



UFSM

Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DOS MARCADORES DO ESTRESSE
OXIDATIVO EM INDIVÍDUOS SUPLEMENTADOS COM
FERRO E ÁCIDO ASCÓRBICO**

Elisângela Colpo

PPGBT

**Santa Maria, RS, Brasil
2007**

**AVALIAÇÃO DOS MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO EM
INDIVÍDUOS SUPLEMENTADOS COM FERRO E ÁCIDO
ASCÓRBICO**

por

Elisângela Colpo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS),
como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica.

**Santa Maria, RS, Brasil
2007**

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica

A comissão Examinadora, abaixo assinada,
Aprova a Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DOS MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO EM
INDIVÍDUOS SUPLEMENTADOS COM FERRO E ÁCIDO
ASCÓRBICO**

elaborada por
Elisângela Colpo

como requisito parcial para obtenção de grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica.

COMISSÃO EXAMINADORA

Maria Beatriz Moretto
(Presidente/Orientador)
(UFSM)

Marcelo Farina
(UFSC)

Francielli Weber Santos
(UNIPAMPA)

Santa Maria, fevereiro de 2007

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por sempre disponibilizar a luz para iluminar os meus caminhos.

À minha família, Artur, Eliane, Elis Élen e Andriele, agradeço pelo apoio, compreensão, incentivo, companheirismo e amor em todos os momentos, minha gratidão eterna.

Ao Matheus, pela compreensão, apoio, incentivo e amor ao longo destes anos, contribuindo para esta conquista.

Ao prof. João Batista Teixeira da Rocha, pelos seus conhecimentos, dedicação e habilidade em orientar este trabalho.

A prof. Cristina Wayne Nogueira pelos seus ensinamentos e apoio na execução deste trabalho.

A prof. Maria Beatriz Moretto pelo apoio e dedicação na realização deste trabalho.

A querida amiga Andreza, pelos ensinamentos, compreensão, dedicação e paciência na elaboração deste trabalho.

Aos meus colegas que ajudaram na elaboração deste trabalho: Iria, Simone, Sally, Andreza, Rosane, Iara, Fabiane, Dievan, Jardel, Rafael, Cleci.

Aos colegas Rafael I., Rafael P., Dievan, Juliano, Robson, Daniel, Gustavo, Matheus, Ricardo, Félix, Jardel, Diego que contribuíram no desenvolvimento deste trabalho.

Aos demais colegas de laboratório pelos ensinamentos, amizade e companheirismo.

Aos demais professores do PPGBT que de alguma maneira contribuíram para a minha formação.

Aos funcionários do PPGBT pela competência na realização dos seus trabalhos.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica pela oportunidade de realização deste curso.

À CAPES pela bolsa de estudos e pelos recursos financeiros concedidos.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

AVALIAÇÃO DOS MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO EM INDIVÍDUOS SUPLEMENTADOS COM FERRO E ÁCIDO ASCÓRBICO

AUTOR: Elisângela Colpo
ORIENTADORA: Maria Beatriz Moretto
CO-ORIENTADOR: João Batista Teixeira da Rocha
LOCAL E DATA DA DEFESA: Santa Maria, Fevereiro de 2007.

O ferro é um nutriente essencial para atividades das células incluindo transporte de oxigênio, transferência de elétrons e regulação genética. Entretanto, esse mineral é potencialmente tóxico por participar de reações de óxido-redução, que favorecem a formação de espécies reativas ao oxigênio (ERO). O dano oxidativo nas biomoléculas pode ser modulado por antioxidantes como o ácido ascórbico (AA). Entretanto, sabe-se que na presença de ferro, o ácido ascórbico pode atuar como um pró-oxidante *in vitro* e contribuir para formação de radicais hidroxila. Baseado na possibilidade pró-oxidante da interação entre o ferro e o ácido ascórbico, foram avaliadas as manifestações da suplementação do ferro associado com o ácido ascórbico. O estudo foi delineado por 9 voluntários saudáveis, não tabagistas, entre 20 e 31 anos. Os voluntários foram suplementados com uma dose única contendo 2g de ácido ascórbico (primeiro grupo), 150mg de ferro (segundo grupo) e 2g de ácido ascórbico mais 150mg de ferro (terceiro grupo). Os 9 indivíduos foram submetidos a todos os tratamentos, os quais foram alternados a cada 15 dias. Os voluntários foram submetidos a coletas sanguíneas antes da suplementação e 2, 5 e 24 horas após a suplementação. Foram avaliados os níveis de ferro e ferritina, a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD), os níveis dos antioxidantes não-enzimáticos: ácido ascórbico, tióis não proteicos (NPSH), bem como os marcadores do estresse oxidativo: espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), oxidação da diclorifluoresceína e a atividade da delta aminolevulinato desidratase (ALA-D). Os resultados encontrados mostraram que os níveis plasmáticos de ácido ascórbico aumentaram significativamente em 2, 5 e 24 horas após a ingestão de ácido ascórbico mais ferro ou somente ácido ascórbico. Os níveis plasmáticos de ferro aumentaram significativamente 2 horas após a ingestão de ferro e 2 e 5 horas no grupo ferro mais ácido ascórbico. Os níveis de TBARS eritrocitário diminuíram significativamente em 5 e 24 horas após a ingestão de ferro, bem como, em 5 horas após a ingestão de ferro mais ácido ascórbico. A atividade da CAT eritrocitária aumentou significativamente em 5 horas após a ingestão de ácido ascórbico mais ferro. Os demais parâmetros avaliados não mostraram diferenças significativas. Com isso, o presente estudo não confirma a hipótese que a combinação de altas doses de ácido ascórbico e ferro, ou apenas ferro causam dano oxidativo *in vivo*. Entretanto, mais estudos são necessários para determinar se a interação entre o ferro e o ácido ascórbico pode causar efeito pró-oxidante *in vivo*.

Palavras-chave: estresse oxidativo; efeito pró-oxidante; ferro; ácido ascórbico; *in vivo*.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Post-Graduate Course in Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

EVALUATION OF OXIDATIVE STRESS MARKERS IN VOLLUNTERS SUPPLEMENTED WITH IRON IS ASCORBIC ACID

AUTHOR: Elisângela Colpo
ADVISOR: Maria beatriz Moretto
CO-ADVISOR: João Batista Teixeira da Rocha
DATE AND PLACE OF THE DEFENSE: Santa Maria, February 2007

Iron is an essential nutrient for cellular activities including oxygen transport, electron transfer, and gene regulation. However, iron is potentially toxic via its redox reactions which generate reactive oxygen species (ROS). Oxidative damage to biomolecules can be modulated by antioxidants such as ascorbic acid (AA). However, it is well known that in the presence of redox-active iron, AA can act as a pro-oxidant *in vitro* and contribute to the formation of hydroxyl radicals. Based on the possible pro-oxidant interaction of iron and AA, we evaluated the manifestations of supplementation of iron associated with the ascorbic acid. The study was delineated by nine non-smoking male healthy volunteers, aged between 20 and 31 years. The volunteers were supplemented with a single dose containing 2g of AA (first group), 150mg of iron (second group) and 2g of AA plus 150mg of iron (third group). The 9 volunteers were submitted the all the treatments, which were alternate every 15 days. The volunteers were submitted to blood collections before the supplementation and 2, 5 and 24 hours after the supplementation. They were evaluated the levels of iron and ferritin, the activity of the antioxidants enzymes catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD), the level non-enzymatic antioxidants: AA, non-protein-SH, as well as markers of the oxidative stress Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), diclorofluorescein oxidation and delta-amino levulinate dehydratase (ALA-D) activity. The results showed that plasma AA levels were increased at 2, 5 and 24 hours after AA or AA plus iron ingestion. Plasmatic iron level was increased at 2 hours after iron ingestion and 2, 5 hours in the group AA plus iron. The erythrocytes TBARS levels decreased at 5 hours after AA and 5, 24 hours after AA plus iron ingestion. The erythrocytes CAT levels caused a significant increase 5 hours after supplementation with AA plus iron. The other results showed no significant different in the determinations. Thus, the present study does not support the hypothesis that the combination of high plasma concentrations of AA and iron, or iron alone, causes oxidative damage *in vivo*. However, further studies are required to determine if iron and AA interactions could have a pro-oxidant effect *in vivo*.

Keywords: oxidative stress; pro-oxidant effect; iron; ascorbic acid; *in vivo*.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1: Via de formação de espécies pró-oxidantes e vias de detoxificação pelo sistema de defesa antioxidante.....	09
FIGURA 2: Efeito pró-oxidante da vitamina C (Rietjens et al., 2002).....	11
TABLE 1: Characteristics of the subjects	32
FIGURE 3. Plasma ascorbic acid after supplementation with ascorbic acid (2g), iron (150mg) or ascorbic acid plus iron.....	33
FIGURE 4. Plasma iron (A) and ferritin levels (B) after supplementation with ascorbic acid (2g), iron (150mg) or ascorbic acid plus iron	34
FIGURE 5. Erythrocytes NPSH after supplementation with ascorbic acid (2g), iron (150mg) or ascorbic acid plus iron.	35
FIGURE 6. Erythrocytes TBARS levels after supplementation with ascorbic acid (2g), iron (150mg) or ascorbic acid plus iron.....	36
FIGURE 7. Oxidation of DCFH after supplementation with ascorbic acid (2g), iron (150mg) or ascorbic acid plus iron.....	37
FIGURE 8. δ -ALA-D activity after supplementation with ascorbic acid (2g), iron (150mg) or ascorbic acid plus iron, determined in the absence (A) or in the presence of DTT (B).....	38
FIGURE 9. Activity of GPX plasmatic after supplementation with ascorbic acid (2g), iron (150mg) or ascorbic acid plus iron. Data are expressed as means \pm S.E.M.....	39
FIGURE 10. CAT activity after supplementation with ascorbic acid (2g), iron (150mg) or ascorbic acid plus iron.....	40
FIGURE 11. SOD activity after supplementation with ascorbic acid (2g), iron (150mg) or ascorbic acid plus iron.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS

- δ -ALA-D - delta aminolevulinato desidratase
AA – ácido ascórbico
 $O_2^{\circ-}$ - ânion superóxido
CAT – catalase
DCFH-DA – diacetato de diclorifluoresceína
ERO – espécies reativas ao oxigênio
 Fe^{+2} – ferro na forma ferrosa
 Fe^{+3} – ferro na forma férrica
GPx – glutaciona peroxidase
GR – glutaciona redutase
GSH – glutaciona reduzida
GSSG - glutaciona oxidada
 H_2O_2 – peróxido de hidrogênio
LPO – lipoperoxidação
MDA - malondialdeído
 OH^{\bullet} - radical hidroxila
 OH^- - ânion hidróxilo
 RO^{\bullet} - radical alcoxil
 ROO^{\bullet} - radical peroxil
ROOH – hidroperóxido orgânico
SOD – superóxido dismutase
TBARS - espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
LISTA DE FIGURAS E TABELA	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
APRESENTAÇÃO.....	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Ferro	1
1.2. Estresse Oxidativo	3
1.2.1. Reação de Fenton	3
1.2.2. Reação de Haber-Weiss	4
1.3. Marcadores do estresse oxidativo	4
1.3.1. Peroxidação Lipídica	4
1.3.2. Delta Aminolevulinato Desidratase (δ-ALA-D)	5
1.4. Defesas Antioxidantes	6
1.4.1 Defesas antioxidantes enzimáticas	7
1.4.2. Defesas antioxidantes não enzimáticas	9
2. OBJETIVOS.....	12
3. ARTIGO CIENTÍFICO	13
4. DISCUSSÃO	42
5. CONCLUSÕES	45
6. PERSPECTIVAS	46
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

APRESENTAÇÃO

No item **INTRODUÇÃO**, está descrita uma sucinta revisão bibliográfica sobre os temas trabalhados nesta dissertação.

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo, os qual encontram-se no item **ARTIGO CIENTÍFICO**. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontra-se no próprio artigo e representa a íntegra deste estudo.

Os itens, **DISCUSSÃO E CONCLUSÃO** encontradas no final desta dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre o artigo científico contido neste trabalho.

No item **PERSPECTIVAS** estão expostos os possíveis estudos para continuação do estudo do autor, referente a esse assunto.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO** e **DISCUSSÃO** desta dissertação.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Ferro

O ferro é um elemento essencial para a vida de todos os organismos. Está presente em algumas enzimas que catalisam mecanismos de oxidação celular e é de grande importância nos sistemas biológicos, onde participa de uma grande variedade de reações de transporte de elétrons, geralmente no estado de oxidação 2+ e 3+ (Minotti e Aust, 1987; Lim et al., 2000; Gurzau et al., 2003; Grundy et al., 2004).

O ferro se distribui amplamente, totalizando cerca de 3,5 a 4,5g em um indivíduo adulto, onde 70 a 80% são considerados ferro funcional. A maior parte do ferro corpóreo está em seu estado divalente na hemoglobina e na mioglobina, estando o restante distribuído entre os sítios de estoque, predominantemente no fígado, baço e medula óssea, ligado à ferritina ou à transferrina para transporte (Queiroz, 2000; Emerit et al., 2001; Martini, 2002; Gurzau et al., 2003).

A absorção de ferro pelo organismo é controlada, a fim de evitar o seu excesso, pois tanto um aporte deficiente de ferro, quanto um acúmulo excessivo no organismo conduzem a morbidade. Em condições normais, um bom padrão alimentar contém 10 a 20mg de ferro por dia, dos quais o organismo absorve cerca de 5 a 10%. Essa absorção compensa perdas de ferro através da descamação de células da pele, vias digestivas, urinárias e respiratórias. Sabe-se que a disponibilidade de ferro muda de acordo com o estado fisiológico (Martini, 2002; Gurzau et al., 2003; Boccio e Monteiro, 2004).

Uma série de desordens humanas e complexas pode desequilibrar a homeostase do ferro. Distúrbios no metabolismo do ferro podem ser encontrados na hemocromatose hereditária (HH), alguns tipos de anemia como β -talassemia maior, anemia sideroblástica, hemolítica crônica, além disso, em hepatopatia crônica, hemodiálise prolongada, hepatite C, porfiria cutânea tarda, síndrome da sobrecarga de ferro dismetabólica, hipotransferrinemia congênita entre outros (Freitas e Meneghini, 2001).

O excesso de ferro pode aumentar a síntese de proteínas que armazenam ferro como a ferritina e a hemossiderina nas células do parênquima hepático atuando como protetoras por manterem baixo o nível intracelular do ferro livre. A capacidade do fígado em sintetizar ferritina supera o papel dos lisossomas em processar ferro para excreção. Os lisossomas convertem a proteína a partir da ferritina e esta em hemossiderina. A formação da

hemossiderina a partir da ferritina não é bem conhecida, mas parece envolver desnaturação da molécula de apoferritina (Gurzau et al., 2003).

O ferro tem a capacidade de receber e doar elétrons, interconvertendo-se entre o estado férrico (Fe^{3+}) e ferroso (Fe^{2+}). Esta capacidade é fisiologicamente essencial para o funcionamento dos citocromos e ferro-proteínas. Porém, esses íons podem estimular a produção de espécies reativas ao oxigênio (ERO) por diferentes mecanismos (Emerit et al., 2001; Gurzau et al., 2003).

