

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Lisiane Conte

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE CAROTENOIDES DO URUCUM SOBRE A
RESISTÊNCIA DA LDL-COLESTEROL À OXIDAÇÃO E O STATUS OXIDATIVO
EM INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS**

Santa Maria, RS
2018

Lisiane Conte

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE CAROTENOIDES DO URUCUM SOBRE A
RESISTÊNCIA DA LDL-COLESTEROL À OXIDAÇÃO E O STATUS OXIDATIVO
EM INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS**

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

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Tatiana Emanuelli
Coorientadora: Dr^ª Sabrina Somacal

Santa Maria, RS
2018

Conte, Lisiane

Efeito da suplementação de carotenoides do urucum sobre a resistência da LDL-colesterol à oxidação e o status oxidativo em indivíduos saudáveis / Lisiane Conte. 2018.

85 p.; 30 cm

Orientadora: Tatiana Emanuelli

Coorientadora: Sabrina Somacal

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmacologia, RS, 2018

1. Aterosclerose 2. Oxidação da LDL 3. Metabólitos do óxido nítrico 4. Carotenoide 5. Urucum I. Emanuelli, Tatiana II. Somacal, Sabrina III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

©2018

Todos os direitos autorais reservados a Lisiane Conte. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: contelisi@gmail.com

Lisiane Conte

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE CAROTENOIDES DO URUCUM
SOBRE A RESISTÊNCIA DA LDL-COLESTEROL À OXIDAÇÃO E O
STATUS OXIDATIVO EM INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS**

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

Aprovado em 06 de Dezembro de 2018:

Tatiana Emanuelli, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Sabrina Somacal, Dra. (UFSM)
(Coorientadora)

Guilherme Vargas Bochi, Dr. (UFSM)

Greicy Michelle Marafiga Conterato, Dra. (UFSC)

Santa Maria, RS
2018

Dedico este trabalho à minha mãe Beatriz, pelo seu amor, paciência, carinho e apoio incondicional. Por ser um exemplo de mãe e mulher, e por sempre me incentivar a buscar o conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, aos meus pais Beatriz e Heriberto, por me darem a vida e por terem me presenteado com meu irmão Leonardo, que trouxe luz e alegria para os meus dias.

Aos meus familiares e amigos, obrigada pelo apoio nos momentos difíceis e por compreender as minhas ausências durante esses últimos anos.

Ao meu namorado Rodrigo, pelo seu amor, paciência, compreensão, companheirismo, ajuda e por me consolar quando tudo parecia dar errado.

À minha orientadora, Tatiana Emanuelli pela oportunidade de realizar meus estudos da graduação e da pós-graduação; pelos conhecimentos que pude adquirir durante esses anos sob sua orientação, pela paciência, profissionalismo, apoio e compreensão.

À Andréia, Sabrina e Miguel, pelos ensinamentos compartilhados desde o início dessa trajetória.

Aos colegas Cristine, Sabrina Marafiga, Sabrina Somacal, Miguel, Silvino, Renata, Jessica e Dani, pela sua imensa ajuda, sem vocês a realização desse trabalho não seria possível.

Também aos amigos que fiz durante esses anos de NIDAL: Dari, Cassi, Aline, Lauren, Roberson, Grasi, Carol, Luana, Natália, Julia, Gustavo, Rodrigo, muito obrigada pelo seu companheirismo, compreensão e alegria.

Aos professores Carlos Fernando de Mello e Felix Antunes Soares, por disponibilizarem as leitoras de microplacas presentes em seus laboratórios para as análises realizadas neste trabalho.

Aos professores Greicy Michelle Marafiga Conterato, Guilherme Vargas Bochi e Paula Augusti por aceitarem avaliar este trabalho.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, pela oportunidade de realizar minha pós-graduação em uma universidade pública e de qualidade.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida.

E a todos aqueles que não mencionei aqui, mas que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE CAROTENOIDES DO URUCUM SOBRE A RESISTÊNCIA DA LDL-COLESTEROL À OXIDAÇÃO E O STATUS OXIDATIVO EM INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS

AUTORA: Lisiane Conte
ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Tatiana Emanuelli
COORIENTADORA: Dr^a. Sabrina Somacal

As doenças cardiovasculares são um grupo de doenças variadas, que incluem doenças de natureza obstrutiva, como a doença arterial coronariana e o acidente vascular cerebral, que constituem as principais causas de morte no mundo. A ocorrência desses eventos obstrutivos é consequência de um processo conhecido como aterosclerose, que caracteriza-se pelo acúmulo de material lipídico e fibroso na parede arterial de vasos de grande e médio calibre. O desenvolvimento da aterosclerose envolve diversos processos, dentre eles o acúmulo vascular de lipídios, a disfunção endotelial, a inflamação e, especialmente, o estresse oxidativo, que é responsável pela oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL). Dessa forma, pesquisadores têm buscado alternativas para evitar o desenvolvimento e a progressão da aterosclerose, como o consumo de alimentos ricos em compostos antioxidantes. Estudos epidemiológicos mostram que maiores níveis séricos de alguns carotenoides, como o licopeno, estão relacionados a um menor risco de sofrer um evento cardiovascular. Apesar disso, alguns estudos têm questionado os benefícios associados à suplementação com o licopeno. Sendo assim, outros carotenoides têm sido foco de pesquisas nos últimos anos. Dentre eles, os carotenoides presentes nas sementes do urucum (*Bixa orellana*), bixina e norbixina, cujo potencial antioxidante e antiaterogênico já foi demonstrado por estudos *in vitro* e em modelos animais. No entanto, não há relatos na literatura sobre os efeitos do seu consumo à curto e longo prazo por humanos. Logo, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do consumo de bixina, norbixina e licopeno durante 7 dias sobre biomarcadores bioquímicos e de estresse oxidativo, além da susceptibilidade da LDL à oxidação induzida por cobre em indivíduos saudáveis. Para tal, foi realizado um ensaio clínico randomizado, duplo cego, controlado por placebo e com delineamento cruzado com retorno. Participaram do estudo 16 voluntários saudáveis (8 homens e 8 mulheres), que receberam por via oral cada um dos quatro tratamentos propostos (bixina, norbixina, licopeno ou placebo) na dose de 0,05 mg/kg de peso corporal. Os marcadores bioquímicos e de estresse oxidativo avaliados, não foram afetados por nenhum dos tratamentos analisados. No entanto, em comparação ao placebo, a suplementação com bixina reduziu a taxa de oxidação da fração lipídica da LDL e os níveis séricos dos metabolitos do óxido nítrico (NOx). Além disso, houve uma correlação positiva entre os níveis de NOx e a suscetibilidade da LDL a oxidação *ex-vivo*, sugerindo que a redução dos níveis de NOx parece ser o mecanismo responsável pela ação protetora da bixina. Estes resultados sugerem que a bixina possui uma ação biológica que pode auxiliar na prevenção da aterosclerose.

Palavras-chave: Aterosclerose. Oxidação da LDL. NOx. Carotenoide. Urucum.

ABSTRACT

EFFECT OF ANNATTO CAROTENOIDS SUPPLEMENTATION ON LDL-CHOLESTEROL RESISTANCE TO OXIDATION AND OXIDATIVE STATUS IN HEALTHY SUBJECTS

AUTHOR: Lisiane Conte
ADVISOR: Prof^a. Dr^a. Tatiana Emanuelli
CO-ADVISOR: Dr^a. Sabrina Somacal

Cardiovascular diseases are a group of varied diseases, including obstructive diseases, such coronary artery disease and stroke, which are the leading causes of death in the world. These obstructive events are consequence of a process, known as atherosclerosis, characterized by the accumulation of fibrous and lipid material in the arterial wall of large and medium-sized vessels. Atherosclerosis development involves several processes, among them lipids accumulation, endothelial dysfunction, inflammation and, especially, oxidative stress, which is responsible of low-density lipoprotein (LDL) oxidation. Thus, researchers have found alternatives to prevent atherosclerosis development and progression, such the consumption of antioxidant-rich food. Epidemiological studies have shown that higher serum levels of some carotenoids, such lycopene, are related to a lower cardiovascular risk. Despite this, some studies have questioned lycopene supplementation benefits. Therefore, researches have highlighted other carotenoids in the last few years. Among them, the carotenoids present in annatto seeds (*Bixa orellana*), bixin and norbixin, whose antioxidant and antiatherogenic potential has already been demonstrated by in vitro and animal studies. However, there are no reports in literature about its short and long-term consumption effects in humans. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effects of bixin, norbixin and lycopene consumption for 7 days on biochemical and oxidative stress biomarkers, as well as the susceptibility of LDL to copper-induced oxidation in healthy individuals. A randomized, double blind, placebo-controlled, cross-over study were made with 16 healthy volunteers (8 men and 8 women), who received each one of the four treatments (bixin, norbixin, lycopene or placebo), at dose of 0.05 mg / kg body weight orally. The biochemical and oxidative stress parameters analysed were not affected by any treatment. However, in comparison to placebo, bixin supplementation reduced the oxidation rate of the lipid moiety of LDL and serum levels of nitric oxide metabolites (NO_x). Besides, the positive correlation found between NO_x levels and the susceptibility of LDL to ex-vivo oxidation, suggesting that the reduction of NO_x levels could be the mechanism responsible for the protective action of bixin. These results suggest that bixin has a biological action that may help in atherosclerosis prevention.

Keywords: Atherosclerosis. LDL oxidation. NO_x. Carotenoid. Annatto.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

Figura 1: Reação de formação do •NO pelas isoformas da NOS.....	19
Figura 2: Processo de formação das células espumosas.....	22
Figura 3: Ruptura da lesão aterosclerótica e formação do trombo.....	24
Figura 4: Reações de remoção de EROs pelas enzimas antioxidantes.....	26
Figura 5: Frutos e sementes do urucuzeiro (<i>Bixa orellana</i>).	32
Figura 6: Estrutura química dos carotenoides do urucum bixina e norbixina.	33

MANUSCRITO

Figure 1: Consort flow diagram of recruitment, allocation, randomization and retention of volunteers.	66
Figure 2: Representative figure of treatment sequence followed by volunteers	67
Figure 3: Effect of carotenoid supplementation on the susceptibility of LDL to Cu ²⁺ -induced oxidation <i>ex-vivo</i>	68
Figure 4: Effect of carotenoid supplementation on plasma protein (a) and lipid (b) oxidation, serum NOx levels (c), plasma antioxidant capacity (d) and red blood cells GSH/GSSG ratio (e)	69
Figure 5: Effect of carotenoid supplementation on superoxide dismutase (a), catalase (b), glutathione peroxidase (c) and glutathione reductase (d) activities in red blood cells	70
Figure 6: Relationship between serum NOx levels and the oxidation rate of the lipid moiety of LDL particles <i>ex vivo</i>	71

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1: Estudos avaliando o efeito do consumo de licopeno ou alimentos à base de tomate, sobre fatores de risco cardiovascular. 31

DESENVOLVIMENTO

Tabela 2: Metodologias e parâmetros utilizados para determinação espectrofotométrica de bixina, norbixina e licopeno nas formulações estudadas... 37

MANUSCRITO

Table 1: Baseline characteristics of 16 volunteers enrolled in the randomised controlled clinical trial..... 64

Table 2: Serum biochemical parameters before (Day 0) and after (Day 7) oral supplementation of carotenoids. 65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- NO - Óxido nítrico
- OH – Radical hidroxil
- 4-HNE – 4-hidroxinonenal
- ANOVA – Análise de variância
- AOPP – Produtos de oxidação proteica avançada
- ApoB100 – Apolipoproteína B100
- AVC – Acidente vascular cerebral
- BH₄ – (6R-) 5,6,7,8-tetra-hidrobiopterina
- Ca²⁺ – Cálcio divalente
- CAT – Catalase
- CC – Circunferência da cintura
- DAC – Doença arterial coronariana
- DCV – Doença cardiovascular
- e-NOS – Óxido nítrico sintase endotelial
- EO – Estresse oxidativo
- ERNs – Espécies reativas de nitrogênio
- EROs – Espécies reativas de oxigênio
- ERs – Espécies reativas
- FAD – Dinucleotídeo de flavina e adenina
- FMN – Mononucleotídeo de flavina
- HMG-CoA redutase – 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase
- GPx – Glutaciona peroxidase
- GR – Glutaciona redutase
- GSH – Glutaciona reduzida
- GSSG – Glutaciona oxidada
- H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
- HCl – Ácido clorídrico
- HDL – Lipoproteína de alta densidade
- HNO₂ – Ácido nitroso

HOCl – Ácido hipocloroso
ICAM-1 – Molécula de adesão intercelular-1
i-NOS – Óxido nítrico sintase induzível
LDL – Lipoproteína de baixa densidade
LDL^{mmox} – LDL minimamente oxidada
LDL^{ox} – LDL oxidada
M-CSF – fator estimulador de colônias de monócitos
MCP-1 – Proteína quimiotática de monócitos-1
MDA – Malondialdeído
MMP – Metaloproteinase
NADP⁺ – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NF-κB – Fator nuclear kappa B
NOS - Óxido nítrico sintase
n-NOS – Óxido nítrico sintase neuronal
NOX – NADPH oxidase
NO_x – Metabólitos do óxido nítrico (nitrito e nitrato)
O₂^{•-} – Ânion radical superóxido
ONOO⁻ – Peroxinitrito
ONOOH – Ácido peroxinitroso
PUFA – Ácido graxo poliinsaturado
ORAC – Capacidade de absorção do radical oxigênio
PPAR – Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma
RL – Radical livre
sdLDL – LDL pequenas e densas
SOD – Superóxido dismutase
TG – Triglicerídeos
VCAM-1 – Molécula de adesão vascular-1
VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO	16
1.1.1 Aterosclerose	16
1.1.1.1 <i>Dislipidemia</i>	17
1.1.1.2 <i>Disfunção endotelial</i>	18
1.1.1.3 <i>Oxidação da LDL</i>	20
1.1.1.4 <i>Inflamação, formação e progressão das lesões ateroscleróticas</i>	22
1.1.2 Estresse oxidativo	24
1.1.3 Tratamento e progressão da aterosclerose	27
1.1.4 Carotenoides	29
1.1.4.1 <i>Carotenoides do urucum</i>	31
1.2 OBJETIVOS	35
1.2.1 Objetivo geral	35
1.2.2 Objetivos específicos	36
1.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
1.3.1 Local de desenvolvimento da pesquisa	36
1.3.2 Obtenção e composição dos corantes de grau alimentício	36
1.3.2.1 <i>Formulações de bixina, norbixina e licopeno</i>	36
1.3.2.2 <i>Identificação e quantificação de bixina, norbixina e licopeno nas formulações</i>	37
1.3.3 Ensaio clínico	38
1.3.3.1 <i>População-alvo</i>	38
1.3.3.2 <i>Critérios de inclusão e exclusão</i>	38
1.3.3.3 <i>Delineamento experimental</i>	38
1.3.3.4 <i>Coleta de material biológico</i>	40
1.3.4 Análises	40
1.3.4.1 <i>Parâmetros antropométricos</i>	40
1.3.4.2 <i>Marcadores bioquímicos</i>	40
1.3.4.3 <i>Isolamento e oxidação da LDL ex-vivo</i>	41
1.3.4.4 <i>Determinação da oxidação lipídica no plasma</i>	42
1.3.4.5 <i>Determinação da oxidação proteica no plasma</i>	43
1.3.4.6 <i>Determinação da NOx no soro</i>	43
1.3.4.7 <i>Determinação da capacidade antioxidante do plasma</i>	43
1.3.4.8 <i>Determinação da GSH, GSSG e razão GSH/GSSG nas hemácias</i>	43
1.3.4.9 <i>Determinação da atividade de enzimas antioxidantes nas hemácias</i>	44
1.3.5 Análise Estatística	44
2 DESENVOLVIMENTO	46
2.1 MANUSCRITO.....	46
3 CONCLUSÃO	72
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
ANEXO A	82

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está apresentada no formato de manuscritos científicos integrados, seguindo as normas do Manual de Dissertações e Teses da UFSM (MDT), versão 2015.

O trabalho está organizado da seguinte forma: primeiramente é apresentada a INTRODUÇÃO, contendo o referencial teórico, os objetivos e material e métodos utilizados para a execução dessa dissertação. A seguir é apresentado o DESENVOLVIMENTO, que traz os resultados que fazem parte deste documento e que serão apresentados sob a forma de um manuscrito. As seções Material e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio manuscrito e representam na íntegra este estudo.

O item CONCLUSÃO, está disposto após o item DESENVOLVIMENTO e contém o resumo dos principais resultados da dissertação. A seção REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS apresenta a bibliografia citada na seção INTRODUÇÃO desta dissertação.

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) compreendem um grupo amplo e diversificado de doenças que acometem o coração, vasos sanguíneos e o cérebro (WHO, 2011). Essas doenças podem apresentar causas genéticas e ambientais, e compreendem arritmias e insuficiências cardíacas, cardiopatia congênita, doença reumática cardíaca (OPAS/OMS, 2017), além da doença arterial coronariana (DAC) e do acidente vascular cerebral (AVC), que são as mais frequentes e resultam de eventos agudos de obstrução de vasos sanguíneos do coração e cérebro, respectivamente (WHO, 2011).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), somente no ano de 2016 as DCV foram responsáveis por 31% dos 56,9 milhões óbitos no mundo, mantendo-se no topo das causas de morte mundiais (WHO, 2018). Dentre elas, os eventos obstrutivos agudos AVC e a DAC possuem a maior prevalência e taxa de mortalidade (WHO, 2011). Estimativas indicam que apenas no ano de 2016 o número de mortes por ambas as doenças foi de 15,6 milhões, o que corresponde a mais de 26% do total de mortes do mundo (WHO, 2018). Além disso, as DCV geram custos elevadíssimos tanto para os pacientes quanto para o governo. Estima-se que, apenas nos Estados Unidos, os custos com DCV (tratamento, procedimentos cirúrgicos, etc.) entre 2010 e 2030 poderão chegar a mais de 800 bilhões de dólares (HEIDERSON, 2011).

A presença de doenças crônicas como hipertensão, diabetes, obesidade e, principalmente, a dislipidemia, estão associadas à ocorrência de eventos cardiovasculares e, portanto, a um risco de morte elevado (HIRAYAMA; MIIDA, 2012). No último século, a humanidade passou por um processo de urbanização e modernização que resultou na mudança nos hábitos de vida da população e, conseqüentemente, no aumento do número de portadores de doenças crônicas e DCV (WHO, 2011). Dentre estes novos comportamentos adotados pela população, os principais são o aumento no consumo de alimentos ricos em gorduras, carboidratos e sódio, e o sedentarismo (BURTON-FREEMAN, 2010). Recentemente foi realizado o Estudo Global de Carga de Doenças (*Global Burden of Disease Study*), publicado em 2016, onde se avaliou a contribuição de fatores de risco cardiovascular sobre um indicador que avalia o número de anos perdidos devido à doença (incapacidade) e à morte prematura (avaliado em DALYs - *Disability-Adjusted Life Year*) em pacientes que sofreram AVC. Este estudo revelou que cerca de 90,5% dos DALYs estava relacionada a fatores de risco modificáveis (índice de massa corporal, pressão arterial sistólica, glicemia, colesterolemia, dentre outros). Destes,

74,2% estavam relacionados à fatores comportamentais (tabagismo, dieta inadequada e sedentarismo) (FEIGIN et al., 2016)

Ao mesmo tempo, a terapia medicamentosa da aterosclerose se baseia no uso de medicamentos hipolipidêmicos (KLOP et al., 2012), cujos efeitos colaterais afetam as funções muscular, hepática e cognitiva, reduzindo a aderência dos pacientes ao tratamento (GAZZOLA; VIGNA, 2016). A baixa aderência ao tratamento se reflete na perda da eficácia terapêutica, e aumento do risco de morte desses pacientes (KIORTIS et al., 2000). Dessa forma, atualmente o foco das organizações e entidades de saúde, como a OMS, têm sido na prevenção dessas doenças.

Diversas campanhas têm sido realizadas para implementar estratégias de prevenção dos fatores de risco de DCV, principalmente em relação a manutenção de uma dieta saudável e equilibrada e a prática regular de exercícios físicos (WHO, 2011). O consumo de alimentos e suplementos que contém substâncias com propriedades biológicas que auxiliam no controle da dislipidemia, estresse oxidativo e inflamação (SCICCHITANO et al., 2014), como os carotenoides (KAULMANN; BOHN, 2014) poderia contribuir na redução do risco. Diversos carotenoides como a astaxantina, a luteína e o licopeno, apresentaram propriedades cardioprotetoras em estudos *in vitro* e *in vivo*, que foram posteriormente avaliadas e, em alguns casos, confirmadas, em ensaios clínicos (EGGERSDORFER; WYSS, 2018). Os carotenoides presentes no urucum, que são autorizados como corantes alimentícios, também apresentaram ação antioxidante (CHISTÉ; BENASSI; MERCADANTE, 2011; OBOH et al., 2011; SABRINA SOMACAL, 2016), anti-inflamatória (SOMACAL et al., 2015, ROEHRS 2017) e hipolipemiante (PINZÓN-GARCÍA et al., 2018) em estudos *in vitro* e em modelos animais. Entretanto, o efeito nutracêutico destes carotenoides em seres humanos ainda é pouco conhecido.

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Aterosclerose

Tanto a DAC e como o AVC são eventos cardiovasculares agudos que ocorrem devido à obstrução de vasos sanguíneos coronarianos e cerebrais por um trombo, que interrompe o suprimento de oxigênio e nutrientes para o tecido muscular cardíaco e cerebral (VAN DAM et al., 2017). Apesar da DAC e do AVC ocorrerem em tecidos

diferentes, existe um processo patológico complexo comum entre ambos: a aterosclerose, cujo desenvolvimento e progressão estão relacionados à eventos oxidativos e inflamatórios (GREGERSEN et al., 2012).

A aterosclerose se caracteriza basicamente pela presença de placas ateroscleróticas compostas por lipídios, células imunes e musculares e material fibroso na túnica íntima de artérias de grande e médio calibre (VAN DAM et al., 2017). Apesar do mecanismo de formação das lesões ateroscleróticas não ter sido completamente elucidado, sabe-se que a exposição do endotélio a fatores de risco cardiovascular, como a hipertensão, a dislipidemia e mediadores pró-inflamatórios altera a função endotelial, permitindo a passagem de lipídios e monócitos para a camada íntima dos vasos, iniciando o processo de formação das placas ateroscleróticas (LIBBY; RIDKER; HANSSON, 2011). Evidências indicam que a formação destas lesões pode se dar ainda na infância, mas a sua progressão ocorre ao longo da vida devido à exposição a fatores de risco cardiovascular (SALVAYRE; NEGRE-SALVAYRE; CAMARE, 2016).

1.1.1.1 Dislipidemia

Dentre os fatores de risco cardiovascular, a dislipidemia possui um papel chave no desenvolvimento das lesões ateroscleróticas (LACY et al., 2018). O termo dislipidemia refere-se a uma doença crônica metabólica caracterizada pela alteração nos níveis séricos de lipídios, seja na redução dos níveis de colesterol sob a forma de lipoproteína de alta densidade (HDL) ou no acúmulo de triglicerídeos (TG) e colesterol não-HDL no organismo, que podem ocorrer individualmente ou estar associados entre si (ZHAO et al., 2017). A HDL possui um papel cardioprotetor, não somente por promover o transporte reverso do colesterol (dos tecidos para o fígado), mas também por remover hidroperóxidos presentes em outras lipoproteínas (KRESANOV, 2016). A presença de baixos níveis de HDL acomete ao menos 1 a cada 5 adultos, sendo a forma mais comum de dislipidemia (NOUBIAP et al., 2018), porém não a mais aterogênica.

