

ÉLIDA PAULA DINI DE FRANCO

AVALIAÇÃO DO SISTEMA OXIDANTE-ANTIOXIDANTE  
E PERFIL LIPÍDICO DE RATOS SUPLEMENTADOS  
COM HESPERITINA E SEUS DERIVADOS  
GLICOSILADOS

BRAGANÇA PAULISTA  
2014

ÉLIDA PAULA DINI DE FRANCO

AVALIAÇÃO DO SISTEMA OXIDANTE-ANTIOXIDANTE  
E PERFIL LIPÍDICO DE RATOS SUPLEMENTADOS  
COM HESPERITINA E SEUS DERIVADOS  
GLICOSILADOS

ORIENTADORA: PROF.<sup>a</sup> DRA. PATRÍCIA DE OLIVEIRA  
CARVALHO

COORIENTADORA: PROF.<sup>a</sup> DRA. FERNANDA BRUSCHI  
MARINHO PRIVIERO

Dissertação apresentada ao Curso de  
Pós Graduação *Stricto Sensu* em  
Ciências da Saúde da Universidade  
São Francisco como um dos pré-  
requisitos para obtenção do título de  
Mestre em Ciências da Saúde

BRAGANÇA PAULISTA  
2014

QV 325  
F895a

Franco, Élica Paula Dini de.

Avaliação do sistema oxidante-antioxidante e perfil lipídico de ratos suplementados com hesperitina e seus derivados glicosilados / Élica Paula Dini de Franco. -- Bragança Paulista, 2014.

69 p.

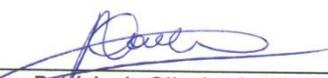
Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.

Orientação de: Patrícia de Oliveira Carvalho.

1. Capacidade antioxidante. 2. Hesperitina. 3. Ratos. 4. Metabolismo lipídico. I. Carvalho, Patrícia de Oliveira. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelas bibliotecárias do Setor de Processamento Técnico da Universidade São Francisco.

**FRANCO P.D.,** Elida, "Avaliação do sistema oxidante-antioxidante e perfil lipídico de ratos suplementados com hesperitina e seus derivados glicosilados". Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em vinte cinco Fevereiro de dois mil e quatorze pela Banca examinadora constituída pelos professores:



---

**Profa. Dra. Patrícia de Oliveira Carvalho**  
Universidade São Francisco



---

**Profa. Dra. Fernanda Bruschi Marinho Priviero**  
Universidade São Francisco



---

**Profa. Dra. Gannabathula Sree Vani**  
Universidade São Francisco

Campus Bragança Paulista  
Campus Campinas - Unidade Cambuí  
Campus Campinas - Unidade Swift  
Campus Itatiba  
Campus São Paulo

Av. São Francisco de Assis, 218 - Jd. São José - CEP 12916-900 / Tel.: 11 2454.8000 / Fax: 4034.1825  
R. Cel. Silva Teles, 700 prédio C - Cambuí - CEP 13024-001 / Tel.: 19 3779.3370  
R. Waldemar César da Silveira, 105 - Swift - CEP 13045-510 / Tel.: 19 3779.3300 / Fax: 3779.3321  
R. Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - Centro - CEP 13251-900 / Tel.: 11 4534.8000 / Fax: 4534.8015  
R. Antonieta Leitão, 129 - Freguesia do Ó - CEP 02925-160 / Tel.: 11 3411.2950 / Fax: 3411.2978

*Dedico este trabalho a Deus, a meus pais, ao Tafarel e todos que sempre acreditaram e torceram por mim.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora que nunca me abandonaram sempre me protegeram e sempre me cobriram de tantas graças.

Aos meus pais por todo apoio e incentivo, mas em especial ao meu pai por tudo que disponibilizou para que este sonho se tornasse realidade.

Ao Tafarel pelo apoio, orações e por sempre acreditar e torcer por mim.

Aos meus familiares que sempre estiveram presentes na minha vida.

Muito obrigada aos meus amigos, pela força e paciência Alessandra, Antônio e Mari que começamos a construir nosso sonho juntos e sei que assim como torço e rezo por você, assim também os fazem. Também preciso agradecê-los pelos momentos alegres e inesquecíveis que me propiciaram.

Aos amigos e colegas conquistados durante este trabalho, Maria Elisa e Yollanda pela paciência de me ensinar o passo a passo de tudo, Márcia pelo respeito, humildade e perseverança. Lúcio pela ajuda, Marta pela força, Jussara pelas risadas e Verônica por toda a ajuda.

Agradeço também a minha orientadora Dra. Patrícia de Oliveira Carvalho, pelo apoio, paciência e carinho que sempre dedicou a mim, bem como a CAPES pela bolsa concedida.

As secretárias, Vilma, Tatine e Rita que sempre estiveram comigo me dando suporte.

Por fim, porém não menos importante agradeço a Universidade São Francisco-USF e em especial a minha coorientadora Prof<sup>a</sup> Dra. Fernanda Bruschi Marinho Priviero e todos os meus professores pela ajuda e pelo apoio.

**Epígrafe**

“Comece fazendo o que é necessário;  
Depois o que é possível e de repente  
você estará fazendo o impossível”

São Francisco de Assis

## **RESUMO:**

Hesperidina é um flavonóide cítrico cuja estrutura química é constituída pela aglicona hesperitina ligada aos açúcares glicose e ramnose. A adição de outra unidade de glicose à molécula de hesperidina resulta em sua forma sintética denominada glicosil hesperidina (G hesperidina). À hesperidina são atribuídas diferentes atividades biológicas, tais como antioxidante, hipolipidêmica, antitumoral, anti-inflamatória, entre outras. Relatos anteriores mostram que a presença de grupos glicosídicos nos flavonóides altera a absorção e a funcionalidade destes compostos. Assim, o objetivo foi avaliar em ratos os efeitos da hesperitina, hesperidina e G-hesperidina nos biomarcadores de estresse oxidativo (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico-TBARS), na defesa antioxidante (enzimas superóxido dismutase-SOD e catalase-CAT) e no perfil de lípidos plasmáticos e de ácidos graxos hepático. Ratos Wistar machos foram divididos em 4 grupos (n=6) e suplementados oralmente por 30 dias com 1mmol / kg de peso corpóreo de hesperitina, hesperidina e G- hesperidina usando salina como controle. Os compostos também foram avaliados quanto à capacidade antioxidante in vitro pelos métodos de DPPH e FRAP. A capacidade antioxidante in vitro da aglicona hesperitina mostrou ser superior a seus derivados glicosilados ( $p < 0,05$ ). Por outro lado, nos animais não foram observadas diferenças significativas nos níveis de TBARS e CAT bem como não houve alteração no perfil de ácidos graxos hepático entre os grupos. A enzima hepática SOD teve seus níveis aumentados nos grupos suplementados com hesperidina e hesperitina comparados ao controle, mostrando um possível efeito protetor destes compostos. Os três grupos suplementados mostraram tendência na redução de triglicérides e LDL- colesterol e redução significativa do índice aterogênico (IA). Os resultados apontam que embora a forma aglicona (hesperitina) mostre maior potencial antioxidante in vitro do que as formas glicosiladas (hesperidina e G-hesperidina), os três compostos mostraram um efeito similar no sistema oxidante-antioxidante em ratos.

**Palavras-chave:** hesperitina, capacidade antioxidante, metabolismo lipídico

## **ABSTRACT:**

Hesperidin is a citric flavonoid with a chemical structure consisting of the aglycone hesperitin linked to the sugars glucose and rhamnose. The addition of another glucose unit to the hesperidin molecule results in a synthetic form known as glycosyl hesperedin (G-hesperedin). Hesperidin has been attributed various biological properties such as antioxidant, antitumor, anti-inflammatory and hypolipidemic activity. Reports have shown that the presence of glycosidic groups in flavonoids alters their absorption properties and functionalities. Thus, this research aimed to assess the effects of hesperitin, hesperidin and G-hesperidin on oxidative stress biomarkers (substances reactive to thiobarbituric acid-TBARS), on antioxidant defense (superoxide dismutase-SOD and catalase-CAT enzymes), and on plasma lipid and hepatic fatty acid profiles in rats. Male Wistar rats were divided into four groups (n=6) and supplemented orally for 30 days with 1 mmol/kg body weight of hesperitin, hesperidin and G-hesperidin using saline as a control. DPPH and FRAP methods were used to assay compounds' antioxidant activity in vitro. Antioxidant activity of aglycone hesperitin in vitro was superior to that of the glycosylated derivatives ( $p < 0.05$ ). However, no significant differences were observed in TBAR and CAT levels and there were no alterations to hepatic fatty acid profiles among the groups. Increased levels of the hepatic enzyme SOD were detected in the hesperidin and hesperitin-supplemented groups compared to the control group, indicating a possible protective effect associated to those compounds.

The three supplemented groups showed a tendency to reduction of triglycerides and LDL-cholesterol and a significant reduction of the atherogenic index (AI). Results indicate that although the aglycone form (hesperitin) shows greater antioxidant potential in vitro than the glycosylated forms (hesperidin and G-hesperidin), the three compounds have similar effects on the oxidant-antioxidant system in rats.

**Key words:** hesperitin, antioxidant activity, lipid metabolism

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS:

Aam	absorbância das amostras
Ac	absorbância do controle
ACAT	acetil-CoA-colesterol aciltransferase
AG	ácidos graxos
AGMI	ácidos graxos monoinsaturados
AGPI	ácidos graxos poli-insaturados
AGS	ácidos graxos saturados
ALT	alanina aminotransferase
AST	aspartato aminotransferase
ANOVA	one way analysis of variance
Apo B	apoproteína B
Apo E	apoproteína E
BF <sub>3</sub>	trifluoreto de boro
BHT	butil hidroxi tolueno
CAT	catalase
CG	cromatografia gasosa
DHA	ácido docosaenóico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DNA	ácido desoxirribonucléico
ER	espécie reativa
ERC	espécie reativa de carbono
ERCI	espécie reativa de cloro
ERN	espécie reativa de nitrogênio
ERO	espécie reativa de oxigênio
ERS	espécie reativa de enxofre
FRAP	potencial antioxidante de redução do ferro
GSH	glutaciona reduzida
GSSG	glutaciona oxidada
GPx	glutaciona peroxidase
GR	glutaciona redutase
HDL	lipoproteína de alta densidade
HMG-CoA redutase	hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA redutase
IA	índice aterogênico
LDH	lactato desidrogenase
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LOOH	hidroperóxido lipídico
LPO	lipoperoxidação
IDL	lipoproteína de moderada densidade
MDA	malondialdeído
MDH	malato desidrogenase

MPT	proteína microsomal de transferência de triglicerídeos
NAD <sup>+</sup>	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo
nm	nanômetro
Nos	óxido nítrico endotelial
PBS	solução salina tamponada
PMF	flavonas polimetoxiladas
SOD	superóxido dismutase
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARS	substância reativa ao ácido tiobarbitúrico
TEP	tetratoxipropano
TAG	triacilglicerol
TPTZ	trifeniltetrazolium
Tris	tris-hidroximetilaminometano
UV	ultravioleta
UV/VIS	espectroscopia ultravioleta visível
VLDL	lipoproteína de muito baixa densidade

## LISTA DE TABELAS:

<b>Tabela 1:</b> Principais agentes de defesa antioxidante (SIES e STAHL, 1995).....	8
<b>Tabela 2:</b> Níveis de asparato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) em ratos controle suplementados com hesperitina, hesperidina e G-hesperidina. Os dados representam a média $\pm$ DP de 12 experimentos .....	44
<b>Tabela 3:</b> Perfil lipídico plásmatico de ratos controle e suplementados com hesperitina , hesperidina e G-hesperidna.....	45
<b>Tabela 4.</b> Composição de ácidos graxos dos lípides totais do fígado de ratos controle e suplementados com hesperitina, hesperidina e G-hesperidina .....	46

## LISTA DE FIGURAS:

<b>Figura 1:</b> Resposta celular às espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (adaptado de VASCONCELOS <i>et al.</i> , 2007).....	4
<b>Figura 2:</b> Representação geral das fases da lipoperoxidação (KRINSKI, 1988). ....	6
<b>Figura 3:</b> Atividade da superóxido dismutase (SOD) citoplasmática (FELIPE, 2011) .....	10
<b>Figura 4:</b> Atividade da superóxido dismutase (SOD) mitocondrial (FELIPE, 2011) .....	10
<b>Figura 5:</b> Atividade da catalase (CAT) (FELIPE, 2011).....	11
<b>Figura 6:</b> Ação antioxidante da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT).....	11
<b>Figura 7:</b> Atividade da glutathione peroxidase GPx (FELIPE, 2011). ....	12
<b>Figura 8:</b> Estrutura básica dos flavonóides (BEHLING <i>et al.</i> , 2004).....	13
<b>Figura 9:</b> Estrutura química dos flavonóides e suas diferentes classes (RAVISHANKAR <i>et al.</i> , 2013). ....	14
<b>Figura 10:</b> Características estruturais dos flavonóides responsáveis pela captação efetiva de radicais livres (GOMES <i>et al.</i> , 2008).....	16
<b>Figura 11:</b> Possíveis locais de ligação de íons metálicos (Mn <sup>+</sup> ) dos flavonóides (GOMES <i>et al.</i> , 2008). ....	17
<b>Figura 12:</b> Estruturas químicas da hesperitina, hesperidina e G- hesperidina. ....	18
<b>Figura 13:</b> Hidrólise enzimática da G-hesperidina e hesperidina (YAMADA, 2006). ....	27
<b>Figura 14:</b> Esquema geral do metabolismo de flavonóides cítricos (adaptado de GARCIA, 2007). ....	28
<b>Figura 15:</b> Curva de calibração com tetraetoxipropano (TEP) para medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.....	33
<b>Figura 16:</b> Forma radicalar (1) e não radicalar (2) do DPPH (ALVES <i>et al.</i> , 2010). ....	37
<b>Figura 17:</b> Medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em fígado de ratos controle e suplementados com hesperitina, hesperidina e G-hesperidina. Os dados representam a média ± DP para 12 experimentos .....	40
<b>Figura 18:</b> Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em fígado de ratos controle e suplementados com hesperitina, hesperidina e G-hesperidina. Os dados representam a média ± DP para 12 experimentos. *p<0,001 quando comparado ao grupo controle      * *p<0,01 quando comparado ao grupo controle.....	41

