cr(III)-Salen}]^{+1} > [\text{Cr(III)-EDTA}]^{-1} = [\text{Cr(III)-En}]^{+3}$ .

Os quelantes/complexadores de íons metálicos também são capazes de afetar seu potencial redox. Assim, também foi estudado por Shrivastava e Nair (2000) o efeito dos complexos de cromo sobre BSA na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Cada complexo de Cr(III) 0,1 mM foi previamente incubado por 30 minutos com BSA, com posterior adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,01 a 0,1 mM) por mais 15 minutos. O progresso da degradação protéica foi monitorado por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (Shrivastava e Nair, 2000). Foi observado que tanto Cr(III)-Salen quanto Cr(III)-EDTA foram responsáveis por provocar uma clivagem extensiva da proteína, com a formação de fragmentos menores de diferentes pesos moleculares, ou seja, sem padrões de modificação específicos. Cr(III)-En, por outro lado, não provocou qualquer dano protéico. A característica randômica do dano protéico observado nos dois primeiros casos foi atribuída à presença de radical hidroxil, produzido a partir da reação do Cr(III) com  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Shrivastava e Nair, 2000).

Dessa forma, evidencia-se que o comportamento apresentado pelo Cr(III) deve-se em grande parte ao complexo ao qual é veiculado. A natureza do quelante utilizado pode conferir tanto um maior poder oxidativo quanto maior segurança terapêutica, conforme resultados obtidos por outros autores (Bagchi, et al., 2002); (Althuis, et al., 2002); (Balk, et al., 2007). Adicionalmente, tanto nos experimentos conduzidos por Shrivastava e Nair (2000) quanto neste trabalho, foi utilizada apenas uma condição experimental, com concentração fixa de Cr(III).

Assim, a falta de efeitos do cloreto de cromo nas proteínas, conforme observado neste estudo, não significa que o íon cromo em si seja incapaz de gerar danos oxidativos e desencadear perdas de componentes celulares. Diante das diversas formas em que esse micronutriente é veiculado, faz-se necessário o estudo da capacidade de

outros complexantes de Cr(III). Outro alvo importante a ser estudado são as membranas biológicas, com a verificação se íons Cr(III), na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, podem induzir a peroxidação lipídica.

## Capítulo II – Formação de radicais livres mediada por Cr(VI)

### A. Identificação do radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ) produzido pelo sistema Cr(VI) + $\text{H}_2\text{O}_2$

Assim como observado com Cr(III), Cr(VI) também é capaz de produzir radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ) na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Essa confirmação foi obtida com a formação do sinal característico do DMPO/ $\bullet\text{OH}$  apresentado no EPR após incubação de 2 mM de Cr(VI) e 10 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por 30 minutos (Figura 32). Com a utilização do sequestrador DMPO (50 mM) não foi observado qualquer sinal detectável produzido pelo Cr(VI) individualmente.

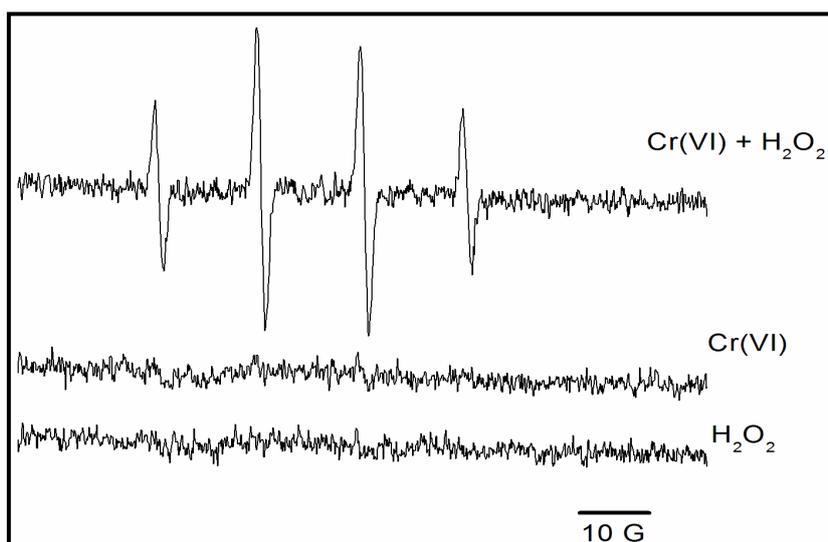


Figura 32 - Sinal de formação do complexo DMPO/ $\bullet\text{OH}$  em EPR após 30 minutos de incubação com Cr(VI) e  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Condições experimentais: Kpi 5 mM, pH 7,2; DMPO 50 mM;  $\text{H}_2\text{O}_2$  10 mM; Cr(VI) 2 mM.

Mattagajasingh e colaboradores (2008) verificaram a formação do mesmo sinal indicativo de produção de  $\bullet\text{OH}$  ao incubar 0,3 mM de Cr(VI), 0,3 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e 40 mM de DMPO (Mattagajasingh, et al., 2008).

## B. Cinética de formação de radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ) pelo sistema $\text{Cr(VI)} + \text{H}_2\text{O}_2$

O dano oxidativo provocado pelo  $\bullet\text{OH}$  na 2-DR, a partir do sistema gerador contendo 0,1 mM de  $\text{Cr(VI)}$  e 1 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , foi acompanhado em termos de cinética e apresentado na Figura 33. Diferente do observado com o  $\text{Cr(III)}$ , não há dependência do tempo para que seja observado dano significativo provocado por  $\text{Cr(VI)}$ . A incubação por 10 minutos já apresentou produção significativa de MDA em relação ao controle conduzido sem  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Mesmo aumentando o tempo para 4 horas de incubação o resultado não se altera, aproximando-se do comportamento observado para  $\text{Fe(II)}$  na reação de Fenton (Avellar, et al., 2004); (Genaro-Mattos, et al., 2009).

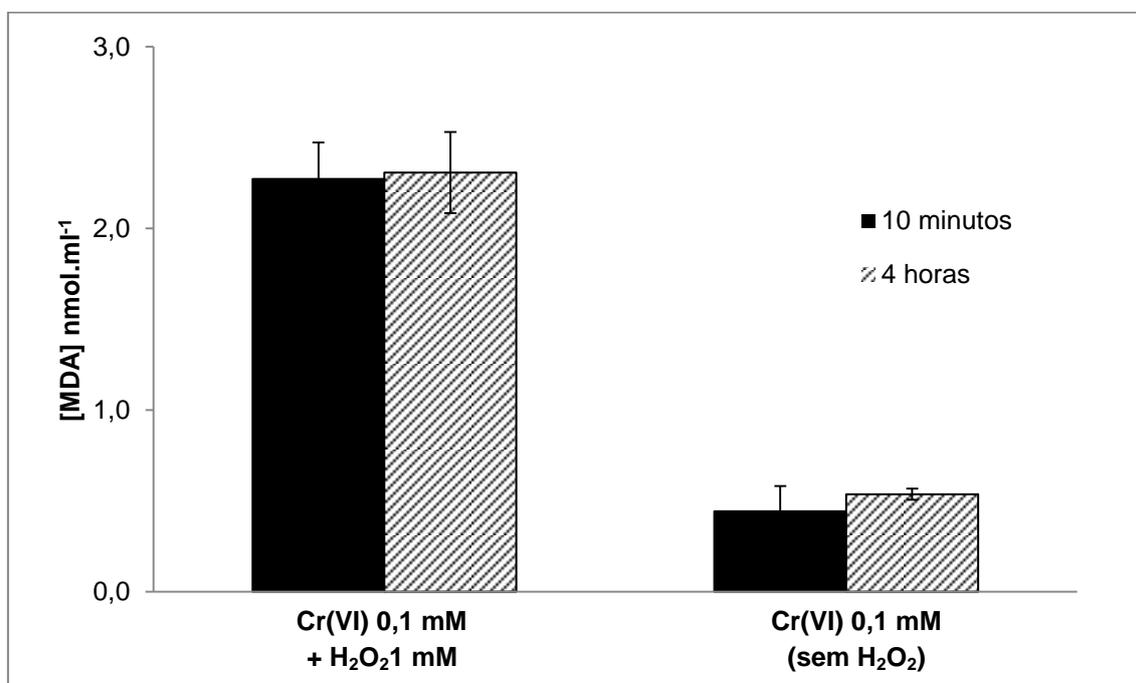


Figura 33 - Formação de MDA pela degradação oxidativa da 2-Desoxirribose após incubação com  $\text{Cr(VI)}$  por 10 minutos e 4 horas. *Condições experimentais:*  $\text{KPi}$  5 mM, pH 7,2; 2-DR 5 mM;  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM;  $\text{Cr(VI)}$  0,1 mM.  $N=6$ .

Por outro lado, a cinética acompanhada pela técnica de EPR demonstrou produção crescente de  $\text{DMPO}/\bullet\text{OH}$  por até 50 minutos, com posterior estabilização (Figura 34). Esse sistema continha 2 mM de  $\text{Cr(VI)}$ , 10 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e 50 mM de  $\text{DMPO}$ . Os pontos com o mesmo símbolo referem-se a um único curso temporal, em que cada ponto indica uma leitura individual.

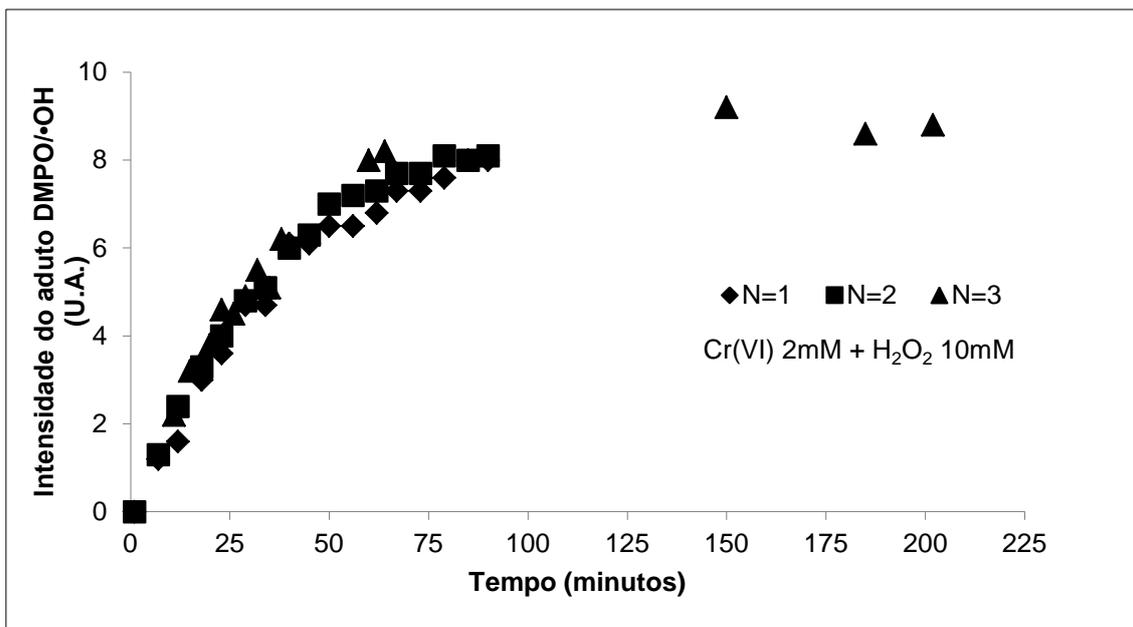


Figura 34 - Formação de DMPO•OH mediada por Cr(VI) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em EPR. Condições experimentais: KPi 5 mM, pH 7,2; DMPO 50 mM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM; Cr(VI) 2 mM.

Resultados de cinética utilizando a técnica de EPR tem-se mostrado discrepantes de outras metodologias utilizadas neste trabalho. Mesmo em sistemas geradores de •OH idênticos, conduzidos por diferentes autores e utilizando o sequestrador DMPO, não há consistência de resultados (Shi, et al., 1993); (Tsou, et al., 1996).

Borthiry e colaboradores (2007) acompanharam a produção de •OH em EPR usando o sequestrador DEPMPO (5-Diethoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrroline-*N*-oxide) (14 mM) após adição de Cr(VI) 0,05 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 mM. Foi verificado que o sinal relativo a DEPMPO/•OH apresentou-se crescente até aproximadamente 10 minutos, permanecendo estável até o tempo analisado de 1 hora (Borthiry, et al., 2007). Este resultado é mais consistente com o apresentado nesse trabalho com a utilização da metodologia da 2-DR.

Contudo, cabe apontar a diferença obtida entre as duas formas de cromo nas metodologias analisadas. Enquanto a produção de MDA por Cr(VI) mantém-se estável em cerca de 2,3 nmol.ml<sup>-1</sup> (Figura 33), Cr(III) atingiu 11,5 nmol.ml<sup>-1</sup> após 240 horas de incubação (Figura 13) e ainda mantendo sua produção a uma velocidade de 0,05 nmol.ml<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> (Figura 14).

A Figura 17 mostra que com 30 minutos de incubação a intensidade do sinal DMPO/•OH a partir da reação entre Cr(III) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é de 10 a 16 U.A. Para o mesmo tempo analisado, o sinal é de cerca de 4 U.A. para Cr(VI). Além disso, a

intensidade máxima do sinal atingida durante toda a incubação conduzida com Cr(VI) também é menor que a obtida com Cr(III). Esse resultado foi anteriormente observado também por Tsou & Yang (1996). A intensidade do sinal para 1 mM de Cr(III) foi quase 5 vezes maior que a produzida por 5 mM de Cr(VI) na presença de 10 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Tsou, et al., 1996). Parece haver, portanto, maior produção de •OH mediada por Cr(III).

### **C. Efeito da concentração de Cr(VI) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para a formação de radical hidroxil (•OH)**

A caracterização da formação de •OH mediada por Cr(VI) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> também foi conduzida em termos de concentração dos reagentes. Essa relação foi acompanhada com o método de degradação oxidativa da 2-DR e de produção de DMPO/•OH em EPR.

A concentração de Cr(VI) como variável foi feita na faixa entre 0 e 0,2 mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM e 10 minutos de incubação (Figura 35). O resultado revela uma dependência linear crescente, em que a produção de MDA acompanha o aumento da concentração de Cr(VI). Esse comportamento assemelha-se ao verificado com Cr(III), embora os valores apresentados pelo Cr(VI) sejam maiores que pelo Cr(III) para uma mesma concentração.

O EPR foi utilizado para verificar diretamente a proporção de •OH afetada pela concentração de Cr(VI) (Figura 36). Na técnica da 2-DR não foi vista a estabilização da reação, sendo monitorada até a relação Cr(VI) : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> igual a 1:5. No EPR a produção de radical hidroxil foi crescente até cerca de 4 mM de Cr(VI), estabilizando-se a partir de então. Considerando que a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizada foi de 10 mM, a proporção de saturação para a reação Cr(VI) : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> deu-se em 1 : 2,5.

A relação entre concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e produção de MDA no método da 2-DR foi conduzida até 5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mantendo-se Cr(VI) em concentração fixa de 0,1 mM, por um período de incubação de 10 minutos. O resultado está apresentado na Figura 37, assim como o controle conduzido na ausência de Cr(VI).