Nos últimos anos, o colesterol sob as formas não-HDL e LDL têm sido consideradas as lipoproteínas mais aterogênicas e, portanto, os principais alvos terapêuticos em pacientes com aterosclerose (GRUNDY et al., 2014). Evidências também têm demonstrado a importância dos níveis elevados da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) no processo aterosclerótico, que está relacionado a uma maior quantidade de TG circulantes (GRUNDY et al., 2014), que além de ativarem vias

inflamatórias (WHEELER-JONES, 2007), promovem a produção de subclasses de LDL pequenas e densas (sdLDL) (HIRAYAMA; MIIDA, 2012). As partículas de LDL são formadas durante o metabolismo das lipoproteínas, que pode gerar subclasses de diferentes densidades e tamanhos. Sabe-se que a produção de VLDL ricas em TG pelo fígado está associada a uma maior geração de sdLDL, do que outras lipoproteínas com baixo conteúdo de TG (HIRAYAMA; MIIDA, 2012). As sdLDL possuem algumas particularidades que as tornam mais aterogênicas que as demais subclasses de LDL, como: o tamanho reduzido, que facilita a sua entrada no espaço subendotelial; a alta afinidade com proteoglicanos da parede arterial, retendo-as nesse espaço; a sua baixa afinidade com receptores de LDL, aumentando o seu tempo de meia-vida; e a ausência de vitamina E nessas partículas, deixando-as mais suscetíveis à oxidação (RIZZO et al., 2009).

Apesar da relação da HDL, TG e do colesterol não-HDL na patogenia da aterosclerose, o acúmulo da LDL na circulação é o evento inicial e essencial para o seu desenvolvimento (LIBBY; RIDKER; HANSSON, 2011). Possibilitando a entrada dessas lipoproteínas da parede arterial, dando sequência a processos oxidativos e inflamatórios que levam a formação das placas ateroscleróticas (VAN DAM et al., 2017).

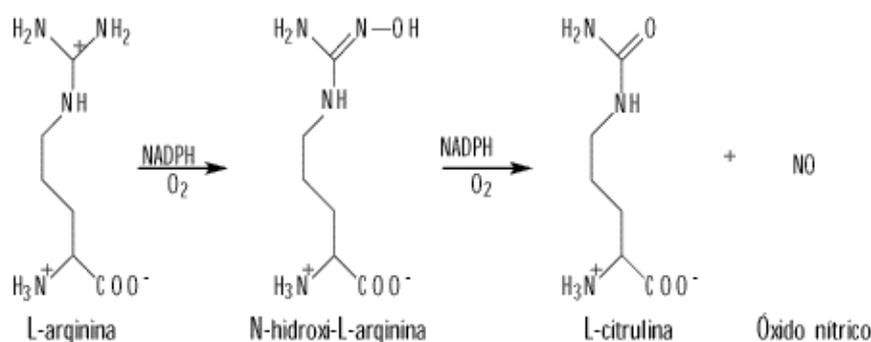
1.1.1.2 Disfunção endotelial

O endotélio vascular é constituído de um epitélio simples pavimentoso, cujas funções vão além do revestimento da parede dos vasos sanguíneos. Este epitélio é considerado um órgão endócrino, que secreta uma série de fatores de regulação autócrinos e parácrinos que regulam o tônus vascular, a coagulação sanguínea, a trombose, a passagem de nutrientes, adesão de células, proliferação de células musculares lisas e a inflamação dos vasos sanguíneos, mantendo a homeostase vascular (SUMBRIA; FISHER, 2017). Estudos mostram que a manutenção do equilíbrio entre a vasodilatação e vasoconstrição tem um papel importante na prevenção da aterosclerose (PARK; PARK, 2015). Diversos fatores com função vasoconstritora ou vasodilatadora, como a endotelina-1, angiotensina-II, prostaciclina, etc., são secretados pelas células endoteliais no lúmen dos vasos, no entanto, a principal delas é o óxido nítrico (\bullet NO) (PARK; PARK, 2015)

O \bullet NO, conhecido anteriormente como fator relaxante derivado do endotélio, é um radical livre (RL) e gás solúvel que regula diversas funções biológicas (HOYTE;

GROSS; KATIAL, 2018). Sua síntese ocorre pela ação de enzimas óxido nítrico sintases (NOS) (ROCHETTE et al., 2013). O organismo possui três isoformas da NOS: a neuronal (n-NOS), a endotelial (e-NOS) e a induzível (i-NOS), que utilizam (6R-) 5,6,7,8-tetra-hidrobiopterina (BH₄), dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD) e mononucleotídeo de flavina (FMN) (FÖRSTERMANN; SESSA, 2011). A síntese do •NO se dá basicamente pela hidroxilação da L-arginina, havendo a formação de um composto intermediário que se oxida formando L-citrulina e •NO, na presença de NADPH e O₂, conforme representado na figura 1 (FÖRSTERMANN; SESSA, 2011). Apesar de todas as NOS sintetizarem •NO por esta via, existem algumas particularidades entre elas, como a necessidade da presença de Ca²⁺ pelas isoformas neuronal e endotelial, que resultam em diferentes atividades entre as isoformas (FÖRSTERMANN; SESSA, 2011).

Figura 1: Reação de formação do •NO pelas isoformas da NOS.



Fonte: Dusse, et al. 2003.

Tanto a n-NOS, que é expressa nas fibras nervosas perivasculares e na parede dos vasos, como a e-NOS, que está presente no endotélio dos vasos periféricos; apresentam atividade cardioprotetora, por produzirem •NO necessário para a manutenção do equilíbrio vascular (entre vasodilatação e vasoconstrição) (LI; HORKE; FÖRSTERMANN, 2014). Diferentemente das demais isoformas, a i-NOS pode ser expressa em diversos tipos celulares (macrófagos, células epiteliais, entre outras) através da exposição a certos estímulos como lipopolissacarídeos bacterianos, citocinas e fatores de crescimento, principalmente pela ativação do fator nuclear kappa-B (NFκB) (DU; GELLER, 2010). Outra peculiaridade da i-NOS, é a sua capacidade de produzir grandes quantidades de •NO por um longo período de tempo (LI; HORKE; FÖRSTERMANN, 2014). Apesar da superprodução de •NO desempenhar um papel importante na defesa do

organismo contra infecções, a ativação da i-NOS também está relacionada a efeitos deletérios como a citotoxicidade, formação de peroxinitrito (ONOO^-), inibição da e-NOS e redução da resposta (relaxamento) das células musculares lisas ao $\bullet\text{NO}$ (FÖRSTERMANN; SESSA, 2011). Estas ações comprometem a vasoconstrição e vasodilatação dependente do endotélio, alterando a sua função (LI; HORKE; FÖRSTERMANN, 2014).

A disfunção endotelial é uma condição onde há baixa disponibilidade de $\bullet\text{NO}$, o endotélio perde a capacidade de vasodilatação e apresenta características pró-inflamatórias, pró-trombóticas, além de perder a sua função de barreira (TABAS; GARCÍA-CARDEÑA; OWENS, 2015). A perda da função endotelial pode ser provocada por dois mecanismos: inativação do $\bullet\text{NO}$ e desacoplamento da e-NOS, nos quais o envolvimento do estresse oxidativo (EO) tem grande importância (FÖRSTERMANN; SESSA, 2011). A inativação do $\bullet\text{NO}$ ocorre principalmente pela sua reação com o ânion radical superóxido ($\text{O}_2\bullet^-$), que, conforme o pH, pode levar a formação de ONOO^- ou ácido peroxinitroso (ONOOH), que são potentes agentes oxidantes (BACHSCHMID et al., 2013). Já o desacoplamento da eNOS, fenômeno no qual essa enzima deixa de sintetizar $\bullet\text{NO}$ e passa a produzir $\text{O}_2\bullet^-$, pode ocorrer devido a oxidação de seu cofator BH_4 pelo ONOO^- (LI 2014), pela depleção do substrato L-arginina ou pelo acúmulo de metil-argininas endógenas, que inibem a síntese do $\bullet\text{NO}$ (FÖRSTERMANN; SESSA, 2011).

A disfunção endotelial está associada ao estresse oxidativo e também a condições em que ele se faz presente, como diabetes, hipercolesterolemia e tabagismo (BACHSCHMID et al., 2013). Assim como a dislipidemia, a disfunção endotelial também desempenha um papel importante no desenvolvimento e progressão da aterosclerose. A perda das funções protetoras do $\bullet\text{NO}$, principalmente da função de barreira, possibilita a entrada da LDL no espaço subendotelial, onde ela sofre oxidação dando origem às lesões ateroscleróticas, que se desenvolvem principalmente nas ramificações das artérias, que são áreas expostas a um fluxo sanguíneo turbulento, fator que também auxilia no desenvolvimento da disfunção endotelial (TABAS; GARCÍA-CARDEÑA; OWENS, 2015).

1.1.1.3 Oxidação da LDL

A LDL é uma lipoproteína composta principalmente por colesterol (esterificado e livre), TG, fosfolípidios e apolipoproteína B-100 (ApoB100), cuja proporção varia

conforme a subclasse de LDL (STEINBERG, 2009; YOSHIDA; KISUGI, 2010), e que se distribuem entre superfície e core lipídico das partículas (TEERLINK et al., 2004). Devido à sua composição, as partículas de LDL são altamente suscetíveis à oxidação, que ocorre no endotélio dos vasos pela ação de espécies reativas (ERs) produzidas por macrófagos, células endoteliais e musculares lisas (YOSHIDA; KISUGI, 2010). Apesar de inúmeros trabalhos estudarem este fenômeno, os mecanismos pelos quais a LDL sofre modificações oxidativas *in vivo* ainda não estão completamente elucidados. No entanto, diversos modelos de oxidação *in vitro*, simulam esse fenômeno utilizando metais de transição, como cobre e ferro, como indutores da oxidação e fornecem informações importantes sobre os mecanismos de oxidação dessa lipoproteína (YOSHIDA; KISUGI, 2010).

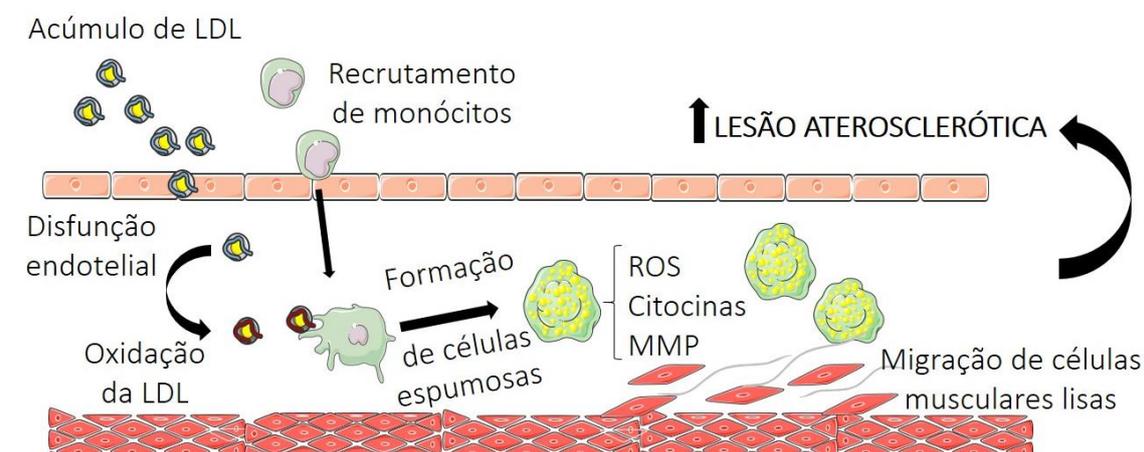
A oxidação da LDL *in vitro* depende de vários fatores como a presença de hidroperóxidos pré-formados, patologias associadas (diabetes, obesidade, etc.) e de antioxidantes (SALVAYRE; NEGRE-SALVAYRE; CAMARE, 2016). Naturalmente, as partículas de LDL possuem antioxidantes na sua estrutura, como a vitamina E e alguns carotenoides, que as protegem de agentes oxidantes (LEVITAN; VOLKOV; SUBBAIAH, 2010). Quando expostas a metais de transição e, ERs, (SALVAYRE; NEGRE-SALVAYRE; CAMARE, 2016), os antioxidantes presentes nessas partículas são esgotados, permitindo a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) (LEVITAN; VOLKOV; SUBBAIAH, 2010). A oxidação dos PUFAs se inicia com a remoção de um elétron do carbono contíguo a ligação dupla pela ação de ERs, formando dienos conjugados, que, em seguida são transformados em hidroperóxidos lipídicos pela ação de outras ERs. Os peróxidos lipídicos são capazes de atacar outros ácidos graxos, de forma que a reação se amplifica, caracterizando a etapa conhecida como propagação. Por fim, diversos produtos finais de peroxidação lipídica são formados, através da interação com proteínas e outras moléculas, como o aldeídos e cetonas, incluindo o malondialdeído (MDA) e 4-hidroxinonenal (4-HNE) (SALVAYRE; NEGRE-SALVAYRE; CAMARE, 2016). O processo de peroxidação da LDL pode levar a formação de partículas de LDL minimamente oxidadas (LDLmmox), que apesar de possuírem baixo teor de produtos de oxidação lipídica, presentes principalmente na sua superfície, ainda podem ser reconhecidas pelos receptores nativos de LDL (receptores B/E), devido à manutenção da estrutura da ApoB100 (YOSHIDA; KISUGI, 2010).

No entanto, a exposição contínua da LDLmmox à agentes oxidantes, leva à uma modificação mais extensa dessas partículas, comprometendo lipídios presentes no core

da LDL (YOSHIDA; KISUGI, 2010) e também levando à oxidação e fragmentação da ApoB100, formando partículas de LDL completamente oxidadas (LDLox). A modificação oxidativa da ApoB100 pode ocorrer por várias vias, dentre elas a reação de produtos da peroxidação lipídica, como o MDA e o HNE com resíduos de lisina presentes na ApoB100, que sofre fragmentação (SALVAYRE; NEGRE-SALVAYRE; CAMARE, 2016). A modificação oxidativa da ApoB100 também pode ser observada em pacientes diabéticos, onde a apolipoproteína sofre glicação, também nos resíduos de lisina (YOSHIDA; KISUGI, 2010).

Além de alterações na sua composição, as partículas LDLox apresentam alterações físicas, como a redução de seu tamanho e aumento da carga negativa na sua superfície, que reduz sua afinidade pelos receptores de LDL (receptores B/E) e aumenta o seu reconhecimento e captação pelos receptores *scavenger* dos macrófagos (KIDO et al., 2015). De acordo com a hipótese elaborada por Steinberg et al. em 1989, esse evento, representado na Figura 2, é essencial para o desenvolvimento da aterosclerose, por provocar uma série de reações, transformando os macrófagos em células espumosas, amplificando o processo oxidativo e inflamatório, levando a progressão das lesões ateroscleróticas (STEINBERG; WITZTUM, 2010).

Figura 2: Processo de formação das células espumosas.



Fonte: autoria pessoal.

1.1.1.4 Inflamação, formação e progressão das lesões ateroscleróticas

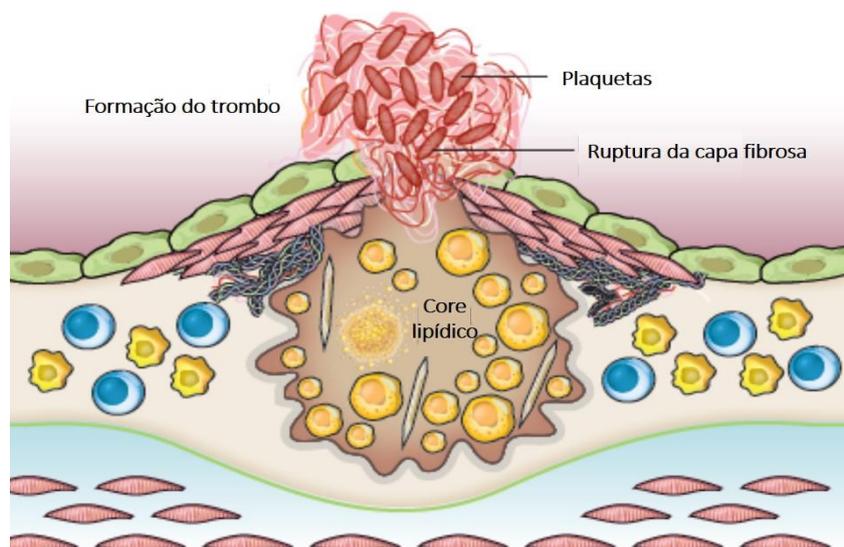
Apesar do envolvimento da disfunção endotelial e do estresse oxidativo (EO), a aterosclerose é considerada um processo inflamatório crônico, resultante de uma resposta

inflamatória exacerbada de células endoteliais e imunes (VIOLA; SOEHNLEIN, 2015), provocadas em resposta aos estímulos exercidos pela presença da LDLox na parede vascular. A modificação oxidativa da LDL libera substâncias que agem na ativação da inflamação, que se inicia pelo recrutamento de macrófagos para a túnica íntima dos vasos (MITEVA et al., 2018).

A presença de LDLox na parede vascular ativa as células endoteliais, fazendo com que as mesmas expressem proteínas quimiotáticas (como a MCP-1, proteína quimiotática para monócitos), moléculas de adesão vascular (VCAM-1) e intracelular (ICAM-1), selectina e outras citocinas pró-inflamatórias permitindo a entrada de monócitos para o subendotélio dos vasos (LIBBY, 2002). Essas células também promovem a diferenciação de monócitos em macrófagos, através do M-CSF (fator estimulador das colônias de monócitos), permitindo o contato entre LDLox e macrófagos, a fagocitose da LDLox pelos receptores *scavenger* e a formação das células espumosas, que sofrem apoptose (MORIYA, 2018).

Antes de sofrerem apoptose, em resposta ao estímulo da LDLox, as células espumosas produzem mais ERs, que oxidam outras partículas de LDL; e de citocinas pró-inflamatórias, que atuam no recrutamento de células imunes e musculares lisas e promovem a angiogênese (SALVAYRE; NEGRE-SALVAYRE; CAMARE, 2016). Dessa forma, a captação de LDLox pelos macrófagos provoca a hiperplasia da lesão aterosclerótica, promovendo o aumento do número dos vasos e a produção de colágeno pelas células musculares lisas, formando uma capa fibrosa, cuja presença exibe um papel protetor nas lesões ateroscleróticas estáveis (TABAS; GARCÍA-CARDEÑA; OWENS, 2015). Onde a remoção das células espumosas mortas por macrófagos viáveis, conhecida como esferocitose, mantém a estabilidade dessas lesões (THORP; TABAS, 2009). No entanto, a amplificação do processo inflamatório está associada ao aumento da instabilidade das lesões ateroscleróticas (MITEVA et al., 2018), onde há uma redução na remoção das células espumosas (esferocitose ineficiente) e um aumento na secreção de metaloproteinases (MMP), gerando um núcleo necrótico com calcificações e degradação da matriz extracelular, reduzindo a espessura da capa fibrosa (TABAS; GARCÍA-CARDEÑA; OWENS, 2015). A figura 3 representa a ruptura dessa placa, onde o conteúdo da lesão aterosclerótica é exposto a fatores de coagulação sanguíneos, que interagem entre si formando um trombo que é responsável pela oclusão do fluxo sanguíneo, promovendo eventos cardiovasculares agudos como o AVC e a DAC (LIBBY, P.; RIDKER, P. M.; HANSSON, 2011).

Figura 3: Ruptura da lesão aterosclerótica e formação do trombo.



Fonte: adaptado de Libby et al. 2011.

1.1.2 Estresse oxidativo

As reações de oxido-redução ocorrem constantemente nos organismos, seja na geração de energia ou na ativação de vias de sinalização, e são essenciais para a manutenção da vida. Essas reações envolvem, basicamente, a transferência de elétrons de um agente redutor para um agente oxidante, que é estabilizada. No entanto, o desequilíbrio na síntese ou no catabolismo de ERs, que agem como agentes oxidantes, provoca o seu acúmulo no organismo, levando a perda de seu papel fisiológico e promovendo danos em diversas moléculas, afetando sua estrutura e função. Essa condição é conhecida como EO, onde as ERs estão presentes em alta concentração, excedendo a capacidade antioxidante do organismo (SALVAYRE; NEGRE-SALVAYRE; CAMARE, 2016).

O EO está envolvido na fisiopatologia de diversas doenças crônicas, dentre elas a aterosclerose (TABAS; GARCÍA-CARDEÑA; OWENS, 2015). ER é um termo utilizado para denominar substâncias capazes de reagir com agentes redutores, as ER podem conter átomos de oxigênio ou nitrogênio, sendo conhecidas como espécies reativas de oxigênio (EROs), e de nitrogênio (ERNs), respectivamente; ou até possuírem elétron(s) desemparelhado(s) no orbital externo, sendo chamadas de RL (PISOSCHI; POP, 2015). Várias vias metabólicas conduzem a formação de ERs, devido a ação de enzimas como: NADPH-oxidase (NOX) (INOBUCHI, 2000), xantina oxidase, NOS, lipo-oxigenases

(HARRISON, 2003) ou até pela superprodução de superóxido pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (BROWNLEE et al., 2001). As principais ERs produzidas são: as espécies não radicalares peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl), $ONOO^-$ e óxido nitroso (HNO_2); e alguns radicais livres como o $O_2^{\bullet-}$, hidroxila (OH^{\bullet}), peroxila (RO_2^{\bullet}), hidroperoxila (HRO_2) e NO^{\bullet} (KARASU et al., 2010).

O excesso dessas ERs prejudica a função fisiológica de diversos tipos celulares, ao modificar macromoléculas essenciais, como DNA, proteínas e lipídios (BLACKHURST; MARAIS, 2006). No caso da aterosclerose, alguns de seus fatores de risco (hipertensão, dislipidemia, diabetes mellitus e tabagismo) estão relacionados ao aumento na geração de ERs na parede vascular (LI 2014), permitindo a oxidação da LDL (STEINBERG; WITZTUM, 2010). A principal via de formação de ERs nos vasos é a partir da NOX presente nas células endoteliais, que também é a principal fonte de $O_2^{\bullet-}$, seguida da xantina oxidase e da cadeia respiratória de elétrons mitocondrial (LI 2014). Apesar da sua baixa reatividade (PISOSCHI; POP, 2015), o $O_2^{\bullet-}$ possui um papel muito importante no dano oxidativo, por reagir rápida e instantaneamente com o $\bullet NO$, formando $ONOO^-$, que além de ser muito mais reativo que o $O_2^{\bullet-}$, também apresenta propriedades pro-inflamatórias (RICCIONI et al., 2012).

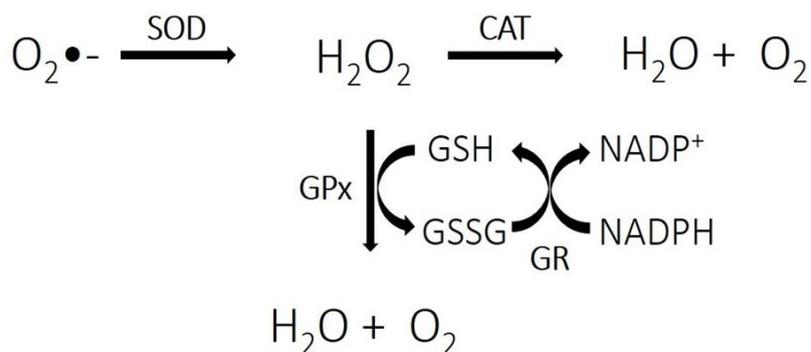
Além do seu papel no desacoplamento da eNOS e perda dos efeitos biológicos do $\bullet NO$, o $ONOO^-$ apresenta outros efeitos negativos na patologia da aterosclerose, por promover a oxidação e nitração de diversas moléculas do organismo de forma direta (ele mesmo) e indireta (através de seus metabólitos radicais OH^{\bullet} e dióxido de nitrogênio - $\bullet NO_2$), que também pode modificar lipídios, proteínas, carboidratos e bases nitrogenadas (BARTESAGHI; RADI, 2018). A ação direta do $ONOO^-$, seja na forma ácida (ácido peroxitroso $ONOOH$) ou livre, está relacionada à depleção de grupos sulfidrila e a oxidação de metaloproteínas (PISOSCHI; POP, 2015). Por outro lado, a ação indireta dessa ER está relacionada a peroxidação lipídica, tanto nas fases de iniciação como de propagação: os seus metabólitos, produtos da homólise do $ONOOH$ (OH^{\bullet} e $\bullet NO_2$) agem removendo rapidamente elétrons de ligações duplas insaturadas de lipídios (BARTESAGHI; RADI, 2018).