<b>Figura 19:</b> Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em plasma de ratos controle e suplementados com hesperitina, hesperidina e G-hesperidina. ....	42
<b>Figura 20:</b> Atividade da enzima catalase em fígado de ratos controle e suplementados com hesperitina, hesperidina e G-hesperidina. ....	43
<b>Figura 21:</b> Atividade da enzima catalase plasma de ratos controle e suplementados com hesperitina, hesperidina e G-hesperidina. ....	43

## SUMÁRIO:

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Radicais Livres .....	1
1.2. Estresse Oxidativo .....	2
1.3. Peroxidação dos Ácidos Graxos.....	5
1.4. Antioxidantes .....	7
1.5. Flavonóides e seu poder antioxidante .....	12
1.6.1. Atividade antioxidante da hesperitina e seus derivados glicosilados.....	19
1.6.2. Atividade hipolipidêmica da hesperitina e seus derivados glicosilados .....	21
1.6.3. Biodisponibilidade dos flavonóides e influência da glicosilação.....	24
2. OBJETIVOS .....	29
2.1. Objetivo Geral .....	30
2.2. Objetivos Específicos.....	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	30
3.1. Estudos <i>in vivo</i> .....	31
3.1.1. Animais.....	31
3.1.2. Obtenção do plasma e homogenato hepático.....	32
3.1.3. Medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) .....	32
3.1.4. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) .....	33
3.1.5. Atividade da enzima catalase .....	34
3.1.6. Determinação das enzimas transaminases .....	34
3.1.7. Determinação de lípides plasmáticos e do índice aterogênico (IA).....	35
3.1.8. Extração de lípides hepáticos e composição de ácidos graxos por cromatografia a gás.....	36
3.2. Capacidades antioxidante <i>in vitro</i> .....	37
3.3. Atividade sequestrante do radical livre (DPPH) .....	37

3.3.1.	Avaliação do potencial antioxidante de redução do ferro (FRAP) .....	38
3.4.	Análise estatística .....	38
4.	RESULTADOS .....	39
4.1.	Avaliação do sistema oxidante-antioxidante <i>in vivo</i> .....	40
4.1.1.	Medida de peroxidação lipídica pelo índice TBARS .....	40
4.1.2.	Atividade hepática e plasmática de enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) .....	40
4.1.3.	Atividade das enzimas transaminases .....	44
4.1.4.	Avaliação do perfil lipídico plasmático .....	44
4.1.5.	Perfil de ácidos graxos dos lípidos hepáticos .....	45
4.2.	Atividades antioxidantes <i>in vitro</i> .....	47
5.	DISCUSSÃO .....	48
6.	CONCLUSÃO .....	55
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	56

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Radicais Livres

Os efeitos tóxicos do oxigênio sobre os seres vivos já eram conhecidos no final do século XIX, quando foram descritas alterações no tecido pulmonar após exposição a altas tensões do gás (LORRAIN-SMITH, 1899 citado por LIMA *et al.*, 2002). Estes efeitos tóxicos são resultado da oxidação de componentes celulares como tióis, cofatores enzimáticos, proteínas, nucleotídeos e lípidos, principalmente ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), que podem sofrer ação de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio, conhecidas como radicais livres (MENEHINI, 1987).

As espécies reativas do oxigênio incluem todos os radicais do oxigênio, como o ânionradical superóxido ( $O_2^-$ ), hidroxila ( $OH^\bullet$ ) e peroxila ( $RO_2^\bullet$ ). O ácido hipocloroso (HOCl), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) e ozônio ( $O_3$ ), são espécies não radicalares, mas podem facilmente levar a reações mediadas por radicais livres nos organismos vivos. Nas espécies reativas de nitrogênio estão incluídos, além do peroxinitrito ( $ONOO^\bullet$ ), o óxido nítrico ( $\bullet NO$ ) e o radical dióxido de nitrogênio ( $NO_2^\bullet$ ) (GUTTERIDGE e HALLIWEL, 1994).

Um radical livre é qualquer espécie capaz de existência independente que contenha um ou mais elétrons desemparelhados, ou seja, ocupando um orbital atômico sozinho (GUTTERIDGE e HALLIWEL, 1994). Isso o torna muito instável e com alta capacidade de reatividade inespecífica com diversas moléculas integrantes dos componentes celulares ou derivado de uma delas.

As moléculas de oxigênio são fundamentais para os organismos aeróbicos, pois são utilizados na produção de energia em cadeias transportadoras de elétrons na mitocôndria, além de inúmeras vias metabólicas fundamentais. Porém, ao mesmo tempo o seu consumo é capaz de gerar substâncias tóxicas fazendo com que ocorra o chamado “paradoxo do oxigênio”, devido as suas vantagens e desvantagens (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

O próprio corpo humano tem mecanismo para lidar com este paradoxo os chamados antioxidantes, que podem ser endógenos, produzidos pelo próprio corpo, ou

exógenos que podem ser obtidos através de, por exemplo, a dieta (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

## 1.2. Estresse Oxidativo

Define-se como estresse oxidativo um desequilíbrio entre os radicais livres e o sistema antioxidante, onde o primeiro leva vantagem, gerando danos oxidativos (HALLIWELL e WHITEMAN, 2004), ou seja, quando o organismo não consegue interceptar os radicais livres, por falha do sistema antioxidante, ou excessiva formação de compostos oxidantes.

Esses danos oxidativos ocorrem pela oxidação de biomoléculas, em especial, lípides, proteínas e ácidos nucleicos produzindo efeitos indesejáveis, alterando assim a sua estrutura e função biológica (HICKS *et al.*, 2006).

Quando o estresse oxidativo começa a apresentar cronicidade tem como consequência o desenvolvimento de patologias crônicas não transmissíveis, como diabetes, aterosclerose, câncer entre outros, bem como o envelhecimento precoce (MAYNE, 2003; GREEN *et al.*, 2004; OLIVARES-CORICHI *et al.*, 2006; GALILI *et al.*, 2007; MAIESE *et al.*, 2007).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs), entre outras espécies com capacidade reativas, fazem parte do metabolismo do ser humano, integrando diversas funções fisiológicas, como na fagocitose (eliminação de agente agressor). Porém, quando sua produção excede o normal, o organismo dispõe de mecanismo de defesa, os antioxidantes, que conseguem manter o equilíbrio oxidativo. O estresse oxidativo é o resultado do desequilíbrio entre o sistema pró oxidante e antioxidante conforme mostra o Figura1 (BARREIROS *et al.*, 2006).

O termo EROs coletivamente denota radicais como superóxido ( $O_2^*$ ) e hidroxila (OH) bem como espécies não radicalares derivadas de oxigênio como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990). Detoxificação de EROs nas células é promovido por sistemas enzimáticos e não enzimáticos, que constituem defesa antioxidante. Sistemas enzimáticos incluem enzimas como SOD (superóxido

dismutase), catalase, glutathione peroxidase, entre outras que agem especificamente contra EROs (HALLIWELL, 1995).

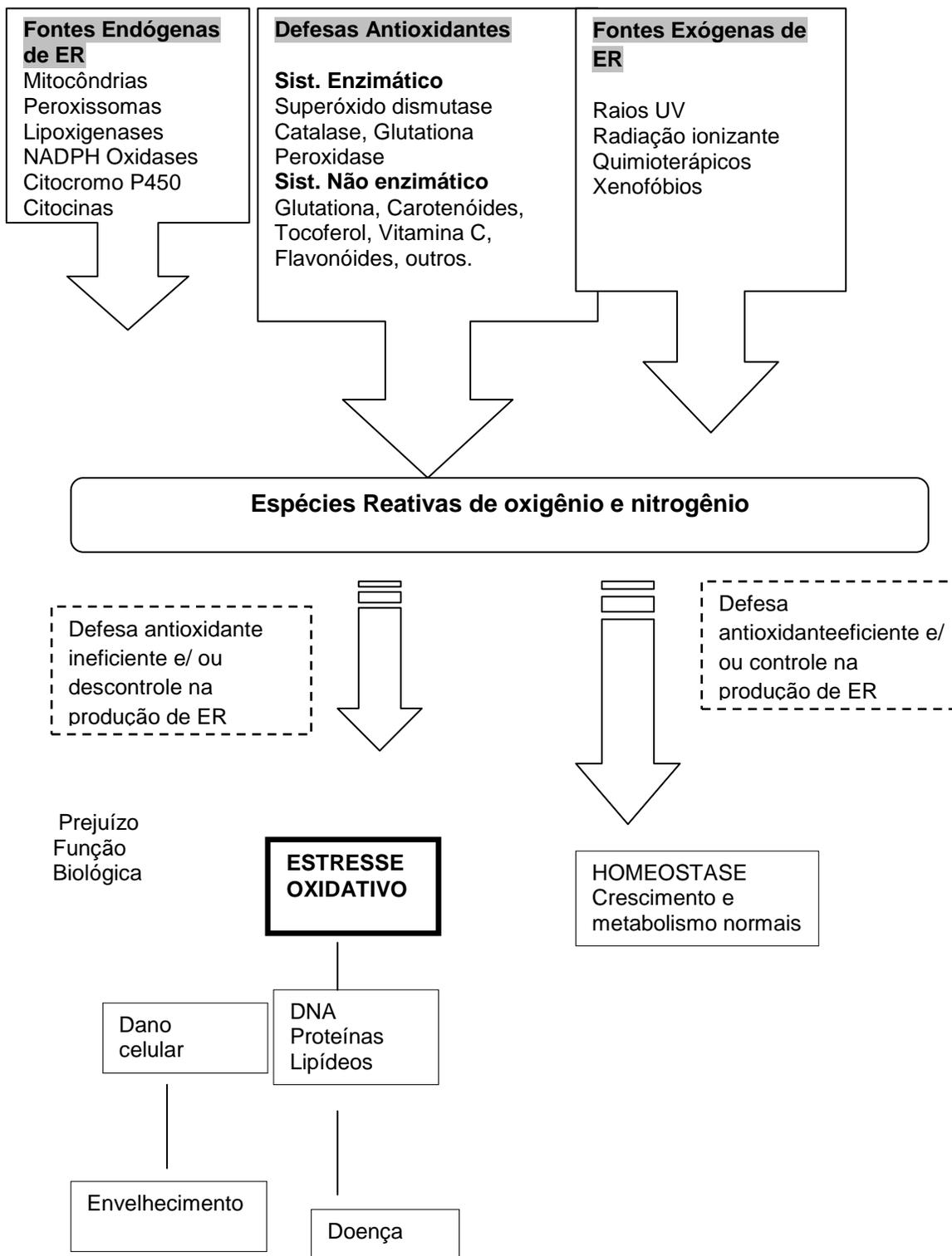


Figura1: Resposta celular às espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (adaptado de VASCONCELOS *et al.*, 2007).

### 1.3. Peroxidação dos Ácidos Graxos

Os mecanismos e a sequência de eventos pelos qual os radicais livres interferem com as funções celulares não são totalmente compreendidos, mas um dos eventos mais importantes parece ser a lipoperoxidação (LPO), o que resulta em dano à membrana celular. Este dano celular causa uma mudança na carga líquida da célula, alterando a pressão osmótica, levando ao inchaço e eventual morte celular. Os radicais livres podem atrair vários mediadores inflamatórios, contribuindo para uma resposta inflamatória geral e dano tecidual. Para proteger-se de espécies reativas de oxigênio, os organismos vivos desenvolveram vários mecanismos eficazes como enzimas antioxidantes (HALLIWELL, 1995).

O dano oxidativo de vários componentes celulares tem sido associado com o desenvolvimento de doenças degenerativas (AMES *et al.*, 1993). Por exemplo, ácidos graxos insaturados (AGI) nas membranas celulares pode ser oxidado na presença de espécies reativas de oxigênio. A oxidação leva à quebra de cadeias de ácidos graxos e compromete a integridade da membrana celular. Além disso, leva a formação do produto final da LPO, o malondialdeído (MDA), sendo este, citotóxico (JI *et al.*, 1998).

Os radicais livres estão relacionados com várias doenças, conforme já descrito. Na maioria das vezes esta relação se dá pela propriedade que os radicais livres têm de reagir com ácidos graxos poli-insaturados, servindo como iniciadores do processo de LPO (MENEHINI, 1987).

A LPO pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultantes da ação dos radicais livres sobre os lípidos das membranas celulares, levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca metabólica e, numa condição extrema à morte celular (BENZIE, 1996). Basicamente, a LPO é a incorporação de um oxigênio molecular em um AGPI para produzir hidroperóxidos como produto primário inicial. Nos sistemas biológicos, a LPO pode ocorrer por duas vias: uma enzimática, envolvendo as ciclo-oxigenases e lipoxigenases, presentes no citossol e na fração microssomal das células que catalisam a inserção do oxigênio nos AGPI, produzindo um hidroperóxido lipídico (LOOH), e a peroxidação não enzimática

(autoxidação) que envolve a participação de espécies reativas de oxigênio, metais e outros radicais livres (AL MEHDI *et al.*, 1993).

Para o início da oxidação dos AGPI, requer-se um oxigênio de forma ativada. O fundamental estado do oxigênio ( $^3\text{O}_2$ ) é um estado triplete com 2 elétrons não pareados de mesmo *spin*, porém em orbitais diferentes. Em um primeiro estágio de excitação, o oxigênio excitado eletronicamente corresponde a um estado singlete ( $^1\text{O}_2$ ), o qual apresenta um par de elétrons na camada externa. Já em um segundo estágio energético, esta molécula ainda apresenta um elétron em cada orbital com *spins* opostos, este estágio apresenta meia vida mais curta que o anterior, o caracterizando assim menos estável (DIMASCIO *et al.*, 2002).

A reação do original triplete com o AGPI é limitado devido à restrição de *spins*, o que não ocorre quando oxigênio está em forma singlete (HSIEH e KINSELLA, 1989).

O processo da LPO pode ser dividido em etapas: iniciação, propagação e terminação, como mostra a Figura 2.