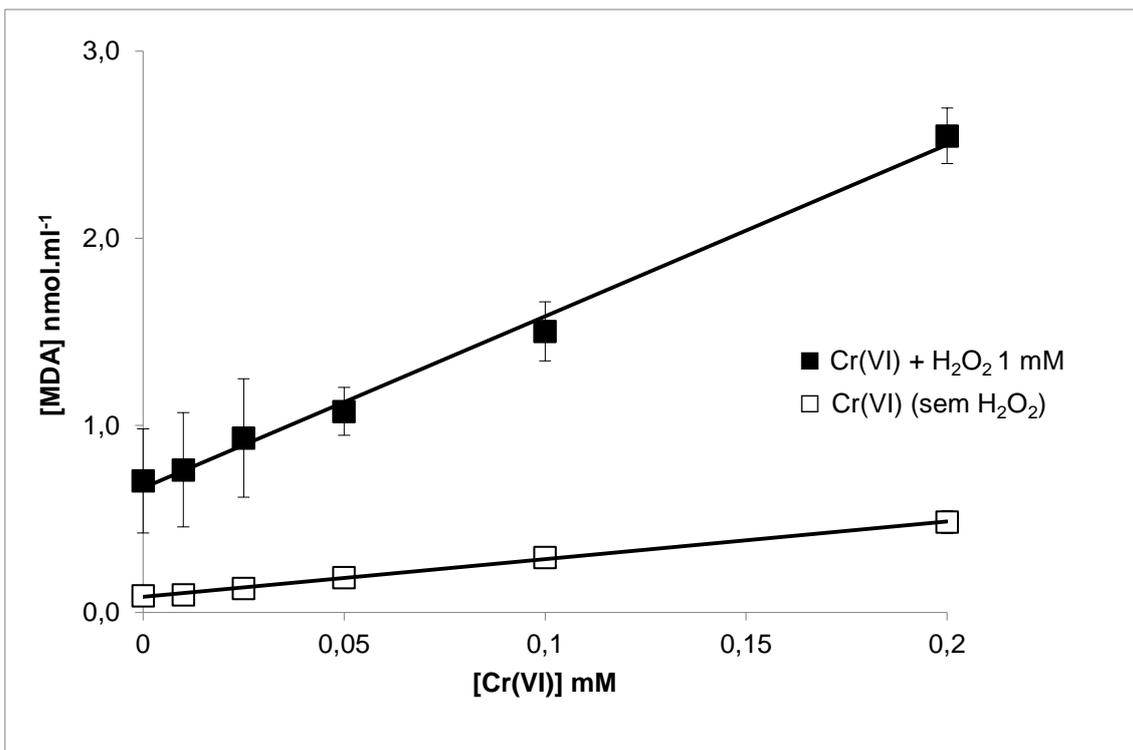


Figura 35 - Efeito da variação da concentração de Cr(VI) na oxidação da 2-DR em meios contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em 10 minutos de incubação. *Condições experimentais:* Kpi 5 mM, pH 7,2; 2-DR 5 mM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM. N=9.

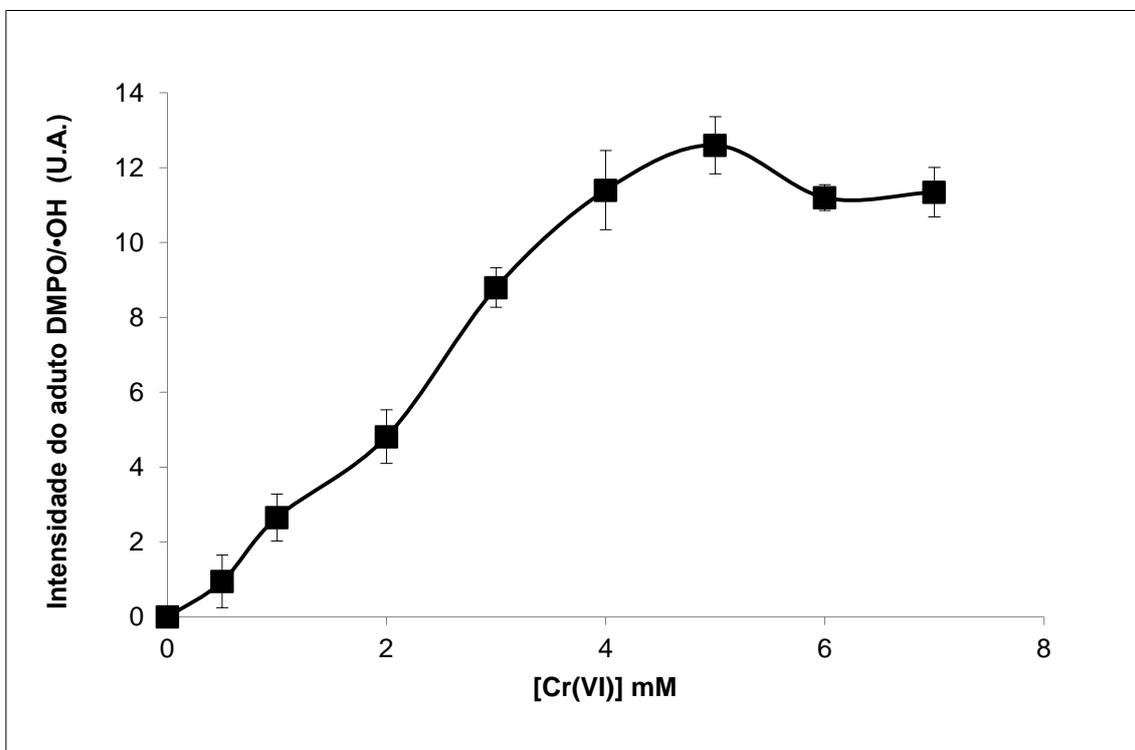


Figura 36 - Efeito da variação da concentração de Cr(VI) na formação de DMPO•OH em meio contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em EPR. *Condições experimentais:* KPi 5 mM, pH 7,2; DMPO 50 mM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM. N=3-6.

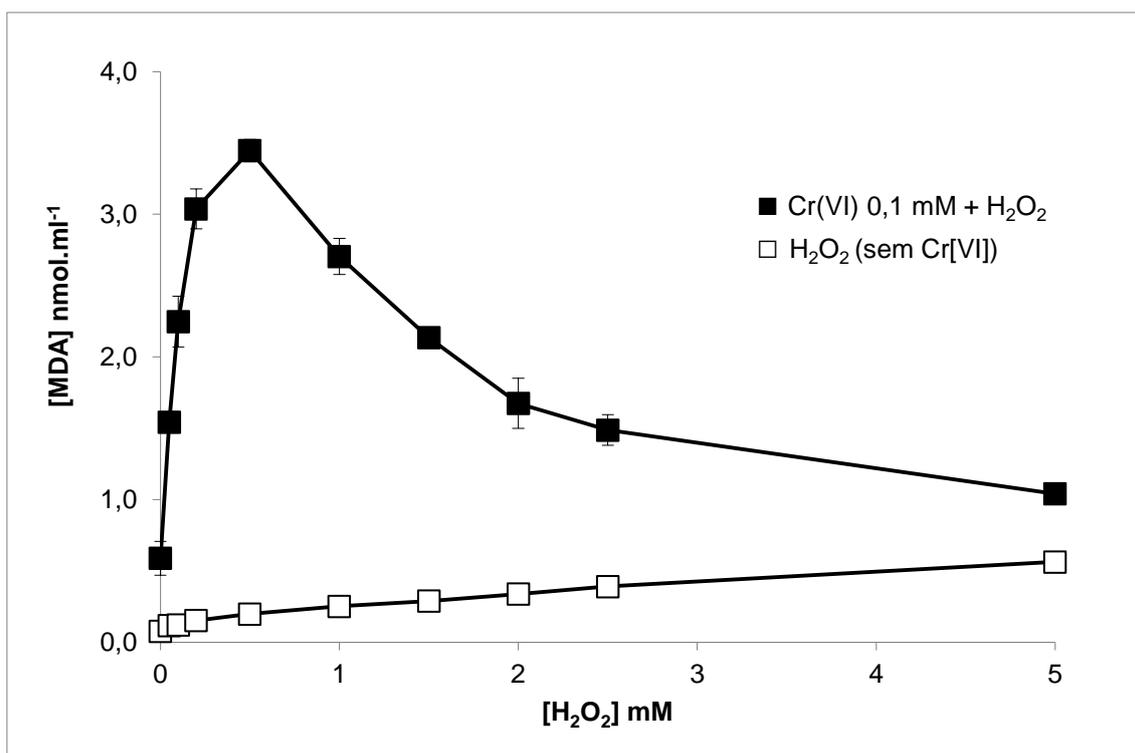


Figura 37 - Efeito da variação da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na oxidação da 2-DR em meios contendo Cr(VI) após 10 minutos de incubação. *Condições experimentais:* Kpi 5 mM, pH 7,2; 2-DR 5 mM; Cr(VI) 0,1 mM. N=6.

Observa-se que há dependência da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para a geração de •OH mediada por Cr(VI), representada por uma curva em sino (Figura 37). O dano oxidativo máximo é alcançado em aproximadamente 0,5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A partir dessa concentração a quantidade de MDA começa a decair gradativamente até 5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, última concentração analisada. Verifica-se, portanto, que a relação do Cr(VI) com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é diferente do Cr(III), para o qual a relação, nas mesmas condições, apresentou-se crescente e linear (Figura 19).

Acredita-se que o Cr(VI) seja o reagente limitante, em que 0,1 mM de Cr(VI) é capaz de reagir apenas com 0,5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Em concentrações acima de 0,5 mM, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em excesso passaria a também ser alvo do radical hidroxil, em competição com a 2-DR. Dessa forma, o dano causado a 2-DR tende a diminuir com o aumento da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que chega a 5 mM, em equivalência a 2-DR.

O mesmo experimento realizado em EPR, entretanto, não repetiu o comportamento em sino do Cr(VI). A relação entre Cr(VI) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> revelou-se crescente até a proporção de Cr(VI) : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> igual a 1:10 (Figura 38). Neste caso, mesmo em excesso, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não se configuraria em competição com o detector-alvo de •OH, pois aqui sua concentração chega apenas a 40 % da concentração de DMPO (50 mM) e não

em equivalência, como com a 2-DR. Entretanto, essa diferença entre os resultados ainda requer aprofundamento de estudo.

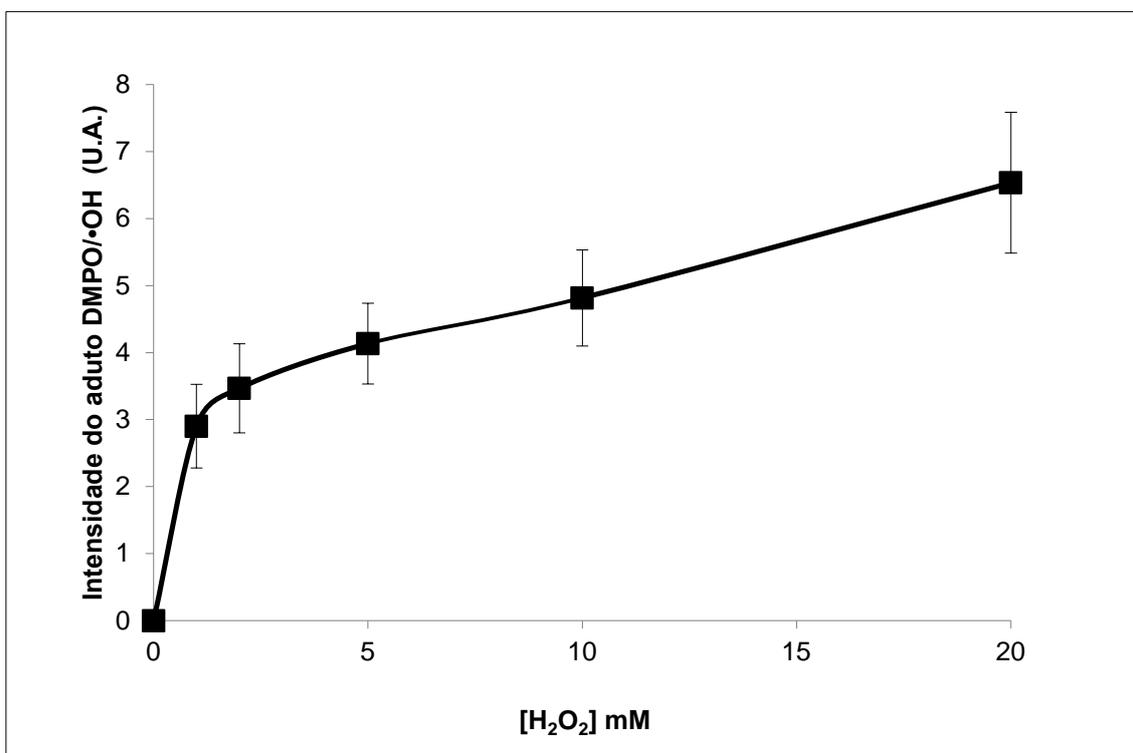


Figura 38—Efeito da variação da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na formação de DMPO/•OH mediada por Cr(VI) em EPR. Condições experimentais: KPi 5 mM, pH 7,2; DMPO 50 mM; Cr(VI) 2 mM. N=3-6.

#### D. Equilíbrio entre consumo e produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na reação com Cr(VI) para a formação de radical hidroxil (•OH)

A partir da manipulação da quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adicionada ao meio, foi possível observar que (1) sua presença é essencial para que o •OH seja produzido e que (2) há uma relação direta entre sua concentração e a quantidade de •OH gerado. Assim, também é de interesse investigar como se comporta a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante sua reação com o Cr(VI), se há consumo ou produção.

Demonstrou-se, na Figura 26, que a medida que a concentração de Fe(II) aumenta, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é consumido na reação de Fenton de maneira proporcional, sendo exaurido quando a concentração de Fe(II) é o dobro da quantidade inicial de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O mesmo procedimento foi conduzido com o Cr(VI), com o monitoramento da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a partir da oxidação do vermelho de fenol pela enzima HRPO.

Foram adicionados entre 0 e 1 mM de Cr(VI) a uma concentração inicial de 0,5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e incubados por 10 minutos. O resultado, apresentado na Figura 39, demonstra que mesmo com o aumento da concentração de Cr(VI), a quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> permanece constante, assim como observado com o Cr(III) (Figura 27).