Apesar da importância da oxidação lipídica e proteica da LDL para o desenvolvimento da aterosclerose, o excesso de ERs também pode afetar lipídios, proteínas e DNA presentes em outras estruturas do organismo; apresentando um importante papel como biomarcadores de EO, fornecendo uma estimativa da extensão do dano oxidativo no organismo (PIRINCCIOGLU et al., 2010). Diversos biomarcadores

tem sido utilizados para essa finalidade, como: os níveis de MDA, que indicam a peroxidação lipídica (PIRINCCIOGLU et al., 2010); e de produtos proteicos de oxidação avançada (AOPP) (BOCHI, 2016). Os AOPP são produtos da oxidação de proteínas como a albumina, colágeno e fibrinogênio, principalmente pela ação do HOCl, que é produzido pela enzima mieloperoxidase presente nos neutrófilos (BOCHI, 2016).

No entanto, o dano às macromoléculas do organismo só ocorre quando há um desequilíbrio entre as ERs e os antioxidantes. Os sistemas de defesa antioxidante são responsáveis por eliminar as ERs, protegendo o organismo do dano oxidativo (TEBAY et al., 2015); e se dividem em dois grupos principais: enzimáticos e não enzimáticos (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). O sistema de defesa antioxidante enzimático inclui enzimas como a catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona redutase (GR) e superóxido dismutase (SOD) que detoxificam diferentes ERs (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004), conforme demonstrado pela figura 4. A SOD dismuta o radical $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 e O_2 (VAZATTA et al. 2009). Já a CAT ($K_m= 1,1 \text{ mM}$) e a GPx ($K_m= 1 \mu\text{M}$) são responsáveis pela decomposição do H_2O_2 , agindo em situações diferentes, conforme a sua afinidade pelo H_2O_2 (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000). A GR auxilia na atividade da GPx, por regenerar a glutaciona reduzida (GSH) (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004). Já o sistema de defesa antioxidante não enzimático é composto por pequenas moléculas endógenas, como a glutaciona, coenzimaQ, ácido úrico, etc. (PISOSCHI; POP, 2015); ou exógenas, como vitaminas, polifenóis e carotenoides, provenientes da dieta (ARAÚJO; MELLO, 2009). Estes antioxidantes podem agir de forma direta, removendo e estabilizando ERs; ou atuar indiretamente, induzindo a expressão de genes envolvidos na síntese e regeneração de antioxidantes endógenos, como a GSH (TEBAY et al., 2015).

Figura 4: Reações de remoção de EROs pelas enzimas antioxidantes.



Fonte: autoria pessoal. CAT – catalase; GPx – glutaciona peroxidase; GR – glutaciona redutase; GSH – glutaciona reduzida; GSSG – glutaciona oxidada; H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio; $NADP^+$ – Nicotinamida

adenina dinucleotídeo fosfato; NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida; $O_2^{\bullet-}$ – Ânion radical superóxido; SOD – superóxido dismutase.

1.1.3 Tratamento e prevenção da aterosclerose

O tratamento da aterosclerose se baseia na redução de fatores de risco como a obesidade, diabetes, hipertensão e, principalmente, a dislipidemia. Conforme a V Diretriz Brasileira de Dislipidemias, o tratamento da aterosclerose e de suas complicações se baseia em duas metas principais: a meta primária é a redução dos níveis de colesterol LDL e a meta secundária o aumento dos níveis de colesterol HDL (XAVIER et al., 2013). Em ambos os casos, o tratamento pode ser medicamentoso ou não, dependendo do nível de risco ao qual o paciente está exposto.

No caso da terapia medicamentosa, a droga de escolha depende do tipo de lipoproteína que se encontra alterada (XAVIER et al., 2013). Quando há um aumento nos níveis de LDL, a classe terapêutica mais utilizada são as estatinas (sinvastatina, atorvastatina, etc.), que são inibidores competitivos da 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMG-CoA redutase), impedindo a síntese de colesterol no fígado, o que induz a expressão de receptores de LDL nos hepatócitos, aumentando a captação de LDL da corrente circulatória, reduzindo ainda mais os níveis de LDL e também de outras lipoproteínas que contém ApoB, como a VLDL (CATAPANO et al., 2016). As estatinas também apresentam alguns efeitos pleiotrópicos no controle da inflamação, estresse oxidativo e trombose, que, em conjunto à sua ação hipolipemiante, conseguem prevenir a ocorrência de eventos cardiovasculares (JOHNSTON et al., 2017). Um estudo mostrou que a terapia com estatinas por pacientes com histórico de infarto agudo do miocárdio e LDL > 125 mg/dL reduziu em cerca de 50% a reincidência de infarto e a morte relacionada à esse evento nestes pacientes (GAZZOLA; VIGNA, 2016).

Outras drogas que são utilizadas como monoterapia, mas também em conjunto com as estatinas, são os inibidores da absorção do colesterol e ácidos biliares no intestino (ezetimiba), devido a sua interação com o transportador *Niemann-Pick C1-like 1*, reduzindo a quantidade de colesterol que chega ao fígado, que também aumenta a expressão de receptores de LDL nas células hepáticas, reduzindo os níveis sanguíneos dessa lipoproteína (CATAPANO et al., 2016). Já em relação aos triglicerídeos, a classe de drogas mais utilizada são os fibratos, que atuam como agonistas dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma alfa (PPAR- α). Esses receptores regulam a expressão de genes que atuam sobre o metabolismo de lipídios e lipoproteínas, como o

gene da enzima lipase lipoproteica, provocando a hidrólise dos TG e síntese de HDL (XAVIER et al., 2013). O uso de uma ou mais drogas para o tratamento da dislipidemia vai depender do nível de risco ao qual o paciente está exposto. Em alguns casos a terapia medicamentosa só é adotada após a terapia nutricional ter sido falha, ou então é utilizada concomitante à mudanças nos hábitos alimentares e exercícios físicos (XAVIER et al., 2013).

Diversos estudos demonstram que mudanças no estilo de vida, como a adoção de hábitos alimentares saudáveis, prática de exercícios físicos regularmente e a interrupção do tabagismo são extremamente úteis não apenas no tratamento da aterosclerose e de outras DCV, mas também na prevenção dessas doenças (WHO, 2011). A adoção de uma dieta equilibrada combinada à prática de exercícios físicos regulares (30 min/dia) reduz os níveis de lipídios circulantes, e auxilia na perda de peso e de massa gorda, melhorando não apenas a dislipidemia, mas também outros fatores de risco como o diabetes, obesidade e hipertensão, o que pode evitar cerca de 80% dos casos de DCV (CATAPANO et al., 2016). De acordo com o estudo CARDIA, a adoção de um estilo de vida saudável no início da idade adulta se reflete em menor risco de desenvolver DCV na meia idade, ressaltando a importância da prevenção (LIU et al., 2012). A V Diretriz Brasileira de Dislipidemias traz algumas recomendações nutricionais que auxiliam nesse processo, como o aumento no consumo de vegetais, frutas, alimentos ricos em fibras; a redução da ingestão de alimentos ricos em carboidratos, açúcares simples, gorduras saturada e trans e a troca de gorduras saturadas por gorduras mono e poli insaturadas (XAVIER et al., 2013).

Alguns alimentos desempenham um papel que vai além de suas propriedades nutricionais, cujo consumo proporciona benefícios adicionais à saúde (CATAPANO et al., 2016). Nesse sentido surgiram os nutracêuticos, que são alimentos, suplementos, produtos planejados ou compostos isolados, que desempenham ações medicinais sobre a prevenção e tratamento de doenças (SCICCHITANO et al., 2014). No caso da aterosclerose e das DCV, diversos compostos com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e hipolipemiantes foram descobertos nos últimos anos (KAULMANN; BOHN, 2014; KRZYSZTOF N WALISZEWSKI; GABRIELA BLASCO, 2010). Sua inserção na dieta pode não apenas prevenir o desenvolvimento dessas doenças, mas também agir em conjunto com as terapias medicamentosas tradicionais na redução dos fatores de risco cardiovasculares (SCICCHITANO et al., 2014).

1.1.4 Carotenoides

Os carotenoides são pigmentos naturais lipofílicos cuja estrutura é formada por um sistema de ligações duplas conjugadas, constituídos geralmente de 40 carbonos, que podem se apresentar de forma cíclica ou acíclica. Essa estrutura é responsável pela sua função, solubilidade e cor, que varia do amarelo ao vermelho, presente em diversos vegetais (abóbora, milho, cenoura), frutas (tomate, laranja) e alimentos processados (adição industrial). (KULCZYŃSKI et al., 2017). Atualmente, são conhecidos mais de 600 carotenoides, que se dividem em dois grupos: os carotenos e as xantofilas. Os carotenos, como o β -caroteno e licopeno são compostos apenas pela cadeia de hidrocarbonetos. Já as xantofilas, como a β -criptoxantina, luteína e zeaxantina, possuem um diferencial, a presença de um ou mais átomos de oxigênio em sua estrutura, o que confere uma maior polaridade quando comparado aos carotenos (YAHIA et al., 2017).

Evidências demonstram que os carotenoides podem reduzir o risco de doenças crônicas, como o câncer e as DCV (EMANUELLI; AUGUSTI; ROEHRS, 2017). Essa atividade é atribuída à sua estrutura química, que além de fornecer a cor aos alimentos, possui a capacidade de agir como antioxidante *in vitro* e *in vivo* (HAEGELE et al., 2000; KULCZYŃSKI et al., 2017). Os carotenoides podem desativar ERs através da transferência elétrons, formando carotenoides radicalares (carotenoide tripleto); da formação de adutos e da transferência de átomos de hidrogênio para o radical livre (KULCZYŃSKI et al., 2017). Dessa forma, esses pigmentos podem reduzir o dano oxidativo, mesmo quando há formação de espécies carotenoides radicalares, que são menos reativas e nocivas as células que os radicais livres e ERs (MUELLER; BOEHM, 2011). Além disso, a capacidade antioxidante *in vitro* dos carotenoides pode variar conforme o número de ligações duplas, tipo de grupo terminal (cadeia cíclica ou acíclica) e presença de átomos de oxigênio, bem como da ER avaliada (RODRIGUES; MARIUTTI; MERCADANTE, 2012).

Cerca de 40 carotenoides podem ser encontrados na corrente sanguínea, porém os mais abundantes são o licopeno, β -caroteno, luteína, zeaxantina e a β -criptoxantina; provenientes do consumo de frutas, vegetais ou alimentos processados nos quais esses pigmentos são adicionados (EGGERSDORFER; WYSS, 2018). Dados epidemiológicos demonstram que a presença de carotenoides na circulação sanguínea está relacionada a prevenção de doenças crônicas (BURROWS et al., 2015; KAULMANN; BOHN, 2014),

especialmente as DCV, pois, devido a sua lipossolubilidade, os carotenoides são transportados no organismo pelas lipoproteínas (AGARWAR; RAO, 2000).

Um dos carotenoides mais estudados nos últimos anos é o licopeno, devido a sua grande capacidade antioxidante e por modular vias de sinalização relacionadas a inflamação e a comunicação celular, podendo trazer benefícios à saúde cardiovascular (COSTA-RODRIGUES; PINHO; MONTEIRO, 2018). Diversos estudos clínicos avaliaram o efeito do consumo de carotenoides sobre a saúde cardiovascular, conforme apresentado na Tabela 1. Apesar de alguns estudos *in vitro* e ensaios clínicos demonstrarem a ação antioxidante e hipolipidêmica do licopeno, alguns estudos não observaram esses efeitos (EGGERSDORFER; WYSS, 2018). Um estudo de metanálise recente mostrou que a suplementação com licopeno pode reduzir apenas a pressão arterial sistólica, enquanto que outros efeitos cardioprotetores como a redução nos níveis de LDL e a melhora da função endotelial estão relacionados ao consumo do tomate e seus subprodutos, logo, não ocorrem apenas devido a presença de licopeno, mas também devido a presença de outros compostos bioativos, que podem agir em conjunto com o licopeno resultando nos efeitos observados (CHENG et al., 2017).

Tabela 1 – Estudos avaliando o efeito do consumo de licopeno ou alimentos à base de tomate, sobre fatores de risco cardiovascular

População	Duração	Tratamento/ suplementação	Efeitos observados	Referência
Adultos saudáveis (n = 22)	3 semanas	Dieta rica em produtos à base de tomate (aproximadamente 37 mg/d de licopeno)	Redução dos níveis de CT e LDL, redução da suscetibilidade da LDL à oxidação	Silaste et al., 2007
Idosos saudáveis (n = 51)	12 semanas	Cápsulas de licopeno (13,3 mg)	Sem modificações na resistência da LDL frente à oxidação induzida <i>ex-vivo</i>	Carroll et al., 2000
Homens saudáveis (n = 22)	2 semanas	Suco (330 mL/d) de tomate	Nenhuma alteração nos níveis de MDA ou na susceptibilidade da LDL à oxidação	Briviba et al., 2004
Portadores de diabetes tipo 2 (n = 57)	4 semanas	Suco de tomate (500 mL/d)	Aumento da lag time	Uprotchard, et al., 2000
Adultos saudáveis (n = 19)	2 semanas	Pasta de tomate (33,3 mg de licopeno)	Melhora da função endotelial e redução do estresse oxidativo	Xaplanteris et al., 2012
Mulheres saudáveis na pós-menopausa (n = 19)	7 dias	Pão amanteigado acrescido de purê de tomate (70 g)	Sem alteração na dilatação fluxo-mediada da artéria braquial	Stangl et al., 2011
Portadores de síndrome metabólica (n = 27)	8 semanas	Consumo de 100g de suco de tomate (2,5 mg de licopeno) 4 dias por semana	Redução da inflamação, da resistência à insulina e níveis de LDL; aumento da HDL e melhora na função endotelial	Tsitsimpikou et al., 2014

Legenda: CT: colesterol total, LDL: lipoproteína de baixa densidade, HDL: lipoproteína de alta densidade.

1.1.4.1 Carotenoides do urucum

O urucuzeiro (*Bixa orellana*) é uma espécie arbórea perene, nativa da floresta tropical da América Central e do Sul, cujo fruto, conhecido como urucum, possui sementes cobertas de uma resina vermelha, representados na Figura 5 (TOCCHNI, L; MERCADANTE, 2001). As sementes do urucum possuem diversos compostos como flavonoides, terpenoides, tocotrienóis, mas principalmente carotenoides, que são

responsáveis pela coloração vermelha do arilo dessas sementes. Devido a sua grande capacidade corante e por ser um produto natural, as indústrias alimentícia e cosmética têm explorado o uso de corantes à base de urucum em seus produtos (RODRIGUES et al., 2007). O urucum é a fonte mais importante de corantes naturais empregada na indústria alimentícia, correspondendo a cerca de 90% do total de corantes naturais empregados no Brasil e em torno de 70% dos corantes naturais utilizados no mundo pela indústria de alimentos (PEDROSA, 1999). Os corantes à base de urucum são adicionados a diversos tipos de alimentos, tais como margarinas, manteiga, molhos, queijos, embutidos e massas (VILAR et al., 2014).

Figura 5: Frutos e sementes do urucuzeiro (*Bixa orellana*).



Fonte: www.rondonia.ro.gov.br.

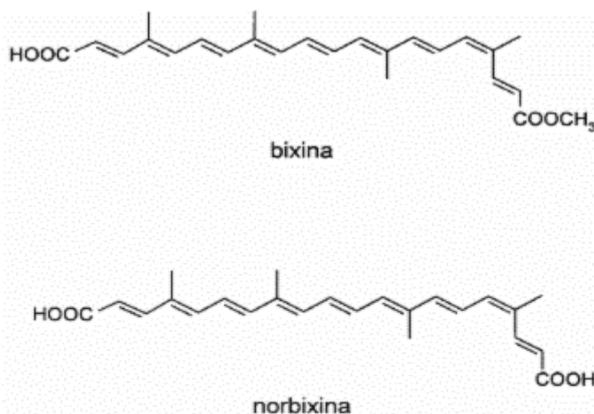
Devido a sua ampla aplicação, existem diversos tipos de extratos à base de urucum, que vão desde extratos lipossolúveis à pós microencapsulados. O método tradicional para obtenção de corante à base de urucum é pela agitação das sementes em água fria, onde as sementes são decantadas e a suspensão água-arilo é seca, obtendo-se uma pasta que geralmente é utilizada como base para a produção de outras formulações (OLIVEIRA, 2005). Além deste, os pigmentos do urucum também podem ser extraídos das sementes através da extração com óleo de soja ou milho, ou com solventes orgânicos, tais como acetona e etanol, ou ainda através de soluções alcalinas (NaOH ou KOH) (VILAR et al., 2014).

Os principais carotenoides presentes nessas formulações são a bixina e norbixina (FELICISSIMO et al., 2004). A bixina ($C_{25}H_{30}O_4$) corresponde a 80% dos carotenoides presentes naturalmente nas sementes do urucum. Assim como outras xantofilas, a bixina apresenta uma polaridade maior que carotenos como licopeno e β -caroteno (YAHIA et al., 2017); devido a sua estrutura química (figura 6), composta por 2 grupos carboxílicos,

sendo um éster monometílico e um ácido carboxílico (DE-OLIVEIRA et al., 2003). Apesar da sua afinidade por solventes de média polaridade, como a acetona e o clorofórmio, a bixina é o carotenoide majoritário nas preparações oleosas e na pasta de urucum (CHISTÉ, 2011).

A norbixina ($C_{24}H_{27}O_4$) é a forma desmetilada da bixina (figura 6), que corresponde à uma pequena parcela dos compostos naturalmente presentes nas sementes do urucum; sendo obtida principalmente através de hidrólise alcalina (extração alcalina) da bixina (TOCHINI; MERCADANTE, 2001). Essa alteração na molécula torna a norbixina mais polar que a bixina, sendo o carotenoide mais abundante nas preparações hidrossolúveis (CHISTÉ, 2011). A norbixina não é encontrada na sua forma livre nestas preparações, mas sim na forma de sais de norbixato de sódio ou de potássio que são solúveis em água. A conversão do norbixato (forma salina) presente nos extratos hidrossolúveis em norbixina pode ser realizada através da adição de ácido sulfúrico ou clorídrico, que reduz o pH da solução para 2-4, formando um precipitado de norbixina. Esta etapa além de possibilitar a obtenção de um corante na forma de pó, é considerado também um processo de purificação das formulações hidrossolúveis (OLIVEIRA, 2005).

Figura 6: Estrutura química dos carotenoides do urucum bixina e norbixina.



Fonte: Tochini e Mercadante, 2001.

O uso de corantes contendo bixina e norbixina se justifica não apenas devido a sua capacidade corante e baixo custo, mas também pela sua baixa toxicidade. A maioria dos estudos avaliando a exposição à extratos de urucum em modelos animais não observaram efeitos tóxicos e mutagênicos (VILAR et al., 2014). No entanto, Hagiwara et al. verificaram que a administração de doses altas de um extrato contendo norbixina (0,3

e 0,9%) provocou alterações nos níveis de proteínas totais, fosfatase alcalina, etc., além de aumentar o peso do fígado em ratos (HAGIWARA et al., 2003). Dessa forma, a ingestão diária aceitável (IDA) da bixina (6 mg/kg) e norbixina (0,3 mg/kg) foi estabelecida pela Autoridade Europeia de Segurança de Alimentos, a fim de garantir a segurança da população (ESFA, 2016).

Relatos indicam que o urucum foi muito utilizado pela medicina tradicional indígena e por outras civilizações da América do Sul e Central (peruana, paraguaia, jamaicana, cubana, etc.) como antipirético, laxante, antimalárico, hipoglicemiante, hipotensivo, expectorante, antimicrobiano (VILAR et al., 2014) e cicatrizante (SILVA; STRINGHETA; 2008). Dessa forma, visando explorar as ações biológicas do urucum e de seus compostos, diversos estudos *in vitro* e em modelos animais foram desenvolvidos nos últimos anos, principalmente em relação a sua atividade antioxidante. Ensaios *in vitro* mostram que a bixina é eficaz na remoção de ERs como o $\text{OH}\cdot$, H_2O_2 , HOCl e ONOO^- em ensaios de atividade “*scavenger*” (CHISTÉ; BENASSI; MERCADANTE, 2011), além de proteger a LDL isolada do sangue humano contra a oxidação induzida por Cu^{2+} *in vitro* (SOMACAL, 2016); enquanto que a norbixina protegeu o DNA plasmidial contra o dano provocado por H_2O_2 (KOVARY et al., 2007). Já em estudos *in vivo* com ratos, a bixina reduziu a peroxidação lipídica induzida por ciclofosfamida no cérebro (OBOH et al., 2011) e por cisplatina nos rins (SILVA; ANTUNES; BIANCHI, 2001), além de proteger a pele contra o dano oxidativo provocado pela luz UV (TAO et al., 2015) e prevenir a depleção de GSH no tecido renal após exposição à cisplatina (SILVA; ANTUNES; BIANCHI, 2001). Além disso, observou-se um aumento na atividade de enzimas antioxidantes em ratos diabéticos tratados com bixina e norbixina (ROEHRS et al., 2014), bem como em coelhos hipercolesterolêmicos suplementados com bixina (SOMACAL et al., 2015). Neste último estudo, também foi observada uma redução na peroxidação lipídica, resposta inflamatória, índice aterogênico e lesões ateroscleróticas dos coelhos promovidas pelo modelo de aterosclerose (SOMACAL et al., 2015). Em outro trabalho relacionado a função cardiovascular, a bixina reduziu a produção de EROs, a resposta inflamatória e a fibrose do tecido cardíaco, em um modelo de cardiomiopatia induzida por um dieta rica em gordura em camundongos (XU; KONG, 2017).

Outros estudos em modelos animais revelaram que a bixina e a norbixina modulam o metabolismo de carboidratos e lipídios; reduzindo os níveis de LDL e triglicérides (LIMA, 2001, 2008; PINZÓN-GARCÍA et al., 2018), colesterol total (LIMA, 2010; PINZÓN-GARCÍA et al., 2018) e glicose (PINZÓN-GARCÍA et al., 2018;

ROEHRS et al., 2014; RUSSELL et al., 2008). Além de reduzir a glicemia e melhorar o perfil lipídico sérico em ratos obesos com doença hepática gordurosa não-alcóolica, a bixina também reduziu a resistência à insulina, o peso corporal e hepático dos animais (PINZÓN-GARCÍA et al., 2018). Estes efeitos dos carotenoides do urucum podem estar relacionados a atividade agonista dos PPAR (GOTO et al., 2012; TAKAHASHI et al., 2009), que regulam não só a expressão de genes relacionados com o metabolismo de lipídios e carboidratos, mas também reduzem a resposta inflamatória (LOVISCACH et al., 2000), a dislipidemia e a resistência à insulina (GOTO et al., 2012).

Apesar dos estudos *in vitro* e em modelos animais demonstrarem o efeito antioxidante, anti-inflamatório e hipolipidêmico dos carotenoides do urucum, o seu efeito cardioprotetor em seres humanos ainda é pouco conhecido. Apenas dois trabalhos sobre o consumo humano desses compostos foram publicados, o mais antigo avaliando a sua absorção e metabolização no organismo e outro mais recente publicado pelo nosso grupo de pesquisa, que demonstra o efeito da ingestão de bixina e norbixina (separadamente) sobre marcadores bioquímicos, inflamatórios e de estresse oxidativo após uma refeição hipercalórica (ROEHRS et al., 2017). Em relação à sua cinética no organismo humano, foi demonstrado que após consumo de corante à base de urucum (16 mg de bixina) é possível detectar bixina (pico máximo 2 h após a ingestão) que é convertida em norbixina (pico máximo 4 h após a ingestão), que são rapidamente eliminadas do organismo (clearance bixina= 8 h, clearance norbixina = 24 h) (LEVY et al., 1997). O outro trabalho verificou que a adição de norbixina à uma refeição hipercalórica atenuou o aumento pós prandial nos níveis de TBARS, LDLox e citocinas pró-inflamatórias e aumentou a atividade da GPx em indivíduos saudáveis; enquanto que a bixina preveniu parcialmente a peroxidação lipídica induzida pela ingestão da refeição hipercalórica (ROEHRS et al., 2017). No entanto, o efeito de múltiplas doses de bixina e norbixina em humanos ainda não foi avaliado.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antioxidante do tratamento de curta duração (7 dias) por via oral com carotenoides do urucum, bixina e norbixina, em indivíduos saudáveis, comparando-os aos efeitos do carotenoide licopeno.

