

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

**QUANTIFICAÇÃO DE α -TOCOFEROL, RETINOL E
CAROTENÓIDES E SEUS POSSÍVEIS EFEITOS
SOBRE A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM
TRABALHADORES EXPOSTOS
A SOLVENTES**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Mariele Feiffer Charão

**Santa Maria, RS, Brasil
2011**

PPGF/UFSM, RS

CHARÃO, Mariele Feiffer

Mestre

2011

**QUANTIFICAÇÃO DE α -TOCOFEROL, RETINOL E
CAROTENÓIDES E SEUS POSSÍVEIS EFEITOS SOBRE A
PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM TRABALHADORES
EXPOSTOS A SOLVENTES**

Mariele Feiffer Charão

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Neuropsicofarmacologia e Imunofarmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de

Mestre em Farmacologia

Orientador (a): Profa. Dra. Solange Cristina Garcia

**Santa Maria, RS, Brasil
2011**

C469q Charão, Mariele Feiffer
Quantificação de a-tocoferol, retinol e carotenóides e seus possíveis efeitos sobre a peroxidação lipídica em trabalhadores expostos a solventes / por Mariele Feiffer Charão. – 2011.
133 f. ; il. ; 30 cm

Orientador: Solange Cristina Garcia
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, RS, 2011

1. Farmacologia 2. Vitaminas lipossolúveis 3. Exposição ocupacional
4. Peroxidação lipídica 5. Estresse oxidativo 6. Antioxidantes I. Garcia, Solange Cristina II. Título.

CDU 615

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**QUANTIFICAÇÃO DE α -TOCOFEROL, RETINOL E
CAROTENÓIDES E SEUS POSSÍVEIS EFEITOS SOBRE A
PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM TRABALHADORES EXPOSTOS
A SOLVENTES**

elaborada por
Mariele Feiffer Charão

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Solange Cristina Garcia, Dra.
(Presidente/Orientador)

Simone Cardoso, Dra.
(UFSC)

Adriana Gioda, Dra.
(PUC/RJ)

Santa Maria, 18 de fevereiro de 2011.

*Dedico este trabalho aos meus amados pais **Ivo** e **Ione**, que são meu alicerce, meus maiores incentivadores e admiradores. Com quem posso contar sempre e que sei que posso sempre recorrer. Agradeço todos os dias por terem me ensinado os verdadeiros valores da vida e por lutar por aquilo que almejo; por estarem sempre ao meu lado, por todo amor e dedicação para que eu conseguisse terminar mais uma etapa em minha vida.*

Vocês são meu tesouro maior!

*Dedico também, aos meus irmãos, **Ivania**, **Iégide**, **Alex** e **Daniele**, nossa grande família, por serem companheiros e incentivadores também da minha conquista.*

Obrigada por todo carinho!

*Dedico também, ao meu noivo, **Dedê**, por todo amor, paciência, renúncias e mudanças que acabou fazendo por mim. Agradeço todos os dias por fazer parte da minha vida, por tornar meus dias mais leves, ser 'minha válvula de escape' e por toda compreensão e ajuda no decorrer deste trabalho.*

Obrigada por todo companheirismo, incentivo e amor!

Amo muito vocês!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A professora **Dr^a Solange Cristina Garcia**, exemplo de dedicação, persistência e garra, sempre estimulando o crescimento profissional. Agradeço pela oportunidade de realizar este trabalho e por todos os ensinamentos transmitidos. Por tentar tornar possível a realização dos inúmeros projetos que orienta, buscando sempre dar as ferramentas necessárias para a realização dos mesmos. Agradeço por todo apoio recebido, pelos anos de convivência e amizade adquirida no decorrer dos anos. Obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, força, saúde e por ter tudo aquilo que preciso para ser feliz. Obrigada por iluminar meus caminhos e por me rodear de pessoas que eu amo e me fazem tão bem.

A toda a família: pais, irmãos, Vó Matilde, tia Leka, sobrinhos Joan e Heitor. Muito obrigada pelo apoio, amizade e carinho. Agradeço todos os dias pela “Big Family” que Deus me deu, pois vocês são meu tesouro maior e com quem posso contar para toda minha vida. Obrigada Vó Matilde e tia Leka (minha “mãe do coração”) por todas as orações e palavras de incentivo. Obrigada Bi por ser minha “mãe em POA”, por toda ajuda e alegria que transmite. Bodinha por ser tão interessada, querer sempre me ajudar, obrigada pelos conselhos e por ser tão presente mesmo tão longe. Maninho, obrigada por sempre torcer pelo meu sucesso. Dani, obrigada pelos anos de convivência, pelo apoio e por torcer por mim. Meus sobrinhos amados, obrigada por trazerem tanta alegria para a nossa família. Obrigada por tudo. Amo todos vocês.

Aos meus sogros Edevar e Eliane, por me tratarem não como nora, mas como uma filha. Obrigada por tudo.

Ao meu noivo por estar sempre me apoiando e incentivando. Obrigada por me conhecer tão bem, me colocar “pra cima” quando os experimentos davam errados, por me fazer rir sempre e por me fazer tão feliz. Agradeço também por toda paciência e companheirismo em todos esses anos. Te amo muito.

As minhas grandes amigas, Vani, Malu, Lelê, Mila, Pâmela. Obrigada pela amizade de muitíssimos anos, pelos momentos de lazer, por todas as conversas via msn, alegrias e sorrisos. Malu e família, obrigada pela grande ajuda em POA, me acolhendo com tanto carinho na casa de vocês. Vani e Rodolfo, obrigada pelas inúmeras caronas, tornando meu namoro à distância bem menos distante, e também pelos momentos inesquecíveis que nós quatro passamos juntos. Mila e Vasco, obrigada pelas ‘desopiladas’ que me proporcionavam. Lelê e Pâmela, obrigada por se fazerem presente na minha vida mesmo com a distância. Obrigada Inezita e Tia Iza por todo carinho e apoio. Agradeço a Deus por povoar a minha vida com verdadeiros amigos.

A todos os meus colegas do LATOX. Obrigada aos eternos colegas e amigos “latoxianos” que já passaram pelo laboratório ou ficaram em Santa Maria, obrigada pelos vários momentos vividos no LATOX/SM, com muitas risadas, análises, projetos, aprendizado e mais risadas. Obrigada também aos remanescentes: Angela, Natália, Rachel, Juzinha e Fernando, e novos integrantes: Bruna, Elisa, Fernanda, Gabriela, Gilian, Guilherme, Juliano, Marília e Sabrina, agora do LATOX/POA. Agradeço por todo o suporte técnico na realização do projeto de mestrado, por toda disposição e esforço. Obrigada por tudo.

As minhas colegas e amigas de graduação e pós-graduação, Luzi e Sílvia. Obrigada pelo convívio, conversas, risadas e companheirismo ao longo desses anos. Adoro muito vocês.

À Empresa METASA/SA Indústria Metalúrgica, em especial à Técnica de Enfermagem Terezinha Pedrolo, pela receptividade, atenção dispensada e colaboração com este trabalho.

Aos professores Adriana Gioda, Simone Cardoso e Leandro Machado de Carvalho por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta dissertação.

A UFSM e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia (professores e funcionários) pela oportunidade de realizar o mestrado.

A CAPES/REUNI pelo fomento através da concessão da bolsa.

A todos os amigos e demais pessoas que não foram citados, mas que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria

QUANTIFICAÇÃO DE α -TOCOFEROL, RETINOL E CAROTENÓIDES E SEUS POSSÍVEIS EFEITOS SOBRE A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM TRABALHADORES EXPOSTOS A SOLVENTES

AUTORA: MARIELE FEIFFER CHARÃO
ORIENTADOR (A): SOLANGE CRISTINA GARCIA
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 18 de fevereiro de 2011.

O estresse oxidativo é um processo caracterizado pela diminuição do sistema de defesa antioxidante e/ou por uma produção excessiva de espécies reativas (ERs). As ERs são substâncias capazes de lesar proteínas, lipídios e DNA. Quando os lipídios são atingidos ocorre um processo chamado de peroxidação lipídica que leva ao aumento nos níveis de malondialdeído (MDA). O estresse oxidativo está envolvido com a patogênese de muitas doenças crônicas, como diabetes, câncer, doença de Parkinson e em danos teciduais em expostos a agentes químicos, como neurotoxicidade, hematotoxicidade e nefrotoxicidade. Sabe-se que existe uma estreita relação entre os solventes orgânicos, presentes em tintas, e o estresse oxidativo. Diante disso, o organismo dispõe de um elaborado sistema de defesa antioxidante, os antioxidantes exógenos, como as vitaminas lipossolúveis e o sistema endógeno como enzimas antioxidantes. Dessa forma, nesse estudo foi primeiramente otimizada e validada metodologia para simultânea quantificação de antioxidantes exógenos: retinol, α -tocoferol, licopeno e β -caroteno, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-VIS/fluorescência). Os parâmetros analíticos de validação analisados foram linearidade, precisão, exatidão, recuperação e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ). Para todas as vitaminas analisadas, os coeficientes de regressão linear foram $> 0,99$; CV% $< 5\%$; bias% $< \pm 6\%$; recuperação $> 92\%$ e os valores de LD e LQ obtidos foram satisfatórios para aplicação na rotina clínica. O método validado foi aplicado em um grupo de expostos ocupacionalmente a tintas (n=45) e um grupo de não expostos (controle, n=30). Os resultados indicaram que todas as vitaminas, exceto a vitamina E, foram significativamente menores no grupo exposto. Além disso, avaliou-se o possível efeito protetivo de antioxidantes exógenos e endógenos sobre o dano lipídico. Foram realizadas as dosagens dos antioxidantes endógenos, glutathione reduzida (GSH) em eritrócitos, das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) em sangue total por métodos espectrofotométricos e os níveis de malondialdeído (MDA) em plasma por CLAE-VIS nos dois grupos de estudo, expostos (n=42) e controles (n=28). A monitorização biológica foi realizada através da dosagem de tolueno sanguíneo, uma vez que, em trabalhos prévios, foi sugerido que este solvente seria o principal indutor de peroxidação lipídica. Apesar dos baixos níveis de tolueno sanguíneo encontrados, os trabalhadores expostos apresentaram níveis de MDA e atividade das enzimas antioxidantes (SOD e CAT) significativamente elevados, quando comparados com o grupo controle e esse aumento foi acompanhado de depleção nos níveis de GSH. Ainda, foram observadas várias correlações entre os níveis de MDA e os antioxidantes

endógenos enzimáticos (SOD e CAT) e não enzimático (GSH) e ainda com as vitaminas lipossolúveis, exceto vitamina E. Através de testes estatísticos foram avaliados quais antioxidantes teriam uma maior influência nos níveis de MDA. Dentre os antioxidantes analisados, a GSH e os carotenóides (principalmente o β -caroteno) foram sugeridos como principais responsáveis pela redução da peroxidação lipídica. Com isso, pode-se sugerir que aumento nos níveis de carotenóides, via dieta, tendem a diminuir o dano lipídico em indivíduos ocupacionalmente expostos a solventes constituintes de tintas.

Palavras-chave: Vitaminas lipossolúveis. Exposição ocupacional. Peroxidação lipídica. Estresse oxidativo. Antioxidantes.

ABSTRACT

Master dissertation
Post Graduate Course on Pharmacology
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

QUANTIFICATION OF α -TOCOPHEROL, RETINOL E CAROTENOIDS AND THEIR POSSIBLE EFFECTS ON LIPID PEROXIDATION IN WORKERS EXPOSED TO SOLVENTS

AUTHOR: MARIELE FEIFFER CHARÃO
ADVISER: SOLANGE CRISTINA GARCIA

Date and place of the defense: Santa Maria, february 18, 2011.

Oxidative stress is a process characterized by the antioxidant defense system decrease and/or an excessive reactive species (RS) production. RS are substances capable of attacking proteins, lipids and DNA. The oxidative damage caused to lipids is known as lipid peroxidation, which leads to the increase of malondialdehyde (MDA) levels. Oxidative stress is involved in the pathogenesis of many chronic diseases, including diabetes, cancer, Parkinson's disease and damaged tissue in exposed to chemical agents, such as neurotoxicity, hematotoxicity and nephrotoxicity. It is known that there is a close relation between organic solvents, present in paints, and oxidative stress. Thus, the body has an elaborate antioxidant defense system, the exogenous antioxidants, such as lipid soluble vitamins, and the endogenous system, such as antioxidant enzymes. In this study a method has been validated and optimized for simultaneous quantification of retinol, α -tocopherol, lycopene and β -carotene using high performance liquid chromatography (HPLC-UV/fluorescence). The analytical parameters of validation analyzed were linearity, precision, accuracy, recovery and limits of detection (LOD) and quantification (LOQ). For all the vitamins analyzed, the linear regression coefficients were > 0.99 , $CV\% < 5\%$; $\% \text{ bias} < \pm 6\%$ recovery $> 92\%$ and the LOD and LOQ values obtained were satisfactory for routine clinical application for all analytes. The validated method was applied to a group of occupationally exposed to paints ($n = 45$) and a non-exposed group (control group, $n = 30$). The results indicated that all vitamins, except vitamin E, were significantly lower in the exposed group. Moreover, the possible correlation between endogenous and exogenous antioxidants and lipid damage was evaluated. Quantifications were done to assess endogenous antioxidants, reduced glutathione (GSH) in erythrocytes, the enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in whole blood through spectroscopic methods, and malondialdehyde (MDA) levels in plasma through HPLC-VIS in both study groups, exposed ($n=42$) and controls ($n=28$). The biological monitoring was performed by measurement of blood toluene, since in previous studies, it was suggested that this solvent would be the major inducer of lipid peroxidation. Despite the low levels of toluene found, exposed workers presented higher levels of MDA and the antioxidant enzymes (SOD and CAT) activities were significantly elevated when compared with the control group; and this increase was accompanied by depletion of GSH levels. Also, several correlations were observed between MDA and the enzymatic (SOD and CAT) and non-enzymatic antioxidants (GSH), and with lipid-soluble vitamins as well, except vitamin E. Through statistical tests the antioxidants which have a greater influence on the levels of MDA were evaluated. Among the antioxidants tested, GSH and carotenoids (mainly β -carotene) were suggested as main responsible for the reduction of lipid peroxidation.

Thus, it can be suggested that high intakes of exogenous antioxidants, such as carotenoids,, tend to decrease lipid damage in occupationally exposed individuals to solvents constituent of paints.

Key-words: Lipid-soluble vitamins. Occupational exposure. Lipid peroxidation. Oxidative stress. Antioxidants.

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO I

TABLE 1 - Equations obtained by the squared regression coefficients for standard calibration and standard spiked curver.....	81
TABLE 2 - Results of validation parameters: precision, accuracy and recoveries for plasma spiked samples with the vitamins.....	81
TABLE 3 - Results of validation parameters: LOD and LOQ.....	82
TABLE 4 - Plasma lycopene, retinol, α -tocopherol and β -carotene levels of the subjects studied (n=75).....	82

MANUSCRITO II

TABLE 1 - Exogenous antioxidants levels found in plasma of the studied groups. The unit is $\mu\text{mol.L}^{-1}$ for all vitamins analyzed by HPLC (visible and fluorescent detectors).....	106
TABLE 2 - Endogenous antioxidants – enzymatics (activities) and nonenzimatic (GSH levels) – in exposed group compared with nonexposed group (control).....	107

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

DISSERTAÇÃO

FIGURA 1 - Etapas do processo de peroxidação lipídica.....	27
FIGURA 2 - Sistema antioxidante enzimático endógeno.....	30
FIGURA 3 - Interconversão da glutathiona nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR).....	33
FIGURA 4 - Estruturas químicas de tocoferóis e tocotrienóis.....	33
FIGURA 5 - Estrutura da vitamina A e de seus derivados.....	36
FIGURA 6 - Principais carotenóides encontrados no plasma.....	40

MANUSCRITO I

FIGURE 1 – Typical standard chromatograms of vitamins mixture analyzed by HPLC, without plasma. A: Fluorimetric detector adjusted at $\lambda_{ex}=328$ nm and $\lambda_{em}=520$ nm for retinol; $\lambda_{ex}=280$ nm and $\lambda_{em}=328$ nm for α -tocopherol, being (1) Retinol; (2) α -tocopherol. B: VIS detector adjusted at $\lambda=450$ nm; (3) Lycopene; (4) β -carotene.....	83
FIGURE 2 – Typical chromatograms of human plasma sample, analyzed by the method described in the present article, without spiked. A: Fluorimetric detector adjusted at $\lambda_{ex}=328$ nm and $\lambda_{em}=520$ nm for retinol; $\lambda_{ex}=280$ nm and $\lambda_{em}=328$ nm for α -tocopherol, being (1) Retinol; (2) α -tocopherol. B: VIS detector adjusted at $\lambda=450$ nm; (3) Lycopene; (4) β -carotene.....	84
FIGURE 3 – Stability tests with plasma samples stored at -20°C , being “0” the collection day and until 90 days after.....	85
FIGURE 4 – Stability tests with plasma samples after extraction with organic solvents stored at -20°C for until 90 days after.....	85

MANUSCRITO II

FIGURE 1 – Plasma MDA levels (μM) from nonexposed group (n=28) and exposed group (n=42). Data are expressed as mean \pm SD, being *p<0.001.....108

FIGURE 2 – *Spearman* correlation. A: correlation between plasma MDA levels vs. erythrocytes GSH levels ($r^2= -0.42$; p<0.001); B: MDA levels vs. plasma lycopene levels ($r^2= -0.26$; p<0.05); C: MDA levels vs. plasma β -carotene levels ($r^2= -0.27$; p<0.05); D: MDA levels vs. plasma retinol levels ($r^2= -0.24$; p<0.05).....108

LISTA DE ABREVIATURAS

4-HNE - 4-Hidroxinonenal

ACGIH – American Conference of Governmental Industrial Hygienists /
Conferência Americana de Higienistas Industriais Governamentais

ATP – Adenosina Trifosfato

BEL – Limite Biológico de Exposição / Biological Exposure Limit

BHT – Butylated hydroxytoluene

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CAT – Catalase

CV – Coeficiente de variação/ Coeficient of variation

DFG – Deutsche Forschungsgemeinschaft / Fundação de Pesquisa Alemã

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

DTNB – 5,5'-Dithio-Bis(2- Nitrobenzoic acid)

EDTA – Ethylene Diamine Tetracetic Acid

EROs – Espécies reativas de oxigênio

ERNs – Espécies Reativas de Nitrogênio

EUA – Estados Unidos da América

FID – Flame Ionization Ddetector

GSH – Glutathiona reduzida

GPx – Glutathiona peroxidase

GR – Glutathiona Redutase

GSSG – Glutathiona dissulfeto

Hb – Hemoglobina

HDL – Lipoproteína de alta densidade

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

IARC – International Agency for Research on Cancer

IBMP – Índice biológico Máximo Permitido

ICH – International Conference on Harmonisation

LD – Limite de Detecção

LDL – Lipoproteína de alta densidade

LOD – Limit of Detection

LQ – Limite de Quantificação

LOQ – Limit of Quantification

MDA – Malondialdeído

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídio

NR-7 – Norma Regulamentadora nº7

PCMSO – Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional

PSSG – Glutaciona ligada a proteínas

RBP – Proteína carreadora do retinol

RLs – Radicais Livres

ROS – Espécies reativas de oxigênio

-SH – Grupos sulfidrílicos

SNC – Sistema Nervoso Central

SOD – Superóxido dismutase

SPME – Solid-Phase Microextraction

TTR - Transtiretina

VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade

VR – Valor de Referência

WHO – World Health Organization

LISTA DE ANEXOS

Anexo A - Comprovante de submissão do manuscrito “**Quantification of lycopene, β -carotene, retinol and α -tocopherol in human plasma after a simple extraction procedure, stability study and application**” à Revista *Biomedical Chromatography*.....132

Anexo B - Comprovante de submissão do manuscrito “**Possible protective effects of exogenous and endogenous antioxidants on lipid peroxidation in exposed occupationally to paints**” à Revista *Archives of Medical Research*.....133

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1 Estresse oxidativo e agentes oxidantes.....	25
2.2 Peroxidação lipídica.....	26
2.3 Antioxidantes.....	28
2.3.1 Sistema antioxidante endógeno.....	29
2.3.1.1 Superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase.....	29
2.3.1.2 Glutathione Reduzida.....	30
2.3.2 Sistema antioxidante exógeno.....	32
2.3.2.1 Vitamina E.....	32
2.3.2.1.1 Absorção, transporte, metabolismo e armazenamento.....	33
2.3.2.1.2 Vitamina E como antioxidante.....	34
2.3.2.2 Vitamina A (Retinol).....	34
2.3.2.2.1 Absorção, transporte, metabolismo e armazenamento.....	36
2.3.2.2.2 Retinol como antioxidante.....	38
2.3.2.3 Carotenóides.....	39
2.3.2.3.1 Absorção, transporte, metabolismo e armazenamento.....	40
2.3.2.3.2 Licopeno.....	42
2.3.2.3.3 β -caroteno.....	42
2.3.2.3.4 Carotenóides como antioxidantes.....	43
2.4 Quantificação de vitaminas lipossolúveis.....	44
2.4.1 Parâmetros de validação metodológica.....	45
2.4.1.1 Linearidade.....	45
2.4.1.2 Limite de detecção e quantificação.....	46
2.4.1.3 Precisão.....	46
2.4.1.4 Exatidão.....	47
2.4.1.5 Recuperação.....	47
2.4.1.6 Robustez.....	47
2.4.1.7 Estabilidade.....	48
2.5 Exposição ocupacional e monitorização biológica.....	48

2.6 Solventes orgânicos e exposição ocupacional.....	50
2.6.1 Exposição a solventes orgânicos e monitorização biológica.....	52
2.7 Relação entre exposição a solventes orgânicos e estresse oxidativo.....	53
3 RESULTADOS	57
3.1 Manuscrito I	58
Abstract.....	60
Introduction.....	61
Experimental.....	64
Results and discussion.....	69
Conclusions.....	74
References.....	75
3.2 Manuscrito II	86
Abstract.....	88
Introduction.....	89
Materials and methods.....	91
Results.....	95
Discussion.....	97
References.....	101
4 DISCUSSÃO.....	109
5 CONCLUSÕES.....	115
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	117

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação de mestrado são apresentados sob a forma de manuscritos, os quais se encontram no item RESULTADOS. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios manuscritos e representam na íntegra este estudo.

Os itens DISCUSSÃO E CONCLUSÃO, dispostos após os manuscritos, contêm interpretações e comentários gerais referentes ao presente estudo e relacionados aos manuscritos deste trabalho.

As REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS são relacionadas às citações que aparecem nos itens INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA e DISCUSSÃO desta dissertação.

1 INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo pode resultar de uma situação em que há uma diminuição dos níveis dos antioxidantes, um aumento de oxidantes/pró-oxidantes ou uma combinação de ambas as condições (MACGRATH et al., 1995; MORENA et al., 2002). Há evidências de que este processo está envolvido com a patogênese de muitas doenças ocupacionais (MORO et al., 2010) e não ocupacionais, incluindo diabetes (OZBEN et al., 1995), câncer (CERUTTI, 1994), doença de Parkinson (GOTZ e cols., 1990), insuficiência renal crônica (LOCATELLI et al., 2003), e em especial, doenças cérebro e cardiovasculares (HALLIWELL, 1993; RUMLEY et al., 2004).

Diante disso, o organismo dispõe de um elaborado sistema de defesa antioxidante para se proteger dos danos causados pelo estresse oxidativo. Estas substâncias antioxidantes podem ser tanto de origem endógena, como enzimas produzidas pelo próprio organismo, ou exógenas, sendo obtidas pela alimentação. Os principais antioxidantes endógenos, são as enzimas glutathione peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) e o tiol não protéico, glutathione reduzida (GSH) e exógenos, vitaminas como, retinol, ácido ascórbico, tocoferóis e carotenóides (MAYNE, 2003).

O sistema enzimático endógeno é a primeira linha de defesa antioxidante do organismo, evitando o acúmulo do ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio, que estão envolvidos no estresse oxidativo (BELLÓ, 2002). A SOD exerce efeito protetor por detoxificar o ânion superóxido, em um processo de dismutação, produzindo peróxido de hidrogênio, que pode ser reduzido por ação das enzimas CAT e GPx, formando água e oxigênio (AMER et al., 1993; NORDBERG & ARNER, 2001). Dentro do sistema não-enzimático endógeno, a GSH atua detoxificando metabólitos eletrofílicos, não somente como doador imediato de elétrons para neutralizar o H₂O₂ e lipoperóxidos, mas também como um seqüestrador de RLs de oxigênio e nitrogênio (NOZAL et al., 1997)

Além disso, dentro do sistema exógeno, muitos estudos têm relatado que os carotenóides, tocoferóis (vitamina E) e retinol (vitamina A) apresentam função antioxidante, desempenhando um importante papel na defesa do organismo contra

os danos causados pelo estresse oxidativo (MONAGHAN & SCHMITT, 1932; DI MASCIO et al., 1991; MILLER et al., 1993; PALACE et al., 1999; YOUNG & LOWE, 2001; ZHANG & OMAYE, 2001; TAPIERO et al., 2004; TAMIMI et al., 2004; SLUIJS et al. 2009). A propriedade antioxidante dos carotenóides é proveniente da estrutura química destes compostos. A presença de um sistema de duplas ligações na sua cadeia estrutural é responsável pelo seqüestro de RLs e espécies reativas de oxigênio (EROs), antes que esses RLs e EROs exerçam seus efeitos deletérios no organismo (DI MASCIO et al., 1991; YOUNG & LOWE, 2001). Já a atividade antioxidante do retinol se deve ao fato deste atuar como um agente de quebra de cadeia oxidativa, por se combinar com o radical peroxila, antes que esse radical possa propagar a peroxidação na fase lipídica da célula e gerar hidroperóxidos (PALACE et al., 1999). Os tocoferóis demonstraram serem eficientes inibidores da peroxidação de lipídios *in vivo*. Eles agem como doadores de hidrogênio para o radical peroxila, interrompendo a reação radicalar em cadeia (MILLER et al., 1993; ZHANG & OMAYE, 2001)

Nesta linha, a exposição ocupacional a tintas representa um importante problema de saúde pública. Tendo em vista a vasta quantidade de produtos químicos presentes na composição das tintas, os pintores encontram-se concomitantemente expostos a diferentes tipos de xenobióticos, como os solventes orgânicos (IARC, 1989; BRAUTBAR & WILLIAMS, 2002). O ambiente de trabalho normalmente contém uma série de produtos químicos, que se inalados e absorvidos pelo organismo, podem representar um risco potencial para a saúde dos trabalhadores, levando assim a doenças ocupacionais. Embora os níveis de exposição tenham diminuído muito nos países desenvolvidos, o número de trabalhadores expostos regularmente a solventes orgânicos é ainda expressivo, levando a crer que ainda hoje milhões deles são expostos diariamente a solventes em todo o mundo (JOHNSON & NYLÉN, 1995).

Atualmente, tem-se relatado que os solventes orgânicos são responsáveis pela geração de maiores níveis de radicais livres (RLs) no organismo, levando assim a um desequilíbrio entre sistema antioxidante e os oxidantes, gerando o estresse oxidativo (KLAASSEN et al., 2001; OGA, 2008). Tal desequilíbrio pode estar envolvido na etiologia de doenças crônicas, incluindo o câncer, doenças cardiovasculares, entre outras (DI MASCIO et al., 1991; MAYNE, 2003). Estudos *in vivo* e *in vitro* revelaram que os solventes orgânicos induzem peroxidação lipídica

em membranas biológicas (GEORGIEVA et al., 2002). Além disso, relatou-se aumento nos níveis de malondialdeído (MDA), no plasma sanguíneo, de indivíduos expostos ocupacionalmente a tintas e vernizes, quando comparados com o grupo controle (DLUGOSZ et al., 2004, MORO et al, 2010).

Dessa forma, estudos abordando possíveis reflexos sobre a peroxidação lipídica, sistemas antioxidantes endógeno e exógeno na exposição ocupacional a tintas são importantes, já que há poucos relatos sobre esse assunto na literatura. Uma vez que as vitaminas antioxidantes podem agir na proteção do organismo frente ao estresse oxidativo, é necessário que exista uma metodologia adequada para a sua quantificação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Estresse oxidativo e agentes oxidantes

Quando há um desequilíbrio entre os níveis de oxidantes e antioxidantes no organismo, causado pela excessiva produção de oxidantes ou depleção dos níveis de antioxidantes, ocorre um processo chamado de estresse oxidativo (McGRATH et al., 1995; MORENA et al., 2002). O somatório de danos oxidativos relacionados ao desequilíbrio antioxidante/pró-oxidante pode levar a diversos danos celulares, desencadeando alterações progressivas em proteínas, lipídios, açúcares e DNA, reduzindo a capacidade funcional e aumentando os riscos de doenças (BERR, 1998; FINKEL & HOLBROOK, 2000).