Um exemplo destes mecanismos é quando o Fe^{2+} reage com o H_2O_2 conduzindo à formação de radicais hidroxil (OH^{\bullet}) através da reação de Fenton. Embora na presença de redutores fisiológicos, o ferro pode ficar entre os dois estados de oxido-redução, gerando ERO altamente reativas (Halliwell e Gutteridge, 1999). As ERO que incluem o radical ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e oxigênio singlet, estão entre os compostos mais reativos produzidos durante as reações de estresse oxidativo com metais pesados (Miller et al., 1990; Halliwell e Gutteridge, 1993).

Muitos estudos têm mostrado que o ferro está envolvido na formação de alguns tipos de lesões no DNA em células de mamíferos (Mello-Filho et al., 1984; Mello-Filho e Meneghini, 1991; Bertoncini e Meneghini, 1995; Meneghini, 1997). Além disso, o ferro tem sido demonstrado induzir a troca de cromátides-irmãs e intervir na mutagênese induzida por peróxido de hidrogênio e também na transformação celular (Larramendy et al., 1987).

Sabe-se que altos níveis de ERO podem promover mutação, carcinogêneses e processos de envelhecimento pelo dano ao DNA (Wiseman e Halliwell, 1996; Beckman e Ames, 1998). Embora seja pouco conhecido que uma alteração no metabolismo do ferro pode promover processos carcinogênicos, trabalhos têm evidenciado que o estresse oxidativo leva a um aumento na homeostase do ferro (Martins et al., 1995; Pantopoulos et al., 1995; De Freitas et al., 2000). O estresse oxidativo pode produzir eventos genotóxicos por causa da indução do aumento das células contendo ferro. De fato, vários estudos têm relatado o aumento do risco de câncer em condições de sobrecarga de ferro, como na hemocromatose (Toyokuni, 1996).

Além disso, o acúmulo de ferro no cérebro tem sido associado com doenças neurológicas como doença de Parkinson, doença de Alzheimer e esclerose múltipla. Entretanto, os mecanismos do ferro não são entendidos nessas doenças (Rolfs e Hediger, 1999; Sayre et al., 1999).

1.2. Estresse Oxidativo

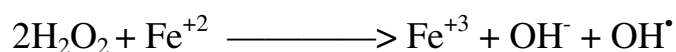
Halliwell e Gutteridge (1999) definiram o estresse oxidativo como o desequilíbrio no balanço entre agentes pró-oxidantes e agentes antioxidantes com a potencialidade de exercer efeitos deletérios. O ânion superóxido ($O_2^{\circ-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\bullet}) são algumas das ERO e sua presença nos organismos pode trazer efeitos deletérios (Premkumar e Bowlus, 2003). Estes efeitos causados pelas ERO podem ser: danos nas membranas ou em outras estruturas lipídicas celulares, preferencialmente quando a peroxidação lipídica atua em ácidos graxos insaturados das membranas biológicas; modificação nas proteínas, alterando a estrutura terciária e provocando a perda de função, fragmentação e ligações cruzadas; e no DNA induzem modificações, que podem ser reparadas pelos mecanismos de reparo ou podem induzir mutações (Halliwell e Gutteridge, 1999).

O radical hidroxila é um dos mais potentes oxidantes, tendo a capacidade de atravessar membranas e reagir com moléculas tais como lipídios insaturados e DNA. Ele pode ser formado através de reações como a de Fenton e de Haber-Weiss, mediadas por íons metálicos.

1.2.1. Reação de Fenton

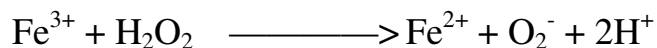
O radical hidroxila pode ser formado quando íons ferro reagem com H_2O_2 , com a participação do ácido ascórbico na redução do Fe^{+3} para Fe^{+2} , como foi observado por Fenton em 1984. A reatividade é devido à formação radical hidroxila (Halliwell e Gutteridge, 1989).

Complexo intermediário



O Fe^{3+} pode ficar disponível para reagir de novo com o H_2O_2 , porém esta reação fica lenta em pH fisiológico:

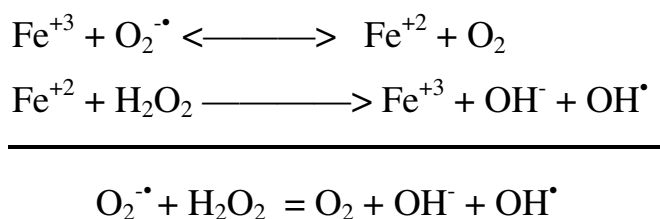
Complexo intermediário



O envolvimento do ferro com o peróxido de hidrogênio, pode formar no sistema biológico, uma série de reações oxidativas, causando o um aumento de EROs (Halliwell e Gutteridge, 1989).

1.2.2. Reação de Haber-Weiss

Essa reação pode ocorrer na presença de sais de ferro ou de cobre:



Os metais de transição podem catalisar a reação entre o H_2O_2 e O_2^- , conduzindo a produção de radical hidroxila. Assim, a soma das duas reações fornece o equivalente da reação de Haber-Weiss (Dunford, 2002). O aumento da geração de O_2^- e H_2O_2 pode designar condições que levam à formação do OH^\bullet (Halliwell e Gutteridge, 1985). Na catálise da reação acima, o ferro necessário pode ser oriundo da ferritina, hemoglobina ou mioglobina (Werns e Luchesi, 1990).

1.3. Marcadores do estresse oxidativo

1.3.1. Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO) é o processo através do qual as ERO agredem os ácidos graxos polinsaturados dos fosfolípidos das membranas das células, desintegrando-as e permitindo, desta feita, a entrada dessas espécies nas estruturas intracelulares (Halliwell e Gutteridge, 1989).

Um produto da LPO bem conhecido é o malondialdeído (MDA) (Alexandrova e Bochev, 2005; Cherubini et al., 2005), o qual é o produto final da degradação não enzimática de ácidos graxos poliinsaturados. Com isso, altos níveis de MDA indicam um aumento da lipoperoxidação (Kashyap et al., 2005).

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação de ERO, porém a membrana plasmática é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, o que provoca alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares. Com isso, há perda da seletividade na troca iônica e na liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e a formação de produtos citotóxicos, culminando com a morte celular. O OH^\bullet é frequentemente reconhecido como a espécie iniciadora e a mais importante da lipoperoxidação. Entretanto, estudos indicam que o ferro também desempenha papel determinante na iniciação deste processo, sendo necessária uma relação equimolar $\text{Fe}^{3+} : \text{Fe}^{2+}$ no meio (Ferreira e Matsubara 1997).

O ferro livre, bem como seus complexos, é capaz de estimular a LPO nas células (Gogvadze et al., 2003). A LPO pode ser iniciada por qualquer radical livre primário que tenha reatividade suficiente para extrair um átomo de hidrogênio de um grupo metileno reativo de um ácido graxo insaturado. Na primeira fase do processo de LPO, as cadeias altamente vulneráveis dos ácidos graxos poliinsaturados são atacadas por radicais livres formando hidroperóxidos lipídicos. Estes hidroperóxidos lipídicos são moléculas razoavelmente estáveis sob condições fisiológicas, mas sua decomposição é catalisada por metais de transição formando radicais alcóxil (RO^\bullet) e peróxil (ROO^\bullet). Os radicais RO^\bullet são análogos altamente reativos do radical OH^\bullet e podem propagar as reações da LPO (Minotti e Aust, 1987; Miller e Aust, 1989; Janero, 1990).

Sabe-se que o ferro desempenha um papel crucial na iniciação da lipoperoxidação e os radicais ROO^\bullet lipídicos formados durante a modificação lipídica podem reagir com proteínas deteriorando funções de enzimas e receptores, podem amplificar a lipoperoxidação e oxidar o colesterol (Halliwell e Gutteridge, 1999).

1.3.2. Delta Aminolevulinato Desidratase (δ -ALA-D)

A δ -ALA-D, uma enzima que participa da rota biossintética do heme, é essencial para organismos aeróbicos (Gabriel et al., 2005). Metais endógenos são componentes essenciais para sistemas de enzimas como a δ -ALA-D, que é uma metaloenzima e requer íons zinco para

sua atividade (Jaffe et al., 1995). A δ -ALA-D catalisa a condensação assimétrica de duas moléculas de ácido aminolevulínico (δ -ALA) para formar porfobilinogênio monopirrólico (PBG) e iniciar a biossíntese do heme (Gibson et al., 1955). O PBG reuni-se dentro de moléculas tetrapirrólicas, que constitui o grupo prostético de proteínas fisiologicamente significantes como a hemoglobina, citocromos e algumas enzimas como a catalase (Gabriel et al., 2005).

A δ -ALA-D é uma enzima sulfidrílica (Gibson et al., 1955; Barnard et al., 1977) e muitos metais como o mercúrio (Rocha et al., 1993, 1995), chumbo (Sassa et al., 1982; Rodrigues et al., 1989, 1996; Goering, 1993) e outros compostos podem oxidar os grupamentos sulfidrilicos modificando sua atividade (Emanuelli et al., 1996; Barbosa et al., 1998; Flora et al., 1998; Jacques-Silva et al., 2001; Flora et al., 2002). Além disso, a δ -ALA-D pode ser inibida por substâncias que competem com o zinco ou ainda que oxidem os grupos -SH (Farina et al., 2002; Nogueira et al., 2003a,b; Santos et al., 2004). Esta situação pode estar associada com o estresse oxidativo (Pande et al., 2001; Folmer et al., 2002; Pande e Flora, 2002; Tandon et al., 2002; Soares et al., 2003), pois além da insuficiente produção de heme, a inibição da δ -ALA-D pode resultar no acúmulo do substrato ácido aminolevulínico (ALA) no sangue, que está relacionado com a superprodução de ERO (Monteiro et al., 1989; Bechara et al., 1993).

Em estudos feitos com equinos e roedores, o excesso de ALA induziu a liberação do íon ferro da ferritina *in vitro*, iniciando um processo de peroxidação lipídica no baço e no fígado destes animais (Oteiza et al., 1994). Assim, o aumento na concentração de ALA, devido à inibição da enzima δ -ALA-D, pode acarretar em conseqüências patológicas inespecíficas, uma vez que a produção exagerada de ERO pode atuar nos mais diferentes órgãos e compartimentos celulares dos organismos nos quais são gerados (Meredith et al., 1979).

Além dos marcadores acima citados, a avaliação das defesas antioxidantes como a atividade das enzimas GPx, CAT, SOD, e os níveis de ácido ascórbico e glutatona são alguns exemplos de importantes marcadores do estresse oxidativo.

1.4. Defesas Antioxidantes

Halliwell e Gutteridge (1990) definem como antioxidante qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas a de um substrato oxidável, retarda ou

inibe significativamente a oxidação deste substrato. Entre as principais enzimas responsáveis pela defesa antioxidante do organismo destacam-se a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPx), as quais constituem a primeira defesa endógena de neutralização das ERO. As defesas não-enzimáticas são compostas principalmente por antioxidantes hidrossolúveis, por exemplo, a glutathione (GSH) e o ácido ascórbico (AA).

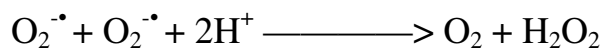
1.4.1 Defesas antioxidantes enzimáticas

- *Superóxido dismutase (SOD)*

A SOD tem papel fundamental na defesa do organismo contra as ERO, pois atua na remoção do radical superóxido. Antes da sua descoberta, a SOD já havia sido descrita por alguns autores como uma proteína que contém cobre, mas nenhuma atividade catalítica lhe havia sido atribuída (Halliwell e Gutteridge, 1985).

Após o trabalho de Mc Cord e Fridovich (1969), entretanto, com a determinação de sua função na dismutação do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), seu papel foi estabelecido, e até hoje, apesar de inúmeras pesquisas realizadas com esta enzima, nenhum outro substrato foi descrito, mostrando a sua especificidade para o superóxido (Halliwell e Gutteridge, 1985).

Existem diferentes tipos de SOD, dependendo do metal que atua como co-fator em seu sítio catalítico, mas todas elas agem basicamente de acordo com a mesma reação descrita por Mc Cord e Fridovich em 1969:

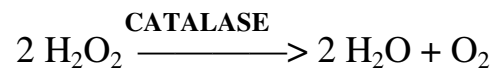


As SOD que contêm cobre e zinco (CuZnSOD) são estáveis e estão presentes em quase todas as células eucarióticas (plantas ou animais) (Halliwell e Gutteridge, 1985). Já as SOD dependente de manganês (MnSOD), em relação a CuZnSOD depende do tecido e das espécies onde atuam. A remoção do Mn dos sítios ativos causa perda da atividade catalítica, não podendo ser repostos por nenhum íon de transição, pois perde a sua atividade funcional. As seqüências de aminoácidos de todas as MnSOD, em todas as espécies, são parecidas e não estão relacionadas com a CuZnSOD (Halliwell e Gutteridge, 1989).

- *Catalase (CAT)*

Enzima presente na maioria das células aeróbicas, que se encontra principalmente nos peroxissomas, nos eritrócitos e em menor quantidade no plasma. A CAT das células animais é formada por quatro subunidades, onde cada uma possui um grupo heme contendo ferro em seu sítio ativo. Esses grupos heme estão orientados em direção a sítios não polares e conectados na superfície da enzima por canais. Cada subunidade está unida a uma molécula de NADH (Jourd'Heul et al., 1998; Lledías et al., 1998; McKenzie et al., 1998; Halliwell, 1999).

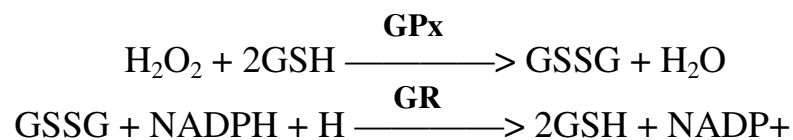
A CAT é uma hemoenzima que catalisa a dismutação do H₂O₂ para formar H₂O e O₂:



Se não neutralizado, o H₂O₂ interage com cátions de ferro (ou cobre), originando o íon hidroxila e o radical livre hidroxila. Além de seu papel como espécie reativa de oxigênio, e, portanto, causador de estresse oxidativo, o H₂O₂ em excesso causa oxidação da hemoglobina e, conseqüentemente, diminuição das concentrações de oxigênio na célula, que pode estar envolvido no desenvolvimento de diversas patologias (Wieacker *et al.*, 1980).

- *Glutathione Peroxidase (GPx)*

O substrato para a GPx é o tripeptídeo glutathione, encontrado na maioria dos animais, plantas, e em algumas bactérias. A enzima catalisa a oxidação de glutathione reduzida (GSH) a glutathione oxidada (GSSG), usando o peróxido de hidrogênio:



A família das GPx removem H₂O₂ acoplado sua redução à água com a oxidação da glutathione reduzida (GSH). A enzima GPx pode reagir com uma grande variedade de peróxidos e hidroperóxidos, além do H₂O₂ e os hidroperóxidos derivados dos ácidos graxos. A metabolização dos hidroperóxidos é muito importante porque estes podem ser uma fonte potencial de radicais (Gaetani, 1989).