1.2.2 Objetivos específicos

Investigar o efeito da suplementação com os carotenoides sobre:

- o perfil lipídico, glicose e marcadores de função renal e hepática no soro de indivíduos saudáveis;
- marcadores de estresse oxidativo e a suscetibilidade da LDL frente à oxidação induzida por cobre *ex-vivo*;
- as defesas antioxidantes enzimáticas e a razão GSH/GSSG em hemácias.

1.3 MATERIAL E MÉTODOS

1.3.1 Local de desenvolvimento da pesquisa

Este trabalho foi desenvolvido nas dependências do Núcleo Integrado de Análises Laboratoriais (NIDAL), lotado no Departamento de Tecnologia e Ciência de Alimentos da UFSM.

1.3.2 Obtenção e composição dos corantes de grau alimentício

1.3.2.1 Formulações de bixina, norbixina, licopeno e placebo

Os corantes de grau alimentício contendo os carotenoides bixina e licopeno foram fornecidos na forma de pó, pela empresa Christian Hansen (Dinamarca) e Galena Química e Farmacêutica Ltda. (Brasil), respectivamente. O corante norbixina na forma de pó foi obtido após uma etapa de precipitação ácida de uma formulação líquida alcalina com cerca de 1% de sais de norbixato (grau alimentício), fornecida pela empresa Christian Hansen (Dinamarca). Esta etapa consistiu na adição de HCl 5% ao extrato alcalino contendo sais de norbixato, até atingir pH entre 2 e 4, havendo a precipitação do pigmento na sua forma livre (SANTOS, 2007). Essa suspensão foi filtrada, lavada com água deionizada e liofilizada, para obtenção de um pó fino contendo norbixina. O tratamento placebo foi composto por amido de milho.

As formulações na forma de pó foram utilizadas para a confecção de cápsulas, contendo 0,05 mg de carotenoide/kg de peso corporal. Cada cápsula (tamanho 1) foi

preparada manualmente, conforme o peso corporal de cada voluntário, através de uma balança semi microanalítica.

1.3.2.2 Identificação e quantificação de bixina, norbixina e licopeno nas formulações

O teor de cada carotenoide foi avaliado nas formulações utilizadas por espectrofotometria, utilizando seus solventes, coeficientes de extinção molar e comprimentos de onda respectivos, conforme a tabela abaixo:

Tabela 2 – Metodologias e parâmetros utilizados para determinação espectrofotométrica de bixina, norbixina e licopeno nas formulações estudadas

Carotenoide	Solvente	ϵ	λ (nm)	Fonte
Bixina	Clorofórmio	2826	470	Tochini e Mercadante, 2001
Norbixina	Solução aquosa de KOH 0,5%	3473	453	Tochini & Mercadante, 2001
Licopeno	Éter de petróleo	3450	472	Nunes & Mercadante, 2004

Legenda: ϵ = coeficiente de extinção molar, λ = comprimento de onda, KOH = hidróxido de potássio.

As formulações contendo os carotenoides do urucum também foram analisados por cromatografia de alta eficiência (CLAE) acoplado à detector de arranjo de diodos (DAD) (CHISTÉ et al., 2011). Estas análises foram desenvolvidas em CLAE-DAD (CBM-20A Prominence, Shimadzu LC), utilizando uma coluna Synergi 4 μ m Hydro RP 80A (250 \times 4.6 mm, Phenomenex, Torrance, USA). As fases móveis utilizadas foram acetonitrila: ácido fórmico 2% (fase móvel A) e água ultrapura (Milli-Q Gradient System, Millipore Corporation, Massachusetts, EUA): ácido fórmico 2% (fase móvel B). Para uma melhor separação e resolução dos picos, foi escolhida a eluição por gradiente de 30% de B e 70% de A por 10 min, 5% de B e 95% de A por 10 min, retornando para 30% de B e 70% de A por 10 min; totalizando 30 min de corrida. O fluxo utilizado foi de 0,9 mL/min. com volume de injeção de 20 μ L e temperatura de 38°C. As amostras de bixina e norbixina foram diluídas em clorofórmio e metanol, respectivamente, para a confecção de soluções-mãe, que foram diluídas na fase móvel inicial (70% de A e 30% de B) e filtradas (filtros 0,22 μ m PTFE hidrofílico) para injeção no equipamento (loop 20 μ L). Os compostos foram identificados pela comparação de seus espectros de absorção e tempos de retenção dos picos com padrões e dados da literatura. Os padrões de bixina e norbixina foram produzidos em laboratório (RIOS; MERCADANTE, 2004; TOCCHNI,

L; MERCADANTE, 2001) e utilizados na confecção da curva de calibração e dos limites de detecção e quantificação, bem como nos testes de recuperação. A quantificação dos compostos foi realizada em 460 nm.

1.3.3 Ensaio clínico

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos (CEP) da UFSM (CAAE number: 68801917.0.0000.5346) (ANEXO A). Este protocolo de pesquisa obedece às normas da resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde para pesquisas envolvendo seres humanos, e possui registro no endereço eletrônico: ClinicalTrials.gov 68801917.0.0000.5346.

1.3.3.1 População-alvo

A população alvo do estudo foi composta por 16 adultos saudáveis (8 mulheres e 8 homens), que foram recrutados no Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos (DTCA) do campus da UFSM, na cidade de Santa Maria, Rio Grande do Sul.

1.3.3.2 Critérios de inclusão e exclusão

Os 16 indivíduos selecionados como participantes da pesquisa tinham idade entre 18 e 35 anos, índice de massa corporal (IMC) entre 18,5 – 24,9 kg/m² e valores normais para glicemia, perfil lipídico e marcadores das funções hepática e renal (XAVIER et al., 2013). Sendo excluídos do estudo indivíduos que faziam uso de medicamentos alopáticos, fitoterápicos ou suplementos (minerais, vitamínicos, etc.); bem como tabagistas e portadores de câncer, doenças crônicas (diabetes, hipertensão), inflamatórias (lúpus, artrite, asma, entre outras.) ou infecciosas (virais, bacterianas ou fúngicas) no último mês.

1.3.3.3 Delineamento experimental

Foi realizado um ensaio clínico randomizado, duplo cego, controlado com placebo e com delineamento cruzado com retorno. Para a realização deste estudo fez-se necessária a adesão voluntária de 16 adultos saudáveis, recrutados nas dependências do DTCA/UFSM, entre estudantes da universidade. No primeiro encontro, os possíveis

participantes da pesquisa receberam informações sobre os objetivos e riscos da pesquisa, tendo liberdade de optar ou não em participar do estudo, através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). A realização de uma triagem inicial dos participantes que aderiram voluntariamente à pesquisa foi feita através da análise de questionário, aplicado pelos pesquisadores. Os indivíduos selecionados receberam a orientação de permanecer em jejum de 12 horas e comparecer no NIDAL para coleta de sangue (30 mL), por flebotomia do membro superior para realização de exames laboratoriais (glicose, perfil lipídico, ureia, creatinina e transaminases), avaliação de parâmetros antropométricos (peso, altura e circunferência da cintura) e aferição da pressão sanguínea. Os participantes que apresentaram níveis normais desses marcadores foram convidados a continuar na pesquisa.

Nos encontros seguintes, realizados no NIDAL, cada voluntário recebeu os 4 tratamentos propostos (bixina, norbixina, licopeno ou placebo) em 4 momentos distintos com *washout* de, no mínimo, 7 dias entre os tratamentos, a fim de eliminar qualquer influência do tratamento anterior. As sequências de tratamento foram distribuídas de acordo com um delineamento experimental conhecido como quadrado latino, onde cada tratamento precede os demais tratamentos apenas uma vez. Cada tratamento foi codificado e as quatro sequências possíveis foram então sorteadas, sendo que, nem os voluntários ou analistas tinham conhecimento das sequências distribuídas entre os participantes.

Cada período de tratamento (1 semana) foi precedido de uma semana de preparo, resultando em duas semanas de intervenção por tratamento. Durante o período de intervenção, os sujeitos foram instruídos a evitar o consumo excessivo e anormal de bebidas alcoólicas, alimentos gordurosos ou que possuam urucum ou outros carotenoides (tomate, cenoura, molhos, embutidos, salgadinhos, biscoitos, condimentos, entre outros). No primeiro dia de cada tratamento, os participantes tinham de se apresentar no NIDAL pela manhã em jejum de 12 horas para coleta de sangue (30 mL) para o Dia 0. Em seguida, cada voluntário recebeu 7 cápsulas do tratamento correspondente (bixina 0,05 mg/kg, norbixina 0,05 mg/1kg, licopeno 0,05 mg/kg ou placebo), sendo a primeira delas consumida logo após a coleta de sangue, juntamente ao café da manhã, nas dependências do NIDAL; e as demais cápsulas deviam ser consumidas nos 6 dias seguintes (1 cápsula/dia), preferencialmente no mesmo horário. No oitavo dia de cada tratamento, os participantes tinham de se apresentar novamente no NIDAL pela manhã em jejum de 12 horas para coleta de sangue (30 mL) para o Dia 7.

A fim de garantir a segurança dos voluntários, a dose escolhida para este estudo corresponde à 10% do valor da IDA do licopeno, que possui o menor valor entre os carotenoides estudados (ESFA, 2010, 2016). Apesar disso, os voluntários foram instruídos a relatar qualquer reação diferente que aparecesse em decorrência da suplementação com os carotenoides, como intolerâncias, desconforto gastrointestinal (náuseas, vômito, diarreia), dores de qualquer natureza, dentre outras.

1.3.3.4 Coleta de material biológico

Todas as coletas de sangue foram realizadas por punção da veia basílica ou veia mediana cubital com sistema à vácuo em tubos com EDTA para obtenção de plasma, leucócitos e papa de hemácias, e tubo sem anticoagulante para obtenção de soro. O sangue coletado foi centrifugado à $3000 \times g$ por 10 min, para separação das frações plasma, soro e papas de hemácias. As amostras para avaliação dos parâmetros bioquímicos e de estresse oxidativo (enzimas antioxidantes, óxido nítrico, AOPP, GSH, GSSG e ORAC) foram congeladas em -20°C até a realização das análises. Já as amostras de plasma utilizadas para o isolamento da LDL e quantificação dos níveis de MDA, foram processadas no dia da coleta e armazenadas posteriormente conforme a exigência de cada metodologia.

1.3.4 Análises

1.3.4.1 Parâmetros antropométricos

Para melhor avaliar o estado de saúde dos voluntários, parâmetros antropométricos como: peso corporal, altura e circunferência da cintura (CC) foram avaliados durante o processo de triagem. O peso corporal foi avaliado através de balança portátil digital, com o indivíduo descalço, em posição ereta e indicado em quilograma (kg). A altura (metros) foi aferida no indivíduo ereto, com os calcanhares unidos e com a cabeça e glúteos em contato com um estadiômetro portátil. A CC foi determinada manualmente conforme a *Anthropometric Standardization Reference*, logo abaixo da última costela (LOHMAN, ROCHE, MARTORELL, 1988).

1.3.4.2 Marcadores bioquímicos

Os níveis séricos de TG, CT, HDL, glicose, ureia, creatinina, AST e ALT foram dosados por kits colorimétricos (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil) no analisador semiautomático Labmax 100 (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil). A LDL foi calculada usando a equação de Friedewald: $LDL = CT - HDL - TG/5$; e a VLDL foi estimada pela fórmula: $VLDL = CT - TG/5$. Já a hemoglobina foi determinada na papa de hemácias utilizando um kit colorimétrico (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil) em um espectrofotômetro manual, no dia da coleta das amostras.

1.3.4.3 Isolamento e oxidação da LDL ex-vivo

A fração enriquecida em LDL foi isolada a partir do plasma fresco por ultracentrifugação ($191.000 \times g$ por 2 horas à $4^{\circ}C$), utilizando um gradiente de densidade descontínuo. Para formar este gradiente, o plasma foi acrescido de KBr (0,326 g/mL), além de EDTA (1 mg/mL) e sacarose (0,5%), para evitar a sua agregação. Posteriormente, uma solução salina de cloreto de sódio (1,006 g/mL) foi adicionada sobre a mistura de plasma e deu-se sequência à ultracentrifugação (ultracentrífuga Hitachi CP80WX – rotor P80AT). Finalizado o processo, uma banda amarelo/laranja, correspondente à LDL, foi coletada e dialisada durante 16 h à $4^{\circ}C$ em tampão fosfato 148 mM pH 7,4 (Na_2HPO_4 8 mM, KH_2PO_4 1,4 mM, KCl 2,6 mM, NaCl 136 mM) (LUIZ DA SILVA; TSUSHIDA; TERAO, 1998). Para a realização dos ensaios de susceptibilidade da LDL frente à oxidação induzida por cobre, fez-se necessária a determinação da concentração de proteína nessas amostras, feita pelo método de Lowry et al. (1951). A determinação de proteínas foi realizada na amostras de LDL frescas, refrigeradas e protegidas da luz, bem como os testes de oxidação da LDL.

A oxidação lipídica das LDL isoladas induzida por $CuSO_4$ foi avaliada através da formação dos dienos conjugados. As LDL isoladas (50 μg de proteína/mL) foram pré-incubadas em tampão fosfato 10 mM pH 7,4 à $37^{\circ}C$, durante 10 minutos. A oxidação foi iniciada pela adição de $CuSO_4$ (5 μM) ao meio e a formação dos dienos conjugados foi monitorada a cada 5 min, durante 6,5 h, através do aumento da absorbância em 234 nm (GIESEG; ESTERBAUER, 1994). A partir destes dados foram determinados dois parâmetros: a fase lag e a taxa de oxidação máxima. A fase lag foi estimada pelo intercepto entre o eixo do tempo e a tangente da inclinação da curva de absorbância dos dienos conjugados durante a fase de propagação (aumento dos níveis de dienos). Já a taxa

de oxidação máxima foi calculada a partir da derivada da curva de formação dos dienos conjugados em função do tempo.

O triptofano é um aminoácido presente na ApoB-100, fazendo parte da estrutura da LDL. A perda da fluorescência deste aminoácido é um indicador da oxidação da fração proteica dessa lipoproteína. A cinética dessa reação foi avaliada pelo decaimento da fluorescência da triptofano (nas LDL isoladas) em comprimentos de onda de excitação e emissão específicos (282 nm e 331 nm, respectivamente), durante 6,5 h, com intervalos de 5 minutos entre cada leitura. A oxidação foi iniciada pela adição de CuSO_4 (3,3 μM) à LDL isolada (50 μg proteína/mL) (GIESSAUF; STEINER; ESTERBAUER, 1995). Os resultados foram expressos como o tempo necessário para que ocorra o decaimento de metade da fluorescência máxima do triptofano ($T_{\text{max}}/2$).

1.3.4.4 Determinação da oxidação lipídica no plasma

A peroxidação lipídica foi avaliada a partir da determinação dos níveis de MDA no plasma por HPLC/UV-vis. No dia da coleta de sangue, as amostras de plasma foram submetidas à hidrólise alcalina com hidróxido de sódio 3N e incubadas à 60°C por 30 min. Em seguida, o meio de reação foi acidificado com ácido fosfórico 6% e as amostras foram derivatizadas com TBA 0,8%, em banho-maria à 90°C por 45 min. As amostras foram resfriadas e congeladas à -20 °C até a análise cromatográfica. A extração do MDA das amostras foi feita minutos antes da injeção no cromatógrafo, pela adição de 50 μL de SDS 10% e de 300 μL de n-butanol, seguida de agitação (1 min) e de uma etapa de centrifugação à 3000 $\times g$ por 10 min. A fase butanólica, contendo o MDA, foi aspirada e filtrada em membrana PTFE 0,22 μm e injetada manualmente no equipamento (GROTTO et al., 2007).

A análise cromatográfica foi conduzida em cromatógrafo líquido Shimadzu acoplado à detector UV/visível (SPD-20AV), utilizando uma coluna C-18 Zorbax 5 μm , 250 x 4,6mm, (Agilent). Foi utilizada uma eluição isocrática com as fases móveis metanol e água ultrapura (Milli-Q Gradient System, Millipore Corporation, Massachusetts, EUA), na proporção 50:50. O volume de injeção utilizado foi de 20 μL e o tempo de corrida foi de 10 min. A quantificação foi realizada em 540 nm, utilizando uma curva de calibração de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP). Os níveis de MDA no plasma foram corrigidos pelo teor de proteína (LOWRY et al., 1951) e expressos em $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína.

1.3.4.5 Determinação da oxidação proteica no plasma

O oxidação proteica do plasma dos voluntários foi avaliada através dos níveis de AOPP. As amostras de plasma foram descongeladas e diluídas em ácido cítrico 0,2 M. A leitura da absorbância foi realizada em um leitor de microplacas em 340 nm, após 2 min de agitação (HANASAND et al., 2012). Os níveis plasmáticos de AOPP foram quantificados a partir de uma curva padrão feita com cloramina-T e expressos em nmol/mg de proteína.

1.3.4.6 Determinação de NOx no soro

O óxido nítrico está envolvido em diversos processos envolvendo a saúde cardiovascular. Como a sua concentração e tempo de vida são baixos, a determinação dos níveis de NO em amostras biológicas se dá através da quantificação dos seus metabólitos, nitrato e nitrito (NOx). A técnica baseia-se na conversão do nitrato em nitrito na presença de cloreto de vanádio, que sofre uma reação de Griess formando um azo-corante roxo, quantificado em 540 nm (MIRANDA; ESPEY; WINK, 2001). Os níveis de NOx foram determinados no soro e expressos em $\mu\text{mol/mg}$ de proteína.

1.3.4.7 Determinação da capacidade antioxidante do plasma

A capacidade antioxidante do plasma foi avaliada pelo método da capacidade de absorção do radical peroxila (ORAC). Primeiramente, foi necessário fazer um extrato etanólico das amostras de plasma para utilizá-las no ensaio. A análise foi realizada em tampão fosfato pH 7,4 utilizando o diidrocloreto de 2,2'-azobis (2-amidino-propano) (AAPH) como fonte de radicais peroxila e a fluoresceína como substrato. Para a determinação da capacidade antioxidante das amostras de plasma, expressa em mM equivalentes de Trolox, foi confeccionada uma curva padrão com o antioxidante Trolox (LEITE et al., 2011).

1.3.4.8 Determinação de GSH, GSSG e razão GSH/GSSG nas hemácias

Os níveis de GSH e GSSG foram determinados nas hemácias através da reação com o orto-phtalaldeído (OPT), gerando um produto fluorescente, analisado em

comprimentos de onda de excitação em 350 nm e de emissão em 420 nm (HISSIN; HILF, 1976). A diferença entre a determinação da GSH e GSSG, foi a adição do NEM 310 mm às amostras de GSSG, onde o NEM forma um aduto com a GSH, impedindo que esta reaja com o OPT, evitando uma superestimação dos níveis da GSH. A quantificação de glutathiona nas hemácias foi feita a partir de curvas de padrão de GSH e GSSG e expressa em nmol/mg de Hb. Os valores de GSH e GSSG foram utilizados no cálculo da razão GSH/GSSG.

1.3.4.9 Determinação da atividade de enzimas antioxidantes nas hemácias

A atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx e GR foram avaliadas na papa de hemácias, obtida pela centrifugação do sangue total. A atividade da SOD foi avaliada através da inibição da auto oxidação da epinefrina, determinada em 480 nm (MISRA; FRIDOVICH, 1972). A CAT teve sua atividade avaliada após a adição de peróxido de hidrogênio ao meio, pela queda da absorbância em 240 nm (AEBI, 1984). A oxidação do NADPH na presença de peróxido de hidrogênio e GSH, verificada através da queda da absorbância em 340 nm, foi utilizada na determinação da atividade da GPx (PAGLIA; VALENTINE, 1967). A atividade da GR foi determinada de maneira semelhante à GPx, utilizando a GSSG como substrato (CARLBERG; MANNERVIK, 1975). A atividade das enzimas antioxidantes foi corrigida pela quantidade de hemoglobina das amostras.

1.3.5 Análise estatística

A determinação do número de participantes para este estudo (16 indivíduos), foi feito a partir de um cálculo de tamanho amostral necessário para se observar uma diferença de 25% entre as médias dos 4 tratamentos propostos, considerando um desvio padrão de 20% das médias da maior parte das análises realizadas (ARÇARI et al., 2011; JIN et al., 2014; WAN et al., 2001), um nível de significância de 0,05 (5%) e poder de prova de 80%.

Os resultados obtidos foram expressos como delta, ou seja, pela diferença entre os valores observados no final (Dia 7) e início (Dia 0) de cada tratamento \pm erro padrão. Esses valores foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e Levene, para a verificação da normalidade e homogeneidade dos dados; e à análise de variância (ANOVA) de uma

via, seguida de teste post-hoc de Duncan, para comparação entre os deltas de cada grupo. Também foi realizada uma análise de correlação entre alguns marcadores, através da análise de correlação de Pearson. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,1$, devido à grande variabilidade existente inter e intraindivíduo em estudos com humanos. Todos os testes estatísticos foram realizados no programa Statistica® versão 9.0 (StatSoft Inc., 2004).

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 MANUSCRITO

SHORT-TERM BIXIN SUPPLEMENTATION OF HEALTHY SUBJECTS
DECREASES THE SUSCEPTIBILITY OF LDL TO Cu^{2+} -INDUCED OXIDATION
EX-VIVO

Lisiane Conte, Sabrina Somacal, Sabrina Marafiga Nichelle, Cristine Rampelotto,
Silvino Sasso Robalo, Miguel Roehrs, Tatiana Emanuelli

Manuscrito submetido ao periódico:
Journal of Nutrition and Metabolism

Short-Term Bixin Supplementation of Healthy Subjects Decreases the Susceptibility of LDL to Cu²⁺-induced Oxidation *ex-vivo*

Lisiane Conte,^{1,2} Sabrina Somacal,² Sabrina Marafiga Nichelle,² Cristine Rampelotto,² Silvano Sasso Robalo,³ Miguel Roehrs,² Tatiana Emanuelli^{1,2}

¹Graduate Program on Pharmacology, Centre of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

²Integrated Centre for Laboratory Analysis Development (NIDAL), Department of Food Technology and Science, Centre of Rural Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

³Department of Animal Science, Federal University of Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

Correspondence should be addressed to Tatiana Emanuelli; Tatiana.emanuelli@ufsm.com.br

Abstract

Lycopene-based medications and supplements have been developed to prevent atherosclerosis, primarily because of their ability to decrease low-density lipoprotein (LDL) oxidation. Bixin and norbixin are carotenoids found in the seeds of annatto (*Bixa orellana*) and are colorants widely used by the food industry. Some studies have already demonstrated that these compounds have antioxidant and antiatherogenic potential *in vitro* and in animal models, but there is no evidence supporting their effects in a long or short-term consumption by humans. The aim of this study was to evaluate the effects of short-term intake of annatto carotenoids on biochemical and oxidative stress biomarkers as well as on the LDL susceptibility to oxidation in healthy individuals, using lycopene as a positive control. The effect of daily supplementation (0.05 mg/kg b.w.) with bixin, norbixin, lycopene or placebo during 7 days was evaluated in a randomised, controlled crossover study in 16 healthy volunteers (8 men and 8 women). The susceptibility of LDL to Cu²⁺-induced oxidation *ex-vivo*, biochemical parameters and oxidative stress biomarkers were evaluated. No treatment affected biochemical parameters or most oxidative stress biomarkers. However, bixin reduced the oxidation rate of LDL lipid moiety (-275%, p<0.1) and nitric oxide metabolites (NOx) (-460%, p<0.1), compared to the placebo group. Moreover, we observed that the changes in these parameters were positively associated, supporting the hypothesis that bixin decreases the susceptibility of LDL to Cu²⁺-induced oxidation by decreasing NOx levels, probably by down-regulating the inducible nitric oxide synthase. This trial was registered in ClinicalTrials.gov 68801917.0.0000.5346.

Keywords: bixin, norbixin, nitric oxide, LDL oxidation, antioxidant

Introduction

The oxidation of LDL (oxLDL) is a key event in the progression of atherosclerosis, which plays a major role in the most prevalent types of cardiovascular diseases [1]. Hypercholesterolemia, hypertension-triggered shear stress and endothelial dysfunction favour the entrance of LDL particles in the tunica intima of blood vessels, where they are oxidized and taken up by macrophage cells leading to foam cell formation [1]. The parallel release of pro-inflammatory cytokines, growing factors and metalloproteinases by macrophages promotes cell recruitment, angiogenesis, apoptosis and degradation of extracellular matrix [2].