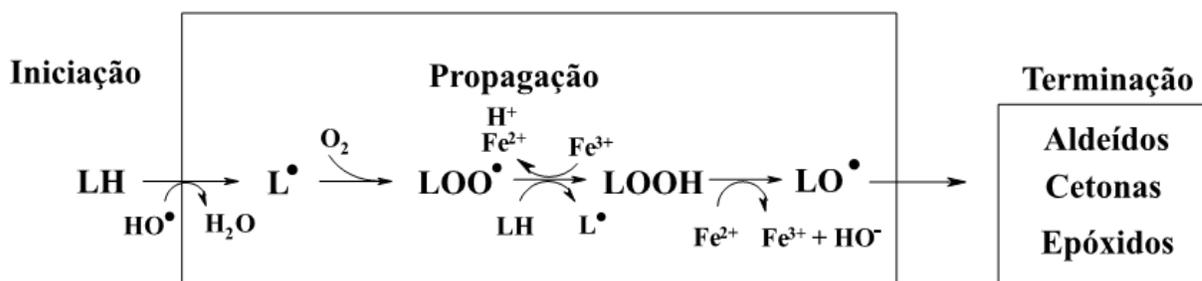


Figura 2: Representação geral das fases da lipoperoxidação (KRINSKI, 1988).

A fase inicial da LPO é a iniciação, que acontece quando o AGPI é atacado por uma espécie reativa o suficiente para abstrair um átomo de hidrogênio a partir do grupo metileno ( $-\text{CH}_2-$ ), formando assim um radical de carbono. Este radical é estabilizado devido a um rearranjo de moléculas que formam um dieno conjugado (duas duplas ligações intercaladas com uma ligação simples) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Em meio à presença de oxigênio, o radical alquila formado, combina-se com o oxigênio formando assim um radical peroxila, o qual pode abstrair um hidrogênio alílico de outro ácido graxo, gerando assim outro radical de carbono, promovendo a etapa de propagação. Quando ocorre a reação do radical peroxila com o átomo de hidrogênio abstraído gera-se um hidroperóxido lipídico (LOOH).

Peróxidos cíclicos podem também ser formados quando ocorre a reação entre o radical peroxila e a dupla ligação na mesma cadeia de ácidos graxos, podendo assim propagar-se (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Alguns íons metais de transição como  $Fe^{n+}$  e  $Cu^{n+}$  podem catalisar a formação de radicais lipídicos alcóxila, peroxila e hidroxila a partir dos hidroperóxidos.

A terceira e última etapa da reação de LPO é a terminação, ela ocorre pela aniquilação dos radicais originando produtos não radicalares (GARDNER, 1989; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Os radicais peroxilas e alcóxilas podem também sofrer dismutação ou clivagem gerando aldeídos, formando uma ligação covalente com resíduos de aminoácidos ou sofrerem rearranjos formando subprodutos da LPO (derivados hidroxi- ceto, ceto- hidroxi e epoxi- hidroxi-ácido graxo). A velocidade da LPO é limitada pelas duas primeiras etapas, ou seja, iniciação e propagação (HSIEH e KINSELLA, 1989).

#### **1.4. Antioxidantes**

Nos dias atuais há um grande interesse em estudos sobre antioxidantes devido às novas descobertas sobre efeito de radicais livres no organismo (VISOLI *et al.*, 2000).

Antioxidantes podem ser definidos como substâncias naturais ou sintéticas que são capazes de inibir ou retardar a oxidação de outras moléculas (HALLIWELL, 1995). Do ponto de vista químico os antioxidantes são compostos aromáticos que contêm no mínimo uma hidroxila.

Durante o processo metabólico há grande e contínua produção de radicais livres, o que leva o organismo ao desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante

para limitar seus níveis intracelulares e impedir assim os danos por eles causados (SIES, 1993). Sendo assim, os antioxidantes são responsáveis pela redução e inibição das lesões causadas pelos radicais livres nas células.

Uma boa e ampla definição de antioxidante é qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz (SIES e STAHL, 1995).

Os antioxidantes são agentes protetores das células contra os efeitos causados pelos ataques de radicais livres e podem ser classificados em antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos conforme mostra a tabela 1.

Tabela 1: Principais agentes de defesa antioxidante (SIES e STAHL, 1995).

<b>Não Enzimáticos</b>	<b>Enzimáticos</b>
$\alpha$ tocoferol (Vitamina C)	Superóxido Dismutase
$\beta$ Caroteno	Catalase
Ácido Ascórbico (Vitamina C)	NADPH- quinona oxidoreta
Flavonóides	Glutathione Peroxidase
Proteínas do Plasma	Enzimas de reparo
Selênio	
L- Cisteína	
Curcumina	

Os antioxidantes atuam em vários níveis para proteção ao organismo;

- Impedindo a formação de radicais livres, principalmente pela inibição das reações em cadeias com ferro e cobre;
- Interceptando radicais livres gerados pelo metabolismo das células ou por fontes exógenas, impedindo assim sua ação sobre as duplas ligações de lípidos e

aminoácidos de proteína, bem como o ataque ao DNA, evitando lesões celulares;

- Os antioxidantes provenientes da dieta como vitaminas A, C e E, flavonóides e carotenóides são importantes para esta ação contra os radicais livres;
- Reparando lesões: Removendo os danos moleculares de DNA e reconstituindo as membranas celulares danificadas;
- Com o aumento de radicais livres, o organismo, em algumas situações, pode gerar uma resposta frente a isso, aumentando assim a síntese de enzimas antioxidantes.

As enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx) são como a primeira linha de defesa do nosso organismo na destruição de radicais livres. A SOD é composta de dois tipos de enzimas que catalisam a destruição do radical anion superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ), sendo este pouco reativo em meio aquoso é formado após a primeira redução de  $O_2$ , este radical tem um papel chave na defesa do organismo, sendo gerada por fagócitos, para eliminar organismos patogênicos (LEITE e SARNI, 2003), esta reação pode ocorrer de forma espontânea na ausência desta enzima, porém torna-se muito lenta. A presença da enzima SOD favorece essa dismutação, tornando a reação de primeira ordem eliminando a necessidade da colisão entre as moléculas. Pela ação desta enzima mesmo em baixas concentrações o  $O_2^{\cdot -}$  é eliminado. A SOD apresenta-se em nosso organismo contendo  $Cu^{2+}$  e  $Zn^{2+}$  (CuZn-SOD) como centros redox e ocorre no citosol, sendo que sua atividade não é afetada pelo estresse oxidativo conforme mostra a Figura 3. A segunda contém  $Mn^{2+}$  (Mn-SOD) como centro redox, ocorre na mitocôndria e sua atividade aumenta com o estresse oxidativo conforme mostra a Figura 4 (BARREIROS *et al.*, 2006).

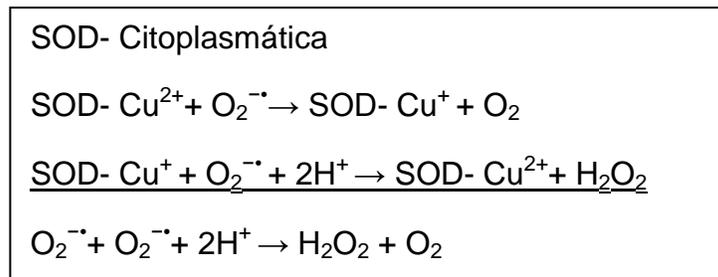


Figura 3: Atividade da superóxido dismutase (SOD) citoplasmática (FELIPE, 2011)

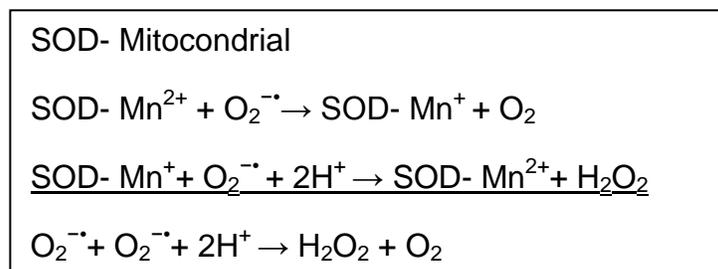


Figura 4: Atividade da superóxido dismutase (SOD) mitocondrial (FELIPE, 2011)

A CAT é uma enzima que está relacionada à dissipação de radicais livres de dentro das células. Seu mecanismo de ação se faz presente sendo um dos muitos sistemas que a célula dispõe para se livrar das espécies radicalares. A CAT está normalmente localizada em uma organela celular de nome peroxissomo (sendo também encontrada nas mitocôndrias do coração de mamíferos). A enzima CAT, age sobre um a reação de conversão de peróxido de hidrogênio em água conforme mostra a Figura 5. Esta enzima é classificada dentro do grupo dos antioxidantes enzimáticos primários. Além disso, a CAT está presente em todos os tecidos dos vertebrados, sendo particularmente importante nos eritrócitos e fígado e apresentando baixa atividade no cérebro (BARREIROS *et al.*, 2006).

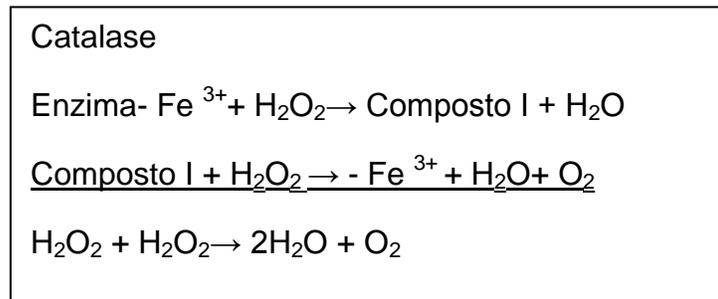


Figura 5: Atividade da catalase (CAT) (FELIPE, 2011).

Apesar de ambas as enzimas acima citadas terem poderes eficientes na contenção de radicais livres elas apresentam uma ação conjunta onde SOD e CAT atuam convertendo o superóxido em água conforme mostra a Figura 6.

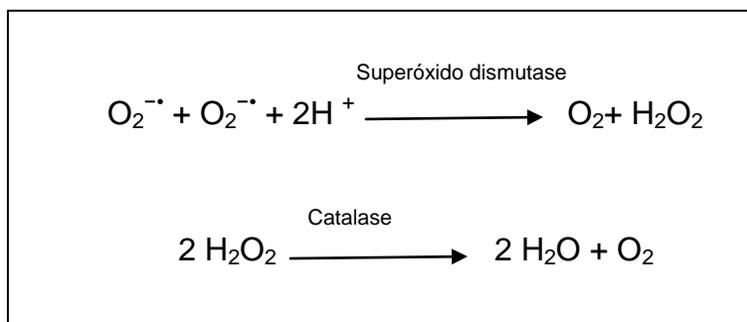


Figura 6: Ação antioxidante da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT).

A GPx é encontrada em muitos tecidos de origem animal, tem em seu sítio ativo, o selênio obtido da dieta (VASCONCELOS *et al.*, 2007). A GPx atua degradando peróxidos através da oxidação de seu substrato GSH (glutathiona reduzida), o que leva a geração de glutathiona oxidada (GSSG). Este sistema é mantido pela ação da glutathiona redutase, que tem como função de restaurar a GSSG à sua forma reduzida, promovendo a manutenção deste ciclo, o cofator utilizado para tal é o NADPH conforme mostra a Figura 7.

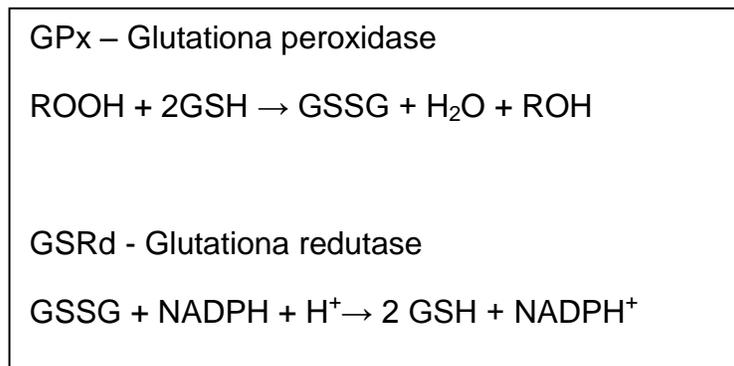


Figura 7: Atividade da glutathiona peroxidase GPx (FELIPE, 2011).

### 1.5. Flavonóides e seu poder antioxidante

Os flavonóides foram descobertos em 1930 por um bioquímico alemão e vencedor do prêmio Nobel de nome Szent- György, que extraiu da casca do limão, a citrina, a este composto veio a descoberta de sua capacidade de permeabilidade capilar. Sendo assim, esta classe de nutriente foi denominada vitamina P (permeabilidade), posteriormente, como este composto apresentou propriedades semelhantes com a da vitamina C foi chamado de vitamina C<sub>2</sub>. Após comprovação que estes compostos não eram vitaminas, estes termos foram abandonados em 1950 (MARTINEZ- FLORES *et al.*, 2002), só a partir disso, descobriu-se que se tratava de um pigmento natural. Mais de 8.000 moléculas já formam descritas pertencentes a esta classe de nutrientes (SOARES *et al.*,2005).

Os compostos fenólicos são uma das maiores classes de metabólitos secundários de plantas. Quimicamente podem ser definidos como substâncias que possuem um anel aromático contendo um ou mais grupos hidroxila. Os compostos fenólicos existentes nos alimentos abrangem os ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides e taninos (DUBICK e OMAYE, 2001).

A estrutura dos flavonóides, como mostra a Figura 8, consiste de um esqueleto de difenil propano (C6-C3-C6) com dois anéis benzênicos (A e B) ligado a um anel pirano (C) (BEHLING *et al.*, 2004).

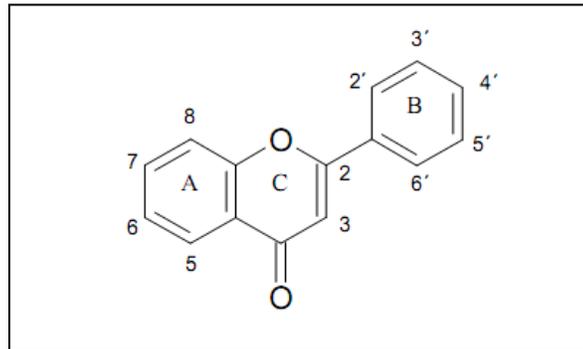


Figura 8: Estrutura básica dos flavonóides (BEHLING *et al.*, 2004).

Os flavonóides constituem o mais importante grupo de compostos fenólicos e podem ser divididos nos seguintes subgrupos: antocianinas (cianidina, delphinidina), flavanas (catequina, epicatequina, luteoforol, procianidina, theaflavina), flavanonas (hesperidina, naringenina), flavonas (apigenina, luteolina, diomestina, tangeritina, nobiletina, tricetina), flavonóis (quercetina, rutina, miricetina) e isoflavonóides (daidzeína, genisteína) (LOPES *et al.*, 2000). Conforme mostra a Figura 9.