A figura 1 ilustra as principais enzimas antioxidantes, capazes de neutralizar as ERO:

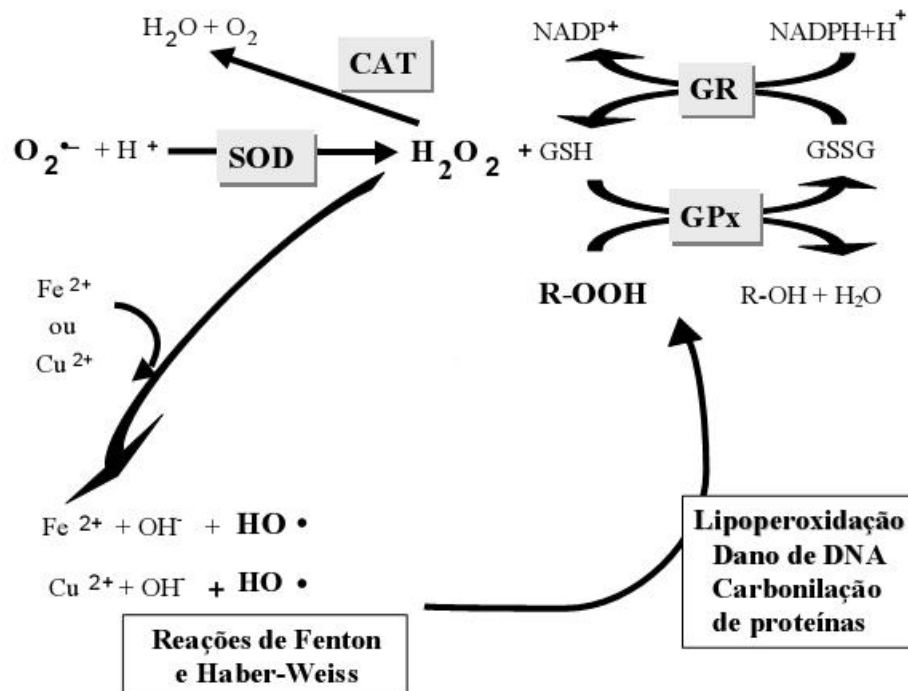


Figura 1: Via de formação de espécies pró-oxidantes e vias de detoxificação pelo sistema de defesa antioxidante (Cravo, 2006).

1.4.2. Defesas antioxidantes não enzimáticas

- Glutathiona (GSH)

A GSH é um tripeptídeo de baixo peso molecular contendo tiol (SH) e é substrato para GPx. É um antioxidante não enzimático e está envolvida em muitos processos metabólicos, incluindo o metabolismo do ácido ascórbico e comunicação entre células. Além disso, a GSH pode prevenir a oxidação de grupos $-\text{SH}$ de proteínas evitando pontes intercadeias podendo diminuir a habilidade para gerarem radicais livres (Halliwell e Gutteridge, 1990). Seu déficit acarreta diminuição da resistência às drogas e radiações, da capacidade de reversão de tumores e da síntese do ascorbato em animais (Halliwell e Gutteridge, 1985).

- *Ácido ascórbico (AA)*

A vitamina C ou Ácido Ascórbico (AA) é uma vitamina hidrossolúvel e termolábil, essencial para o organismo humano, pois participa de diversos processos metabólicos e fisiológicos, dentre eles a regeneração do α -tocoferol, a formação do colágeno, síntese de epinefrina, corticosteróides e ácidos biliares. Além de co-fator enzimático, participa dos processos de óxido-redução, reduzindo o Fe^{3+} em ferroso Fe^{2+} no trato gastrintestinal para facilitar a absorção e também está envolvido na transferência de ferro da transferrina plasmática para ferritina hepática (Aranha et al. 2000; Ren et al., 2001; Themelis et al., 2001; Escott-Stump e Mahan, 2002; Manela-Azulay et al., 2003; Martínez et al., 2003).

O AA é um dos antioxidantes mais importantes em tecidos de mamíferos (Banhegyi et al., 1997), com a capacidade de neutralizar radicais como o $\text{O}_2^{\cdot-}$ e o OH^{\cdot} (Namiki, 1990). AA é comumente encontrado no organismo na forma de ascorbato. Vários estudos têm investigado o efeito do consumo de vitamina C através de frutas e vegetais com o desenvolvimento do câncer (Rietjens et al., 2002). Estudos observacionais epidemiológicos sugerem que vitaminas antioxidantes, como a vitamina C, podem inibir doenças cardiovasculares e câncer (Flagg et al., 1995). Alguns estudos têm mostrado uma significativa redução no risco de câncer de pulmão com um aumento na dieta de vitamina C (Bandera et al., 1997; Ocké et al., 1997; Yong et al., 1997). Entretanto, níveis de vitamina C plasmática têm sido demonstrado apresentar apenas um modesto aumento ou insignificante efeito benéfico, que pode ter maior relevância nos cânceres do trato digestivo, particularmente câncer de esôfago e estômago (Stähelin et al., 1991; Comstock et al., 1997). Outro estudo concluiu que a vitamina C não demonstrou eficácia na quimioprevenção do câncer (Lippman et al., 1998).

Além de suas propriedades antioxidantes, o ascorbato pode participar de reações opostas, as oxidações, sendo um potente indutor de radicais livres, agindo como um pró-oxidante (Halliwell, 1990). A indução de peroxidação lipídica *in vitro* pelo sistema de ascorbato-ferro é um teste padrão por induzir estresse oxidativo e testar a atividade antioxidante. Neste sistema modelo, a quelação de Fe^{2+} pelo ascorbato produz uma atividade catalítica pela produção de EROs. Quando o Fe^{+3} está presente, a vitamina C pode converter o Fe^{+3} em Fe^{2+} , que reage subsequentemente com oxigênio ou peróxido de hidrogênio resultando na formação de ânions superóxido ou radicais hidroxila (Figura 2) (Samuni et al., 1983; Halliwell et al., 1987; Higson et al., 1988). Por outro lado, não está bem claro se o ascorbato possui propriedades oxidantes *in vivo* em condições fisiológicas (Emerit et al.,

2001; McArdle et al., 2002; Premkumar e Bowlus, 2003; Osgová et al., 2003; García-Casal et al., 2004; Mühlhöfer et al., 2004; Renz, 2004).

A concentração e a localização intracelular da vitamina C pode ser um fator decisivo na atividade desta vitamina como oxidante ou antioxidante. Quando o AA é oxidado a DHA (ácido dehidroascórbico) através de reações reversíveis, há formação de um intermediário, o radical ascorbil (ASC°). Isso explica o efeito pró-oxidante da vitamina C *in vitro* (Figura 2) (Basu e Donaldson, 2003; Mühlhöfer, et al., 2004).

Além da importante relação da ação anticarcinogênica e pró-oxidante da vitamina C, esta tem sido demonstrada induzir a morte celular, fragmentação nuclear e clivar o DNA internucleossomal em humanos com leucemia mielóide, todos com a habilidade de aumentar as concentrações de vitamina C e induzir a apoptose em vários tumores de células (Sakagami e Satoh, 1997; Sakagami et al., 2000). A apoptose induzida pela atividade da vitamina C tem sido atribuída a sua ação pró-oxidante e está inibida pela catalase, N-acetilcisteína e GSH, depleção de íons Ca^{2+} e Fe^{3+} , mas estimulado pelo H_2O_2 , Cu^{2+} e queladores de ferro (Sakagami and Satoh, 1997; Sakagami et al., 2000).

O fato da vitamina C não ter apresentado efeito antioxidante na quimioprevenção do câncer tem sido demonstrado que a vitamina C intercede na formação de genotoxinas de lipoperóxidos, mesmo na ausência de metais de transição, podendo apresentar atividade pró-oxidante (Lee et al., 2001).

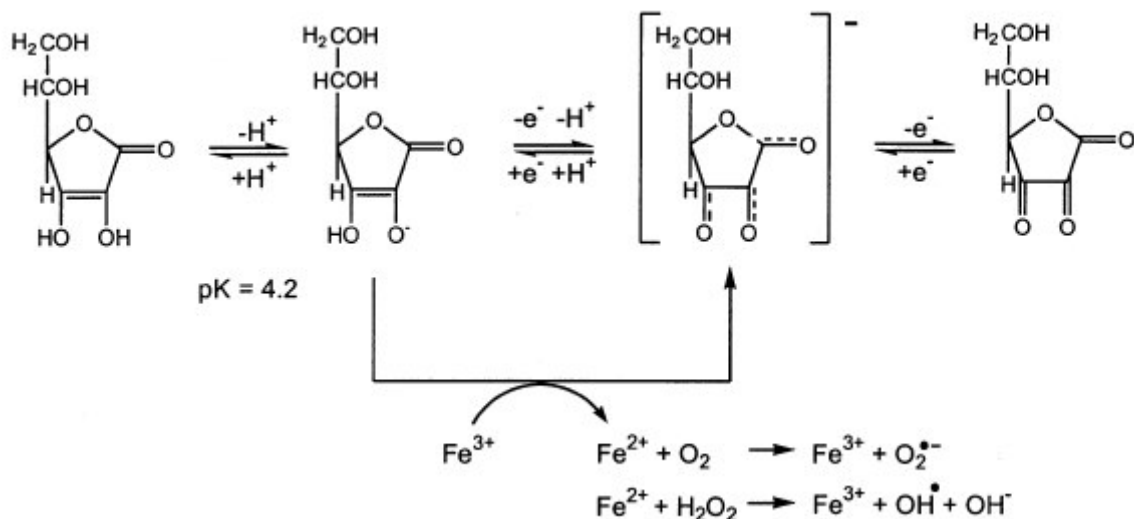


Figura 2: Efeito pró-oxidante da vitamina C (Rietjens et al., 2002).

2. OBJETIVOS

Tendo em vista os aspectos relacionados ao efeito pró-oxidante do AA com o Fe, *in vitro*, favorecendo a formação do estresse oxidativo, este trabalho teve por objetivo avaliar os marcadores do estresse oxidativo em indivíduos suplementados com Fe e AA, através da determinação:

- Dos parâmetros hematimétricos como hemoglobina e hematócrito, como também ferro sérico e ferritina.
- Da atividade das enzimas marcadoras de estresse oxidativo, tais como: CAT, δ -ALA-D, SOD e GPx no sangue dos voluntários.
- Dos níveis sanguíneos de antioxidantes não enzimáticos como o -SH não protéico e a vitamina C.
- Do estresse oxidativo através da determinação dos níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e da oxidação da diacetato de diclorifluoresceína (DCFH-DA).

3. ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico, o qual encontra-se aqui organizado. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio artigo. O artigo está disposto da mesma forma que foi submetido para publicação na Revista *Journal of Nutritional Biochemistry*.

3.1. A SINGLE HIGH DOSE OF ASCORBIC ACID AND IRON IS NOT CORRELATED WITH OXIDATIVE STRESS IN HEALTHY VOLUNTEERS

Elisângela Colpo, João Batista Teixeira Rocha, Iria Luiza Gomes Farias, Simone Pieniz, Sally Danuta Schettert, Andreza Fabro de Bem, Rosane Maria Souza dos Santos, Iara Bertoncello, Cleci Menezes Moreira, Maria Beatriz Moretto

Artigo submetido para publicação na Revista *Journal of Nutritional Biochemistry*

**A SINGLE HIGH DOSE OF ASCORBIC ACID AND IRON IS NOT
CORRELATED WITH OXIDATIVE STRESS IN HEALTHY VOLUNTEERS**

Elisângela Colpo¹, João Batista Teixeira Rocha^{1*}, Iria Luiza Gomes Farias², Simone Pieniz¹,
Sally Danuta Schettert¹, Andreza Fabro de Bem², Rosane Maria Souza dos Santos², Iara
Bertoncello², Cleci Menezes Moreira², Maria Beatriz Moretto²

- 1- Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas –
Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS – 97105900
- 2- Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde

* Corresponding Author:

Prof. João Batista Teixeira Rocha
Departamento de Química,
Centro de Ciências Naturais e Exatas,
Universidade Federal de Santa Maria,
Santa Maria – RS – 97105900
E-mail: jbtrocha@yahoo.com.br

ABSTRACT

Free iron can become a potent pro-oxidant *in vivo* and can induce cellular oxidative stress. Ascorbic acid (AA) is a powerful antioxidant, which can exhibit pro-oxidant effects in the presence of iron *in vitro*. However, the *in vivo* pro-oxidant effects of these two nutrients are controversial. We evaluated the potential toxic effect of supplementation of iron associated with AA. Nine non-smoking male healthy volunteers, aged between 20 and 31 years participated in the cross-over study design after a washout period. The volunteers were supplemented with a single dose containing 2g of AA, 150mg of iron and 2g of AA plus 150 mg of iron. The volunteers were submitted to all treatments, which were alternate each 15 days. AA, iron, ferritin, Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), catalase, delta-amino levulinate dehydratase and SH were measured in blood of the volunteers. The results showed that plasma AA levels were increased at 2, 5 and 24 hours after AA or AA plus iron ingestion. Plasmatic iron level was increased at 2 hours after iron ingestion and 2, 5 hours in the group AA plus iron. The erythrocytes TBARS levels decreased at 5 hours after AA and 5, 24 hours after AA plus iron ingestion. The erythrocytes catalase levels caused a significant increase 5 hours after supplementation with AA plus iron. There was no significant difference between groups in the other evaluated biochemical parameters. Thus, the present study does not support the hypothesis that the combination of high plasma concentrations of AA and iron, or iron alone, causes oxidative damage *in vivo*, in a single dose of the supplementation.

Key words: Fenton reaction; pro-oxidant; *in vivo*; reactive oxygen species; ascorbic acid, iron.

INTRODUCTION

Iron is an essential nutrient for normal cellular functions and has the capacity to accept and donate electrons readily, interconverting between ferric (Fe^{+3}) and ferrous (Fe^{+2}) [1, 2, 3, 4]. This capacity makes it a useful component of cytochromes, oxygen binding molecules and some enzymes [1].

Excess of iron is thought to generate oxidative stress via an increase of reactive oxygen species (ROS). Overproduction of ROS can damage different kinds of biomolecules, which can contribute to development of several chronic diseases as diabetes [5], cancer [6] and cardiovascular disease [7]. Of particular importance, iron overload in humans and in experimental animals has been associated with oxidative stress [8, 9].

Oxidative stress is defined as an imbalance in pro-oxidant *versus* antioxidant species in favor of the former, results in oxidative damage to biological macromolecules. Increased oxidative stress has been implicated in iron overload conditions, such as homozygous hemochromatosis and treatment of β -thalassemia [10, 11] and is thought to be due iron-catalyzed generation of hydroxyl and alkoxy radicals through Fenton chemistry [12].

Oxidative damage of biomolecules can be counteracted by antioxidants. Ascorbic acid (AA) is a powerful water-soluble antioxidant which can prevent peroxidation in plasma exposed to various types of oxidative stress [13, 14]. Ascorbic acid deficiency is always associated with an increase in oxidative stress and tissue injury [15]. However, in vitro ascorbic acid can enhance iron redox cycling (Fe^{3+} - Fe^{2+} transition), which can lead to the production of hydroxyl radicals and lipid alkoxy radicals [2, 16]. In fact, free iron can damage tissues via the Fenton reaction catalyzing the conversion of superoxide and hydrogen peroxide to free radical species that attack cellular membranes, proteins and DNA [1, 3, 13]. Although, this Fenton chemistry occurs readily in vitro, its occurrence under physiological conditions is unlikely, given the negligible availability of 'free' catalytic iron [17].

Of particular nutritional importance, ascorbic acid enhances the bioavailability of nonheme iron and can increase iron body burden [1, 12, 18]. In line with this, dietary association of iron and AA is recommended to increase intestinal iron absorption [1, 18]. However, the possible pro-oxidant effect of AA supplementation, particularly when associated with iron supplementation in vivo continues to be highly debatable [16].

According to DRIs (Dietary Reference Intakes), the daily ingestion of iron can reach 27mg/day, depending on the age group and up to 120mg/day of ascorbic acid. UL (Limits tolerable superior of ingestion) it is of 45mg/day for iron and 2000mg/day for of ascorbic acid

[19]. However, in people under risk of iron overload in which the elevated levels of iron could lead to higher 'free iron' concentrations, an excess of ascorbic acid could have deleterious effects [17].