NO synthesized by endothelial nitric oxide synthase (e-NOS) plays an important role in vascular homeostasis promoting vasodilatation, besides inhibiting inflammation, platelet aggregation, oxidative stress and the migration and proliferation of vascular smooth muscle cells (SMC) [3]. In contrast to e-NOS, the inducible isoform of NOS (iNOS) exhibits pro-atherosclerotic effects [4]. The overproduction of NO by iNOS inhibits eNOS activity, impairs the activation of endothelial receptors, reduces SMC response to NO and leads to peroxynitrite (ONOO⁻) formation after reaction with superoxide anion radical (O₂^{•-}) [4].

Due to its huge reactivity, ONOO⁻ triggers lipid and LDL oxidation [5] beyond promoting oxidative changes in proteins and nucleic acids [6]. Above their role in oxidative stress damaging mechanisms, some oxidative biomarkers, such advanced oxidation protein products (AOPP) are markers of protein oxidative damage, which can be produced after the modification of plasma albumin and has been shown to be implicated in the pathogenesis of atherosclerosis [7] by the amplification of proinflammatory pathways [8]. Endogenous antioxidant enzymes play a key role to control the production of reactive species as peroxides and O₂^{•-}, but we have no enzyme to remove ONOO⁻ [9]. Non-enzymatic defences comprising endogenous small molecules as uric acid, glutathione and coenzymeQ, as well dietary antioxidants (vitamins, polyphenols and carotenoids) also helps to keep the homeostasis between the synthesis and removal of reactive species (RS) [6].

Dietary antioxidants play an important role in the prevention of CVD, where carotenoids have a distinguished place [10–12]. Lycopene, which is found at large amount in tomato, has high antioxidant capacity and is among the most studied carotenoids. Despite several studies showing that lycopene consumption presents positive effects in cardiovascular function, its protective effect against LDL oxidation or oxLDL levels remains controversial [13,14]. Thus, other carotenoids have been studied in last years. Bixin and norbixin are apocarotenoids found in food colorants extracted from annatto seeds (*Bixa orellana*), where they are synthesized from a lycopene molecule [15]. Despite their safety as food colorants [16], the beneficial biological effects of bixin and norbixin have been studied just in the last few years. Bixin has been shown to increase antioxidant enzymes activity in diabetic rats [17], reduce inflammatory response and atherosclerotic plaques in hypercholesterolemic rabbits [18]. Despite these promising data obtained in animal studies, there is only one human study investigating the effects of annatto carotenoids in humans [19]. In this study a single dose of norbixin reduced the postprandial levels of oxLDL, TBARS and proinflammatory cytokines levels after the consumption of a hypercaloric meal by healthy volunteers [19]. However, the biological effects of multiple doses of bixin and norbixin have not been investigated in humans.

In the present study, we investigated the effect of short-term bixin and norbixin supplementation on biochemical parameters, oxidative stress biomarkers and LDL susceptibility to oxidation *ex-vivo* in healthy subjects. The effects were compared to lycopene supplementation as a positive standard as this carotenoid is considered to have cardiovascular benefits.

Material and methods

Subjects

Sixteen healthy subjects (eight men and eight women; 25.4 ± 0.8 years, 66.5 ± 2.2 kg body weight, 1.71 ± 0.03 m body height and 22.6 ± 0.7 kg/m² body mass index) participated of this randomised, double blind, placebo-controlled crossover clinical trial. Undergraduate and graduate students aged between 18 and 35 years, with blood pressure, anthropometric (weight and BMI) and biochemical (glucose, lipid profile, transaminases, urea and creatinine) parameters within normal values were recruited in Federal University of Santa Maria, who gave their written consent to participate in the study (Fig..1). The study was conducted according to Declaration of Helsinki and the protocol of study was approved by the local ethics committee (CAAE number: 68801917.0.0000.5346). Volunteers with alcohol/cigarette/drug addiction, dyslipidaemia, diabetes, hypertension, cancer, as well as recent inflammatory and infectious diseases, were excluded from the study. Participants that were using medications, excepting oral contraceptives, were also excluded.

Study protocol

The health status was assessed at participant's entry, by applying a questionnaire (initial screening) and making anthropometric measurements and blood biochemical analysis (glucose, lipid profile, ALT, AST, urea and creatinine). Healthy subjects were included in the study and instructed to follow their usual diet, avoiding excessive/unusual consumption of alcoholic beverages, fatty foods, annatto/carotenoid-containing food or another unusual food during the study. The intervention period comprised one to three weeks of washout period, followed by one week of treatment. All subjects received the four treatments during the study in different periods, resulting in 2 months of participation leastwise. Each treatment was composed by a daily capsule of placebo or 0.05 mg/kg b.w. BIX, NBIX or LYC. Participants received seven capsules per treatment, corresponding to one week of treatment; and were instructed to take a capsule per day at the breakfast, preferably. A latin square crossover design was used. Four treatment sequences were chosen to yield a balanced design that was uniform both within periods and within sequences, and each treatment preceded every other treatment only once (Fig. 2). Treatments were coded (A,B,C,D) and sequences were randomly distributed among volunteers (Fig. 2). Both volunteers and analysts had no knowledge of drawn sequences.

The dose of carotenoids chosen for this clinical trial (0.05 mg/kg b.w.) is 10 times lower than the ADI of lycopene (0.5 mg/kg b.w.), which was the carotenoid that had the lowest ADI value comparing to bixin and norbixin (ADI: 6 and 0.3 mg/kg b.w., respectively) [20,21]. This dose is lower than recently used by our group for a single dose study with annatto carotenoids in humans (0.06 and 1.2 mg/kg b.w. for norbixin and bixin, respectively) [19] because we would assess the effect of multiple doses.

Two 12-h fasting blood collections (30 mL) were done for each treatment: at baseline (Day 0) and one day after the last capsule consumption (Day 7). Blood was collected from basilic or median cubital vein puncture using vacuum tubes containing EDTA for plasma and red blood cells (RBC) obtainment and without anticoagulant for serum obtainment. LDL isolation, ORAC, AOPP and MDA measurements were done using plasma samples, whereas antioxidant enzymes activities and GSH/GSSG ratio were evaluated in RBC samples. Serum samples were used to evaluate biochemical parameters and NO_x levels. At Days 0 and 7, blood collections were made between 7 and 9 a.m., after 12 h fasting.

Carotenoid preparation and quantification

Christian Hansen of Brazil (Valinhos, SP) provided food grade annatto pasta and bixin alkaline extract, which were used in this study. Annatto pasta had high content of bixin (30%) and was used for the bixin treatment. NBIX was obtained from the bixin alkaline extract, through acid precipitation [22] and lyophilisation, to obtain a powder formulation containing 42% norbixin. Lycopene (10%) was obtained from Galena Chemistry and Pharmaceutical Ltda (Campinas/SP). Placebo was composed by crude maize starch. Powders were manually encapsulated using an analytical balance and capsules size 1, once the capsule content varied according to individual weight (dose = 0.5 mg carotenoid/kg b.w.).

The concentrations of bixin, norbixin and lycopene powder were checked by spectrophotometry using the respective molar extinction coefficients for bixin ($\epsilon_{470\text{nm}}=2826$), norbixin ($\epsilon_{453\text{nm}}=3473$), and lycopene ($\epsilon_{472\text{nm}}=3450$) [23,24]. Thereafter, carotenoids of BIX and NBIX powders were identified by high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to a photodiode array detector (PDA). BIX and NBIX were diluted in mobile phase, filtered in 0.22 μm pore membrane and injected (20 μL) in HPLC-PDA (CBM-20A Prominence, Shimadzu LC) coupled to a Synergi 4 μm Hydro RP 80A column (250 \times 4.6 mm, Phenomenex, Torrance, USA). Samples were run at 0.9 mL/min using the following gradient: 70% A:30% B for 10 min, 95% A:5% B for 10 min, 70% A:30% B for 10 min, being mobile phase A acetonitrile containing 2% acid formic, mobile phase B water containing 2% acid formic. Compounds were identified by PDA spectra and peak retention time by comparison with authentic standards and literature data. Annatto carotenoids were quantified at 460 nm using standard curves of bixin and norbixin.

Anthropometric parameters

Body weight, body height and waist circumference (WC) were determined during volunteers screening. Body weight (kg) was measured using a portable digital balance. Body height (meters) was verified in the erect individual, with heels united and head and gluteus in contact with a portable stadiometer. WC was determined below the last rib, according to the *Anthropometric Standardization Reference Manual* [25]. These parameters were accompanied during study intervention, but did not show any changes (data not shown).

Biochemical parameters

Colorimetric kits (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brazil) were used to determine serum levels of glucose, total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, VLDL-cholesterol, triglycerides, AST, ALT, urea and creatinine in a Labmax 100 semiautomatic analyser,

and haemoglobin levels in a spectrophotometer. Serum VLDL-C was estimated through TG levels and the Friedewald formula was used to calculate serum LDL-C. The atherogenic index was determined by the ratio between non-HDL cholesterol and HDL-cholesterol.

LDL isolation and *ex-vivo* oxidation induced by copper

LDL was isolated from the fresh plasma samples by discontinuous density-gradient ultracentrifugation [26]. EDTA, sucrose and KBr were added to avoid LDL aggregation and to form density-gradient. LDL particles (yellow/orange band) were collected and dialysed for 16 h at 4°C in PBS. The protein content of LDL particles was determined [27] and oxidation susceptibility assays of LDL were done in sequence, using Cu²⁺ to induce oxidation.

Isolated LDL particles (50 µg protein/mL) were incubated with 10 µM CuSO₄ in 10 mM phosphate buffer, pH=7.4 at 37°C by 10 min, then the oxidation of LDL lipid moiety was monitored by assessing conjugated dienes formation at 234 nm during 6.5 h at 37°C, in a micro plate reader [28]. Data obtained was used to calculate the lag phase and conjugated dienes (CD) oxidation rate. Lag phase was estimated by the intercept between the time axis and the tangent of the slope of the CD absorbance curve during the propagation phase. The slope of the CD absorbance curve was used to calculate CD oxidation rate.

The oxidation of LDL protein moiety was analysed by the loss of tryptophan (Trp) fluorescence, which decreases due to the oxidation of amino acid residues in ApoB-100. Isolated LDL particles (50 µg protein/mL) were incubated with 3.3 µM CuSO₄ in 10 mM phosphate buffer, pH=7.4 at 37°C by 10 min and thereafter the loss of Trp fluorescence was monitored (excitation at 282 nm and emission at 331 nm) during 6.5 h at 37°C [29], in a microplate reader. Fluorescence measurements were used to calculate the time necessary to loss 50% of Trp fluorescence (T_{MAX/2}).

Biomarkers of oxidative stress

Lipid peroxidation product, malondialdehyde, was evaluated in plasma samples that were derivatized with TBA and then analysed by HPLC-UV/vis, using a Zorbax ODS C18 5 µm (250 x 4.6 mm, Agilent, Santa Clara, USA) [30]. Plasma, serum and RBC endpoint/kinetic UV/VIS and fluorescence spectrophotometry assays were done in a microplate reader. Plasma AOPP levels were measured at 340 nm [31]. Griess reaction was performed to evaluate NOx levels in serum, at 540 nm [32]. Plasma antioxidant capacity was analysed by the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay that uses AAPH as the source of peroxy radicals and fluorescence spectrophotometry (excitation at 485 nm and emission at 528 nm) [33]. GSH and GSSG were determined in the RBC fraction through reaction with ortho-phthalaldehyde by fluorescence spectrophotometry (emission at 350 nm and excitation at 420 nm) using *N*-ethylmaleimide complexation to prevent interference of GSH with measurement of GSSG [34]. Data were expressed as the GSH/GSSG ratio. Antioxidant enzymes activities were assessed in RBC samples and results were normalized by the Hb content. SOD activity was assessed by the inhibition of epinephrine autoxidation at 480 nm [35], whereas CAT activity was quantified by the decomposition of hydrogen peroxide at 240 nm [36]. GPx and GR were determined at 340 nm, through NADPH oxidation, using specific substrates [37,38].

Statistical analysis

The number of participants required for this study (16 subjects) was calculated using a power analysis to detect 25% difference among means, considering a standard deviation of 20% [39–41], alpha error of 0.05 and power of 0.8 (80%), using an one-way ANOVA hypothesis test.

Data were expressed as delta values between final and baseline values (Day 7 value – Day 0 value) \pm standard error. To verify normality and homogeneity, data were submitted to Shapiro-Wilk and Levene tests. The one-way ANOVA and Duncan post hoc test were performed to compare deltas values. The associations between variables were assessed by Pearson's correlation analysis. Differences were considered significant when $p < 0.1$. All statistical analysis were made using Statistica® version 9.0 software system (StatSoft Inc., 2004).

Results

Twenty-one volunteers meet the inclusion criteria for the study but three were excluded because of health problems (exclusion criteria) or other motivations (Fig. 1). Eighteen participants are included in the study but 2 participants abandoned the study due to infections disease or other motivation. Thus, 16 participants completed this randomised placebo-controlled crossover trial. The volunteers' baseline characteristics are shown in Table 1. Serum glucose levels, lipid profile, markers of renal and hepatic function, anthropometric measurements and blood pressure was within normal values.

Baseline and final serum biochemical parameters are summarized in Table 2. Daily supplementation with lycopene or annatto carotenoids for one week did not change serum glucose or lipid profile, neither the markers of hepatic (AST and ALT) or renal (urea and creatinine) function. Glucose, total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, VLDL-cholesterol, triglycerides, AST, ALT, creatinine and urea levels remained within normal levels after the treatment. Likewise, the atherogenic index of plasma, which is a strong predictor of the risk of atherosclerosis and coronary heart disease, did not show alterations during the study.

The oxidation of LDL induced by copper *ex vivo* was assessed to determine LDL susceptibility to oxidative insults, which may play a key role in the first steps of atherosclerosis (Fig. 3). The oxidation of LDL protein moiety was assessed as the loss of Trp fluorescence and was expressed as $T_{MAX/2}$. CD formation, which characterize the oxidation of the lipid moiety of LDL, were evaluated as the initial lag phase time (Lag phase) and the maximal formation rate of CD (oxidation rate). Greater susceptibility to oxidation is indicated by lower values of $T_{MAX/2}$ and lag phase time and higher values of oxidation rate. Dietary supplementation with carotenoids did not affect $T_{MAX/2}$ (Fig. 3a) or lag phase time (Fig. 3b) values. However, bixin supplementation reduced the CD oxidation rate compared to placebo (Fig. 3c, $p < 0.1$), whereas lycopene or norbixin supplementation had no effect.

The oxidative stress status was analysed by AOPP, MDA and NOx levels, besides GSH/GSSG ratio and ORAC values (Fig. 4). Plasma protein oxidation, assessed by AOPP levels (Fig. 4a) had a slight decrease in all groups, including placebo along the treatment, but no differences were detected among treatments. Carotenoid treatments also did not cause significant changes in plasma lipid oxidation (MDA levels) (Fig. 4b). Nitric oxide was indirectly assessed by the levels of their metabolites nitrite and nitrate (NOx assay) because it has a short half-life. Bixin supplementation significantly reduced NOx levels

compared to the placebo treatment (Fig 4c, $p = 0.073$). As well as MDA, serum antioxidant capacity assessed by ORAC values (Fig. 4d) and GSH/GSSG ratio (Fig. 4e) was not changed by any carotenoid-treatment compared to the placebo group.

The activity of antioxidant enzymes from RBC was assessed as a marker of enzymatic antioxidant defences (Fig. 5). RBC SOD activity decreased during the intervention period, but no difference was observed among treatments. RBC CAT and GPx activities also did not differ among treatments. Interestingly, lycopene supplementation reduced RBC GR activity compared to the placebo treatment, whereas bixin and norbixin had no effect.

There was a significant positive relationship between the changes in NOx levels and CD oxidation rate of LDL particles after treatment ($r=0.391$, $p=0.007$; Figure 6).

Discussion

In this study, the effect of short-term 1-week supplementation with bixin or norbixin was investigated for the first time, regarding the resistance of LDL-cholesterol to Cu^{2+} -induced oxidative modifications, biochemical and oxidative stress biomarkers in a young healthy population, using lycopene supplementation as a positive control. The short-term supplementation with carotenoids did not modify biochemical biomarkers or most oxidative stress markers evaluated. The highlight of our study was the ability of bixin to decrease the oxidation rate of LDL lipid moiety induced by Cu^{+2} *ex-vivo*, which was parallel to the decrease in NOx levels.

Several studies demonstrated the positive association between dietary intake of lycopene-rich foods and decreased risk of CVD [42]. A recent meta-analysis have confirmed that the short-term (1 – 6 months) intake of tomato products (70 – 400 g/day) can reduce LDL-cholesterol levels, blood pressure and inflammatory factors [14]. The effect of annatto carotenoids on lipid metabolism has been studied in various animal models. Long-term treatment with bixin has been demonstrated to improve HDL levels and decrease atherogenic index in hypercholesterolemic rabbits [18], besides reducing LDL and TG levels in diabetic rats [17]. In our study, the short-term supplementation with low doses of lycopene or annatto carotenoids was not able to change serum lipid profile or glycaemia. These findings are in accordance with a single-dose study in humans, where bixin and norbixin intake with a high calorie meal did not change post prandial serum lipid profile or glycaemia [19]. In the same way, lycopene-enriched tomato sauce consumption during 4 weeks by healthy young subjects also did not improve TC, TG, HDL and glucose levels [43]. In fact, the lipid-lowering effect of tomato products appears to depend on the supplementation time, as at least 4 week-period appears to be required to observe effects in metabolic-syndrome patients, marathon-runners, overweight and healthy subjects. Moreover, various studies found lipid-lowering effects for lycopene-containing food products that also contain other bioactive compounds, but not for lycopene alone [14].

Although we have used short-term supplementation with carotenoid at lower than their ADI values, we have monitored potential changes in hepatic and renal function during supplementation. As expected, no carotenoid treatment altered aminotransferases activities or creatinine and urea levels confirming the safety of this dose.

Hypercholesterolemia, mainly LDL accumulation, has an important role in atherosclerosis development [44]. LDL particles can infiltrate arterial wall and suffer oxidative modifications in lipids and ApoB100 (ox-LDL), which enables the uptake of ox-LDL particles by macrophages [45]. RS generated by enzymes such as NADPH oxidase, xanthine oxidase and lipoxygenases can promote LDL oxidation in vascular wall [4,46]. Transition metals, such as copper, may also be involved in LDL oxidation *in vivo*, thus *in vitro* methodologies simulate this condition using Cu^{2+} to induce LDL oxidation [47,48]. Cu^{2+} -induced LDL oxidation comprises an initial phase characterized by antioxidant consumption and minimal lipid peroxidation, which is followed by a propagation phase characterized by extensive PUFA peroxidation and ApoB100 fragmentation [9].

Carotenoids, such as lycopene, astaxanthin and lutein have been shown to decrease ox-LDL formation due to its antioxidant action [10]. Tomato juice and ketchup consumption has been demonstrated to increase the resistance of LDL against Cu^{2+} -induced oxidation in healthy subjects [49]. However, other studies found no effect of lycopene, demonstrating that lycopene benefits are still unclear [50]. In the present study, lycopene or norbixin supplementation did not improve LDL resistance to Cu^{2+} -induced oxidation. However, bixin intake reduced CD oxidation rate of LDL, although it was not able to attenuate the oxidation of the protein moiety or increase the lag phase for the oxidation of the lipid moiety of LDL.

The resistance of LDL to oxidation in *ex vivo* assays, may be influenced by LDL composition [51]. The lag phase for the *ex-vivo* oxidation of the lipid moiety is enhanced by LDL-antioxidant content, while the propagation phase can be modified by the content of preformed lipid hydroperoxides (LOOH) [51]. LDL Cu^{2+} -induced oxidation is dependent on the presence of LOOH, which has an important role in the propagation phase [52]. Therefore, *in vitro* LOOH removal prevents LDL from oxidation induced by Cu^{2+} and other agents [53]. Thus, we believe that bixin effect on CD oxidation rate may be related to reduction of LOOH formation in LDL particles during the supplementation period.

LDL peroxidation and, consequently, LOOH formation, is promoted by reactive species generated by macrophages, endothelial and smooth muscle cells [54]. Hydrogen peroxide, superoxide anion radical, hydroxyl radical and peroxynitrite, are RS involved in this process [46]. ONOO⁻ is a potent oxidant that can be formed by the reaction between NO[•] and O₂^{•-} at physiological pH, while in the presence of H⁺ peroxynitrous acid (ONOOH) is generated and can be decomposed yielding products that also have a role in lipid peroxidation [5]. Different mechanisms are involved in O₂^{•-} production [4], whereas NO is generated by three NO synthase isoforms that use L-arginine as substrate [55]. eNOS and iNOS have a relationship with cardiovascular pathophysiology, but only iNOS activity is associated to ONOO⁻ generation, oxidative damage and pro-atherosclerotic effects [55].

In vitro studies have shown that lutein [56], β -carotene [57] and astaxanthin [58] inhibit iNOS expression in macrophage cells via down-regulation of NF κ B pathway. Reduced expression of iNOS leads to the decrease of NO levels [58]). Previous data from our research group, have shown that bixin inhibits the protein expression of iNOS in macrophages exposed to oxLDL (Somacal et al. unpublished data) and reduces the increased protein oxidation and NOx levels in diabetic rats [17]. In the present study, dietary supplementation with bixin reduced serum NOx levels compared to placebo,

whereas norbixin and lycopene had no effect. We also observed a positive correlation between NO_x levels and the CD oxidation rate of LDL. Thus, we propose that the increased resistance of LDL to oxidation triggered by bixin supplementation is underlined by the reduction of NO_x levels, possibly mediated by the inhibition of iNOS expression. Lower NO_x levels are expected to decrease ONOO⁻ and LOOH level in LDL particles.

The control of oxidative stress, either by reduction in RS generation or by its detoxification, is an important event to prevent atherosclerosis development. Beyond LDL “challenge test” and NO_x levels, other oxidative stress biomarkers as AOPP, MDA, GSH/GSSG ratio and ORAC levels can also estimate oxidative stress *in vivo*. Despite the antioxidant capacity of carotenoids, lutein supplementation in new born infants did not change AOPP levels [59], which besides being a protein oxidation biomarker also plays a proinflammatory action [8]. MDA levels reveal the extension of oxidative damage to lipids. Despite evidence that carotenoids can protect lipids from RS, some clinical trials, especially with lycopene, demonstrated that lycopene supplementation is not related to the reduction of MDA levels [60]. While AOPP and MDA levels indicates protein and lipid oxidation, GSH/GSSG ratio estimates the redox status [61], whose imbalance is associated with early atherosclerosis development [62]. Some carotenoids such as β-carotene, astaxanthin and lutein have been shown to improve cell redox status by increasing GSH levels [63], however the effect of lycopene consumption have conflicting results in antioxidant capacity assessments, such as plasma ORAC assay [64]. In the present study, no carotenoid treatment affected AOPP, MDA or ORAC values, neither the GSH/GSSG ratio. Although a previous study has demonstrated that a single dose of norbixin reduces the postprandial lipid oxidation triggered by a high calorie meal in humans [19], whereas bixin and norbixin have been shown to attenuate lipid and protein oxidation in animal models [17, 18, 65], this is the first study on the effect of annatto carotenoids on the GSH/GSSG ratio and plasma ORAC in literature.

Antioxidant enzymes such as SOD, CAT, GPx and GR help endogenous and exogenous non-enzymatic antioxidants to protect against oxidative damage, by converting ROS into less reactive species and water or by regenerating endogenous antioxidants, namely GSH [6]. Animal and human studies have shown that lycopene consumption increases antioxidant enzymes activities [63]. In addition, bixin and norbixin increased antioxidant enzymes activities in animal models of diabetes and atherosclerosis [17, 18], while bixin up-regulated gene expression of SOD and CAT in a mice model of diabetic cardiomyopathy [66]. However, only norbixin has increased the postprandial activity of GPx in humans after the concomitant intake with a high calorie meal [19]. The short-term dietary supplementation with lycopene, bixin or norbixin did not change in SOD, CAT or GPx activities. The interspecies differences and differences in the intervention-time, dose and absence of challenge may explain the absence of effect. However, there was a reduction in GR activity after lycopene supplementation, which may be an adaptive response to a lower requirement of antioxidant enzymatic defences due to the increase in non-enzymatic defences.