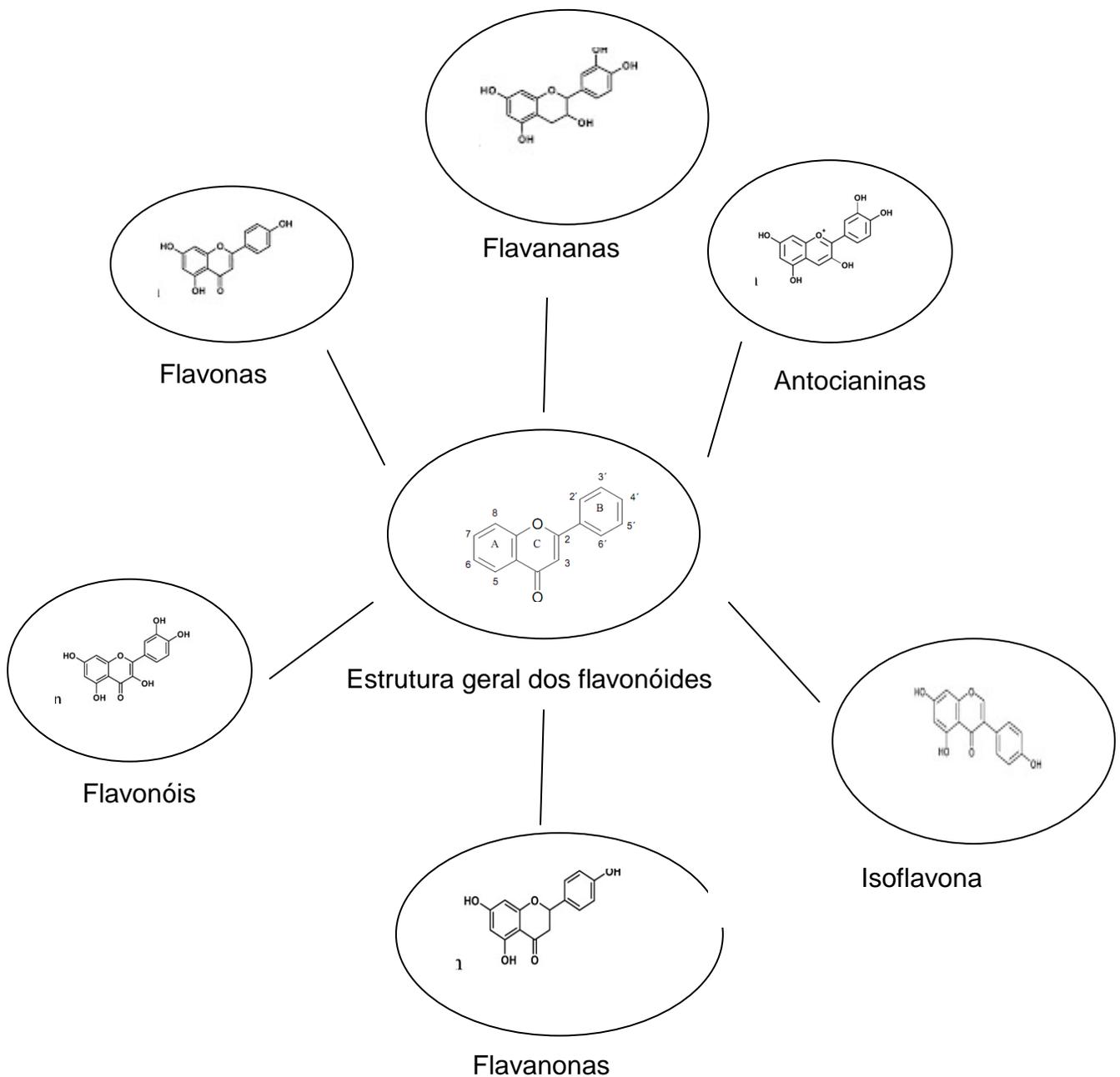


Figura 9: Estrutura química dos flavonóides e suas diferentes classes (RAVISHANKAR *et al.*, 2013).

Três tipos de flavonóides ocorrem com frequência em frutas cítricas: flavanonas, flavonas e flavonóis (BENAVENTE-GARCIA *et al.*, 1997). As flavanonas existem como mono ou diglicosídeos e contribuem para o sabor dos cítricos. São exemplos de flavanonas: a hesperidina, a narirutina, a naringina, e a neohesperidina (SIVAM, 2002).

Peterson *et al.*, (2006) explica que as laranjas contêm as flavanonas agliconas hesperitina e naringina, mas raramente ocorrem como agliconas livres no próprio fruto. As flavanonas glicosídicas dominantes nas laranjas doces (*C. sinensis*) são a hesperidina e a narirutina, enquanto que nas laranjas azedas (*C. aurantium*) as duas flavanonas glicosídicas predominantes são a neohesperidina e naringina. A principal diferença entre as flavanonas glicosídicas de laranjas doces e de laranjas azedas está em suas moléculas de açúcar, que influenciam o gosto. O açúcar rutinose (6-O-A-ramnose-D-glucose) causa nas flavanonas hesperidina e narirutina um sabor neutro e é relativamente elevada em laranjas doces, tangerinas, e tangor. Enquanto que o açúcar neohesperidose (2-O-L-ramnose-D-glucose) é elevado em tangelos e laranjas azedas e transmite um sabor amargo ou picante às flavanonas glicosídicas neohesperidina e naringina (PETERSON *et al.*, 2006).

A ingestão média de flavanonas é de aproximadamente 25 mg/dia em muitos países da Europa, com variações em função dos hábitos alimentares. O consumo de flavonóides pela população do estado de São Paulo foi estimado em cerca de 60 a 106mg/dia, representado por alimentos comuns na dieta típica brasileira. A laranja e o suco de laranja são boas fontes destes flavonóides e contêm cerca de 40mg/100g do alimento, mas perdas consideráveis ocorrem com a remoção da casca, antes do consumo ou no processo industrial (VINUEZA *et al.*,2008).

De modo geral, os flavonóides podem ocorrer em sua forma livre (aglicona) ou conjugada a açúcares (glicosídeos). Nos alimentos estão na forma glicosídica, e após serem ingeridos e chegarem ao intestino grosso à molécula de açúcar (glicose, galactose, ramnose, xilose ou arabinose) é hidrolisadae os flavonóides passam para a forma aglicona. Mais de 80 espécies de açúcares têm sido descritos como ligados aos flavonóides (VINUEZA *et al.*,2008).

A atividade antioxidante dos flavonóides depende da sua estrutura e pode ser determinada por cinco fatores: reatividade como agente doador de H e elétrons, estabilidade do radical flavanol formado, reatividade frente a outros antioxidantes, capacidade de quelar metais de transição e solubilidade e interação com as membranas (BARREIROS *et al.*, 2006). A atividade de sequestro está diretamente

ligada ao potencial de oxidação dos flavonóides e das espécies a serem sequestradas. Quanto menor o potencial de oxidação do flavonóide, maior é sua atividade como sequestrador de radicais livres. Flavonóides com potencial de oxidação menor que o do  $\text{Fe}^{+3}$  e  $\text{Cu}^{+2}$  e seus complexos podem reduzir esses metais, sendo potencialmente pro-oxidantes (RICE-EVANS *et al.*, 1997).

Quanto maior o número de hidroxilas, maior a atividade como agente doador de H e de elétrons (CAO *et al.*, 1997), pois podem doar elétrons e suportar como resultado a deslocalização em torno do sistema aromático. Outra parte estrutural importante estaria no C4 e C3, que segundo Lien *et al.*,( 1999) poderiam atuar no aumento da propriedade antioxidante como mostra a Figura 10.

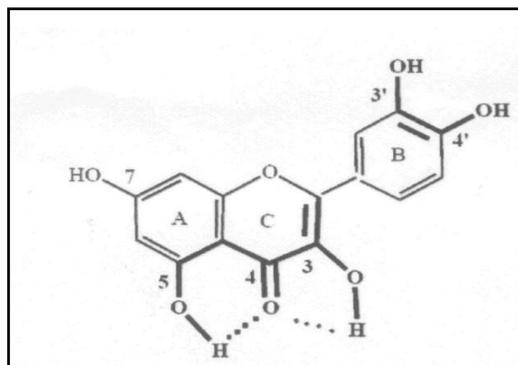


Figura 10: Características estruturais dos flavonóides responsáveis pela captação efetiva de radicais livres (GOMES *et al.*,2008).

Os flavonóides são antioxidantes não enzimáticos, que em geral possuem uma estrutura química ideal para captarem radicais livres ( $\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot\text{NO}$ ), espécies oxidantes não radicalares ( $\text{HOCl}$  e  $\text{ONOO}^-$ ) e quelar metais de transição como ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) e o cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ). A estrutura química do flavonóide influencia na sua atividade antioxidante, conforme já descrito acima (SILVA *et al.*,2012).

Os flavonóides sendo quelantes de metais promovem a reação de oxidação/redução do  $\text{Fe}^{2+}$  e do  $\text{Cu}^{2+}$ . O  $\text{Fe}^{2+}$  e o  $\text{Cu}^{2+}$  participam na reação de Fenton que origina radicais livres. O radical hidroxila ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) é prejudicial para o organismo,

devido a sua semivida curta, dificilmente pode ser sequestrado *in vivo*. A remoção de metais de transição livre no meio biológico é fundamental para a proteção antioxidante do organismo.

Os flavonóides possuem três locais possíveis para a quelação de metais como mostra a Figura 11.

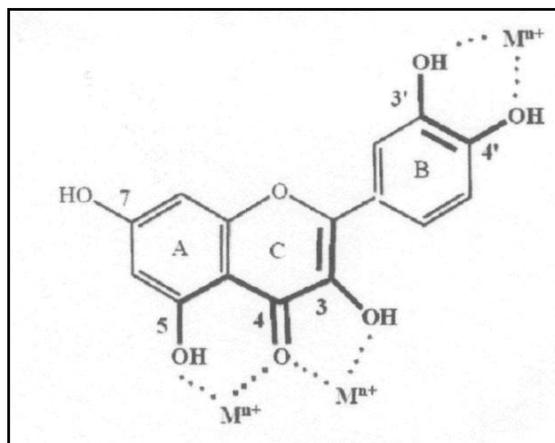


Figura 11: Possíveis locais de ligação de íons metálicos (M<sup>n+</sup>) dos flavonóides (GOMES *et al.*, 2008).

Um número considerável de estudos *in vitro* e *in vivo* foram realizados usando flavonóides para estabelecer uma relação entre a estrutura do composto e sua atividade antioxidante. O elemento estrutural específico dos flavonóides são os principais determinantes da eliminação de radicais livres, quelação e atividade pró-oxidante (RAVISHANKAR *et al.*, 2013).

### 1.6. Hesperitina, hesperidina e G- hesperidina

A hesperidina (C<sub>28</sub>H<sub>34</sub>O<sub>15</sub>, 610.57 g/mol) é um flavonóide glicosilado composto por uma aglicona hesperitina (C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>, 302.27 g/mol) ligada à glicose e ramnose, apresenta-se em estado sólido e possui baixa solubilidade em água (VINUEZA *et al.*, 2008). Em 1991 um grupo japonês sintetizou a forma sintética chamada de glicosil

hesperidina ou G- hesperidina ( $C_{34}H_{44}O_{20}$ , 772.70 g/mol) associando mais uma molécula de glicose na hesperidina. A G-hesperidina é mais hidrofílica que os outros dois compostos, com um valor de  $\log P < -3,2$ , enquanto a hesperidina e hesperitina possuem os valores de 1,78 e 2,9, respectivamente (Majumdar e Srirangam, 2009), sendo considerada 10 mil vezes mais solúvel em água que a hesperidina (YAMADA *et al*, 2006). As estruturas dos compostos estão mostradas na Figura 12.

A hesperidina é quase exclusivamente encontrada em frutas cítricas, sendo que este composto apresenta altas concentrações em cascas e partes membranosas da fruta, como no caso do albedo da laranja. A literatura científica atribui a este flavonóide diversas propriedades como anticarcinogênica, anti-inflamatória, antioxidante, hipolipidêmica, vasoprotetora (EMIN *et al*, 1994). Comparada a hesperidina, poucos autores descrevem os efeitos benéficos da hesperitina e G-hesperidina em animais. O Brasil foi considerado em 2011 o maior produtor de frutas cítricas de todo mundo, produzindo 115 milhões de toneladas seguido da China, com produção de 20,68 milhões de toneladas (PURI *et al*, 2011).

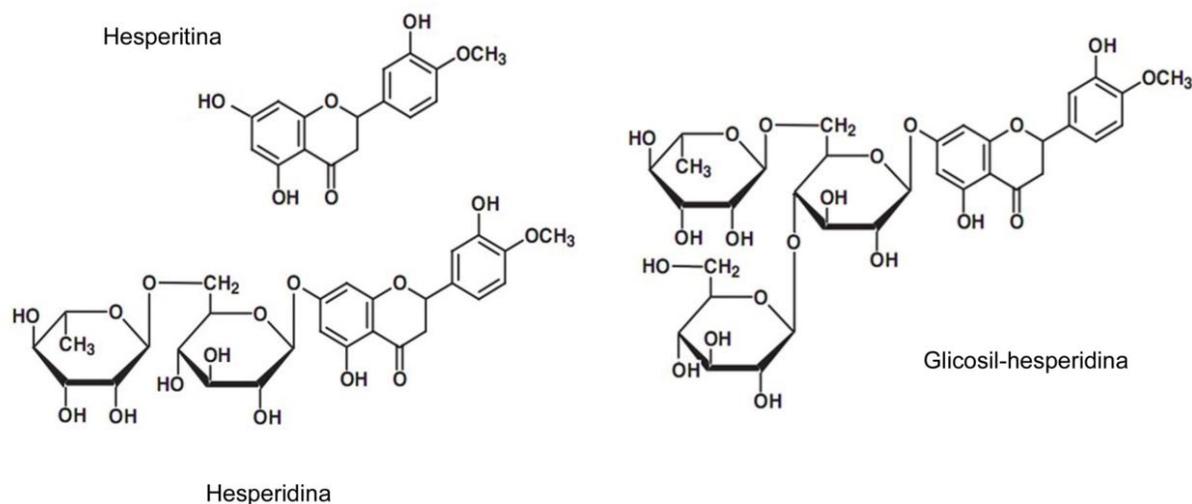


Figura 12: Estruturas químicas da hesperitina, hesperidina e G- hesperidina.