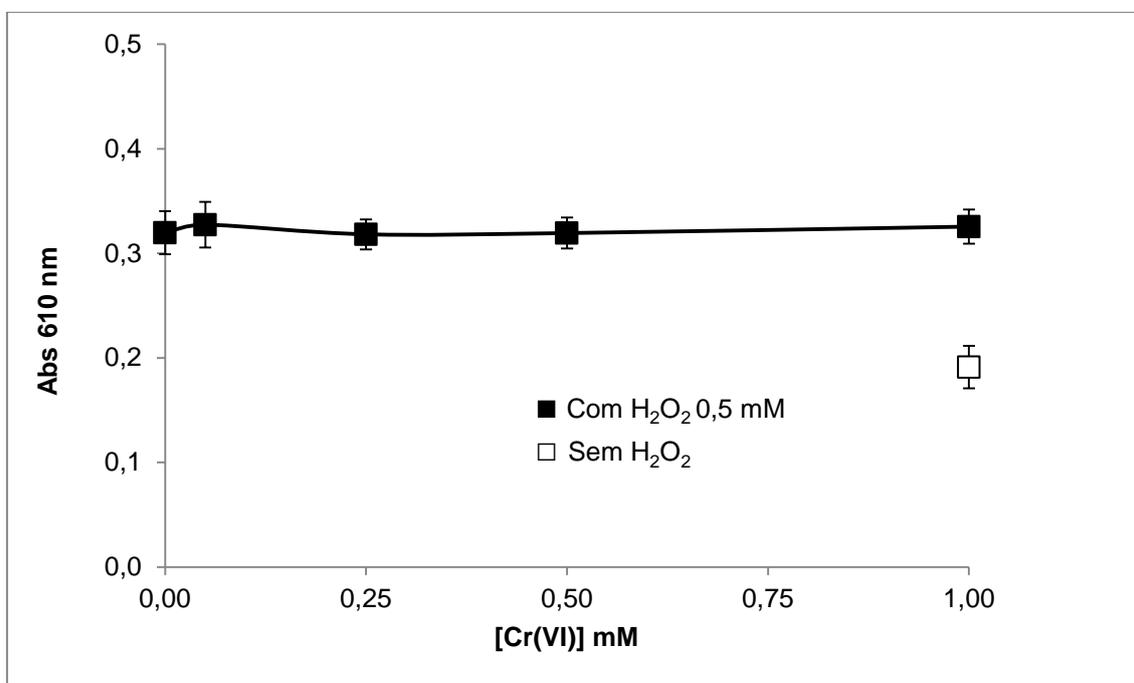


Figura 39 - Efeito da variação da concentração de Cr(VI) na concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em diferentes tempos de incubação. Condições experimentais: K<sub>pi</sub> 5 mM, pH 7,2; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM; Cr(VI) entre 0 e 1 mM. N=6.

Apesar das similaridades entre Cr(VI) e Fe(II) em relação ao tempo de reação e dependência da concentração do metal, este resultado sugere que a reação entre Cr(VI) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> difere-se também da reação de Fenton clássica pois não provoca um simples consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ao contrário, uma vez comprovado que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de fato participa da reação, a inalteração da sua concentração sugere que há um mecanismo concomitante de produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de forma a manter um equilíbrio entre produção e consumo também no sistema Cr(VI) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Zhang e colaboradores (2001) estudaram os efeitos de Cr(VI) em células humanas epiteliais e constataram a formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelo aumento da oxidação da escapoletina na presença de *horseradish* peroxidase (Zhang, et al., 2001). Essa geração ocorreria por meio da dismutação do radical superóxido (verificada pelo maior consumo de oxigênio) e seria o fator indispensável para a geração de •OH (Zhang, et al., 2001).

Ao estudar os mecanismos de redução do Cr(VI) por proteolipossomos contendo citocromo b<sub>5</sub>, Borthiry e colaboradores (2007) verificaram que a geração de radical hidroxil, detectado por EPR, foi significativamente diminuída após adição de catalase. Uma vez que não foi adicionado H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, os autores concluíram que ele foi produzido pelo próprio sistema, como etapa indispensável para a geração de •OH. A fonte, segundo os autores, também seria a partir da dismutação do superóxido (Borthiry, et al., 2007).

#### **E. Diminuindo interferentes do sistema Cr(VI) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para a formação de radical hidroxil (•OH)**

Assim como conduzido com o Cr(III), também procurou-se verificar a interferência de metais contaminantes no sistema Cr(VI) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para a geração de •OH. A utilização da resina Chelex® ocorreu conforme procedimento descrito para o Cr(III) na metodologia da 2-DR, com sua adição às soluções estoque com no mínimo 24 horas de antecedência (tampão e 2-DR) e à água deionizada utilizada no experimento e nas soluções diárias (Cr[VI] e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

A Figura 40 apresenta o resultado da incubação de 0,1 mM de Cr(VI) e 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 10 minutos, na presença e ausência de Chelex®. Da mesma forma, verifica-se que não há interferência significativa de metais contaminantes nesse sistema, uma vez que não há diferença de resultados após a adição da resina. Esse comportamento é observado tanto para os pontos experimentais quanto nos controles conduzidos na ausência de cada reagente. Assim, pode-se creditar a reação entre Cr(VI) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como a principal fonte de •OH, responsável pela produção de MDA observada.

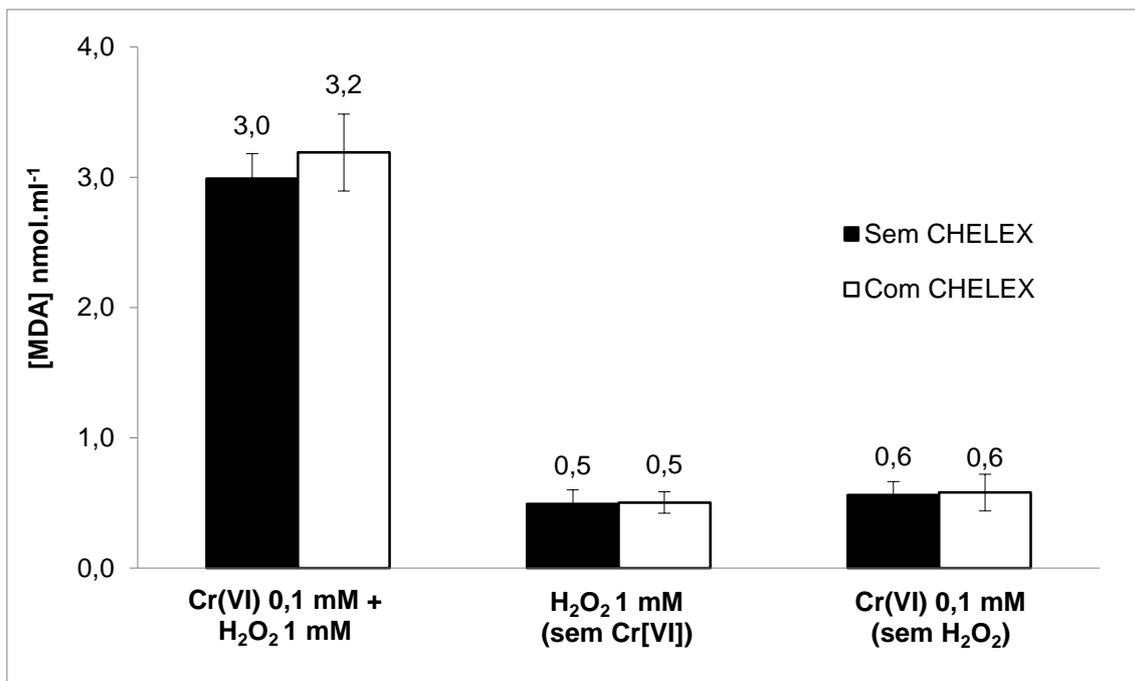


Figura 40 - Efeito da adição de Chelex® na produção de MDA em meios contendo Cr(VI) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> após 10 minutos de incubação. Condições experimentais: Kpi 5 mM, pH 7,2; 2-DR 5 mM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM; Cr(VI) 0,1 mM. N=6.

#### F. Efeito do sistema Cr(VI) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em biomoléculas – Proteínas

A fim de verificar o efeito oxidativo do sistema Cr(VI) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em biomoléculas, foram conduzidos experimentos com a utilização de proteínas purificadas (albumina sérica bovina e β-lactoglobulina) de forma a compará-lo com o dano causado por Fe(II) mediante reação de Fenton. Os experimentos foram conduzidos nas mesmas condições que as descritas anteriormente para o Cr(III), com 0,1 mM de metal (Fe[II] ou Cr[VI]), 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 10 mM de tampão fosfato, pH 7,2 e proteína purificada 1 mg.ml<sup>-1</sup> com 10 minutos de incubação<sup>8</sup>.

Os resultados apresentaram-se semelhantes para as duas proteínas utilizadas (Figura 41 e Figura 42). Conforme apontado previamente, Fe(II) é capaz de induzir a formação de proteínas carboniladas de forma significativa tanto na ausência quanto na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a partir de processos de autoxidação e reação de Fenton, respectivamente, para a produção de radicais livres.

<sup>8</sup>O efeito do sistema Cr(VI) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na albumina sérica bovina foi verificado também com 4 horas de incubação, sem apresentar diferença de resultados (Apêndice D).

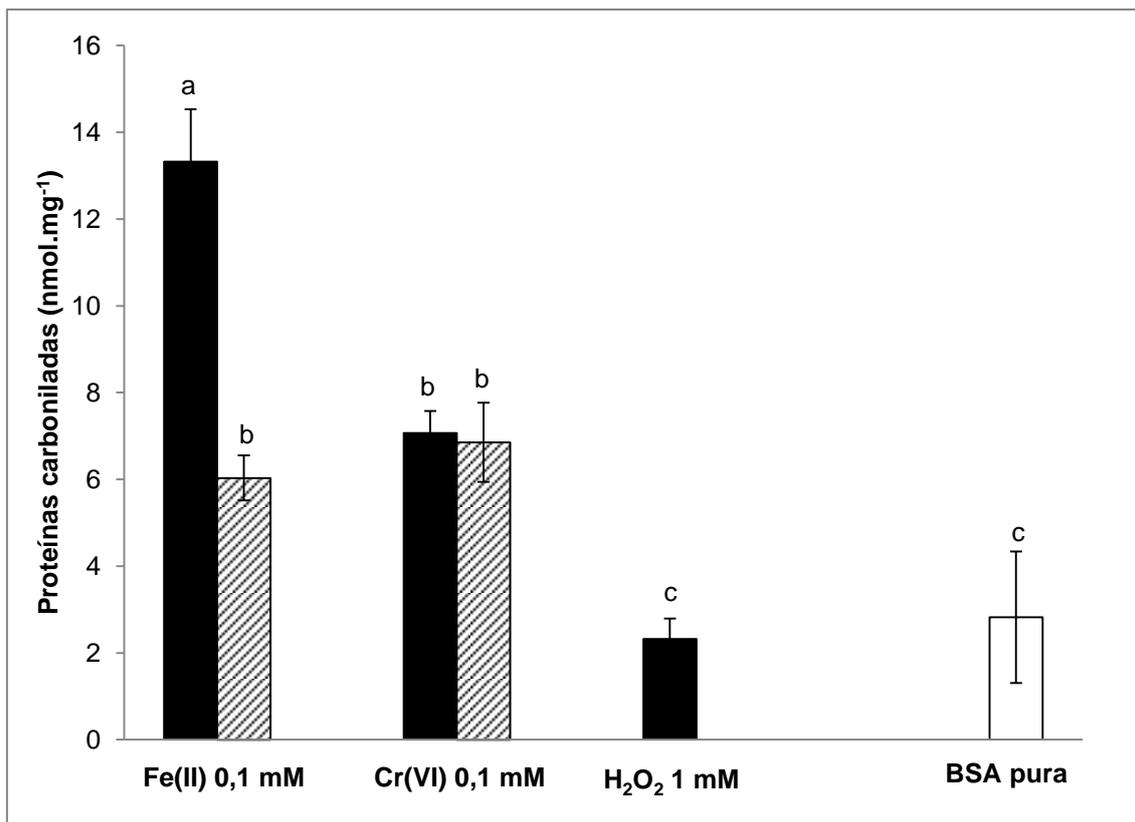


Figura 41 - Efeito de Fe(II) e Cr(VI) na produção de proteínas carboniladas após 10 minutos de incubação a partir de albumina sérica bovina (BSA). *Condições experimentais:* KPi 5 mM, pH 7,2; BSA 1 mg.ml<sup>-1</sup> (15 μM); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM; Fe(II) 0,1 mM; Cr(VI) 0,1 mM. N=3. Colunas pretas referem-se aos pontos experimentais conduzidos na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Colunas hachuradas referem-se aos pontos conduzidos na ausência de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Coluna branca refere-se ao controle conduzido com BSA pura em meio tamponado. Letras diferentes referem-se a resultados estatisticamente diferentes com  $p < 0,005$ . Resultados expressos em concentração de proteínas carboniladas (nmol) por quantidade de proteína total (mg).

Os pontos em que houve adição de Cr(VI) apresentaram valores semelhantes aos obtidos por Fe(II) por autoxidação. Diferente do Cr(III), Cr(VI) mostrou-se capaz de gerar dano significativo em proteínas comparado aos controles. Mattagajasingh e colaboradores (2008) também verificaram que o tratamento de células intactas com Cr(VI) 0,1 mM por duas horas foi responsável por aumentar em 3 vezes a formação de proteínas carboniladas em comparação com as células controle (Mattagajasingh, et al., 2008).

O efeito obtido aqui, entretanto, foi independente da presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este resultado está em conflito com os demais descritos anteriormente, nos quais a presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sempre apresentou resultados diferentes dos controles. Assim, constatado que a produção de proteínas carboniladas mediada por Cr(VI) deve-se a sua atuação independente, procurou-se estudar se essa relação seria mantida em outras concentrações de Cr(VI). Dessa forma, foi conduzido um experimento em que o dano

gerado a BSA foi monitorado entre 0,1 mM e 1 mM de Cr(VI), na ausência e na presença de 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 43).

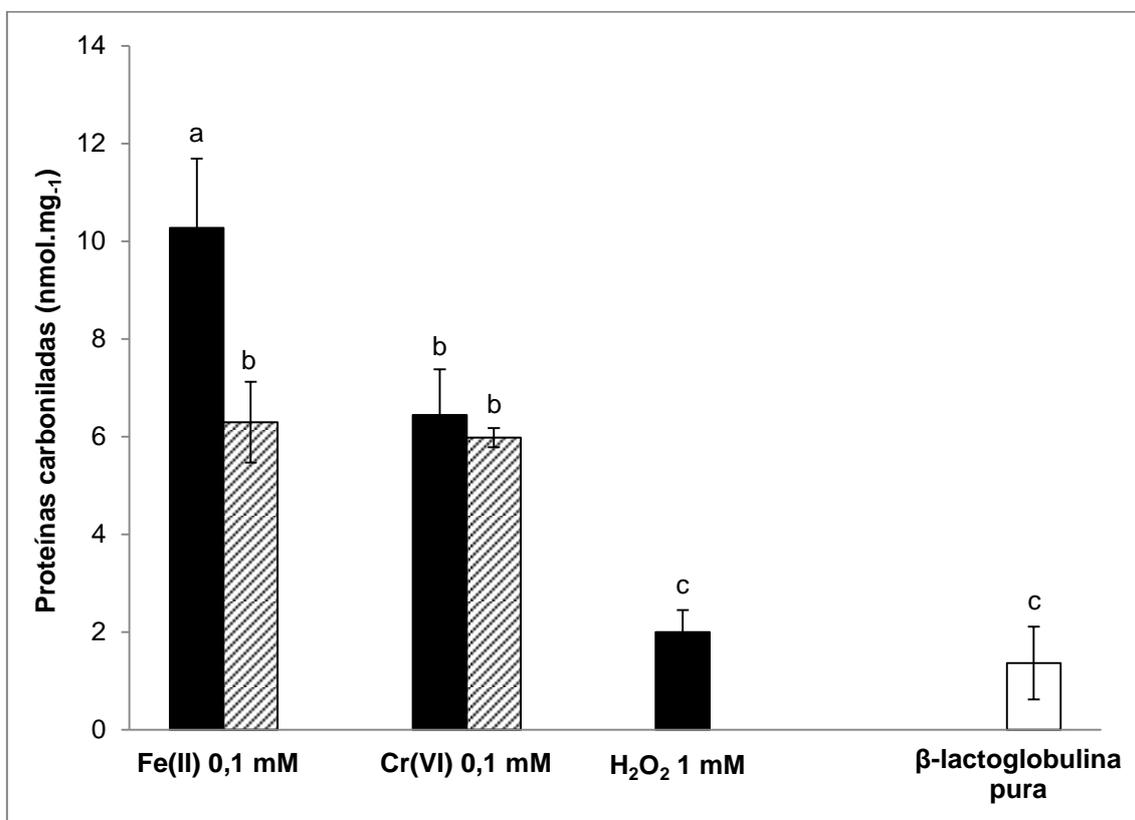


Figura 42 - Efeito de Fe(II) e Cr(VI) na produção de proteínas carboniladas após 10 minutos de incubação a partir de  $\beta$ -lactoglobulina. *Condições experimentais:* KPi 5 mM, pH 7,2;  $\beta$ -lactoglobulina 1 mg.ml<sup>-1</sup> (0,54  $\mu$ M); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM; Fe(II) 0,1 mM; Cr(VI) 0,1 mM. N=3. Colunas pretas referem-se aos pontos experimentais conduzidos na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Colunas hachuradas referem-se aos pontos conduzidos na ausência de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Coluna branca refere-se ao controle conduzido com  $\beta$ -lactoglobulina pura em meio tamponado. Letras diferentes referem-se a resultados estatisticamente diferentes com  $p < 0,05$ . Resultados expressos em concentração de proteínas carboniladas (nmol) por quantidade de proteína total (mg).