Conclusion

Short-term oral supplementation of lycopene or norbixin did not affect biochemical parameters or oxidative stress biomarkers in healthy subjects. However, bixin supplementation reduced the oxidation rate of the lipid moiety of LDL particles in a Cu²⁺-induced *ex vivo* assay, probably due to the reduction of NO_x levels. Thus, we propose

that bixin supplementation could prevent early oxidative modifications in LDL, which is a key event in the development of atherosclerosis.

Data Availability

The authors will provide the data related to the results contained in this article when necessary.

Conflicts of Interest

All authors report no conflict of interest.

Acknowledgments

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) [grant number 001], Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) [grant 17/2551-0000949-5]. The authors are thankful to Dr. Carlos Fernando de Mello and Dr. Felix Antunes Soares for providing the use of microplate readers.

References

- [1] A.D. van Dam, M.R. Boon, J.F.P. Berbée, P.C.N. Rensen, V. van Harmelen, Targeting white, brown and perivascular adipose tissue in atherosclerosis development, *Eur. J. Pharmacol.* 816 (2017) 92–92. doi:10.1016/j.ejphar.2017.03.051.
- [2] I. Tabas, G. García-Cardena, G.K. Owens, Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis, *J. Cell Biol.* 209 (2015) 13–22. doi:10.1083/jcb.201412052.
- [3] K.-H. Park, W.J. Park, Endothelial Dysfunction: Clinical Implications in Cardiovascular Disease and Therapeutic Approaches., *J. Korean Med. Sci.* 30 (2015) 1213–25. doi:10.3346/jkms.2015.30.9.1213.
- [4] H. Li, S. Horke, U. Förstermann, Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis, *Atherosclerosis.* 237 (2014) 208–219. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.09.001.
- [5] H. Yoshida, R. Kisugi, Mechanisms of LDL oxidation, *Clin. Chim. Acta.* 411 (2010) 1875–1882. doi:10.1016/j.cca.2010.08.038.
- [6] A.M. Pisoschi, A. Pop, The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review, *Eur. J. Med. Chem.* 97 (2015) 55–74. doi:10.1016/j.ejmech.2015.04.040.
- [7] W. Cao, F.F. Hou, J. Nie, AOPPs and the progression of kidney disease, *Kidney Int. Suppl.* 4 (2014) 102–106. doi:10.1038/kisup.2014.19.
- [8] J.Z. Klafke, F.G. Porto, R. Batista, G.V. Bochi, R.N. Moresco, P.L. da Luz, P.R.N. Viecili, Association between hypertriglyceridemia and protein oxidation and proinflammatory markers in normocholesterolemic and hypercholesterolemic individuals, *Clin. Chim. Acta.* 448 (2015) 50–57. doi:10.1016/j.cca.2015.06.013.
- [9] R. Salvayre, A. Negre-Salvayre, C. Camare, Oxidative theory of atherosclerosis and antioxidants, *Biochimie.* 125 (2016) 281–296. doi:10.1016/j.biochi.2015.12.014.
- [10] G. Riccioni, L. Speranza, M. Pesce, S. Cusenza, N. D’Orazio, M.J. Glade, Novel phytonutrient contributors to antioxidant protection against cardiovascular disease, *Nutrition.* 28 (2012) 605–610. doi:10.1016/j.nut.2011.11.028.
- [11] E.M. YAHIA, J.J. ORNELAS-PAZ, T. EMANUELLI, E.J. LOPES, L.Q. ZEPKA, B. CERVANTES-PAZ, Chemistry, stability and biological actions of carotenoids, in: *Fruit Veg. Phitochemicals Chem. Hum. Heal.*, 2017: pp. 285–346.
- [12] T. EMANUELLI, P.R. AUGUSTI, M. ROEHRS, Protective effects of carotenoids in cardiovascular disease and diabetes, in: *Fruit Veg. Phitochemicals Chem. Hum. Heal.*, 2017: pp. 347–382.
- [13] J. Costa-Rodrigues, O. Pinho, P.R.R. Monteiro, Can lycopene be considered an

- effective protection against cardiovascular disease?, *Food Chem.* 245 (2018) 1148–1153. doi:10.1016/j.foodchem.2017.11.055.
- [14] H.M. Cheng, G. Koutsidis, J.K. Lodge, A. Ashor, M. Siervo, J. Lara, Tomato and lycopene supplementation and cardiovascular risk factors: A systematic review and meta-analysis, *Atherosclerosis*. 257 (2017) 100–108. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2017.01.009.
- [15] S. Tao, S.L. Park, M.R. De La Vega, D.D. Zhang, G.T. Wondrak, Systemic administration of the apocarotenoid bixin protects skin against solar UV-induced damage through activation of NRF2, *Free Radic. Biol. Med.* 89 (2015) 690–700. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.08.028.
- [16] N. Martins, C.L. Roriz, P. Morales, L. Barros, I.C.F.R. Ferreira, Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agro-industries to ensure consumer expectations and regulatory practices, *Trends Food Sci. Technol.* 52 (2016) 1–15. doi:10.1016/j.tifs.2016.03.009.
- [17] M. Roehrs, C.G. Figueiredo, M.M. Zanchi, G.V. Bochi, R.N. Moresco, A. Quatrin, S. Somacal, L. Conte, T. Emanuelli, Bixin and norbixin have opposite effects on glycemia, lipidemia, and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats., *Int. J. Endocrinol.* 2014 (2014) 839095. doi:10.1155/2014/839095.
- [18] S. Somacal, C.G. Figueiredo, A. Quatrin, A.R. Ruviaro, L. Conte, P.R. Augusti, M. Roehrs, I.T. Denardin, J. Kasten, M.L. da Veiga, M.M.F. Duarte, T. Emanuelli, The antiatherogenic effect of bixin in hypercholesterolemic rabbits is associated to the improvement of lipid profile and to its antioxidant and anti-inflammatory effects, *Mol. Cell. Biochem.* 403 (2015) 243–253. doi:10.1007/s11010-015-2354-x.
- [19] M. Roehrs, L. Conte, D.T. da Silva, T. Duarte, L.H. Maurer, J.A.M. de Carvalho, R.N. Moresco, S. Somacal, T. Emanuelli, Annatto carotenoids attenuate oxidative stress and inflammatory response after high-calorie meal in healthy subjects, *Food Res. Int.* 100 (2017) 771–779. doi:10.1016/j.foodres.2017.08.005.
- [20] EFSA, The safety of annatto extracts (E 160b) as a food additive, (2016).
- [21] EFSA, Statement on the divergence between the risk assessment of lycopene by EFSA and the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), (2010).
- [22] J.A.B. dos Santos, Análise comparativa entre técnicas de processamentos para extração de pigmentos nas sementes de urucum, (2007) 147.
- [23] A.Z. Tocchni, L; Mercadante, Extração e determinação, por CLAE, de bixina e norbixina em coloríficos, *Ciência e Tecnologia Aliment.* 21 (2001) 310–313.
- [24] I.L. Nunes, A.Z. Mercadante, Obtenção de cristais de licopeno a partir de descarte de tomate, *Ciência e Tecnol. Aliment.* 24 (2004) 440–447. doi:10.1590/S0101-20612004000300024.
- [25] T. LOHMAN, A. ROCHE, R. MARTORELL, Anthropometric standardization

- Reference Manual, in: Champaign Hum. Kinet. Books, 1988: p. 184.
- [26] E. Luiz da Silva, T. Tsushida, J. Terao, Inhibition of mammalian 15-lipoxygenase-dependent lipid peroxidation in low-density lipoprotein by quercetin and quercetin monoglucosides., *Arch. Biochem. Biophys.* 349 (1998) 313–320. doi:10.1006/abbi.1997.0455.
- [27] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [28] S.P. Gieseg, H. Esterbauer, Low density lipoprotein is saturable by pro-oxidant copper, *FEBS Lett.* 343 (1994) 188–194. doi:10.1016/0014-5793(94)80553-9.
- [29] A. Giessauf, E. Steiner, H. Esterbauer, Early destruction of tryptophan residues of apolipoprotein B is a vitamin E-independent process during copper-mediated oxidation of LDL, *Biochim. Biophys. Acta.* 1256 (1995) 221–232.
- [30] D. Grotto, L.D. Santa Maria, S. Boeira, J. Valentini, M.F. Charão, A.M. Moro, P.C. Nascimento, V.J. Pomblum, S.C. Garcia, Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 619–624. doi:10.1016/j.jpba.2006.07.030.
- [31] V. Witko-Sarsat, M. Friedlander, C. Capeillère-Blandin, T. Nguyen-Khoa, A.T. Nguyen, J. Zingraff, P. Jungers, B. Descamps-Latscha, Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia., *Kidney Int.* 49 (1996) 1304–13. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- [32] K.M. Miranda, M.G. Espey, D.A. Wink, A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite, *Nitric Oxide - Biol. Chem.* 5 (2001) 62–71. doi:10.1006/niox.2000.0319.
- [33] A. V Leite, L.G. Malta, M.F. Riccio, M.N. Eberlin, G.M. Pastore, M.R. Maróstica Júnior, Antioxidant potential of rat plasma by administration of freeze-dried jaborcaba peel (*Myrciaria jaborcaba* Vell Berg), *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 2277–83. doi:10.1021/jf103181x.
- [34] P.J. Hissin, R. Hilf, A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues, *Anal. Biochem.* 74 (1976) 214–226. doi:10.1016/0003-2697(76)90326-2.
- [35] H.P. Misra, I. Fridovich, SUBSTANCES OF LOW MOLECULAR WEIGHT : The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase, *J. Biol. Chem.* 247 (1972) 3170–3175.
- [36] Aebi, Calase in vitro, *Methods Enzymol.* 105 (1984) 121–126.
- [37] D.E. Paglia, W.N. Valentine, Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase, *J. Lab. Clin. Med.* 70 (1967) 158–169.
- [38] I. Carlberg, B. Mannervik, Purification glutathione and characterization of the

- flavoenzyme reductase from rat liver, *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 5475–5480. doi:5480.
- [39] D.P. Arçari, V.B. Porto, E.R.V. Rodrigues, F. Martins, R.J. de Lima, A.C.H.F. Sawaya, M.L. Ribeiro, P. de O. Carvalho, Effect of mate tea (*Ilex paraguariensis*) supplementation on oxidative stress biomarkers and LDL oxidisability in normo- and hyperlipidaemic humans, *J. Funct. Foods.* 3 (2011) 190–197. doi:10.1016/j.jff.2011.04.001.
- [40] Y. Wan, J.A. Vinson, T.D. Etherton, J. Proch, S.A. Lazarus, P.M. Kris-Etherton, Effects of cocoa powder and dark chocolate on LDL oxidative susceptibility and prostaglandin concentrations in humans, *Am. J. Clin. Nutr.* 74 (2001) 596–602. doi:PMID: 11684527.
- [41] R. Jin, J.A. Welsh, N.A. Le, J. Holzberg, P. Sharma, D.R. Martin, M.B. Vos, Dietary fructose reduction improves markers of cardiovascular disease risk in Hispanic-American adolescents with NAFLD, *Nutrients.* 6 (2014) 3187–3201. doi:10.3390/nu6083187.
- [42] M. Eggersdorfer, A. Wyss, Carotenoids in human nutrition and health, *Arch. Biochem. Biophys.* 652 (2018) 18–26. doi:10.1016/j.abb.2018.06.001.
- [43] I. Abete, A. Perez-Cornago, S. Navas-Carretero, I. Bondia-Pons, M.A. Zulet, J.A. Martinez, A regular lycopene enriched tomato sauce consumption influences antioxidant status of healthy young-subjects: A crossover study, *J. Funct. Foods.* 5 (2013) 28–35. doi:10.1016/j.jff.2012.07.007.
- [44] O.J. Lara-Guzmán, Á. Gil-Izquierdo, S. Medina, E. Osorio, R. Álvarez-Quintero, N. Zuluaga, C. Oger, J.M. Galano, T. Durand, K. Muñoz-Durango, Oxidized LDL triggers changes in oxidative stress and inflammatory biomarkers in human macrophages, *Redox Biol.* 15 (2018) 1–11. doi:10.1016/j.redox.2017.11.017.
- [45] D. Steinberg, J.L. Witztum, Oxidized Low-Density Lipoprotein and Atherosclerosis, *Arter. Thromb Vasc Biol.* 30 (2010) 2311–2316. doi:10.1161/atvbaha.108.179697.
- [46] H.N. Siti, Y. Kamisah, J. Kamsiah, The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review), *Vascul. Pharmacol.* 71 (2015) 40–56. doi:10.1016/j.vph.2015.03.005.
- [47] A. Bayrak, T. Bayrak, E. Bodur, K. K??l??n??, E. Demirpen??e, The effect of HDL-bound and free PON1 on copper-induced LDL oxidation, *Chem. Biol. Interact.* 257 (2016) 141–146. doi:10.1016/j.cbi.2016.08.007.
- [48] M.R. Straliootto, M.A. Hort, B. Fiuza, J.B.T. Rocha, T. Rocha, M. Farina, G. Chiabrando, A.F. de Bem, Diphenyl diselenide modulates oxLDL-induced cytotoxicity in macrophage by improving the redox signaling, *Bichimie.* 95 (2013) 1544–1551. doi:10.1016/j.biochi.2013.04.008.
- [49] M.-L. Silaste, G. Alfthan, A. Aro, Y.A. Kesäniemi, S. Hörkkö, Tomato juice decreases LDL cholesterol levels and increases LDL resistance to oxidation., *Br. J. Nutr.* 98 (2007) 1251–8. doi:10.1017/S0007114507787445.

- [50] B. Burton-Freeman, Postprandial metabolic events and fruit-derived phenolics: a review of the science., *Br. J. Nutr.* 104 Suppl (2010) S1-14. doi:10.1017/S0007114510003909.
- [51] B.M. Winklhofer-Roob, G. Faustmann, J.M. Roob, Low-density lipoprotein oxidation biomarkers in human health and disease and effects of bioactive compounds., *Free Radic. Biol. Med.* 111 (2017) 38–86. <http://10.0.3.248/j.freeradbiomed.2017.04.345%0Ahttp://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=aph&AN=124491666&lang=pt-br&site=ehost-live>.
- [52] B. Frei, J.M. Gaziano, Content of antioxidants, preformed lipid hydroperoxides, and cholesterol as predictors of the susceptibility of human LDL to metal ion-dependent and -independent oxidation., *J. Lipid Res.* 34 (1993) 2135–45. doi:10.1016/0891-5849(93)90443-X.
- [53] C.E. Thomas, R.L. Jackson, Lipid hydroperoxide involvement in copper-dependent and independent oxidation of low density lipoproteins., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 256 (1991) 1182–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2005580>.
- [54] N.R. Madamanchi, A. Vendrov, M.S. Runge, Oxidative stress and vascular disease, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25 (2005) 29–38. doi:10.1161/01.ATV.0000150649.39934.13.
- [55] U. Förstermann, W.C. Sessa, Nitric oxide synthases: Regulation and function, *Eur. Heart J.* 33 (2011) 1–13. doi:10.1093/eurheartj/ehr304.
- [56] J.H. Kim, H.J. Na, C.K. Kim, J.Y. Kim, K.S. Ha, H. Lee, H.T. Chung, H.J. Kwon, Y.G. Kwon, Y.M. Kim, The non-provitamin A carotenoid, lutein, inhibits NF- κ B-dependent gene expression through redox-based regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/Akt and NF- κ B-inducing kinase pathways: Role of H₂O₂ in NF- κ B activation, *Free Radic. Biol. Med.* 45 (2008) 885–896. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.06.019.
- [57] S.-K. Bai, S.-J. Lee, H.-J. Na, K.-S. Ha, J.-A. Han, H. Lee, Y.-G. Kwon, C.-K. Chung, Y.-M. Kim, beta-Carotene inhibits inflammatory gene expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages by suppressing redox-based NF- κ B activation., *Exp. Mol. Med.* 37 (2005) 323–334. doi:10.1038/emm.2005.42.
- [58] S.-J. Lee, S.-K. Bai, K.-S. Lee, S. Namkoong, H.-J. Na, K.-S. Ha, J.-A. Han, S.-V. Yim, K. Chang, Y.-G. Kwon, S.K. Lee, Y.-M. Kim, Astaxanthin Inhibits Nitric Oxide Production and Inflammatory Gene Expression by Suppressing I κ B Kinase-dependent NF- κ B Activation, *Mol. Cells.* 16 (2003) 97–105.
- [59] S. Perrone, M. Tei, M. Longini, A. Santacroce, G. Turrisi, F. Proietti, C. Felici, A. Picardi, F. Bazzini, P. Vasarri, G. Buonocore, Lipid and protein oxidation in newborn infants after lutein administration, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014 (2014). doi:10.1155/2014/781454.
- [60] A. Kaulmann, T. Bohn, Carotenoids, inflammation and oxidative stress – implications of cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention, *Nutr. Res.* in press (2014). doi:10.1016/j.nutres.2014.07.010.

- [61] D. Giustarini, G. Colombo, M.L. Garavaglia, E. Astori, N.M. Portinaro, F. Reggiani, S. Badalamenti, A.M. Aloisi, A. Santucci, R. Rossi, A. Milzani, I. Dalle-Donne, Assessment of glutathione/glutathione disulphide ratio and S-glutathionylated proteins in human blood, solid tissues, and cultured cells, *Free Radic. Biol. Med.* 112 (2017) 360–375. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.08.008.
- [62] S. Ashfaq, J.L. Abramson, D.P. Jones, S.D. Rhodes, W.S. Weintraub, W.C. Hooper, V. Vaccarino, D.G. Harrison, A.A. Quyyumi, The relationship between plasma levels of oxidized and reduced thiols and early atherosclerosis in healthy adults, *J. Am. Coll. Cardiol.* 47 (2006) 1005–1011. doi:10.1016/j.jacc.2005.09.063.
- [63] B. Kulczyński, A. Gramza-Michałowska, J. Kobus-Cisowska, D. Kmiecik, The role of carotenoids in the prevention and treatment of cardiovascular disease – Current state of knowledge, *J. Funct. Foods.* 38 (2017) 45–65. doi:10.1016/j.jff.2017.09.001.
- [64] B.M. Burton-Freeman, H.D. Sesso, Whole Food versus Supplement: Comparing the Clinical Evidence of Tomato Intake and Lycopene Supplementation on Cardiovascular Risk Factors, *Adv. Nutr. An Int. Rev. J.* 5 (2014) 457–485. doi:10.3945/an.114.005231.
- [65] A. Rohini, N. Agrawal, H. Kumar, V. Nath, V. Kumar, Norbixin, an apocarotenoid derivative activates PPAR γ in cardiometabolic syndrome: Validation by *in silico* and *in vivo* experimental assessment, *Life Sci.* 209 (2018) 69–77. doi:10.1016/j.lfs.2018.08.001.
- [66] Z. Xu, X.Q. Kong, Bixin ameliorates high fat diet-induced cardiac injury in mice through inflammation and oxidative stress suppression, *Biomed. Pharmacother.* 89 (2017) 991–1004. doi:10.1016/j.biopha.2017.02.052.

Table 1: Baseline characteristics of 16 volunteers enrolled in the randomised controlled clinical trial.

Parameters	Population (n = 16)	Reference values
Age (years)	25.4 ± 0.8	-
Weight (kg)	66.5 ± 2.2	-
Height (m)	1.71 ± 0.03	-
Sex	8 male/8 female	-
Waist circumference (cm)	80.9 ± 2.1	Men < 94.0 Women < 80.0
Systolic blood pressure (mmHg)	110 ± 0.5	< 120
Diastolic blood pressure (mmHg)	80 ± 0.4	< 80
Body mass index (kg/cm ²)	22.6 ± 0.7	18.5 - 24.9
ALT (U/L)	19.0 ± 2.0	< 45.0
AST (U/L)	18.7 ± 1.6	< 35.0
TC (mg/dL)	179.6 ± 6.9	< 190.0
HDL-C (mg/dL)	52.0 ± 4.3	> 40.0
LDL-C (mg/dL)	110.1 ± 4.9	< 130.0
TG (mg/dL)	87.4 ± 12.4	< 150.0
Glucose (mg/dL)	92.5 ± 2.4	60.0 - 100.0
Creatinine (mg/dL)	1.15 ± 0.06	0.4 – 1.4
Urea (mg/dL)	28.7 ± 1.7	10 – 50.0

Values are expressed as mean ± SEM. ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase, TC, total cholesterol; HDL, high density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein; TG, triglycerides.

Table 2: Serum biochemical parameters before (Day 0) and after (Day 7) oral supplementation of carotenoids.

Parameters	Placebo			Bixin			Norbixin			Lycopene		
	Day 0	Day 7	Change	Day 0	Day 7	Change	Day 0	Day 7	Change	Day 0	Day 7	Change
Glucose (mg/dL)	83.7 ± 2.2	81.9 ± 1.8	-1.8 ± 2.1	84.5 ± 2.9	84.4 ± 3.5	-0.1 ± 1.3	82.7 ± 2.4	85.6 ± 2.4	2.9 ± 2.1	84.6 ± 3.0	84.5 ± 2.4	-0.1 ± 1.7
TC (mg/dL)	176.4 ± 8.7	177.3 ± 6.7	0.9 ± 5.2	180.8 ± 8.8	181.1 ± 10.1	0.3 ± 4.6	174.8 ± 11.7	179.3 ± 1.0	4.5 ± 5.9	176.7 ± 8.2	185.6 ± 8.8	8.9 ± 4.1
HDL-CI (mg/dL)	51.5 ± 3.9	49.6 ± 4.2	-1.9 ± 1.9	49.7 ± 3.1	50.9 ± 3.6	1.2 ± 1.81	52.1 ± 4.6	53.1 ± 5.5	1.0 ± 2.7	53.6 ± 3.0	54.1 ± 3.3	0.5 ± 2.5
LDL-C (mg/dL)	110.7 ± 7.1	109.3 ± 6.4	-1.4 ± 4.8	113.6 ± 6.8	118.4 ± 9.6	4.8 ± 7.2	101.6 ± 6.6	106.4 ± 6.4	4.8 ± 5.8	109.7 ± 6.5	114.8 ± 6.8	5.1 ± 5.6
TG (mg/dL)	88.1 ± 12.3	99.5 ± 12.4	11.4 ± 5.6	93.4 ± 12.5	102.6 ± 11.5	9.2 ± 7.1	93.4 ± 11.6	99.2 ± 12.8	5.8 ± 4.5	81.5 ± 10.6	86.7 ± 9.2	5.2 ± 5.5
VLDL-C (mg/dL)	17.8 ± 2.6	19.4 ± 2.6	1.6 ± 1.1	18.7 ± 2.5	20.5 ± 2.3	1.8 ± 1.4	18.7 ± 2.3	19.8 ± 2.5	1.1 ± 0.9	16.3 ± 2.1	17.3 ± 1.8	1.0 ± 1.1
AST (U/L)	15.2 ± 1.0	15.4 ± 1.1	0.2 ± 0.8	16.3 ± 0.9	15.5 ± 1.1	-0.8 ± 0.7	13.7 ± 0.9	14.6 ± 0.7	0.9 ± 0.6	15.4 ± 0.9	16.5 ± 0.8	1.1 ± 0.8
ALT (U/L)	15.4 ± 2.1	15.0 ± 1.7	-0.4 ± 1.0	18.7 ± 1.8	17.5 ± 2.2	-1.1 ± 1.5	13.9 ± 1.6	12.7 ± 1.2	-1.2 ± 1.2	16.4 ± 1.5	17.3 ± 1.5	0.9 ± 0.9
Creatinine (mg/dL)	1.17 ± 0.06	1.14 ± 0.07	-0.03 ± 0.05	1.09 ± 0.06	1.11 ± 0.05	0.02 ± 0.03	1.09 ± 0.05	1.05 ± 0.04	-0.04 ± 0.04	1.1 ± 0.1	1.14 ± 0.09	0.04 ± 0.05
Urea (mg/dL)	23.4 ± 1.5	26.1 ± 1.7	2.7 ± 0.9	26.9 ± 1.6	26.0 ± 1.7	-0.9 ± 1.4	27.1 ± 1.6	27.4 ± 1.8	0.3 ± 1.4	28.2 ± 1.3	26.2 ± 1.7	-2.0 ± 1.1
Atherogenic index	2.75 ± 0.24	2.91 ± 0.37	0.16 ± 0.18	2.72 ± 0.2	2.72 ± 0.21	0.0 ± 0.2	2.67 ± 0.3	2.52 ± 0.3	-0.14 ± 0.23	2.5 ± 0.2	2.56 ± 0.21	0.06 ± 0.2

Data are expressed as means ± SEM of 16 volunteers. TC: total cholesterol, HDL-C: high density lipoprotein cholesterol, LDL-C: low density lipoprotein cholesterol, TG: triglycerides, VLDL-C: very low density lipoprotein cholesterol, AST: aspartate amino transferase, ALT: alanine amino transferase. Change = Day 7 – Day 0.

