

## Oxigênio, radicais livres de oxigênio e saúde

Danilo Wilhelm Filho

Departamento de Biologia - Centro de Ciências Biológicas -  
Universidade Federal de Santa Catarina - Campus Universitário,  
Trindade - 88040-900 Florianópolis, SC - Brasil

### Resumo

Os radicais livres de oxigênio ou oxiradicais (RLO) e seus efeitos deletérios começaram a ser cada vez mais reconhecidos na comunidade científica a partir das duas últimas décadas. Alcançaram o horizonte de interesse popular apenas nos últimos anos, notadamente devido às implicações inerentes à presença dos oxiradicais envolvendo diversas patologias e ao processo de envelhecimento. O emprego de terapias antioxidantes e a suplementação de microelementos e vitaminas antioxidantes é ainda controverso e polêmico, principalmente como consequência da ausência de procedimentos terapêuticos definidos e regulamentados, apesar de que o embasamento científico existente neste particular ser suficiente para atender este mister.

Key words: oxygen; oxyradicals; antioxidant defennses; antioxidant therapies.

### Summary

The oxyradicals, oxygen free radicals, or reactive oxygen species and their deleterious consequences began to be recognized throughout the scientific community in the last two decades. They reached more popularity only in the last few years, mainly as a consequence of their involvement in

many pathologies and the aging process. The use of antioxidant therapies as well as the microelement and vitamine supplementations are still in debate. The absence of standard methods regarding such procedures may be responsible for this controversy despite the bulk of scientific production that give support to this knowledge.

## Introdução

O oxigênio foi sempre o principal elemento constituinte da crosta terrestre, mas como forma molecular gasosa somente teria iniciado sua incorporação na atmosfera a partir de cerca de 3 bilhões de anos atrás, através da atividade fotossintética de algas cianofíceas (Gilbert, 1981). Os organismos necessitaram adaptar-se à sua crescente existência, pois o oxigênio apresenta dois aspectos essenciais na sua utilização, um promotor e outro destruidor de vida (Fridovich, 1975).

Desde o século XVIII com os trabalhos de Lavoisier e posteriormente de Priestley, ficou demonstrado que o oxigênio era vital para a grande maioria dos organismos atualmente existentes na biosfera, exceção a algumas formas anaeróbicas para as quais o gás é letal mesmo em exposições curtas a baixas tensões. A partir da publicação pioneira de meados da década de 50 (Gerschman et al., 1954), estabeleceram-se as bases da teoria envolvendo a ação dos RLO, indicando que sua utilização no próprio processo da respiração promove dano através de um processo contínuo. Foi com o descobrimento da enzima superóxido dismutase (SOD - que promove a dismutação do ânion superóxido,  $O_2^-$ , um dos oxiradicais mais importantes gerados inicialmente pelo organismo) quinze anos mais tarde (McCord e Fridovich, 1969), que a investigação nesta área foi realmente impulsionada, deixando de ser tema de interesse apenas da química básica. O crescimento exponencial das publicações congêneres é um testemunho fiel desta repercussão, onde a associação dos oxiradicais com mais de duas centenas de condições clínicas (Halliwell e Gutteridge, 1989) e os processos degenerativos decorrentes do envelhecimento (Harman, 1984; Cutler, 1984) constituem os objetos principais desses estudos: Os destaques das áreas mais investigadas recaem sobre as patologias relacionadas com os sistemas e aparelhos cardio-vascular, respiratório, nervoso, imunológico, da visão, além

de processos carcinogênicos, inflamatórios e o próprio envelhecimento (Halliwell e Gutteridge, 1989; Davies, 1991; Van Lente, 1993).