### **1.6.1. Atividade antioxidante da hesperitina e seus derivados glicosilados**

A atividade antioxidante e inibidora da LPO da hesperidina desperta interesse de vários pesquisadores para a prevenção de danos oxidativos (PRADEEP *et al.*, 2008; KALPANA *et al.*, 2009).

Várias análises científicas comprovam a ação antioxidante *in vivo* da hesperitina e seus derivados glicosilados.

No estudo de Kalpana *et al.*, (2009), verificou-se que a hesperidina apresentou alto potencial para sequestrar espécies reativas de oxigênio, como os radicais hidroxil e superóxido, além disso, apresentou efeito sequestrador de óxido nítrico e inibidor de danos induzidos pelos peróxidos de hidrogênio como a peroxidação lipídica em membranas de eritrócitos.

Assim como a hesperidina, sua forma aglicona, hesperitina vem sendo estudada quanto ao seu papel antioxidante, dados reportados do trabalho de Cho (2006), que avaliaram os efeitos antioxidantes e neuroprotetoras da hesperidina e hesperitina utilizando células corticais de ratos, apontaram que a hesperitina é um antioxidante mais ativo e neuroprotetor que a hesperidina, protegendo neurônios contra danos oxidativos.

No estudo de Leelavinothan e Kalist (2011) onde injetaram por via subcutânea em ratos *Wistar* machos uma quantidade de 83 mg/Kg dia de cádmio e posteriormente suplementaram uma quantidade de 840 mg/kg dia de hesperitina por 21 dias, notou-se que no grupo que recebeu cádmio e não foi suplementado com hesperitina os níveis de LPO medidas através de TBARS apresentaram-se muito elevados mas não houve aumento de antioxidantes não enzimáticos neste grupo, em contra partida no grupo que recebeu cádmio e posteriormente hesperitina, mostrou níveis bem menores de LPO medidas pelo mesmo método e um aumento expressivo dos antioxidantes não enzimáticos.

Os metabólitos da hesperetina também têm demonstrado um aumento na capacidade antioxidante, diminuindo o peróxido de hidrogênio e níveis de peróxidolipídico em hamsters hipercolesterolêmicos (KIM *et al.*, 2010). Um trabalho recente mostrou também que os metabolitos da hesperetina têm maior atividade

antioxidante contra vários sistemas oxidativos, incluindo a eliminação de ânion superóxido, reduzindo o poder quelante do metal, sendo estes mais ativos do que a hesperetina ou hesperidina (YANG *et al.*,2012).

No estudo de Yamamoto *et al.*, (2011) ratos *Wistar* machos que apresentavam hipertensão foram suplementados com doses de hesperitina e G- hesperidina por um curto intervalo de tempo (1 dose) por via oral e intraperitoneal , o resultado apresentado foi que tanto a hesperitina quanto a G-hesperidina apresentaram resultados positivos independente da forma de administração, visto que causou uma redução significativa da pressão arterial sistólica. O efeito depressor foi significativamente inibida por um inibidor de sintase de óxido nítrico.

Oliveira *et al.*, (2012) apontou que a suplementação de G-hesperidina, isolada ou em combinação com a natação contínua ou intervalada, melhorou o perfil bioquímico e os biomarcadores antioxidantes no soro sanguíneo dos ratos.

Utilizando cultura de células, Chen *et al.*, (2010) demonstraram que a hesperidina pode diminuir a morte celular induzida por peróxido de hidrogênio na linhagem LO<sub>2</sub> de células hepáticas e também apresentou atividade promotora de antioxidante endógena através da expressão da enzima heme oxigenase-1 (HO-1), que é responsável pelo catabolismo de grupos heme, que são citoprotetores, uma vez que estão relacionados aos produtos gerados neste processo, como o aumento de bilirrubina, ferro livre e monóxido de carbono, sendo o penúltimo indutor do aumento na síntese de ferritina, que pode reduzir as concentrações de ferro livre (FERRIS *et al.*, 1999). Da mesma forma, Peng e Kuo (2003) observaram as atividades antioxidantes de alguns flavonóides (quercetina, miricetina, kaempferol, hesperidina e luteolina) em culturas de células intestinais Caco-2 e verificaram que a exposição a estes flavonóides podem reduzir a peroxidação lipídica induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e Fe<sup>2+</sup>, mesmo após os flavonóides extracelulares serem removidos.

### **1.6.2. Atividade hipolipidêmica da hesperidina e seus derivados glicosilados**

As doenças coronarianas são as patologias que mais matam não só no Brasil como em todo o mundo, seguida por acidentes vasculares cerebrais, ambas tem seu risco aumentado em 70% quando o paciente apresenta níveis altos de colesterol e suas frações (WHO, 2011).

Pesquisas feitas em ratos experimentais demonstram que a hesperidina tem ação hipolipidêmica. O composto hesperidina quando administrado isoladamente em ratos hiperlipidêmicos diminuiu os níveis plasmáticos de colesterol total, lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) e triacilglicerol (TAG) e aumentou os níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL-c) (VINUEZA *et al.*, 2009).

Embora a ação da hesperidina sobre o perfil de lípides ainda não esteja completamente elucidada, uma possível explicação para o efeito hipolipidêmico da hesperidina é por sua atuação no fígado, reduzindo o conteúdo de colesterol hepático, fazendo com que se aumente a captação das lipoproteínas ricas em colesterol e com as lipoproteínas remanescentes ricas em triacilglicerol e as LDL-c, fazendo com que suas concentrações plasmáticas sejam diminuídas (GARCIA *et al.*, 2008). As atividades dos receptores de LDL-c foram aumentadas (WILCOX *et al.*, 2001), fortalecendo a evidencia que a secreção de apo-B é modulada pela expressão dos receptores hepáticos de LDL-c (TWISK *et al.*, 2000).

Estudos em células hepáticas de linhagem hepG2 mostraram que a hesperidina quando administrada em sua forma aglicona foi capaz de reduzir a secreção de apo-B (apoproteína B), pelos hepatócitos, como resultado houve a diminuição na síntese de éster de colesterol, esse fato ocorreu provavelmente pela inibição da ACAT (acetil-CoA-colesterol aciltransferase), uma enzima hepática que tem função de catalisar a formação de éster de colesterol a partir do próprio colesterol (BORRADAIL *et al.*, 1999).

Além da redução da atividade e da expressão da ACAT há diminuição da atividade da proteína microsomal de transferência de triacilgliceróis (MPT). Os autores reportam a formação de uma pequena partícula pré- VLDL-c (lipoproteína de muita baixa densidade) no retículo endoplasmático rugoso hepático, que se uniu a apo-B na membrana e foi enriquecida com triacilglicerol (GARCIA *et al.*, 2008). Segundo

evidência, há a necessidade de uma proteína microsomal de transferência de triacilglicerol para que o VLDL-c flutuante no hepatócito seja formado, e secretado para o sangue. Esta proteína transferiu os triacilglicerol sintetizados que se ligou a apo-B para a formação da VLDL-c nascente, que mais tarde será enriquecida de lípidos e secretada, como VLDL-c flutuante (LARSSONN *et al.*, 2004).

Para que ocorra a formação e liberação das VLDL-c no sangue deve-se ocorrer em primeiro momento o transporte do colesterol para o interior do retículo endoplasmático rugoso do hepatócito, onde este será esterificado pela enzima ACAT e então incorporado a lipoproteína nascente, a taxa de esterificação do colesterol não é limitada pelos níveis de ACAT, mas sim pela disponibilidade de colesterol livre no retículo endoplasmático. O mecanismo de esterificação ocorre pela ação dos transportadores de membrana, glicoproteínas P ou multidrogas resistentes, que normalmente facilitam o transporte celular normal do colesterol pela membrana plasmática do retículo endoplasmático (METHERALL *et al.*, 1996).

O excesso de colesterol livre intracelular pode ser citotóxico, já os ésteres de colesterol podem se acumular em níveis mais altos. Na homeostasia, ao se inibir o transporte intracelular do colesterol haverá estimulação da ACAT para que esta enzima catalise a reação de esterificar o colesterol (METHERALL *et al.*, 1996).

Outro mecanismo da hesperidina na redução da hipercolesterolemia se dá através da inibição da glicoproteína P, que resultaria na redução ou e até mesmo na inibição da ACAT, que assim diminuiria a esterificação do colesterol e como consequência diminuiria a formação e liberação de VLDL-c (GARCIA *et al.*, 2008).

Há evidências que apontam um possível mecanismo de ação desta flavanona na atuação sobre a secreção do fígado do apo-B na forma de VLDL-c. Na circulação sanguínea, os triacilgliceróis desta proteína sofrem hidrólise pela enzima lipase lipoprotéica e os ácidos graxos são liberados para os tecidos e assim metabolizados. Após perder componentes protéicos e lipídicos, as VLDLs são transformadas em IDL-c (lipoproteína de densidade moderada), que sofrem ação das lipases hepáticas sendo transformadas em LDL-c (GARCIA *et al.*, 2008). As LDL-c e IDL-c circulantes são captadas no fígado devido à alta especificidade e afinidade com os receptores LDL-c

que conseguem reconhecer a apo-B da LDL-c, o receptor relacionado à proteína também reconhece a apo- E (apoproteína E) das lipoproteínas remanescentes (ZANNIS *et al.*, 2004). Estes receptores regulam o catabolismo das LDL-c, o que com o passar do tempo possui a capacidade de se tornar cada vez mais densa e mais aterogênica.

Pesquisas apontam que a hesperidina pode atuar reduzindo ou inibindo a atividade da proteína microsomal de transferência de triacilglicerol quando isso ocorre há uma significativa diminuição de VLDL-c nascente e como consequência diminuição dos níveis de LDL-c circulantes (BORRADAILE *et al.*, 1999). Há também um aumento da atividade dos receptores de LDL-c. Os dois mecanismos juntos promovem uma ação hipolipidêmica, pois diminuem a esterificação do colesterol e os níveis plasmáticos de LDL-c (GARCIA *et al.*, 2008).

Em outros estudos, as flavanonas cítricas retiradas da casca da tangerina e uma mistura de flavonóides contendo hesperidina e naringenina foram administradas a ratos hipercolesterolêmicos. Os resultados mostraram que os grupos suplementados com flavonóides tiveram redução dos níveis plasmáticos e hepáticos de colesterol e também de triacilglicerol hepáticos, quando comparados ao grupo que não recebeu suplementação. A atividade das enzimas HMG-CoA redutase e ACAT foram menores para os grupos suplementados e também foi observada uma diminuição na excreção de colesterol fecal (BOK *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 1999).

Ratos que foram alimentados com ração contendo alto teor de colesterol e suplementos com hesperidina e vitamina E, apresentaram redução nas concentrações de colesterol plasmático e no conteúdo de triacilglicerol hepáticos, independentemente do nível de vitamina E presente na dieta (PARK *et al.*, 2001).

No estudo de Kim *et al.*, (2010), foi realizado uma comparação na eficácia hipolipidêmica e antioxidante de hesperetina e seus metabolitos em hamsters hipercolesterolêmicos. Os hamsters alimentados com dieta hiperlipídica (10% de óleo de coco e 0,2 % de colesterol) e suplementado com hesperitina (0,02 %) ou seus metabolitos durante 12 semanas apresentaram redução nos níveis plasmáticos e hepáticos de colesterol total, TAG hepático e apolipoproteína B.

A administração em longo prazo de hesperidina ou G- hesperidina (30 mg/d/kg peso corpóreo durante 25 semanas) em ratos *Wistar* espontaneamente hipertensos, mostrou reduzir a concentração de lípides plasmáticos e aumentar os níveis de HDL-c, conforme relatado por Ohtsuki et al., (2003). Ao mesmo tempo, a administração de G- hesperidina reduziu o diâmetro vascular e inibiu a hipertrofia da vasculatura.

### **1.6.3. Biodisponibilidade dos flavonóides e influência da glicosilação.**

As propriedades biológicas dos flavonóides dependem da sua biodisponibilidade. Uma evidência indireta de sua absorção pelo intestino é o aumento da capacidade antioxidante do plasma após o consumo de alimentos que contém estes compostos. Uma estimativa mais precisa sobre a biodisponibilidade destes compostos tem sido obtida pela determinação das concentrações plasmática e urinária de metabólitos após a ingestão de compostos puros ou de gêneros alimentícios que apresentam fontes do composto de interesse (SCALBERT e WILLIAMSON, 2000).

A principal limitação na biodisponibilidade dos flavonóides glicosilados é relativa à sua capacidade de absorção no lúmen intestinal, em especial devido ao alto peso molecular e a alta polaridade da estrutura destes compostos (SCALBERT e WILLIAMSON, 2000). As formas agliconas (livres de açúcar) podem ser diretamente absorvidas pelo intestino delgado. Entretanto, estes compostos estão presentes em alimentos na forma de ésteres e glicosídeos, ou ainda polímeros que não podem ser absorvidos na forma nativa. A maioria dos flavonóides presentes nos alimentos ocorre principalmente na forma glicosilada de 3-O-glicosídeo e polímeros (HEIM, 2002). Para que ocorra a difusão passiva pela membrana da borda em escova do intestino delgado, é necessária a remoção do açúcar. Por este motivo, o primeiro passo do metabolismo destes compostos é a desglicosilação (glicosidases). Glicosidases ativas podem estar presentes em alimentos ou, algumas vezes, em células da mucosa gastrintestinal, ou podem ainda ser secretadas pela microflora colônica (SCALBERT e WILLIAMSON, 2000).

Polifenóis ligados a ramnose, quando chegam intactos ao cólon, podem ser hidrolisados por ramnosidases oriundas da microflora, o que possibilita a sua absorção. A mesma probabilidade é aplicada a polifenóis ligados à arabinose ou à xilose, mas esta questão ainda não foi estudada em detalhes (HOLLMAN *et al.*, 1999).

A absorção no cólon ocorre mais lentamente e com menor intensidade se comparada ao intestino delgado. As razões, para tanto, podem ser sua pequena área de exposição e a baixa atividade dos transportadores de membrana. Condizente com a informação anterior, os glicosídeos ligados a ramnose são absorvidos mais lentamente e com menor eficácia do que as formas aglicona ou ligadas à glicose. Isso foi demonstrado claramente em humanos, em que os resultados mostraram que a absorção máxima de quercetina 4'-glicosídeo ocorreu entre 30 e 42 min., enquanto a absorção máxima da mesma quantidade de rutina (quercetina-3-rutinosídeo) ocorreu entre 6 e 9 horas após a ingestão. A biodisponibilidade da rutina é em torno de 15-20% da quercetina 4'-glicosídeo (HOLLMAN e KATAN, 1997).