Os radicais livres (agentes oxidantes) são moléculas orgânicas e inorgânicas envolvidas nesse processo, cuja estrutura química possui um elétron desemparelhado, ou seja, ocupando um orbital atômico ou molecular sozinho. Isso os torna muito instáveis e extraordinariamente reativos, sendo capazes de reagir rapidamente com vários compostos ou atingir alvos celulares, como as membranas (VANNUCCHI et al., 1998; GUTTERIDGE & HALLIWELL, 2000).

Dentre os oxidantes mais importantes envolvidos em processos patológicos estão as espécies reativas de oxigênio (EROs) e as de nitrogênio (ERNs). As principais EROs distribuem-se em dois grupos, as radicalares: superóxido (O_2^-), hidroxila (OH^\cdot) peroxila (ROO^\cdot) e alcoxila (RO^\cdot); e as não-radicalares: oxigênio singlete (1O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso. Dentre as ERNs incluem-se o óxido nítrico (NO^\cdot), o óxido nitroso e o peroxinitrito ($HNOO^\cdot$), dentre outros. A maioria destes compostos apresenta tempo de vida médio muito curto (GILLHAM et al., 1997; SIES, 1997).

O oxigênio tem a sua atividade fundamental no metabolismo celular aeróbico. Desta forma, a formação de radicais livres (RLs) pelo organismo em condições normais é inevitável. Durante a fosforilação oxidativa, mecanismo usado pelas células para produzir energia química (ATP), parte dos elétrons é transferida para o oxigênio, dando origem ao radical ânion superóxido (O_2^-) (JUNQUEIRA & RAMOS,

2005). Eles ainda podem ser produzidos durante a oxidação de ácidos graxos, reações do citocromo P-450 e de células fagocíticas, entre outros. Algumas enzimas também são capazes de gerar RLs, sob condições normais ou patológicas. Fontes exógenas como tabaco, radiações, luz ultravioleta, solventes orgânicos e alguns fármacos, dentre outros, também geram RLs ou espécies reativas não radicalares (BIESALSKI, 2002).

Em condições fisiológicas normais, as EROs podem desempenhar importante papel fisiológico na regulação da resposta imunológica, participando do processo fagocítico de defesa contra infecções e atuando como fatores de transcrição na sinalização intracelular, induzindo a apoptose (HALLIWELL, 1994; BIESALSKI, 2002; ESSICK & SAM, 2010). Porém, quando ocorre um desequilíbrio entre as EROs e antioxidantes, devido ao aumento na produção de EROs e/ou a redução de antioxidantes, é gerado um processo que provoca danos em muitos constituintes celulares, como lipídios insaturados, proteínas e DNA (FINDLAY et al., 2005) denominado estresse oxidativo (BEAL, 1995; FINKEL & HOLBROOK, 2000; GUTTERIDGE & HALLIWELL, 2000; JUNQUEIRA & RAMOS, 2005).

2.2 Peroxidação lipídica

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação dos RLs, porém a membrana é um dos mais atingidos, onde esses RLs vão exercer sua ação desencadeando um processo denominado peroxidação lipídica ou lipoperoxidação, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares e origina vários produtos secundários (URSO & CLARKSON, 2003; FERREIRA & MATSUBARA, 1997). Estes produtos são principalmente aldeídos, com capacidade para aumentar o dano oxidativo (UCHIDA, 2000).

O malondialdeído (MDA) é um dos mais conhecidos produtos secundários da peroxidação lipídica, resultante da exposição de membranas biológicas a radicais livres, podendo ser utilizado como indicador da injúria de membranas celulares. A quantificação de MDA em biomateriais é amplamente utilizada como biomarcador do estresse oxidativo (ESTERBAUER et al., 1991).

A peroxidação lipídica também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, de câncer e à exacerbação da toxicidade de xenobióticos. Porém, assim como na formação das EROs, nem sempre os processos de lipoperoxidação são prejudiciais, pois seus produtos são importantes na reação em cascata a partir do ácido aracdônico (formação de prostaglandinas) e, portanto, na resposta inflamatória. Todavia, o excesso de tais produtos pode ser lesivo ao organismo (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

A peroxidação lipídica ou lipoperoxidação é uma reação em cadeia, representada pelas seguintes etapas, etapa inicial: interação do ácido graxo com radical hidroxila. Isto tem como consequência a perda de um átomo de hidrogênio do ácido graxo e liberação de um radical lipídico. Etapa 2: este radical lipídico incorpora rapidamente uma ou mais moléculas de oxigênio e transforma-se em radical peróxido. Etapa 3: o radical peróxido interage com outra molécula de ácido graxo, retira o seu hidrogênio e origina um hidroperóxido e mais um novo radical lipídico livre é formando, sendo assim, uma típica reação em cadeia (Figura 1) (PORTER et al., 1995; FERREIRA & MATSUBARA, 1997, VANNUCCHI et al., 1998):

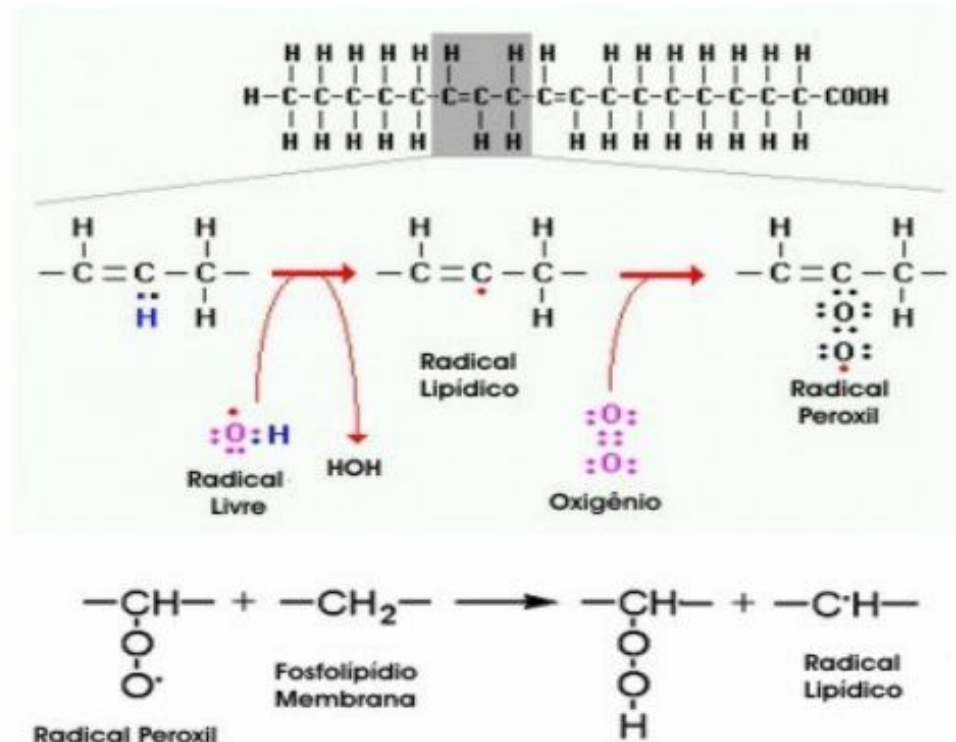


Figura 1 - Etapas do processo de peroxidação lipídica (PORTER et al., 1995).

O tempo de vida longo e a alta reatividade permitem a estas moléculas agirem tanto dentro, quanto fora das células, interagindo com outras biomoléculas como ácidos nucleicos e proteínas, freqüentemente levando a danos irreversíveis sobre o delicado mecanismo de funcionamento da célula (DEL RIO, 2005). O contínuo dano oxidativo leva a destruição de membranas, ricas em ácidos graxos poliinsaturados, contribuindo para a diminuição da sua fluidez e para a injúria celular (HERSHKO, 1989). Ocorre perda da seletividade na troca iônica, inativação de enzimas e proteínas de transporte da membrana e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos. Adicionalmente, a oxidação de lipídios no sangue agride as paredes das artérias e veias, facilitando o acúmulo destes lipídios, com conseqüente aterosclerose, podendo causar trombose, infarto ou acidente vascular cerebral (BARREIROS, 2006).

2.3 Antioxidantes

Por definição, uma substância antioxidante é aquela capaz de diminuir ou inibir a oxidação, mesmo presente em baixas concentrações em relação a seu substrato. Desta forma, estes compostos têm como função proteger os sistemas biológicos contra os efeitos deletérios dos processos ou das reações que levam a oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares. Isto implica que, os diferentes antioxidantes podem atuar em níveis e com modos de ação distintos (CAMPOS, 2005).

Os antioxidantes atuam em diferentes níveis de proteção no organismo sendo que o seu mecanismo de ação é bem variado, desde a remoção do oxigênio do meio, varredura das EROs, seqüestro dos metais catalisadores da formação de radicais livres, aumento da geração de antioxidantes endógenos ou mesmo a interação de mais de um mecanismo. Outro mecanismo de proteção é o reparo das lesões causadas pelos radicais. Esse processo está relacionado com a remoção de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas (BELLÓ, 2002).

O organismo possui um sistema antioxidante endógeno, tendo como representantes as enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase e

o tiol não protéico, a glutathiona reduzida (GSH) que reagem com os compostos oxidantes e protegem as células e os tecidos do estresse oxidativo (NOZAL et al., 1997; BELLÓ, 2002). Em adição aos efeitos protetores dos antioxidantes endógenos, é de grande importância a inclusão de antioxidantes exógenos, obtidos na dieta através do consumo de frutas e vegetais ricos em nutrientes como vitamina C, E (α -tocoferol), A (retinol), carotenóides (como licopeno e β -caroteno) e flavonóides, sendo que estes nutrientes estão relacionados com a diminuição do risco do desenvolvimento de doenças associadas ao acúmulo de radicais livres (POMPELLA, 2003; BIANCHI & ANTUNES, 1999).

2.3.1 Sistema antioxidante endógeno

O sistema enzimático endógeno é a primeira linha de defesa antioxidante do organismo, evitando o acúmulo do ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio. É formado por diversas enzimas, destacando-se a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GPx) (BELLÓ, 2002). Dentro do sistema não-enzimático endógeno, o principal representante é a glutathiona reduzida (GSH) (NOZAL et al., 1997).

2.3.1.1 Superóxido dismutase, catalase e glutathiona peroxidase

A SOD tem papel fundamental na defesa do organismo contra as EROs, pois age transformando ânions radicais superóxido em peróxido de hidrogênio (Figura 2), a qual é uma reação normal em pH fisiológico, porém muito acelerada na presença dessa enzima. A superóxido dismutase pode ocorrer de três formas, dependendo do metal associado à mesma: cobre (Cu) e zinco (Zn) no citoplasma dos eucariontes, manganês (Mn) na matriz mitocondrial e ferro (Fe) em bactérias (GILLHAM et al., 1997, SIES, 1997).

Outro antioxidante enzimático é a catalase que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio e sua atividade é dependente de NADPH (Figura

2). É encontrada no sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado e sua localização está nos peroxissomas, tendo por isto ação diminuída em órgãos como o coração, pulmão e o cérebro que possuem pouco peroxissomas. Nestes órgãos a ação antioxidante por esta enzima ocorre quando os radicais livres atingem a corrente sanguínea, através da catalase eritrocitária (GILLHAM et al., 1997, SIES, 1997).

Outro mecanismo de detoxificação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é através da glutatona peroxidase (GPx), que catalisa a redução do H_2O_2 e de hidropeptídeos orgânicos através da utilização da glutatona reduzida (GSH) (Figura 2). Está localizada no citoplasma e na matriz mitocondrial e ocorre em sua maioria associada ao selênio (Se), e seus principais locais de ação são fígado e eritrócitos, podendo ocorrer também no coração, pulmões e músculos (GILLHAM et al., 1997, SIES, 1997). Desta forma, o sistema antioxidante enzimático diminui a formação de radicais hidroxila e, conseqüentemente a peroxidação lipídica (Figura 2).

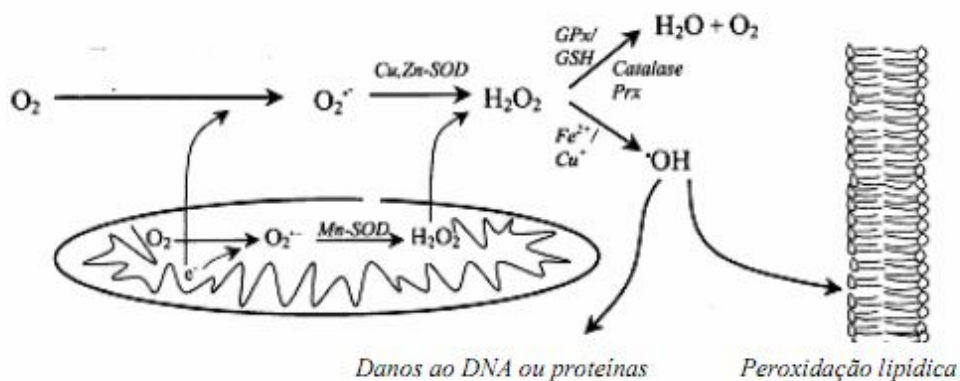


Figura 2 - Sistema antioxidante enzimático endógeno (NORDBERG & ARNÉR, 2001).

2.3.1.2 Glutationa Reduzida (GSH)

A glutatona é um tripeptídeo, L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina, e é o maior tiol livre não protéico encontrado em vários tecidos biológicos, sendo considerada também o principal antioxidante não enzimático endógeno (NOZAL et al., 1997). No sangue, 99,5% da glutatona se encontra no interior dos eritrócitos e uma pequena quantidade está associada às membranas destes (MILLS & LANG, 1996). Embora

presente em várias formas: reduzida (GSH), oxidada (GSSG) e ligada às proteínas (PSSG), a GSH é a forma mais abundante (NOZAL et al., 1997).

Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento $-SH$, presente em sua molécula. Dentre outras funções fisiológicas, a GSH é seqüestradora de radicais livres (NOZAL et al., 1997), detoxificando metabólitos eletrofilicos, não somente como doador imediato de elétrons para neutralizar o H_2O_2 e lipoperóxidos, mas também como um seqüestrador de RLs de oxigênio e nitrogênio (LECHTWEIS & JI, 2001, ASHFAQ et al., 2006).

O núcleo do resíduo cistenilglicina da glutathiona está envolvido na sua função como antioxidante, mais especificamente como um redutor intracelular, sendo capaz, por exemplo, de reagir com um elétron não pareado de um radical livre, formando um radical GS^\bullet , que produz, por dimerização, o GSSG. A redução de H_2O_2 e peróxidos orgânicos a seus álcoois correspondentes com a conversão de GSH em GSSG é catalisada pela enzima GPx dependendo essencialmente da presença de selênio. A GSSG é, então, reduzida pela glutathiona redutase (GR), regenerando a GSH, num processo à custa de NADPH (SHAN et al., 1990; JORDÃO JR et al., 1998). A Figura 3 apresenta o sistema glutathiona e a interconversão nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), e o papel das enzimas glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR).

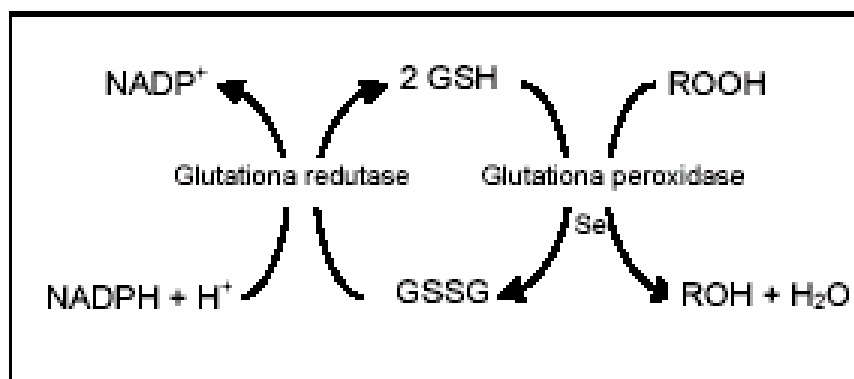


Figura 3 - Interconversão da glutathiona nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR) (SIES et al., 1972)

2.3.2 Sistema antioxidante exógeno

O sistema antioxidante exógeno é formado por antioxidantes hidrofílicos (vitamina C, indóis e catecóis) e lipofílicos (vitamina E, carotenóides, vitamina A) (MAYNE, 2003; URSO & CLARKSON, 2003). Dentre eles, as vitaminas lipossolúveis merecem destaque, uma vez que muitos estudos têm relatado que os carotenóides, tocoferóis (vitamina E) e retinol (vitamina A) apresentam função antioxidante, desempenhando um importante papel na defesa do organismo contra os danos causados pelo estresse oxidativo (MONAGHAN & SCHMITT, 1932; DI MASCIO et al., 1991; MILLER et al., 1993; PALACE et al., 1999; YOUNG & LOWE, 2001; ZHANG & OMAYE, 2001; TAPIERO et al., 2004; TAMIMI et al., 2004; SLUIJS et al. 2009).

2.3.2.1 Vitamina E (tocoferóis)

Vitamina E é uma descrição genérica para quatro diferentes tocoferóis e quatro diferentes tocotrienóis. A forma predominante no plasma e que apresenta maior atividade biológica é o α -tocoferol (MAYNE, 2003, BURTIS et al., 1998). Estruturalmente caracterizam-se pela presença do anel cromanol com uma cadeia alifática lateral e diferem entre si pelo número e posição do grupo metila no anel cromacol (SALDEEN & SALDEEN, 2005). Os tocoferóis apresentam uma cadeia lateral saturada em sua estrutura, enquanto os tocotrienóis possuem uma cadeia lateral insaturada com três duplas ligações (Figura 4) (ZINGG & AZZI, 2004; ZINGG, 2007; MIYAZAWA et al., 2009).

A vitamina E é encontrada naturalmente nos alimentos de origem vegetal, principalmente naqueles folhosos de coloração verde escura, nas sementes oleaginosas, nos óleos vegetais e no gérmen de trigo (BATISTA et al., 2007; RIGOTTI, 2007). Também é encontrada em alimentos de origem animal como gema do ovo e fígado, entretanto nesses alimentos são encontradas baixas concentrações de α -tocoferol (BATISTA et al., 2007).

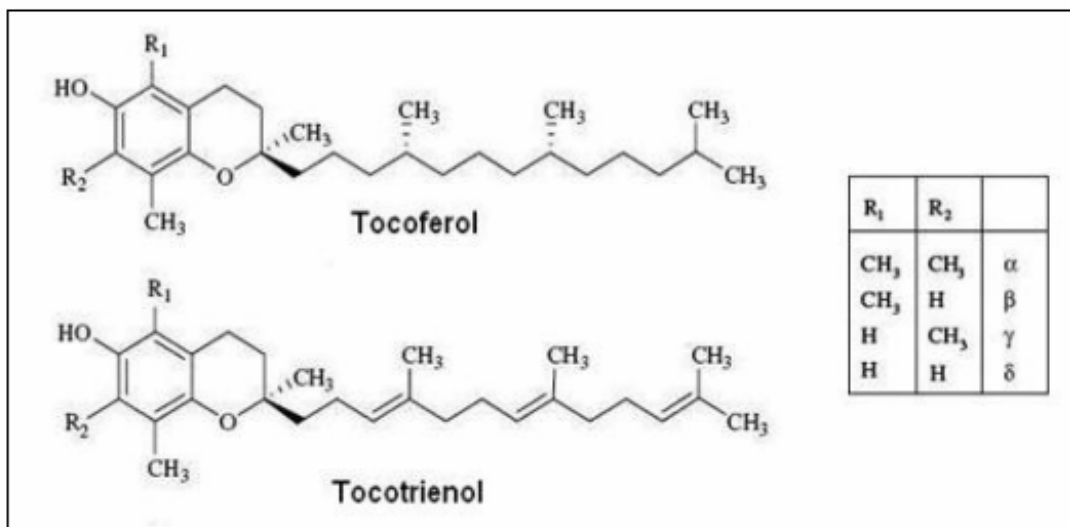


Figura 4: Estruturas químicas de tocoferóis e tocotrienóis (ZINGG, 2007)

2.3.2.1.1 Absorção, transporte, metabolismo e armazenamento

A absorção intestinal de lipídios e vitaminas lipossolúveis, como a vitamina E, é dependente da função pancreática, secreção biliar, formação da micela e penetração através da membrana intestinal. A maior parte da vitamina E é absorvida como álcool livre e pequena quantidade como éster. Os ésteres são largamente hidrolisados na parede intestinal e os alcoóis penetram na parede do intestino e são transportados via vasos linfáticos até a circulação geral (BJØRNEBOE et al., 1990; RIGOTTI, 2007).

Após a absorção no intestino delgado, a vitamina E é transportada até o fígado onde é armazenada. Nos hepatócitos ela se liga a lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que a transportam através da corrente sanguínea até os tecidos (BJØRNEBOE et al., 1990; KAYDEN & TRABER, 1993, RIGOTTI, 2007). É excretada na forma livre na bile e a biotransformação do α-tocoferol nos hepatócitos origina α-tocoferil quinona. Este produto é degradado nos rins a ácido α-tocoferônico, seguido por conjugação e eliminação na urina (THAKUR & SRIVASTAVA, 1996; ZINGG, 2007).

2.3.2.1.2 Vitamina E como antioxidante

A vitamina E é um componente muito importante para a defesa celular contra compostos que causam oxidação das moléculas celulares em mamíferos, agindo como antioxidante. A vitamina E pode prevenir a oxidação de várias formas: a) destruindo agentes oxidantes, ao agir como doador de hidrogênio para o radical peroxila, b) diminuindo a conversão de agentes oxidantes menos reativos a mais reativos, c) facilitando o reparo de danos causados pelos agentes oxidantes, d) providenciando um ambiente favorável para a atividade de outros antioxidantes (MILLER et al., 1993; ZHANG E OMAYE, 2001).

Como possui alta lipossolubilidade, distribui-se pelas membranas lipídicas, constituindo-se na principal defesa das mesmas contra as lesões oxidativas (CHAN, 1993). Estudos apontam a vitamina E como o mais importante antioxidante para a lipoproteína de baixa densidade (LDL) (BONITHON-KOPP et al., 1997; STAMPFER & RIMM, 1995) e quando há depleção de antioxidantes na molécula de colesterol LDL, ocorre peroxidação lipídica em cadeia, de modo que a presença de antioxidantes nessa lipoproteína retarda o início deste processo (MOSCA et al., 1997). Sua deficiência tem sido associada a um aumento da viscosidade das plaquetas do sangue, predispondo à formação de coágulos potencialmente fatais (BONITHON-KOPP et al., 1997; STAMPFER & RIMM, 1995).

Assim, a vitamina E previne doenças ateroscleróticas não somente por seu efeito antioxidante, mas também por seu efeito inibidor sobre a proliferação de células do músculo liso e sobre a adesão e agregação plaquetária (HARRIS et al., 2002). Além disso, ela tem efeito modulador sobre as respostas inflamatória e imune, em geral, sua deficiência aumenta os componentes da resposta inflamatória e prejudica a imunidade celular e humoral (CHAN, 1993). Experimentos com animais mostraram que a suplementação com vitamina E aumenta a resistência contra infecções e recentes ensaios clínicos também sugerem que a vitamina E reduz o risco de infecções respiratórias (MEYDANI et al., 2005).

2.3.2.2 Vitamina A (Retinol)

A vitamina A, também conhecida pela designação de retinol é um álcool primário, polietilênico e lipossolúvel, apresentando grande capacidade reativa. Essa vitamina é instável aos processos oxidativos e a temperaturas acima de 34°C (SILVEIRA, 1996; MAHAN & STUMP, 2000). O termo vitamina A é empregado atualmente para designar todos os derivados de beta-ionona que possuam atividade biológica de retinol, exceto os carotenóides. O termo retinóide se refere ao retinol ou aos seus derivados de ocorrência natural e análogos sintéticos, mostrados na figura 5, que não apresentam necessariamente, atividade semelhante à do retinol (SILVEIRA, 1996).

Os carotenóides são um grupo composto por mais de 400 substâncias diferentes, de ocorrência natural, sintetizados por uma grande variedade de microorganismos fotossintéticos e vegetais e menos de 10% atuam como precursores de vitamina A. Destes, o de maior atividade *in vivo* é o β -caroteno, um dímero do retinol. A transformação de β -caroteno em retinol é um importante processo no metabolismo dos animais, visto que os compostos carotenóides são biologicamente ativos após sua transformação em retinol (SILVEIRA, 1996). O ácido retinóico, um metabólito do retinol, no qual o grupo álcool sofreu oxidação, apesar de ser mais potente que o retinol na promoção da diferenciação e crescimento do tecido epitelial na deficiência da vitamina A, não apresenta a mesma eficiência na restauração da visão ou das funções reprodutivas. Adicionalmente, observa-se que muitos dos derivados retinóides, entretanto, falham em suas funções por ligarem-se a proteínas específicas que os transportam para os tecidos, onde permanecem inativos (MAHAN & STUMP, 2000). A deficiência primária de vitamina A resulta da ingestão inadequada de vitamina A pré-formada (retinol) e carotenóides. Deficiências secundárias resultam de má-absorção devido à insuficiência dietética de lipídios, insuficiência pancreática ou biliar e de transporte prejudicado devido a doença hepática, desnutrição protéico-calórica ou deficiência de zinco (VANNUCCHI, 1991; BOOTH et al., 1992; MAHAN E STUMP, 2000).

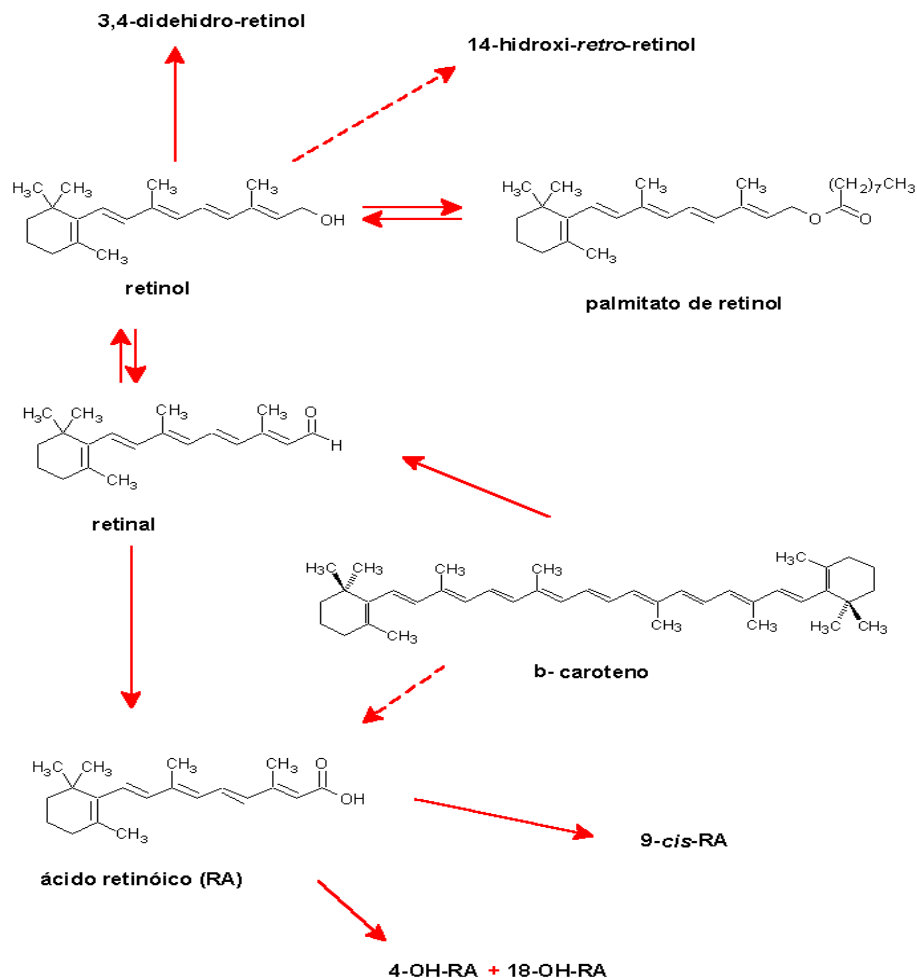


Figura 5. Estrutura da vitamina A e de seus derivados (adaptado de NAPOLI, 1996).