### Fontes de RLO e Defesas Antioxidantes

Os oxiradicais são normalmente formados através de reações de oxirredução (Cadenas, 1985), sendo que as que envolvem a transferência de elétrons por íons metálicos como o ferro e o cobre, possuem grande importância biológica, pois aceleram a lenta reação (chamada de Haber-Weiss) produtora do radical hidroxil (Halliwell e Gutteridge, 1984). As espécies ativas de oxigênio possuem reatividades muito elevadas comparativamente ao oxigênio molecular ou dióxigênio, conferindo destarte sua nocividade, e caracterizam-se por apresentar um ou mais elétrons não-pareados em seus orbitais (Halliwell e Gutteridge, 1989; Cadenas 1989).

Atualmente são conhecidos vários agentes exógenos promotores de oxiradicais, como o smog, ozônio, xenobiontes, radiação ionizante e ultrassom (González-Flecha, 1990; Davies, 1991). A principal fonte endógena de oxiradicais consiste na própria respiração celular, sendo a produção de  $O_2^{\cdot -}$  uma função quase linear do oxigênio consumido pelo organismo (Boveris, 1977; Jamieson, et al., 1986; Wilhelm Filho et al., 1993). Estima-se que aproximadamente 3 a 5% do oxigênio consumido não consegue ser reduzido de forma tetravalente até  $H_2O$  pela ação da citocromo *c* oxidase mitocondrial, configurando-se as mitocôndrias como o sítio mais importante na geração de espécies ativas de oxigênio dos organismos (Boveris, 1977). Além desta fonte, a autoxidação espontânea de hemoproteínas como a hemoglobina, mioglobina e citocromos, além de tióis, flavinas, ferredoxinas, hidroquinonas, catecolaminas, granulócitos polimorfonucleados (onde sua ação bactericida é benéfica ao organismo), sistema microsomal citocromo  $P_{450}$  e redutases associadas, além de diversas enzimas, contribuem na formação de oxiradicais (Halliwell e Gutteridge, 1989; Sies, 1993).

Os oxiradicais e seus produtos geralmente podem ser detectados de forma indireta através do estudo de atividades enzimáticas; por intermédio da medição da produção de quimioluminescência por órgãos e tecidos; através de substâncias exaladas na respiração como o etano, o propano e o próprio peróxido de hidrogênio, além de medidas diretas realizadas através de técnicas mais sofisticadas como ressonância magnética nuclear (Boveris et al.,

1981; Halliwell e Gutteridge, 1989; González-Flecha, 1990). Na avaliação do dano celular oriundo dos RLO, os métodos comumente empregados constituem a mensuração de substâncias reativas com o ácido tiobarbit rico (onde a forma majoritária é o malondialdeído), a detecção de derivados da ação dos oxirradicais no ADN (rotineiramente é utilizado o OH<sup>8</sup>dG, ou 8-hidroxi 2' deoxiguanosina), ou a mensuração de danos proteicos (Halliwell e Gutteridge, 1989).

Os organismos aeróbios possuem diversas defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas no sentido de manter baixos níveis de oxirradicais e minimizar o dano deles decorrente. As proteções enzimáticas básicas podem ser resumidas como segue: a SOD (existem duas formas nos eucariontes e distintas da existente nos procariontes) converte o ânion superóxido, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, em peróxido de hidrogênio, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e O<sub>2</sub>, enquanto que a catalase converte o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O. Como coadjuvantes importantes e apresentando variações quali-quantitativas de acordo com seu endereço celular e sub-celular, podem ser mencionadas as enzimas glutathione redutase, glicose 6-fosfato desidrogenase, γ-glutamyl cisteína sintetase, γ-glutamyl transpeptidase, as múltiplas formas das glutathione S-transferases, entre outras (Pryor, 1986; Halliwell e Gutteridge, 1989).