Com resultado semelhante ao do experimento citado acima, a quercetina presente na cebola, que geralmente está presente ligada à glicose, foi absorvida com rapidez e eficácia elevadas, quando comparada com a quercetina presente na maçã, que contém, além de glicose, vários outros açúcares ligados. O mecanismo pelo qual a glicosilação facilita a absorção da quercetina e de outros compostos pertencentes à mesma classe foi apenas parcialmente elucidado, mas parece estar relacionado com transportadores de hexoses, especialmente com o SGLT-1 (co-transportador de glicose sódio-dependente). Esse transportador encarrega-se de levar a forma glicosilada da quercetina para o interior do enterócito, no qual esta sofreria a ação de glicosidases citosólicas (GRAEFE *et al.*, 2001).

Outro caminho de absorção de polifenóis foi sugerido, este envolve duas enzimas presentes na membrana da borda em escova do intestino delgado, a floridizina hidrolase e a lactase, que são glicosidases encarregadas de catalisar a hidrólise extracelular de alguns glicosídeos. Após a hidrólise, ocorre a difusão passiva da forma aglicona pela membrana da borda em escova (DAY *et al.*, 2003).

Após sua absorção, os flavonóides são conjugados no intestino delgado e no fígado pela glicuronidação, sulfatação ou metilação ou metabolizados a pequenos compostos fenólicos (YANG, 2001; HEIM, 2002). Ao sofrerem essas modificações, os flavonóides podem tornar-se metabólitos mais ativos ou serem eliminados do organismo mais facilmente por se tornarem mais polares; dessa forma, muitos desses produtos metabólicos podem ser detectados na urina e fezes humanas (WALLE *et al.*, 2003).

O metabolismo bacteriano de flavonoides no cólon tem sido bem reportado em estudos com animais e pode ser um passo limitante na biodisponibilidade de muitos flavonóides em humanos e animais. Bactérias da microflora do cólon são responsáveis pela hidrólise de flavonóides glicosilados e conjugados, gerando compostos fenólicos menores (WALLE *et al.*, 2003). A hidrólise da G-hesperidina e hesperidina resultando a aglicona livre hesperitina estão mostradas na Figura 13.

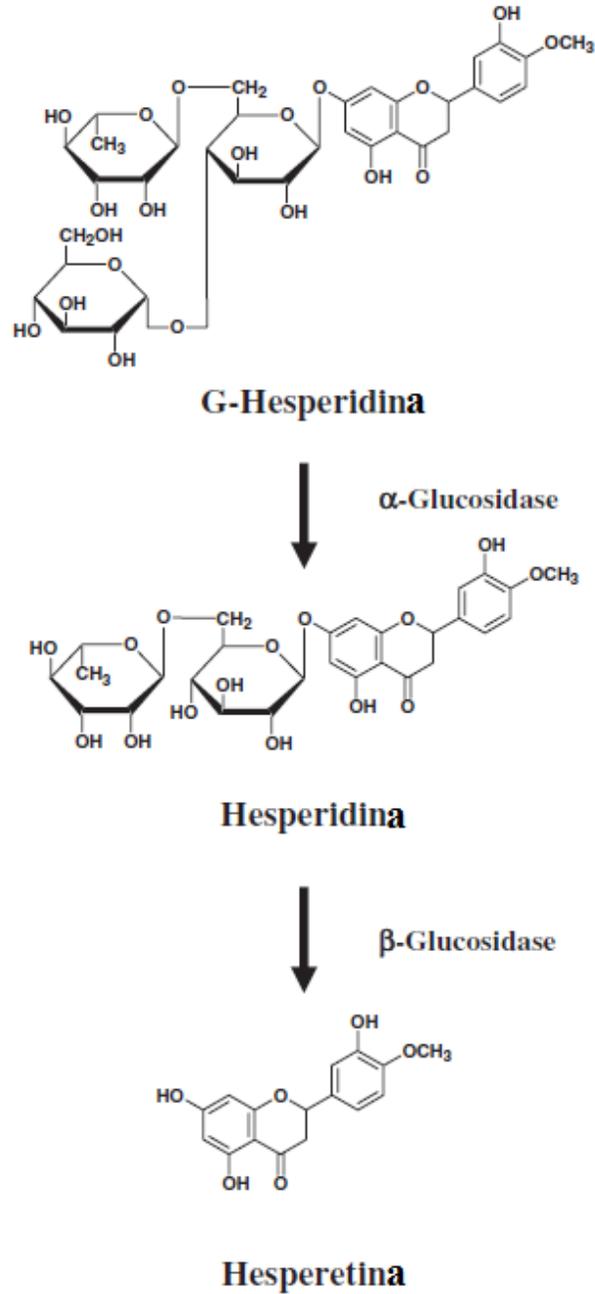


Figura 13. Hidrólise enzimática da G-hesperidina e hesperidina (YAMADA, 2006).

Os flavonóides das frutas cítricas são absorvidos no trato gastrointestinal (KRIS-ETHERTON *et al.*, 1984). O metabolismo destes compostos está ilustrado na Figura 14.

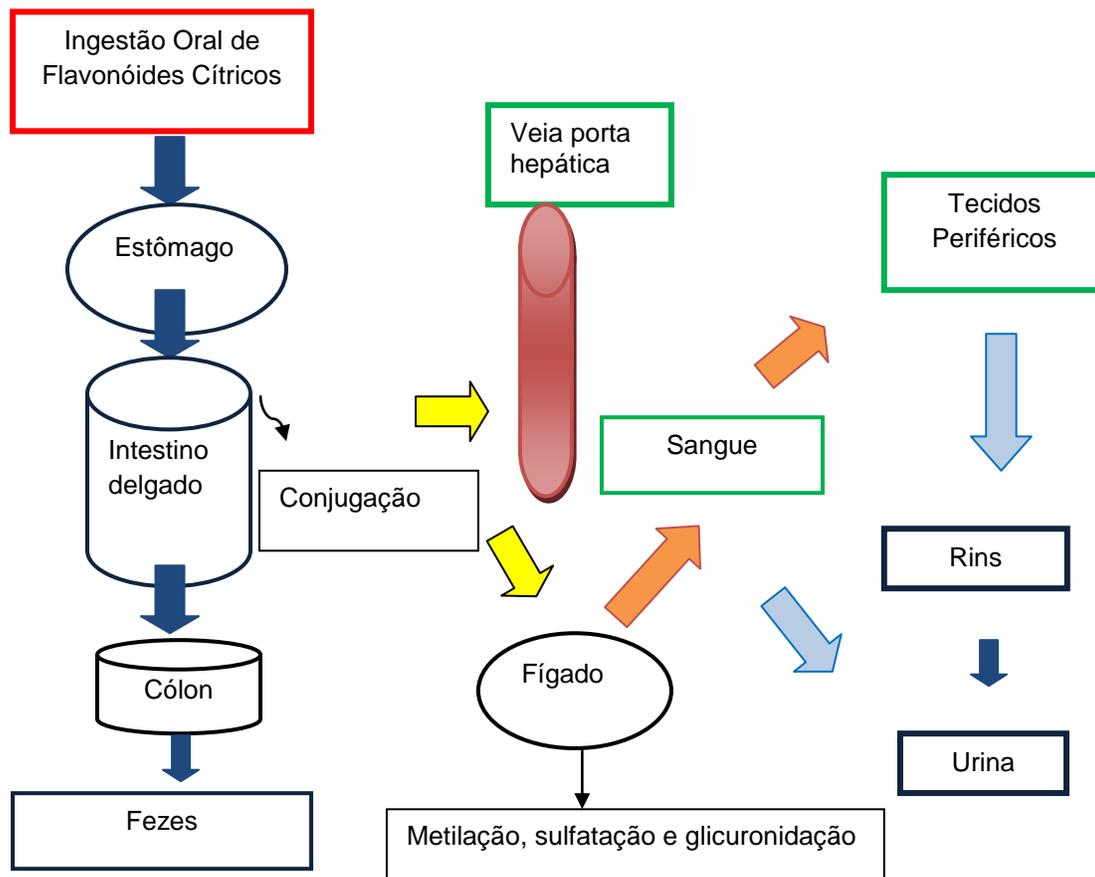


Figura 14: Esquema geral do metabolismo de flavonóides cítricos (adaptado de GARCIA, 2007).

As flavanonas são hidrolisadas pela microflora intestinal e absorvidas no cólon na forma aglicona, como hesperitina quando então podem se difundir passivamente aos enterócitos (ERLUND, 2001; MANACH *et al.*, 2003). Na parede intestinal, os flavonóides podem sofrer reações de conjugação, tais como glicuronidação e metilação (MANACH *et al.*, 1998; SPENCER *et al.*, 1999). No plasma, são encontrados metabólitos recombinados de flavanonas como glicuronóides e sulfatados (MANACH *et al.*, 2003).

Os flavonóides conjugados são levados pelo sistema porta dos enterócitos ao fígado, onde sofrerão outras reações, como metilação, sulfatação e glicuronidação, formando uma variedade de formas conjugadas (SCALBERT *et al.*, 2002). Os

flavonóides conjugados podem ser excretados pela bile ou levados aos tecidos periféricos pelo sangue onde empenham suas atividades funcionais (VINUEZA *et al.*,2008).

## **2. OBJETIVOS**

## **2.1. Objetivo Geral**

Avaliar os efeitos da hesperitina, hesperidina e G-hesperidina nos biomarcadores de estresse oxidativo (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico-TBARS), na defesa antioxidante (enzimas superóxido dismutase-SOD e catalase-CAT) e nos níveis de lípidos plasmáticos e ácidos graxos hepáticos em ratos e correlacionar com o potencial antioxidante *in vitro* destes compostos.

## **2.2. Objetivos Específicos**

1. Avaliar em ratos controle e suplementados com hesperitina e seus derivados glicosilados os seguintes parâmetros:

- Oxidação lipídica hepática por quantificação de malondialdeído (MDA) através da determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS);
- Atividade hepática e plasmática das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT);
- Toxicidade aguda através da determinação das transaminases (AST e ALT) em plasma;
- Níveis de lípidos (colesterol total, LDL-c, HDL-c e triacilglicerol) plasmáticos e índice aterogênico
- Composição de ácidos graxos dos lípidos hepáticos.

2. Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* da hesperitina e seus derivados glicosilados através dos métodos de DPPH e FRAP.

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1. Estudos *in vivo***

#### **3.1.1. Animais**

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais em Pesquisa- CEUA, sob nº: 001.10.12, obedecendo ao previsto na Resolução CONSEPE 27/2008. Foram utilizados ratos *Wistar*, machos, com peso variando entre 180 e 200 g provenientes do CEMIB (Centro de Bioterismo da UNICAMP). Todos os animais ficaram alojados no Biotério da Universidade São Francisco e passaram por um período de adaptação às condições ambientais durante uma semana. Os animais foram mantidos em ciclos claro/escuro de 12 horas, temperatura 22°C ±3 e de umidade 55 UR ± 3, com livre acesso a água e ração comercial padrão (Labina, Purina).

As soluções padrões aquosas de hesperitina (Sigma), hesperidina (Sigma) e G-hesperidina (Hyashibara, Japan) foram administradas nas doses de 1mmol/Kg de peso do animal via gavagem por 30 dias. O Grupo 1 foi tratado com 0,31g de hesperitina/Kg de peso, o Grupo 2 foi tratado com 0,61g de hesperidina/Kg de peso e o Grupo 3 com 0,77g de G-hesperidina/Kg de peso. Os animais foram divididos em quatro grupos (6 animais cada), sendo um controle e os demais suplementados com 2mL de solução salina usada como veículo para as administrações dos compostos. Os animais foram pesados em dias alternados para o ajuste da concentração de cada composto.

Após o tratamento os animais foram anestesiados por via intramuscular com xilazina/quetamina e o sangue da aorta abdominal coletado em tubos contendo heparina. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e amostras de fígado e plasma armazenadas a temperatura de -80°C para as análises descritas a seguir.

### **3.1.2. Obtenção do plasma e homogenato hepático**

As amostras de sangue coletadas em tubo com heparina foram centrifugadas por 10 minutos a 4 °C e a camada superior retirada e o plasma armazenado para a determinação da atividade das enzimas antioxidantes e as análises bioquímicas.

Para a preparação dos homogenatos, fragmentos de fígado (1g) foram pesados e adicionados a mesma proporção de solução salina tamponada PBS com pH de 7,0. A mistura foi triturada, homogeneizada e centrifugada por 45 minutos, o sobrenadante foi dividido em três frações para a determinação da atividade das enzimas antioxidantes, das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e da composição de ácidos graxos dos lípides totais do fígado.

### **3.1.3. Medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

Uma das técnicas de maior relevância para quantificar os danos de oxidação em lípidos consiste em medi-los com as substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (*thiobarbituric acid- TBA*). O malondialdeído, considerado um dos principais metabólitos secundários da LPO, é capaz de reagir com duas moléculas de TBA, formando assim um complexo de coloração vermelho que é lido em comprimento de onda específico (532-535 nm).

Para avaliar a LPO foi utilizada a medida de TBARS de acordo com o método desenvolvido por Ohkawa *et al.*, (1979). A alíquota de 250µL de amostra (homogeneizados de fígado) foi misturada com 25µL BHT 4% em metanol, 1mL de ácido tricloroacético a 12%, 1mL de ácido tiobarbitúrico 0,73% e 750µL 0,1 mol/L tampão Tris-HCl contendo 0,1mmol/L EDTA pH 7,4. Após 60 minutos de incubação em banho- maria fervente, as amostras foram resfriadas em banho de gelo e diluídas em 1,5 mL de n-butanol. As amostras foram homogeneizada por 30 segundos em vórtex e centrifugada a 3.000 rpm por 10 minutos. As absorvâncias das amostras foram lidas em espectrofotômetro Jenway 6105 UV/VIS a 532nm. A concentração tecidual de malondialdeído foi expressa em nmol/g de tecido e a quantificação foi realizada utilizando uma curva de calibração com tetraetoxipropano (TEP) conforme a Figura 15.