Todos os pontos na presença de Cr(VI) apresentaram resultado maior que os controles conduzidos na sua ausência ou com BSA pura. Comparando-se as concentrações de Cr(VI), a produção de proteínas carboniladas é crescente, com resultado estatisticamente diferente entre todas as concentrações analisadas (colunas de mesma cor) ( $p < 0,05$ ). Nas concentrações de 0,1 mM, 0,25 mM e 0,5 mM, a independência do Cr(VI) é mantida, uma vez que os resultados na presença ou ausência de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não diferem.

Quando a concentração de Cr(VI) passa a ser de 1 mM, equivalente a de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, verificamos que a produção de carbonil foi maior na ausência de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ou seja, quando induzida exclusivamente pelo Cr(VI). Contudo, uma vez que todas as

metodologias estudadas asseguraram que não há produção de radicais livres mediada apenas por Cr(VI), seja por autooxidação (como ocorre com o Fe[III]) ou por outro processo, sugere-se que o dano gerado exclusivamente por Cr(VI) a proteínas ocorra por complexação e ataque direto do Cr(VI) a elas, sem o envolvimento de espécies reativas de oxigênio.

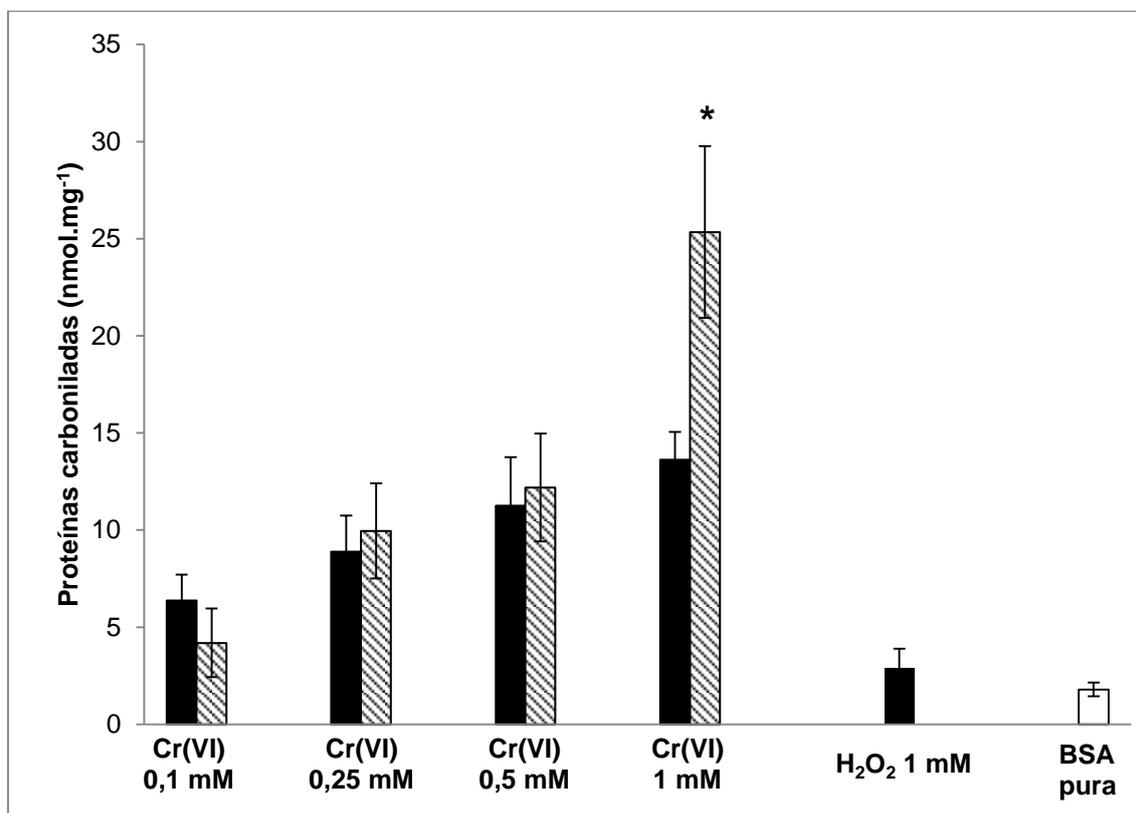


Figura 43 - Efeito da concentração de Cr(VI) na produção de proteínas carboniladas após 10 minutos de incubação a partir de albumina sérica bovina. *Condições experimentais:* KPi 5 mM, pH 7,2; BSA 1 mg.ml<sup>-1</sup> (15 μM); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM. N=5. Colunas pretas referem-se aos pontos experimentais conduzidos na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Colunas hachuradas referem-se aos pontos conduzidos na ausência de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Coluna branca refere-se ao controle conduzido com BSA pura em meio tamponado. Coluna com símbolo (\*) refere-se a um resultado estatisticamente diferente do par correspondente, com p<0,05. Resultados expressos em concentração de proteínas carboniladas (nmol) por quantidade de proteína total (mg).

A exposição de homogenatos de células contendo 1 mg de proteína a crescentes concentrações de Cr(VI), conduzido por Mattagajasingh e colaboradores (2008), causou aumento crescente da concentração de proteínas carboniladas, sendo significativo a partir de 0,01 mM de Cr(VI). Nesse caso, não foi possível distinguir se o dano gerado foi dependente ou não de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e supôs-se que seria mediante ataque radicalar do •OH gerado pela reação entre Cr(VI) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, uma vez que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> poderia

estar presente no meio celular independente de adição direta (Mattagajasingh, et al., 2008).

Qualquer que seja o mecanismo pelo qual o dano oxidativo é gerado, entretanto, um aumento no conteúdo de proteínas carboniladas é um indicativo de que isso poderia ser repercutido em alto percentual de proteínas com alterações de função no organismo vivo. Este pode ser um importante fator que contribui para o dano e morte celular mediado por Cr(VI). Dessa forma, ressalta-se o potencial tóxico da forma Cr(VI) em sistemas orgânicos.

### Capítulo III – Mecanismo de formação de radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ) mediada por Cr(III) e Cr(VI) em interação com $\text{H}_2\text{O}_2$

A característica de oxi-redução, inerente à reação de formação de radicais livres observada nesse trabalho, determina a inevitável mudança de estado de oxidação das espécies de cromo utilizadas – 3 e 6. Entretanto, a valência que pode ser alcançada nessas reações ainda não foi elucidada. Dessa forma, não estaria descartada a possibilidade de oxidação do  $\text{Cr}^{3+}$  até  $\text{Cr}^{6+}$ , assim como de redução de  $\text{Cr}^{6+}$  para  $\text{Cr}^{3+}$ .

A compreensão dos mecanismos pelos quais Cr(VI) sofre redução é de especial importância, uma vez que esse evento está diretamente relacionado aos seus efeitos tóxicos (Borthiry, et al., 2007). Borthiry e colaboradores (2007) demonstraram a formação de Cr(V) a partir da redução de Cr(VI) em sistemas aeróbicos de proteolipossomos contendo citocromo  $b_5$  (Borthiry, et al., 2007). A presença de Cr(V) em meio contendo Cr(III),  $\text{H}_2\text{O}_2$  e ascorbato, observada em EPR por Tsou & Yang (1996), fez com que esses autores também sugerissem a geração de Cr(V) e Cr(VI) a partir de Cr(III) (Tsou, et al., 1996).

Acredita-se que se um estado de oxidação for produto da reação de outro, então a adição de ambos causaria o desequilíbrio da reação. Assim, foram realizados experimentos com o método da 2-DR de forma a manter, num mesmo meio reacional, tanto Cr(III) como Cr(VI). A concentração individual de cada espécie de cromo foi de 0,1 mM e manteve-se a concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em 1 mM, tampão fosfato 5 mM, pH 7,2 e 2-DR 5 mM. O meio reacional foi incubado por 10 minutos e quatro horas e os resultados estão apresentados em comparação ao dano causado por cada cromo individualmente<sup>9</sup>.

Quando incubados por 10 minutos, o dano observado com a presença de ambas no mesmo meio reacional equivale-se ao dano provocado pelo Cr(VI) individualmente (Figura 44). Isso ocorre tanto nos pontos experimentais (na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), quanto nos controles sem  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Neste tempo, o dano observado no ponto experimental do Cr(III) não difere dos controles sem  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou mesmo sem cromo,

---

<sup>9</sup> Essa comparação também foi conduzida com concentrações individuais de cromo de 0,05 mM, em 4 horas e 10 minutos de incubação. Os resultados não diferem da concentração apresentada nesta seção e estão apresentados no Apêndice E.

reiterando a dependência do tempo para a geração de dano mediado por Cr(III). Ou seja, o dano provocado pelas duas formas juntas, em 10 minutos, refere-se apenas ao dano causado pelo Cr(VI), sem interferência do Cr(III).

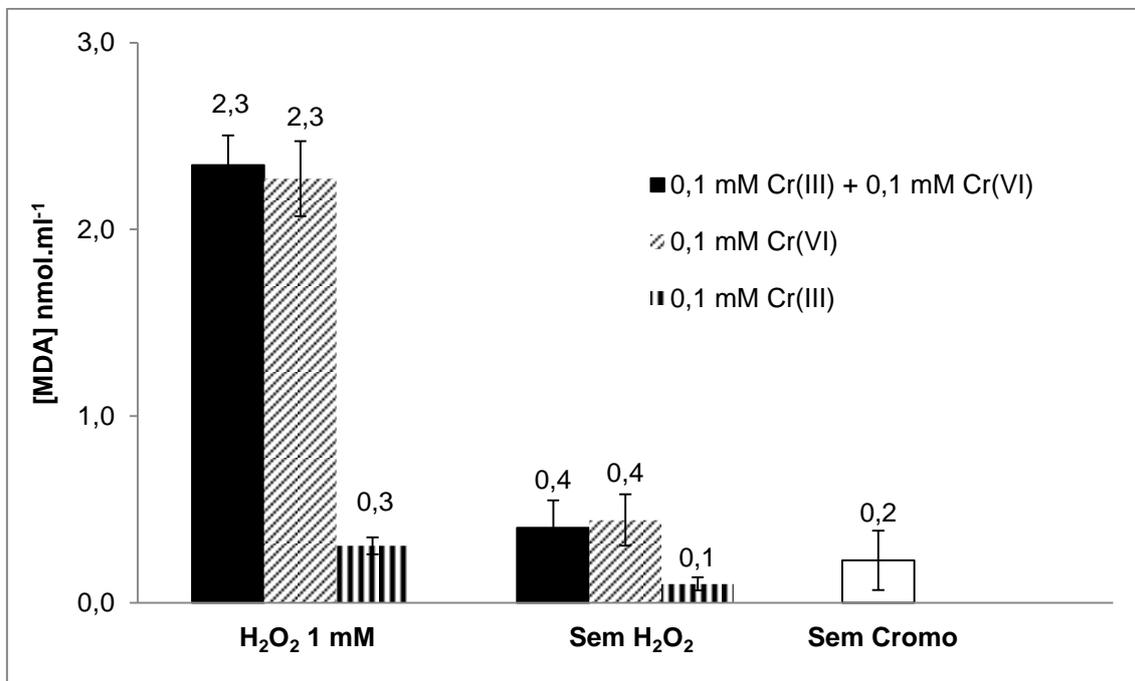


Figura 44 – Efeito da adição de Cr(III) e Cr(VI) no mesmo meio reacional na oxidação da 2-DR após 10 minutos de incubação em comparação com os danos individuais. *Condições experimentais:* Kpi 5 mM, pH 7,2; 2-DR 5 mM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM; Cr(III) 0,1 mM; Cr(VI) 0,1 mM. N=6.

Quando aumentamos o tempo para 4 horas, entretanto, já é possível ver diferença entre o dano provocado quando as duas formas de cromo estão juntas e suas ações individuais (Figura 45). Cr(III) contribuiu de forma significativa para a geração de radical hidroxil e conseqüente dano a 2-DR, tanto quando incubado individualmente, quanto em conjunto com Cr(VI). Na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o valor encontrado para a incubação conjunta de ambas as formas de cromo assemelha-se a soma dos valores individuais obtidos.

Esse resultado sugere que possivelmente a atuação de cada espécie de cromo na geração de radicais livres seja de forma independente e que seus mecanismos não são interferentes ou coincidentes. Borthiry e colaboradores (2008), ao acompanhar a produção de •OH por Cr(VI), verificaram que ela foi crescente até 10 minutos, mas constante até 1 hora. Mesmo durante esse período de estabilidade, entretanto, foi verificado que o “desaparecimento” do Cr(VI) continuou ocorrendo, ou seja, continuou

sendo reduzido a valências menores. Como conclusão, os autores sugeriram que a redução do Cr(VI) ocorre até formas de cromo que não contribuiriam para o  $\bullet\text{OH}$  gerado e que o Cr(III) seria essa forma predominante (Borthiry, et al., 2007).