2.3.2.2.1 Absorção, transporte, metabolismo e armazenamento

As fontes dietéticas de vitamina A podem ser a vitamina A pré-formada e a pró-vitamina A, representada pelos carotenóides. O retinol só pode ser encontrado em tecidos animais, tendo como fontes alimentares principais, o fígado, o óleo de fígado de peixes, o leite integral e derivados, os ovos e as aves. O β -caroteno, precursor de retinol, é encontrado normalmente em frutas e hortaliça. A absorção do retinol é realizada similarmente à das gorduras sendo que em condições de normalidade do aparelho gastrointestinal é praticamente toda absorvida, observando-se que sua absorção e de seus ésteres é mais completa em jejum e se

administrados com soluções aquosas. Na presença de anormalidades da absorção das gorduras, a absorção do retinol sofre redução (MAHAN & STUMP, 2000).

A vitamina A pode ser mobilizada do fígado para distribuição aos tecidos periféricos na dependência da oferta do aporte alimentar. Sendo essa deficiente, esse processo envolve a hidrólise de ésteres de retinil, fazendo com que o fígado mantenha uma concentração constante de sua forma ativa na circulação. A ligação de retinol a um transportador específico, a RBP (proteína carreadora do retinol), que circula no plasma em um complexo com TTR (transtiretina, pré-albumina), impede a excreção do complexo retinol-RBP na urina (MAHAN & STUMP, 2000). Visto que a síntese hepática da RBP depende da presença tanto de zinco quanto de aminoácidos e de níveis de retinol plasmático, os níveis da RBP podem ser afetados por diferenças daqueles nutrientes bem como deficiência crônica da vitamina A grave o suficiente para depletar estoques de ésteres de retinil hepático (BOOTH et al., 1992).

O retinol é liberado das proteínas no estômago e o produto dessa ação são os ésteres de retinil que, no intestino delgado, são hidrolizados de novo a forma de retinol, que é absorvido mais eficientemente do que os ésteres. Já os carotenóides com atividade pró-vitamina A, quando há necessidade e uma diminuição da ingestão de retinol, são clivados dentro das células da mucosa intestinal em moléculas de retinaldeído, que posteriormente são reduzidos a retinol. Após a absorção do retinol ocorre a conjugação do mesmo ao ácido glicurônico, seguida da entrada na circulação entero-hepática onde resultam dois produtos, ésteres de retinil quando ocorre a esterificação do retinol ou ácido retinóico originado a partir da oxidação do retinol. Tanto os ésteres de retinil quanto o ácido retinóico serão transportados no plasma (MAHAN & STUMP, 2000).

O retinol não é eliminado na urina e sob forma inalterada é excretado somente em casos de nefrite crônica. Quando altas doses de vitamina A são administradas é que certa proporção sofre excreção sob forma inalterada nas fezes. O ácido retinóico, absorvido após passagem na circulação pela veia porta é transportado no plasma como um complexo ligado à albumina. De modo diferente do retinol, o ácido retinóico não é armazenado no fígado, sendo rapidamente excretado (MAHAN & STUMP, 2000).

O armazenamento de retinol é feito sob forma de ésteres de retinil. Cerca de 50-80% da vitamina A no corpo é estocada no fígado onde é ligada à proteína

ligadora de retinol (RBP). Esse estoque regula os efeitos de variabilidade nas taxas de ingestão de vitamina A, particularmente contra os riscos de deficiência durante os períodos de baixa ingestão dessa vitamina.

2.3.2.2.2 Retinol como antioxidante

O potencial antioxidante do retinol foi primeiramente descrito pelo trabalho de Monaghan e Schmitt (1932), os quais relatam que a vitamina A pode proteger lipídios de rancidez. A atividade antioxidante do retinol pode ser pelo fato dele atuar como um agente de quebra de cadeia oxidativa por se combinar com o radical peroxil, antes que esse radical possa propagar a peroxidação na fase lipídica da célula e gerar hidroperóxidos (PALACE et al., 1999). Tesoriere et al. (1993) sugerem melhor eficiência do retinol, comparado ao tocoferol, devido a sua curta cadeia de polienos, que permite uma alta mobilidade e melhor oportunidade para interagir com o radical peroxil na membrana (DAS, 1989). Além disso, Topinka et al. (2007) sugerem um efeito protetivo da vitamina A em condições de elevada exposição a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (poluentes do ar). Recentemente, Sram et al. (2009) mostraram em estudo conduzido com voluntários saudáveis de três países da Europa, que há uma associação inversa entre os níveis de vitamina A e aductos do DNA (os quais levam a dano de DNA após ativação metabólica) e Ragin et al. (2010) mostraram essa mesma associação, em voluntários tabagistas.

Porém, atualmente muitos autores têm proposto um papel pró-oxidante do retinol em sistemas biológicos (GEILAN et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009; ROEHRS et al., 2009). Oliveira e colaboradores relatam que o retinol induziu danos oxidativos a lipídios, proteínas e DNA, e em menor proporção, disfunção mitocondrial, através de um mecanismo envolvendo aumento do ânion superóxido, (OLIVEIRA et al., 2009). Roehrs et al. (2009), em estudo realizado com hemodialisados, relatam que níveis elevados de retinol na circulação atuam como pró-oxidantes, causando assim efeito adicional no processo de estresse oxidativo.

2.3.2.3 Carotenóides

Os carotenóides são pigmentos naturais sintetizados por plantas e microrganismos, sendo componentes essenciais dos alimentos (STHAL & SIES, 2003). Consistem em mais de 600 componentes, inclusive isômeros, todos os quais são polisoprenóides. Geralmente são compostos tetraterpenóides (C₄₀) constituídos de 8 unidades de isopreno (C₅) formando uma cadeia poliênica que pode conter de duas a quinze duplas ligações conjugadas (AMBRÓSIO et al., 2006) Essas são responsáveis por sua cor e por algumas de suas funções biológicas (SHAMI & MOREIRA, 2004).

São coloridos, possuindo um espectro que vai do amarelo ao vermelho (OLSON et al., 1995), tendo como função primária absorver luz durante a fotossíntese em plantas ou fotoproteção em microrganismos. Algumas das principais fontes de carotenóides são cenouras e abóboras (α e β -caroteno), tomates e produtos derivados, como extrato, polpa e molhos (licopeno), espinafre (luteína) e laranja (β -criptoxantina) (SILVA & NAVES, 2001).

De acordo com os elementos químicos presentes em suas moléculas, os carotenóides são classificados em dois grandes grupos: os carotenos e as xantofilas (OLSON & KRINSKY, 1995). Os carotenos são hidrocarbonetos poliênicos com variados graus de insaturação e constituídos apenas por átomos de carbono (C) e hidrogênio (H). Nesse grupo destacam-se licopeno e β -caroteno (RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2006). As xantofilas, também conhecidas como oxicarotenóides, possuem além da estrutura característica dos carotenos (C e H), átomos de oxigênio na forma de alcoóis, aldeídos, cetonas, epóxidos, ésteres, dentre outros grupos funcionais. Astaxantina, luteína, zeaxantina, α -criptoxantina e β -criptoxantina são integrantes desse grupo de compostos (FRASER & BRAMLEY, 2004).

São constituintes normais do sangue e tecidos de humanos, sendo distribuídos primariamente no tecido adiposo (80-85%), fígado (8-12%), e músculo (2-3%) e com pequenas quantidades em outros tecidos (OLSON, 1995). O soro contém β -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina, licopeno e luteína como os principais componentes, com baixas concentrações de zeaxantina (PARKER, 1989). A figura 6 representa os principais carotenóides encontrados no sangue.

Dos mais de 600 carotenóides, menos de 10% atuam como precursores de vitamina A. O β -caroteno é o carotenóide nutricionalmente mais ativo compreendendo 15 a 30% dos carotenóides séricos totais, sendo que a vitamina A é formada primariamente pela clivagem central deste, preferencialmente no fígado e intestino (BENDICH, 1989). Teoricamente, o β -caroteno é clivado e produz 2 moléculas de retinal que por um processo de redução transforma-se em retinol (NAPOLI, 1996). Entretanto, diferenças na taxa de absorção, suscetibilidade para a oxidação e a habilidade para ser convertido a retinal, ácido retinóico e retinol, contribuem no fato do β -caroteno fornecer menos do que 50% da atividade biológica da vitamina A. De fato, em humanos a taxa de conversão admitida de β -caroteno para retinol é de 6:1 (OLSON, 1995; WANG, 1994).

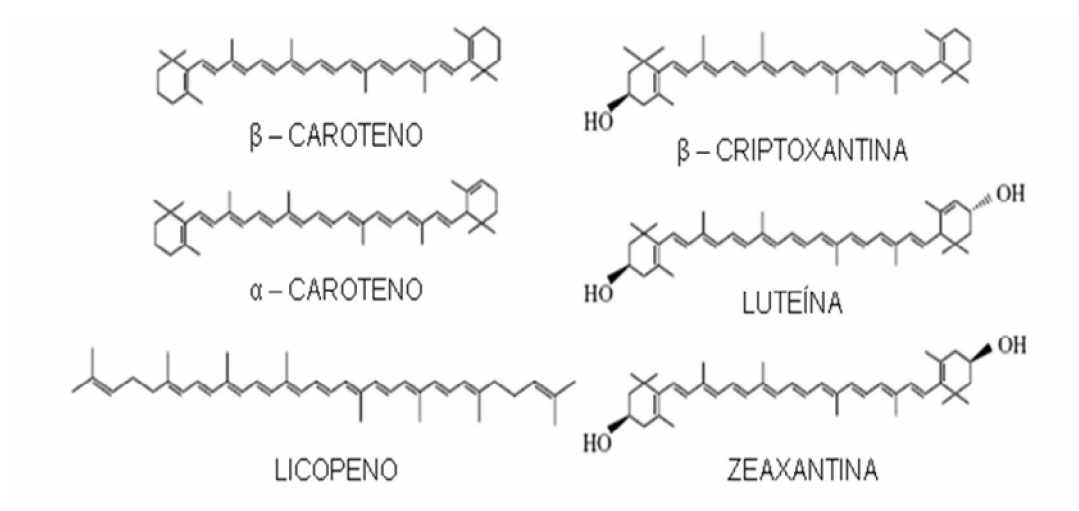


Figura 6. Principais carotenóides encontrados no plasma (KRINSKI & JOHNSON, 2005).

2.3.2.3.1 Absorção, transporte, metabolismo e armazenamento

A absorção e o metabolismo de carotenóides têm uma grande variação entre espécies animais. Em humanos e só em alguns outros mamíferos (macacos, o furão e os bovinos), uma quantidade apreciável de carotenóides pode ser absorvida intacta pelas células da mucosa e conseqüentemente aparecem inalterados na circulação e tecidos periféricos (BOWEN et al., 1993; ERDMAN et al., 1993).

A absorção dos carotenóides ocorre na mucosa intestinal, e a captação destes compostos pelas células da mucosa duodenal parece ser por difusão passiva, a favor de um gradiente de concentração entre a quantidade de carotenóide na micela e aquela na membrana da célula presumida como sendo o determinante na taxa de difusão destes compostos (PARKER, 1996). Após a captação pelo enterócito, os carotenóides não metabolizados são incorporados pelo quilomícron e segregados pela linfa, seguida pela captação hepática e liberado novamente na circulação em associação com a VLDL e finalmente em associação com a LDL (ERDMAN et al., 1993). A eficiência da absorção dos carotenóides é relativamente baixa (<30%), e a porcentagem absorvida diminui com aumento da ingesta (OLSON, 1994).

Na circulação são transportados em associação com as lipoproteínas, com uma distribuição semelhante a do colesterol, por isso as concentrações plasmáticas de colesterol são altamente correlacionadas com as concentrações circulantes de carotenóides quando os dados populacionais são analisados (CLEVIDENCE & BIERI, 1993; OLSON, 1994). No total, aproximadamente 75% dos carotenóides plasmáticos estão ligados a LDL, e os restantes são distribuídos entre as VLDL e HDL. Os carotenóides com menor polaridade (por exemplo, β -caroteno, α -caroteno e licopeno) são predominantemente ligados a LDL, enquanto os carotenóides mais polares (luteína) são associados mais com a HDL do que LDL (CLEVIDENCE & BIERI, 1993).

O tecido adiposo (especialmente devido ao seu volume) e o fígado são os tecidos onde ocorrem os maiores depósitos de carotenóides, embora estes compostos também tenham sido encontrados nos pulmões, rim, colo, próstata e em muitos outros tecidos (SCHMITZ et al., 1991). Altas concentrações de carotenóides são encontradas em tecidos que são ricos em receptores de LDL, tais como o corpo lúteo, tecido adrenal e testículos, provavelmente resultante da absorção inespecífica pelas lipoproteínas. Em geral, a concentração de carotenóide nos tecidos reflete diretamente a ingestão destes compostos. Por esta razão, as concentrações de carotenóides no plasma podem funcionar como biomarcadores da ingestão de hortaliças e frutas (as maiores fontes), quando outras variáveis que influenciam são consideradas, e são utilizadas como marcadores de conformidade nas intervenções com grandes quantidades de vegetais (ROCK, 1997).

2.3.2.3.2 Licopeno

O licopeno é um carotenóide não cíclico que contém 11 ligações duplas conjugadas e 2 ligações duplas não conjugadas, linearmente arranjadas (LAZARUS et al, 2003; SHAMI & MOREIRA, 2004). Possui uma coloração vermelha, sendo encontrado em alguns alimentos como tomate e seus produtos derivados, goiaba, mamão, melancia e pitanga (SHI & LE MAGUER, 2000; LAZARUS et al, 2003; SHAMI & MOREIRA, 2004).

Ingerido na forma natural (*trans*-licopeno), é pouco absorvido, mas estudos demonstram que o processo térmico melhora a biodisponibilidade por ajudar no rompimento da parede celular e extração (WILLCOX, 2003). O aumento de gordura na dieta facilita a absorção e biodisponibilidade do licopeno (SHAMI & MOREIRA, 2004).

A oxidação do licopeno é um processo complexo. O processo oxidativo ocorre naturalmente no fruto cru ou durante o processamento térmico, além de ocorrer *in vivo* como parte do metabolismo normal do carotenóide. Inicialmente, o licopeno é oxidado nas posições 1 e 5, originando licopeno 1,2-epóxido e licopeno 5,6-epóxido, respectivamente. Embora o primeiro composto seja bastante estável, o licopeno 5,6-epóxido é instável e ambos sofrem ciclização, originando uma mistura de 2,6-ciclicopeno-1,5-epóxido A e B. Embora os epóxidos de licopeno e produtos de rearranjo não sejam encontrados no soro humano, os correspondentes dióis A e B estão presentes (KUCUK et al., 2001)

2.3.2.3.3 β -caroteno

Apesar de existir mais de 600 diferentes carotenóides, apenas 10% são precursores da vitamina A, sendo o β -caroteno a forma mais ativa e disponível na dieta (BENDICH & OLSON, 1989; OLSON, 1989). O β -caroteno por meio de sua atividade de pró-vitamina A, tem potencial para formar duas moléculas de retinol (PAIVA & RUSSEL, 1999). Suas principais fontes dietéticas são: cenoura, damasco,

manga, pimenta vermelha, espinafre, abóbora e brócolis (VOUTILAINEN et al., 2006)

Apenas aqueles carotenóides que têm pelo menos um anel β -ionona não substituído anexado a uma estrutura de C-7 para C-15 intacto de polieno conjugado pode ser metabolizado a retinal, que é então reduzido para retinol (GOODWIN, 1986).

O mecanismo principal pelo qual o β -caroteno é metabolizado a retinal (que é posteriormente convertido em retinol) acredita-se que seja através de clivagens centrais pela enzima citosólica β -caroteno-15, 15'-dioxigenase (GOODWIN, 1986). Existem estudos nos quais foram utilizados tecido intestinal humano e fígado de ratos indicando que o 9-cis- β -caroteno funciona como um precursor para ambos trans- e 9-cis-ácido retinóico (NAGAO & OLSON, 1994; WANG et al., 1994). β -caroteno não é convertido em retinol a menos que haja necessidade, e o rendimento de conversão é conhecido por ser baixo (SOLOMONS & BULUX, 1993). A excreção de metabólitos dos carotenóides ainda não foi identificada. Presupõem-se que o processo de degradação de carotenóides e seus metabólitos sejam semelhantes ao da vitamina A e retinóides. O citocromo P450 do fígado participa no metabolismo do retinol e ácido retinóico à metabólitos polares (LEO et al., 1989) assim existe a possibilidade do envolvimento deste sistema no metabolismo dos carotenóides. Devido à absorção ineficiente destes compostos, a maior parte dos carotenóides que são ingeridos são excretados nas fezes (ROCK et al., 1996).

2.3.2.3.4 Carotenóides como antioxidantes

A principal atividade antioxidante dos carotenóides é a desativação do oxigênio singleto, que constitui uma forma altamente reativa do oxigênio molecular, sendo que a velocidade para essa reação é superior à dos tocoferóis. Os carotenóides protegem as células de danos oxidativos provocados por RLs e por EROs que podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana, atacando lipídios, proteínas, carboidratos e DNA (SHAMI & MOREIRA, 2004), desempenhando assim, um importante papel na prevenção de doenças associadas ao processo de estresse oxidativo. (RIBEIRO & SERAVALLI, 2004).

A proteção antioxidante é fornecida pelos carotenóides acíclicos, que possuem nove ou mais duplas ligações conjugadas (DI MASCIO et al., 1989). Esses carotenóides são capazes de seqüestrar EROs, como o radical peroxil e o oxigênio singlete, estabilizando o elétron desemparelhado do radical por ressonância. Ao combaterem EROs, podem interagir de três maneiras diferentes: a) transferência de elétrons, b) remoção de íons de hidrogênio, ou c) adição de espécies radicalares (YOUNG & LOWE, 2001).

Outros efeitos benéficos dos carotenóides incluem aumento da função do sistema imune (BENDICH, 1989), proteção da radiação solar (MATEWS-ROTH, 1990), e inibição do desenvolvimento de certos tipos de câncer (Nishino, 1998).

Porém, um estudo realizado com suplementação de beta-caroteno e vitamina A, teve de ser encerrado antes do previsto, por ter apresentado uma incidência maior de câncer de pulmão e mortalidade (GOOGMAN et al., 2004). Sies e Sthal (1995) também relatam esses efeitos negativos para o beta-caroteno. Ainda outros trabalhos relatam que suplementação com beta-caroteno, licopeno e luteína não mostraram efeito antioxidante, não havendo assim, efeito protetor sob os lipídeos (WRIGHT et al., 1999).

2.4 Quantificação de vitaminas lipossolúveis

Muitos estudos epidemiológicos relatam que os carotenóides, tocoferóis e retinol apresentam função antioxidante, desempenhando um importante papel na defesa do organismo contra os danos causados pelo estresse oxidativo (MONAGHAN & SCHMITT, 1932; DI MASCIO et al., 1991; PALACE et al., 1999; YOUNG & LOWE, 2001; TAPIERO et al., 2004; TAMIMI et al., 2004; SLUIJS et al. 2009). Frente a isso, a quantificação dessas vitaminas com uma metodologia específica e com método de extração simples e rápido é de extrema importância.

A cromatografia líquida de alta eficiência é considerada a melhor escolha para quantificação de vitaminas lipossolúveis como o retinol, α -tocoferol, licopeno e β -caroteno. Vários métodos são descritos na literatura, porém muitos deles apresentam métodos de extração muito demorados e trabalhosos (MACCREHAN &

SCHONBERGER, 1987; FINCKH et al., 1995; STEGHENS et al., 1997; ABAHUSAIN et al., 1998; TALWAR et al., 1998; SU et al., 1999; THOMAS et al., 2001; TAIBI & NOCOTRA, 2002; TZOUGANAKI et al., 2002; LEE et al., 2003; ORTEGA et al., 2004; RUPÉREZ et al., 2004; VERTZONI et al., 2005; BOONSIRI et al., 2007; SILUK et al., 2007; SEMERARO et al., 2009; THIBEAULT et al., 2009).

Recente estudo descreveu uma metodologia para separação de retinol, carotenóides e tocoferóis simultaneamente com um tempo de corrida de 15 minutos, porém o procedimento para extração desses compostos leva em torno de 36 minutos (THIBEAULT et al., 2009), tornando o tempo total de análise mais prolongado e trabalhoso, dificultando dessa maneira seu uso na rotina laboratorial. Com isso, métodos de extração que não necessitem de muitas etapas no tratamento das amostras oferecem uma vantagem em relação àqueles que necessitam.

2.4.1. Parâmetros de validação metodológica

2.4.1.1 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância analisada, dentro de uma determinada faixa de aplicação (ICH, 2004; RIBANI et al., 2004). Na maior parte dos casos, a relação matemática entre o sinal (área ou altura do pico) e a concentração ou massa da espécie de interesse deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas dessa espécie (RIBANI, 2004). Essa relação matemática pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica (ICH, 2004; RIBANI et al., 2004). Além dos coeficientes de regressão a e b , também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação r (RIBANI et al., 2004). Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1.0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (BRASIL, 2003; ICH, 2004; RIBANI et al., 2004).

2.4.1.2 Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental (ICH, 1995; INMETRO, 2003).

O LD pode ser calculado baseado em parâmetros da curva analítica, através da fórmula $LD = 3,3 \times s/b$, onde s é a estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação e b é a inclinação (“slope”) ou coeficiente angular da curva analítica (RIBANI et al., 2004).

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental (ICH, 1995; INMETRO, 2003). Como o LD, o LQ é expresso como uma concentração, sendo que a precisão e exatidão das determinações também devem ser registradas. Pode ser calculado baseado nos parâmetros da curva analítica, e expressos pela fórmula $LQ = 10 \times s/b$, em que s é a estimativa do desvio padrão da resposta (que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação) e a inclinação da curva analítica b , em níveis próximos ao LQ (CAUSON, 1997; BRASIL, 2003; BRANCH, 2005; RIBANI et al., 2004).

2.4.1.3 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas, calculada como o coeficiente de variação (CV%) entre as medidas (ICH, 1995; INMETRO, 2003). O objetivo da validação da precisão é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os resultados concordantes (BRASIL, 2003; RIBANI et al., 2004). Pode ser dividida em precisão intra-dia ou repetibilidade e inter-dia ou precisão intermedária. Na precisão intra-dia é avaliada a capacidade de repetir o mesmo método em um curto intervalo de tempo, por exemplo, dentro de 1

dia. Na precisão inter-dia é verificada a possibilidade de repetir o mesmo método em condições diferentes, como por exemplo, analista, reagentes e dias diferentes (CAUSON, 1997).

2.4.1.4 Exatidão

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (ICH, 1995; INMETRO, 2003). A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança, ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão. Um dos procedimentos utilizados para avaliar a exatidão é porcentagem bias (%bias) (QUEIROZ et al., 2001; BRASIL, 2003; BRANCH, 2005).

2.4.1.5 Recuperação

A recuperação representa a eficiência de extração de um método analítico, expressa como a porcentagem da quantidade conhecida de um analito, obtida da comparação dos resultados analíticos de amostras branco acrescidas de padrão e submetidas ao processo de extração, com os resultados analíticos de soluções padrão não extraídas (CAUSON, 1997).

2.4.1.6 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso por que as medidas são susceptíveis a variações das condições analíticas (BRANCH, 2005).

2.4.1.7 Estabilidade

Os estudos de estabilidade são realizados a fim de estabelecer o período em que as amostras podem ser armazenadas sem perda na concentração do analito desejado. A estabilidade das amostras estocadas deve ser comparada com a concentração da amostra fresca (realizada logo após a coleta) e variações maiores que 10% podem comprometer a integridade dos dados obtidos (CAUSON, 1997; BRANCH, 2005).

2.5 Exposição Ocupacional e monitorização biológica

A exposição ocupacional é decorrente da atividade profissional, em que o trabalhador encontra-se em contato com agentes químicos através das vias possíveis de absorção da substância tóxica pelo organismo: respiratória, cutânea e digestiva (CÂMARA & GALVÃO, 1995; OGA, 2008). Com isso, pode desencadear a produção de efeitos sobre a superfície do organismo (pele e mucosas), produzindo uma ação local tóxica, ou de penetração e absorção, com produção de efeitos sistêmicos, de curto, médio ou longo prazo (OGA 2008). Tendo em vista que as pessoas passam mais de ¼ de suas vidas no ambiente de trabalho (FRITSCHI et al., 2009), a exposição ocupacional a xenobióticos torna-se um relevante problema de saúde pública (NEVES, 1999).

Vários fatores podem influenciar a real dose de substâncias absorvidas da atmosfera, isso porque a intensidade da exposição depende, entre outros fatores, da concentração do agente tóxico no local de trabalho, do tipo e da intensidade de trabalho, da duração diária e da frequência de exposição ao longo da vida do trabalhador e das condições ambientais (temperatura, umidade e ventilação) (MANINI et al., 2007).

A absorção de agentes tóxicos pelo organismo depende principalmente de suas propriedades físico-químicas (MANINI et al., 2007). Também devem ser considerados fatores inerentes ao indivíduo, como sexo, idade, raça, suscetibilidade

genética, estado nutricional, psíquico e doenças prévias, que podem interferir no aparecimento, duração e gravidade dos efeitos adversos ocasionados por agentes presentes no ambiente de trabalho (BERTONCELLO, 1999).

Milhões de pessoas expõem-se a solventes orgânicos no ambiente de trabalho, tornando imprescindível a vigilância do risco destas exposições à saúde. Aproximadamente 200 mil trabalhadores em todo mundo estão empregados em indústrias de tintas. As tintas, na sua maioria, são constituídas por uma mistura complexa de solventes orgânicos (hidrocarbonetos, cetonas entre outros) e metais pesados, entre outros xenobióticos, em diferentes concentrações (IARC, 1989). Dentre os xenobióticos presentes na constituição das tintas, o tolueno é tido como o principal componente (WHO, 1996; MOON et al., 2001; SAMOTO et al., 2006; OGA, 2008).

Dessa maneira, indivíduos que trabalham em indústrias de tintas estão simultaneamente expostos a diferentes tipos de xenobióticos, principalmente solventes orgânicos, caracterizando um processo de coexposição ou exposição mista, que pode resultar em inibição ou indução das etapas de biotransformação de xenobióticos. (IKEDA, 1995; KLAASSEN et al., 2001; OGA, 2008).

Com isso, se faz necessário o acompanhamento desses indivíduos através da monitorização biológica, que é definida como um repetitivo controle na quantificação de determinado produto químico e/ou de seus metabólitos em diferentes fluidos biológicos (urina, sangue), ar exalado ou tecido de indivíduos expostos a agentes de risco químico, físico ou biológico, que se encontram presentes no ambiente de trabalho e/ou no ambiente em geral (MANNO et al., 2009)

No Brasil, a Norma Regulamentadora nº 7 (NR-7) de 29 de dezembro de 1994 da Secretaria de Segurança e Saúde no Trabalho, estabeleceu parâmetros biológicos para controle da exposição a agentes químicos. De acordo com esta Portaria, todas as instituições que admitam trabalhadores como empregados são obrigados a elaborar e implementar o Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional (PCMSO), que tem por objetivo promover e preservar a saúde dos trabalhadores (BRASIL, 1994).

O PCMSO inclui a realização obrigatória de exames médicos, entre eles avaliação clínica, envolvendo anamnese ocupacional, exame físico e metal, além de outros exames complementares realizados de acordo com termos específicos da

NR-7. A periodicidade das avaliações clínicas deve ser no mínimo, semestral, podendo ser reduzida a critério do médico do trabalho (BRASIL, 1994).

A monitorização biológica tem como objetivo principal a detecção precoce e preferencialmente reversível de sinais biológicos (biomarcadores), que são indicadores da condição de exposição, e podem resultar, em longo prazo, em danos à saúde (MANNO, et al., 2009). Além disso, busca definir a exposição ocupacional, quantificar a dose (interna, efetiva, acumulada) da exposição e verificar se os limites de exposição são respeitados (MANINI et al., 2007).

2.6 Solventes orgânicos e exposição ocupacional

Os solventes orgânicos são produtos químicos líquidos à base de carbono, compostos por diversas estruturas químicas, com propriedade lipofílicas e volatilidade variável (McDIARMID & AGNEW, 1995; KLAASSEN et al., 2001).

Volatilidade e lipofilicidade são as duas principais propriedades dos solventes que determinam sua absorção e deposição no corpo. Em geral, a lipofilicidade aumenta com o aumento do peso molecular, enquanto a volatilidade diminui (AYLOTT & PRASHER, 2002). Os principais determinantes da toxicidade dos solventes são: número de átomos de carbono; números de ligações químicas entre átomos de carbono; estrutura molecular (AZEVEDO, 2004).