Mechanisms for protecting cells from the toxic activity of ROS include the SOD-mediated conversion of O_2^{\bullet} to H_2O_2 , the enzymes catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) that rapidly degrade H_2O_2 to H_2O , and various endogenous radical scavengers and reductants such as ascorbic acid [20, 21, 22].

However, to the best of our knowledge, data about the effect of acute high dose of vitamin C and iron on the antioxidant enzymes activity and on markers of oxidative stress in human blood are scarce. Therefore, the purpose of this study was to determine the effect pro-oxidant of the iron with the ascorbic acid in healthy individuals through an only dose.

MATERIALS AND METHODS

2.1 Chemicals

Iron carbonyl tablets were A GIFT from Herbarium Botanical Laboratory Ltd. and ascorbic acid tablets were obtained from Roche (São Paulo, SP, Brazil). The kit Hitachi 917 iron and kit Integra 400 ferritin determination were donated by Roche Diagnoses. 5-aminolevulinic acid (ALA), DL-dithiothreitol (DTT) and malondialdehyde (MDA) were obtained from Sigma (St. Louis, MO). Mono- and dibasic potassium phosphate, trichloroacetic acid and sodium chloride were obtained from Merck (Rio de Janeiro, RJ, Brazil).

2.2 Subjects

The study protocol was approved by the Human Ethics Committee of the Health Science Center from the Federal University of Santa Maria, and informed consent was obtained from all the patients (N° 117/05). Nine healthy subjects males non-smoking, aged between 20 and 31 years were recruited. Exclusion criteria were smoking, iron deficiency or anemia, high alcohol intake, consumption of vitamin and mineral supplements or drugs. Subjects were considered healthy on the basis of physical examination and routine biochemical and hematological laboratory determinations (Table 1). Each subject was tested three times in a randomized cross-over with regard to the administration of 2g of ascorbic acid and 150mg of iron. Two Latin squares of 3 x 3 for the three treatments were used to randomize participants into three orders of ascorbic acid plus iron ingestion. Prior to each intervention volunteers followed a 15 days washout period. The subjects were supplemented with a single dose containing 2g of ascorbic acid in the first group, 150mg of iron carbonyl in the second group and 2g of ascorbic acid plus 150mg of iron carbonyl in the third group. Fasting venous blood samples were collected prior to the start of supplementation and again after 2h, 5h and 24h. Blood was collected between 8 a.m. and 1 p.m. and all the subjects were fasted for at least 1h p.m. before collect. After 24h of the first collect, the subjects collected blood in fast by 8h. A nutritionist instructed them on excluding several foods, rich in ascorbic acid and iron, from their diet (vegetable, legumes, fruit, juice, coffee, tea, egg, all the types of meat, foods contend phytates, tannins and calcium, among others). Samples were obtained in January 2006.

2.3 Sample collection

The blood of the subjects was collected by venous arm puncture and aliquotted into either anticoagulant free tubes (for serum) or heparinized tubes. Total blood was used to determination of ALA-D activity and for DCFA oxidation. The plasma and cells were separated by centrifugation at 1500×g for 10 min. and erythrocytes were used for NPSH, TBARS and CAT determinations. The plasma samples were used for TBARS, NPSH, iron and ascorbic acid determinations. The serum samples were used to measure ferritin and iron.

2.4. Ascorbic acid determination

Ascorbic acid determination was performed as described by Jacques-Silva et al. [23]. Plasma was precipitated with 1 volume of a cold 10% trichloroacetic acid solution and centrifuged at 1.000×g. An aliquot of 300µl of the supernatants were mixed with 2, 4-dinitrophenylhydrazine (4.5mg/ml), CuSO₄ (0.075mg/mL and trichloroacetic acid 13.3% (final volume 1ml) and incubated for 3 h at 37°C. Then 1mL of H₂SO₄ 65 % (v/v) was added to the medium. The content of ascorbic acid was calculated using a standard curve (1.5 – 4.5µmol/l ascorbic acid freshly prepared in sulfuric acid) and expressed as µmol ascorbic acid/ml of plasma).

2.5. Measurement of serum Iron and Ferritin concentration

Iron and ferritin were determined using a commercial kit Hitachi 917 iron and kit Integra 400 ferritin donated from Roche Diagnostics, São Paulo, Brazil. The activity of iron was expressed as µg/dl plasma and ferritin was expressed ng/ml plasma.

2.7. Non-protein thiol groups (NPSH) determination

Erythrocyte nonprotein thiol groups (NPSH) were determined as described by Ellman [24]. Red blood cells pellet (300µl), obtained after centrifugation of heparinized whole blood, was hemolized with 100µl triton 10% solution for 10min. Then, the protein fraction was precipitated with 200µl of 10% trichloroacetic acid followed by centrifugation. The colorimetric assay was carried out in phosphate buffer 1M, pH 7.4. A standard curve using glutathione was constructed in order to calculate the non-protein thiol groups in the tissue samples. The activity of NPSH was expressed as nmol GSH/ml erythrocytes.

2.8. Determination of TBARS levels

TBARS were determined in erythrocytes by the method of Ohkawa et al. [25], in which malondialdehyde (MDA), an end-product of fatty acid peroxidation, reacts with thiobarbituric acid (TBA) to form a colored complex. In brief, samples were incubated at 100°C for 60 min in acid medium containing 0.45% sodium dodecyl sulfate (SDS) and 0.6% TBA. After centrifugation the reaction product was determined at 532nm using 1, 1, 3, and 3-tetramethoxypropane as standard and the results were expressed as nmol MDA/ml plasma.

2.9. Determination of DFCH Oxidation

2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA) was used to detect intracellular ROS levels in blood samples by the method of Cao and Li [26]. DCF-DA is cell membrane permeable. Once inside the cells, DCF-DA is hydrolyzed by cellular esterases to form DCF, which is trapped intracellularly due to its membrane impermeability. DCF then reacts to intracellular ROS to form the fluorescent product, 2',7'-dichlorofluorescein. The fluorescence was measured using a Perkin-Elmer luminescence spectrometer (LS50B) at an excitation wavelength of 488nm and an emission wavelength of 520nm.

2.10. δ -Aminolevulinic dehydratase (δ -ALA-D) activity

Blood δ -ALA-D activity was assayed according to the method of Berlin and Schaller [27]. The enzyme activity was measured by determining the amount of porphobilinogen formed at 37°C, in the presence and absence of the reducing agent dithiothreitol (DTT). The enzyme reaction was initiated after 10 min of pre-incubation. The reaction was started by adding substrate (δ -ALA) and incubated for 90 min at 37°C. The reaction product (porphobilinogen) was determined using modified Ehrlich's reagents and measured at 555nm.

2.11. Glutathione peroxidase (GSHPx) assay

GSHPx (EC 1.11.1.9) activity determination was assayed by the method of Pagalia and Valentine [28]. In this method, GSHPx catalyses the oxidation of glutathione in the presence of hydrogen hydroperoxide. Oxidized glutathione is converted to the reduced form in the presence of glutathione reductase and NADPH, while NADPH is oxidized to NADP⁺. In brief, plasma (10 μ l) was added to the assay mixture (total volume = 500 μ l) and the reaction started by the addition of H₂O₂ to give a final concentration of 0.4mM. Conversion of NADPH to NADP⁺ was monitored continuously at 340nm for 2 min. GSHPx activity was

expressed as μmol of NADPH oxidized per minute per ml of plasma, using an extinction coefficient 6.22×10^6 for NADPH.

2.12. Catalase (CAT) assay

Catalase activity was measured by the method of Aebi [29]. Packed erythrocytes were hemolyzed by adding one hundred volumes of distilled water, then, 20 μl of this hemolyzed sample was added to a cuvette and the reaction was started by the addition of 100 μl of freshly prepared 300mM H_2O_2 in phosphate buffer (50mM, pH 7.0; total volume of incubation: 1ml). The rate of H_2O_2 decomposition was measured spectrophotometrically at 240nm during 120s. The activity of catalase was expressed as $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{ml eryth./min}$.

2.13. Superoxide Dismutase (SOD) assay

SOD (E.C.1.15.1.1) activity in tests was assayed spectrophotometrically as described by Boveris and Cadenas [30]. This method is based on the capacity of SOD to inhibit autoxidation of adrenaline to adrenochrome. The color reaction was measured at 480nm. One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme required to inhibit the rate of epinephrine autoxidation by 50% at 26°C.

2.14. Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm S.E.M. Statistical analysis was performed using a analysis of variance (ANOVA), followed by Post-hoc by Duncan's multiple range test. When appropriate it was used repeated measures ANOVA, followed by Post-hoc by Duncan's multiple range test. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

3.1. Ascorbic Acid levels

Supplementation with ascorbic acid alone or in the presence of iron caused a significant increase in plasma ascorbic acid from 2 to 24 hours compared difference between groups with repeated measures ANOVA ($P < 0.00001$; Figure 1). In line with this, one-way ANOVA yielded a significant effect of vitamin C intake as compared before treatment, 2 and 5 hours ($P < 0.00001$) and 24 hours (Figure 3; $P < 0.01$).

3.2. Iron and ferritin levels

Plasma levels of iron were increased only in the group supplemented with iron + ascorbic acid at 2 and 5 hours after tablets ingestion compared before treatment group (Figure 4A; $P < 0.05$). In contrast plasma ferritin levels did not present any significant variation (Figure 4B).

3.3. Non-protein thiol content – NPSH

The Erythrocyte NPSH levels at different times before and after ingestion ascorbic acid and iron did not vary (Figure 5).

3.4. TBARS levels

Supplementation with ascorbic acid alone or in the presence of iron caused a significant decrease in erythrocytes TBARS levels at 5 hours after ascorbic acid and ascorbic acid plus iron ingestion (Figure 6; $P < 0.05$). In fact, repeated measures ANOVA of erythrocytes TBARS revealed a decreased at 24 hours for the group supplemented with ascorbic acid (Figure 6; $P < 0.05$).

3.5. DFCH oxidation

Diclorofluorescein oxidation in volunteers' blood of all the groups was not modified by ascorbic acid, iron or ascorbic acid plus iron ingestion (Figure 7).

3.6. δ -Aminolevulinic dehydratase (δ -ALA-D) activity

Blood δ -Aminolevulinic dehydratase (measured in the absence or in the presence of DTT) was not modified by dietary supplementation with ascorbic acid, iron or both (Figure 8 – A and B).

3.7. GPx and Catalase activities

Supplementation with ascorbic acid plus iron ingestion was not associated with significant changes in GPx activity (Figure 9). In contrast, one way ANOVA of Catalase activity indicated a significant increase enzyme activity after ascorbic acid + iron ingestion at 5 hours (Figure 10; $p < 0.05$).

3.8. Superoxide Dismutase Activity (SOD)

Ingestion ascorbic acid and/or iron did not modify SOD activity (Figure 11).

DISCUSSION

This study demonstrates that ascorbic acid exhibits antioxidant activity, rather than pro-oxidant activity, in vivo, in the blood of volunteers in the presence of iron overload. Literature data about the potential pro-oxidant effect of ascorbic acid in the presence of iron is controversial. In fact, in vivo studies do not support a pro-oxidant role for ascorbic acid in the presence of free iron [18, 31]. However, in vitro studies support a pro-oxidant role for ascorbic acid in the presence of free iron [32]. This is a consequence of ascorbic acid involvement in the chemical reduction of Fe^{+3} to Fe^{+2} , which participates in Fenton reaction and produces hydroxyl radical (OH^{\bullet}). In contrast to in vitro, in vivo studies supporting a pro-oxidant effect of ascorbic acid are scanty. Sustaining a pro-oxidant effect of the iron-ascorbic acid interaction in vivo, a report showed that a daily combined supplementation of iron (100mg as fumarate) and ascorbic acid (500mg as ascorbic acid) during the third trimester of pregnancy caused a 20% increase in plasma lipid oxidation [17]. Oxidative damage may depend on iron binding sites presents on proteins or DNA but not lipids [33]. A study [34] investigating the effects of ascorbic acid and iron co-supplementation on 13 different oxidative DNA damage products in human leukocytes found that, although some oxidative products increased and others decreased, total base damage increased after 6 weeks of supplementation and returned to baseline after 12 weeks. AA supplementation could also have pro-oxidant effects on normal human volunteers [33] as determined by an increase in 8-oxoadenine levels in leukocytes. Similarly, an increase in some oxidized DNA bases have been observed in mice fed AA-supplemented low-iron diet [4, 35].

In contrast, there are also few studies suggesting that co-supplementation for long periods with ascorbic acid and iron can decrease the oxidative stress in human blood [2]. Furthermore, ascorbic acid did not increase lipid peroxidation in 3T3 fibroblasts incubated with iron [17]. In agreement with this, the present results support a limited antioxidant effect of ascorbic acid after simultaneous ingestion of high doses of ascorbic acid and iron in male human healthy volunteers. This was observed 5 hours after ingestion of both supplements, where a small decrease in blood TBARS levels and small increase in catalase were found.

More important, in other studies, investigators have reported that there is no evidence of increased free radical damage due to the combined ingestion of iron and ascorbic acid [2, 4, 36, 37]. Taken together, we can speculate that high-dose ascorbic acid therapy can be antioxidative and can be considered a safe therapy [2, 38, 39].

In summary, the results of the present in vivo study, demonstrate that the activity of the enzymes ALA-D, SOD and GPx, levels of the NPSH were not altered significantly after

an overload of ascorbic acid and iron in healthy volunteers. These findings support the concept that, even at high intakes of ascorbic acid, iron uptake is tightly regulated in healthy people and, therefore, ascorbic acid would not lead to exacerbation of free radical damage in vivo by enhancing catalytic iron levels, as otherwise suggested [40, 41]. In agreement with this, the present results support a limited anti-oxidant effect of ascorbic acid after ingestion of simultaneous a single high dose of ascorbic acid and iron in male human healthy volunteers. The data also did not indicate a pro-oxidant effect of single high of ascorbic acid supplementation, alone or in the presence of iron, on lipid peroxidation.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

REFERENCES

- [1] Emerit J, Beaumont C, Trivin F. Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. *Biom. Pharm.* 2001; 55: 333-339.
- [2] Proteggente AR, England TG, Rice-Evans CA, Halliwell B. Iron supplementation and oxidative damage to DNA in healthy individuals with high plasma ascorbate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 288: 245 - 251.
- [3] Premkumar K, Bowlus CL. Ascorbic acid reduces the frequency of iron induced micronuclei in bone marrow cells of mice. *Mutation Research* 2003; 542: 99–103.
- [4] Premkumar K, Min K, Alkan Z, Hawkes WC, Ebeler S, Bolwus CL. The potentiating and protective effects of ascorbate on oxidative stress depend upon the concentration of dietary iron fed C3H mice. *J. Nutr. Biochem.* 2006 (*in press*).
- [5] Ellervik C, Mandrup-Poulsen T, Nordestgaard BG, Larsen LE, Appleyard M, Frandsen M, et al. Prevalence of hereditary haemochromatosis in late-onset type 1 diabetes mellitus: a retrospective study. *Lancet* 2001; 358: 1405- 1409.
- [6] Parkkila S, Niemela O, Savolainen ER, Koistinen P. HFE mutations do not account for transfusional iron overload in patients with acute myeloid leukemia. *Transfusion* 2001; 41: 828- 831.
- [7] Rasmussen M, Folsom AR, Catellier DJ, Tsai MY, Garg U, Eckfeldt JH A prospective study of coronary heart disease and the hemochromatosis gene (HFE) C282Y mutation: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Atherosclerosis* 2001; 154: 739-746.
- [8] Johnson RM, Goyette Jr G, Ravindranath Y, Ho YS. Hemoglobin autoxidation and regulation of endogenous H₂O₂ levels in erythrocytes. *Free Radical Biology and Medicine* 2005; 39: 1407-1417.
- [9] Sinha S, Saxena R. Effect of iron on lipid peroxidation, and enzymatic and non-enzymatic antioxidants and bacoside-A content in medicinal plant *Bacopa monnieri* L. *Chemosphere* 2006; 62: 1340–1350.
- [10] Livrea MA, Tesoriere L, Pintaudi AM, Calabrese A, Maggio A, Freisleben HJ et al. Oxidative stress and antioxidant status in β -thalassemia major: iron overload and depletion of lipid-soluble antioxidants. *Blood* 1996; 88: 3608–3614.
- [11] Young IS, Trouton TG, Torney JJ, McMaster D, Callender ME, Trimble ER. Antioxidant status and lipid peroxidation in hereditary haemochromatosis. *Free Radical Biol. Med.* 1994; 16: 393–397.
- [12] Halliwell B. Vitamin C: antioxidant or prooxidant in vivo? *Free Radical Res.* 1996; 25: 439–454.