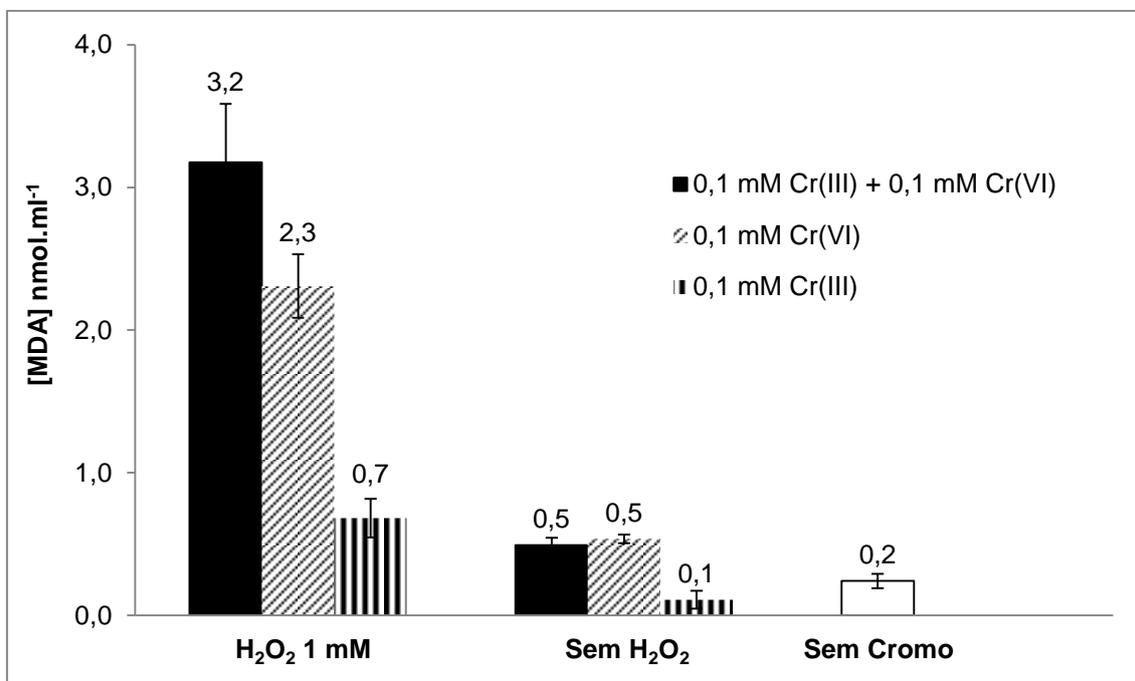


Figura 45 - Efeito da adição de Cr(III) e Cr(VI) no mesmo meio reacional na oxidação da 2-DR após 4 horas de incubação em comparação com os danos individuais. *Condições experimentais:* Kpi 5 mM, pH 7,2; 2-DR 5 mM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM; Cr(III) 0,1 mM; Cr(VI) 0,1 mM. N=9.

A falta de interferência observada com a incubação conjunta de Cr(III) e Cr(VI) e a constatação de que Cr(III) pode sim contribuir de forma significativa para a produção de  $\bullet\text{OH}$  sugerem que a redução de Cr(VI) seria interrompida antes de chegar a Cr(III). Sugere-se, portanto, que no sistema analisado o cromo não chega a outro estado mais estável, passando apenas por espécies intermediárias, como Cr<sup>2+</sup>, Cr<sup>4+</sup> e ou Cr<sup>5+</sup>. Estas são menos estáveis e consideravelmente mais reativas, o que incita maior produção de radical hidroxil.

Além de independentes, os resultados de cinética e a interação que cada espécie apresenta em relação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sugerem ainda que os mecanismos envolvidos na produção de radicais livres são diferentes entre Cr(III) e Cr(VI).

**A. Mecanismo de formação de radical hidroxil (•OH) pelo sistema Cr(III) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

O envolvimento do cromo, um metal de transição com capacidade de oxi-redução semelhante ao ferro e cobre, e do peróxido de hidrogênio para a geração de radical hidroxil, sugere um mecanismo do tipo Fenton de formação de radicais livres. Esse raciocínio está em consonância com o sugerido por Tsou & Yang (1996) após observarem a inibição provocada por catalase na presença dos mesmos reagentes. A reação então sugerida por esses autores segue de acordo com a forma clássica, sendo necessária apenas a oxidação do metal pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para que o •OH seja gerado (Reação 17) (Tsou, et al., 1996).

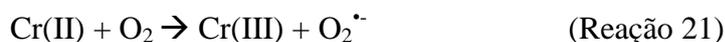


Entretanto, esse mecanismo não é suficiente para explicar a produção por 10 dias de •OH (Figura 13), uma vez que para isso é necessário que os reagentes estejam constantemente disponíveis no meio reacional. O equilíbrio da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi demonstrado com o uso da técnica de oxidação do vermelho de fenol. Nesse sentido, acreditamos que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> participe tanto como reagente quanto como produto.

Com o Cr(III), entretanto, não é possível obter a mesma evidência de manutenção da concentração, uma vez que não foi possível monitorar ao longo do tempo. Acredita-se, contudo, que o mecanismo também promova sua reciclagem, mantendo sua concentração aproximadamente constante. Sem esse fator todo o Cr(III) adicionado inicialmente seria consumido, ou seja, oxidado ou reduzido a outras valências, o que cessaria a produção de radical hidroxil. Também não foi possível distinguir, pelos métodos utilizados, se sua participação na reação ocorre por oxidação ou redução. Entretanto, por qualquer dos meios, os resultados sugerem que há o retorno para a forma inicial de Cr(III) sem alcançar a oxidação máxima a Cr(VI).

Assim, foram desenvolvidos dois mecanismos para a geração de •OH mediada por Cr(III) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, propostos em conjunto com o prof. Marcelo Hermes-Lima e Thiago C. Genaro-Mattos, Mestre em Química (UnB) e colaborador neste estudo. O primeiro mecanismo considera a redução do Cr(III) a Cr(II) e o outro sua oxidação a Cr(VI), a partir do desenvolvimento da Reação 17.

No primeiro caso, inicialmente o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> promoveria a redução do Cr(III) a Cr(II), com formação de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Reação 18). A geração de •OH ocorreria na segunda etapa, de oxidação do Cr(II) também pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e formação de Cr(III) (Reação 19). Conforme proposto, a manutenção da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ocorreria por meio da dismutação de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Reação 20)<sup>10</sup>. Uma fonte extra de Cr(III) e O<sub>2</sub><sup>•-</sup> poderia ser a oxidação do Cr(II) pelo oxigênio molecular (Reação 21), entretanto com a limitação da concentração de O<sub>2</sub> dissolvido no meio aquoso, de aproximadamente 250 μM ao nível do mar (cerca de 230 μM a 1000 metros de altitude) (Connel, 1997).



No caso do desenvolvimento da Reação 17, segundo mecanismo proposto, ocorreria uma inversão de etapas. A formação de •OH seria na primeira etapa, por oxidação do Cr(III) pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Reação 17), conforme Tsou & Yang (1996). O Cr(IV) produzido passaria a ser a fonte de reciclagem de Cr(III) e geração de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> por redução (Reação 22). Novamente, a dismutação de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> formaria o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e auxiliaria na manutenção da sua concentração (Reação 20).



A partir dessas reações hipotéticas, a reciclagem constante de Cr(III) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seria o meio pelo qual a reação entre eles mantém-se capaz de produzir •OH mesmo com longos períodos de incubação. Esses seriam os requisitos básicos do mecanismo proposto, uma vez que garantiria a disponibilidade mínima de reagentes.

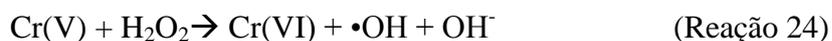
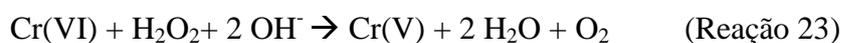
<sup>10</sup> Esse mecanismo foi apresentado no pôster “Chromium mediated hydroxyl radical formation. The longest-lasting Fenton-type reaction reported so far” por Thiago C. Genaro-Mattos no congresso da Society for Free Radical Biology and Medicine de 2009 em São Francisco, Califórnia, sendo bem aceito.

Outro mecanismo possível seria considerar que não foi verificada variação na concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelo fato de sua reação com o Cr(III) ocorrer de forma tão lenta que não foi possível mensurar seu decaimento além do provocado pelo tempo. Essa proposição não considera, portanto, que haja uma produção concomitante de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e sim que a baixa velocidade da reação entre Cr(III) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não provocaria alterações significativas em sua concentração que pudessem ser detectadas pelo método utilizado<sup>11</sup>.

### **B. Mecanismo de formação de radical hidroxil (•OH) pelo sistema Cr(VI) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Os resultados apresentados nesse trabalho reiteram a capacidade de íons Cr(VI) em gerar radical hidroxil na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A diminuição do sinal característico de •OH observada em EPR após adição de catalase em meios contendo Cr(VI) confirmou a participação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Borthiry, et al., 2007). Essa reação, entretanto, requer a redução de Cr(VI) a Cr(V), o que também já foi demonstrado por diferentes autores (Bagchi, et al., 2002); (Borthiry, et al., 2007); (Mattagajasingh, et al., 2008). Assim, acredita-se que o Cr(V), produzido a partir da redução do Cr(VI), seria a espécie capaz de produzir radical hidroxil após reação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em uma reação tipo Fenton.

Por esse raciocínio, Borthiry e colaboradores (2007) sugeriram a Reação 24 para a produção de •OH via Cr(V), à qual foi acrescida uma etapa inicial por Mattagajasingh e colaboradores (2008), compreendendo a redução do Cr(VI) (Reação 23).



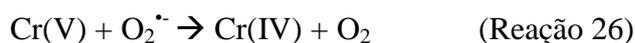
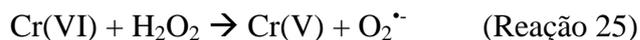
Esse mecanismo, entretanto, não contempla produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e sugere um ciclo redox para o Cr(VI), em que este sim seria mantido em concentração ao menos parcialmente constante. Verificou-se que a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> permanece inalterada

---

<sup>11</sup> Essa nova proposta de mecanismo não estava contemplada no texto inicial e ainda carece um melhor desenvolvimento. Ela foi proposta durante a arguição pela banca examinadora e, por sua coerência, foi também incluída no texto final.

nesse sistema, a partir do monitoramento da oxidação do vermelho de fenol pela HPRO. Dessa forma, acredita-se que durante esse processo também haja produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, também por dismutação de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Nesse caso, sugere-se que a produção de superóxido pelo consumo de O<sub>2</sub> seria a fonte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a partir de sua dismutação, conforme pontuado por Zhang e colaboradores (2001) e Borthiry e colaboradores (2007) (Zhang, et al., 2001); (Borthiry, et al., 2007).

Para o Cr(VI), os resultados apresentados nesse trabalho sugerem que ele seja o reagente limitante e que não seja reciclado eficientemente. Sugere-se que o Cr(V) também possa ser gerado diretamente pela redução do Cr(VI) pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Reação 25), com a formação de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, como uma opção alternativa a proposta de Mattagajasingh e colaboradores (2008) (Reação 23). O Cr(V) gerado deve ser, em parte, reduzido a Cr(IV), possivelmente pelo próprio O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Reação 26). A partir deste estado de oxidação não haveria mais redução, uma vez que não deve haver produção de Cr(III).



## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

---

Apesar de a redução intracelular do cromo hexavalente ser apresentada classicamente na literatura como uma forma de detoxificação (Guallar, et al., 2005), verificou-se nesse trabalho que esse processo pode induzir a geração de espécies reativas de oxigênio, notadamente radical hidroxil e peróxido de hidrogênio. De forma similar, cromo trivalente, um micronutriente, também apresentou expressivo potencial de geração de EROs, também incluindo  $\bullet\text{OH}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

A produção de radical hidroxil mediada por ambas espécies de cromo mostrou-se dependente da concentração tanto do metal quanto de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . O comportamento cinético de Cr(VI) não requer longos períodos de incubação, assemelhando-se a forma clássica apresentada por Fe(II). Com o Cr(III), entretanto, a produção de  $\bullet\text{OH}$ , confirmada por quatro metodologias, apresentou-se contínua, mesmo após vários dias de incubação (Figuras 13 e 15). Ressalta-se que esse comportamento é inédito para metais de transição que são catalisadores de reações tipo Fenton.

Confirmando seu potencial tóxico, a presença de Cr(VI), independente de qualquer outro reagente, foi suficiente para causar danos oxidativos às proteínas albumina e  $\beta$ -lactoglobulina (Figuras 41 a 43). Se o comportamento for o mesmo para todas as classes de proteínas, poderia resultar em inativação de enzimas, modificação de receptores e transdutores de sinal, alteração de proteínas transportadoras, entre outros, em organismos vivos.

Não foi demonstrado neste trabalho que a capacidade oxidativa do Cr(III) seja danosa a biomoléculas *in vitro*. Entretanto, não é possível concluir que o mesmo comportamento “inofensivo” ocorra *in vivo*. Além disso, dentre as biomoléculas, foi estudada apenas a influência em proteínas isoladas, ficando a verificação da peroxidação lipídica e de danos em DNA como perspectiva de trabalho futura.

Dessa forma, uma vez que ainda não está comprovada a segurança e tampouco os benefícios de sua suplementação, a utilização do micronutriente cromo trivalente em concentrações acima da necessidade dietética fisiológica apresenta-se desaconselhada, especialmente em situações inerentemente de estresse oxidativo, como é o caso do Diabetes Mellitus (Balk, et al., 2007).

Sugeriu-se que a formação de  $\bullet\text{OH}$ , tanto para Cr(III) como Cr(VI), ocorra a partir de reação do tipo Fenton, envolvendo seus metabólitos intermediários, em interação com o  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Cada processo, entretanto, ocorre de forma independente, mas assemelham-se na reciclagem de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Estudos cinéticos e termodinâmicos, conduzidos por áreas da Química mais especializadas nesses sistemas, poderiam concluir as reais etapas, constituintes e mecanismos envolvidos na produção de radical hidroxil mediada por Cr(III) e Cr(VI). De forma concomitante, também fazem-se necessários estudos em meios biológicos mais complexos para a compreensão se a capacidade oxidativa observada é de fato estimulada em sistemas *in vivo* e se esse fato acarreta em significativos danos celulares e teciduais. Para Cr(III), especialmente, também é requerido o aprofundamento do estudo de sua exposição crônica e diferentes complexadores de metal (citrato, por exemplo).

Reconhece-se, ainda, que o entendimento deste mecanismo não limita ou exclui a influência sistêmica em um organismo vivo. A possibilidade de interação com os demais (complexos) sistemas celulares pode oferecer novos caminhos e possibilidades de reação aos reagentes e produtos, aqui estudados em poucas condições experimentais. Entretanto, a compreensão da bioquímica básica auxilia a lançar luz a novas possibilidades de investigação e é este o maior propósito deste trabalho.

Assim, este estudo contribuiu para enriquecer o atual estado da arte acerca dos mecanismos envolvidos na geração de espécies reativas de oxigênio mediada por íons Cr(III) e Cr(VI) em sistemas *in vitro*. Sugere-se a continuidade do estudo dos efeitos do Cr(III), uma vez aqui detectados, de forma a assegurar a segurança de sua utilização terapêutica e do Cr(VI), para esclarecer seu processo tóxico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Albanes, D., Heinonen, O. P. e Huttunen, J. K. 1994.** The Effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *The New England Journal of Medicine*. 1994, Vol. 330, 15, pp. 1029-1035.
- Althuis, M. D., et al. 2002.** Glucose and insulin responses to dietary chromium supplements: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr*. 2002, Vol. 76, pp. 148-55.
- American Diabetes Association.** [Online] <http://www.diabetes.org/>.
- Anderson, R. A. e Mertz, W. 1977.** Glucose tolerance factor: an essential dietary agent. *Trends in Biochemical Sciences*. 1977, Vol. 2, pp. 277-279.
- Augusto, O. 2006.** *Radicais Livres: bons, maus e naturais*. São Paulo : Oficina de Textos, 2006.
- Avellar, I. G.J., et al. 2004.** Reevaluating the role of 1,10-phenanthroline in oxidative reactions involving ferrous ions and DNA damage. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2004, Vol. 1675, pp. 46-53.
- Bagchi, D., et al. 2002.** Cytotoxic and oxidative mechanisms of different forms of chromium. *Toxicology*. 2002, Vol. 180, pp. 5-22.
- Balk, E. M., et al. 2007.** Effect of chromium supplementation on glucose metabolism and lipids. *Diabetes Care*. 2007, Vol. 30, pp. 2154-2463.
- Barreto, J. C., et al. 1995.** Terephthalic acid: a dosimeter for the detection of hydroxyl radicals in vitro. *Life Sciences*. 4, 1995, Vol. 56, pp. 89-96.
- Borthiry, G. R., et al. 2007.** Reduction of hexavalent chromium by human cytochrome b5: Generation of hydroxyl radical and superoxide. *Free Radical Biology & Medicine*. 2007, Vol. 42, pp. 738-755.
- Brasil. 2011.** *Diretrizes metodológicas: Elaboração de pareceres técnico-científicos*. Brasília : Ministério da Saúde, 2011.
- Bratakos, M. S., Lazos, E. S. e Bratakos, S. M. 2002.** Chromium content of selected Greek foods. *The Science of the Total Environment*. 2002, Vol. 290, pp. 47-58.
- Buettner, G. R. 1993.** The spin trapping of superoxide and hydroxyl free radicals with DMPO (5,5-dimethylpyrroline-N-oxide): more about iron. *Free Rad. Res. Comms*. 1993, Vol. 19, pp. S79-S87.
- Bunker, V. W., et al. 1984.** The uptake and excretion of chromium by elderly. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1984, Vol. 39, pp. 797-802.