Deste modo os organismos mantêm baixas concentrações de ânion superóxido (valores para fígado de rato) em torno de 10<sup>-10</sup> e 10<sup>-11</sup> M (Tyler, 1975), e de peróxido de hidrogênio em aproximadamente 10<sup>-7</sup> e 10<sup>-9</sup> M (Oshino et al., 1973). Como consequência determinante disto, as células exibem uma reduzidíssima concentração (10<sup>-18</sup> M) do radical hidroxil (·OH), produto da reação entre as duas formas anteriores, O<sub>2</sub><sup>-</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Chance et al., 1979). Apesar de seu conteúdo e tempo de vida médio (10<sup>-9</sup> s) diminutos, o radical hidroxilo é extremamente pernicioso, reagindo com qualquer estrutura molecular adjacente (Pryor, 1986). Daí a necessidade das células ostentarem concentrações enzimáticas antioxidantes tão elevadas, onde as concentrações enzimáticas superam as concentrações dos substratos em algumas ordens de magnitude (valores aproximados para o fígado de rato: CAT/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 10<sup>-100</sup>; SOD/O<sub>2</sub><sup>-</sup> = 100000), ao contrário do que ocorre nas relações enzima-substrato em geral (Halliwell e Gutteridge, 1989). Apesar destas precauções e das outras formas de antioxidantes existentes, a ação dos oxirradicais persiste e continuamente produz dano celular.

Além do conjunto de enzimas antioxidantes já referido, os organismos aeróbios estão dotados de antioxidantes não-enzimáticos igualmente

muito variáveis de acordo com o a espécie ou tecido, onde vale destacar os seguintes (Halliwell e Gutteridge, 1989; Davies, 1991): as vitaminas E, C e A (além de outros carotenóides como o licopeno e o  $\beta$ -caroteno) (DiMascio et al., 1989; 1990), a glutathiona (GSH), ubiquinóis (UQ<sub>10</sub> no homem e peixes, UQ<sub>9</sub> no rato), ácido úrico, pigmentos biliares e hormônios estrógenos. Muitos desses antioxidantes agem complementarmente ou sinergicamente, como são os casos da associação do  $\alpha$ -tocoferol ao ascorbato (Chan, 1992), ao  $\beta$ -caroteno (Palozza e Krinsky, 1992), e ao ubiquinol (Kagan et al., 1990).

### Danos Associados aos RLO e sua Prevenção

O balanço entre prooxidantes e antioxidantes é delicado nos sistemas biológicos e seus desequilíbrios caracterizam diversas consequências clínicas. É essencialmente nos suplementos vitamínicos adequados que reside o principal modo de reforço exógeno ao sistema antioxidante do organismo humano, e tornado relativamente popular nos anos recentes (Pryor, 1989; Davies, 1991). O elevado poder antioxidante da vitamina E (basicamente o  $\alpha$ -tocoferol, forma majoritária encontrada em maiores concentrações apenas em óleos vegetais e sementes oleaginosas como amêndoas, castanhas, avelãs, nozes e congêneres, além de pescados em geral (Burton e Ingold, 1989; Jukes, 1992; Ames e Shigenaga, 1993) e o poder regenerativo da vitamina C sobre o radical  $\alpha$ -tocoferoxil oriundo da oxidação do  $\alpha$ -tocoferol (Krinsky, 1989; Chan, 1992) contribuem decisivamente para interromper as chamadas reações de propagação dos oxiradicaís nas membranas celulares e de organelas, atenuando os processos de peroxidação lipídica ali ocorrentes, e secundando, assim, a ação antioxidante enzimática. A título de ilustração, o miocárdio é um dos tecidos mais refratários quanto à lipoperoxidação, provavelmente devido à alta concentração de vitamina E relativamente à de ácidos graxos polinsaturados (Kornbrust e Mavis, 1980). Deficiências de vitamina E provocam diversos sintomas, incluindo distrofia muscular, ataques cardíacos, necrose hepática, ataxias, degeneração alveolar, entre outras (Drevon, 1991). Talvez o maior divulgador, desde os anos 60, das ações antioxidantes das vitaminas C e E, tenha sido Linus Pauling, o único detentor de dois prêmios Nobel não-compartidos e recentemente falecido.