Do ponto de vista toxicológico, são substâncias orgânicas, lipossolúveis, que atravessam a barreira hematoencefálica com facilidade, tendo assim, ação semelhante ao efeito dos anestésicos no corpo humano, ou seja, inibe a atividade do cérebro e da medula espinhal, diminuindo a capacidade funcional do sistema nervoso central, tornando-o menos sensível aos estímulos (FORSTER et al., 1994).

São largamente utilizados em inúmeros ramos industriais, tais como indústria química, farmacêutica, de tintas e de semicondutores e são usados como desengraxantes em vários tipos de indústrias pesadas, de base, fundições e oficinas mecânicas (McDIARMID & AGNEW, 1995). Muitos produtos classificados e usados com solventes são também matéria-prima da indústria química (fabricação de plástico) e combustível (BUSCHINELLI, 2000).

A absorção pelo trato respiratório é a principal via de entrada dos solventes orgânicos no organismo. A capacidade de penetração no fluxo sanguíneo dos vapores dos solventes e sua velocidade de transporte pelas membranas dependem da sua solubilidade lipídica, uma vez que as lipoproteínas das membranas celulares têm que ser atravessadas. (KLAASSEN et al., 2001). Uma segunda via de exposição é a pele, onde a absorção cutânea de solventes orgânicos, na sua forma líquida, depende da hidratação e espessura da camada córnea, da taxa de perfusão sanguínea da derme, e do comprimento de suas cadeias moleculares. O contato freqüente com solventes lipossolúveis pode levar a irritações dérmicas, entre outras injúrias (KLAASSEN et al., 2001).

Os danos causados tanto pelo solvente como por seu(s) metabólito(s) tóxico(s) podem desencadear no trabalhador uma doença clinicamente reconhecível (SCHENCK et al., 2008). Como uma das principais características dos hidrocarbonetos aromáticos é a alta lipossolubilidade, estes compostos tendem a permanecer nos compartimentos orgânicos, através dos processos de distribuição e armazenamento, perpetuando assim, seus efeitos tóxicos. A biotransformação ocorre através de reações enzimáticas, principalmente no fígado, podendo também ocorrer em órgãos extra-hepáticos. Este processo nem sempre corresponde a uma detoxificação propriamente dita, pois muitas dessas substâncias podem ser transformadas em metabólitos altamente reativos (ativação metabólica ou bioativação), passando a ser responsáveis pelos efeitos tóxicos das substâncias originais (KLAASSEN et al., 2001).

Há similaridade nos efeitos agudos de diversos solventes orgânicos, sendo que os principais são desorientação, euforia e confusão, progredindo para inconsciência, convulsão e morte por parada respiratória ou cardíaca. A rapidez de desenvolvimento destes sintomas assegura que os efeitos narcóticos dos solventes devem-se ao solvente em si, e não aos metabólitos. Na maioria dos indivíduos, a recuperação dos efeitos no sistema nervoso central é rápida e completa após a remoção do local de exposição (KLAASSEN et al., 2001; OGA, 2008). Além disso, a neurotoxicidade pode se manifestar através de vários sinais e sintomas, entre eles alteração na coordenação e disfunção motora, sendo que a tontura é um sintoma precoce envolvendo exposição a solventes (AYLOTT & PRASHER, 2002).

Dentre os solventes orgânicos presentes em tintas, destacam-se tolueno, os xilenos, estireno e etilbenzeno como agentes químicos potencialmente importantes

como risco ocupacional de exposição e toxicidade (GROMADZINSKA & WASOWICZ, 2003). O principal agente e em maior proporção nas tintas é o tolueno, que é um depressor do sistema nervoso central (SNC), sendo bem conhecida sua neurotoxicidade (HAMMER, 2002), mas seu mecanismo de ação ainda não está totalmente esclarecido.

2.6.1 Exposição a solventes orgânicos e monitorização biológica

Do ponto de vista da medicina do trabalho, a exposição ocupacional apresenta-se mais vinculada a uma mistura complexa de agentes químicos presente no ambiente de trabalho, do que a um xenobiótico isoladamente (BRAUTBAR & WILLIAMS, 2002). No caso da exposição a tintas, muitos produtos químicos são encontrados na sua constituição, sendo que os principais são os solventes orgânicos. Dentre eles, os mais encontrados são tolueno, xilenos, estireno e etilbenzeno (GROMADZINSKA & WASOWICZ, 2003), sendo que o tolueno é encontrado em maior proporção nas formulações de tintas (HAMMER, 2002).

No Brasil, a monitorização biológica da exposição ocupacional ao tolueno é realizada através dos níveis urinários de ácido hipúrico, indicador biológico de exposição proposto (BRASIL, 1994). No entanto, apesar do ácido hipúrico ser o principal metabólito urinário do tolueno, possui valor de referência (VR) de até 1,5 g/g de creatinina, podendo ser encontrado como constituinte normal na urina de indivíduos não expostos ao tolueno (TRUCHON et al., 1999). O índice biológico máximo permitido (IBMP) para o ácido hipúrico urinário é de 2,5 g/g creatinina (BRASIL, 1994).

Mais recentemente, tem sido preconizada a quantificação de *orto*-cresol (*o*-cresol), como uma alternativa na monitorização biológica do tolueno, pelos órgãos internacionais, como a Conferência America de Higienistas Industriais Governamentais (ACGIH) e a Fundação de Pesquisa Alemã (DFG), ambos responsáveis pelo estabelecimento dos índices biológicos de exposição nos EUA e Alemanha, respectivamente. Isto porque este metabólito apresenta maior

especificidade, uma vez que sofre menos interferência de alimentos, aditivos e medicamentos e também não é encontrado na urina de indivíduos não expostos ao tolueno (LAURENS, 2002; OGA, 2008).

Além disso, uma alternativa recomendada pela ACGIH na monitorização biológica do tolueno é a quantificação dos níveis sanguíneos do solvente inalterado, uma vez que a concentração do tolueno sanguíneo correlaciona-se significativamente com a intensidade de exposição ambiental ao solvente (KAWAI et al., 1993). Entretanto, a utilização do tolueno sanguíneo na biomonitorização do tolueno reflete apenas a exposição mais recente, e não a exposição média ocorrida durante todo o dia, uma vez que o solvente se difunde rapidamente pelos tecidos (OGA, 2008).

A legislação brasileira propõe como biomarcadores de exposição ao estireno a determinação isolada ou conjunta dos níveis urinários do ácido mandélico e do ácido fenilgloxílico (BRASIL, 1994) sendo que a concentração máxima aceitável dos níveis urinários de ácido mandélico e ácido fenilgloxílico são de 0,80 e 0,24 g/g de creatinina, respectivamente (BRASIL, 1994; OGA, 2008). Para a monitorização biológica da exposição ao xileno é realizada dosagem dos níveis urinários de ácido metilhipúrico, uma vez que esse metabólito não é encontrado normalmente na urina de indivíduos não expostos ao xileno tendo valor de IBMP para o ácido metilhipúrico urinário de 1,5 g/g creatinina. Ainda, o biomarcador de exposição recomendado para monitorização biológica de exposição ao etilbenzeno é o ácido mandélico urinário, sendo o nível de IBMP aceitável para a exposição ocupacional ao etilbenzeno de 1,5 g/g de creatinina, em urina coletada no final da jornada semanal de trabalho (BRASIL, 1994).

2.7 Relação entre exposição a solventes orgânicos e estresse oxidativo

Muitos estudos suportam a hipótese de que o estresse oxidativo seria determinante para a toxicidade exercida por muitos xenobióticos, como os solventes orgânicos, por promover aumentos na produção de RLs, criando assim um

desequilíbrio na homeostase entre moléculas oxidantes e defesa antioxidante do organismo (GROMADZINSKA & WASOWICZ, 2003; COSTA et al., 2005)

Existem evidências de que a metabolização de solventes orgânicos como o tolueno, xileno, estireno e etilbenzeno, entre outros, formam espécies altamente reativas e epóxidos (PERSSON et al., 1990; GATÉ et al., 1999), substâncias essas que poderiam ser as principais responsáveis pela toxicidade desses xenobióticos, levando a alterações em sistemas antioxidantes, dano lipídico, protéico e de DNA (SAWICKA & DLUGOSZ, 2008). O tolueno, por exemplo, é biotransformado principalmente em ácido benzóico e outros metabólitos como o benzaldeído, além disso, uma pequena quantidade do solvente é metabolizada a compostos fenólicos e epóxidos intermediários altamente reativos e prejudiciais às células e tecidos do organismo (MATTIA et al., 1993; TABATABAIE & FLOYD, 1996). Mattia et al. 1993, demonstrou que a injeção intraperitoneal de tolueno em ratos causou uma significativa elevação na geração de EROs e redução nos níveis de GSH no cérebro.

Em uma pesquisa envolvendo ratos expostos a uma mistura de solventes orgânicos evidenciou-se aumento da peroxidação lipídica, acompanhada pela diminuição dos antioxidantes GSH e SOD, o que foi sugerido como resultado da ação oxidante dos solventes sobre os mecanismos de defesa antioxidante do organismo (ULAKOGLU et al., 1998). Mais recentemente, em estudo com um mesmo modelo experimental, foi relatado aumento significativo nos níveis de MDA nos pulmões e no plasma de ratos expostos a tintas (MARTINEZ-ALFARO et al., 2009) e os mesmos achados foram relatados por Dillioglugil, et al. (2005) em estudo desenvolvido em ratos expostos a altas concentrações de solventes, com objetivo de verificar alterações oxidativas em tecido pulmonar.

Martinez-Alfaro et al. (2006) também encontrou depleção nos níveis de GSH, acompanhado pelo aumento do biomarcador lipídico, MDA, e concomitante dano de DNA. Estudo *in vitro* evidenciou dano de DNA, acompanhado por depleção dos níveis de GSH e enzimas antioxidantes, além de dano oxidativo em macromoléculas, mesmo em condições ambientais aceitáveis de exposição para vários solventes orgânicos (COSTA et al., 2005). Já Ilgazli et al. 2004, evidenciou aumento nos níveis de GSH após a sexta semana de exposição, sugerindo uma tentativa de compensação dos danos teciduais causados pelo aumento da peroxidação lipídica no tecido pulmonar de ratos expostos à mistura de solventes em altas concentrações.

Coskun et al. (2005) relataram, em estudo com ratos *Wistar* expostos ao tolueno, níveis de MDA significativamente maiores, e uma diminuição da atividade das enzimas SOD e GPx, além de um aumento na atividade da enzima catalase, evidenciando um desequilíbrio nas defesas antioxidantes do organismo. Ainda, em estudo realizado por Singh, et al. (2010), usando *Drosophila melanogaster* como modelo experimental, foi observado significativo aumento de EROs à medida que aumentava o tempo de exposição a solventes, quando comparados com o grupo controle. Ainda foi evidenciado um aumento tempo-dependente nas atividades de SOD e CAT, elevação significativa nos níveis de MDA e depleção nos níveis de GSH à medida que aumentava os níveis e tempo de exposição (SINGH et al. 2010).

Em estudo com humanos, realizado em um grupo de pintores expostos a uma complexa mistura de solventes (estireno, etilenoglicol, tolueno, p-xileno), foi demonstrado um aumento na concentração dos dois principais produtos da peroxidação lipídica: malondialdeído e 4-hidroxinonenal (MDA e 4-HNE) quando comparados com o grupo não exposto (grupo controle) (DLUGOSZ & SAWICKA, 1998).

Ainda, trabalhadores expostos cronicamente a solventes orgânicos demonstraram aumento significativo nos níveis de MDA quando comparado com o grupo controle. O aumento da peroxidação lipídica foi acompanhado pelo aumento das enzimas SOD e GPx, sugerindo um mecanismo compensatório desenvolvido pelos trabalhadores expostos (HALIFEOGLU et al., 2000). Estudos preliminares, com um grupo de 22 trabalhadores expostos ao estireno e outras misturas presente em tintas, demonstraram concentrações significativamente elevadas de MDA em comparação com o grupo controle (DLUGOSZ et al., 2005). Bayil et al., 2007, conduziram um estudo com vinte pintores, onde os resultados demonstraram níveis aumentados de MDA e SOD nos pintores, quando comparados ao grupo não exposto e diminuição da capacidade antioxidante total.

Recentemente, em um trabalho realizado pelo nosso grupo de pesquisa, utilizando trabalhadores expostos a tintas como o grupo de estudo, foi observado que mesmo em baixas concentrações de exposição, estando dessa maneira abaixo do Índice Biológico Máximo Permitido (IBMP), houve alteração nos biomarcadores do estresse oxidativo quando comparados com o grupo controle. Sugerindo assim, que os efeitos de co-exposição de solventes podem contribuir para danos induzidos pelo estresse oxidativo e podem resultar em doenças ocupacionais. Além disso, o

tolueno foi sugerido como o principal indutor de peroxidação lipídica (MORO et al., 2010)

Kim et al. (2010) em uma pesquisa com trabalhadores expostos a solventes orgânicos observou uma correlação significativa entre os níveis do metabólito urinário de exposição ao tolueno, ácido hipúrico, com os níveis de MDA.

No entanto, existem poucos trabalhos científicos que correlacionam exposições a solventes orgânicos e os biomarcadores do estresse oxidativo em seres humanos, principalmente avaliando conjuntamente antioxidantes exógenos, como as vitaminas E, retinol e carotenóides. Desta forma, devido a escassez de trabalhos encontrados sobre esse assunto, estudos que contribuam para o melhor entendimento do possível envolvimento da exposição ocupacional a solventes orgânicos, sistema antioxidante, exógeno e endógeno, e o estresse oxidativo são importantes.

3 RESULTADOS

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de dois manuscritos, apresentados a seguir. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios manuscritos. A apresentação do manuscrito I está baseada na versão submetida à revista *Biomedical Chromatography* e o manuscrito II na versão submetida à revista *Archives of Medical Research*.

3.1 Manuscrito I

Quantification of lycopene, β -carotene, retinol and α -tocopherol in human plasma after a simple extraction procedure, stability study and application

Manuscrito submetido à Revista *Biomedical Chromatography*.

Quantification of lycopene, β -carotene, retinol and α -tocopherol in human plasma after a simple extraction procedure, stability study and application

MF Charão^{1,2}, AM Moro^{2,3}, N Brucker^{2,3}, RP Bulcão^{2,3}, M Baierle^{2,3}, J Durgante², PH Saldiva⁴, D Bohrer⁵, SC Garcia^{2*}

¹Post-graduate Program of Pharmacology, Center of Healthy Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

²Laboratory of Toxicology, Department of Analysis, Federal University of Rio Grande of Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

³Post-graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁴Laboratory of Experimental Air Pollution, Medical School, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

⁵Department of Chemistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

*Direct correspondence to Prof Dr Solange Cristina Garcia.

E-mail address: solange.garcia@ufrgs.br (S. C. Garcia).

Laboratory of Toxicology, Department of Analysis, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Av. Ipiranga 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil

Running Head: Plasma lipid-soluble vitamin quantification, stability and application.
Abstract

Epidemiological studies showed that high intakes of lycopene, vitamins A, E and β -carotene are associated with low risk of several chronic diseases. Studies reported quantification of these vitamins, but the extractions normally are quite laborious and lengthy. Thus, an isocratic HPLC method for simultaneous quantification in plasma using a simple liquid-liquid extraction procedure, with fluorescence and visible detection was optimized, validated and applied. Moreover stability study was conducted with plasma samples and extracted material stored at -20°C until three months. The assay was linear from 0.025 to 0.8 $\mu\text{mol/L}$ for lycopene and β -carotene and 0.25 to 8.0 $\mu\text{mol/L}$ for retinol, 2.0 to 64.0 $\mu\text{mol/L}$ for α -tocopherol. Intra- and inter-run precision were obtained with $\text{CV}\% < 5\%$. The accuracy ranged from 1.26 to -2.99%, 0.45 to -4.45%, 0.29 to -4.73%, 0.15 to -5.80% for lycopene, retinol, α -tocopherol and β -carotene, respectively; and recoveries were 92.73 – 104.26%. Sensitivity obtained was sufficient for routine clinical application. The stability study demonstrated that plasma and extracted material were stable until two months stored at -20°C . The results in painters demonstrated that all vitamins were decreased compared with nonexposed subjects. In this line, the method proved to be reproducible, precise, accurate, sensitive and stable.

Keywords: Lycopene; liquid-liquid extraction, stability, lipid-soluble vitamins; painters.

Introduction

Oxidative stress is a process characterized by an imbalance between antioxidants and oxidants species (Locatelli *et al.*, 2003), and it is involved in development of several pathologies (Morena *et al.*, 2002; Rumley *et al.*, 2004). The organism has some mechanisms of defense from dietary sources, such as lipid-soluble vitamins, which can prevent diseases, for example some types of cancer, cardiovascular disease and chronic disorders (Su *et al.*, 1999; Olmedilla *et al.*, 2001; Ortega *et al.*, 2004; Semeraro *et al.*, 2009).

Thus, several biological activities have been described for these compounds (Olmedilla *et al.*, 2001) and the protective effect of these substances may be due mainly to their antioxidants properties (Talwar *et al.*, 1998). Among vitamins, lycopene, retinol, α -tocopherol and β -carotene are major components of the exogenous antioxidant defense system, acting against peroxidation (Shi *et al.*, 2004; Stahl & Sies, 2005; Yuan *et al.*, 2006; Semeraro *et al.*, 2009).

Also, many epidemiological studies showed that high intakes of lycopene, vitamins A, E and β -carotene are associated with low risk development of several chronic diseases (Steghens *et al.*, 1997; Olmedilla *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003; Ortega *et al.*, 2004). For this reason, quantification of these vitamins is very important, with a rapid, simple and specific method for determination of these compounds simultaneously in plasma is necessary. Moreover, study of stability utilizing a common freezer to store the samples also is important, especially in epidemiology studies.

High performance liquid chromatography (HPLC) methods are considered the best choice for determination of these vitamins. The first quantification method of lipid-soluble vitamins was described in 1973 (Vecchi *et al.*, 1973). Later, in the last ten years, several studies have been published for their quantification with different mobile phase (Casal *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003; Ortega *et al.*, 2004; Vertzoni *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2006; Semeraro *et*

al., 2009; Thibeault *et al.*, 2009), columns with normal (Casal *et al.*, 2001, Boonsiri *et al.*; 2007) or reverse phase (Aust *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003; Siluk *et al.*, 2007; Semeraro *et al.*, 2009;), detectors, such as visible, UV (DAD) (Aust *et al.*, 2001; Casal *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2001; Tzouganaki *et al.*, 2001; Rupérez *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2003; Ortega *et al.*, 2004; Vertzoni *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2006; Semeraro *et al.*, 2009; Thibeault *et al.*, 2009), fluorescence (FLD) (Aust *et al.*, 2001; Casal *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2001; Taibi & Nocotra, 2002; Lee *et al.*, 2003; Rupérez *et al.*, 2004; Siluk *et al.*, 2007; Semeraro *et al.*, 2009) and electrochemical (ECD) (Aust *et al.*, 2001; Wang & Wang, 2001; Rupérez *et al.*, 2004), and different sample extraction procedures (Thomas *et al.*, 2001; Taibi & Nocotra, 2002; Tzouganaki *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003; Ortega *et al.*, 2004; Rupérez *et al.*, 2004; Vertzoni *et al.*, 2005; Boonsiri *et al.*, 2007; Siluk *et al.*, 2007; Semeraro *et al.*, 2009; Thibeault *et al.*, 2009).

Many studies determined that for complete chromatographic separation of vitamins of interest is required with the use of gradient (MacCrehan & Schonberger, 1987; Steghens *et al.*, 1997 Su *et al.*, 1999; Casal *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2001; Taibi & Nicrota, 2002; Ortega *et al.*, 2004; Siluk *et al.*, 2007) rather than an isocratic solvent (Finckh *et al.*, 1995; Abahusain *et al.*, 1998; Talwar *et al.*, 1998; Tzouganaki *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003; Vertzoni *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2006; Boonsiri *et al.*, 2007; Semeraro *et al.*, 2009; Thibeault *et al.*, 2009). The use of solvent in the gradient system proved to be disadvantageous, given to the substantially longer chromatographic times involved, compared to the isocratic method, since the gradient method required rebalancing of the HPLC system after injections (Thibeault *et al.*, 2009).

Some reports described methods using diode-array detection (DAD) for simultaneous determination of retinoids, carotenoids and tocopherols, but the detection of α -tocopherol by UV causes loss of sensitivity (Casal *et al.*, 2001). Fluorescence (FLD) detector is more

sensible than UV, is generally used for quantification of tocopherols (Casal *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2001; Taibi & Nicotra, 2002; Lee *et al.*, 2003; Repérez *et al.*, 2004; Siluk *et al.*, 2007), and less frequently for the retinoids (Taibi & Nicotra, 2002; Siluk *et al.*, 2007; Semeraro *et al.*, 2009).

Several procedures for sample extraction have been, some of them based on protein precipitation using an organic solvent such as ethanol, methanol, isopropanol or acetonitrile, followed by liquid-liquid extraction and/or evaporation of the organic solvent under nitrogen stream and posterior reconstitution (MacCrehan & Schonberger, 1987; Finckh *et al.*, 1995; Steghens *et al.*, 1997; Abahusain *et al.*, 1998; Talwar *et al.*, 1998; Su *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 2001; Wang & Wang, 2001; Tzouganaki *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003; Ortega *et al.*, 2004; Rapérez *et al.*, 2004; Vertzoni *et al.*, 2005; Boonsiri *et al.*, 2007; Siluk *et al.*, 2007; Thibeault *et al.*, 2009), and normally are methods lengthy. Extraction reagents include *n*-hexane, petroleum ether, dichloromethane-methanol, chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol (MacCrehan & Schonberger 1987; Finckh *et al.*, 1995; Steghens *et al.*, 1997; Abahusain *et al.*, 1998; Talwar *et al.*, 1998; Su *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 2001; Wang & Wang, 2001; Taibi & Nicotra, 2002; Tzouganaki *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003; Ortega *et al.*, 2004; Rupérez *et al.*, 2004; Vertzoni *et al.*, 2005; Boonsiri *et al.*, 2007; Siluk *et al.*, 2007; Semeraro *et al.*, 2009; Thibeault *et al.*, 2009), with the addition of antioxidants such as butylated hydroxytoluene (MacCrehan & Schonberger 1987; Finckh *et al.*, 1995; Thomas *et al.*, 2001; Tzouganaki *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003; Vertzoni *et al.*, 2005; Boonsiri *et al.*, 2007; Siluk *et al.*, 2007; Semeraro *et al.*, 2009; [5, 13, 16, 19, 22-26] or ascorbic acid (Talwar *et al.*, 1998) to avoid oxidation of lipid-soluble vitamins.

Despite of a study that reported an isocratic method for separation of carotenoids, tocopherols and retinol within a run time of 15 minutes, the extraction procedure was prolonged and laborious (Thibeault *et al.*, 2009), making the total analysis time more

prolonged and more difficult to use in clinical routine. Extraction methods that do not require many steps in the samples treatment and the evaporation procedure would offer an advantage and to be a resource to mistakes or loss.

In this paper, a fast analysis method using HPLC with VIS/fluorescence detection and isocratic elution was developed to quantify plasma lycopene, retinol, α -tocopherol and β -carotene levels, simultaneously, with a simple and rapid extraction procedure. Moreover, stability tests using plasma and supernatant (extracted) stored at -20°C and application of method in plasma human samples were performed.

Experimental

Chemicals and reagents

HPLC grade acetonitrile, dichloromethane, dioxane, ethanol, methanol, *n*-butanol and triethylamine were purchased from Tedia Company (Fairfield, USA). Butylated hydroxytoluene (BHT), ammonium acetate, retinol, α -tocopherol, lycopene and β -carotene were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Instrumentation and chromatographic conditions

The HPLC system, purchased from Shimadzu (Kyoto, Japan), consisted of: a quaternary pump LC-20AT and degasser DGU-20A5, an automatic injector with cooler SIL20-ACHT, a column oven CTO-20A, UV/VIS detector SPD-20AV, fluorescence detector RF-10XL and system controller CBM-20A. Chromatographic control, data processing were carried out using LC Solution Software[®], version 1.25.

Vitamins were separated by isocratic elution with a mixture of acetonitrile: dioxane: methanol solution: triethylamine (81.7:15:3:0.3, v/v) as mobile phase. Methanol solution

consisted of ammonium acetate 0.1 M dissolved in methanol. The flow rate was set at 1.6 mL/min, using a Shim-pack CLC-ODS (150 mm x 4 mm, 5 μ m) column connected with a guard column ODS and thermostated at 20 °C.

The eluent was monitored by measuring its absorbance at 450 nm, to quantify lycopene and β -carotene, and fluorescence in two different excitation and emission wavelength, to quantify retinol and α -tocopherol. Retinol was detected using an excitation of 340 nm and emission wavelength of 520 nm. These settings were maintained from injection to 5 min. At 5 min, the excitation was changed to 298 nm and the emission wavelength to 328 nm, to quantify α -tocopherol. These conditions were maintained up to 15 min and returned to the initial excitation and emission wavelength until the end of chromatographic run at 25 min.

Standard solutions and standard curve preparation

All standards were protected from light and manipulated using amber eppendorf. Stock solutions of following vitamins were prepared as follows: retinol (3.5 mmol/L) dissolved in ethanol, α -tocopherol (0.2 mol/L) in ethanol:*n*-butanol (50:50, v/v), lycopene and β -carotene (each to 1.8 mmol/L) in dichlorometane, all solvents containing 5 mg BHT/mL. These solutions were stored in aliquots in amber eppendorfs at -80 °C. Their actual concentrations were confirmed spectrophotometrically, after dilution in ethanol, using the appropriated absorption coefficients (Thibeault *et al.*, 2009)

Intermediated working standard solutions were prepared separately in the concentrations of 100 μ mol/L for retinol, 500 μ mol/L for α -tocopherol and 10 μ mol/L for lycopene and β -carotene diluted in ethanol:*n*-butanol (50:50, v/v) containing 5 mg BHT/mL. For standard calibration curves, the intermediated standard solutions were diluted in ethanol:*n*-butanol (50:50, v/v) containing 5 mg BHT/mL, to obtain a mixture of 5 different concentrations of working standard solutions in the range of 0.25 – 8 μ mol/L; 2 – 64 μ mol/L;

0.025 – 0.8 $\mu\text{mol/L}$ and 0.025 – 0.8 $\mu\text{mol/L}$ for retinol, α -tocopherol, lycopene and β -carotene, respectively. These solutions were prepared daily, protected from light and kept on ice during all procedure. For the standard addition curves, a fixed volume (30 μL) of each diluted mixture of working standard solutions was added to 150 μL of plasma pool, then an aliquot of 90 μL was transferred to an amber eppendorf and the samples were further processed with ethanol:*n*-butanol solution (50:50, v/v) containing 5 mg BHT/mL for extraction as described below. For basal levels, a fixed volume (30 μL) of ethanol:*n*-butanol solution (50:50, v/v) containing 5 mg BHT/mL was added to 150 μL of plasma pool and processed.

Sample procedure

Blood samples were collected from voluntaries by venipuncture into 5 mL evacuated tubes containing an EDTA solution as anticoagulant and were maintained at 0-4 $^{\circ}\text{C}$ and protected from light until centrifugation. The blood samples were centrifuged at 1500 x g for 10 min in refrigerated centrifuge (4 $^{\circ}\text{C}$) and supernatant plasma was remove and each sample was divided into 500 μL aliquots and stored at -80 $^{\circ}\text{C}$ until analysis. The blood collects to stability tests were realized separately and are described below.

The extraction procedure was carried out in duplicate, under ice bath, in a room protected from direct sunlight. In an amber eppendorf, 90 μL of plasma was mixed with 450 μL ethanol:*n*-butanol solution (50:50, v/v) containing 5 mg BHT/mL, vortex mixed for 10 seconds, let stand for 5 min on ice, light protected, and after mixed again further 10 seconds, followed by centrifugation at 2700 x g for 3 min; 400 μL of the clear supernatant was transferred to vials. Vials were capped and immediately placed in compartment of autosampler that was maintained at 4 $^{\circ}\text{C}$. Then, 20 μL of each sample was injected into HPLC system for simultaneous quantification of vitamins.

Assay validation

Linearity, precision, accuracy, recovery and sensitivity

A linear relationship should be evaluated across the range of the analytical procedure. This linearity was determined by five analytical curves with 0.25, 1.0, 2.0, 4.0 and 8.0 $\mu\text{mol/L}$ for retinol, 2.0, 8.0, 16.0, 32.0 and 64.0 $\mu\text{mol/L}$ for α -tocopherol and 0.025, 0.1, 0.2, 0.4 and 0.8 $\mu\text{mol/L}$ for lycopene and β -carotene spiked in plasma. Plasma without spiked vitamins was considered the basal level. The curves were prepared on five different days and the linear regression was calculated.