- Cayman Chemical Company. 2011.** *Protein carbonyl assay kit*. Ann Arbor : Cayman Chemical Company, 2011.
- Cerulli, J., et al. 1998.** Chromium picolinate toxicity. *Ann. Pharmacother.* 1998, Vol. 32, pp. 428-431.
- Cheeseman, K. H., Beavis, A. e Esterbauer, H. 1988.** Hydroxyl-radical-induced iron-catalysed degradation of 2-deoxyribose. *Biochem J.* 1988, Vol. 252, pp. 649-653.
- Connel, D. W. 1997.** *Basic concepts of environmental chemistry*. s.l. : Boca Raton: Lewis, 1997.
- Figgitt, M., et al. 2010.** The genotoxicity of physiological concentrations of chromium (Cr(III) and Cr(VI)) and cobalt (Co(II)): an in vitro study. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2010, Vol. 688, pp. 53-61.
- Fonseca, A. W. 2009.** Efeito da flutuação da disponibilidade de oxigênio e da privação alimentar sobre o metabolismo de radicais livres. *Tese de Doutorado*. Instituto de Biociências, USP : s.n., 2009.
- Fowler, J.F. 2000.** Systemic contact dermatitis caused by oral chromium picolinate. *Cutis*. 2000, Vol. 65, p. 116.
- Freinbichler, W., et al. 2011.** Highly reactive oxygen species: detection, formation and possible functions. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2011, Vol. 68, pp. 2067-2079.
- Freinbichler, W., et al. 2008.** The detection of hydroxyl radicals in vivo. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2008, Vol. 102, pp. 1329-1333.
- Garcia, E., et al. 2001.** Daily dietary intake of chromium in southern Spain measured with duplicate diet sampling. *British Journal of Nutrition*. 2001, Vol. 86, pp. 391-396.
- Genaro-Mattos, T. C. 2009.** Mecanismo de ação antioxidante dos ácidos caféico e tânico em sistemas contendo íons ferro. *Dissertação de Mestrado*. Instituto de Química, Universidade de Brasília : s.n., 2009.
- Genaro-Mattos, T. C., et al. 2009.** Chromium mediated hydroxyl radical formation. The longest-lasting Fenton type reaction reported so far. *Free Radical Biology and Medicine*. 2009, Vol. 47, p. S188.
- Genaro-Mattos, T. C., et al. 2009.** Reevaluation of the 2-deoxyribose assay for determination of free radical formation. *Biochim Biophys Acta*. 2009, Vol. 1790, pp. 1636-1642.

- Gibson, R. S., Mc Donald, A. C. e Martinez, O. B. 1985.** Dietary chromium and manganese intakes of a selected sample of Canadian elderly women. *Hum Nutr Appl Nutr.* 1985, 39, pp. 43-52.
- Gomes, C. S. 2005.** Estudos da oxidação de íons ferro e estanho na produção de radicais livres: efeitos de antioxidantes. *Dissertação de Mestrado.* Instituto de Química, Universidade de Brasília : s.n., 2005.
- Guallar, Eliseo, et al. 2005.** Low Toenail Chromium Concentration and Increased Risk of Nonfatal Myocardial Infarction. *American Journal of Epidemiology.* Março de 2005, Vol. 162, 2, pp. 157-164.
- Halliwell, B. e Gutteridge, JMC. 2007.** *Free Radicals in Biology and Medicine.* 4a ed. Londres : Oxford University Press, 2007.
- Hamanaka, R. B. e Chandel, N. S. 2010.** Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends in Biochemical Sciences.* 2010, Vol. 35, pp. 505-513.
- Haro, María Isabel Grijalva, Vázquez, Martha Nydia Ballesteros e Pacheco, Rosa María Cabrera. 2001.** Contenido de cromo en alimentos y estimación de su ingestión dietaria en el noroeste de México. *Arch Latinoam Nutr.* Mar de 2001, Vol. 51, 1, pp. 105-10.
- Hawkins, C. L., Morgan, P. E. e Davies, M. J. 2009.** Quantification of protein modifications by oxidants. *Free Radical Biology and Medicine.* 2009, Vol. 46, 8, pp. 965-988.
- Hermes-Lima, M. 2004.** Oxidative stress and medical sciences. [A. do livro] K B. Storey. *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation.* s.l. : John Wiley & Sons, Inc., 2004, pp. 369-382.
- . **2004.** Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. [A. do livro] K. B. Storey. *Functional Metabolism: regulation and adaptation.* Nova Iorque : John Wiley & Sons, Inc, 2004, pp. 319-68.
- Hermes-Lima, M., et al. 1994.** Deoxyribose degradation catalyzed by Fe(III)-EDTA: kinetic aspects and potential usefulness for submicromolar iron measurements. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 1994, Vol. 137, 1, pp. 65-73.
- Hermes-Lima, M., et al. 1998.** The iron chelator pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) protects plasmid pUC-18 DNA against \*OH-mediated strand breaks. *Free Radic Biol Med.* 1998, Vol. 25, pp. 875-80.
- Hua, Y., et al. 2012.** Molecular mechanisms of chromium in alleviating insulin resistance. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 2012, Vol. 23, pp. 313-319.

- Hummel, M., Standl, E. e Schnell, O. 2007.** Chromium in metabolic and cardiovascular disease. *Horm Metab Res.* 2007, Vol. 39, pp. 743-751.
- Huszonek, J. 1993.** Over-the-counter chromium picolinate. *Am. J. Psychiatry.* 1993, Vol. 150, pp. 1560-1561.
- Institute of Medicine. 2001.** Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. *Dietary Reference Intakes.* 2001, pp. 197-223.
- Jeejeebhoy, K. N., et al. 1977.** Chromium deficiency, glucose intolerance, and neuropathy reversed by chromium supplementation, in a patient receiving long-term total parenteral nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 1977, Vol. 30, pp. 531-538.
- Jomova, K. e Valko, M. 2011.** Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology.* 2011, Vol. 283, pp. 65-87.
- Kozlovsky, A. e Anderson, R. A. 1985.** Chromium intake, absorption and excretion of subjects consuming self-selected diets. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 1985, Vol. 41, pp. 177-1183.
- Kryston, T. B., et al. 2011.** Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutation Research.* 2011, Vol. 711, pp. 193-201.
- Kumpulaine, J. T. 1992.** Chromium content of food and diets. *Biol Trace Elem Res.* 1992, Vol. 32, pp. 9-18.
- Lau, F. C., et al. 2008.** Nutrigenomic basis of beneficial effects of chromium(III) on obesity and diabetes. *Mol Cell Biochem.* 2008, Vol. 317, pp. 1-10.
- Levine, R. L., et al. 1990.** Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology.* 1990, Vol. 186, pp. 464-478.
- Liu, K. J. e Shi, X. 2001.** In vivo reduction of chromium (VI) and its related free radical generation. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 2001, Vol. 222, pp. 41-47.
- Lopes, G. K.B., Schulman, H. M. e Hermes-Lima, M. 1999.** Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ion. *Biochem Biophys Acta.* 1999, Vol. 1472, pp. 142-152.
- Lushchak, V. I. 2011.** Adaptative response to oxidative stress: bacteria, fungi, plants and animals. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 2011, Vol. 153, pp. 175-190.

- Mahboob, M., et al. 2002.** Effects of chromium picolinate on antioxidant enzyme levels in rats. *Toxicol. Sci.* 2002, Vol. 66, 1-S, p. 32 (Abstract 154).
- Marzec, Z. 2004.** Alimentary chromium, nickel, and selenium intake of adults in Poland estimated by analysis and calculations using the duplicate portion technique. *Nahrung.* 2004, Vol. 48, pp. 47-52.
- Mattagajasingh, S. N., Misra, B. R. e Misra, H. P. 2008.** Carcinogenic chromium(VI)-induced protein oxidation and lipid peroxidation: implications in DNA-protein crosslinking. *Journal of Applied Toxicology.* 2008, Vol. 28, pp. 987-997.
- Mertz, W. 1993.** Chromium in human nutrition: a review. *The Journal of Nutrition.* 1993, Vol. 123, pp. 626-633.
- Mertz, Walter. 1998.** Chromium research from a distance: from 1959 to 1980. *Journal of the American College of Nutrition.* 1998, Vol. 17, 6, pp. 544-547.
- Mohamedshah, Farida Y., et al. 1998.** Distribution of stable isotope of chromium (<sup>53</sup>Cr) in serum, urine, and breast milk in lactating women. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 1998, Vol. 67, pp. 1250-5.
- Mohanty, J. G., et al. 2010.** A fluorimetric semi-microplate format assay of protein carbonyls in blood plasma. *Analytical Biochemistry.* 400, 2010, pp. 289-294.
- Mojovic, M., et al. 2005.** An EPR spin-probe and spin-trap study of the free radicals produced by plant plasma membranes. *J. Serb. Chem. Soc.* 2005, Vol. 70, 2, pp. 177-186.
- Moskovitz, J. e Oien, D. B. 2010.** Protein Carbonyl and the Methionine Sulfoxide Reductase System. *Antioxidants & Redox Signaling.* 2010, Vol. 12, 3.
- Nakamura, K., et al. 2010.** Reevaluation of Quantitative ESR Spin Trapping Analysis of Hydroxyl Radical by Applying Sonolysis of Water as a Model System. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 2010, Vol. 83, 9, pp. 1037–1046.
- Nelson, D. L. e Cox, M. M. 2008.** *Lehninger - Principles of Biocheminstry.* Nova Iorque : W.H. Freeman and Company, 2008.
- Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação - NEPA/UNICAMP. 2011.** *Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - TACO.* 4a. Campinas, SP : s.n., 2011.
- Omenn, G. S., et al. 1996.** Risk Factors for Lung Cancer and for Intervention Effects in CARET, the Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial. *Journal of the National Cancer Institute.* 1996, Vol. 88, 21, pp. 1550-1559.

- Pamplona, R. e Costantini, D. 2011.** Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011, Vol. 301, pp. R843-R863.
- Pereira, M. G. 1995.** *Epidemiologia: teoria e prática*. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1995.
- Pick, E. e Keisari, Y. 1980.** A simple colorimetric method for measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *Journal of Immunological Methods*. 1980, Vol. 38, pp. 161-170.
- Quintaes, K. D. 2000.** Utensílios para alimentos e implicações nutricionais. *Rev. Nutr.* set./dez. de 2000, Vol. 13, 3, pp. 151-156.
- Radak, Z., et al. 2011.** Age-associated neurodegeneration and oxidative damage to lipids, proteins and DNA. *Molecular Aspects of Medicine*. 2011, Vol. 32, pp. 305-315.
- Ramos-Vasconcelos, G. R. e Hermes-Lima, M. 2003.** Hypermetabolism, antioxidant defenses and free radical metabolism in the pulmonate land snail *Helix aspersa*. *The Journal of Experimental Biology*. 2003, Vol. 206, pp. 675-685.
- Roussel, Ane-Marie, et al. 2007.** Food chromium content, dietary chromium intake and related biological variables in French free-living elderly. *British Journal of Nutrition*. 2007, Vol. 98, pp. 326-331.
- Saltiel, A. R. e Kahn, C. R. 2001.** Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001, Vol. 414, pp. 799-806.
- Santos, E. E., Lauria, D. C. e Porto da Silveira, C. L. 2004.** Assessment of daily intake of trace elements due to consumption of foodstuff by adult inhabitants of Rio de Janeiro city. *Science of the Total Environment*. 2004, Vol. 327, pp. 69-79.
- Saran, M. e Summer, K. H. 1999.** Assaying for hydroxyl radicals: Hydroxylated terephthalate is a superior fluorescence marker than hydroxylated benzoate. *Free Radical Research*. 1999, Vol. 31, pp. 429-436.
- Sargent, T. III., Lim, T. H. e Jensen, R. L. 1979.** Reduced chromium retention in patients with hemochromatosis, a possible basis for hemochromatotic diabetes. *Metabolism*. 1979, Vol. 28, pp. 70-79.
- Scaduto, R. C. 1995.** Oxidation of DMSO and methanesulfinic acid by the hydroxyl radical. *Free Radical Biology & Medicine*. 1995, Vol. 18, 2, pp. 271-277.
- Schwarz, K. e Mertz, W. 1959.** Chromium(III) and the glucose tolerance factor. *Arch Biochem Biophys*. 1959, Vol. 85, pp. 292-295.

- Shi, X. e Dalal, N. S. 1989.** Chromium(V) and hydroxyl radical formation during the glutathione reductase-catalyzed reduction of chromium(VI). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989, Vol. 163, pp. 627-634.
- **1990.** On the hydroxyl radical formation in the reaction between hydrogen peroxide and biologically generated chromium(V) species. *Arch. Biochem. Biophys.* 1990, Vol. 277, pp. 342-350.
- Shi, X., Dalal, N. S. e Kasprzak, K. S. 1993.** Generation of Free Radicals from Hydrogen Peroxide and Lipid Hydroperoxides in the presence of Cr(III). *Archives of Biochemistry and Biophysics.* Abril de 1993, Vol. 302, 1, pp. 294-299.
- Shrivastava, H. Yamini e Nair, Balachandran Unni. 2000.** Protein degradation by peroxide catalyzed by chromium (III): role of coordinated ligand. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2000, Vol. 270, pp. 749-754.
- Sociedade Brasileira de Diabetes. 2012.** [Online] 18 de Abril de 2012. [Citado em: 12 de Julho de 2012.] <http://www.diabetes.org.br/sala-de-noticias/2116-sao-12-milhoes-de-diabeticos-no-brasil>.
- **2009.** *Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes.* Itapevi : A. Araújo Silva Farmacêutica, 2009.
- Stearns, D. M., et al. 2002.** Chromium(III) tris(picolate) is mutagenic at the hypoxanthine (guanine) phosphoribosyltransferase locus in Chinese hamster ovary cells. *Mut. Res.* 2002, Vol. 513, pp. 135-142.
- Steiner, M. G. e Babbs, C. F. 1990.** Quantification of the hydroxyl radical by reaction with dimethyl sulfoxide. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 1990, Vol. 278, pp. 478-481.
- Stoecker, B. J. 2007.** Basis for dietary recommendations for chromium. *The Nutritional Biochemistry of Chromium(III).* Inglaterra : s.n., 2007.
- Tsou, T. C. e Yang, J. L. 1996.** Formation of reactive oxygen species and DNA strand breakage during interactions of chromium(III) and hydrogen peroxide in vitro: evidence for a chromium(III)-mediated Fenton-like reaction. *Chemico-Biological Interactions.* 1996, Vol. 102, pp. 133-153.
- Van Cauwenbergh, R., et al. 1996.** Daily dietary chromium intake in Belgium, using duplicate portion sampling. *Z Lebensm Unters Forsch.* Set de 1996, Vol. 203, 3, pp. 203-6.
- Vincent, J. B. e Stallings, D. 2007.** Introduction: a history of chromium studies (1955-1995). *The Nutritional Biochemistry of Chromium(III).* 1a. Inglaterra : s.n., 2007.