Os suplementos antioxidantes (além dos vitamínicos, são utilizados o selênio como cofator da glutathiona peroxidase, o ubiquinol<sub>10</sub>, o zinco, e o

$\beta$ -caroteno - este excelente neutralizador do oxigênio singlete, espécie excitada do oxigênio; Sies et al., 1993) vem sendo lentamente incorporados de forma rotineira na área clínica, inclusive na medicina do esforço (Alessio, 1993). Alguns resultados de trabalhos isolados solidamente conduzidos nos anos recentes ilustram esta tendência, conforme segue (revisões relativamente recentes constituem: Halliwell, 1988; Chow, 1988; Halliwell e Gutteridge, 1989; Davies, 1991):

- a) doenças do miocárdio: níveis plasmáticos de  $\alpha$ -tocoferol são inversamente proporcionais às doenças coronarianas; redução de *angina pectoris* em 44% nos pacientes tratados com suplemento de  $\beta$ -caroteno; pacientes pré-tratados com suplementos de vitaminas E e A durante 5 dias previamente a cirurgias do miocárdio apresentaram menores danos teciduais e convalescença mais rápidas comparativamente a pacientes não-tratados; coração isquêmico, bem como demais tecidos em condição pós-isquêmica, sofrem a chamada injúria de reperfusão (melhor dizendo, de reoxigenação, constituindo o "paradoxo do oxigênio") causada pelos RLO;
- b) enfisema, asma, fibrose cística, pneumoconiose, doenças pulmonares induzidas por xenobiontes como o herbicida paraquat, o antibiótico bleomicina, e poluentes como o ozônio, estão fortemente associados ao estresse oxidativo;
- c) aterosclerose: níveis de oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e RLO são fatores vinculados estreitamente;
- d) visão: os processos de catarata, retinopatia e fibroplasia retrolênica, além de outras desordens do aparelho visual, estão relacionados com a ação dos RLO (a suplementação de vitamina E em bebês prematuros parece diminuir a incidência destas enfermidades nos mesmos);
- e) sistema nervoso: antioxidantes minimizam o efeito de edema cerebral, assim como nas doenças neurodegenerativas como o Mal de Parkinson e Alzheimer (onde íons metálicos como o cobre, ferro e alumínio são determinantes na produção de RLO);
- f) nos processos inflamatórios os níveis de  $O_2^{\cdot -}$  determinam o recrutamento de neutrófilos e são importantes nas artrites reumatóides;

- g) envelhecimento: a detecção de OH<sup>8</sup>dG aumenta com a idade do organismo ou em situações de exercício e estresse;
- h) na malária o relacionamento entre os RLO, agentes patogênicos e aspectos imunológicos constituem objeto de intensos estudos;
- i) atletas suplementados com vitamina E (500 mg/dia) exibem melhor recuperação de danos causados às miofibrilas, comparativamente a atletas não-tratados;
- j) outros: os níveis de carotenóides na dieta alimentar é inversamente proporcional a diversos tipos de câncer (o licopeno aparentemente é mais eficaz neste particular); eritrócitos de indivíduos hipertireoídeos detém meia-vida menor comparativamente a indivíduos normais, refletindo o maior consumo de oxigênio atrelado à maior produção de RLO; em acidentes vasculares cerebrais (AVC), a adição de quelantes como o EDTA permite acentuada melhora de atividade cerebral mesmo após 1 hora do AVC; o emprego de suplementos antioxidantes em doadores de sangue minimiza a lipoperoxidação em eritrócitos.