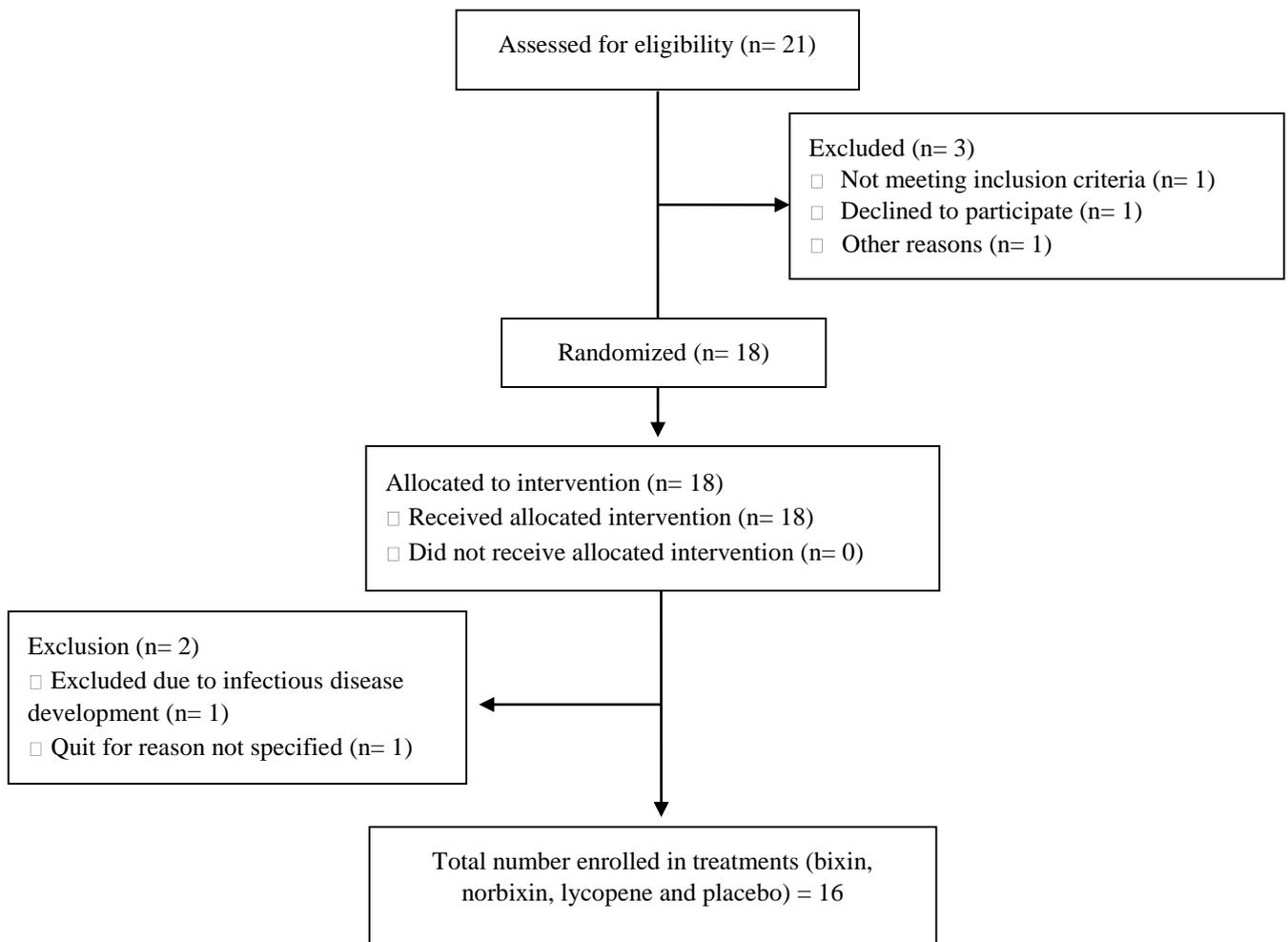
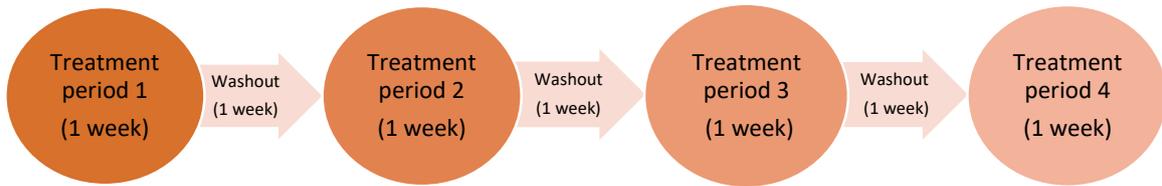


Figure 1: Consort flow diagram of recruitment, allocation, randomization and retention of volunteers.



Treatment sequence	Number of volunteers
LYC – BIX – NBIX - Placebo	4
BIX – Placebo – LYC - NBIX	5
NBIX – LYC – Placebo - BIX	3
Placebo – NBIX – BIX - LYC	4

Figure 2: Representative figure of treatment sequence followed by volunteers.

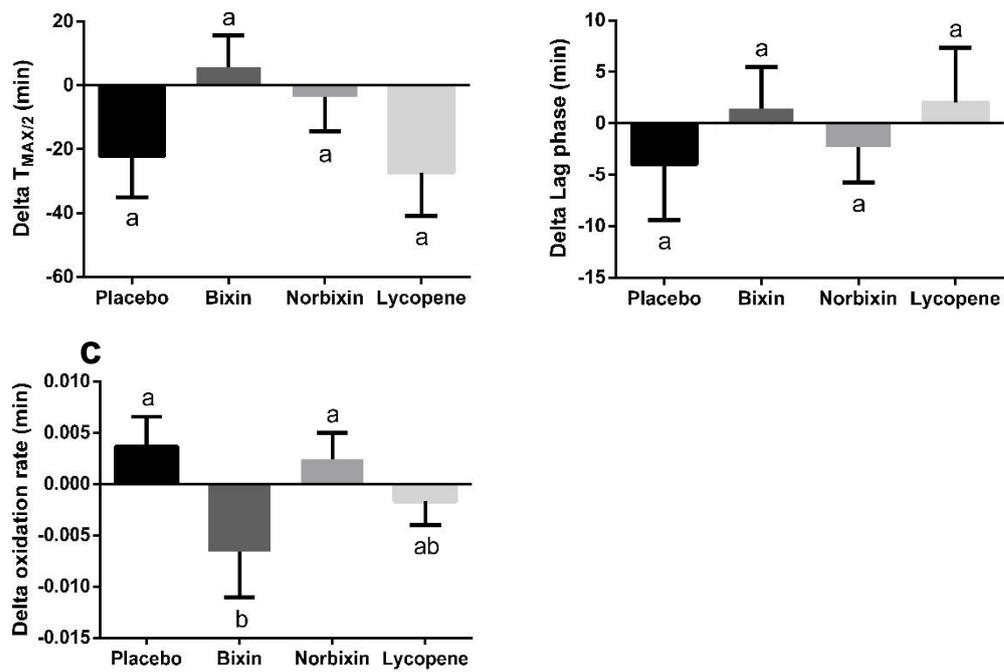


Figure 3: Effect of carotenoid supplementation on the susceptibility of LDL to Cu^{2+} -induced oxidation *ex-vivo*. The oxidation of the protein moiety was assessed as the time required to lose half-maximal tryptophan fluorescence (a), whereas the oxidation of the lipid moiety assessed as the lag time for the formation of conjugated dienes (b) and the oxidation rate (c). Results (means \pm SEM) are presented as the delta values between final and baseline values. Different letters indicate significant difference among treatments ($p < 0.1$).

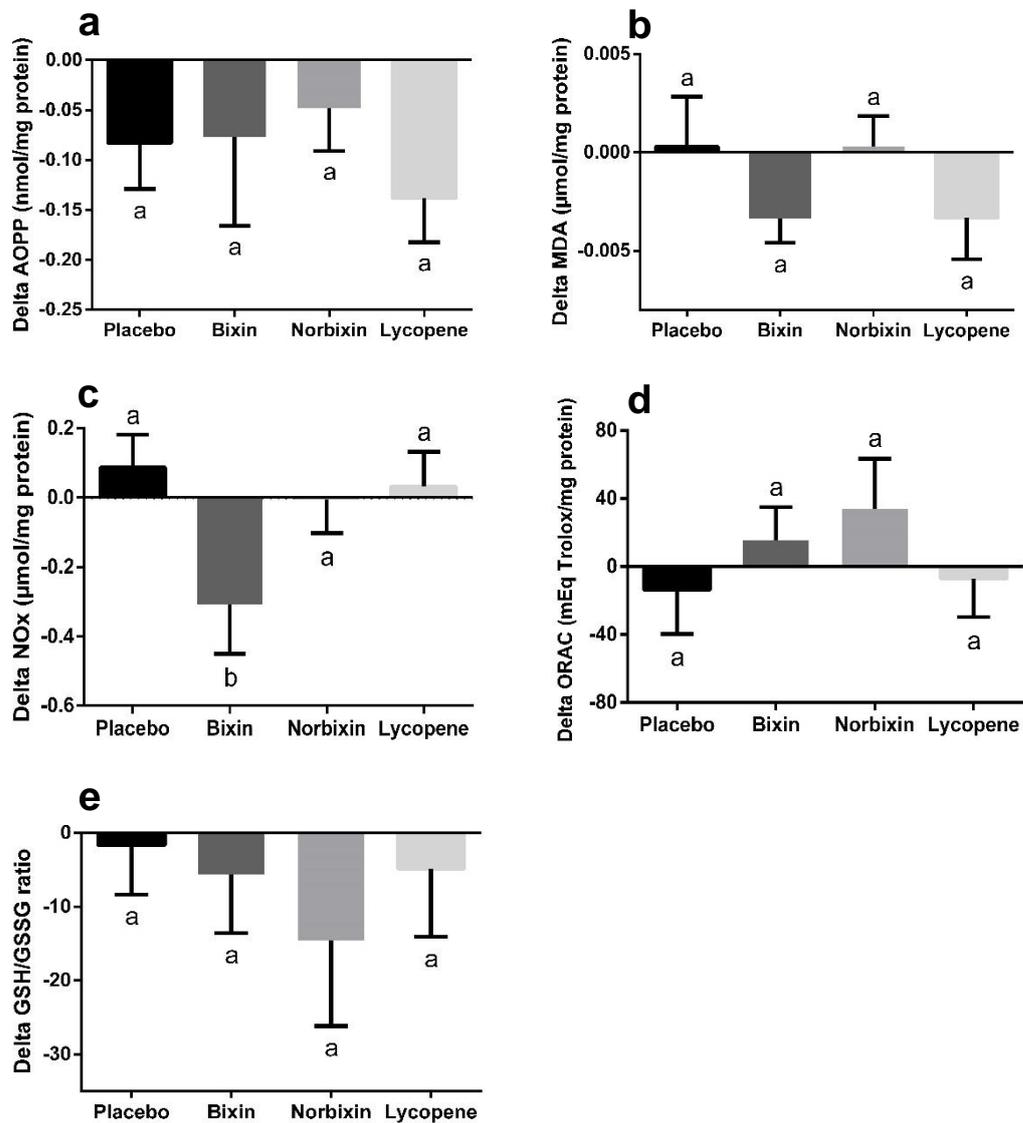


Figure 4: Effect of carotenoid supplementation on plasma protein (a) and lipid (b) oxidation, serum NOx levels (c), plasma antioxidant capacity (d) and red blood cells GSH/GSSG ratio (e). Results (means \pm SEM) are presented as the delta values between final and baseline values. Different letters indicate significant difference among treatments ($p < 0.1$). AOPP: advanced oxidation protein products, MDA: malondialdehyde, NOx: nitric oxide metabolites (nitrite and nitrate), ORAC: oxygen radical absorbance capacity, GSH: reduced glutathione, GSSG: oxidised glutathione.

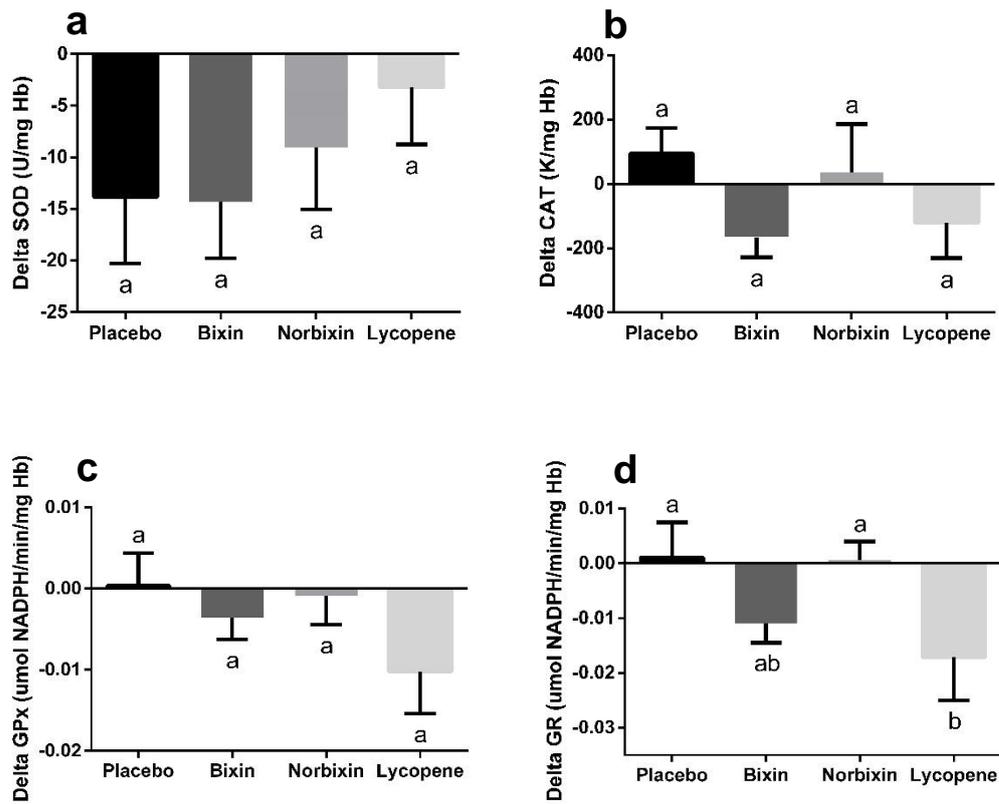


Figure 5: Effect of carotenoid supplementation on superoxide dismutase (a), catalase (b), glutathione peroxidase (c) and glutathione reductase (d) activities in red blood cells. Results (means \pm SEM) are presented as the delta values between final and baseline values. Different letters indicate significant difference among treatments ($p < 0.1$). SOD: superoxide dismutase, CAT: catalase, GPx: glutathione peroxidase, GR: glutathione reductase.

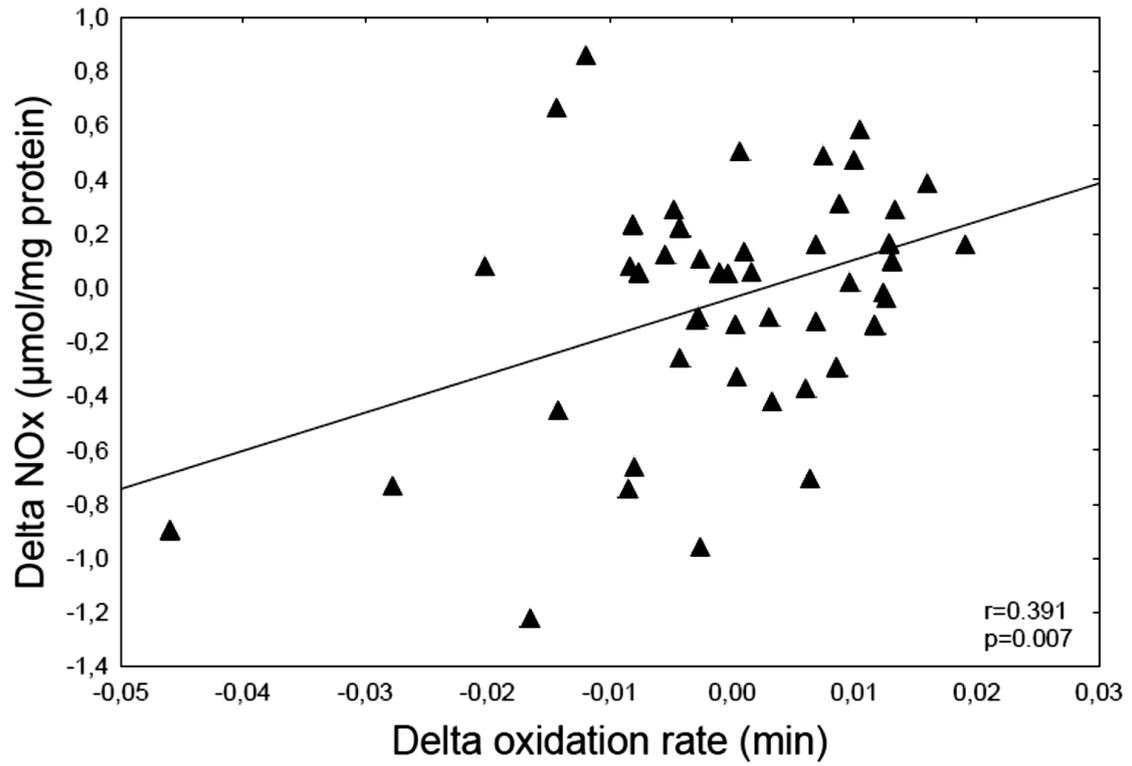


Figure 6: Relationship between serum NOx levels and the oxidation rate of the lipid moiety of LDL particles *ex vivo*. NOx: nitric oxide metabolites (nitrite and nitrate), LDL: low density lipoprotein.

3 CONCLUSÃO

Neste estudo, os efeitos da suplementação à curto prazo com a bixina e norbixina por via oral (0,05 mg/kg de peso corporal) sobre parâmetros bioquímicos, de estresse oxidativo e a suscetibilidade da LDL à oxidação induzida por cobre em indivíduos saudáveis foram demonstrados pela primeira vez. Analisando os resultados obtidos com a suplementação dos carotenoides do urucum e comparando-as aos efeitos observados com o licopeno, podemos concluir que:

- Nenhum dos carotenoides modificou significativamente o perfil lipídico sérico, a glicemia, a função renal ou hepática na dose avaliada
- A maioria dos marcadores de estresse oxidativo avaliados não foi modificada pelo tratamento com nenhum dos carotenoides
- A suplementação com bixina reduziu a taxa de oxidação máxima da LDL frente à oxidação induzida pelo cobre *ex-vivo*, indicando uma redução da sua suscetibilidade a oxidação;
- A suplementação com bixina também diminuiu os níveis séricos de NOx, e a correlação positiva entre os níveis de NOx e a taxa de oxidação máxima da porção lipídica da LDL, sugerem que este seja o mecanismo responsável pela ação protetora da bixina.
- A bixina e a norbixina não modificaram a atividade de nenhuma enzima antioxidante avaliada. No entanto, o licopeno reduziu a atividade da GR, possivelmente devido a menor necessidade de atuação dessa enzima, provocada pela maior disponibilidade de defesas antioxidantes não-enzimáticas.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, A.; RAO, A. V. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. **Canadian Medical Association Journal**, v. 163, p. 739–744, 2000.
- ARAÚJO, M. B. & MELLO, M. A. R. Exercício, estresse oxidativo e suplementação com creatina. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. 3, p. 264–272, 2009.
- BACHSCHMID, M. M. et al. Vascular aging: Chronic oxidative stress and impairment of redox signaling - Consequences for vascular homeostasis and disease. **Annals of Medicine**, v. 45, n. 1, p. 17–36, 2013.
- BARTESAGHI, S.; RADI, R. Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. **Redox Biology**, v. 14, n. September 2017, p. 618–625, 2018.
- BLACKHURST, D. M.; MARAIS, A. D. Concomitant consumption of red wine and polyunsaturated fatty acids in edible oil does not influence the peroxidation status of chylomicron lipids despite increasing plasma catechin concentration. **Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases**, v. 16, n. 8, p. 550–558, dez. 2006.
- BOCHI, G. V. **Formação de produtos proteicos de oxidação avançada a partir da reação de fenton e colágeno: efeitos sobre processos inflamatórios em neutrófilos e células renais embrionárias.** 2016.
- BRIVIBA K, SCHNABELE K, RECHKEMMER G & BUB A Supplementation of a diet low in carotenoids with tomato or carrot juice does not affect lipid peroxidation in plasma and feces of healthy men. **Journal of Nutrition**, v.134, p.1081–1083, 2004.
- BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Cell Metabolism**, v. 414, p. 813–820, 2001.
- BURROWS, T. L. et al. Plasma carotenoid levels as biomarkers of dietary carotenoid consumption: A systematic review of the validation studies. **Journal of Nutrition and Intermediary Metabolism**, v. 2, n. 1–2, p. 15–64, 2015.
- BURTON-FREEMAN, B. Postprandial metabolic events and fruit-derived phenolics: a review of the science. **The British Journal of Nutrition**, v. 104 Suppl, p. S1-14, out. 2010.
- CARROLL YLCB, MORRISSEY PA. Lipoprotein carotenoid profiles and the susceptibility of low density lipoprotein to oxidative modification in healthy elderly volunteers. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 54, p. 500-507, 2000.
- CATAPANO, A. L. et al. **2016 ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias** **European Heart Journal**, 2016.
- CHENG, H. M. et al. Tomato and lycopene supplementation and cardiovascular risk factors:

- A systematic review and meta-analysis. **Atherosclerosis**, v. 257, p. 100–108, 2017.
- CHISTÉ, R. C. **Avaliação da Extração de Compostos Bioativos com Propriedades Antioxidantes e Corantes Presentes em Urucum e Piquiá**. 2011.
- CHISTÉ, R. C.; BENASSI, M. T.; MERCADANTE, A. Z. Effect of solvent type on the extractability of bioactive compounds, antioxidant capacity and colour properties of natural annatto extracts. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, p. 1863–1870, 2011.
- COSTA-RODRIGUES, J.; PINHO, O.; MONTEIRO, P. R. R. Can lycopene be considered an effective protection against cardiovascular disease? **Food Chemistry**, v. 245, p. 1148–1153, 2018.
- DE-OLIVEIRA, A C. A X. et al. Induction of liver monooxygenases by annatto and bixin in female rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 1, p. 113–8, jan. 2003.
- DU, Q.; GELLER, D. A. **Molecular Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase**. Second Edition, Elsevier Inc., 2010.
- EGGERSDORFER, M.; WYSS, A. Carotenoids in human nutrition and health. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 652, p. 18–26, 2018.
- EMANUELLI, T.; AUGUSTI, P. R.; ROEHRS, M. Protective effects of carotenoids in cardiovascular disease and diabetes. In: **Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health**. [s.l: s.n.]. p. 347–382.
- ESFA. **The safety of annatto extracts (E 160b) as a food additive**, 2016.
- FEIGIN, V. L. et al. Global burden of stroke and risk factors in 188 countries, during 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **The Lancet Neurology**, v. 15, n. 9, p. 913–924, 2016.
- FELICISSIMO, M. P. et al. Time-of-flight secondary ion mass spectrometry and X-ray photoelectron spectroscopy analyses of Bixa orellana seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 7, p. 1810–4, 7 abr. 2004.
- FERREIRA, A.L.A. & MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61–68, 1997.
- FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: Regulation and function. **European Heart Journal**, v. 33, n. 7, p. 1–13, 2011.
- GAZZOLA, K.; VIGNA, G. B. Hypolipidemic drugs in elderly subjects: Indications and limits. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 26, n. 12, p. 1064–1070,

2016.