- Vincent, J.B. 2004.** Recent advances in the nutritional biochemistry of trivalent chromium. *Proceedings of the Nutrition Societt.* 2004, Vol. 63, pp. 41-47.
- Walsh, P. S., Metzger, D. A. e Higuchi, R. 1991.** Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques.* 1991, Vol. 10, 4, pp. 506-13.
- Wasser, W. G. e Feldman, N. S. 1997.** Chronic renal failure after ingestion of over-the-counter chromium picolinate. *Ann. Intern. Med.* 1997, Vol. 126, p. 410.
- Weil, J A., Bolton, J. R. e Wertz, J. E. 1994.** *Electron Paramagnetic Resonance, Elementary Theory and Practical Applications.* Nova Iorque : Wiley, 1994.
- Wilplinger, M., Schinsleben, I e Pfannhauser, W. 1996.** Condition of supply of Austrians with trace element chromium. *Z Lebensm Unters Forsch.* Setembro de 1996, Vol. 203, 3, pp. 207-9.
- Yamaguchi, K., Tamura, Z. e Maeda, M. 1997.** Molecular structure of the Zwitterionic form of Phenolsulfonphthalein. *Analytical Sciences.* 1997, Vol. 13.
- Yazaki, Y., et al. 2010.** A pilot study of chromium picolinate for weight loss. *J Altern Complement Med.* 2010, Vol. 16, pp. 291-9.
- Ye, X., Yoshida, S. e Ng, T. B. 2000.** Isolation of lactoperoxidase, lactoferrin, a-lactalbumin, b-lactoglobulin B and b-lactoglobulin A from bovine rennet whey using ion exchange chromatography. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2000, Vol. 32, pp. 1143-1150.
- Yoo, D. H., et al. 2005.** Spin Trapping EPR method for simultaneous monitoring of hydroxyl radicals and hydrogen atoms in gama-irradiation process. *J. Ind. Eng. Chem.* 2005, Vol. 11, 2, pp. 215-221.
- Zhang, Yue, et al. 2009.** Interactions of chromium (III) and chromium (VI) with bovine serum albumin studied by UV spectroscopy, circular dichroism, and fluorimetry. *Biol Trace Elem Res.* 2009, Vol. 130, pp. 172-184.
- Zhang, Z., et al. 2001.** Cr(VI) induces cell growth arrest through hydrogen peroxide-mediated reactions. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 2001, Vol. 222, pp. 77-83.
- Zhu, B. Z., Antholine, W. E. e Frei, B. 2002.** Thiourea protects against copper-induced oxidative damage by formation of a redox-inactive thiourea-copper complex. *Free Radical Biology and Medicine.* 2002, Vol. 32, pp. 1333-1338.
- Ziech, D., et al. 2011.** Reactive Oxygen Species (ROS)-Induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. *Mutation Research.* 2011, Vol. 711, pp. 167-173.

**Apêndice A**

**Metodologia empregada para a revisão da literatura:**

*Efeito dos suplementos nutricionais a base de cromo em pacientes diabéticos ou com resistência a insulina*

A revisão da literatura conduzida para apresentar os efeitos dos suplementos nutricionais a base de cromo, embora menos extensa e abrangente que uma revisão sistemática, foi elaborada a partir da metodologia proposta pelo Ministério da Saúde brasileiro para a elaboração de pareceres técnico-científicos. O material de apoio fornece etapas que auxiliam a busca, seleção, análise crítica da qualidade das evidências científicas e apresentação dos resultados (Brasil, 2011).

Para que o efeito de uma intervenção em saúde seja avaliada a partir das evidências disponíveis, é necessário que a busca seja específica e precisa. Para isso, é necessário que a população de interesse, a intervenção, as formas de manejo alternativas e os desfechos esperados estejam claros e bem definidos. Esses elementos constituem a pergunta a ser respondida com a revisão e auxiliam na determinação dos termos de busca a serem empregados nas bases de dados. Assim, a Tabela 5 apresenta a especificação dos componentes necessários a essa busca.

Tabela 5 - Componentes para formulação da pergunta e termos de busca

<b>Componente</b>	<b>Pergunta</b>	<b>Termos de busca (fonte DeCS/MeSH)</b>
<b>População</b>	Pacientes diabéticos ou com resistência a insulina	<b>DeCS:</b> Diabetes Mellitus OR Insulin Resistance  <b>MeSH:</b> ("Diabetes Mellitus"[Mesh] OR "Diabetes Mellitus, Type 2"[Mesh] OR "Diabetes Mellitus, Type 1"[Mesh]) OR "InsulinResistance"[Mesh]  <b>Vocabulário não oficial:</b> diabetes
<b>Intervenção</b>	Suplementos nutricionais a base de cromo	<b>DeCS:</b> Chromium  <b>MeSH:</b> "Chromium"[Mesh]
<b>Comparação</b>	Placebo	(não especificado a priori)
<b>Desfecho</b>	Glicemia, insulinemia, HbA1C ou perfil lipídico	(não especificado a priori)

Deste modo, a pergunta a ser respondida é: Para pacientes diabéticos ou com resistência a insulina o uso de suplementos nutricionais a base de cromo é eficaz em promover melhoria da glicemia, insulinemia, hemoglobina glicada (HbA1C) ou perfil lipídico, em comparação ao placebo?

Após a especificação dos descritores, foram utilizadas as bases de dados *Cochrane Library*, *Centre for Reviews and Dissemination (CRD)*, *Trip Database* e *Medline (Pubmed)* para a busca por revisões sistemáticas. A estratégia de busca e o quantitativo dos resultados encontrados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Estratégia de busca de evidências científicas.

<b>Base de dados</b>	<b>Termo de busca</b>	<b>Resultados encontrados</b>	<b>Referências selecionadas</b>
<b>Cochrane Library</b>	Chromium diabetes	Revisões sistemáticas: <b>1</b>	Revisões sistemáticas: <b>1</b>
<b>CRD</b>	(chromium) AND (diabetes)	Revisões sistemáticas: <b>6</b>	Revisões sistemáticas: <b>5</b>
<b>Trip Database</b>	chromium diabetes	Revisões sistemáticas: <b>5</b>	Revisões sistemáticas: <b>3</b>
<b>Medline (Pubmed)</b>	(chromium diabetes) AND ((meta-analysis[ptyp] OR meta-analysis[tiab] OR meta-analysis[mh] OR (systematic[tiab] AND review[tiab]) NOT ((case[ti] AND report[ti]) OR editorial[ptyp] OR comment[ptyp] OR letter[ptyp] OR newspaper article [ptyp])))	Revisões sistemáticas: <b>6</b>	Revisões sistemáticas: <b>5</b>

As referências selecionadas compreendem as revisões sistemáticas conduzidas na última década (2002 a 2012) e que fossem capazes de responder a pergunta formulada. Assim, após a remoção das duplicatas, seis trabalhos pareceram aptos. Desses, não foi possível o acesso ao texto completo para dois deles e outros dois apenas reavaliaram as demais revisões disponíveis. Dessa forma, duas revisões sistemáticas com meta-análises foram selecionadas para avaliação da qualidade da evidência. Foram elas:

- *Effect of chromium supplementation on glucose metabolism and lipids: a systematic review of randomized controlled trials*  
Balk E. M., Tatsioni A., Lichtenstein A. H., Lau J., Pittas A. G.  
*Diabetes Care* 2007; 30:2154-63
- *Glucose and insulin responses to dietary chromium supplements: a meta-analysis*  
Althuis M. D., Jordan N. E., Ludington E. A., Wittes J. T.

*American Journal of Clinical Nutrition* 2002; 76:148-55.

As revisões selecionadas foram então avaliadas segundo a qualidade da evidência que apresentam, de acordo com critérios de medicina baseada em evidências. Os aspectos avaliados estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Parâmetros de avaliação da qualidade da evidência das revisões sistemáticas selecionadas.

<b>Parâmetros</b>	<b>Balk et al. (2007)</b>	<b>Althuis et al. (2002)</b>
A revisão se baseou numa pergunta estruturada, explícita e sensível?	PARCIALMENTE Não explícita: os componentes da pergunta precisam ser agrupados a partir de diferentes partes do texto.	SIM
A busca por estudos relevantes foi detalhada e completa?	NÃO Não foram buscadas em todas as bases de dados obrigatórias ( <i>Cochrane</i> e <i>CRD</i> ) e não foram usados termos oficiais.	SIM (Termos oficiais indexados; <i>Cochrane</i> e <i>Medline</i> )
Os estudos primários apresentavam qualidade metodológica adequada para a pergunta?	NÃO De acordo com a avaliação dos autores, apenas 5 estudos eram de boa qualidade, 18 de média qualidade e 18 de baixa qualidade.	SIM
A avaliação dos estudos incluídos pode ser reproduzida?	NÃO Não foi especificada: descrição dos fatores mas não dos critérios para análise. Referência da Fundação Nacional do Rim.	SIM (Provê referência para a avaliação da qualidade dos estudos)
Os resultados foram semelhantes de estudo para estudo?	NÃO Grande heterogeneidade: diferentes formulações dos suplementos a base de cromo, diferentes doses e resultados diferentes em relação a qualidade dos estudos (menor qualidade, maiores efeitos) e fonte de financiamento (financiados pela indústria apresentam maiores efeitos).	NÃO Poucos estudos, com diferentes formulações dos suplementos a base de cromo e diferentes doses.
O estudo apresentou estimativa de precisão para os efeitos do tratamento/exposição?	SIM	SIM
O desfecho apresentado pelo estudo é relevante clinicamente?	SIM	SIM
Os potenciais conflitos de interesse foram declarados?	SIM	NÃO

Após essa análise, os estudos foram então avaliados quanto ao conteúdo apresentado. As Tabela 8 e 8sumarizam os resultados apresentados pelas duas revisões. A análise final, considerando todos os aspectos compreendidos aqui, está apresentada na seção *Cromo e o metabolismo de insulina* da Revisão Bibliográfica desta dissertação de mestrado.

Tabela 8 – Resultados da revisão sistemática conduzida por Balk e colaboradores (2007).

Estudo	Tipo de estudo/população	Desfechos	Resultados (IC 95%)
<b>Balk et al. (2007)</b>	Revisão sistemática  41 ECR (n = 1.198)  <b>População:</b> Adultos (não grávidas) DM 1 e 2, intolerância a glicose e tolerancia normal a glicose  <b>Comparação:</b> placebo  <b>Intervenção:</b> - 10 estudos: levedo de cerveja (1,28 a 400 µg/dia) - 15 estudos: cloreto de cromo (50 a 600 µg/dia) - 5 estudos: nicotinato de cromo (200 a 800 µg/dia) - 15 estudos: picolinato de cromo (60 a 1000 µg/dia)	HbA1C  Glicemia em jejum  Glicemia pós-prandial  Sensibilidade a insulina  Lipoproteínas (LDL/HDL/Triglicérides)	<b>Diferença de risco:</b>  DM: -0,6% (-0,9 a -0,2) Int. a glicose: sem alteração  DM: -Levedo de cerveja: -1,1 mmol/L (-1,6 a -0,6) -CrCl: -0,3 mmol/L (-0,9 a +0,2) -CrPic: -0,8 mmol/L (-1,2 a -0,3) Int. a glicose: sem alteração Tol. Normal a glicose: sem alteração  DM, Int. a glicose ou Tol. normal a glicose: sem alteração *Não foi feita meta-análise por insuficiência de informações metodológicas dos estudos  DM, Int. a glicose ou Tol. normal a glicose: sem alteração *Não foi feita meta-análise por insuficiência de informações metodológicas dos estudos  DM e Int. a glicose: sem alteração (LDL -0,31 mmol/L [-0,73 a +0,11]) *Não foi avaliado em indivíduos com Tol. normal a glicose.

**Limitações do estudo:** Grande heterogeneidade: diferentes formulações dos suplementos a base de cromo, diferentes doses e resultados diferentes em relação a qualidade dos estudos (menor qualidade, maiores efeitos) e fonte de financiamento (financiados pela indústria apresentam maiores efeitos). Não foram especificados os critérios para análise da qualidade dos estudos. De acordo com a avaliação dos autores, apenas 5 estudos eram de boa qualidade, 18 de média qualidade e 18 de baixa qualidade. A busca nas bases de dados não abrangeu bases obrigatórias (Cochrane e Embase) e não foram usados termos oficiais.

Tabela 9 - Resultados da revisão sistemática conduzida por Althuis e colaboradores (2002).

Estudo	Tipo de estudo/população	Desfechos	Resultados (IC 95%)
<b>Althuis et al. (2002)</b>	<p>Revisão sistemática</p> <p>15 ECR selecionados (n = 618), 14 ECR incluídos na meta-análise (n = 463)</p> <p><b>População:</b> DM2 (193, apenas 38 analisados na meta-análise), intolerância a glicose e tolerância normal a glicose (saudáveis) (425 de não-diabéticos)</p> <p><b>Comparação:</b> placebo ou outros agentes (resultados permanecem os mesmos quando restringem a comparação para apenas placebo)</p> <p><b>Intervenção:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 2 estudos: levedo de cerveja (10,8 e 160 µg/dia)</li> <li>- 6 estudos: cloreto de cromo (200 a 250 µg/dia)</li> <li>- 4 estudos: nicotinato de cromo (200 a 800 µg/dia)</li> <li>- 7 estudos: picolinato de cromo (200 a 1000 µg/dia)</li> <li>- 1 estudo: cromo ligado a niacina (600 µg/dia)</li> </ul>	<p>HbA1C</p> <p>Glicemia em jejum</p> <p>Glicemia após teste de tolerância a glicose (120 min)</p> <p>Insulinemia em jejum</p> <p>Insulinemia após teste de tolerância a glicose (120 min)</p>	<p><b>Diferença de risco: (n = 14)</b></p> <p>DM2 e não-diabéticos: inconclusivo (amostras pequenas ou população heterogênea)</p> <p>Geral: 0,027 mmol/L (-0,09 a +0,15) DM2: inconclusivo (amostras pequenas ou população heterogênea) Não-dabéticos: 0,028 mmol/L (-0,086 a +0,14)</p> <p>Geral: 0,26 mmol/L (-0,24 a +0,76) DM2: inconclusivo (amostras pequenas ou população heterogênea) Não-dabéticos: 0,042 mmol/L (-0,43 a +0,52)</p> <p>Geral: 0,28 pmol/L (-7,0 a 7,5 pmol/L) DM2: inconclusivo (amostras pequenas ou população heterogênea) Não diabéticos: 0,25 pmol/L (-6,98 a 7,48 pmol/L)</p> <p>Geral: 11,1 pmol/L (-69,0 a 91,2 pmol/L) DM2: inconclusivo (amostras pequenas ou população heterogênea) Não diabéticos: 5,5 pmol/L (-74,0 a 85,1 pmol/L)</p> <p>*Formulação do suplemento, dose ou nível de atividade física não interferiram no efeito do cromo nos níveis de glicemia e insulinemia em jejum. **Nenhum estudo reportou efeitos adversos da suplementação com cromo. ***Único estudo que encontrou efeitos da suplementação de cromo em indivíduos diabéticos foi conduzido na China e questiona-se a aplicabilidade em populações ocidentais.</p>
<b>Limitações do estudo:</b> Estudos selecionados são ECR pequenos e com baixo poder científico/epidemiológico conduzidos em populações diversas.			