- [13] Berger, TM, Polidori MC, Dabbagh A, Evans PJ, Halliwell B, Morrow JD, et al. Antioxidant Activity of Vitamin C in Iron-overloaded Human Plasma. *J Biol. Chem.* 1997; 272: 15656–15660.
- [14] Na N, Delanghe JR, Taes YEC, Torck M, Baeyens WRJ, Ouyang J. Serum vitamin C concentration is influenced by haptoglobin polymorphism and iron status in Chinese. *Clin. Chim. Acta*, 2006; 365: 319 – 324.
- [15] Johnston CS, Hale JC. Oxidation of ascorbic acid in stored orange juice is associated with reduced plasma vitamin C concentrations and elevated lipid peroxides. *J. Am. Diet. Assoc.* 2005; 105:106-109.
- [16] Premkumar K, Bowlus CL. Ascorbic Acid does not increase the oxidative stress induced by dietary iron in C3H mice. *J. Nutr.* 2003; 134: 435–438.
- [17] Fraga CG, Oteiza PI. Iron toxicity and antioxidant nutrients. *Toxicology* 2002; 180: 23 -32.
- [18] Hoppe M, Hulthén L, Hallberg L. The relative bioavailability in humans of elemental iron powders for use in food fortification. *Eur. J. Nutr.* 2006; 45: 37-44.
- [19] NRC (National Academic Press). Dietary Reference intakes: applications in dietary assessment. Washington DC, National Academic Press; 2001.
- [20] Nappi AJ, Vass E. Comparative studies of enhanced iron-mediated production of hydroxyl radical by glutathione, cysteine, ascorbic acid, and selected catechols. *Biochem. Biophys. Acta*, 1997; 1336: 295–301.
- [21] Fridovich I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Annals of the New York Academy of Sciences* 1999; 893: 13–18.
- [22] Freitas JM, Meneghini R. Iron and its sensitive balance in the cell. *Mutation Research*, 2001; 475: 153–159.
- [23] Jacques-Silva MC, Nogueira CW, Broch LC, Flores EMM, Rocha JBT Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. *Pharm. Toxicol.* 2001; 88: 119–125.
- [24] Ellman GL. Tissue sulphhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 1959; 82-70.
- [25] Ohkawa H, Ohishi H, Yagi K. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 1979; 95: 351–358.
- [26] Cao Z, Li Y. Potent induction of cellular antioxidants and phase 2 enzymes by resveratrol in cardiomyocytes: protection against oxidative and electrophilic injury. *Eur. J. Pharmacol.* 2004; 489: 39–48.
- [27] Berlin A, Schaller KH. European Standardized Method for the determination of *d*-aminolevulinic acid dehydratase activity in blood, *Z. Klin. Chem.* 1974; 389–390.

- [28] Pagalia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 1967; 70: 158-69.
- [29] Aebi H. Catalase in vitro, *Methods Enzymol.* 1984; 105: 121–127.
- [30] Boveris A, Cadenas E. Cellular source and steady-state levels of reactive oxygen species. In: Clerch L, Massaro D. *Oxygen, gene expression and cellular function.* Marcel Decker: New York. 1997; 105: 1-25.
- [31] Cook JD, Reddy MB. Effect of ascorbic acid intake on nonheme-iron absorption from a complete diet. *Am. J. Clin. Nutr.* 2001; 73: 93 – 98.
- [32] Paolini M , Pozzetti L, Pedulli GF, Marchesi E, Cantelli-Forti G. The nature of prooxidant activity of vitamin C. *Pharmacology Letters.* 1999; 64: 273-278.
- [33] Podmore ID, Griffith HR, Karl HE, Mistry N, Mistry P, Lunec J. Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. *Nature* 1998; 392: 559–560.
- [34] Rehman A, Collis CS, Yang M, Kelly M, Diplock AT, Halliwell B et al. The effects of iron and vitamin C co-supplementation on oxidative damage to DNA in healthy volunteers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998; 246: 293–298.
- [35] Lachili B, Hininger I, Faure H, Arnaud J, Richard MJ, Favier A, et al. Increased lipid peroxidation in pregnant women after iron and vitamin C supplementation. *Biol. Trace Elem. Res.* 2001; 83: 103 - 110.
- [36] Carr A and Frei B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions. *Faseb J.* 1999; 13: 1007- 1024.
- [37] Chen K, Suh J, Carr AC, Morrow JD, Zeind J Frei B. Vitamin C suppresses oxidative lipid damage *in vivo*, even in the presence of iron overload. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2000. 279: E1406-E1412.
- [38] Sánchez-Moreno C, Paniagua M, Madrid A, Martín A. Protective effect of vitamin C against the ethanol mediated toxic effects on human brain glial cells. *J. Nutr. Biochem.* 2003; 14: 606–613.
- [39] YANG M. et al. Do iron and vitamin C co-supplementation influence platelet function or LDL oxidizability in healthy volunteers? **Eur. J. Clin. Nutr.** 53, 36-374, 1999.
- [40] Mühlhöfer A, Mrosek S, Schlegel B, Trommer W, Rozario F, Böhles H et al. High-dose intravenous vitamin C is not associated with an increase of pro-oxidative biomarkers. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2004; 58: 1151 – 1158.
- [41] Proteggente AR, Rehman A, Halliwell B, Rice-Evans CA. Potential problems of ascorbate and iron supplementation: pro-oxidant effect in vivo? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000; 277: 535–540.

Legends for figures:

Figure 3. Plasma ascorbic acid after supplementation with ascorbic acid (2g), iron (150mg) or ascorbic acid plus iron. Data are expressed as means \pm S.E.M. * $p < 0.00001$ as compared between groups (Repeated measures/ ANOVA). # Denoted $p < 0.00001$ as compared before treatment group with 2 and 5 hours and $p < 0.01$ as compared before treatment group with 24 hours (one-way ANOVA/Duncan).

Figure 4. Plasma iron (A) and ferritin levels (B) after supplementation with ascorbic acid (2g), iron (150mg) or ascorbic acid plus iron. Data are expressed as means \pm S.E.M. (#) Denoted $p < 0.05$ as compared before treatment time point group (one-way ANOVA/Duncan).

Figure 5. Erythrocytes NPSH after supplementation with ascorbic acid (2g), iron (150mg) or ascorbic acid plus iron. Data are expressed as means \pm S.E.M.

Figure 6. Erythrocytes TBARS levels after supplementation with ascorbic acid (2g), iron (150mg) or ascorbic acid plus iron. Data are expressed as means \pm S.E.M. (#) Denoted $p < 0.05$ as compared before treatment time point group (Repeated measures/ ANOVA).

Figure 7. Oxidation of DCFH after supplementation with ascorbic acid (2g), iron (150mg) or ascorbic acid plus iron. Data are expressed as means \pm S.E.M.

Figure 8. δ -ALA-D activity after supplementation with ascorbic acid (2g), iron (150mg) or ascorbic acid plus iron, determined in the absence (A) or in the presence of DTT (B). Data are expressed as means \pm S.E.M.

Figure 9. Activity of GPX plasmatic after supplementation with ascorbic acid (2g), iron (150mg) or ascorbic acid plus iron. Data are expressed as means \pm S.E.M.

Figure 10. CAT activity after supplementation with ascorbic acid (2g), iron (150mg) or ascorbic acid plus iron. Data are expressed as means \pm S.E.M. # $p < 0.05$ as compared to before treatment group (Repeated measures/ ANOVA).

Figure11. SOD activity after supplementation with ascorbic acid (2g), iron (150mg) or ascorbic acid plus iron. Data are expressed as means \pm S.E.M.

Table 1: Characteristics of the subjects.

Table 1:

	Mean
Age (years)	24.3±3.9 (20.0-30.0)
WBC (Thsd/ cu mm)	6.1±1.3 (4.0 – 8.1)
RBC (Mill/ cu mm)	5.0±0.2 (4.63 – 5.22)
HGB (Grams/dl)	14.3±0.5 (13.5 – 14.9)
HCT (%)	45.7±1.6 (42.3 – 46.5)
MCV (Femtoliters)	91.8±2.5 (86.4 – 92.6)
MCH (Pico Grams)	28.9±1.0 (27.0 – 30.9)
MCHC (Grams/dL)	31.5±0.6 (31.2 – 34.6)
PLT (Thsd/ cu mm)	232.8± 42.2(132 – 319)

Results are expressed as mean ± S.E.M. WBC: white blood Cell; RBC: red blood cells; HGB: hemoglobin; HCT: hematocrit; MCV: mean corpuscular volume; MCH: mean corpuscular hemoglobin; MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration; PTL: platelets.

Figure 3:

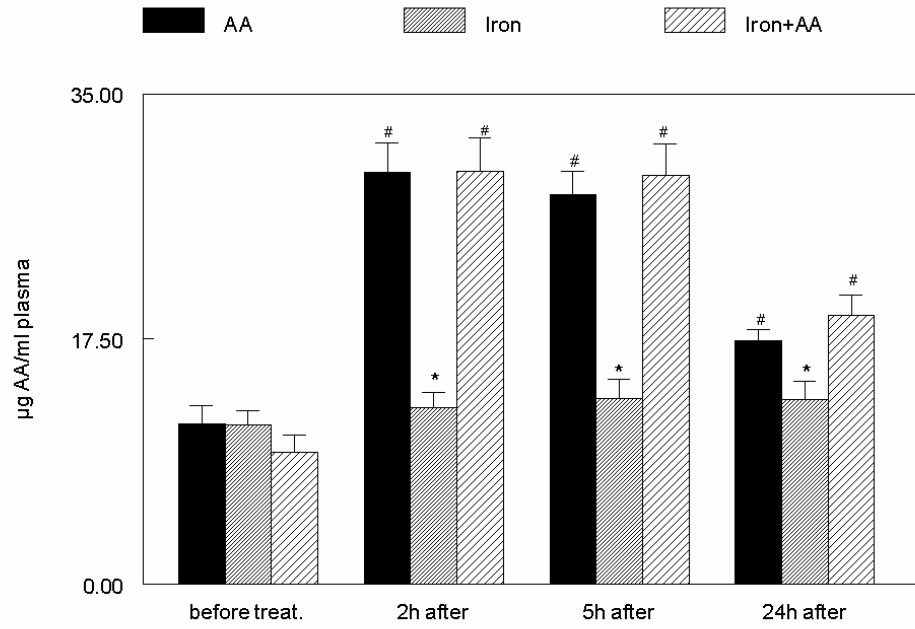


Figure 4:

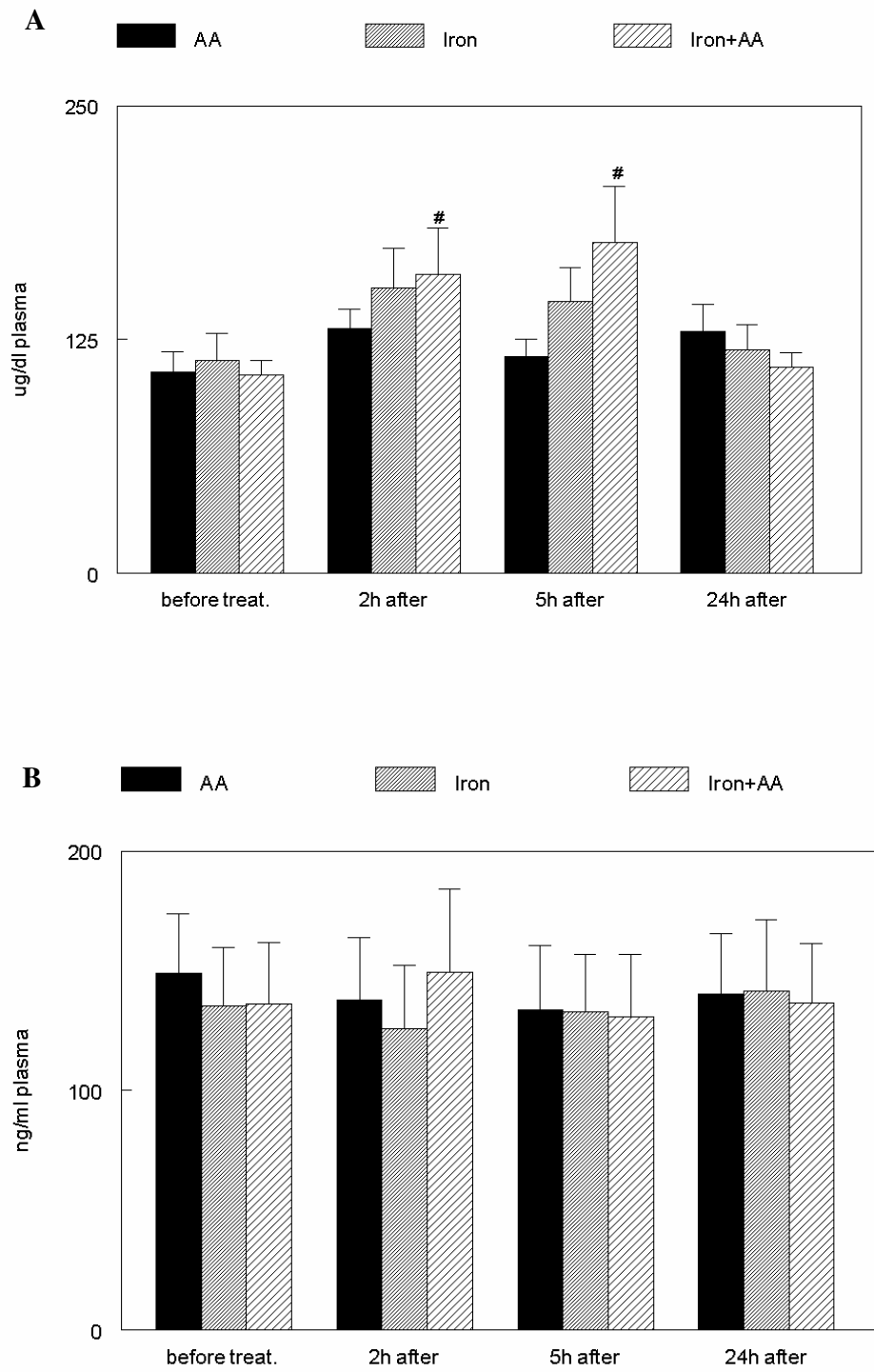


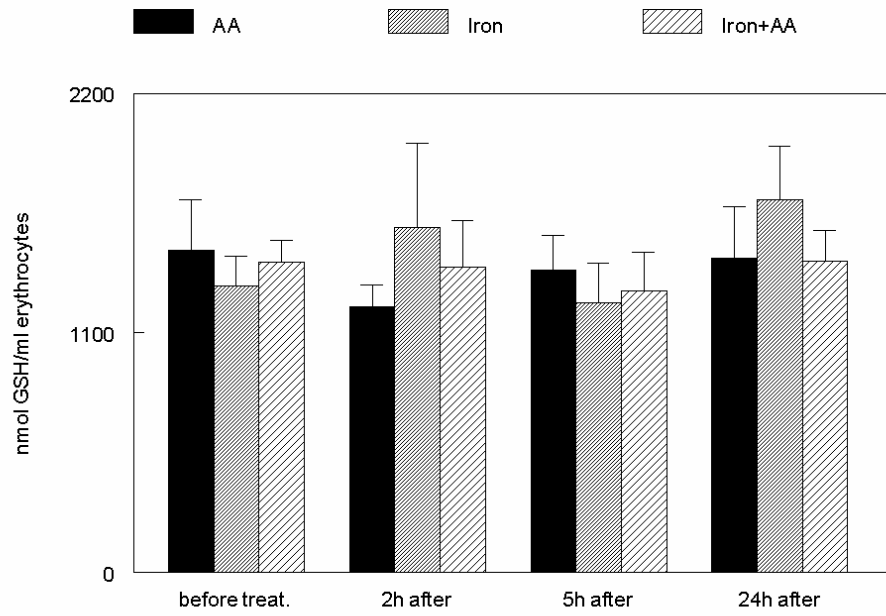
Figure 5:

Figure 6:

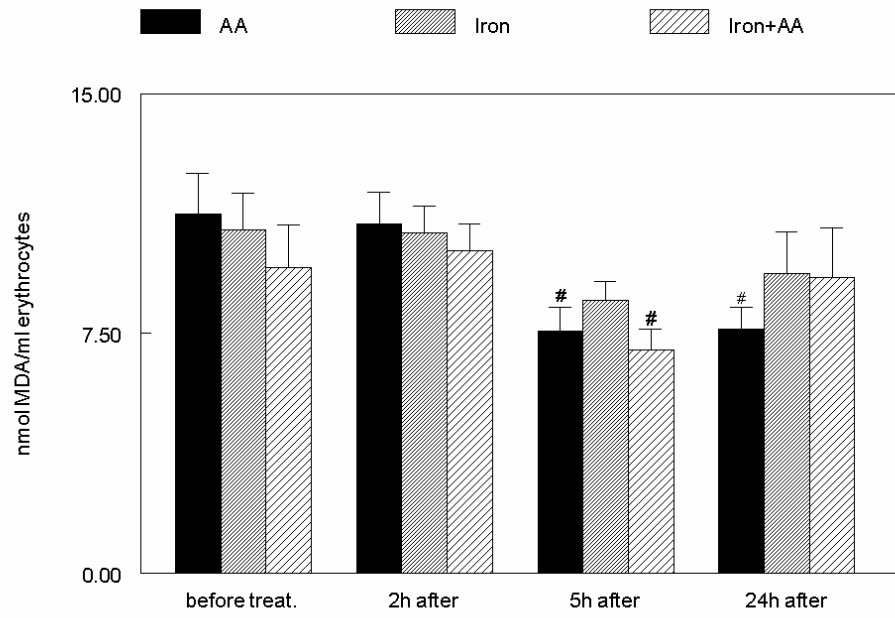


Figure 7:

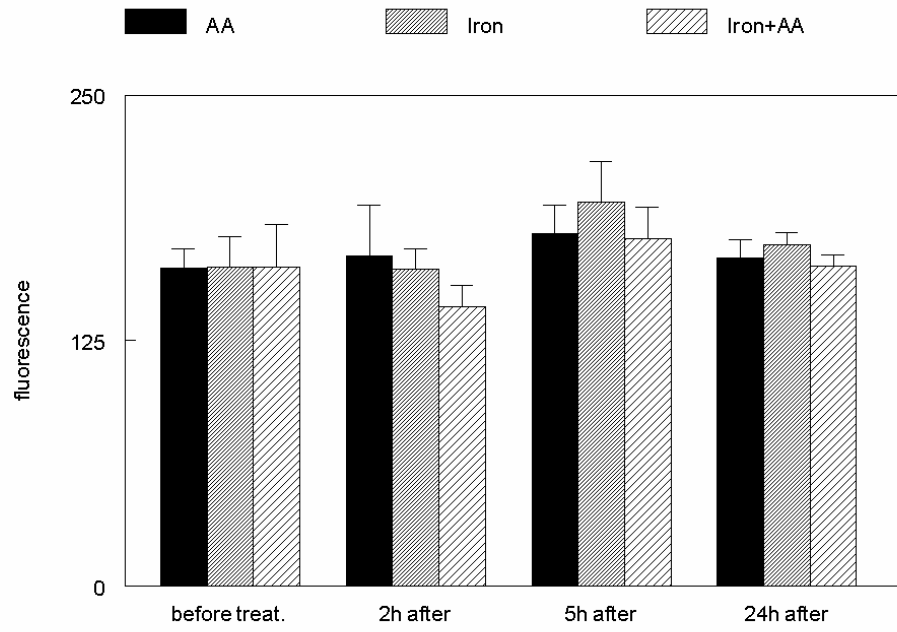


Figure 8:

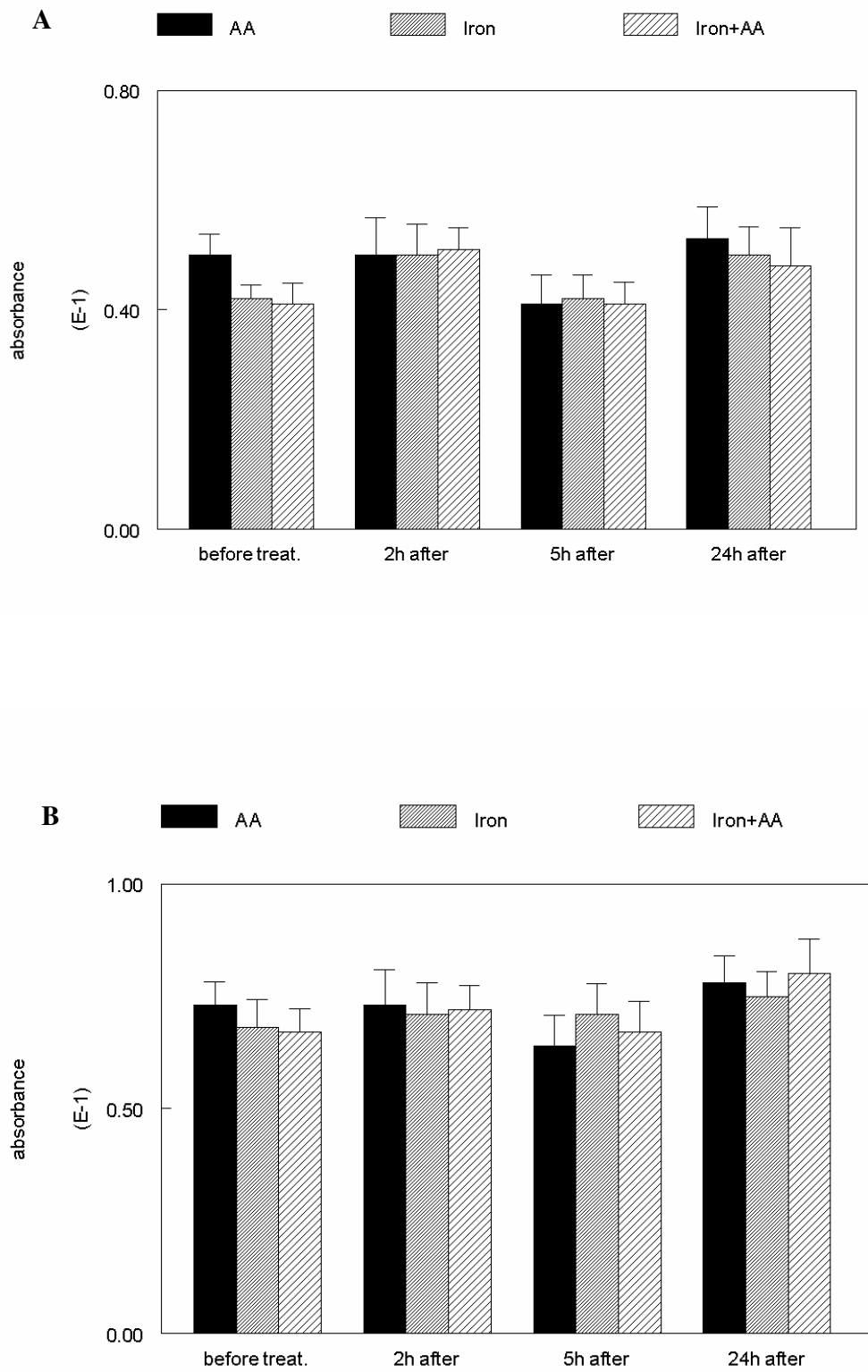


Figure 9:

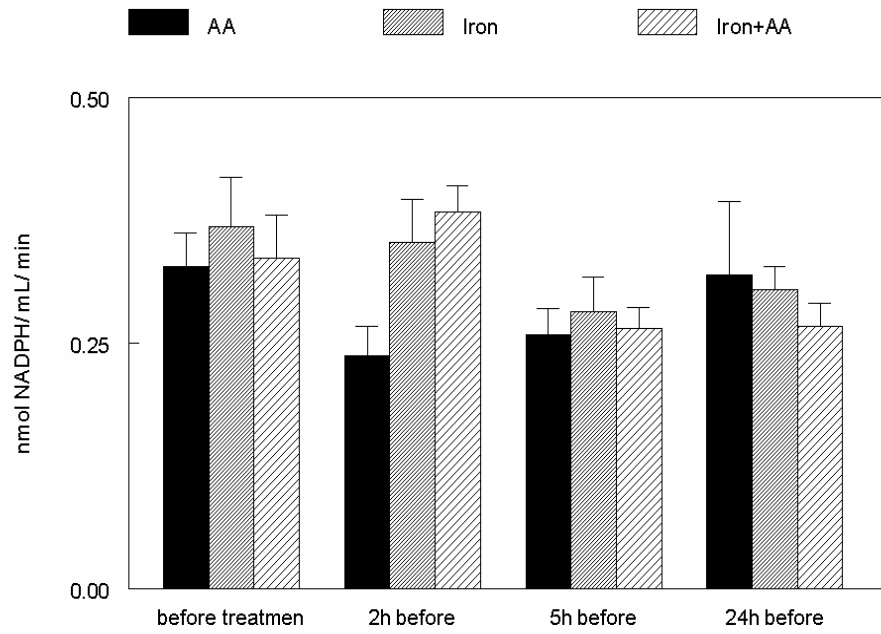


Figure 10:

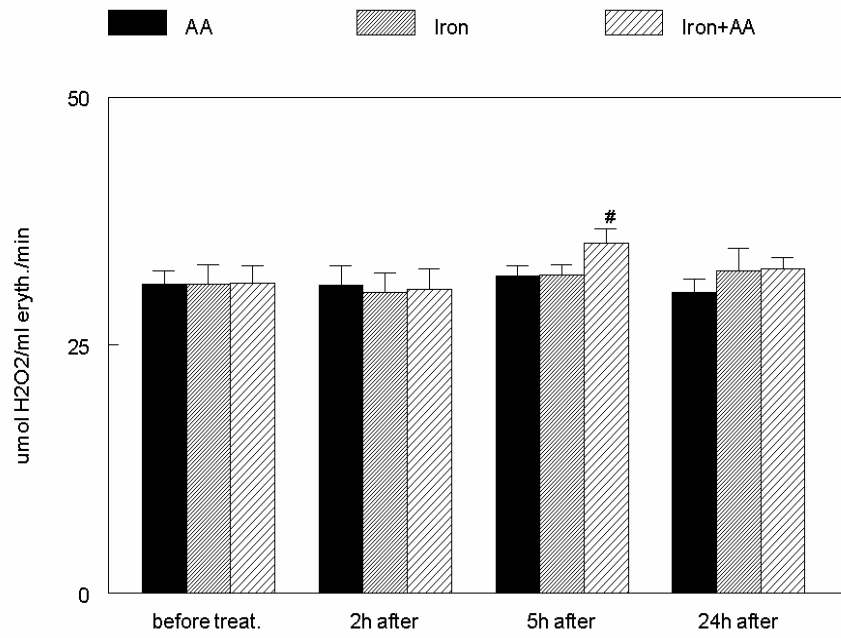
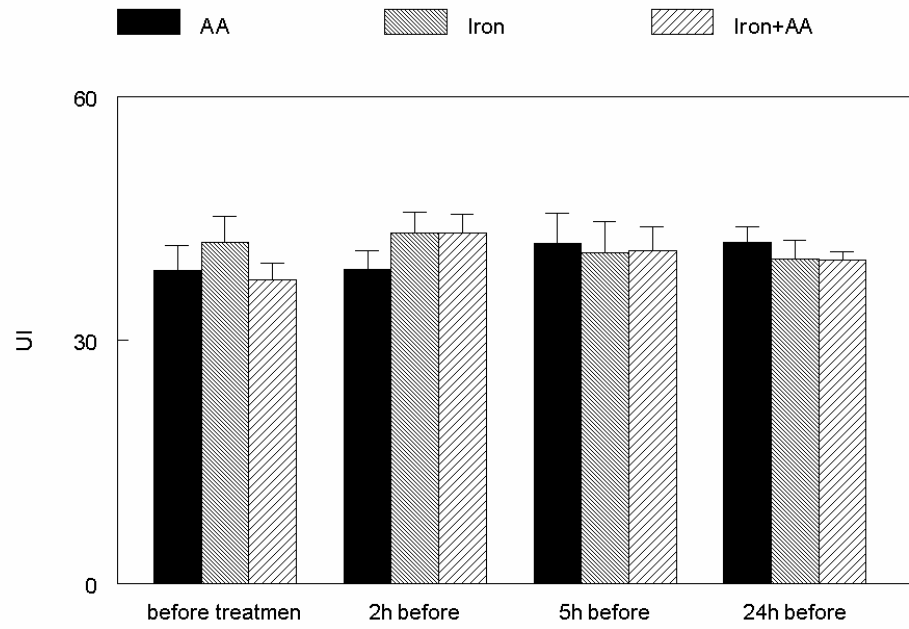


Figure 11:



4. DISCUSSÃO

Este estudo demonstra que o ácido ascórbico exibe atividade antioxidante, ao invés de pro-oxidante, *in vivo*, no sangue dos voluntários, na presença de sobrecarga de ferro. De fato, estudos *in vivo* demonstram que o ácido ascórbico melhora a absorção do ferro, aumentando seus níveis no organismo (Cook e Reddy, 2001, Hoppe et al., 2006). Isso demonstra que mesmo na presença de altas doses de vitamina C, o equilíbrio do ferro está rigorosamente regulado nas pessoas. No entanto, baixos níveis de vitamina C na dieta podem ser vantajosos nos casos de sobrecarga de ferro, como no tratamento de hemocromatose e alguns tipos de anemia como a β -talassemia, devido ao potencial do ferro de induzir dano aos tecidos (Young et al., 1994; Livrea et al., 1996). Além disso, indivíduos com sobrecarga de ferro geralmente possuem baixos níveis de vitamina C plasmática, devido à possibilidade de interação com altos níveis de ferro catalítico nesses indivíduos, e, além disso, a administração de vitamina C tem sido evidenciada ser prejudicial nessas pessoas (Frei et al., 1990; Herbert, 1994). A sobrecarga de ferro tem sido sugerida na aterosclerose, porém os dados ainda são conflitantes e inconsistentes, além do mais, indivíduos com sobrecarga de ferro não sofrem de aterosclerose prematura (Kiechl et al., 1997; Franco et al., 1998). Do mesmo modo, vários estudos com suplementação de ferro e vitamina C, ambos em modelos animais e humanos, indicam que a vitamina C possui uma redução maior que um aumento do dano oxidativo quando associado com o ferro (Winterbourn, 1981; Minetti et al., 1992; Collis et al., 1996; Berger et al., 1997; Collis et al., 1997; Rehman et al., 1998).