The precision of a method is determined by the extent to which the test results of multiple injections of standards agree. It can be subdivided into repeatability or intra-run precision and intermediate precision or inter-run. Accuracy is the extent to which the results generated approached the real value. The intra- and inter-run precisions and accuracy of the method were evaluated on five separated days. Three standards concentrations (0.25, 1.0 and 8.0 $\mu\text{mol/L}$ for retinol; 2.0, 8.0 and 32 $\mu\text{mol/L}$ for α -tocopherol; 0.025, 0.1 and 0.8 $\mu\text{mol/L}$ for lycopene and β -carotene) were carried out in replicate and injected into HPLC (n=5). The intra- and inter-run precisions were calculated by coefficient of variation (CV%). The accuracy was expressed as percentage bias.

Recovery is reported as the extraction efficiency of an analytical process, reported in percentage. To calculate the recoveries of the vitamins of interest, plasma samples were spiked with retinol (0.25 – 8.0 $\mu\text{mol/L}$), α -tocopherol (2.0 – 64 $\mu\text{mol/L}$), lycopene and β -carotene (0.025 – 0.8 $\mu\text{mol/L}$) and the peak areas of replicates were compared to those of standard solutions (n=5).

The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were determined by use of standard deviation of the response (s) and the slope of calibration curve (b) constructed at

levels near the limit as per ICH recommendations (ICH, 2004). The equations are: $LOD = 3.3 s/b$ and $LOQ = 10 s/b$. The standard deviation of the response was based on the standard deviation of the intersection of the line in the y-axis.

Stability in plasma before and after extraction

For the assessment of lycopene, retinol, α -tocopherol and β -carotene in plasma after storage, a pool fresh sample was drawn and separated in aliquots. A replicate was quantified by HPLC at the day of the collection, after extraction procedure. The other aliquots were stored at -20°C and the stability was evaluated at 1, 10, 20, 30, 60 e 90 days after collection of blood samples. Moreover, other test was performed after plasma extraction. Thus, the samples were processed completely, the supernatant was quantified by HPLC at the day of the collection, and the remaining supernatants were separated in aliquots and storage at -20°C and quantified at 1, 10, 20, 30, 60 and 90 days after extraction.

Ruggedness

The ruggedness of the method was tested in plasma samples by varying some chromatographic parameters, such as mobile phase composition, flow rate, temperature and analysts.

Application

The method was applied to determine plasmatic levels of lycopene, retinol, α -tocopherol and β -carotene of a group of 45 painters from an industry of Rio Grande do Sul and a corresponding control group of 30 nonoccupational exposed men, aged 28.70 ± 4.20 and 27.80 ± 4.30 years (mean \pm standard deviation), respectively.

The study was approved by the committee of ethics in research (No. 23081.015931/2006-59) and all participants were informed and your consent written was required

Statistical analyses

The analyses of the data were carried out using software Statistic 6.0 for windows with Mann-Whitney test for independent samples. All results were expressed as mean \pm standard deviation. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

Results and Discussion

Quantification of exogenous antioxidants is very important to evaluate different physiological and pathological conditions. Also, is known that in oxidative stress there is a depletion of the antioxidants. Thus, studies in this area are indispensable to advance in the prevention of diseases. Therefore, methods for laboratorial routine with reproducibility and stability reliable are necessary, especially in epidemiological studies.

Chromatography

The method described separates and quantifies in a single run, lycopene, retinol, α -tocopherol and β -carotene using reversed-phase chromatography, isocratic elution, VIS and FLD detector. Typical chromatograms of a standard mixture and plasma sample are shown in Fig. 1 and Fig. 2, respectively. The retention times for retinol, α -tocopherol, lycopene and β -carotene were 2.3, 8.5, 11.4 and 21.3 min, respectively, and the total run time of 25 min is similar to that of other methods in the literature (Steghens *et al.*, 1997; Abahusain *et al.*, 1998; Casal *et al.*, 2001 Lee *et al.*, 2003) besides, the number of compounds properly separated in

this method is higher. Unfortunately, all peaks of biological sample could not be identified because of a lack of pure standards. However, even though we could not identify these peaks, separating them means that they do not interfere with identified peaks, which improves the specificity.

It is well known the importance of triethylamine and ammonium acetate in increasing the yield of carotenoids, particularly lycopene and β -carotene (Craft, 1992; Thibeault *et al.*, 2009). In view of this, we used a mobile phase with 3 mmol/L of ammonium acetate and we attempted to test two different concentrations of triethylamine. The results showed that the major concentration of triethylamine tested (0.3%, v/v) was better for quantification of lycopene and β -carotene due to better resolution and an increase in peak area (data not show).

Extraction of vitamins

Several HPLC methods for determination of lycopene, retinol, α -tocopherol and β -carotene in human serum or plasma have been reported. Most of them require protein precipitation, liquid-liquid extraction, drying under nitrogen and reconstitution of the sample prior to analysis (MacCrehan & Schonberger, 1987; Finckh *et al.*, 1995; Steghens *et al.*, 1997; Abahusain *et al.*, 1998; Talwar *et al.*, 1998; Su *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 2001; Wang & Wang, 2001; Tzouganaki *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003; Ortega *et al.*, 2004; Rupérez *et al.*, 2004; Vertzoni *et al.*, 2005; Boonsiri *et al.*, 2007; Siluk *et al.*, 2007; Thibeault *et al.*, 2009). In general, the procedures are quite laborious and carry the risk of unwanted transformation such as isomerization, oxidation and degradation products (Taibi & Nicotra, 2002).

Approximately 90% of the total plasma lipid-soluble vitamins in humans is associated with low-density lipoprotein and high-density lipoprotein fractions, so current protein precipitation procedures with ethanol, methanol, isopropanol or acetonitrile, followed by extraction with organic solvents are used (Taibi & Nicotra, 2002). In our opinion, this

procedure can be shortened by organic solvents, such as mixture of ethanol and *n*-butanol, which can perform lipid extraction by breaking up the lipoproteins.

Abahusain *et al.* (1998) reported a liquid-liquid extraction and posterior direct injection into HPLC for quantification of retinol, α -tocopherol, α - and β -carotene but not lycopene, an important antioxidant in the body, and the extraction time is very prolonged, taking around 30 minutes. Also, Taibi & Nicotra (2002) and Rupérez *et al.* (2004) reported a simple and fast extraction procedure, but for quantification of only retinol and α -tocopherol, and only retinol, α -tocopherol and γ -tocopherol, respectively. Methods that quantify these vitamins and carotenoids require many steps for their (MacCrehan & Schonberger, 1987; Finckh *et al.*, 1995; Steghens *et al.*, 1997; Abahusain *et al.*, 1998; Talwar *et al.*, 1998; Su *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 2001; Wang & Wang, 2001; Tzouganaki *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003; Ortega *et al.*, 2004; Rupérez *et al.*, 2004; Vertzoni *et al.*, 2005; Boonsiri *et al.*, 2007; Siluk *et al.*, 2007; Thiebeault *et al.*, 2009) and the procedure is longer and laborious. Recently, Thiebeault *et al.* (2009) related a fast method for quantification of 9 compounds (carotenoids, tocopherols and retinol) within a run time of 15 minutes, but the extraction procedure is prolonged (approximately 40 minutes) and with many steps, making the total analysis time slow (approximately 55 minutes) and the extraction procedure laborious.

In this work we reported a simple and rapid sample preparation procedure (approximately 8 minutes) in which five volumes of an ethanol:*n*-butanol solution (50:50, v/v) containing 5 mg of BHT/mL were used to extraction of retinol, α -tocopherol, lycopene and β -carotene, consisting of a one-step extraction, direct injection of the sample into the HPLC system and analysis (total analysis time approximately 33 minutes). This allows the analysis of a large series of samples in a few times, which is very important in epidemiological or clinical studies.

Validation

Linearity, precision, accuracy, recovery and sensitivity

Linearity and reproducibility were evaluated by linear regression. The equations obtained by the squared regression and the values to r^2 are presented in Table 1. Analytical curves (i.e., peak area of each concentration from spiked plasma against peak area from lycopene, retinol, α -tocopherol and β -carotene standard solutions) showed excellent linearity and parallelism with a linear regression coefficients, being 0.998, 0.999, 0.997 and 0.999 for lycopene, retinol, α -tocopherol and β -carotene, respectively.

The intra- and inter-run precision (expressed in percentage by variation coefficient) and the accuracy (as percentage of bias) based on peak area ratios are represented in Table 2.

To calculate the recoveries of the vitamins, plasma samples were spiked with known amounts of retinol, α -tocopherol, lycopene and β -carotene. Data are shown in Table 2 and were satisfactory, being within the accepted values, which should be around $\pm 15\%$ (Causon, 1997).

LOD and LOQ (determined by 3.3 s/b and 10 s/b) were sufficiently low to measure the lowest concentration of lycopene and β -carotene. The sensitivity for each parameter was satisfactory to the plasmatic lipid-vitamins quantification in a routine clinical analysis. LOD and LOQ are presented in Table 3.

Stability

Some reports related that plasma samples stored at $-70\text{ }^\circ\text{C}$ are stable at least 12 months (Talwar *et al.*, 1998) and 4 years (Comstock, *et al.*; 1995). However, few works shown the stability of lycopene, retinol, α -tocopherol and β -carotene in plasma samples and extracted material stored at $-20\text{ }^\circ\text{C}$ (Su *et al.*, 1999; Abahusain *et al.*, 1998). Abahusain *et al.* (1998) reported the stability for retinol, α -tocopherol, α - and β -carotene, but not for lycopene.

Moreover, Su (1999) related the stability of plasma samples and extracted material by only 72 hours.

In this work, we reported stability of plasma samples (Fig. 3) and extracted material, supernatant, (Fig. 4) stored at -20 °C at 90 days. It is possibly to observe that there was no significant loss of lycopene, retinol, α -tocopherol and β -carotene levels until the second month (60 days) in the plasma and extracted material, being within the accepted range, which should be around $\pm 10\%$ (Causon, 1997), but in the third month only retinol was stable in the plasma and extracted material, and the other vitamins shown loss in the last month analyzed. In this line, it is possible to suggest that plasma samples with EDTA could stay at -20°C until two months with reliability.

Ruggedness

Methodological ruggedness was considered satisfactory under different chromatographic conditions, such as mobile phase composition and different analysts. The temperature ranged from 18 to 23 °C and the flow rate from 1.5 to 1.7 mL/min, also shown satisfactory results. These data showed that this method could be suitably used for quantification of retinol, α -tocopherol, lycopene and β -carotene in plasma samples.

Application

The method was applied to quantify for the first time the plasma lycopene, retinol, α -tocopherol and β -carotene levels, as possible protective factors, in a study of a group of 45 painters from an industry of Rio Grande do Sul exposed to organic solvents and a corresponding control group of 30 nonoccupational exposed men. The results (Table 4) indicated significantly lower lycopene, retinol and β -carotene concentrations in exposed subjects compared to controls, however all vitamins were on reference values (Burtis, 1998).

This group was chosen because it is known that some xenobiotics are involved in the development of occupational diseases. On the other hand, there is few scientific works demonstrating of association between oxidative stress biomarkers include exogenous antioxidants and tissue damage in this group.

Conclusion

An analytical method for quantification of plasma lycopene, retinol, α -tocopherol and β -carotene levels was optimized and validated. The method described gives excellent linearity, precision, accuracy and recoveries for all vitamins of interest.

The advantage of the method is the simultaneous extraction and analysis of four lipid-soluble vitamins from human plasma with a simple and fast extraction procedure. Another advantage of the present procedure is that only a few microliters of plasma (90 μ L) are necessary to perform the analyses. The study of stability shown that there was no significant decreased in the compounds of interest in plasma and extracted material storing at -20 °C for 60 days. In this line, this method may be used for quantitative analysis and it opens up the possibility of including these vitamins in epidemiological studies with large number of subjects. Moreover, for the first time was demonstrated that painters possess decreased levels of the plasma vitamins studied and future studies are necessary with this workers group.

Acknowledgements

The authors would like to thank CAPES/DAAD PROBRAL 352/10, CNPq - Universal Edital (grant to S.C. Garcia) and CNPq/MCT (N° grant to P.H. Saldiva) for the finance support. M.F. Charão is the recipient of CAPES/REUNI Masters Degree fellowship. S.C. Garcia is the recipient of CNPq research fellowship.

References

Abahusain MA, Wright J, Dickerson JWT, El-Hazmi MA and Enein HYA. Determination of retinol, α -tocopherol, α - and β -Carotene by direct extraction of human serum using high performance liquid chromatography. *Biomedical Chromatography* 1998; 12: 89-93.

Aust O, Sies H, Stahl W and Polidori MC. Analysis of lipophilic antioxidants in human serum and tissues: tocopherols and carotenoids. *Journal of Chromatography A* 2001; 936: 83-93.

Boonsiri P, Pooart J, Tangrassameeprasert R and Hongsprabhas P. Serum β -carotene, lycopene and α -tocopherol levels of healthy people in northeast Thailand. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 2007; 16: 47-51.

Burtis C, Ashwood E and Eward R. *Fundamentos de Química Clínica*, fourth ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1998, 454.

Casal S, Macedo B and Oliveira MBP. Simultaneous determination of retinol, β -carotene and α -tocopherol in adipose tissue by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* 2001; 763: 1-8.

Causon R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis Viewpoint and discussion. *Journal of Chromatography B* 1997; 689: 175-180.

Comstock GW, Norkus EP, Hoffman SC, Xu MW and Helzlsouer KJ. Stability of ascorbic acid, carotenoids, retinol, and tocopherols in plasma stored at -70°C for 4 years. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 1995; 4: 505-507.

Craft NE. Carotenoid reversed-phase high-performance liquid chromatography methods: reference compendium. *Methods in Enzymology* 1992; 213: 185-205.

Finckh B, Kontush A, Commentz J, Hübner C, Burdelsk M and Kohlschütter A. Monitoring of ubiquinol-10, ubiquinone-10, carotenoids, and tocopherols in neonatal plasma microsamples using high-performance liquid chromatography with coulometric electrochemical detection. *Analytical Biochemistry* 1995; 232: 210-216.

International Conference on Harmonisation Q2B: Validation of Analytical Procedures: Methodology. ICH: Geneva 2004; 1-9.

Lee BL, New AL and Ong CN. Simultaneous determination of tocotrienols, tocopherols, retinol, and major carotenoids in human plasma. *Clinical Chemistry* 2003; 49: 2056-2066.

Locatelli F, Canaud B, Eckardt K, Stenvinkel P, Wanner C and Zoccali C. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2003; 18: 1272-1280.

MacCrehan WA and Schönberger E. Determination of retinol, α -tocopherol, and β -carotene in serum by liquid chromatography with absorbance and electrochemical detection. *Clinical Chemistry* 1987; 33: 1585-1592.

Morena M, Cristol JP, Bosc JY, Tetta C, Forret G, Leger CL, Delcourt C, Papoz L and Descomps B. Convective and diffusive losses of vitamin C during haemodiafiltration session: a contributive factor to oxidative stress in haemodialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2002; 17: 422-427.

Olmedilla B, Granado F, Southon S, Wright AJA, Blanco I, Gil-Martinez E, Van den Berg H, Corridan B, Roussel AM, Chopra M and Thurnham DI. Serum concentrations of carotenoids and vitamins A, E, and C in control subjects from five European countries. *British Journal of Nutrition* 2001; 85: 227-238.

Ortega H, Coperías JL, Castilla P, Gómez-Coronado D and Lasunción MA. Liquid chromatographic method for the simultaneous determination of different lipid-soluble antioxidants in human plasma and low-density lipoproteins. *Journal of Chromatography B* 2004; 803: 249-255.

Rumley AG, Woodward M, Rumley A and Lowe GDO. Plasma lipid peroxides: relationships to cardiovascular risk factors and prevalent vascular disease. *QJM* 2004; 97: 809-816.

Rupérez FJ, Mach M and Barbas C. Direct liquid chromatography method for retinol, α - and γ -tocopherols in rat plasma. *Journal of Chromatography B* 2004 ; 800: 225-230.

Semeraro A, Altieri I, Patriarca M and Menditto A. Evaluation of uncertainty of measurement from method validation data: An application to the simultaneous determination of retinol and α -tocopherol in human serum by HPLC. *Journal of Chromatography B* 2009; 877: 1209-1215.

Shi J, Kakuda Y and Yeunq D. Antioxidative properties of lycopene and other carotenoids from tomatoes: synergistic effects. *Biofactors* 2004; 21: 203-210.

Siluk D, Oliveira RV, Esther-Rodriguez-Rosas M, Ling S, Bos A Ferrucci L and Wainer IW. A validated liquid chromatography method for the simultaneous determination of vitamins A and E in human plasma. *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis* 2007; 44: 1001-1007.

Stahl W and Sies H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005; 1740: 101-107.

Steghens JP, van Kappel AL, Riboli E and Collombel C. Simultaneous measurement of seven carotenoids, retinol and α -tocopherol in serum by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* 1997; 694: 71-81.

Su Q, Rowley KG and O'Dea K. Stability of individual carotenoids, retinol and tocopherols in human plasma during exposure to light and after extraction. *Journal of Chromatography B* 1999; 729: 191-198.

Taibi G and Nicotra CMA. Development and validation of a fast and sensitive chromatographic assay for all-trans-retinol and tocopherols in human serum and plasma using liquid-liquid extraction. *Journal of Chromatography B* 2002; 780: 261-267.

Talwar D, Ha TKK, Cooney J, Brownlee C and St JO'Reilly D. A routine method for the simultaneous measurement of retinol, α -tocopherol and five carotenoids in human plasma by reverse phase HPLC. *Clinica Chimica Acta* 1998; 270: 85-100.

Thibeault D, Su H, MacNamara E and Schipper HM. Isocratic rapid liquid chromatographic method for simultaneous determination of carotenoids, retinol, and tocopherols in human serum. *Journal of Chromatography. B* 2009; 877: 1077-1083.

Thomas JB, Kline MC, Gill LM, Yen JH, Duewer DL, Sniegoski LT and Sharpless KE. Preparation and value assignment of standard reference material 968c fat-soluble vitamins, carotenoids, and cholesterol in human serum. *Clinica Chimica Acta* 2001; 305: 141-155.

Tzouganaki ZD, Atta-Politou J and Koupparis MA. Development and validation of liquid chromatographic method for the determination of lycopene in plasma. *Analytica Chimica Acta* 2002; 467: 115–123.

Vecchi M, Vesely J and Oesterhelt G. Applications of high-pressure liquid chromatography and gas chromatography to problems in vitamin A analysis. *Journal of Chromatography A* 1973; 83: 447-453.

Vertzoni MV, Reppas C and Archontaki HA. Optimized determination of lycopene in canine plasma using reversed-phase high-performance liquid chromatographic, *Journal of Chromatography B* 2005; 819: 149-154.

Xu F, Yuan QP and Dong HR. Determination of lycopene and β -carotene by high-performance liquid chromatography using sudan I as internal standard. *Journal of Chromatography B* 2006; 838: 44-49.

Wang LH and Wang JF. Determination of retinoids in human serum, tocopherol and retinyl acetate in pharmaceuticals by RP-LC with electrochemical detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2001; 25: 785-793.

Yuan JM, Gao YT, Ong CN, Ross RK and Yu MC. Prediagnostic level of serum retinol in relation to reduced risk of hepatocellular carcinoma. *Journal of National Cancer Institute* 2006; 98: 482-490.

Tables:**Table 1** Equations obtained by the squared regression and linear regression coefficients for standard calibration and standard spiked curves.

Vitamins	Standard calibration curve	r ²	Standard spiked curve	r ²
Lycopene	y= 59364x - 252.33	0.999	y= 55211x - 599.81	0.997
Retinol	y= 372736x - 8562.8	1	y= 405787x - 40224	0.999
α-tocopherol	y= 178761x - 22874	0.999	y= 205172x - 171711	0.999
β-carotene	y= 63703x - 15.91	0.999	y= 6358x - 248.12	0.999

Table 2 Results of validation parameters: precision, accuracy and recoveries for plasma spiked samples with the vitamins.

Vitamins	Concentration (μmol/L)	Intra-run precision (%)	Inter-run precision (%)	Accuracy (%bias)	Recovery (%)
Lycopene	0.025	3.02	2.81	-2.99	93.92
	0.2	4.49	2.69	1.26	93.60
	0.8	0.81	2.88	-1.70	92.73
Retinol	0.25	2.99	1.87	2.78	96.51
	2	2.02	3.14	-4.45	101.20
	8	1.60	1.02	0.45	105.02
α-tocopherol	2	3.46	1.62	-2.55	97.15
	16	4.60	3.95	-4.73	100.20
	64	1.60	3.13	0.29	104.26
β-carotene	0.025	3.82	1.41	4.30	101.97
	0.2	2.60	4.69	-5.80	94.72
	0.8	1.05	1.93	0.15	99.73

Table 3 Results of validation parameters: LOD and LOQ.

Vitamins	LOD ($\mu\text{mol/L}$)	LOQ ($\mu\text{mol/L}$)
Lycopene	0.003	0.009
Retinol	0.024	0.073
α -tocopherol	0.276	0.838
β -carotene	0.005	0.015

Table 4 Plasma lycopene, retinol, α -tocopherol and β -carotene levels of the subjects studied (n=75).

Vitamins ($\mu\text{mol/L}$)	Nonexposed group (n=30)	Exposed group (n=45)
Lycopene	0.68 ± 0.18	$0.55 \pm 0.24^*$
Retinol	2.30 ± 0.40	$1.99 \pm 0.38^*$
α -tocopherol	25.60 ± 6.25	23.24 ± 6.18
β -carotene	0.52 ± 0.34	$0.36 \pm 0.20^*$

The results are expressed as mean \pm SD (standard deviation).

* $p < 0.01$

Figure 1. Typical standard chromatograms of vitamins mixture analyzed by HPLC; without plasma. A: Fluorimetric detector adjusted at $\lambda_{ex}=340$ nm and $\lambda_{em}=520$ nm for retinol; $\lambda_{ex}=280$ nm and $\lambda_{em}=328$ nm for α -tocopherol, being (1) Retinol; (2) α -tocopherol. B: VIS detector adjusted at $\lambda=450$ nm; (3) Lycopene; (4) β -carotene.

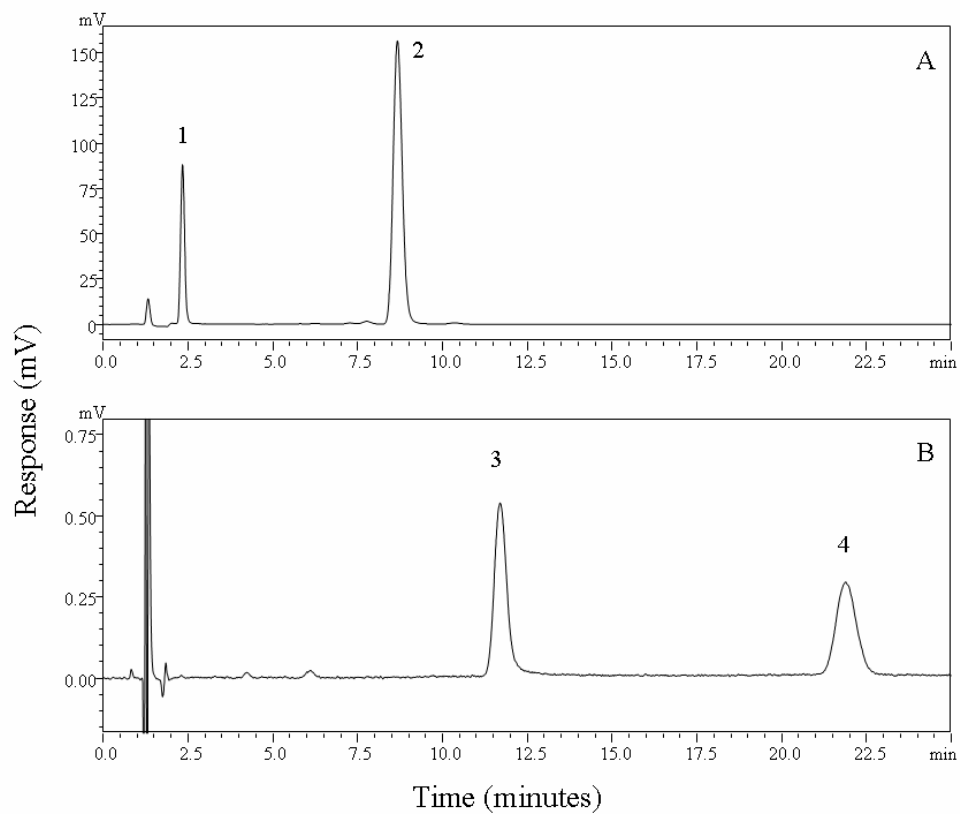


Figure 2. Typical chromatograms of human plasma sample, analyzed by the method described in the present article, without spiked. A: Fluorimetric detector adjusted at $\lambda_{ex}=340$ nm and $\lambda_{em}=520$ nm for retinol; $\lambda_{ex}=280$ nm and $\lambda_{em}=328$ nm for α -tocopherol, being (1) Retinol; (2) α -tocopherol. B: VIS detector adjusted at $\lambda=450$ nm; (3) Lycopene; (4) β -carotene.

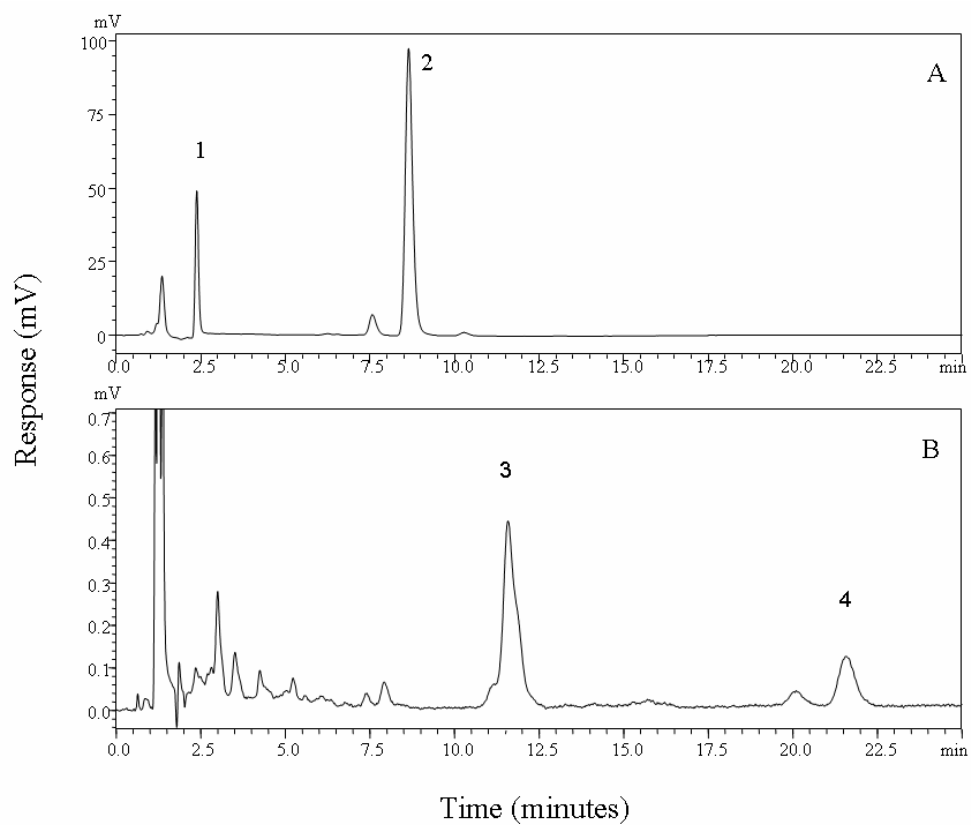


Figure 3. Stability tests with plasma samples stored at -20 °C, being “0” the collection day and until 90 days after.