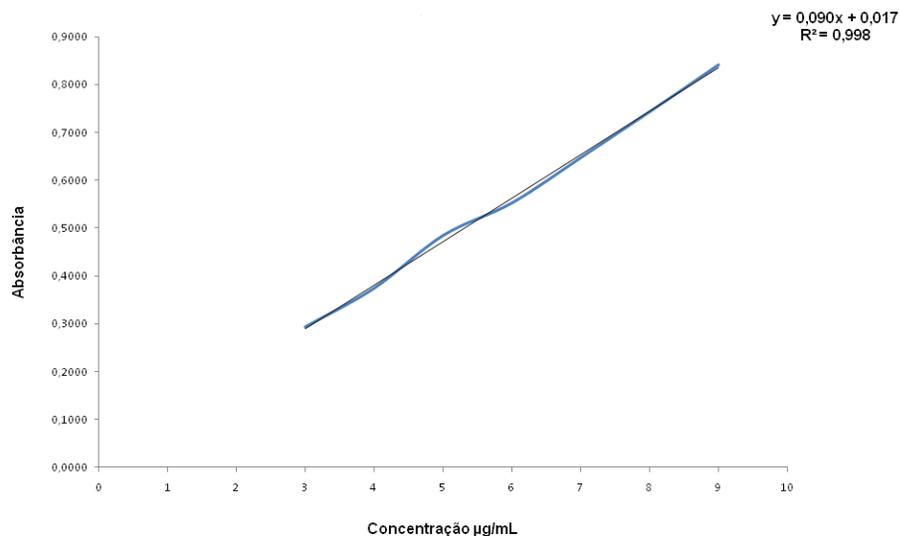


Figura15: Curva de calibração com tetraetoxipropano (TEP) para medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

### 3.1.4. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

Para avaliar a atividade superóxido dismutase (SOD) no plasma e fígado foi utilizado um kit SD-125 da Randox Laboratoris Ltda ®, seguindo o protocolo do fabricante. Resumidamente, foram adicionados 2,5 mL de tampão fosfato a 500 µl do homogenato de tecido (fígado) ou plasma, agitado no vórtex, retirado uma alíquota de 50 µl e transferido para outro tubo. Foi adicionado então, 0,6 mL do substrato (proveniente do kit), agitado novamente no vórtex e acrescentou-se a esta mistura 1 mL de H<sub>2</sub>O destilada, 250 µl de xantina oxidase, e novamente agitado em vórtex. A absorbância foi lida em espectrofotômetro Jenway 6105 UV/VIS no comprimento de onda de 505 nm, após 30 segundos da adição da xantina. Após a leitura os tubos foram colocados em banho-maria a 37°C por 3 minutos e uma nova leitura da absorbância em

505 nm foi realizada. O resultado foi expresso como U/mL de proteína total presente no homogenato e plasma.

### 3.1.5. Atividade da enzima catalase

A atividade da catalase foi determinada pela velocidade de consumo de peróxido de hidrogênio, este procedimento determina a velocidade de decomposição de  $H_2O_2$  em água e oxigênio catalisado por esta enzima (BEUTLER, 1984). Para avaliação da atividade da catalase no plasma e fígado foi utilizado o kit CAT 100 da empresa Sigma Aldrich ®, seguindo o método descrito por Beutler (1975). O homogenato de fígado (diluição 1:40) e plasma (diluição 1:250) no volume final de 1 mL, foram colocados em cubetas de quartzo. A seguir, foi adicionada a solução de reação, composta de  $H_2O_2$  10mM (10  $\mu$ L de peridol 30% em 10 mL de água destilada) e tampão Tris-HCl 1M EDTA 5mM em pH 8,0. As cubetas permaneceram na temperatura de 37°C por 15 minutos. O resultado foi expresso como U/mL de proteína total presente no homogenato e plasma. A quantificação de proteína foi determinada pelo método de biureto, utilizando o Kit de proteína total da Bioclin ®, e a albumina de soro bovino como padrão.

### 3.1.6. Determinação das enzimas transaminases

As transaminases são enzimas catalisadoras de transferência de um grupo alfa-amino de um aminoácido por um alfa-cetoácido com a formação de novos amino e alfa-cetoácidos. O fígado produz mais de 60 transaminases, sendo apenas duas de maior relevância clínica, a alanina aminotransferase (ALT) e a asparato aminotransferase (AST). A cinética para determinação da atividade de AST é baseada na conversão da L- alanina em oxalacetato catalisada pela glutamato **oxaloacetato** transaminase (GOT). O oxalacetato formado reage com o NADH e o íon hidrônio produzindo o L- malato e  $NAD^+$ , catalisada pelo malato desidrogenase (MDH) segundo as reações abaixo.

GOT

34

L- alanina+ alfacetogluturato  $\leftarrow \rightarrow$ oxalacetato + L- glutamina

MDH

Oxalacetato+ NADH + H<sup>+</sup>  $\leftarrow \rightarrow$  L- malato + NAD<sup>+</sup>

---

A cinética da atividade da ALT foi determinada baseando-se na conversão da L- alanina em piruvato e L- glutarato. O composto formado, em questão, o piruvato reage com o NADH e o íon hidrônio, produzindo assim L- lactato e NAD<sup>+</sup> em uma reação catalisada pelo lactato desidrogenase segundo a equação.

LDH

Piruvato + NADH +H<sup>+</sup>  $\leftarrow \rightarrow$ L- lactato + NAD<sup>+</sup>

A determinação da atividade da AST e ALT foi realizada utilizando o kit enzimático colorimétrico K 034 e K035 da empresa Bioclin®. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 340 nm em espectrofotômetro Jenway 6105 UV/VIS.

### 3.1.7. Determinação de lípides plasmáticos e do índice aterogênico (IA)

Os níveis séricos de colesterol total, triacilglicerol, lipoproteína de alta densidade (HDL-c) foram determinados no plasma dos animais utilizando respectivamente kits colorimétricos comerciais K083, K071 e K117 da Labtest ®.

A estimativa de LDL-c foi obtida a partir dos resultados das dosagens de colesterol total, TAG e HDL-c, pela fórmula de FRIEDEWALD *et al.*, (1972).

Colesterol LDL (mg/ dL) = Colesterol Total – HDL-c – TAG

5

Os índices calculados a partir de medidas laboratoriais e a determinação de marcadores plasmáticos são frequentemente utilizados para a avaliação do risco cardiovascular. Para cálculo do índice aterogênico utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{IA (mg/dL)} = \frac{\text{TAG}}{\text{HDL-c}}$$

### **3.1.8. Extração de lípides hepáticos e composição de ácidos graxos por cromatografia a gás**

A extração total dos lípides do homogenato hepático foi realizada através do tratamento das amostras com clorofórmio: metanol (2:1, v/v) em temperatura ambiente. A cada 1 mL de homogenato foi adicionado 5 mL de metanol, levados a vórtex por 2 minutos, e adicionado mais 10 mL de clorofórmio e novamente levado ao vórtex por mais 2 minutos. As amostras foram agitadas por 1 hora e após decantação, a camada inferior foi filtrada em papel anidro conforme metodologia descrita por Folch *et al.*, (1957), esse procedimento foi repetido por 3 vezes e os extratos unificados e secos em nitrogênio.

O perfil de ácidos graxos foi determinado por cromatografia a gás (CG). O procedimento adotado neste estudo foi uma adaptação do trabalho descrito por AOCS em 1993. Em um tubo de ensaio contendo os lípides da amostra conforme descrito no item 5.1.2, foram adicionados 2 mL de solução 0,5N de NaOH em metanol. O tubo, fechado, foi levado a banho-maria em água fervente, em um período aproximado de 5 minutos e após resfriado em água corrente foi adicionado à mistura 2,5 mL de reagente esterificante BF<sub>3</sub> metanol e levado novamente ao banho fervente pelo mesmo tempo anterior e resfriado em água corrente. Foram adicionados 2mL de solução saturada de NaOH e após agitação por 30 segundos acrescentou-se 2,5 mL de hexano para extração dos ésteres metílicos de ácidos graxos.

Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram injetados no cromatógrafo a gás CHROMPACK® (model CP 9001) com o detector de ionização e coluna capilar CP-Sil 88 (Chrompak, WCOT Fused Silica 59 m x 0.25 mm). O detector de temperatura foi de 280 °C e o injetor 250 °C. A temperatura inicial foi de 180 °C por 2 min., programado para aumentar 10 °C por minuto até 210 °C por 30 minutos. O gás carregador usado foi

o hidrogênio com fluxo de 2,0 mL/ minuto na coluna. A identificação dos ácidos graxos foi realizada por comparação do tempo de retenção dos componentes das amostras com padrões autênticos de ésteres de ácidos graxos (Padrão Sigma) injetados sob as mesmas condições. A composição de cada ácido graxo foi expressa sobre o percentual de ácidos graxos totais.

### 3.2. Capacidades antioxidante *in vitro*

### 3.3. Atividade sequestrante do radical livre (DPPH)

Segundo Faria *et al.*, (2005), o método é baseado na capacidade dos antioxidantes presentes nas amostras em sequestrar o radical estável DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila). Este método é baseado no descoloramento de uma solução que contém radicais estáveis de cor violeta, que quando reduzida passa a apresentar uma cor amarelada conforme mostra Figura 16. Isso se dá, pois quando uma substância que age como doador de átomos de hidrogênio é adicionado a uma solução de DPPH, a hidrazina é obtida com mudança simultânea na coloração de violeta a amarelo pálido (ALVES, *et al.*, 2010). Quando adicionada ao meio uma substância antioxidante, capaz de ceder elétrons, neutralizando assim os radicais livres, ocorre o decréscimo de absorbância de 517 nm (SILVA *et al.*, 2012).

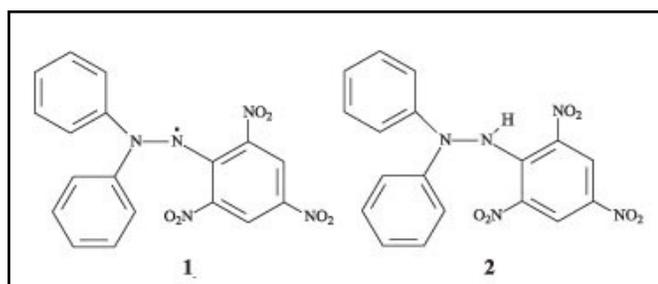


Figura 16: Forma radicalar (1) e não radicalar (2) do DPPH (ALVES *et al.*, 2010).

As determinações foram realizadas adicionando-se em cada eppendorf 250 µL da solução metanólica de DPPH (20 mg/mL) e 40 µL de metanol (para o controle), ou o mesmo volume do extrato a ser analisado ( hesperidina, hesperitina e G- hesperidina) preparadas na concentração de 75µM. Todas as análises foram realizadas em triplicata e as leituras realizadas em espectrofotômetro Jenway 6105 UV/VIS no comprimento de onda a 517 nm, após 25 minutos de incubação a 25°C. O decaimento da absorbância das amostras (Aam) correlacionado ao decaimento da absorbância do controle (Ac), resulta na porcentagem de sequestro de radicais livres (% SRL), expressa através da equação:

$$\% \text{ SRL} = (Ac - Aam) / Ac \times 100$$

### **3.3.1. Avaliação do potencial antioxidante de redução do ferro (FRAP)**

Segundo Rufino *et al.* (2006) o método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) baseia-se na redução, a baixo valor de pH, do complexo Fe<sup>+3</sup>-tripiridiltriazina ao complexo Fe<sup>+2</sup>-tripiridiltriazina de coloração azul, na presença do reagente 2,3,5-cloreto trifeniltetrazolium (TPTZ). A mudança de cor é monitorada pela leitura da absorbância a 595 nm. Diferentes diluições dos compostos (5:5, 1:9 e 9:1 em água destilada) foram preparadas em tubos de ensaio cor âmbar. Em ambiente escuro, foram adicionados 90 µL de cada composto a outro tubo de ensaio contendo 270 µL de água destilada. Resumidamente, a essa mistura, foram acrescentados 2,7 mL do reagente FRAP em tampão acetato 0,3 M pH 3,6, previamente preparado com o composto TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) 10 mM e solução aquosa de cloreto férrico 20 mM. Em seguida, os tubos foram homogeneizados e mantidos em banho- maria a 37°C durante 30 minutos e a leitura realizada em espectrofotômetro ultravioleta visível (UV/VIS) a 595 nm. O resultado foi expresso em µM sulfato ferroso / g de amostra.

### **3.4. Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média acompanhada do seu respectivo desvio padrão (DP). Os experimentos *in vitro* foram realizados em triplicata. Foram realizadas análises de variância (*one- way analysis of variance*, ANOVA), seguidas do teste de Tukey, utilizando o software Origin versão 8.6 para comparação entre as médias, considerando o nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ).

#### **4. RESULTADOS**

## 4.1. Avaliação do sistema oxidante-antioxidante *in vivo*

### 4.1.1. Medida de peroxidação lipídica pelo índice TBARS

O teste para a avaliação de LPO *in vivo* foi realizado em homogenato hepático de ratos suplementados com hesperitina, hesperidina e G- hesperidina.

Os dados mostram que não houve aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na concentração de TBARS em nenhum grupo tratado seja com hesperitina, hesperidina e G- hesperidina quando comparados ao grupo controle (Figura 17).

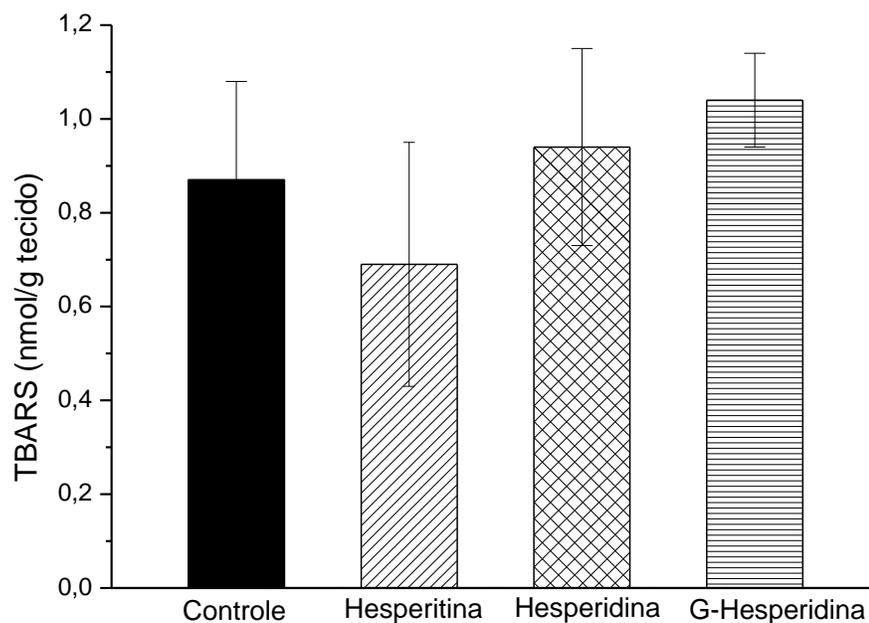


Figura 17: Medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em fígado de ratos controle e suplementados com hesperitina, hesperidina e G-hesperidina. Os dados representam a média  $\pm$  DP para 12 experimentos

### 4.1.2. Atividade hepática e plasmática de enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT)

A atividade enzimática da SOD e CAT foi determinada no fígado e plasma dos animais controle e suplementados com hesperitina, hesperidina e G- hesperidina.