Contudo, dados na literatura sobre o potencial pró-oxidante do ácido ascórbico na presença de ferro são controversos. Estudos *in vitro* sustentam o papel pró-oxidante do ácido ascórbico na presença de ferro (Buettner e Jurkiewicz, 1996; Cai et al., 2001). Isto ocorre como consequência da participação do ácido ascórbico na redução do Fe^{+3} para Fe^{+2} , através da reação de Fenton, produzindo radicais hidroxila (OH^\bullet). Ao contrário de experimentos *in vitro*, estudos *in vivo* que apóiam o efeito pro-oxidante do ácido ascórbico são escassos.

Baseado no efeito pro-oxidante da interação entre o ferro e ácido ascórbico *in vivo*, um estudo demonstrou que a suplementação diária de 100mg de fumarato juntamente com 500mg de ácido ascórbico durante o terceiro trimestre de gestação causou um aumento de 20% na peroxidação lipídica plasmática (Lachilli et al., 2001). No estudo de Rehman e colaboradores (1998), indivíduos saudáveis não-fumantes foram suplementados com 14mg/dia de sulfato ferroso e 60 ou 260mg/dia de vitamina C. Os níveis de diferentes tipos de bases oxidadas foram mensurados nos glóbulos brancos do sangue. Um grupo de voluntários teve uma média

basal de vitamina C plasmática de $76 \pm 14 \mu\text{mol/l}$, que não sofreu alteração significativa após a suplementação. Apesar de alguns produtos das bases de DNA sofrerem uma elevação passageira após 6 semanas, os níveis destes produtos retornaram aos níveis basais após 12 semanas de suplementação. Os outros produtos de oxidação do DNA diminuíram significativamente como, por exemplo, a 8-oxoguanina, a 8-oxoadenina, a glicol timina e a 5-hidroxi-citosina aumentaram após 12 semanas de suplementação. No estudo de Podmore e colaboradores (1998) foi suplementado em 30 voluntários saudáveis 500mg de vitamina C diariamente por 6 semanas. A concentração plasmática de vitamina C foi elevada 60% após a suplementação. Os níveis basais das bases de DNA oxidadas (8-oxoguanina e 8-oxoadenina) foram medidos no sangue periférico em linfócitos e mostraram que a 8-oxoguanina e a 8-oxoadenina apresentaram 30 e 8 lesões por 10^5 bases não oxidadas, respectivamente. Após a suplementação com vitamina C, os níveis de 8-oxoguanina foram reduzidos significativamente em relação aos níveis basais, enquanto os níveis de 8-oxoadenina foram significativamente elevados. A 8-oxoguanina reduzida e 8-oxoadenina elevada retornaram aos níveis basais depois de um período sem vitamina C por 7 semanas. Além disso, em outro estudo foi observado uma tendência no aumento de algumas bases de DNA, incluindo diidrotimina, 5-OH metiluracil e fapiadenina, em camundongos alimentados com uma dieta contendo baixos níveis de ferro e ácido ascórbico (Fraga e Oteiza, 2002).

Por outro lado, vários estudos têm mostrado que a vitamina C endógena ou no plasma protege contra hidroperóxidos e a formação de F_2 -isoprostano que pode ser induzido por peroxinitrito (Thomas et al., 1998), tabaco (Cross et al., 1993; Frei et al., 1991) ou ainda atividade dos neutrófilos (Frei et al., 1988). Além disso, a vitamina C protegeu o LDL-colesterol contra a oxidação por metais de transição como o ferro (Frei et al., 1997). O que talvez seja surpreendente é o efeito da vitamina C sobre a peroxidação lipídica na presença de metais de transição com atividade de oxido-redução. Em um estudo a vitamina C endógena e exógena demonstrou inibir a formação de hidroperóxidos lipídicos em humanos com sobrecarga de ferro (Berger et al., 1997), ao invés de aumentar a oxidação, como poderia ser esperado pela reação de Fenton. Igualmente em outro estudo voluntários saudáveis foram suplementados com 14mg/dia de ferro e 60 ou 260mg/dia de AA por 12 semanas demonstrou uma pequena redução em lipoproteínas de baixa densidade oxidadas e efeitos benéficos sobre as plaquetas funcionais em *ex-vivo*, não observando evidências do efeito pró-oxidante da co-suplementação de ferro e AA (Yang et al., 1999). Do mesmo modo, um estudo mostrou que suplementando indivíduos com 12.5mg/dia de ferro por seis semanas não apresentou dano oxidativo ao DNA, mesmo na presença de altas concentrações de ácido ascórbico no plasma.

Todavia, a dose usada pode ter sido muito baixa ou o tempo de suplementação muito curto para produzir mudanças significantes no ferro sérico e conseqüentemente danos a base de DNA (Proteggente et al., 2001).

Do mesmo modo, em diversos estudos, tanto em modelos animal quanto em humanos, autores têm relatado que não existem evidências do aumento de ERO devido à suplementação de ferro e ácido ascórbico (Rehman et al., 1998; Carr e Frei, 1999; Chen et al., 2000; Proteggente et al., 2000; Proteggente et al., 2001; Fraga e Oteiza, 2002; Mühlhöfer et al., 2004). De acordo com isso, os resultados apresentados apóiam o efeito limitado antioxidante do ácido ascórbico após a ingestão simultânea de uma única dose elevada de ferro e AA em voluntários humanos saudáveis do sexo masculino. Isto foi observado neste estudo 5 horas após a ingestão de ambos os suplementos, onde uma pequena redução sanguínea dos níveis de TBARS e um pequeno aumento na atividade da catalase foram constatados. Além disso, a atividade das enzimas ALA-D, SOD e GPx, bem como os níveis de NPSH não foram alterados significativamente.

Os resultados apresentados no presente estudo demonstram que, o consumo de uma dose elevada de AA e ferro em pessoas saudáveis, não desencadeou o aumento de ERO *in vivo*, mesmo aumentando os níveis plasmáticos de ferro e vitamina C. De acordo com isso, o presente estudo sugere um efeito limitado antioxidante do ácido ascórbico após a ingestão simultânea de uma dose elevada de ferro e ácido ascórbico em humanos saudáveis do sexo masculino. Esses dados também não evidenciam o efeito pró-oxidante da suplementação com AA apenas, ou na presença de ferro, sobre a peroxidação lipídica.

5. CONCLUSÕES

Os resultados presentes neste estudo demonstraram que:

- A suplementação de ferro e ácido ascórbico não está relacionada a peroxidação lipídica;
- A interação do ferro com ácido ascórbico não induziu estresse oxidativo;
- O ferro associado ao ácido ascórbico não apresentou efeito pró-oxidante *in vivo*.

6. PERSPECTIVAS

Com base nos resultados apresentados neste trabalho, faz-se necessário:

- Verificar o comportamento do ferro associado ao ácido ascórbico em um tempo prolongado, *in vivo*, verificando se existe um possível aumento do estresse oxidativo com doses elevadas crônicas de ferro e ácido ascórbico;
- Determinar *in vitro*, o efeito da suplementação de altas doses de ferro associado ao ácido ascórbico.
- Investigar o efeito da vitamina C em outros metais, como o cobre, na participação da Reação de Fenton, observando seu papel pró-oxidante ou antioxidante;

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDROVA, M.L., BOCHEV, P. G. Oxidative stress during the chronic phase after stroke. **Free Radical Biology and Medicine**, 39, 297-316, 2005.

ARANHA, F.Q. et al. O papel da vitamina C sobre as alterações orgânicas no idoso. **Revista de Nutrição**, 13, 89-97, 2000.

BANDERA, E.V. et al. Diet and alcohol consumption and lung cancer risk in the New York State Cohort (United States). **Cancer Causes Control** 8, 828, 1997.

BANHEGYI, G. et al. Ascorbate metabolism and its regulation in animals. **Free Radical Biology and Medicine**, 23, 793-803, 1997.

BARBOSA, N.B.V. Effect of organic selenium on d-aminolevulinate dehydratase from liver, kidney, and brain of adults rats. **Toxicology and Applied Pharmacology** 149, 243-253, 1998.

BARNARD, G.F. et al. Mechanism of porphobilinogen synthase- possible role of essential thiol-groups. **Journal of Biological Chemistry** 252, 8965-8974, 1977.

BASU, T.K.; DONALDSON, D. Intestinal absorption in health and disease: micronutrients. **Best Practice and Research Clinical Gastroenterology**, 17, 957-979, 2003.

BECHARA, E.J.H. et al. A free radical hypothesis of Lead poisoning and inborn porphyries associated with 5-aminolevulinic acid overload. **Química Nova**. 16: 385-392, 1993.

BECKMAN, K.B.; AMES, B.N. The free radical theory of aging matures **Physiol. Rev.** 78, 547-581, 1998.

BERGER, T. M. et al. Antioxidant activity of vitamin C in iron-overloaded human plasma. **J. Biol. Chem.** 272, 15656-15660, 1997.

BERTONCINI, C.R.A.; MENEGHINI, R. DNA strand breaks produced by oxidative stress in mammalian cells exhibit 30-phosphoglycolate termini. **Nucl. Acids Res.** 23, 2995-3002, 1995.

BOCCIO, J.; MONTEIRO, J.B. Fortificação de alimentos com ferro y zinc: pros y contras desde un punto de vista alimenticio y nutricional. **Revista de Nutrição**, 17, 71-78, 2004.

BUETTNER, G. R.; JURKIEWICZ, B. A. Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. **Radiat. Res.** 145, 532–541, 1996.

CAI, L; KOROPATNICK, J; CHERIAN, M.G. Roles of vitamin C in radiation-induced DNA- damage in presence and absence of copper. **Chem. Biol. Interact.** 137, 75–88, 2001.

CARR, A.; FREI, B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions. **Faseb J.** 13, 1007- 1024, 1999.

CHEN, K. et al. Vitamin C suppresses oxidative lipid damage *in vivo*, even in the presence of iron overload. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** 279, E1406-E1412, 2000.

CHERUBINI, A. et al. Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radical Biology & Medicine*, 39, 841-852, 2005. COOK, J.D.; REDDY, M.B. Effect of ascorbic acid intake on nonheme-iron absorption from a complete diet. **Am. J. Clin. Nutr.** 73, 93 – 98, 2001.

COLLIS, C. S. et al. The effects of ascorbic acid and iron co-supplementation on the proliferation of 3T3 fibroblasts. **FreeRad. Res.** 25, 87–93, 1996.

COLLIS, C. S., et al. Effects of co-supplementation of iron with ascorbic acid on antioxidant-pro-oxidant balance in the guinea pig. **Free Rad. Res.** 27, 113–121, 1997.

COMSTOCK, G.W. The risk of developing lung cancer associated with antioxidants in the blood: ascorbic acid, carotenoids, alpha-tocopherol, selenium and total peroxy radical absorbing capacity. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.** 6, 907, 1997.

COOK, J.D., REDDY, M.B. Effect of ascorbic acid intake on nonheme-iron absorption from a complete diet. **Am. J. Clin. Nutr.** 73: 93 – 98, 2001.

CRAVO, M.F. **Respostas antioxidantes e dano oxidativo em diferentes regiões do corpo do poliqueto *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae).** Tese (Mestrado em Fisiologia Animal Comparada) – Fundação Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, 2006.

CROSS, C. et al. Cigarette smoke oxidation of human plasma constituents. **Ann. NY Acad. Sci.** 686, 72–89, 1993.

DE FREITAS, J.M. Yeast lacking Cu–Zn superoxide dismutase show altered iron homeostasis: role of oxidative stress in iron metabolism, **J. Biol. Chem.** 275, 11645–11649, 2000.

DE FREITAS, J.M.; MENEGHINI, R. Iron and its sensitive balance in the cell. **Mutation Research** 475, 153-159, 2001.

DUNFORD, H.B. Oxidations of iron (II)/(III) by hydrogen peroxide: from aquo to enzyme. **Coordination Chemistry Reviews** 233- 234, 311-318, 2002.

EMANUELLI, T. Effect of mercuric chloride intoxication and dimercaprol treatment on aminolevulinatase from brain, liver and kidney of adult mice. **Pharmacology e Toxicology** 79, 138–143, 1996.

EMERIT, J.; BEAUMONT, C.; TRIVIN, F. Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. **Biomedical Pharmacother**, 55, 333-339, 2001.

ESCOTT-STUMP, S.; MAHAN, K.L. **Krause**: alimentos, nutrição e dietoterapia. 10. ed. São Paulo: Roca. 2002.

FARINA, M. et al. Reaction of diphenyl diselenide with hydrogen peroxide and inhibition of daminolevulinatase from rat liver and cucumber leaves. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 35, 623–631, 2002.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 43, 35-43, 1997.

FLAGG, E.W., COATES, R.J., GREENBERG, R.S. Epidemiologic studies of antioxidants and cancer in humans. **J. Am. Coll. Nutr.** 14, 419, 1995.

FLORA, S.J.S. et al. Effects of zinc supplementation during chelating agent administration in cadmium intoxication in rats. **Journal of Applied Toxicology** 18, 357–362, 1998.

FLORA, S.J.S. et al. Meso 2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA) and monoysoamyl DMSA effect on gallium arsenide induced pathological liver injury in rats. **Toxicology Letters** 132, 9–17, 2002.

FOLMER, V.; SOARES, J.C.M.; ROCHA, J.B.T. Oxidative stress in mice is dependent on the free glucose content of the diet. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology** 34, 1279–1285, 2002.

FRAGA, C.G.; OTEIZA, P.I. Iron toxicity and antioxidant nutrients. **Toxicology**. 180, 23–32, 2002.

FRANCO, R. F., et al. Prevalence of hereditary haemochromatosis in premature atherosclerotic vascular disease. **Br. J. Haematol.** 102, 1172–1175, 1998.

FREI, B.; STOCKER, R.; AMES, B. N. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 85, 9748–9752, 1988.

FREI, B. et al. Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma. **Adv. Exp. Med. Biol.** 264, 155–163, 1990.

FREI, B., et al. Gas phase oxidants of cigarette smoke induce lipid peroxidation and changes in lipoprotein properties in human blood plasma: protective effects of ascorbic acid. **Biochem. J.** 277, 133–138, 1991.

FREI, B. Vitamin C as an antiatherogen: mechanisms of action. In: **Vitamin C in Health and Disease** (Packer, L., and Fuchs, J., ed) p. 163–182, Marcel Dekker, Inc., New York, 1997.

GABRIEL, D. et al. Human erythrocyte δ -aminolevulinic acid dehydratase inhibition by monosaccharides is not mediated by oxidation of enzyme sulfhydryl groups. **Cell Biology International** 29, 669–674, 2005.