GOTO, T. et al. Bixin Activates PPAR α and Improves Obesity-Induced Abnormalities of Carbohydrate and Lipid Metabolism in Mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. 11952–11958, 2012.

GREGERSEN, S. et al. Inflammatory and oxidative stress responses to high-carbohydrate and high-fat meals in healthy humans. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 2012, 2012.

GRUNDY, S. M. et al. An International Atherosclerosis Society Position Paper: Global recommendations for the management of dyslipidemia - Full report. **Journal of Clinical Lipidology**, v. 8, n. 1, p. 29–60, 2014.

HAEGELE, A. D. et al. Plasma Xanthophyll Carotenoids Correlate Inversely with Indices of Oxidative DNA Damage and Lipid Peroxidation Plasma Xanthophyll Carotenoids Correlate Inversely with Indices of Oxidative DNA Damage and Lipid Peroxidation 1. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 9, n. April, p. 421–425, 2000.

HAGIWARA, A. et al. A thirteen-week oral toxicity study of annatto extract (norbixin), a natural food color extracted from the seed coat of annatto (*Bixa orellana* L .), in Sprague – Dawley rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p. 1157–1164, 2003.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radical Biology and Medicine**. 3^a ed. 2000.

HALLIWELL, B. & WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, p. 231–255, 2004.

HARRISON, D. Role of oxidative stress in atherosclerosis. **The American Journal of Cardiology**, v. 91, p. 7–11, 2003.

HEIDERSON, P. A. Forecasting the future of cardiovascular disease in the United States. **Circulation**, v. 123, p. 933–944, 2011.

HIRAYAMA, S.; MIIDA, T. Small dense LDL: An emerging risk factor for cardiovascular disease. **Clin. Chim. Acta**, v. 414, p. 215–224, 2012.

HOYTE, F. C. L.; GROSS, L. M.; KATIAL, R. K. Exhaled Nitric Oxide: An Update. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 38, n. 4, p. 573–585, 2018.

INOBUCHI, T. ET AL. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NADPH oxidase. **Diabetes**, v. 49, p. 1939–1945, 2000.

JOHNSTON, T. P. et al. Preventing cardiovascular heart disease: Promising nutraceutical and non-nutraceutical treatments for cholesterol management. **Pharmacological Research**, v.

120, p. 219–225, 2017.

KARASU, Ç. Glycooxidative stress and cardiovascular complications in experimentally-induced diabetes: Effects of antioxidant treatment. **The Open Cardiovascular Medicine Journal**, v. 4, p. 240–256, 2010.

KAULMANN, A.; BOHN, T. Carotenoids, inflammation and oxidative stress – implications of cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention. **Nutrition Research**, v.34, jul. 2014.

KIDO, T. et al. Sequential change in physicochemical properties of LDL during oxidative modification. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 193, p. 52–62, 2015.

KLOP, B. et al. Understanding postprandial inflammation and its relationship to lifestyle behaviour and metabolic diseases. **International Journal of Vascular Medicine**, v. 2012, n. Vldl, p. 947417, jan. 2012.

KOVARY, K. et al. Biochemical behaviour of norbixin during in vitro DNA damage induced by reactive oxygen species. **British Journal of Nutrition**, v. 85, n. 04, p. 431, 9 mar. 2007.

KRESANOV, P. **OXIDIZED HDL LIPIDS AND THE RISK FOR ATHEROSCLEROSIS The Cardiovascular Risk in Young Finns Study**. 2016.

KRZYSZTOF N WALISZEWSKI; GABRIELA BLASCO. Nutraceutical properties of lycopene. **Salud Pública de México**, v. 52, p. 254–265, 2010.

KULCZYŃSKI, B. et al. The role of carotenoids in the prevention and treatment of cardiovascular disease – Current state of knowledge. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 45–65, 2017.

LACY, M. et al. Interactions between dyslipidemia and the immune system and their relevance as putative therapeutic targets in atherosclerosis. **Pharmacology and Therapeutics**, p. #pagerange#, 2018.

LEVITAN, I.; VOLKOV, S.; SUBBAIAH, P. V. Oxidized LDL : v. 13, n. 1, 2010.

LEVY, L. W. et al. Bixin and norbixin in human plasma: determination and study of the absorption of a single dose of Annatto food color. **The Analyst**, v. 122, n. 9, p. 977–80, set. 1997.

LI, H.; HORKE, S.; FÖRSTERMANN, U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 237, n. 1, p. 208–219, 2014.

LIBBY, P.; RIDKER, P. M.; HANSSON, G. K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. **Nature**, v. 473, p. 317–325, 2011.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature**, v. 32, p. 2045–51, set. 2002.

LIMA, ET AL. Bixina, norbixina e quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de

- coelhos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, p. 196–200, 2001.
- LIMA, L. R. P. Ação terapêutica e inocuidade no metabolismo de quercetina, bixina e norbixina em coelhos hiperlipidêmicos. **Tecnologia & Ciência Agropecuária João Pessoa**, v. 2, p. 51–56, 2008.
- LIMA, L. R. P. Efeito de flavonoides e de corantes do urucum sobre a hiperlipidemia induzida em coelhos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 42, p. 69–74, 2010.
- LIU, K. et al. Healthy lifestyle through young adulthood and the presence of low cardiovascular disease risk profile in middle age: The Coronary Artery Risk Development in (Young) Adults (CARDIA) study. **Circulation**, v. 125, n. 8, p. 996–1004, 2012.
- LOVISCACH, M. et al. Distribution of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in human skeletal muscle and adipose tissue: relation to insulin action. **Diabetologia**, v. 43, n. 3, p. 304–11, mar. 2000.
- MITEVA, K. et al. Innate and adaptive immunity in atherosclerosis. **Vascular Pharmacology**, v. 107, n. February, p. 67–77, 2018.
- MORIYA, J. Critical roles of inflammation in atherosclerosis. **Journal of Cardiology**, 2018.
- MUELLER, L.; BOEHM, V. Antioxidant activity of β -carotene compounds in different in vitro assays. **Molecules**, v. 16, n. 2, p. 1055–1069, jan. 2011.
- NOUBIAP, J. J. et al. Prevalence of dyslipidaemia among adults in Africa: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Global Health**, v. 6, n. 9, p. e998–e1007, 2018.
- Nunes, I.L.; Mercadante, A.Z. Obtenção de cristais de licopeno a partir de descarte de tomate, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, p. 440–447, 2004.
- OBOH, G. et al. Inhibition of cyclophosphamide-induced oxidative stress in rat brain by polar and non-polar extracts of Annatto (*Bixa orellana*) seeds. **Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft für Toxikologische Pathologie**, v. 63, n. 3, p. 257–62, mar. 2011.
- OLIVEIRA, J. S. DE. Caracterização, extração e purificação por cromatografia de compostos de urucum (*Bixa orellana* L.). p. 189, 2005.
- OPAS/OMS. **Doenças cardiovasculares**.
- PARK, K.-H.; PARK, W. J. Endothelial Dysfunction: Clinical Implications in Cardiovascular Disease and Therapeutic Approaches. **Journal of Korean Medical Science**, v. 30, n. 9, p. 1213–25, 2015.
- PEDROSA, J. C. L. N. J. Teores de bixina e proteína em sementes de urucum em função do tipo e do período de armazenagem. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e**

Ambiental, v. 3, n. 1, p. 121–123, 1999.

PINZÓN-GARCÍA, A. D. et al. Evidence of hypoglycemic, lipid-lowering and hepatoprotective effects of the Bixin and Bixin: β -CD inclusion compound in high-fat-fed obese mice. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 106, n. June, p. 363–372, 2018.

PIRINCCIOGLU, A. G. et al. Malondialdehyde (MDA) and protein carbonyl (PCO) levels as biomarkers of oxidative stress in subjects with familial hypercholesterolemia. **Clinical Biochemistry**, v. 43, n. 15, p. 1220–1224, 2010.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55–74, 2015.

POWERS, S.K. & LENNON, S. L. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 58, p. 1025–1033, 1999.

RICCIONI, G. et al. Novel phytonutrient contributors to antioxidant protection against cardiovascular disease. **Nutrition**, v. 28, n. 6, p. 605–610, 2012.

RIZZO, M. et al. Atherogenic dyslipidemia and oxidative stress: a new look. **Translational Research**, v. 153, n. 5, p. 217–23, maio 2009.

ROCHETTE, L. et al. Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: Possible therapeutic targets? **Pharmacology and Therapeutics**, v. 140, n. 3, p. 239–257, 2013.

RODRIGUES, E.; MARIUTTI, L. R. B.; MERCADANTE, A. Z. Scavenging capacity of marine carotenoids against reactive oxygen and nitrogen species in a membrane-mimicking system. **Marine Drugs**, v. 10, n. 8, p. 1784–1798, 2012.

RODRIGUES, S. M. et al. Isolation and purification of RNA from tissues rich in polyphenols, polysaccharides, and pigments of annatto (*Bixa orellana* L.). **Molecular Biotechnology**, v. 37, n. 3, p. 220–4, nov. 2007.

ROEHRS, M. et al. Bixin and norbixin have opposite effects on glycemia, lipidemia, and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. **International Journal of Endocrinology**, v. 2014, p. 839095, jan. 2014.

ROEHRS, M. et al. Annatto carotenoids attenuate oxidative stress and inflammatory response after high-calorie meal in healthy subjects. **Food Research International**, v. 100, n. August, p. 771–779, 2017.

ROVER, J. R. L, ET AL. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado à métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, p. 112–119, 2001.

- RUSSELL, K. R. M. et al. Hypoglycaemic activity of Bixa orellana extract in the dog. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, v. 30, n. 4, p. 301–305, maio 2008.
- SALVAYRE, R.; NEGRE-SALVAYRE, A.; CAMARE, C. Oxidative theory of atherosclerosis and antioxidants. **Biochimie**, v. 125, p. 281–296, 2016.
- SCHNEIDER, C.D. & OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, p. 308–313, 2004.
- SCICCHITANO, P. et al. Nutraceuticals and dyslipidaemia: Beyond the common therapeutics. **Journal of Functional Foods**, v. 6, n. 1, p. 11–32, 2014.
- SILASTE M.L. et al. Tomato juice decreases LDL cholesterol levels and increases LDL resistance to oxidation. **British Journal of Nutrition**, v.98, p.1251–1258, 2007.
- SILVA, C. R.; ANTUNES, L. M.; BIANCHI, M. L. Antioxidant action of bixin against cisplatin-induced chromosome aberrations and lipid peroxidation in rats. **Pharmacological Research**, v. 43, n. 6, p. 561–6, jun. 2001.
- SOMACAL, S. et al. The antiatherogenic effect of bixin in hypercholesterolemic rabbits is associated to the improvement of lipid profile and to its antioxidant and anti-inflammatory effects. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 403, n. 1–2, p. 243–253, 2015.
- SOMACAL, S. **Potencial Antiaterogênico da Bixina in Vivo e in Vitro**. 2016
- STANGL, V. et al. Lack of effects of tomato products on endothelial function in human subjects: results of a randomised, placebo-controlled cross-over study. **British Journal of Nutrition**, v. 105, p. 263–267, 2011.
- STEINBERG, D. The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an update. **Journal of Lipid Research**, v. 50, n. Supplement, p. S376–S381, 2009.
- STEINBERG, D.; WITZTUM, J. L. Oxidized Low-Density Lipoprotein and Atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 30, n. 12, p. 2311–2316, 2010.
- STRINGHETA, P. C.; SILVA, P. I. **Pigmentos de Urucum: Extração, Reações Químicas, Usos e Aplicações**. 1. ed. Viçosa-MG: Gráfica e Editora Suprema, 2008. 166p.
- SUMBRIA, R.; FISHER, M. **Endothelium**. Second Ed ed. [s.l.] Elsevier, 2017.
- TABAS, I.; GARCÍA-CARDEÑA, G.; OWENS, G. K. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. **Journal of Cell Biology**, v. 209, n. 1, p. 13–22, 2015.
- TAKAHASHI, N. et al. Bixin regulates mRNA expression involved in adipogenesis and enhances insulin sensitivity in 3T3-L1 adipocytes through PPARgamma activation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 390, n. 4, p. 1372–6, 25 dez.

2009.

TAO, S. et al. Systemic administration of the apocarotenoid bixin protects skin against solar UV-induced damage through activation of NRF2. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 89, p. 690–700, 2015.

TEBAY, L. E. et al. Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 88, p. 108–146, 2015.

TEERLINK, T. et al. Combined data from LDL composition and size measurement are compatible with a discoid particle shape. **Journal of Lipid Research**, v. 45, n. 5, p. 954–966, 2004.

THORP, E.; TABAS, I. Mechanisms and consequences of efferocytosis in advanced atherosclerosis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 86, n. 5, p. 1089–1095, 2009.

TOCCHNI, L; MERCADANTE, A. Z. Extração e determinação, por CLAE, de bixina e norbixina em coloríficos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 3, p. 310–313, 2001.

TSITSIMPIKOU, C. et al. Dietary supplementation with tomato-juice in patients with metabolic syn- drome: a suggestion to alleviate detrimental clinical factors. **Food Chemical Toxicology**, v. 74, p. 9-13, 2014.

UPRITCHARD, J.E.; SUTHERLAND, W.H.F.; MANN, J.I. Effect of supplementation with tomato juice, vitamin E, and vitamin C on LDL oxidation and products of in- flammatory activity in type 2 diabetes, **Diabetes Care**, V. 23, p.733-738, 2000.

VAN DAM, A. D. et al. Targeting white, brown and perivascular adipose tissue in atherosclerosis development. **European Journal of Pharmacology**, v. 816, p. 92–92, 2017.

VAZATTA, R. ET AL. Exercício Físico e Mecanismo Antioxidante de Defesa. **Revista Saúde**, v. 11, p. 7–15, 2009.

VILAR, D. D. A. et al. Traditional Uses, chemical constituents, and biological activities of Bixa Orellana L.: A review. **Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

VIOLA, J.; SOEHNLEIN, O. Atherosclerosis - A matter of unresolved inflammation. **Seminars in Immunology**, v. 27, n. 3, p. 184–193, 2015.

WHEELER-JONES, C. P. D. Chylomicron remnants: mediators of endothelial dysfunction? **Biochemical Society Transactions**, v. 35, n. Pt 3, p. 442–5, jun. 2007.

WHO. **Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control**. [s.l: s.n.].

Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241564373_eng.pdf>.

WHO. **The top 10 causes of death**, 2018.

XAPLANTERIS, P. et al. Tomato paste sup- plementation improves endothelial dynamics and

reduces plasma total oxidative status in healthy subjects, **Nutrition Research**, v. 32, p. 390-394, 2012.

XAVIER, H. T. et al. V DIRETRIZ BRASILEIRA DE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 101, n. 4, supl.1, p. 1–20, 2013.

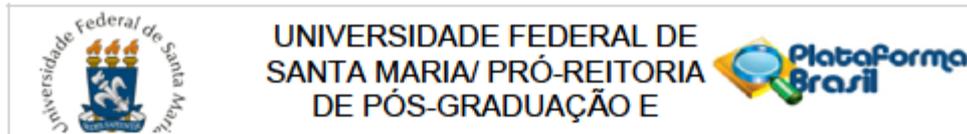
XU, Z.; KONG, X. Q. Bixin ameliorates high fat diet-induced cardiac injury in mice through inflammation and oxidative stress suppression. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 89, p. 991–1004, 2017.

YAHIA, E. M. et al. Chemistry, stability and biological actions of carotenoids. In: **Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry and human health**. [s.l: s.n.]. p. 285–346.

YOSHIDA, H.; KISUGI, R. Mechanisms of LDL oxidation. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, n. 23–24, p. 1875–1882, 2010.

ZHAO, J. Y. et al. An integrated method of therapeutic lifestyle change for older adults with dyslipidaemia. **Public Health**, v. 148, n. 134, p. 30–36, 2017.

ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO DE PESQUISA PELO CEP/UFMS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EFEITO DE CAROTENOIDES SOBRE A RESISTÊNCIA DA LDL À OXIDAÇÃO E O ESTATUS ANTIOXIDANTE EM INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS

Pesquisador: Tatiana Emanuelli

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 68801917.0.0000.5346

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Maria/ Pró-Reitoria de Pós-Graduação e

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

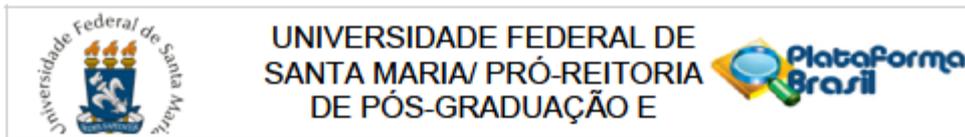
DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.121.710

Apresentação do Projeto:

Estudos epidemiológicos mostraram que a presença de alguns carotenoides no sangue, como o licopeno (LIC), está relacionada a um menor risco de sofrer um evento cardiovascular. Diversos medicamentos e suplementos à base de licopeno foram desenvolvidos a fim de prevenir e tratar a aterosclerose, principalmente devido a sua capacidade de diminuir a oxidação da LDL. A bixina (BIX) e a norbixina (NBIX) são carotenoides presentes nas sementes do urucum (*Bixa orellana*) e são amplamente utilizados pela indústria de alimentos como corantes. Alguns estudos já demonstraram que esses compostos apresentam um potencial antioxidante e antiaterogênico *in vitro* e em modelos animais, no entanto, não há relatos na literatura sobre esses efeitos em humanos. Sendo assim, o objetivo desse projeto é avaliar o potencial antiaterogênico do consumo a curto prazo de carotenoides do urucum em indivíduos saudáveis, utilizando o licopeno como controle positivo. Será avaliado o efeito da suplementação diária com BIX (6 mg/kg/dia), NBIX (0,3 mg/kg/dia), LIC (0,5 mg/kg/dia) ou placebo em 16 voluntários saudáveis (8 homens e 8 mulheres) por 7 dias sobre a suscetibilidade da LDL à oxidação induzida por cobre, capacidade antioxidante do plasma, atividade e expressão de enzimas antioxidantes, razão GSH/GSSG e níveis de MDA em eritrócitos isolados. Será realizado um ensaio clínico randomizado, duplo cego, controlado com placebo e com delineamento cruzado com retorno, com washout de 21 dias. Os resultados desta

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar
Bairro: Camobi **CEP:** 97.105-970
UF: RS **Município:** SANTA MARIA
Telefone: (55)3220-9362 **E-mail:** cep.ufsm@gmail.com



Continuação do Parecer: 2.121.710

pesquisa contribuirão para determinar se o consumo de carotenoides do urucum possui efeito antiaterogênico em indivíduos saudáveis de forma comparável ao licopeno, além de elucidar os mecanismos envolvidos no efeito antioxidante destes compostos em humanos.

Objetivo da Pesquisa:

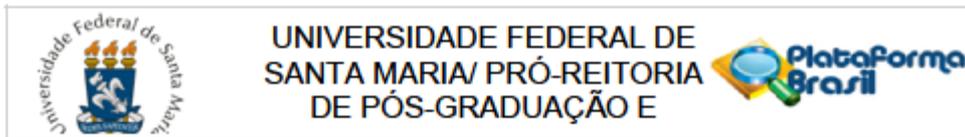
- Avaliar o potencial antiaterogênico e antioxidante do tratamento de curta duração (7 dias) por via oral com carotenoides do urucum (BIX, NBIX) em indivíduos saudáveis, comparando-se aos efeitos do licopeno.
- Investigar o efeito do tratamento com carotenoides sobre a suscetibilidade da LDL a oxidação induzida por cobre ex-vivo;
- Verificar se o tratamento com carotenoides modula a expressão e a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx em leucócitos;
- Avaliar se o tratamento com carotenoides modula o estatus antioxidante do plasma e eritrócitos, através da avaliação da capacidade antioxidante total pelo método de ORAC, dos níveis de MDA e a razão GSH/GSSG;
- Analisar a formação dos AOPP ex-vivo no plasma;
- Determinar a concentração plasmática dos carotenoides após o tratamento.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Existe o risco dos participantes se sentirem constrangidos durante o questionário ou em outros momentos da pesquisa, podendo desistir do estudo sem prejuízos para ambas as partes. Os sujeitos podem ter dificuldade ou não se sentirem a vontade ao consumir os tratamentos e/ou com as restrições da dieta, podendo se retirar da pesquisa a qualquer momento.

As doses diárias de carotenoides escolhidas para este estudo correspondem aos seus valores de IDA estabelecidos pela Autoridade Europeia de Segurança de Alimentos (ESFA, 2016 e ESFA, 2010) e portanto são consideradas seguras para ingestão humana. Salieta-se ainda, que segundo a OMS os valores de IDA para a BIX e NBIX são o dobro dos valores estabelecidos pela EFSA, o que reforça a grande margem de segurança adotada neste estudo (JECFA, 2008). No entanto, vale ressaltar que caso algum voluntário apresente qualquer intolerância ou desconforto gastrointestinal (náuseas, vômito, diarreia, etc.) decorrente da suplementação com os carotenoides, o mesmo será excluído do estudo imediatamente.

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar
 Bairro: Camobi CEP: 97.105-970
 UF: RS Município: SANTA MARIA
 Telefone: (55)3220-9362 E-mail: cep.ufsm@gmail.com



Continuação do Parecer: 2.121.710

O procedimento de coleta de sangue apresenta baixo risco e desconforto para os indivíduos, no entanto, pode levar a formação de hematomas locais, que serão tratados pela aplicação de gel ou pomada que auxiliam na absorção do hematoma e de massagem local, sem nenhum custo para os participantes da pesquisa.

Os resultados dos exames realizados pelos voluntários serão entregues aos mesmos por e-mail ou correspondência via Correio, de acordo com a preferência de cada um. Assim, a pesquisa permitirá aos voluntários a verificação do estado de saúde atual, através da avaliação da glicemia, hemoglobina glicada, perfil lipídico e marcadores de função hepática e renal. Em caso de anormalidades no resultados dos exames, os participantes serão orientados a procurar um médico para melhor avaliação do seu estado de saúde.

Esta pesquisa terá benefícios por investigar se o consumo de carotenoides pode auxiliar na prevenção da aterosclerose, por proteger a LDL de modificações oxidativas e melhorar as defesas antioxidantes do organismo; auxiliando na prevenção e controle das DCV.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

São apresentados de forma adequada.

Recomendações:

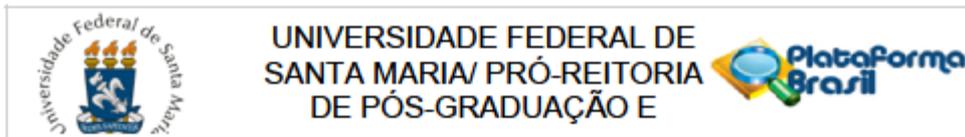
Veja no site do CEP - <http://w3.ufsm.br/nucleodecomites/index.php/cep> - na aba "orientações gerais", modelos e orientações para apresentação dos documentos. ACOMPANHE AS ORIENTAÇÕES DISPONÍVEIS, EVITE PENDÊNCIAS E AGILIZE A TRAMITAÇÃO DO SEU PROJETO.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

.

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar
 Bairro: Camobi CEP: 97.105-970
 UF: RS Município: SANTA MARIA
 Telefone: (55)3220-9362 E-mail: cep.ufsm@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA
DE PÓS-GRADUAÇÃO E

Continuação do Parecer: 2.121.710

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_910887.pdf	23/05/2017 20:24:06		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	23/05/2017 20:23:34	Tatiana Emanuelli	Aceito
Outros	projetogap.pdf	03/05/2017 17:29:18	Tatiana Emanuelli	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projetointegra.pdf	03/05/2017 17:26:32	Tatiana Emanuelli	Aceito
Outros	Financiamento.pdf	03/05/2017 16:51:35	Tatiana Emanuelli	Aceito
Outros	Confidencialidade.pdf	03/05/2017 16:49:59	Tatiana Emanuelli	Aceito
Outros	autorizacaoins.pdf	03/05/2017 16:49:06	Tatiana Emanuelli	Aceito
Folha de Rosto	folharostofinal.pdf	03/05/2017 16:47:28	Tatiana Emanuelli	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SANTA MARIA, 14 de Junho de 2017

Assinado por:
CLAUDEMIR DE QUADROS
(Coordenador)

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar
 Bairro: Camobi CEP: 97.105-970
 UF: RS Município: SANTA MARIA
 Telefone: (55)3220-9362 E-mail: cep.ufsm@gmail.com