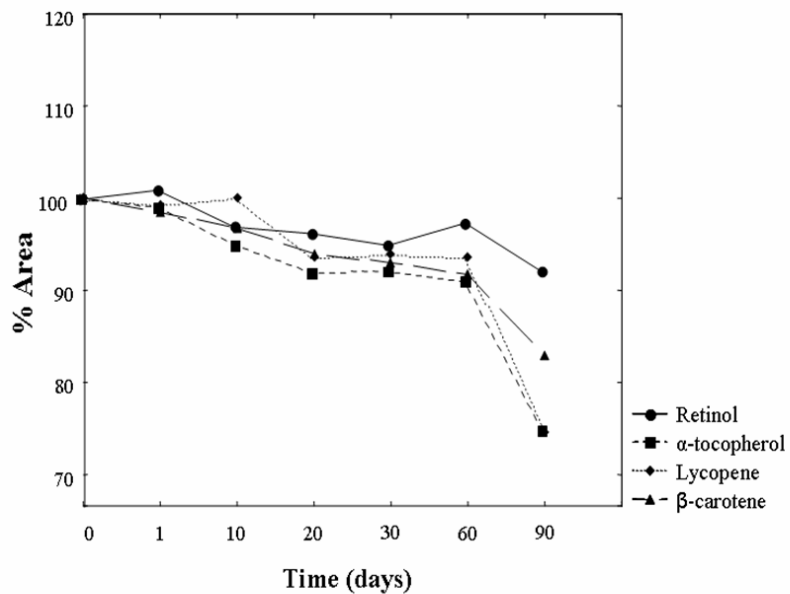
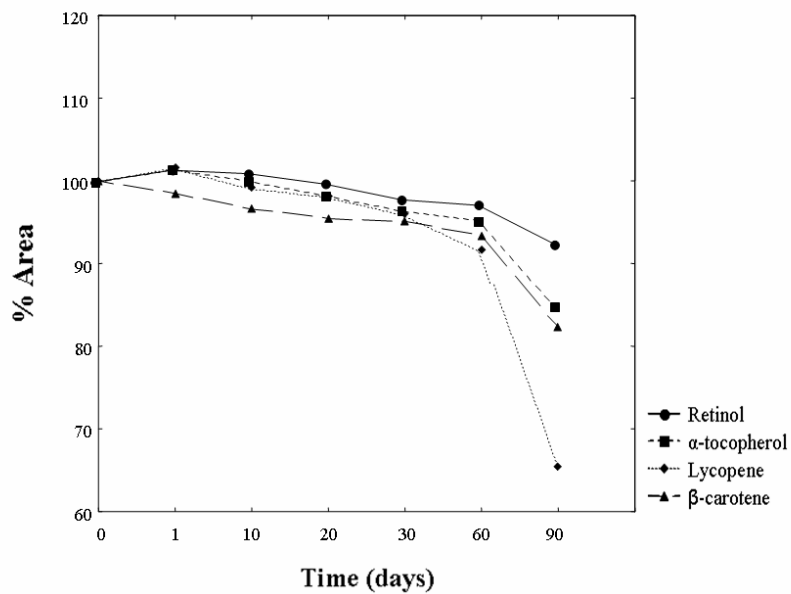


Figure 4. Stability tests with plasma samples after extraction with organic solvents stored at -20 °C for until 90 days.



3.2 Manuscrito II

Possible protective effects of exogenous and endogenous antioxidants on lipid peroxidation in exposed occupationally to paints.

Manuscrito submetido à Revista *Archives of Medical Research*.

Possible protective effects of exogenous and endogenous antioxidants on lipid peroxidation in exposed occupationally to paints.

Mariele F. Charão^{1,2}, Juliana Valentini², Angela M. Moro^{2,3}, Natália Brucker^{2,3}, Rachel Bulcão^{2,3}, Marília Baierle^{2,3}, Fernando Freitas^{2,3}, Sabrina Nascimento², Gillian Guerreiro², Fernanda Waechter², Rafael Linden⁴, Paulo H. Saldiva⁵, Solange C. Garcia^{2*}

¹Post-graduate Program of Pharmacology, Center of Healthy Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

²Laboratory of Toxicology, Department of Analysis, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

³Post-graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁴Health Sciences Institute, Pharmaceutical Sciences, Feevale University, Novo Hamburgo, RS, Brazil

⁵Laboratory of Experimental Air Pollution, Medical School, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

*Direct correspondence to Prof Dr Solange Cristina Garcia.

E-mail address: solange.garcia@ufrgs.br (S. C. Garcia).

Laboratory of Toxicology, Department of Analysis, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Av. Ipiranga 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil

Abstract

Background and Aim: There are evidences that occupational exposure to organic solvents, present in paints, is responsible for the increase of free radicals and enables the development of diseases. Antioxidant defense systems, exogenous and endogenous, could avoid tissue damage. This study investigated possible protective effects of the exogenous and endogenous antioxidants on oxidative damage in painters.

Methods: Blood samples were collected from a nonexposed (n=28) and a painters group (n=42). Blood toluene levels were measured by gas-chromatography; plasmatic malondialdehyde (MDA) and lipid-soluble vitamins levels were quantified by high performance liquid chromatography with visible and fluorescence detection ; endogenous antioxidants, erythrocytes reduced glutathione (GSH) and enzymes catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activities in whole blood were determined by spectrophotometry.

Results: All vitamins, except vitamin E, were significantly lower in exposed group. Also, despite the fact that blood toluene was below the biological exposure limits, the MDA levels and antioxidant enzyme activities were increased, while GSH levels were decreased in painters compared with nonexposed subjects. Moreover, multivariate regression models showed that GSH levels and carotenoids (mainly β -carotene) levels were significant covariables to explain the lipid peroxidation.

Conclusion: The present work suggests that the exogenous antioxidants such as carotenoids could protect occupationally exposed subjects to xenobiotics from lipid peroxidation.

Keywords: lipid-soluble vitamins; exogenous antioxidants; tissue damage; organic solvents, occupational exposure.

Introduction

Complex exposure to xenobiotics is one of the reasons for the reported increase of respiratory diseases, cancer and immunological disturbances. In relation to cancer, for example, this is of major concern since only 5–10% of all cancer cases can be attributed to genetic defects, whereas the remaining 90–95% is derived from exposure to the environment and lifestyle (1). For this reason, studies on oxidative stress related to occupational exposure to xenobiotics are very important to advance in the prevention.

Free radicals are continuously produced during aerobic metabolism (2, 3, 4) and they are formed by gaining or losing an electron or by homolytic fission of the covalent bond (3).

Under normal physiological conditions, reactive oxygen species (ROS) can play an important role in the organism (5). Moreover, an imbalance between the rate of free radical production and the effect of protective antioxidants leads to oxidative damage, which is also known as oxidative stress (2, 3, 6). The reactive species, such as superoxide anion and hydroxyl ion, are believed to initiate this process (2, 7, 8). They bind and oxidize lipids, proteins and DNA (3, 4, 6). Lipids are the most involved class of biomolecules that are target of oxidative stress.

The oxidative damage caused to lipids is known as lipid peroxidation and this process gives rise to a number of secondary products, such as malondialdehyde (MDA) which is the principal and most studied product of polyunsaturated fatty acid peroxidation (9), it is the most mutagenic one and reacts with DNA forming DNA-adducts such as deoxyguanosine, deoxyadenosine, and deoxycytidine (10).

Oxidative damage caused by free radicals is counteracted by a number of enzymes and vitamins (4, 11). Endogenous antioxidants such as enzymatic and nonenzymatic defense systems are necessary to prevent cellular damage (2). Two of the endogenous enzymatic antioxidant defense systems are superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), which react

with superoxides and hydrogen peroxide, respectively (12). Reduced glutathione (GSH), the main intracellular reducing reservoir, is involved in detoxication of many xenobiotics and protection of cells from free radicals and ROS (13, 14). Lipid-soluble vitamins, such as vitamins E, A and carotenoids are exogenous antioxidants which play an important role in the defense of the organism against damage caused by oxidative stress (15, 16, 17, 18, 19, 20). There are evidences that oxidative stress plays an important role in the toxicodynamics of organic solvents, present in paints, by generation of reactive oxygen species (ROS) (2, 3, 7, 8, 21, 22). In this line, workers occupationally exposed to organic solvents are more susceptible than nonexposed ones to ROS production, leading to oxidative stress and possibly more susceptibility for the development of diseases. However, more studies are necessary in this area.

Nowadays, the production and use of paints represent the main source of occupational exposure to organic solvents (23). Organic solvents include a number of heterogeneous liquid compounds used as thinners or solubilizing media and with particular affinity to lipophilic molecules. The properties of each solvent, strictly related to its chemical structure, determine its applications, the degree of dispersion in the environment and the toxicological profile for the exposed subjects (24). Long-term inhalation of paint solvents, especially toluene, affects many organs in humans and rats, mainly the central nervous system (25). Also, the chronic exposure of solvents results in structural and functional impairment of a variety of organs, and it is implicated in many pathologies (26).

There are studies in the literature relating that occupational exposure to high concentrations of organic solvents induces lipid peroxidation and decreases endogenous antioxidants in the body, such as reduced glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GSH-Px) (8, 27, 28).

Nevertheless, a recent work of our group showed that despite low-level exposure to xenobiotics present in paints and biological exposure indices below the Biological Exposure Limit (BEL), alterations in oxidative stress biomarkers were observed, and toluene, even in low exposure, seems to be the main inducer of lipid peroxidation (22). However, there are few studies in the literature reporting the exogenous antioxidants such as vitamins E (α -tocopherol), A (retinol) and carotenoids (lycopene and β -carotene) in occupationally exposed workers to solvents (29).

In this line, the objective of this study was to investigate possible protective effects of the exogenous and endogenous antioxidants on oxidative damage in painters. For this purpose, we quantified blood toluene levels, since in previous study, this solvent was suggested as the major inducer of lipid peroxidation (22), the biomarker of lipid oxidation (MDA), exogenous antioxidants: lipid-soluble vitamins (vitamin E, A, lycopene and β -carotene) and endogenous antioxidants: enzymes SOD and CAT, and reduced glutathione (GSH) in exposed and nonexposed subjects. Moreover, through levels of exogenous and endogenous antioxidant systems in the human body, we tried to statistically check which of them have the greatest influence on the decrease of lipid peroxidation.

Materials and methods

Subjects

This work was realized with 42 painters from an industry of Rio Grande do Sul, Brazil, aged 28.50 ± 4.70 years and the control group (healthy subjects occupationally nonexposed to xenobiotics) consisting of 28 occupationally nonexposed men, aged 27.90 ± 4.50 years (mean \pm standard deviation). All the subjects completed an investigator-administered questionnaire

to assess general health, lifestyle, years of employment, smoking, alcohol drinking habits, and use of multivitamins and medication.

The study was approved by the committee of ethics and informed consent was required from all participants, according to the guidelines of the local ethics committee (No. 23081.015931/2006-59).

Biological samples

After participants signed the informed consent, venous blood samples were collected with the anticoagulant EDTA for the measurement of MDA, exogenous antioxidants (α -tocopherol, retinol, lycopene and β -carotene) and GSH levels; and with heparin to determine SOD and CAT enzymatic activities. After collection, the EDTA vacuum blood collection tube was immediately centrifuged at 1500 g for 10 min at 4 °C, and the plasma was used to determine MDA and antioxidant vitamins (α -tocopherol, retinol, lycopene and β -carotene), and the erythrocytes (RBC) were used for the quantification of GSH. The plasma for vitamins quantification was kept at -80°C until analysis. The whole blood with heparin (1.0 ml) was stored in eppendorf tubes and kept at -20°C until antioxidant enzymes (SOD and CAT) analysis.

Quantification of blood toluene levels

To a 10-mL headspace vial, 1 mL of blood sample was added together with 4 mL of 25% NaCl (w/v) and 100 μ L of 20 μ g mL⁻¹ nitrobenzene (internal standard, IS). After vortexing (10 s), 0.2 g of NaCl was added, to achieve the salting-out effect. Toluene and IS were extracted by SPME. The samples were extracted using a Carboxen/PDMS fiber obtained from Supelco® (Bellefonte, USA), for 10 min at 50 °C, at a mixing velocity of 250 rpm. The analytes were desorbed at 250 °C for 3 min. Gas-chromatographic separation was performed in a CP 3800

gas chromatograph (Varian, Middelburg, The Netherlands) with a OV-1 column (30 m, 0.32mm, 1 μ m), from Ohio Valley (Marietta, USA). Carrier gas (helium) flow rate was 4 mL min^{-1} . The initial oven temperature was 100 $^{\circ}\text{C}$, maintained for 2 min, and then increased at 15 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ until 180 $^{\circ}\text{C}$, which was maintained for 0.7 min. The total run time was 8 min. Detection was made using an FID, kept at 250 $^{\circ}\text{C}$. The retention times were 2 and 4.6 min for toluene and IS, respectively.

The limit of detection and quantification of the method used were 0.02 and 0.05 mg L^{-1} , respectively.

MDA plasmatic levels

The plasma MDA levels were quantified according to Grotto et al. (30), method developed in our laboratory utilizing HPLC with VIS detection at 532 nm. A volume of 75 μL of plasma was hydrolyzed by 25 μL of NaOH at 60 $^{\circ}\text{C}$ for 30 min in shaking bath water system. The deproteinization step was carried out with 125 μL of H_3PO_4 6% and the derivatization with 125 μL of TBA (Thiobarbituric acid) 0.8%, heated at 90 $^{\circ}\text{C}$ for 45 min. Following, the mixture was cooled and 50 μL of 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) was added. The samples were extracted with 300 μL of *n*-butanol, were carried out by vortex-mixed for 1 min and centrifuged at 3000 $\times g$ for 10 min, and then 20 μL of the *n*-butanol layer was injected into the HPLC using a reverse phase column at 40 $^{\circ}\text{C}$, maintained with thermostated column system. The mobile phase was a mixture of 2.5 mM KH_2PO_4 pH 7.0 and methanol (50:50 v/v). The sample run was 8 min, with a flow rate of 0.6 mL/min, maintained isocratically.

Erythrocytes GSH levels

Levels of GSH were determined by spectrophotometry at 412 nm, as described by Ellman (31). The erythrocytes were hemolyzed by Triton X-100, and after 10 min, precipitated with

20% trichloroacetic acid (w/v). After centrifugation, the supernatant aliquots were reacted with 10 mM of 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB). The content of GSH was expressed in $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ of erythrocyte. The analytical curves were prepared with increasing concentrations of reduced glutathione (10–100 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ of erythrocyte).

Ellman's reagent or DTNB (5,5-dithio-bis 2-nitrobenzoic acid), a symmetric aryl disulfide, reacts with reduced thiol to produce a mixed disulfide (Ellman's derivate) plus an anion, 5-thio-2-nitrobenzoate (TNB), which is quantified by its strong visible absorbance at 412 nm (32), as an indirect measure of reduced thiol.

Antioxidant enzymes

The antioxidant enzyme catalase (CAT) activity was measured as described previously by Aebi (33) with certain adaptations. This assay involves the change in absorbance at 240 nm due to the catalase dependent decomposition of H_2O_2 . SOD activity was measured kinetically as described by McCord and Fridovich (34), based on its ability to inhibit the autoxidation of adrenaline to adrenochrome at an alkaline pH.

Plasma α -tocopherol, retinol, lycopene and β -carotene levels

Quantification of α -tocopherol, retinol, lycopene and β -carotene was performed according to a method developed in our laboratory. 90 μL of plasma was mixed with 450 μL ethanol:*n*-butanol solution (50:50, v/v) containing 5 mg BHT/mL, vortex mixed for 10 seconds, let stand for 5 min on ice and mixed again for 10 seconds, followed by centrifugation at 2700 x g for 3 min; 400 μL of the clear supernatant was transferred to vials. Then, 20 μL of each sample was injected into HPLC system using a reverse phase column, UV/fluorescence detection and vitamins were separated by isocratic elution with a mixture of acetonitrile: dioxane: methanol solution: triethylamine (81.7:15:3:0.3, v/v) as mobile phase. Methanol

solution consisted of ammonium acetate 0.1 M dissolved in methanol. The flow rate was set at 1.6 mL/min. The eluent was monitored by measuring its absorbance at 450 nm, to quantify lycopene and β -carotene, and fluorescence in two different excitation and emission wavelengths, to quantify retinol and α -tocopherol. Retinol was detected using an excitation of 340 nm and emission wavelength of 520 nm. These settings were maintained from injection to 5 min. At 5 min, the excitation was changed to 298 nm and the emission wavelength to 328 nm, to quantify α -tocopherol. These conditions were maintained up to 15 min and returned to the initial excitation and emission wavelengths until the end of the chromatographic run at 25 min.

Statistical analysis

Data were entered and analyzed in the Statistic (Version 6.0) software (SAS Institute) and Jump 5.0.1a (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Descriptive analyses were performed using Mann-Whitney test to compare the means between the groups. Spearman linear correlation was performed between content of the antioxidants (SOD, CAT, GSH, lycopene, β -carotene, α -tocopherol and retinol) and MDA levels. Multivariate analyses were performed to identify the factors that influenced MDA levels. In the regression model to explain MDA levels, with exception of the vitamin E status, all the variables were included as continuous variables.

Data were expressed as mean \pm standard deviation. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

Results

The blood toluene levels found in the exposed group were $0.068 \pm 0.03 \text{ mg L}^{-1}$. The nonexposed group did not present measurable blood toluene levels.

The biomarkers of lipid peroxidation were significantly increased in the exposed workers when compared with the nonexposed group (Figure 1), being the plasma MDA levels 10.08 ± 2.72 vs. 5.77 ± 1.28 μM ($p < 0.001$), respectively. Exogenous antioxidants are presented in table 1, in the exposed subjects decreased levels were found for all vitamins compared with nonexposed, being a significant difference for retinol, lycopene and β -carotene.

Endogenous antioxidants (enzymatic and nonenzymatic) are shown in table 2. The results demonstrated an increase of blood enzymatic antioxidants and a decreased in the erythrocytes GSH levels.

Univariate correlation analysis, through of *Spearman* correlation, showed a significantly negative correlation between plasma MDA levels vs. erythrocytes GSH levels ($r^2 = -0.42$; $p < 0.001$), plasma lycopene levels ($r^2 = -0.26$; $p < 0.05$), plasma β -carotene levels ($r^2 = -0.27$; $p < 0.05$), and plasma retinol levels ($r^2 = -0.24$; $p < 0.05$), respectively, shown in figure 2 (A-D).

In this line, a positive correlation was observed between MDA levels vs. SOD activity ($r^2 = 0.27$; $p < 0.05$), and CAT activity ($r^2 = 0.24$; $p < 0.05$). Multivariate regression models showed that GSH and β -carotene levels were significant covariables to explain the plasma MDA levels (β estimate = -67.84 ; $p < 0.001$, β estimate = -3.50 ; $p < 0.05$, respectively). Additionally, the reduction of lycopene levels presented a tendency to explain the increase of lipid peroxidation (β estimate = -2.73 ; $p = 0.06$). This model of regression included as categorical variable the antioxidant enzymes (SOD and CAT activities), lipid-soluble vitamins (lycopene, vitamin A and β -carotene levels), and the main endogenous antioxidant (GSH levels).

Vitamin E was not included in this model, since this antioxidant was not significantly associated with MDA levels in univariate correlation. The multivariate model presented 42.89 % of the explanation for the decrease of MDA levels observed in our study group.

Discussion

Organic solvents present in paint industry are mainly composed by toluene and also include styrene, xylene and ethylbenzene in various amounts. The biotransformation of many xenobiotics is carried out by oxidation and there are some evidences that organic solvents, present in paints, may express their toxicity by formation of reactive oxygen species (ROS) during their biotransformation (35). High ROS formation is suggested to cause lipid peroxidation resulting in damage to biological membranes and can result in chronic diseases (7, 21). Moreover, various health effects caused by organic solvents have been reported, such as neurologic diseases, toxic hepatitis and cancer (36).

Lipid peroxidation occurs as a result of the reaction of polyunsaturated fatty acids with ROS. Metabolic products derived from lipid peroxidation can react with many components of cells and result in toxic effects on cellular and metabolic functions (21). In this work, despite low blood toluene concentrations, levels of MDA were significantly higher in paint workers than in control group, suggesting that occupationally exposed workers are more susceptible to lipid peroxidation than nonexposed ones.

To prevent lipid peroxidation, the body has an important antioxidant defense system (37, 38; 39). SOD is one of the major enzymes of the endogenous antioxidant defense system which protects against oxidative stress by catalyzing the dismutation of superoxide anion radicals (O_2^-) into hydrogen peroxide (H_2O_2) and oxygen (O_2). CAT is a haemeprotein that can also catalyze the degradation of hydrogen peroxide (H_2O_2) to water (H_2O) and oxygen (O_2), and thus protects live organisms against the deleterious effects of excessive reactive oxygen species (ROS) (40).

In this study, SOD and CAT activities were significantly higher in exposed group when compared to control group. When cells are exposed to oxidative stress they increase activity

and expression of antioxidant enzymes as a compensatory mechanism to be protected from the damage (41) and some evidences indicate that the induction of the antioxidant enzymatic system is considered a valid biomarker of environmental pollution (42, 43). Moreover, the multivariate analyses revealed that these antioxidants enzymes did not present protective effect under lipid peroxidation. Kum et al. (44), in a study with rat exposed to some organic solvents, showed increased MDA levels and no statistical differences in SOD and CAT activities among the control and exposed groups. Also, Ilgazli et al. (8) showed increased MDA levels and no statistical difference was found in SOD activities in lung tissue.

In addition, this present work showed decreased GSH levels in paint workers when compared to the nonexposed group. Depletion of GSH, which is considered the most abundant intracellular nonenzymatic antioxidant in human body (45), could indicate the consumption of this antioxidant in response to oxidative stress (46). In contrast to others endogenous antioxidants, the multivariate regression models demonstrated that GSH status was important to modulate the lipid peroxidation. GSH is recognized as having a detoxifying function and/or protection from ROS (14) and it seems to be involved in the mechanism of defense to reactive species generated from organic solvents present in paints. Halifeoglu et al. (21) reported that in plasma of people working with paint thinner, lipid peroxidation increased and GSH levels decreased significantly. A study in rats after thinner exposure showed increased lipid peroxidation, followed by the decrease of antioxidant GSH (26, 47, 48, 49), suggesting it as a result of oxidative action of solvents (47).

The levels of the exogenous antioxidants, such as α -tocopherol, retinol, lycopene and β -carotene were within the normal range for adults (50) in workers exposed to organic solvents present in paints and control group. However, paint workers presented significantly decreased levels for all vitamins, except vitamin E, when compared to the nonexposed group. Meagher et al. (51) found no evidence of additional effects of supplementing of vitamin E in healthy

individuals on lipid peroxidation *in vivo*. Also, in our findings, only vitamin E was not associated with MDA levels.

In this line, a negative correlation was found between MDA and retinol, lycopene and β -carotene. However, the multivariate regression models show that only β -carotene levels can influence the decrease on lipid peroxidation while lycopene levels present a tendency (p value near 0.05) to explain the decrease of this oxidative imbalance. These results suggest that high intakes of these antioxidant vitamins are accompanied by the reduction of lipid peroxidation. Thus, it can be considered that in the absence of adequate levels of lipid-soluble antioxidant vitamins (46), the increased free radicals production, caused by organic solvents (2, 3, 7, 8, 21, 22), may cause functional and structural damage by reacting with lipoproteins, resulting in lipid peroxidation with formation of degradation products, such as MDA (52).

Carotenoids, such as lycopene and β -carotene, are important biological compounds that can act scavenging free radicals and reactive oxygen species, before they exert their deleterious effects (53). Burton and Ingold (54), suggested that carotenoids scavenge peroxy radicals by addition to the conjugated system of double bonds. Hydrogen abstraction was considered a less likely mechanism (54) and the profile of carotenoid oxidation formed during auto-oxidation suggests that lycopene and β -carotene scavenge peroxy radicals by both hydrogen abstraction and radical addition reactions (55). Moreover, Woodall et. al. (56) also suggested that carotenoids scavenge peroxy radicals by hydrogen abstraction as well as by addition and electron transfer.

Also, some *ex vivo* antioxidant studies in which carotenoids have been added to either plasma or isolated LDL fractions demonstrated that β -carotene addition has a protective effect (57, 58, 59, 60).

In conclusion, the results presented in this study demonstrated that alterations in lipid peroxidation were observed in a solvent-exposed workers group. In both groups exogenous

antioxidants levels were within the normal ranges. However, for the first time, was demonstrated that levels higher of carotenoids especially β -carotene could be protect of lipid damage subjects occupationally exposed to organic solvents present in paints. Thus, the evaluation of these antioxidants in painters may be an important tool for the assessment of the imbalance between oxidants and antioxidants in the organism, especially in the lipid membranes domain and it could be suggested that high intakes of exogenous antioxidants, such as carotenoids, may protect the organism from lipid damage. However, further studies are necessary to elucidate its action mechanisms and the possible protective effect that antioxidants may have on lipid damage in occupationally exposed subjects to xenobiotics.

Acknowledgements

The authors would like to thank CAPES/DAAD (PROBRAL 352/10) and Universal Edital (both grant to S.C.Garcia) and CNPq/MCT (N^o 479613/2009-5, grant to P.H. Saldiva) for the finance support. M.F. Charão is the recipient of CAPES/REUNI Masters Degree fellowship. S.C. Garcia is the recipient of CNPq research fellowship.

References

1. Katic, J, Cemeli E, Baumgartner A, et al. Evaluation of the genotoxicity of 10 selected dietary/environmental compounds with the *in vitro* micronucleus cytokinesis-block assay in an interlaboratory comparison. *Food Chem Toxicol* 2010; 48:2612-2623
2. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; 41:1819-1828.
3. Sawicka E, Długosz A. Toluene and P-xylene mixture exerts antagonistic effect on lipid peroxidation *in vitro*. *Int J Occup Med Environ Health* 2008; 21:201-209.
4. Karabulut I, Balkanci ZD, Pehlivanoglu B, Erdem A, Fadillioglu E. Effect of toluene on erythrocyte membrane stability under *in vivo* and *in vitro* conditions with assessment of oxidant/antioxidant status. *Toxicol Ind Health* 2009; 25:545-550.
5. Biesalski HK. Free radical theory of aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002; 5:5-10.
6. Lykkesfeldt J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clin Chim Acta* 2007; 380:50-58.
7. Ulakoğlu EZ, Saygi A, Gümüştaş MK, Zor E, Oztek I, Kökoğlu E. Alterations in superoxide dismutase activities, lipid peroxidation and glutathione levels in thinner inhaled rat lungs: relationship between histopathological properties. *Pharmacol Res* 1998; 38:209-214.
8. Ilgazli A, Sengul C, Maral H, Ozden M, Ercin C. The effects of thinner inhalation on superoxide dismutase activities, malondialdehyde and glutathione levels in rat lungs. *Clin Chim Acta* 2004; 343:141-144.
9. Del Rio D, Stewart AJ, Pellgrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2005; 15:316-328.
10. Marnett LJ. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicol* 2002; 181:219-222.
11. Bayil S, Cicek H, Cimenci IG, Hazar M. How volatile organic compounds affect free radical and antioxidant enzyme activity in textile workers. *Arh Hig Rada Toksikol* 2008; 59:283-287.
12. Rahman I, MacNee W. Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease. *Am J Physiol* 1999; 277:1067-1088.
13. Koegh JP, Steffen B, Siegers CP. Cytotoxicity of heavy metals in human small intestinal epithelial cell line I-407: role of glutathione. *J Toxicol Environ Health* 1994; 43:351-359.
14. Ashfaq S, Abramson JL, Jones DP, Rhodes SD, Weintraub WS, Hooper WC, et al. The relationship between plasma levels of oxidized and reduced thiols and early atherosclerosis in healthy adults. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47:1005-1011.

15. Di Mascio P, Kaiser S, Sies H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch Biochem Biophys* 1989; 274:532-538.
16. Pallace VP. Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Rad Biol Med* 1999; 26:746-761.
17. Young A, Lowe GM. Antioxidant and Prooxidant Properties of Carotenoids. *Arch Biochem Biophys* 2001; 385:20-27.
18. Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomed Pharmacoth* 2004; 58:100-110.
19. Tamimi RM, Hankinson SE, Campos H, Spiegelman D, Zhang S, Colditz GA, et al. Plasma carotenoids, retinol, and tocopherols and risk of breast cancer. *Am J Epidemiol* 2005; 161:153-160.
20. Sluijs I, Beulens JW, Grobbee DE, van der Schouw YT. Dietary carotenoid intake is associated with lower prevalence of metabolic syndrome in middle-aged and elderly men. *J Nutr* 2009; 139:987-992.
21. Halifeoglu I, Canatan H, Ustundag B, Ilhan N, Inanc F. Effect of thinner inhalation on lipid peroxidation and some antioxidant enzymes of people working with paint thinner. *Cell Biochem Funct* 2000; 18:263-267.
22. Moro AM, Charão M, Brucker N, Bulcão R, Freitas F, Guerreiro G, et al. Effects of low-level exposure to xenobiotics present in paints on oxidative stress in workers. *Sci Total Environ* 2010; 408:4461-4467.
23. Martínez-Alafaro M, Palma-Tirado L, Sandoval-Zapata F, Cárabez-Trejo A et al. Correlation between formamidopyrimidine DNA glycosylase (Fpg)-sensitive sites determined by a comet assay, increased MDA, and decreased glutathione during long exposure to thinner inhalation. *Toxicol Lett* 2006; 163: 198-205.
24. Campagna D, Stengel B, Mergler D, Limasset JC, Diebold F, Michard D, et al. Color vision and occupational toluene exposure. *Neurotoxicol Teratol* 2001; 23:473-480.
25. Yamada K. Influence of lacquer thinner and some organic solvents on reproductive and accessory reproductive organs in the male rat. *Biol Pharm Bull* 1993; 16: 425-427.
26. Baydas G, Ozveren F, Akdemir I, Tuzcu M, Yasar A. Learning and memory deficits in rats induced by chronic thinner exposure are reversed by melatonin. *J Pineal Res* 2005; 39: 50-56.
27. Coskun O, Oter S, Korkmaz A, Armutcu F, Kanter M. The Oxidative and morphological Effects of High Concentration Chronic Toluene Exposure on Rat Sciatic Nerves *Neurochem Res* 2005; 30:33-38.