Geralmente os efeitos deletérios oriundos dos oxiradicais são percebidos a médio e longo prazo no organismo, como é o caso dos processos carcinogênicos e do próprio envelhecimento (Emerit e Chance, 1992). O mesmo se aplica às consequências terapêuticas relacionadas com a ingestão de micronutrientes antioxidantes (Pryor, 1991b). Para os EUA, a recomendação da ingestão diária de vitamina E e C para adultos consiste em 50 UI e 60 mg respectivamente, e não contempla sua participação como antioxidante *per se* (Pryor, 1991a; Ames e Shigenaga, 1993). Se considerarmos as contribuições negativas decorrentes do estresse da vida hodierna e de xenobiontes em geral, todos associados com o chamado estresse oxidativo, e considerando ainda o baixo consumo de frutas e legumes da população em geral (menos de 10% da população norte-americana mostra um consumo adequado neste particular), os suplementos das vitaminas E e C deveriam ser acrescidos significativamente. Acredita-se que hoje em dia o controle, prevenção e tratamento das enfermidades crônicas modernas mais responsáveis por óbitos nos países desenvolvidos (doenças do miocárdio, hipertensão, câncer e diabete) passariam necessariamente pela consideração do aspecto nutricional (Pryor, 1989).

O impasse atual que se verifica quanto à aceitação e emprego rotineiros dos micronutrientes antioxidantes junto aos profissionais da saúde estariam dependentes da definição da sua toxicidade, eficácia e dosagem, exigências comuns às novas drogas lançadas no mercado (Pryor, 1991a; Turrens, 1991). Relativamente à vitamina E, é questionável tratá-la como agente quimioterapêutico que somente poderia ser recomendado após rigorosos e extensos estudos em humanos (considerando seus efeitos na prevenção de câncer, seriam necessários acompanhamentos entre 10 a 30 anos, de difícil controle nutricional) e não somente restritos a animais de laboratório (estudos já realizados). Alternativamente, a adoção de uma suplementação relativamente modesta dos micronutrientes antioxidantes como o  $\beta$ -caroteno e as vitaminas E e C, seria uma atitude recomendável (Pryor, 1987; Bendich e Machlin, 1988; Malone, 1991).

Atualmente existem poucos centros de pesquisa no país atuantes na área em pauta, destacando-se os grupos existentes na USP, UFRJ e UFRGS, todos voltados essencialmente para a área humana. Recentemente iniciou-se a consolidação de um grupo emergente na UFSC, envolvendo os Departamentos de Bioquímica, Ciências Fisiológicas e Biologia, do Centro de Ciências Biológicas, constituído por biólogos ligados às áreas de toxicologia, fisiologia e bioquímica comparadas, sendo que o maior interesse deste grupo converge sobre peixes. Em 1992 foi realizado no Centro de Ciências da Saúde da UFSC, o I Encontro Catarinense sobre Radicais Livres de Oxigênio, com a participação de diversos profissionais do país e do exterior, demonstrando um esforço pioneiro de divulgação local do tema. Infelizmente, um dos objetivos principais do simpósio, ou seja, o de atrair o interesse de profissionais ligados à área da saúde e nutrição, não foi alcançado, provavelmente como consequência da resistência e da lentidão inerentes ao processo de permeabilidade da informação que caracterizam a interface entre a ciência básica e aplicada.

## Conclusão

A noção da importância dos efeitos biológicos decorrentes da ação dos RLO, apesar de demonstradas há 40 anos atrás e haver sido impulsionada há 25 anos com a descoberta da enzima superóxido dismutase, parece resistir quanto à sua aceitação e incorporação mais abrangentes no trata-



mento preventivo de diversas patologias, ou no retardamento do processo do envelhecimento e conseqüente aumento da longevidade. A discussão sobre o tema e sua aceitação nas áreas da saúde e nutrição, e considerando ainda sua crescente penetração na população, podem envolver em futuro próximo, entre outros aspectos, desde a diminuição da demanda a consultórios e hospitais e de determinados medicamentos (pelo menos nos segmentos da sociedade que não padecem cronicamente de fome e problemas de sanitarismo básico) até em aumentos significativos da longevidade e suas conseqüências sócio-econômicas. É mister o estabelecimento quali-quantitativo de padrões e procedimentos que envolvam as terapias antioxidantes e a suplementação preventiva de antioxidantes, sem deixar de levar em consideração as especificidades de cada tratamento e de cada paciente, regulando tais procedimentos e denunciando o charlatanismo infelizmente já existente nesta área. Se este concerto de atitudes é desejado, seria fundamental a tomada de consciência e o engajamento de profissionais da área da saúde e da nutrição neste campo de conhecimento.