## Apêndice B

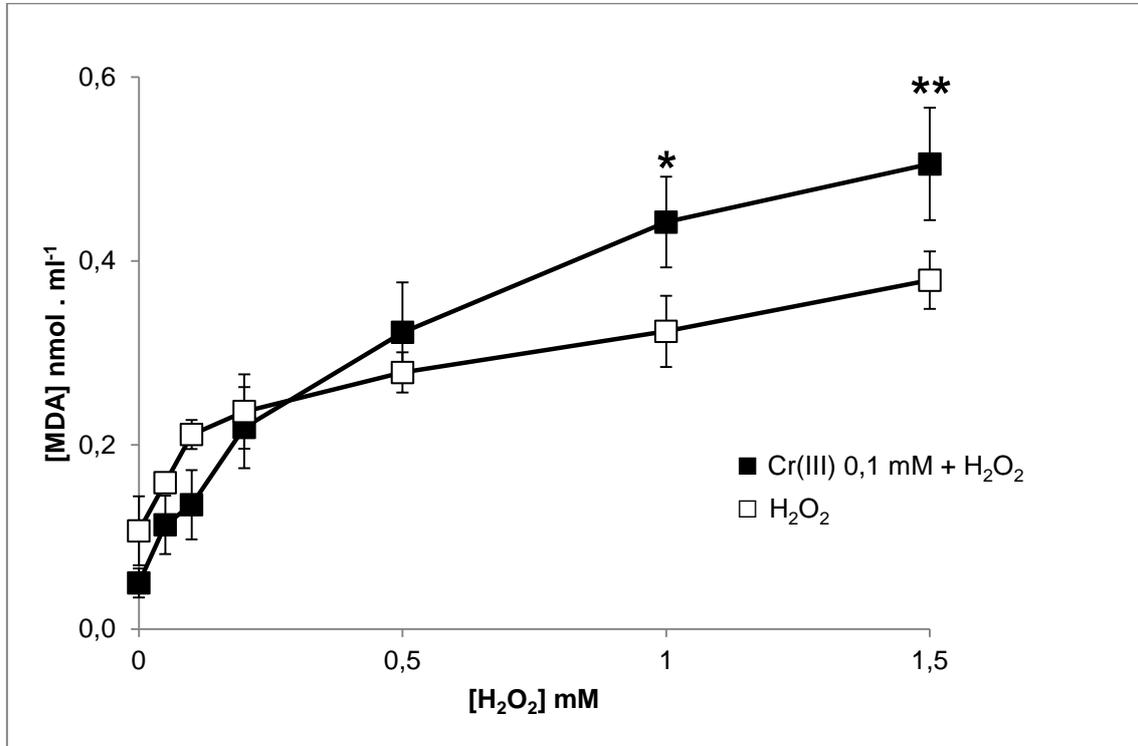


Figura 46 - Efeito da variação da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na oxidação da 2-DR em meios contendo Cr(III) após 10 minutos de incubação. *Condições experimentais:* Kpi 5 mM pH 7,2; 2-DR 5 mM; Cr(III) 0,1 mM. N=6. (\*) p < 0,001 em relação ao controle. (\*\*) p < 0,005 em relação ao controle.

## Apêndice C

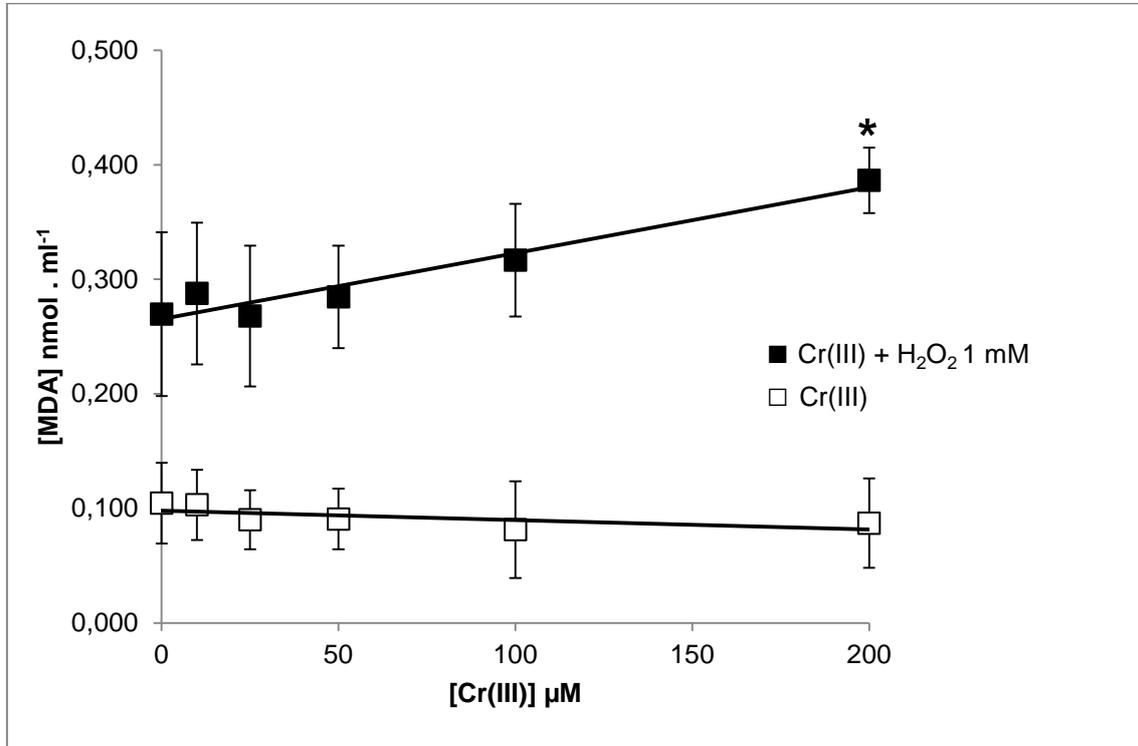


Figura 47 - Efeito da variação da concentração de Cr(III) na oxidação da 2-DR em meios contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> após 10 minutos de incubação. *Condições experimentais:* Kpi 5 mM pH 7,2; 2-DR 5 mM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM. N=9. (\*) p < 0,05 em relação às concentrações anteriores.

## Apêndice D

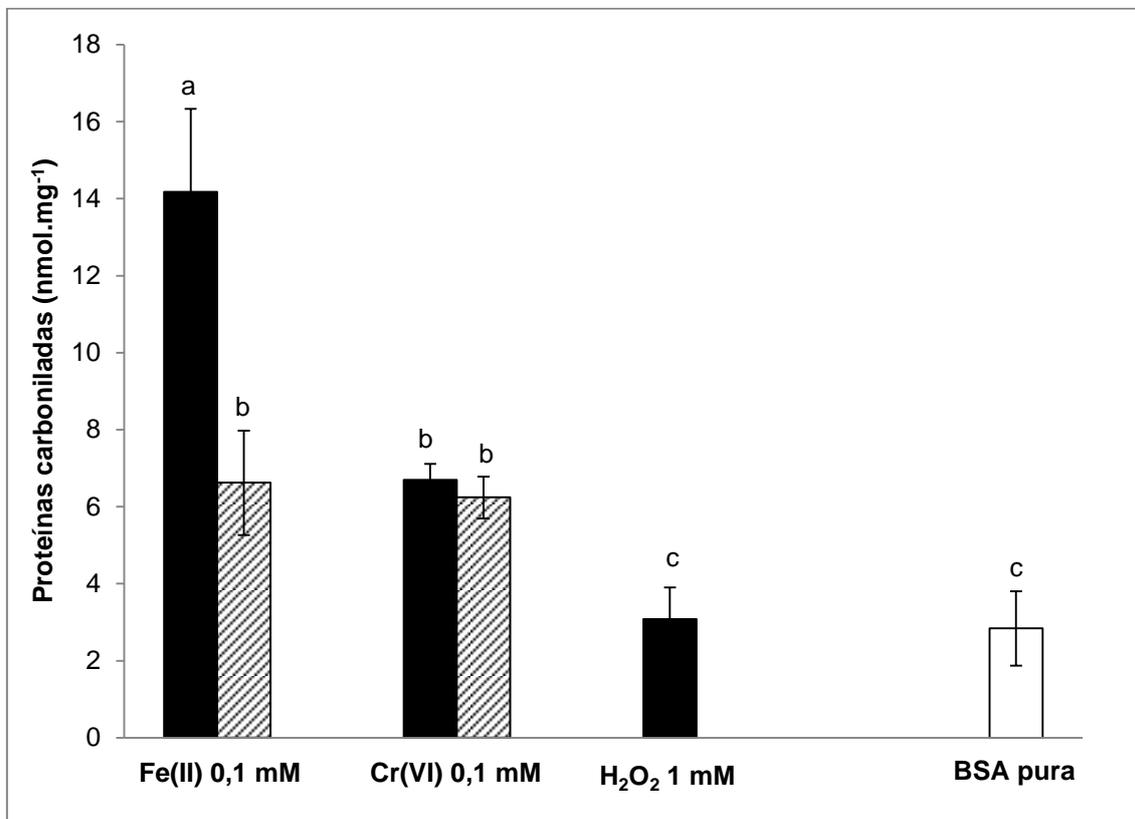


Figura 48 - Efeito de Fe(II) e Cr(VI) na produção de proteínas carboniladas após 4 horas de incubação a partir de albumina sérica bovina (BSA). *Condições experimentais:* KPi 5 mM, pH 7,2; BSA 1 mg.ml<sup>-1</sup> (1,5 mM); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM; Fe(II) 0,1 mM; Cr(VI) 0,1 mM. N=3. Colunas pretas referem-se aos pontos experimentais conduzidos na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Colunas hachuradas referem-se aos pontos conduzidos na ausência de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Coluna branca refere-se ao controle conduzido com BSA pura em meio tamponado. Letras diferentes referem-se a resultados estatisticamente diferentes com  $p < 0,01$ . Resultados expressos em concentração de proteínas carboniladas (nmol) por quantidade de proteína total (mg).

## Apêndice E

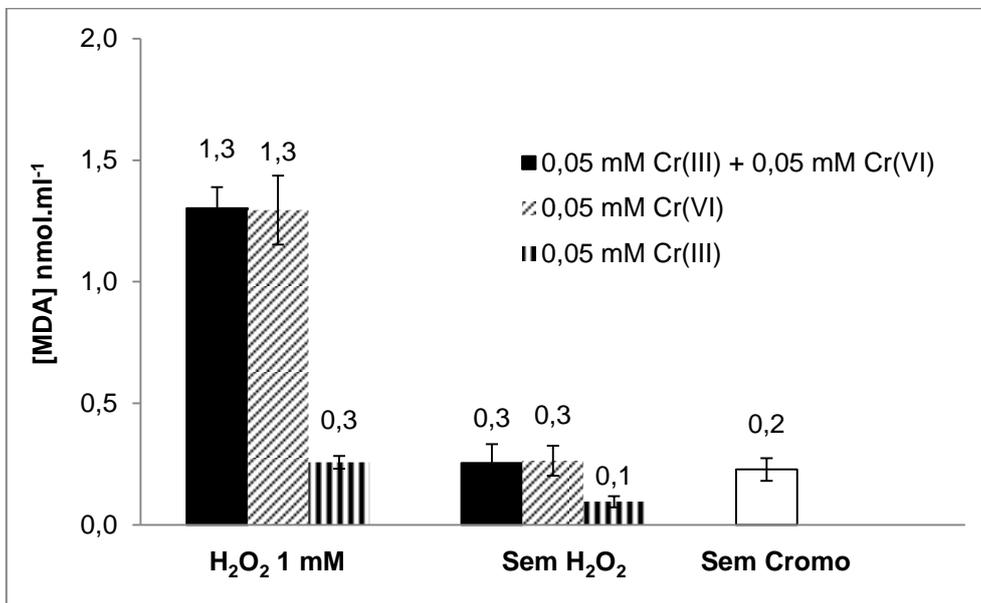


Figura 49 - Efeito da adição de Cr(III) e Cr(VI) no mesmo meio reacional na oxidação da 2-DR após 10 minutos de incubação em comparação com os danos individuais. *Condições experimentais:* Kpi 5 mM, pH 7,2; 2-DR 5 mM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM; Cr(III) 0,05 mM; Cr(VI) 0,05 mM. N=6.

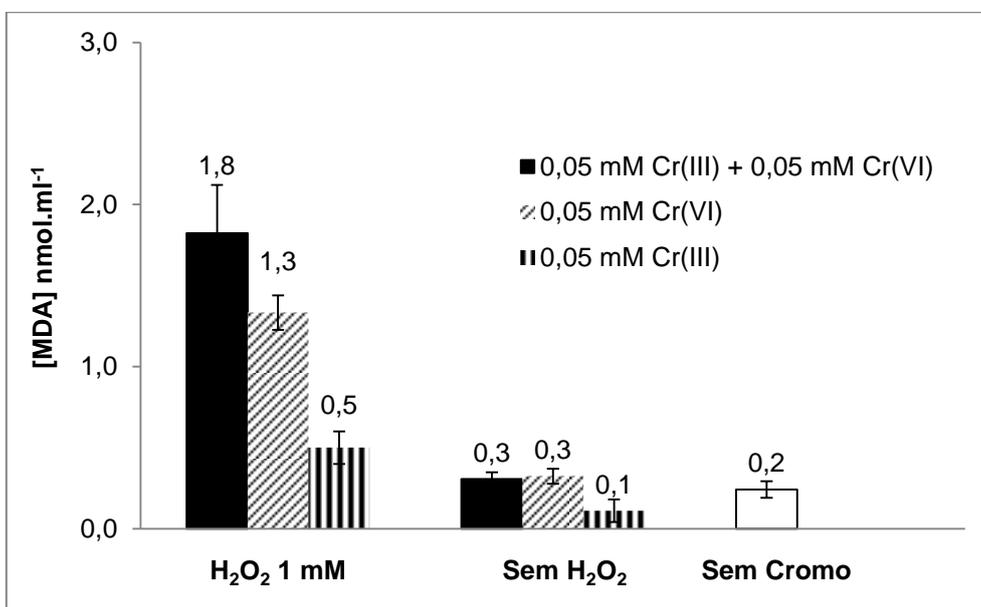


Figura 50-Efeito da adição de Cr(III) e Cr(VI) no mesmo meio reacional na oxidação da 2-DR após 10 minutos de incubação em comparação com os danos individuais. *Condições experimentais:* Kpi 5 mM, pH 7,2; 2-DR 5 mM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM; Cr(III) 0,05 mM; Cr(VI) 0,05 mM. N=6.