28. Georgieva T, Michailova A, Panev T, Popov T. Possibilities to control the health risk of petrochemical workers. *Int Arch Occup Environ Health* 2007; 75:21-26.
29. van Loon AJ, Kant IJ, Swaen GM, Goldbohm RA, Kremer AM, van den Brandt PA. Occupational exposure to carcinogens and risk of lung cancer: results from The Netherlands cohort study. *Occup Environ Méd* 1997; 54:817-824.
30. Grotto D, Santa Maria LD, Boeira S, Valentini J, Charão MF, Moro AM, et al. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. *J Pharm Biom Anal* 2007; 43:619-624.
31. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959; 82:70-77.
32. Gergel D, Cederbaum A. Interaction of nitric oxide with 2-thio-5 nitrobenzoic acid: implications for the determination of free sulfhydryl groups by Ellman's reagent. *Arch Biochem Biophys* 1997; 347:282-288.
33. Aebi H. Catalase in vitro. *Meth Enzymol* 1984; 105:121-126.
34. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969; 244:6049-6055.
35. Gaté L, Paul J, Ba GN, Tew KD, Tapiero H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed Pharmacother* 1999; 53:169-180.
36. Kang SK, Kum EA. Occupational diseases in Korea. *J Korean Med Sci* 2010; 25:S4-S10.
37. Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 899:136-147.
38. Olmedilla B, Granado F, Southon S, Wright AJA, Blanco I, Gil-Martinez E et al. Serum concentrations of carotenoids and vitamins A, E, and C in control subjects from five European countries. *Br J Nutr* 2001; 85:227-238.
39. Mayne ST. Antioxidant Nutrients and Chronic Disease: Use of Biomarkers of Exposure and Oxidative Stress Status in Epidemiologic Research. *J Nutr* 2003; 133:933S-940S.
40. Scandalios, J.G., 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38, 995-1014.
41. Vardi N, Parlakpınar H, Oztürk F, Ates B, Gul M, Cetin A, et al. Potent protective effect of apricot and b-carotene on methotrexate-induced intestinal oxidative damage in rats. *Food Chem Toxicol* 2008; 46: 3015-3022.
42. Song Y, Zhu LS, Wang J, Wang JH, Liu W, Xie H. DNA damage and effects on antioxidative enzymes in earthworm (*Eisenia foetida*) induced by atrazine. *Soil Biol Biochem* 2009; 41:905-909.

43. Xue YG, Gu XY, Wang XR, et al. The hydroxyl radical generation and oxidative stress for the earthworm *Eisenia fetida* exposed to tetrabromobisphenol A. *Ecotoxicol* 2009; 18:693–699.
44. Kum C, Sekkin S, Kiral F, Akar F. Effects of xylene and formaldehyde inhalations on renal oxidative stress and some serum biochemical parameters in rats. *Toxicol Ind Health* 2007; 23:115-120.
45. Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog Lipid Res* 2004; 43:200–227.
46. Costa C, Pasquale R, Silvari V, Barbaro M, Catania S. In vitro evaluation of oxidative damage from organic solvent vapours on human skin. *Toxicol In Vitro* 2006; 20:324–331.
47. Ulakoğlu EZ, Saygi A, Gümüştaş MK, Zor E, Oztek I, Kökoğlu E. Alterations in superoxide dismutase activities, lipid peroxidation and glutathione levels in thinner inhaled rat lungs: relationship between histopathological properties. *Pharmacol Res* 1998; 38:209-214.
48. Zengin E, Saygi A, Koray M, Zor E, Oztek I, Kokoglu E. Alterations in superoxide dismutase activities, lipid peroxidation and glutathione levels in thinner inhaled rat lungs: relationship between histopathological properties. *Pharmacol Res* 1998; 38:209–214.
49. Martínez-Alfaro M, Cárabez-Trejo A, Gallegos-Corona MA, Pedraza-Aboytes G, Hernández-Chan NG, Leo-Amador GE. Thinner inhalation effects on oxidative stress and DNA repair in a rat model of abuse. *J Appl Toxicol* 2010; 30:226-232.
50. Burtis C, Ashwood E, Eward R. *Fundamentos de Química Clínica*. 4th ed. Rio Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.
51. Meagher EA, Barry OP, Lawson JA, Rokach J, FitzGerald GA. Effects of Vitamin E on Lipid Peroxidation in Healthy Persons. *JAMA* 2001; 285:1178-1182.
52. Leung EYL, Crozier JEM, Talwar D, O'Reilly DJ, McKee RF, Horgan PG, et al. Vitamin antioxidants, lipid peroxidation, tumour stage, the systemic inflammatory response and survival in patients with colorectal cancer. *Int J Cancer* 2008; 123:2460–2464.
53. El-Agamey A, Lowe GM, McGarvey DJ, Mortensen A, Phillip DM, Truscott TG, et al. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Arch Biochem Biophys* 2004; 430:37-48.
54. Burton GW, Ingold KU. β -carotene: an unusual type of lipid peroxidation. *Science* 1984; 224:569-573.
55. Liebler DC, McClure TD. Antioxidant Reactions of β -Carotene: Identification of Carotenoid-Radical Adducts. *Chem Res Toxicol* 1996; 9:8-11.
56. Woodall AA, Lee SWM, Weesie RJ, Jackson MJ, Britton G. Oxidation of carotenoids by free radicals: relationship between structure and reactivity. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1336:33-42.

57. Carpenter KL, van der Veen C, Hird R, Dennis IF, Ding T, Mitchinson MJ. The carotenoids beta-carotene, canthaxanthin and zeaxanthin inhibit macrophage-mediated LDL oxidation. *FEBS Lett* 1997; 401:262–266.
58. Romanchik JE, Harrison EH, Morel DW. Addition of lutein, lycopene, or b-carotene to LDL or serum in vitro: effects on carotenoid distribution, LDL composition, and LDL oxidation. *J Nutr Biochem* 1997; 8:681–688.
59. Dugas TR, Morel DW, Harrison EH. Dietary supplementation with b-carotene, but not with lycopene, inhibits endothelial cell-mediated oxidation of low-density lipoprotein. *Free Radic Biol Med* 1999; 26:1238–1244.
60. Panasencko OM, Sharov VS, Briviba K, Sies H. Interaction of peroxynitrite with carotenoids in human low density lipoproteins. *Arch Biochem Biophys* 2000; 373:302–305.

Tables

Table 1. Exogenous antioxidants levels found in plasma of the studied groups. The unit is $\mu\text{mol.L}^{-1}$ for all vitamins analyzed by HPLC (visible and fluorescent detectors).

Exogenous antioxidants	Exposed group (n = 42)	Nonexposed group (n = 28)
Retinol	1.95 ± 0.34^a	2.33 ± 0.31
Vitamin E	23.08 ± 5.69	25.17 ± 6.20
Lycopene	0.54 ± 0.20^a	0.68 ± 0.19
β -carotene	0.32 ± 0.25^a	0.48 ± 0.24

Data represent mean \pm SD and were analyzed by one-way ANOVA with the Duncan post hoc test ($p < 0.05$);

^a Statistically different when compared to controls.

Table 2. Endogenous antioxidants – enzymatics (activities) and nonenzymatic (GSH levels) – in exposed group compared with nonexposed group (control).

Endogenous antioxidants	Exposed group (n = 42)	Nonexposed group (n = 28)
GSH ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$)	$39.10 \pm 0.02^{\text{a}}$	44.26 ± 0.01
SOD ($\text{U.g}^{-1} \text{Hb}$)	$1.30 \pm 0.31^{\text{a}}$	1.01 ± 0.26
CAT ($\text{K.g}^{-1} \text{Hb}$)	$60.85 \pm 15.01^{\text{a}}$	52.68 ± 15.23

Data represent mean \pm SD and were analyzed by one-way ANOVA with the Duncan post hoc test ($p < 0.05$);

^a Statistically different when compared to controls.

Figure 1 – Plasma MDA levels (μM) from nonexposed group (n=28) and exposed group (n=42). Data are expressed as mean \pm SD, being * $p < 0.001$

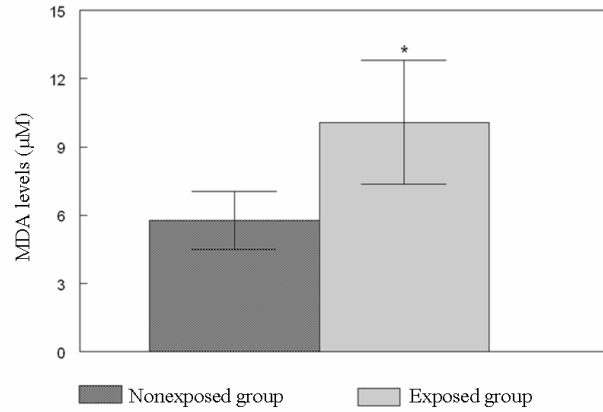
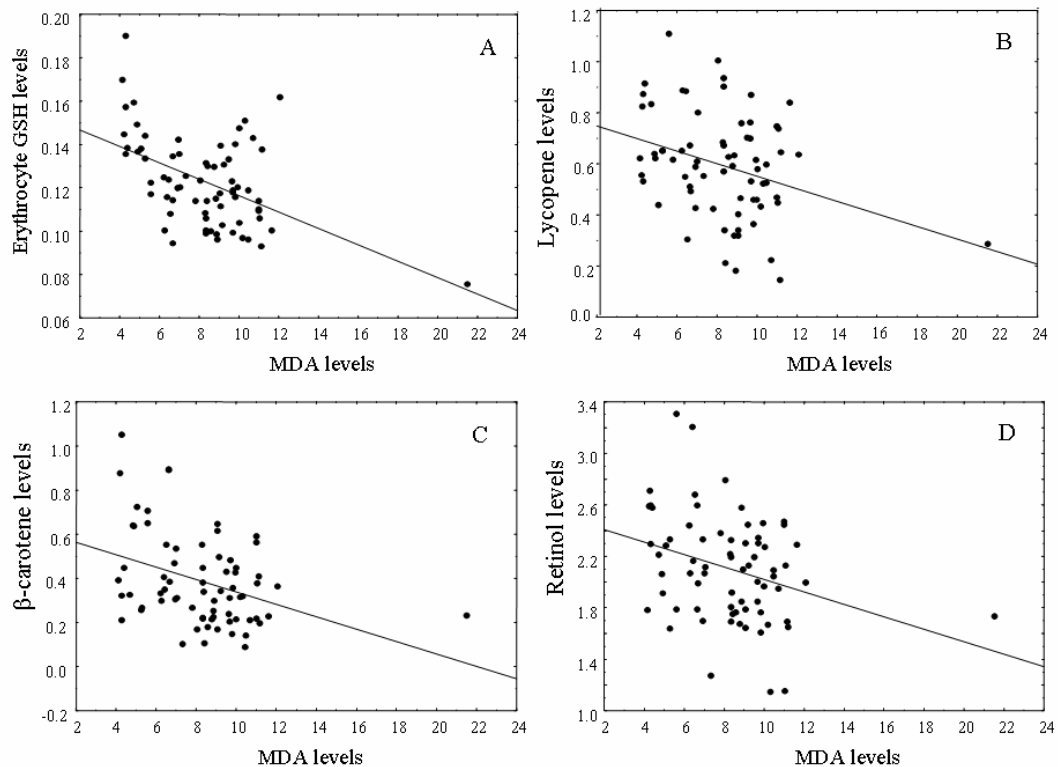


Figure 2 – *Spearman* correlation. A: correlation between plasma MDA levels vs. erythrocytes GSH levels ($r^2 = -0.42$; $p < 0.001$); B: MDA levels vs. plasma lycopene levels ($r^2 = -0.26$; $p < 0.05$); C: MDA levels vs. plasma β -carotene levels ($r^2 = -0.27$; $p < 0.05$); D: MDA levels vs. plasma retinol levels ($r^2 = -0.24$; $p < 0.05$)



4 DISCUSSÃO

Em condições fisiológicas normais, as EROs podem desempenhar importantes funções no organismo como, papel regulador da resposta imune, participando da fagocitose, processo de defesa contra infecções, induzindo a apoptose (BIESALSKI, 2002). Porém, o aumento da produção dessas EROs e/ou redução de antioxidantes do organismo cria um desequilíbrio, causando danos em muitos componentes celulares, como lipídios, proteínas e DNA (FINKEL & HOLBROOK, 2000; GUTTERIDGE & HALLIWELL, 2000).

Diante disso, o organismo dispõe de um elaborado sistema de defesa antioxidante e dentro desse sistema, podem-se citar os antioxidantes não enzimáticos, como as vitaminas lipossolúveis. Muitas atividades biológicas têm sido descritas para esses compostos (OLMEDILLA et al., 2001) e o efeito protetivo dessas substâncias pode ser devido, principalmente, pela suas propriedades antioxidantes (TALWAR et al., 1998).

Dentre elas, retinol, α -tocoferol, licopeno e β -caroteno são os principais componentes do sistema de defesa antioxidante exógeno que agem protegendo contra a peroxidação (SHI et al., 2004; STAHL & SIES, 2005; YUAN et al., 2006). Ainda, muitos estudos epidemiológicos mostraram que níveis de vitamina A, E e carotenóides estão associados com redução do risco no desenvolvimento de muitas doenças crônicas (OLMEDILLA et al., 2001; TAMIMI et al., 2004; SLUIJS et al., 2009). Com isso, é necessário o desenvolvimento e a quantificação dessas vitaminas, através de uma metodologia simples e específica.

Quando um método é validado, ele assegura a credibilidade das análises realizadas durante a rotina laboratorial, sendo algumas vezes mencionado como “o processo que fornece uma evidência documentada de que a metodologia realiza aquilo para o qual é indicada a fazer” (ICH, 2004). Portanto, o método otimizado apresentou-se apropriado para a quantificação das vitaminas lipossolúveis em questão, respeitando todos os parâmetros de desempenho analítico: linearidade, precisão, exatidão, recuperação e sensibilidade (CAUSON, 1997; BAKSHI & SINGH, 2002; BRASIL, 2003).

No manuscrito I, os resultados apresentados demonstraram que um método eficiente para quantificação das vitaminas retinol, α -tocoferol, licopeno e β -caroteno

por CLAE com detecção VIS/fluorescência foi otimizado e validado. Os resultados encontrados estão de acordo com os parâmetros validação estabelecidos pelas normas da ICH e ANVISA.

Os resultados dos parâmetros de validação metodológica observados no manuscrito I foram satisfatórios. Curvas analíticas mostraram excelente linearidade e paralelismo com coeficientes de regressão (r^2) superiores a 0,99. No estudo da especificidade foi observada uma boa separação cromatográfica e a precisão intra- e inter- dia encontrada apresentou CV < 5%, dentro do limite aceito para validação de métodos cromatográficos que deve ser menor que 15%. A inexatidão foi calculada pela tendenciosidade (% *bias*) resultando em %*bias* < ±6%, apresentando valores satisfatórios, ou seja, inferiores a ±15% (CAUSON, 1997; BRASIL, 2003).

A sensibilidade para cada parâmetro foi satisfatório para a quantificação de retinol, α -tocoferol, licopeno e β -caroteno sendo os valores de LD e LQ para retinol de 0,024 e 0,073 $\mu\text{mol/L}$, α -tocoferol de 0,276 e 0,838 $\mu\text{mol/L}$, licopeno 0,003 e 0,009 $\mu\text{mol/L}$ e β -caroteno 0,005 e 0,015 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente. A recuperação obtida a partir da fortificação das amostras apresentou valores acima de 92%. Estes parâmetros mostraram-se satisfatórios tratando-se de validação cromatográfica para a análise de amostras biológicas (CAUSON, 1997; QUEIROZ et al., 2001; BRIL, 2003; BRANCH, 2005).

Além disso, foi avaliada a estabilidade do plasma, antes e após a extração, armazenados a -20°C. Os resultados mostraram que tanto as amostras de plasma sem extração, como o material extraído, podem ser estocados a -20°C por dois meses, sem comprometer a análise. Porém, após três meses de armazenamento, houve uma perda significativa para todas as vitaminas, exceto para o retinol. Com isso, sugere-se que as amostras de plasma e material extraído podem ser armazenadas, com segurança, por pelo menos dois meses.

Muitos métodos usando CLAE para quantificação de vitaminas lipossolúveis são relatados na literatura, sendo que a maioria deles descrevem procedimentos de extração que requerem precipitação de proteínas, extração líquido-líquido, secagem sob fluxo de nitrogênio e reconstituição da amostra (MacCrehan & Schonberger, 1987; Finckh et al., 1995; Steghens et al., 1997; Abahusain et al., 1998; Talwar et al., 1998; Su et al., 1999; Thomas et al., 2001; Wang & Wang, 2001; Tzouganaki et al., 2002; Lee et al., 2003; Ortega et al., 2004; Rupérez et al., 2004; Vertzoni et al., 2005; Boonsiri et al., 2007; Siluk et al., 2007; Thiebeault et al., 2009). Na maioria das

vezes esses procedimentos acabam se tornando muito trabalhosos e demorados, o que pode levar a perda dos compostos por ocorrer oxidação e degradação dos mesmos (Taibi & Nicotra, 2002), além de dificultar dessa maneira seu uso na rotina laboratorial.

Abahusain et al (1998) relatou uma extração líquido-líquido direta e posterior injeção em CLAE para a quantificação de retinol, α -tocoferol, α - e β -caroteno, mas não de licopeno, que é considerado também um importante antioxidante, protegendo dessa maneira o organismo frente ao estresse oxidativo. Porém o tempo de extração dessa metodologia é muito longo, levando em torno de 30 minutos. Além disso, Taibi e Nicotra (2002) e Rupérez et al (2004) descreveram um método simples e rápido de extração, porém somente para a quantificação de apenas retinol e α -tocoferol, e retinol, α -tocoferol e γ -tocoferol, respectivamente. Recentemente, Thibeault et al (2009) relatou um método rápido para a quantificação de retinol, tocoferóis e carotenóides (totalizando 9 compostos) com um tempo de corrida de 15 minutos, porém o processo de extração é bastante prolongado e com muitas etapas (aproximadamente 40 minutos), tornando o tempo de análise bastante demorado (aproximadamente 55 minutos para cada análise).

Uma das principais vantagens do método validado no presente trabalho é o procedimento de extração simples e rápido (aproximadamente 8 minutos) para a simultânea quantificação de retinol, α -tocoferol, licopeno e β -caroteno em CLAE. O procedimento é realizado com apenas uma etapa de extração líquido-líquido, centrifugação e injeção do sobrenadante no cromatógrafo, tendo um tempo total de análise de aproximadamente 33 minutos. Com isso, o método é de simples execução e torna-se rápido, uma vez que para o processamento de cada amostra é preciso no máximo 10 minutos, diferentemente da maioria dos métodos que requer muitas etapas de processamento, o que acaba demandando um tempo bem maior. Assim, isto permite a análise de um número maior de amostras em poucos dias, o que é bastante importante em estudos clínicos e epidemiológicos.

A aplicação do método foi realizada em um estudo com trabalhadores expostos a tintas e não expostos. Os resultados indicaram níveis de retinol, licopeno e β -caroteno plasmáticos significativamente menores em indivíduos expostos em relação ao grupo controle (não expostos), porém todas as vitaminas estavam dentro dos valores de referência.

Os trabalhadores expostos a tintas compõem o principal grupo de risco decorrente da exposição ocupacional. Tendo em vista a vasta quantidade de produtos químicos presentes na composição das tintas, pode-se concluir que os pintores encontram-se concomitantemente expostos a diferentes tipos de xenobióticos, como solventes orgânicos (KLAASSEN et al., 2001), podendo haver o desenvolvimento de doenças ocupacionais, que podem ser definidas como doenças que surgem ou se agravam no decorrer dos anos de trabalho do indivíduo exposto (KANG & KING, 2010).

Atualmente, tem-se relatado que os solventes orgânicos são responsáveis pela geração de uma maior taxa de radicais livres (RLs) no organismo, levando assim a um desequilíbrio entre sistema antioxidante e os oxidantes, gerando o estresse oxidativo (KLAASSEN et al., 2001; OGA, 2008). Tal desequilíbrio pode estar envolvido na etiologia de doenças crônicas, incluindo o câncer, doenças cardiovasculares, entre outras (DI MASCIO et al., 1991; MAYNE, 2003).

Nesta linha, no Manuscrito II, foram avaliados os níveis de alguns importantes biomarcadores do estresse oxidativo em trabalhadores expostos a solventes orgânicos presentes em tintas, de uma indústria do Rio Grande do Sul e comparados com indivíduos não expostos (grupo controle). Além disso, foram verificados estatisticamente os possíveis efeitos de sistemas antioxidantes, como as enzimas SOD e CAT, o principal antioxidante não enzimático do organismo, GSH, e vitaminas lipossolúveis antioxidantes, como retinol, α -tocoferol, licopeno e β -caroteno sobre a peroxidação lipídica.

Os trabalhadores expostos, apesar de terem níveis de tolueno sanguíneo abaixo do limite biológico de exposição que é de 1 mg/L (ACGIH, 1996), apresentaram níveis significativamente mais elevados de MDA quando comparados com o grupo controle, sugerindo que os trabalhadores expostos ocupacionalmente são mais susceptíveis à peroxidação lipídica do que os não expostos. (LASHERAS et al., 2002). O MDA indica a extensão de dano da membrana celular e ocorre como resultado da reação de ácidos graxos poliinsaturados com as EROs (ESTERBAUER et al., 1991, HALIFEOGLU et al., 2000).

Frente a ação lesiva das EROs sobre os lipídios, o organismo dispõe de um sistema de defesa antioxidante. Dentre o sistema antioxidante enzimático destacam-se as enzimas SOD e CAT. A SOD exerce efeito protetor por detoxificar o ânion superóxido, em um processo de dismutação, produzindo peróxido de hidrogênio,

que pode ser reduzido por ação da enzima CAT, formando água e liberando oxigênio (AMES et al., 1993; NORDBERG & ARNÉR, 2001). As atividades da SOD e CAT foram significativamente maiores nos expostos que nos controles. Isso pode ser devido a um mecanismo compensatório desenvolvido pelo organismo para se proteger dos danos oxidativos gerados pelo aumento de espécies reativas formadas frente à exposição aos xenobióticos do ambiente de trabalho (VARDI et al., 2008).

Porém, a análise multivariada mostrou que essas enzimas não apresentam efeito protetivo sobre a peroxidação lipídica. Kum et al., 2007 também relataram, em trabalho com ratos expostos a solventes orgânicos, aumento nos níveis de MDA, que não foi acompanhado de aumento ou diminuição dos níveis de SOD e CAT, não apresentando diferenças significativas entre o grupo controle e exposto, levando a crer que essas enzimas não estão correlacionadas com os níveis de MDA.

A depleção dos níveis de GSH, principal antioxidante endógeno do organismo (DOTAN et al, 2004) poderia ser um indicativo de consumo das defesas antioxidantes do organismo, na tentativa de conter os efeitos tóxicos provocados pelos altos níveis de peroxidação lipídica encontrados (DILLIOGLUGIL et al., 2005). Ao contrário dos outros antioxidantes endógenos, a análise multivariada demonstrou que os níveis de GSH são importantes para proteger o organismo da peroxidação lipídica. A GSH está envolvida na desintoxicação de muitos xenobióticos (POMPELLA et al., 2003) e também atua protegendo o organismo das EROs derivadas da exposição aos vapores de solventes (COSTA et al., 2005; ASHFAQ et al., 2006). Halifeoglu et al (2001), relataram que em trabalhadores expostos a tintas houve um aumento significativo na peroxidação lipídica com níveis significativamente menores de GSH.

Sobre os antioxidantes não-enzimáticos exógenos, tais como α -tocoferol, retinol, licopeno e β -caroteno, os níveis ficaram dentro dos valores de referência para adultos (BURTIS et al.; 1998) em ambos os grupos. Porém, os trabalhadores expostos apresentaram níveis significativamente menores para todas as vitaminas, exceto para α -tocoferol. Em estudo realizado com suplementação de vitamina E foi relatado que não houve evidências de efeitos sobre a peroxidação lipídica em indivíduos saudáveis (MEAGHER et al., 2001). Da mesma maneira, no presente estudo, somente a vitamina E não mostrou associação com os níveis de MDA.

Além disso, correlações negativas entre os níveis de MDA com retinol, licopeno e β -caroteno foram encontradas. Entretanto, após a análise multivariada, apenas os níveis de β -caroteno mostraram influência na diminuição da peroxidação lipídica, enquanto os níveis de licopeno apresentaram uma tendência para explicar a diminuição da peroxidação lipídica avaliada pelo MDA. Com isso, a ingestão dessas vitaminas poderia reduzir a peroxidação lipídica e pode-se considerar que na ausência de níveis adequados de vitaminas lipossolúveis antioxidantes, o organismo pode ficar mais vulnerável ao aumento de EROs, causado pelos solventes orgânicos (GUTTERIDGE, 1995; ULAKOGLU et al., 1998; HALIFEOGLU et al., 2000; ILGAZLI et al., 2004; SAWICKA & DLUGOSZ, 2008; MORO et al., 2010).

A ação antioxidante dos carotenóides, como o licopeno e β -caroteno, é devido as suas estruturas químicas, que podem agir seqüestrando radicais livres e EROs antes que eles exerçam seus efeitos deletérios (EL-AGAMEY et al., 2004). Estudos *ex vivo* verificaram que a adição de β -caroteno em plasma ou frações isoladas de LDL possuíram efeito protetor, inibindo a peroxidação (CARPENTER et al., 1997; ROMANCHIK et al., 1997; DUGAS et al., 1998; PANASENKO et al., 2000).

Os resultados encontrados nesse trabalho mostraram que o grupo de pintores está mais susceptível a peroxidação lipídica, uma vez que foram observados níveis mais elevados de MDA nesse grupo quando comparado ao grupo não exposto. Além disso, os antioxidantes que tiveram maior influência na diminuição da peroxidação lipídica foram a GSH e carotenóides (principalmente o β -caroteno). Com isso, a avaliação dos antioxidantes em pintores pode ser uma ferramenta importante para avaliação do desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes do organismo, especialmente no domínio das membranas lipídicas. Além disso, pode-se sugerir que o aumento na ingestão de alimentos ricos em carotenóides poderia, a longo prazo, exercer efeito protetivo no organismo, porém mais estudos neste sentido são necessários.

5 CONCLUSÕES

- Uma metodologia foi otimizada e validada com sucesso para quantificação simultânea de retinol, α -tocoferol, licopeno e β -caroteno, com um simples e rápido método de extração por CLAE com detector VIS e fluorescência. Os parâmetros avaliados, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão, recuperação e robustez estão de acordo com os parâmetros de validação estabelecidos pelas normas da ICH e ANVISA;

- O método foi aplicado em um grupo de trabalhadores expostos a solventes orgânicos (presente nas tintas) e grupo controle (indivíduos não expostos) e os resultados obtidos demonstraram que houve uma diferença significativa entre os níveis de todas as vitaminas dosadas, exceto para a vitamina E, entre os grupos analisados;

- O estudo de estabilidade demonstrou que as amostras de plasma e material extraído podem ser armazenadas com segurança por até dois meses a -20°C ;

- Os trabalhadores expostos apresentaram níveis de tolueno relativamente baixos. Porém, ainda assim, foram observados níveis de MDA plasmáticos significativamente mais elevados no grupo exposto em relação ao grupo controle;

- O grupo exposto apresentou atividades de SOD e CAT significativamente elevadas quando comparados com o grupo não exposto. Podendo ser sugerido como um mecanismo compensatório desenvolvido pelo organismo, frente à excessiva produção de EROs.

- Os níveis de GSH e vitaminas lipossolúveis, com exceção da vitamina E, foram significativamente menores nos trabalhadores expostos. Podendo ser indicativo do consumo desses antioxidantes na tentativa de proteger o organismo dos efeitos causados pelo estresse oxidativo.