GAETANI, G.F. et al. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. **Blood**, 73, 334–339, 1989.

GARCÍA-CASAL, M.N.; LEETS I.; LAYRISSE, M. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) does not increase iron uptake or ferritin synthesis by Caco-2 cells. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 15, 261–266, 2004.

GIBSON, K.D.; NEUREBERGER, A.; SCOTT, J.J. The purification and properties of delta-aminolevulinic acid dehydratase. **Biochemistry Journal** 61, 618–629, 1955.

GOERING, P.L. Lead protein interactions as a basis for lead toxicity. **Neurotoxicology**. 14, 45–60, 1993.

GOGVADZE, V.; WALTER, P.B.; AMES, B.N. The role of Fe²⁺ - induced lipid peroxidation in the initiation of the mitochondrial permeability transition. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 414, 255-260, 2003.

GRUNDY, M.A. et al. High-throughput non-heme iron assay for animal tissues. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, 59, 195-200, 2004.

GURZAU, E.S.; NEAGU, C.; GURZAU, A.E. Essential metal – case study on iron. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 56, 190-200, 2003.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Clarendon Press, 1985, 543 p.

HALLIWELL, B.; WASIL, M.; GROOTVELS, M. Biologically significant scavenging of the myeloperoxidase-derived oxidant hypochlorous acid by ascorbic acid. **FEBS Lett.** 213, 15, 1987.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Clarendon Press, 543, 1989.

HALLIWELL, B., How to characterize a biological antioxidant. **Free Rad. Res. Commun.** 9, 1, 1990.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in Enzymology**, 186, 1-5, 1990.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. Clarendon Press, Oxford, 1993.

HALLIWELL, B. Vitamin C: poison, prophylactic or panacea? **Trends Biochemical Science.** 24, 255-257, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford University Press, New York, USA, 1999.

HERBERT, V. The antioxidant supplement myth. **Am. J. Clin. Nutr.** 60, 157–158, 1994.

HIGSON, F.K.; KOHEN, R.; CHEVION, M. Iron enhancement of ascorbate toxicity. **Free Rad. Res. Commun.** 5, 107, 1988.

HOPPE, M.; HULTHÉN, L.; HALLBERG, L. The relative bioavailability in humans of elemental iron powders for use in food fortification. **Eur. J. Nutr.** 45, 37-44, 2006.

JANERO, D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biology and Medicine**, 9, 515-540, 1990.

JAFFE, E.K. et al. Characterization of the role of the stimulatory magnesium of *Escherichia coli* porphobilinogen synthase. **Biochemistry** 34, 244–251, 1995.

JOURD'HEUIL. et al. Effect of nitric oxide on hematoxylin-catalysed oxidative reactions. **Nitric Oxide.** 2, 37-42, 1998.

KASHYAP, M.K. et al. Different antioxidant status, total antioxidant power and free radical in essential hypertension. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 277, 89-99, 2005.

KIECHL, S. et al. Body iron stores and the risk of carotid atherosclerosis: prospective results from the Bruneck study. **Circulation** 96, 3300–3307, 1997.

LACHILI, B. et al. Increased lipid peroxidation in pregnant women after iron and vitamin C supplementation. **Biol. Trace Elem. Res.** 83, 103 – 110, 2001.

LARRAMENDY, M. et al. Iron-mediated induction of sister-chromatid exchanges by hydrogen peroxide and superoxide anion **Mutat. Res.** 178, 57–63, 1987.

LEE, S.H.; OE, T.; BLAIR, I.A. Vitamin C-induced decomposition of lipid hydroperoxides to endogenous genotoxins. **Science** 292, 208, 2001.

LLEDÍAS, F.; RANGEL, P.; HANSBERG, W. Oxidation of catalase by singlet oxygen. **Journal of Biological Chemistry.** 273, 10630-10637, 1998.

LIM, C. et al. Interaction between dietary levels of iron and vitamin C on growth, hematology, immune response and resistance of channel catfish *Ictalurus punctatus* to *Edwardsiella ictaluri* challenge. **Aquaculture**, 185, 313-327, 2000.

LIPPMAN, S.M.; LEE, J.J.; SABICHI, A.L. Cancer chemoprevention: progress and promise. **J. Natl. Cancer Inst.** 90, 1514, 1998.

LIVREA, M. A., et al. Oxidative stress and antioxidant status in b-thalassemia major: iron overload and depletion of lipidsoluble antioxidants. **Blood** 88, 3608–3614, 1996.

MANELA-AZULAY, M. et al. Vitamina C. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, 78, 265-274, 2003.

MARTÍNEZ, B.; RINCÓN, F.; IBÁÑEZ, M.V. Effects of ascorbic acid and ferrous sulfate on trace element extractability by dialyzation of weaning foods. **Food Chemistry**, 86, 369-376, 2003.

MARTINI, F.C.C. **Comparação entre a disponibilidade de ferro na presença de vitamina e beta-caroteno em alimentos e medicamentos**. 2002. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos). Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 2002. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br>>. Acesso em: 17 nov. 2006.

MARTINS, E.A.L.; ROBALINHO, R.L.; MENEGHINI R. Oxidative stress induces activation of a cytosolic protein responsible for control of iron uptake. **Arch. Biochem. Biophys.** 316, 128–134, 1995.

McARDLE, F. et al. UVR-induced oxidative stress in human skin *in vivo*: effects of oral vitamin C supplementation. **Free Radical Biology and Medicine**, 33, 1355-1362, 2002.

McCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). **J.Biol.Chem.**, 244, 6049-6055, 1969.

McKENZIE, R.C.; REFFETY, T.S.; BECKETT, G.J. Selenium: an essential element for immune function. **Immunology Today**. 19, 324-345, 1998.

MELLO-FILHO, A.C.; MENEGHINI, R. Iron is the intracellular metal involved in the production of DNA damage by oxygen radicals **Mutat. Res.** 251, 109–113, 1991.

MELLO-FILHO, A.C.; HOFFMANN M.E.; MENEGHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron, **Biochem. J.** 15, 273–275, 1984.

MENEGHINI, R. Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage, **Free Rad. Biol. Med.** 23, 783–792, 1997.

MEREDITH, P.A.; MOORE, M.R.; GOLDBERG, A. Erythrocyte ALA dehydratase activity and blood protoporphyrin concentrations as indices of lead exposure and altered haem biosynthesis. **Clinical Science Molecular Medicine.** 56, 61-69, 1979.

MILLER, D.M.; AUST, S.D. Studies of ascorbate-dependent, iron-catalyzed lipid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 271, 113-119, 1989.

MILLER, D.M.; BUETTNER, G.R.; AUST, S.D. Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions. **Free Rad. Biol. Med.**, 8, 95-108, 1990.

MINETTI, M. et al. Iron-induced ascorbate oxidation in plasma as monitored by ascorbate free radical formation: no spin-trapping evidence for the hydroxyl radical in iron-overload plasma. **Biochem. J.** 282, 459–465, 1992.

MINOTTI, G.; AUST, S.D. The requirement for iron (III) in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide. **Journal of Biological Chemistry**, 262, 1098 – 1104, 1987.

MONTEIRO, H.P. et al. Free radical generation during δ -aminolevulinic acid autoxidation: induction by hemoglobin and connections with porphyriopathies. **Archives of Biochemistry and Biophysics.** 271: 206-216, 1989.

MÜHLHÖFER, A.; MROSEK, S.; SCHLEGEL, B. High-dose intravenous vitamin C is not associated with an increase of pro-oxidative biomarkers. **European Journal of Clinical Nutrition**, 58, 1151-1158, 2004.

NAMIKI, M. Antioxidants/ antimutagens in food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition.** 29, 273-300, 1990.

NOGUEIRA, C.W. 2,3-Dimercaptopropane-1-sulfonic acid and meso 2,3-dimercaptosuccinic acid increase mercury- and cadmium-induced inhibition of δ -aminolevulinic acid dehydratase. **Toxicology**, 184, 85–95, 2003a.

NOGUEIRA, C.W. et al. Organochalcogens effects on aminolevulinic acid dehydratase activity from human erythrocytic cells in vitro. **Toxicology** 191, 169–178, 2003b.

OCKÉ, M.C. et al. Repeated measurements of vegetables, fruits, β -carotene and vitamins C and E in relation to lung cancer. **Am. J. Epidemiol.** 145, 358, 1997.

OTEIZA, P.I. et al. 5-Aminolevulinic acid induces iron release from ferritin. **Archives of Biochemistry and Biophysics.** 316, 607-611, 1994.

OZGOVÁ, S.; HERMÁNEK, J.; GUT, I. Different antioxidant effects of polyphenols on lipid peroxidation and hydroxyl radicals in the NADPH-, Fe-ascorbate- and Fe-microsomal systems. **Biochemical Pharmacology**, 66, 1127-1137, 2003.

PANDE, M.; FLORA, S.J.S. Lead induced oxidative damage and its response to combined administration of α -lipoic acid and succimers in rats. **Toxicology** 177, 187–196, 2002.

PANDE, M. et al. Combined administration of a chelating agent and an antioxidant in the prevention and treatment of acute lead intoxication in rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology** 9, 173–184, 2001.

PANTOPOULOS, K.; HENTZE, M.W. Rapid responses to oxidative stress mediated by iron regulatory protein **EMBO J.** 14, 2917–2924, 1995.

PODMORE, I.D. et al. Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. **Nature** 392, 559–560, 1998.

PREMKUMAR, K.; BOWLUS, C.L. Ascorbic Acid reduces the frequency of iron induced micronuclei in bone marrow cells of mice. **Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 542, 99-103, 2003.

PREMKUMAR, K. et al. The potentiating and protective effects of ascorbate on oxidative stress depend upon the concentration of dietary iron fed C3H mice. **J. Nutr. Biochem.** 2006 (*in press*).

PROTEGGENTE, A.R. et al. Potential problems of ascorbate and iron supplementation: pro-oxidant effect in vivo? **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 277, 535–540, 2000.

PROTEGGENTE, A.R. et al. Iron supplementation and oxidative damage to DNA in healthy individuals with high plasma ascorbate. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 288, 245 – 251 2001.

QUEIROZ, S.S.; TORRES, M.A.A. Anemia ferropriva na infância. **Jornal de Pediatria**, São Paulo, 76, 298-304. 2000.

REHMAN A. et al. The effects of iron and vitamin C co-supplementation on oxidative damage to DNA in healthy volunteers. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 246, 293–298, 1998.

REN, J. et al. Study of the catalytic electro-oxidation of ascorbic acid on an electrode modified by macrocyclic compounds of Fe(III), Mn(III), Ni(II), and Co(II) with TBP. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 504, 59-63, 2001.

RENZ, S.V. **Oxidação e antioxidantes**. Seminário (Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias). Universidade Federal de Porto Alegre (UFRGS), Porto Alegre, 2003. Disponível em: <<http://www.5.ufrgs.br/bioquimica/posgrad>>. Acesso em: 05 out 2006.

RIETJENS, I.M.C.M. et al. The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. **Environmental Toxicology and Pharmacology** 11, 321–333, 2002.

ROCHA, J.B.T. et al. Effects of methylmercury exposure during the second stage of rapid postnatal brain growth on negative geotaxis and on delta-aminolevulinic acid dehydratase of suckling rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 26, 1077–1083, 1993.

ROCHA, J.B.T. Effect of treatment with mercury chloride and lead acetate during the second stage of rapid postnatal brain growth on delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in brain, liver kidney and blood of suckling rats. **Toxicology** 100, 27–37, 1995.

RODRIGUES, A.L.; BELLINASSO, M.L.; Dick, T. Effect of some metal ions on blood and liver delta-aminolevulinic acid dehydratase of *Pimelodus-Maculatus* (Pisces, Pimelodidae). **Comparative Biochemistry and Physiology** 94, 65–69, 1989.

RODRIGUES, A.L.S. et al. Delta aminolevulinic acid dehydratase activity in weanling and adult rats exposed to lead acetate. **Environmental Contamination and Toxicology** 57, 47–53, 1996.

ROLFS, A.; HEDIGER, M.A. Metal ion transporters in mammals: structure, function and pathological implications, **J. Physiol.** 518, 1–12, 1999.

SAKAGAMI, H.; SATOH, K. Modulating factors of radical intensity and cytotoxic action of ascorbate. **Anticancer Res.** 17, 3513, 1997.

SAKAGAMI, H. et al. Apoptosis- inducing activity of vitamin C and vitamin K. **Cell. Mol. Biol.** 46, 129, 2000.

SAMUNI, A. et al. On the cytotoxicity of vitamin C and metal ions. **Eur. J. Biochem.** 137, 119, 1983.

SANTOS, F.W. et al. Cadmium induced testicular damage and its response to administration of succimer and diphenyl diselenide in mice. **Toxicology Letters** 152, 255–263, 2004.

SASSA, S. Delta-aminovulnic acid dehydratase assay. **Enzyme.** 28: 133-145, 1982.

SAYRE, L.M. PERRY, G.; SMITH, M.A. Redox metals and neurodegenerative disease **Curr. Opin. Chem. Biol.** 3, 220–305, 1999.

SOARES, J.C.M.; Folmer, V.; Rocha, J.B.T. Influence of dietary selenium supplementation and exercise on thiol-containing enzymes in mice. **Nutrition** 19, 627–632, 2003.

STÄHELIN, H.B. Plasma antioxidant vitamins and subsequent cancer mortality in the 12-year follow-up of the prospective Basel study. **Am. J. Epidemiol.** 133, 766, 1991.

TANDON, S.K. et al. Reversal of lead-induced oxidative stress by chelating agent, antioxidant, or their combination in the rat. **Environmental Research** 90, 61–66, 2002.

THEMELIS, D.G.; TZANAVARAS, P.D.; KIKI F.S. On-line dilution flow injection manifold for the selective spectrophotometric determination of ascorbic acid based on the Fe(II)-2,2'-dipyridyl-2-pyridylhydrazone complex formation, **Talanta**, 55, 127–134, 2001.

THOMAS, S. R.; DAVIES, M. J.; STOCKER, R. Oxidation and antioxidation of human low-density lipoprotein and plasma exposed to 3-morpholinopyridone and reagent peroxynitrite. **Chem. Res. Toxicol.** 11, 484–494, 1998.

TOYOKUNI, S. Iron-induced carcinogenesis: the role of redox regulation, **Free Rad. Biol. Med.** 20, 553–566, 1996.

WERNIS, S.W.; LUCHESE, B.R. Free radicals and ischemic tissue injury. **Trends in Pharmacological Sciences.** 11, 161-166, 1990.

WIEACKER, P. et al. Assignment of the gene coding for human catalase to the short arm of chromosome 11. **Ann. Genet.**, 23, 73-77, 1980.

WINTERBOURN, C. C. Hydroxyl radical production in body fluids: roles of metal ions, ascorbate and superoxide. **Biochem. J.** 198, 125–131, 1981.

WISEMAN, H.; HALLIWELL, B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer **Biochem. J.** 313, 17–29, 1996.

YANG M. et al. Do iron and vitamin C co-supplementation influence platelet function or LDL oxidizability in healthy volunteers? **Eur. J. Clin. Nutr.** 53, 36-374, 1999.

YOUNG, I. S. et al. Antioxidant status and lipid peroxidation in hereditary haemochromatosis. **Free Rad. Biol. Med.** 16, 393–397, 1994.

YONG, L.-C. Intake of vitamins E, C and A and risk of lung cancer. The NHANES I epidemiologic followup study. **Am. J. Epidemiol.** 146, 231, 1997.