### Agradecimentos

Aos Drs. Afonso Bainy do Departamento de Bioquímica - CCB e Carlos Eduardo Pinheiro, do Depto. de Pediatria - CCS, pela leitura crítica do manuscrito.

### Referências Bibliográficas

- Alessio, H.M. (1993). Exercise-induced oxidative stress. *Med.Sci.Sports Exerc.*, 25(2): 218-224.
- Ames, B.N. and Shigenaga, M.K. (1993). Oxidants are a major contributor to aging. *Ann.New York Acad.Sci.*, 663: 85-96.
- Bendich, A. and Machlin, L. (1988). Safety of oral intake of vitamin E. *Am.J.Clin.Nutr.*, 48: 612-619.
- Boveris, A. (1977). Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide. *Adv.Exp.Med.Biol.*, 78: 67-82.

D. W. Filho

- Boveris, A.; Cadenas, E. and Chance, B. (1981). Ultraweek chemiluminescence: a sensitive assay for oxidative radical reactions. *Fed.Proc.*, **40**: 23-26.
- Burton, G.W. and Ingold, K.U. (1989). Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant. *Ann.New York Acad.Sci.*, **570**: 7-22.
- Cadenas, E. (1985). Oxidative stress and formation of excited species. In: Sies, H. (Editor). *Oxidative Stress*. Academic, San Diego, pp.85-113.
- Cadenas, E. (1989). Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu.Rev.Biochem.*, **58**:79-110.
- Chan, A.C. (1992). Partners in defense, vitamin E and vitamin C. *Can.J.Physiol.Pharmacol.*, **71**: 725-731.
- Chance, B.; Sies, H. and Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol.Rev.*, **59**: 527-602.
- Chow, C.K. (1988). *Cellular Antioxidant Defense Mechanisms*. Vol. 3; CRC Press, Boca Raton, 252 pp.
- Cutler, R.G. (1984). Antioxidants, aging, and longevity. In: Pryor, W.A. (Editor). *Free Radicals in Biology*, vol. VI. Academic, Orlando, pp. 371-428.
- Davies, K.J.A. (1991). *Oxidative Damage & Repair: Chemical, Biological and Medical Aspects*. Pergamon, Oxford, 910 pp.
- Di Mascio, P.; Devasagayam, T.; Kaiser, S. and Sies, H. (1990). Carotenoids, tocopherols and thiols as biological singlet molecular oxygen quenchers. *Biochem.Soc.Trans.*, **18**: 1054-1056.
- Di Mascio, P.; Kaiser, P. and Sies, H. (1989). Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch. Biochem. Biophys.*, **274**(2): 32-538.
- Drevon, C.A. (1991). Absorption, transport and metabolism of vitamin E. *Free Rad.Res.Commun.*, **14**: 224-246.
- Emerit, I. and Chance, B. (1992). *Free Radicals and Aging*. Birkhauser, Basel, 229 pp.
- Fridovich, I. (1975). Oxygen: boon and bane. *Amer.Sci.*, **63**: 54-59.
- Gerschman, R.; Gilbert, D.L.; Nye, S.W.; Dwyer, P. and Fenn, W.O. (1954). Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common. *Science*, **119**: 623-626.