- Os antioxidantes que demonstraram maior influência sobre a peroxidação lipídica nesse grupo de estudo foram a GSH e os carotenóides (principalmente o β -caroteno). Nesta linha, pode-se sugerir que uma maior ingestão de alimentos ricos em carotenóides poderia ter um maior efeito protetivo no organismo, visto que

quanto maiores os níveis dessas vitaminas no organismo menor o dano lipídico (avaliado através dos níveis plasmáticos de malondialdeído) em indivíduos ocupacionalmente expostos a solventes e tintas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS (ACGIH). Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices. Cincinnati: ACGIH, 1996

AMES, B.N.; SHIGENAGA, M.K.; HAGEN, T.M. Oxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, v. 90, p. 7915–7922, 1993.

ASHFAQ, S. et al. The Relationship Between Plasma Levels of Oxidized and Reduced Thiols and Early Atherosclerosis in Healthy Adults. **Journal of the American College of Cardiology**, v.47, p. 1005-1011, 2006.

AZEVEDO A. P. M. **Efeito de produtos químicos e ruído na gênese da perda auditiva ocupacional**. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 2004.

AYLOTT, S.; PRASHER, D. Solvents impair balance in man. **Noise & Health**, v. 4, p. 63-71, 2002.

AMBRÓSIO, C. L. B.; CAMPOS, F. A. C. S.; FARO, Z. P. Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 2, p. 233-243, 2006.

BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods-critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, p. 1011-1040, 2002.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-126, 2006.

BATISTA, E. S.; COSTA, A. G. V.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. Adição da vitamina E aos alimentos: implicações para os alimentos e para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, v. 20, n. 5, p. 525-535, 2007.

BAYIL, S. et al. Free radical and antioxidant enzyme levels at exposure of volatile organic compounds in workers. **Saudi Medical Journal**, v. 28, p. 290-291, 2007.

BEAL, M. F. Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Annals of Neurology**, v. 38, p. 357-366, 1995.

BELLÓ, A. **Dano oxidativo e Regulação Biológica pelos Radicais Livres**. Porto Alegre: Editora Ulbra, p. 15-19, 2002.

BENDICH, A. Carotenoids and the immune response. **Journal of Nutrition**, v. 119, p. 112-115, 1989.

BENDICH, A.; OLSON, J. A. Biological actions of carotenoids. **The FASEB Journal**, v.3, n.8, p.1927-1932, 1989.

BERTONCELLO L. **Efeitos da exposição ocupacional a solventes orgânicos, no sistema auditivo**. Monografia de Conclusão do curso de especialização em Audiologia Clínica, Porto Alegre, 1999.

BERR, C. et al. Systemic oxidative stress and cognitive performance in the population-based EVA study. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 24, p. 1202-1208, 1998.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, p. 123-130, 1999.

BIESALSKI, H. K. Free radical theory of aging. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 5, n. 1, p. 5-10, 2002.

BJØRNEBOE, A.; BJØRNEBOE, G.E.A.; DREVON A.A. Absorption, Transport and Distribution of Vitamin E. **The Journal of Nutrition**, p. 233-242, 1990.

BONITHON-KOPP, C. et al. Combined effects of lipid peroxidation and antioxidant status on Carotid atherosclerosis in a population aged 59-71 y: The EVA Study. Etude sur le Vieillissement Arteriel. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 65, p. 121-127, 1997.

BOOTH, S. L.; JOHNS, T.; KUHNLEIN, H. V. Natural food sources of vitamin A and provitamin A. **Food and Nutrition Bulletin**, v. 14, p. 6-19, 1992.

BOWEN, P. E.; MOBARHAN, S.; SMITH, J. C. Carotenoid absorption in humans. **Methods in Enzymology**, v. 214, p. 3-17, 1993.

BRANCH, S.K. Review: Guidelines from the International Conference on Harmonisation (ICH). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38 p. 798–805, 2005.

BRASIL – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Brasil. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 02 de junho de 2003. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>.

BRAUTBAR, N.; WILLIAMS, J. Industrial solvents and liver toxicity: Risk assessment, risk factors and mechanisms. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 205, p. 479-491, 2002.

BRASIL. Ministério do Trabalho e Emprego. NR-7. In: Segurança e Medicina do Trabalho. 50 ed. 1994.

BURTIS, C.; ASHHWOOD, E.; EWARD, R. **Fundamentos de química clínica**. 4th. Rio de Janeiro, 1998.

BUSCHINELLI, J. T. P. Agentes químicos e intoxicações ocupacionais. In: **Saúde no trabalho: temas básicos para o profissional que cuida da saúde dos trabalhadores** (Ferreira Jr., M., org.), São Paulo: Roca. p.137-175, 2000.

CÂMARA, V. M.; GALVÃO, L. A. C. A patologia do trabalho numa perspectiva ambiental. In: MENDES, R ed. **Patologia do trabalho**. Rio de Janeiro, Editora Atheneu, p. 609-630, 1995.

CAMPOS, M. A. G. et al. Estado nutricional e fatores associados em idosos. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 52, n. 4, p. 214-221, 2005.

CARPENTER, K.L. et al. The carotenoids beta-carotene, canthaxanthin and zeaxanthin inhibit macrophage-mediated LDL oxidation. **FEBS Letters**, v. 401, p. 262–266, 1997.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analyses - Viewpoint and discussion. **Journal of Chromatography B**, v. 689, p. 175-180, 1997.

CHAN, A. C. Partners in defense, vitamin E and vitamin C. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 71, n. 9, p. 725-731, 1993.

CLEVIDENCE, B. A.; BIERI, J. G. Association of carotenoids with human plasma lipoproteins. **Methods in Enzymology**, v. 214, p. 33-46, 1993.

COSKUN, O. et al. The Oxidative and Morphological Effects of High Concentration Chronic Toluene Exposure on Rat Sciatic Nerves. **Neurochemical Research**, v. 30, p. 33-38, 2005.

COSTA, C. et al. In vitro evaluation of oxidative damage from organic solvent vapours on human skin. **Toxicology in vitro**, v. 20, p. 324-331, 2006.

DAS, N. P. Effects of vitamin A and its analogs on nonenzymatic lipid peroxidation in rat brain mitochondria. **Journal of Neurochemistry**, v. 25, p. 585-588, 1989.

DEL RIO, D.; STEWART, A. J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 15, n. 4, p. 316-328, 2005.

DILLIOGLUGIL, M. O. et al. Protective effects of N-acetylcysteine on the peroxidative changes of rat lungs exposed to inhalation of thinners. **Respirology**, v. 10, p. 615-619, 2005.

Di MASCIO, P.; MURPHY, M.E.; SIES H. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 53, p. 194S-200S, 1991.

DLUGOSZ, A.; SAWICKA, E. Chemoprotective effect of coenzyme Q on lipids in the paint and lacquer industry workers. **International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health**, v. 11, p. 153-163, 1998.

DLUGOSZ, A.; SAWICKA, E.; MARCHEWKA, Z. Styrene and ethylene glycol have a synergistic effect on lipid peroxidation that is better protected than repaired by CoQ₁₀. **Toxicology in Vitro**, v. 19, n. 5, p. 581-588, 2005.

DOTAN, Y.; LICHTENBERG, D.; PINCHUK, I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. **Progress in Lipid Research**, v. 43, p. 200-227, 2004.

DUGAS, T.R.; MOREL, D.W.; HARRISON, E.H. Dietary supplementation with β -carotene, but not with lycopene, inhibits endothelial cell-mediated oxidation of low-density lipoprotein. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p. 1238–1244, 1999.

EL-AGAMEY, A. et al. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 430, p. 37-48, 2004.

ERDMAN, J. W.; BIERER, T. L.; GUGGER, E. T. Absorption and transport of carotenoids. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 691, p.76-85, 1993.

ESSICK E.E.; SAM, F. Oxidative stress and autophagy in cardiac disease, neurological disorders, aging and cancer. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 3, p.168-177, 2010.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R. J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radical Biology & Medicine**, v.11, p.81-128, 1991.

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.

FINDLAY, V. J.; TAPIERO, H.; TOWNSEND, D. M. Sulfiredoxin: a potential therapeutic agent? **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 59, p. 374-379, 2005.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-247, 2000.

Forster L.M.K.; Tannhauser M.; Tannhauser S.; Toxicologia do tolueno: aspectos relacionados ao abuso. **Revista de Saúde Pública**, v.28, p. 167-172, 1994.

FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Progress in Lipid Research**, v. 43, n. 3, p. 228-265, 2004.

FRITSCHI, L. et al. OccIDEAS: Retrospective Occupational Exposure Assessment in Community-Based Studies Made Easier. **Journal of Environmental and Public Health**, p. 1-5, 2009.

GATÉ, L. et al. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 53, p. 169-180, 1999.

GEILAN, D.P. et al. Retinol increases catalase activity and protein content by a reactive species-dependent mechanism in Sertoli cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 174, p. 38-43, 2008.

GEORGIEVA, T. et al. Possibilities to control the health risk of petrochemical workers. **International Archives Occupational and Environmental Health**, v. 75, p. 26-21, 2002.

GILLHAM, B.; PAPACHRISTODOULOU, D. K.; THOMAS, J. H. **Wills' biochemical basis of medicine**. 3. ed. Oxford: Reed Educational and Professional Publishing Ltd, 1997. p. 196-202.

GOOGMAN, G.E. et al. The Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial: Incidence of Lung Cancer and Cardiovascular Disease Mortality During 6-Year Follow-up After Stopping β -Carotene and Retinol Supplements. **Journal of National Cancer Institute**, v. 96, p. 1743-1750, 2004.

GOODWIN, T. W. Metabolism, nutrition and function of carotenoids. **Annual Review of Nutrition**, v. 6, p. 273-297, 1986.

GROMADZINSKA J., WASOWICZ W., Oxidative stress-inducing workplace agents. **Comments on Toxicology. Taylor & Francis health sciences**, v. 9, p. 23-37, 2003.

GUTTERIDGE, J.M. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clinical Chemistry**, v. 41, p. 1819-28, 1995.

GUTTERIDGE, J.M.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. **Annals of New York Academy Science**, v. 899, p. 136-147, 2000.

HALIFEOGLU, I. et al. Effect of thinner inhalation on lipid peroxidation and some antioxidant enzymes of people working with paint thinner. **Cell Biochemistry and Function**, v. 18, p. 263-267, 2000.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human diseases: curiosity, cause or consequence? **The Lancet**, v. 344, p. 721-724, 1994.

HAMMER, K. D. Metabolite ratio of toluene-exposed rotogravure printing plant workers reflects individual mutagenic risk by sister chromatid exchanges. **Mutation Research**, v. 519, p. 171-177, 2002.

HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Seminars in Hematology**, v. 26, n. 4, p. 277-285, 1989.

IKEDA, M. Solvents in urine as exposure markers. **Toxicology Letters**, v. 108, p. 99-106, 1999.

ILGAZLI, A. et al. The effects of thinner inhalation on superoxide dismutases activities, malondialdehyde and glutathione levels in rat lungs. **Clinica Chimica Acta**, v. 343, p. 141-144, 2004.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Some organic solvents, resin monomers and related compounds, pigments and occupational exposure in the paint manufacture and painting. Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Lyon: IARC, 1989.

ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Text on Validation of Analytical Procedures. **ICH Steering Committee**, 2004.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO); Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003.

JOHNSON, A. C.; NYLÉN, P. R. Effects of industrial solvent on hearing. **Occupational Medicine**, v. 10, p. 623-40, 1995.

JORDÃO Jr, A. A. et al. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutathione reduzida e da vitamina E. **Medicina**, v. 31, p. 434-449, 1998.

JUNQUEIRA, V. B. C.; RAMOS, L. R. Estresse Oxidativo. In: RAMOS, L. R.; NETO, J. T. **Geriatría e gerontologia**. Barueri : Manole Ltda, 2005. Cap. 24, p. 315-324.

KANG, S.K.; KUM E.A. Occupational diseases in Korea. **Journal of Korean Medicine Science**, v. 25, p. S4-S10, 2010.

KAWAI, T. et al. Comparative evaluation of blood and urine analysis as a tool for biological monitoring of n-hexane and toluene. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 65, p. 123-126, 1993.

KAYDEN H.J.; TRABER, M.G. Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentrations of vitamin E in humans. **Journal of Lipid Research**, v.34, p. 343-358, 1993.

KIM, J.H. et al. Changes in oxidative stress biomarker and gene expression levels in workers exposed to volatile organic compounds. **Industrial Health**, p.1-22, 2010.

KLAASSEN, C.D.; AMDUR, M.O.; DOULL, J. **Casarett and Doull's Toxicology - The Basic Science of Poisons**. 6 ed. New York, McGraw Hill. 2001.

KRINSKY, N. I.; JOHNSON, E. J. Carotenoid actions and their relation to health and disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 25, p.459-516, 2005.

KUCUK, O. et al. Phase II randomized clinical trial of lycopene supplementation before radical prostatectomy. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 10, p. 861-868, 2001.

KUM, C. et al. Effects of xylene and formaldehyde inhalations on renal oxidative stress and some serum biochemical parameters in rats. **Toxicology and Industrial Health**, v. 23, p. 115-120, 2007.

LASHERAS, C. et al. Independent and interactive association of blood antioxidants and oxidative damage in elderly people. **Free Radical Research**, v. 36, p. 875-882, 2002.

LAURENS, J. et al. Validated method for quantitation of biomarkers for benzene and its alkylated analogues in urine. **Journal of Chromatography B**, v. 774, p. 173-185, 2002.

LAZARUS, S.; CATIGNANI, G.L.; WILLCOX, J.K. Tomatoes and cardiovascular health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.43, p.1-18, 2003.

LEICHTWEIS, S.; JI, L. L. Glutathione deficiency intensifies ischaemia-reperfusion induced cardiac dysfunction and oxidative stress. **Acta Physiology Scandinavian**, v. 179, p. 1-10, 2001.

LEO, M. A. et al. Metabolism of retinol and retinoic acid by human liver cytochrome P450IIC8. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 269, p. 305-312, 1989.

LOCATELLI, F. et al. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 18, p. 1272-1280, 2003.

LYKKESFELDT, J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clinica Chimica Acta*, v. 380, p. 50-58, 2007.

MAHAN, L.K & STUMP, S.E. What is a vitamin? In: KRAUSE'S. **Food, Nutrition & Diet Therapy**. W.B. 10ª edição, Saunders Company, p.68-109, 2000.

MANINI, P.; PALMA, G.; MUTTI, A. Exposure assessment at the workplace: Implications of biological variability. **Toxicology Letters**, v. 168, p. 210-218, 2007.

MANNO, M. et al. Biomonitoring for occupational health risk assessment (BOHRA). **Toxicology Letters**, v. 192, p. 3-16, 2009.

MARTÍNEZ-ALFARO, M. et al. Correlation between formamidopyrimidine DNA glycosylase (Fpg)-sensitive sites determined by a comet assay, increased MDA, and decreased glutathione during long exposure to thinner inhalation. **Toxicology Letters**, v. 163, p. 198-205, 2006.

MARTÍNEZ-ALFARO, M. et al. Thinner inhalation effects on oxidative and DNA repair in a rat model of abuse. **Applied Toxicology**, v. 30, p. 226-232, 2010.

MATHEWS-ROTH, M.M.. Plasma concentration of carotenoids after large doses of beta-carotene. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 52, p. 500-501, 1990.

MATTIA C. J.; ADAMS J. D.; BONDY S. C. Free radical induction in the brain and liver by products of toluene catabolism. **Biochemical Pharmacology**, v. 46, p. 103-110, 1993.

MAYNE, S. T. Antioxidants nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. **The Journal of Nutrition**, v. 133, p. 933-940, 2003.

McDIARMID, M. A.; AGNEW, J. Efeitos do trabalho sobre a reprodução. In: MENDES, R ed. **Patologia do trabalho**. Rio de Janeiro, Editora Atheneu, p.389-427, 1995.

McGRATH, L. T. et al. Oxidative stress in erythrocyte membrane fluidity in patients undergoing regular dialysis. **Clinica Chimica Acta**, v. 235, p. 179-188, 1995.

MEAGHER, E.A. et al. Effects of Vitamin E on Lipid Peroxidation in Healthy Persons. **The Journal of the American Medical Association**, v. 285, p. 1178-1182, 2001.

MEYDANI, S. N.; HAN, S. N.; WU, D. Vitamin E and immune response in the aged: molecular mechanisms and clinical implications. **Immunological Reviews**, v. 205, p. 269-284, 2005.

MILLER, J. K.; SLEBODZINSKA, E. B.; MADSEN, F. C. Oxidative stress, antioxidants and animal function. **Journal Dairy Science**, v.76, p.2812-2823, 1993.

MILLS, B. J.; LANG, C. A. Differential distribution of free and bound glutathione and cyst(e)ine in human blood. **Biochemical Pharmacology**, v. 52, p. 401-406, 1996.

MIYAZAWA, T.; SHIBATA, A.; SOOKWONG, P.; KAWAKAMI, Y.; EITSUKA, T.; ASAI, A.; OIKAWA, S.; NAKAGAWA, K. Antiangiogenic and anticancer potential of unsaturated vitamin E (tocotrienol). **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 20, p. 79-86, 2009.

MONAGHAN, B. R.; SCHMITT, F. O. The effects of carotene and of vitamin A on the oxidation of linolei acid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 96, p. 387-395, 1932.

MOON, C. S. et al. Use of solvents in industries in Korea; experience in Sinpyeong-Jangrim industrial complex. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 74, p. 148-152, 2001.

MORENA, M. et al. Convective and diffusive losses of vitamin C during haemodiafiltration session: a contributive factor to oxidative stress in haemodialysis patients. **Nephrology Dialysis and Transplantation**, v. 17, p. 422-427, 2002.

MORO, A.M. et al. Effects of low-level exposure to xenobiotics present in paints on oxidative stress in workers. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 4461–4467, 2010.

MOSCA, M. et al. Antioxidant nutrient supplementation reduces the susceptibility of low density lipoprotein to oxidation in patients with coronary artery disease. **Journal of American College of Cardiology**, v.30, p. 392-9, 1997.

NAGAO, A.; OLSON, J. A. Enzymatic formation of 9-*cis*, 13-*trans*, and all-*trans* retinals from isomers of beta-carotene. **The FASEB Journal**, v. 8, p. 968-973, 1994.

NAPOLI, J.L. Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism and signal transduction. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 80, p. 52-62, 1996.

NEVES, H. Vigilância de Exposição Ocupacional a Substâncias Tóxicas. **Informe epidemiológico do SUS**, v. 8, p. 35-46, 1999.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, p. 1287-1312, 2001.

NOZAL, M. J. et al. Determination of glutathione, cysteine and N-acetylcysteine in rabbit eye tissues using high-performance liquid chromatography and post-column derivatization with 5-5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). **Journal of Chromatography A**, v. 778, p. 347-353, 1997.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 3. ed. São Paulo, Editora Atheneu, 2008.

OLIVEIRA, M.R. et al. Evaluation of the effects of vitamin A supplementation on adult rat substantia nigra and striatum redox and bioenergetic states. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 33, p. 353-362, 2009.

OLMEDILLA, B. et al. Serum concentrations of carotenoids and vitamins A, E, and C in control subjects from five European countries. **British Journal of Nutrition**, v. 85, p. 227-238, 2001.

OLSON JA, KRINSKY NI. Introduction: the colorful, fascinating world of the carotenoids: important physiologic. **The FASEB Journal**, v.9, p.1547-1550, 1995.

OLSON, J. A. Absorption, transport, and metabolism of carotenoids in humans. **Pure and Applied Chemistry**, v. 66, p. 1011-1016, 1994.

OLSON, J. A. Vitamin A function of carotenoids: the conversion of β -carotene to vitamin A. **The Journal Nutrition**, v.119, p.105-108, 1989.

PAIVA, S.A.R.; RUSSELL, R.M. β -carotene and other carotenoids as antioxidants. **Journal of the American College of Nutrition**, v.18, p.426-433, 1999.

PALLACE, V.P. Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v.26, p.746-761, 1999.

PANASENKO, O.M. et al. Interaction of peroxynitrite with carotenoids in human low density lipoproteins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 373, p. 302–305, 2000.

PARKER, R.S. Carotenoids in human blood and tissues. **Journal of Nutrition**, v.119, p.101-104, 1989.

PARKER, R. S. Absorption, metabolism and transport of carotenoids. **The FASEB Journal**, v. 10, p. 542-551, 1996.

PERSSON, J. O.; TERELIUS, Y.; INGELMAN-SUNDBERG, M. CytochromeP450-dependent formation of reactive oxygen radicals: isoenzyme-specific inhibition of P450-mediated reduction of oxygen and carbon tetrachloride. **Xenobiotica**, v. 20, p. 887-900, 1990.

POMPELLA, A. et al. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 1499-1503, 2003.

PORTER, N. A.; CALDWELL, S. E.; MILLS, K. A. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. **Lipids**, v.30, p.277-284, 1995.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em eluídos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 1, p. 68-76, 2001.

RAGIN, C. et al. Pooled analysis of studies on DNA adducts and dietary vitamins. **Mutation Research**, v. 705, p. 77–82, 2010.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, E.P.; SERAVALLI, A.G. **Química dos Alimentos**. Instituto Mauá de Tecnologia. Editora Edgard Blucher Ltda, Primeira Edição, São Paulo, p. 155-157, 2004.

RIGOTTI, A. Absorption, transport, and tissue delivery of vitamin E. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 28, p. 423-436, 2007.

ROCK, C. L. Responsiveness of serum carotenoids to a high-vegetable diet intervention designed to prevent breast cancer recurrence. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 6, p. 617-623, 1997.

ROCK, C. L.; JACOB, R. A.; BOWEN, P. E. Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 96, p. 693-702, 1996.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; RODRIGUEZ, E. B.; AMAYA-FARFAN, J. Advances in food carotenoid research: chemical and technological aspects, implications in human health. **Malaysian Journal of Nutrition**, v. 12, p. 101-121, 2006.

ROEHRS, M. et al. The plasma retinol levels as pro-oxidant/oxidant agents in haemodialysis patients. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 24, p. 2212-2218, 2009.

ROMANCHIK, J.E.; HARRISON, E.H.; MOREL, D.W. Addition of lutein, lycopene, or β -carotene to LDL or serum in vitro: effects on carotenoid distribution, LDL composition, and LDL oxidation. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 8, p. 681–688, 1997.

SALDEEN, K.; SALDEEN, T. Importance of tocopherols beyond α -tocopherol: evidence from animal and human studies. **Nutrition Research**, v. 25, n.10, p. 877-899, 2005.

SAMOTO, H. et al. Field survey on types of organic solvents used in enterprises of various sizes. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 79, p. 558-567, 2006.

SAWICKA, E.; DLUGOSZ, A. Toluene and P-xylene mixture exerts antagonistic effect on lipid peroxidation in vitro. **International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health**, v. 21, p. 201-209, 2008

SCHENCK, L. et al. Risk assessment and occupational exposure limits. **Toxicology Letters**, v.180, p. 32-246, 2008.

SCHMITZ, H. H. Concentrations of selected carotenoids and vitamin A in human liver, kidney and lung tissue. **Journal of Nutrition**, v. 121, p. 1613-1621, 1991.

SHAMI, N.J.I.E.; MOREIRA, E.A.M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, v.17, p.227-236, 2004.

SHAN, X.; AW, T. Y.; JONES, D. P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 47, p. 61-71, 1990.

SHI, J.; LE MAGUER, M. Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing. **Critical Reviews in Biotechnenology**, v.4, p.293-334, 2000.

SHI, J.; KAKUDA, Y.; YEUNG, D. Antioxidative properties of lycopene and other carotenoids from tomatoes: synergistic effects. **Biofactors**, v. 21, p. 203-210, 2004.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v. 82, p. 291-295, 1997.

SIES, H. et al. Oxidation in the NADP system and release of GSSG from hemoglobin-free perfused rat liver during peroxidatic oxidation of glutathione by hydroperoxides. **FEBS Letters**. v. 27, p. 171-175, 1972.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, p. 1315S-1321S, 1995.

SILVA, C. R. M.; NAVES, M. M. V. Suplementação de vitaminas na prevenção do câncer. **Revista de Nutrição**, v.14, p.135-143, 2001.

SILVEIRA, S. A. **Avaliação antropométrica e dos níveis plasmáticos de vitamina A em indivíduos infectados pelo HIV-1 em pacientes com SIDA**. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) - Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, 1996.

SINGH, M.P. et al. Effects of co-exposure of benzene, toluene and xylene to *Drosophila melanogaster*: Alteration in hsp70, hsp60, hsp83, hsp26, ROS generation and oxidative stress markers. **Chemosphere**, v. 79, 577–587, 2010.

SLUIJS, I. et al. Dietary carotenoid intake is associated with lower prevalence of metabolic syndrome in middle-aged and elderly men. **Journal of Nutrition**, v. 139, p. 987-992, 2009.

SOLOMONS, N. W.; BULUX, J. Plant sources of provitamin A and human nutriture. **Nutrition Review**, v. 51, p. 199-204, 1993.

SRAM, R.J. et al. Effect of vitamin levels on biomarkers of exposure and oxidative damage—The EXPAH study. **Mutation Research**, v. 672, p. 129–134, 2009.

STAHL, W.; SIES, H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1740, p. 101-107, 2005.

STAMPFER, M.J.; RIMM, E. B. Epidemiologic evidence for vitamin E. **Sciences**, v. 899, p. 136-47, 1995.

TABATABAIE, T.; FLOYD, R. A. Inactivation of glutathione peroxidase by benzaldehyde. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 141, p. 389-393, 1996.

TALWAR, D. et al. A routine method for the simultaneous measurement of retinol, α -tocopherol and five carotenoids in human plasma by reverse phase HPLC. **Clinica Chimica Acta**, v. 270, p. 85-100, 1998.

TAMIMI, R.M. et al. Plasma carotenoids, retinol, and tocopherols and risk of breast cancer. **American Journal of Epidemiology**, v. 161, p. 153-160, 2005.

TAPIERIO, H.; TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 58, p. 100-110, 2004.

TESORIERE, L. Antioxidant activity of all-trans-retinol in homogenous solution and phosphatidylcholine liposomes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.307, p. 217-223, 1993.

THAKUR, M.L.; SRIVASTAVA, U. S. Vitamin-E metabolism and its application. **Nutrition Research**, v.16, p.1767-1809, 1996.

TOPINKA, J. Et al. Biomarkers of air pollution exposure—A study of policemen in Prague. **Mutation Research**, v. 624, p. 9–17, 2007.

TRUCHON, G.; TARDIF, R.; BRODEUR, J. O-Cresol; A Good Indicator of Exposure to Low Levels of Toluene. **Applied Occupational and Environmental Hygiene**, v. 14, p. 677-681, 1999.

UCHIDA, K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, p. 1685-96, 2000.

ULAKOGLU, E. Z. et al. Alterations in superoxide dismutase activities, lipid peroxidation and glutathione levels in thinner inhaled rat lungs: relationship between histopathological properties. **Pharmacological Research**, v. 38, p. 209-214, 1998.

URSO, M. L.; CLARKSON, P. M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**, v. 189, p. 41-54, 2003.

VANNUCCHI, H. Interaction of vitamins and minerals. **Archivos Latinoamericanos de Nutri n**, v. 41, p. 9-18, 1991.

VANNUCCHI H. et al. Papel dos nutrientes na peroxida o lip dica e no sistema de defesa antioxidante. **Medicina**, v. 31, p. 31-44, 1998.

VARDI, N. et al. Potent protective effect of apricot and β -carotene on methotrexate-induced intestinal oxidative damage in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 3015–3022, 2008.

VOUTILAINEN, S. et al. Carotenoids and cardiovascular health. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.83, p.1265-1271, 2006.

WANG, X. D. et al. Biosynthesis of 9-cis-retinoic acid from Y-cis-beta-carotene in human intestinal mucosa in vitro. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 313, p. 150-155, 1994.

WRIGHT, A.J.A. et al. Beta-carotene and lycopene, but not lutein, supplementation changes the plasma fatty acid profile of healthy male non-smokers. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 134, p. 592-598, 1999.

YOUNG, A.; LOWE, G.M. Antioxidant and Prooxidant Properties of Carotenoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 385, p. 20-27, 2001.

YUAN, J.M. et al. Prediagnostic level of serum retinol in relation to reduced risk of hepatocellular carcinoma. **Journal of National Cancer Institute**, v. 98, p. 482-490, 2006.

ZHANG, P.; OMAYE, S. T. β -Carotene: interactions with α -tocopherol and ascorbic acid in microsomal lipid peroxidation. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.12, p.38-45, 2001.

ZINGG, J. M .Vitamin E: an overview of major research directions. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 28, p. 400-422, 2007.

ZINGG, J.M.; AZZI, A. Non-antioxidant activities of vitamin E. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 1113–1133, 2004.