- Gilbert, D.L. (1981). *Oxygen and Living Processes: An Interdisciplinary Approach*. Springer, New York, 250 pp.
- González-Flecha, B.S. (1990). Estrés oxidativo en patología humana: métodos de estudio de aplicación clínica. *Acta Bioq.Clin.Latinoamer.*, 24(1): 67-74.
- Halliwell, B. (1988). *Oxygen Radicals and Tissue Injury* (Proceedings of an Upjohn Symposium). FASEB, Bethesda, 148 pp.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem.J.*, 219: 1-14.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1989). *Free Radicals in Biology and Medicine* (2nd ed.). Clarendon, Oxford, 318 pp.
- Harman, D. (1982). The free-radical theory of aging. In: Pryor, W.A. (Editor) *Free Radicals in Biology*. Vol. V. Academic, Orlando, pp.255-275.
- Jamieson, D.; Chance, B.; Cadenas, H. and Boveris, A. (1986). The relation of free radical production to hyperoxia. *Annu.Rev.Physiol.*, 48: 703-719.
- Jukes, T.H. (1992). A corner of history: Antioxidants, nutrition, and evolution. *Prev.Med.*, 21: 34-39.
- Kagan, V.E.; Serbinova, E.A.; Maguire, J.J.; Shvedova, A.A. and Paker, L. (1991). On the path from ubiquinone to ubiquinol: chain breaking lipid peroxil radical scavenging or vitamin E radical recycling? In: Davies, K.J.A. (Editor). *Oxidative Damage and Repair - Chemical, Biological and Medical Aspects*. Pergamon, Oxford, pp. 121-125.
- Kornbrust, D.J. and Mavis, R.D. (1980). Relative susceptibility of microsomes from lung, heart, liver, kidney, brain and testes to lipid peroxidation: correlation with vitamin E content. *Lipids*, 15: 315-322.
- Krinsky, N.I. (1989). Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radical Biol.Med.*, 7:617-635.
- Malone, W. (1991). Studies evaluating antioxidants and -carotene as chemopreventives. *Am.J.Clin.Nutr.*, 53(suppl.): S305-S313.
- McCord, J.M. and Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J.Biol.Chem.*, 244: 6049-6055.
- Oshino, N.; Chance, B.; Sies, H. and Bucher, T. (1973). The role of hydrogen peroxide generation in perfused rat liver and the reaction of catalase compound I and hydrogen donors. *Arch.Biochem.Biophys.*, 157: 117-131.

D. W. Filho

- Palozza, P. and Krinsky, N.I. (1992). -carotene and -tocopherol are synergistic antioxidants. *Arch.Biochem.Biophys.*, **297**: 184-187.
- Pryor, W.A. (1986). Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. *Annu.Rev.Physiol.*, **48**: 657-667.
- Pryor, W.A. (1987). Views on the wisdom of using antioxidant vitamin supplements. *Free Radical Biol.Med.*, **3**: 189-191.
- Pryor, W.A. (1989). Vitamin E: The status of current research and suggestion for future studies. In: Vitamine E - Biochemistry and Health Implications. *Ann.New York Acad.Sci.*, **570**: 400-406.
- Pryor, W.A. (1991a). Does what we eat influence our health? A comparison of two recent books on nutrition. *Free Radical Biol.Med.*, **11**: 611-613.
- Pryor, W.A. (1991b). The antioxidant nutrients and disease prevention - What do we know and what do we need to find out? *Am.J.Clin.Nutr.*, **53(suppl.)**: 391S-393S.
- Sies, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *Eur.J.Biochem.*, **215**: 213-219.
- Sies, H.; Stahl, W. and Sundquist, A.R. (1993). Antioxidant functions of vitamins-Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids. *Ann.New York Acad.Sci.*, **669**: 7-20.
- Turrens, J. (1991). The potential of antioxidant enzymes as pharmacological agents *in vivo*. *Xenobiotica*, **21**: 1033-1040.
- Tyler, D.D. (1975). Polarographic assay and intracellular distribution of superoxide dismutase in rat liver. *Biochem.J.*, **147**: 493-501.
- Van Lente, F. (1993). Free radicals. *Anal.Chem.*, **65 (12)**:374-377.
- Wilhelm Filho, D.; Giulivi, C. and Boveris, A. (1993). Antioxidant defences in marine fish. I - Teleosts. *Comp.Biochem.Physiol.*, **65C**: 409-413.