Foi observado que a atividade da SOD hepática estava aumentada nos grupos suplementados com hesperitina ( $p < 0,001$ ) e hesperidina ( $p < 0,01$ ) quando comparada ao grupo controle (Figura 18), porém não houve diferença significativa no grupo tratado com G- hesperidina. Por outro lado, a suplementação com hesperitina e seus derivados glicosilados (hesperidina e G-hesperidina) não foi capaz de promover alterações significativas nas atividades plasmática desta enzima como podemos observar na Figura 19.

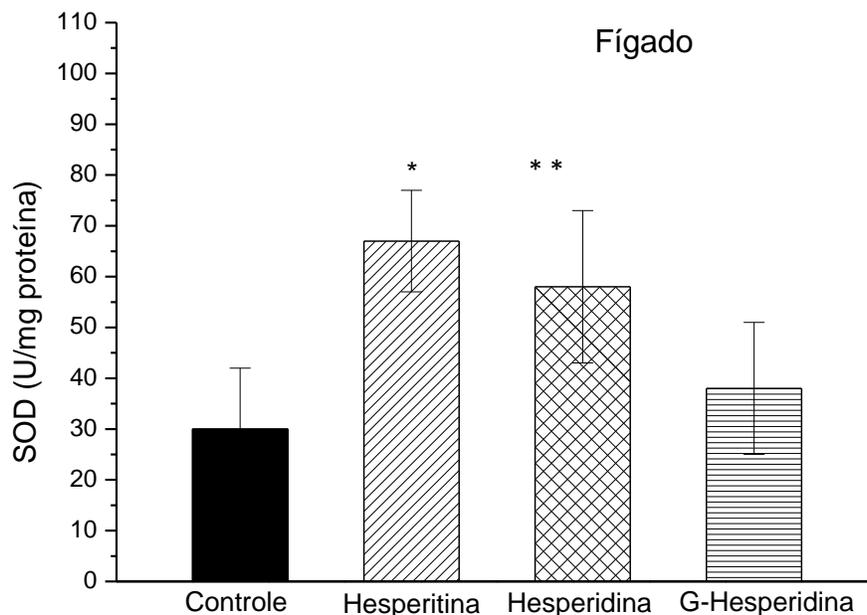


Figura18: Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em fígado de ratos controle e suplementados com hesperitina, hesperidina e G-hesperidina. Os dados representam a média  $\pm$  DP para 12 experimentos. \* $p < 0,001$  quando comparado ao grupo controle  
\* \* $p < 0,01$  quando comparado ao grupo controle

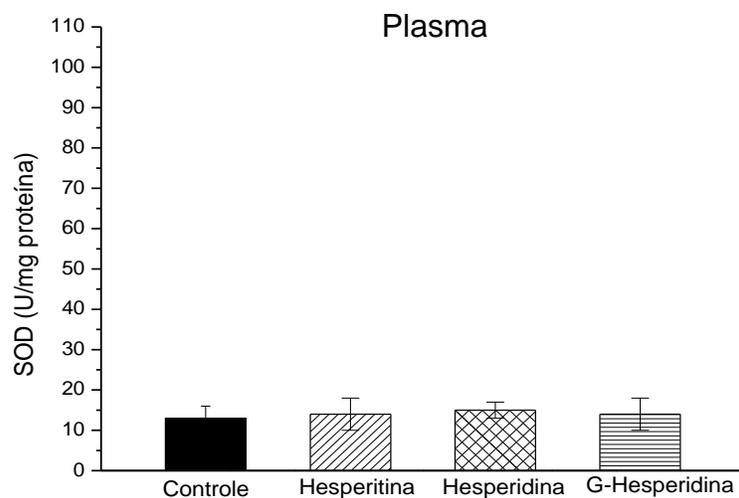


Figura 19: Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em plasma de ratos controle e suplementados com hesperitina, hesperidina e G-hesperidina.

Neste estudo não foram observadas diferenças na atividade da CAT avaliada no tecido hepático e plasma dos grupos suplementados em comparação ao grupo controle conforme se observa nas Figuras 20.

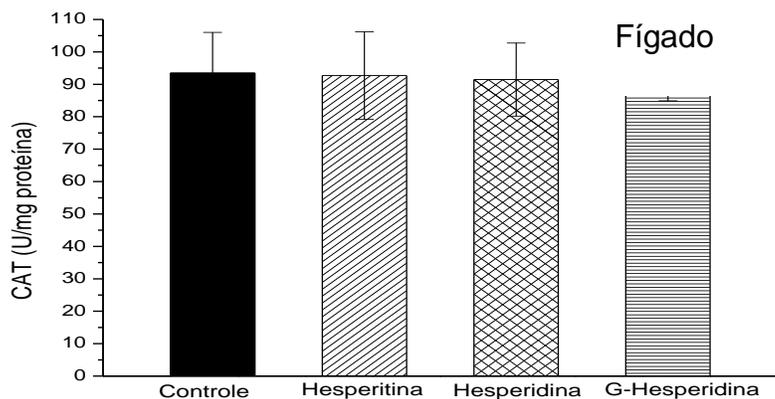


Figura 20: Atividade da enzima catalase em fígado de ratos controle e suplementados com hesperitina, hesperidina e G-hesperidina.

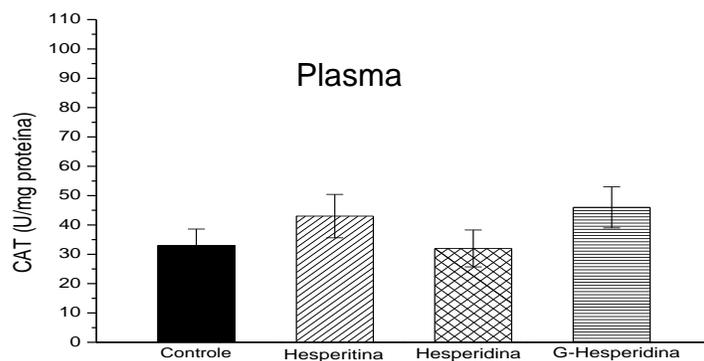


Figura 21: Atividade da enzima catalase plasma de ratos controle e suplementados com hesperitina, hesperidina e G-hesperidina.

#### 4.1.3. Atividade das enzimas transaminases

A função hepática foi avaliada com o objetivo de pesquisar danos hepáticos destes flavonóides (hesperitina, hesperidina e G- hesperidina) nas doses utilizadas no trabalho as atividades das enzimas AST e a ALT segundo o item 5.1.6.

Não houve alterações significativas na concentração plasmática das enzimas ALT e AST após o tratamento com os flavonóides. Tabela 2

Tabela 2: Níveis de asparato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) em ratos controle suplementados com hesperitina, hesperidina e G-hesperidina. Os dados representam a média  $\pm$ DP de 12 experimentos

Parâmetros	Grupo controle (salina)	Grupo hesperitina	Grupo hesperidina	Grupo G-hesperidina
AST	191,1 $\pm$ 14,5	152,8 $\pm$ 8,5	208,5 $\pm$ 67,1	198,5 $\pm$ 7,0
ALT	93,5 $\pm$ 6,5	74,5 $\pm$ 12,0	98,5 $\pm$ 12	100,5 $\pm$ 7,0

#### 4.1.4. Avaliação do perfil lipídico plasmático

A tabela 3 mostra o perfil lipídico e o índice aterogênico (IA) dos ratos controle e suplementados com hesperitina, hesperidina e G-hesperidina.

Pode-se observar que embora os níveis de triacilglicerol, colesterol total, LDL-colesterol e HDL-c não mostraram diferenças significativas entre os grupos suplementados e o controle, houve uma diminuição de 22% nos níveis de LDL-colesterol no grupo tratado com hesperitina em comparação ao controle. A mesma resposta foi observada nos grupos suplementados com hesperidina e G-hesperidina, nos quais houve a redução de 13% e 18%, nos níveis de LDL-c respectivamente, em comparação ao controle. Todos os grupos tratados apresentaram redução significativa nos valores de índice aterogênico (IA).

Tabela 3: Perfil lipídico plásmatico de ratos controle e suplementados com hesperitina , hesperidina e G-hesperidna.

<b>Parâmetros</b>	<b>Grupo controle (salina)</b>	<b>Grupo hesperitina</b>	<b>Grupo hesperidina</b>	<b>Grupo G-hesperidina</b>
Colesterol (mg/dL)	73.7 ± 13.6	59.7 ± 5.5	69.3 ± 18.2	64.7 ± 7.8
Triacilglicerol (mg/dL)	97.2 ± 9.4	73.7 ± 7.0	77.3 ± 3.5	71.0 ± 8.1
LDL-c (mg/dL)	19.8 ± 3.7	15.3 ± 2.9	17.5 ± 3.4	16.2 ± 2.5
HDL-c (mg/dL)	34.7 ± 1.5	29.7 ± 5.1	35.3 ± 7.0	34.0 ± 1.7
IA (mg/dL)	2.85 ± 0.17	2.41 ± 0.12 *	2.09 ± 0.27*	2.01 ± 0.24*

\* Valores com diferenças significativas comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ , ANOVA, Teste de Tukey).

#### 4.1.5. Perfil de ácidos graxos dos lípides hepáticos

A tabela 4 mostra que os principais ácidos graxos encontrados no tecido hepático de ratos foram: palmítico (16:0), esteárico (18:0), palmitoléico (16:1 *n*-7), oléico (18:1 *n*-9) linoléico (18:2 *n*-6), linolênico (18:3 *n*-3), araquidônico (20:4 *n*-6), eicosapentaenóico (20:5 *n*-3), docosapentaenóico (22:5 *n*-3), docosahexaenóico (22:6 *n*-3). Estes ácidos graxos foram distribuídos em saturados, monoinsaturados e poli-insaturados da família *n*-6 e *n*-3.

Observa-se que as quantidades encontradas de ácidos graxos saturados, monoinsaturado se poli-insaturados das famílias *n*-6 e *n*-3, dos grupos suplementados se mantiveram praticamente iguais comparado ao grupo controle.

Tabela 4. Composição de ácidos graxos dos lípides totais do fígado de ratos controle e suplementados com hesperitina, hesperidina e G-hesperidina

Ácidos graxos	Controle (salina)	Grupo hesperitina	Grupo hesperidina	Grupo G-hesperidina
16:0	24,3 ± 3,2	23,4 ± 3,6	19,9 ± 4,3	21,5 ± 1,6
18:0	12,1 ± 1,9	13,5 ± 0,8	13,8 ± 1,4	13,6 ± 1,0
Total saturados (AGS)	36,4	36,9	33,7	35,1
16:1 n-7	3,8 ± 0,5	3,1 ± 0,6	3,7 ± 0,3	3,3 ± 0,9
18:1 n-9	16,9 ± 1,5	17,9 ± 1,3	18,8 ± 2,4	17,7 ± 1,5
Total monoinsaturados (AGMI)	20,7	21,0	22,5	21,0
18:2 n-6	20,8 ± 2,9	19,5 ± 1,9	20,4 ± 2,4	21,8 ± 2,6
20:4 n-6	16,7 ± 2,3	16,3 ± 2,1	17,3 ± 2,6	16,5 ± 2,7
Total poli-insaturados <i>n</i> -6 (AGPI)	37,5	35,8	37,7	38,3
18:3 n-3	0,7 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,4	0,8 ± 0,3
20:5 n-3	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0,1
22:5 n-3	0,9 ± 0,3	1,0 ± 0,2	1,3 ± 0,1	0,9 ± 0,3
22:6 n-3	3,4 ± 0,6	4,2 ± 0,8	3,5 ± 0,3	3,6 ± 0,4
Total poli-insaturados <i>n</i> -3 (AGPI)	5,4	6,3	6,1	5,6

#### 4.2. Atividades antioxidantes *in vitro*

As amostras de hesperitina, hesperidina e G- hesperidina foram analisadas por dois diferentes métodos antioxidantes (DPPH e FRAP) conforme descrito no item 5.2. Os resultados dos ensaios de DPPH e FRAP estão respectivamente apresentados nas tabelas 5.

Tabela 5: Potencial antioxidante *in vitro* dos compostos avaliados pelos métodos DPPH e FRAP

<b>Parâmetros</b>	<b>Grupo hesperitina</b>	<b>Grupo hesperidina</b>	<b>Grupo G-hesperidina</b>
DPPH (% SRL)	45,7±10,8 <sup>a</sup>	19,5 ± 4,5 <sup>b</sup>	25,2 ± 4,9 <sup>b</sup>
FRAP (µM / g)	2,7± 0,3 <sup>a</sup>	1,5 ± 0,5 <sup>b</sup>	1,6 ± 0,9 <sup>b</sup>

Letras iguais indicam não haver diferenças significativas entre os dados. Letras diferentes entre os dados indicam valores com diferença significativa ( $p < 0,05$ , ANOVA, Teste Tukey).

Nesses ensaios foi observado que a capacidade antioxidante da hesperitina, medida por DHHP e FRAP, é superior ( $p < 0,05$ ) comparada aos seus derivados glicosilados, hesperidina e G – hesperidina.

## 5. DISCUSSÃO

Os testes *in vitro* de medida da capacidade antioxidante são importantes ferramentas que auxiliam na busca por substâncias bioativas, bem como na seleção de compostos de interesse. Entretanto, muitos desses métodos não têm mostrado correlação com a habilidade dos compostos em inibir a deterioração oxidativa *in vivo*. Isto se deve ao fato de que a atividade antioxidante *in vivo* depende não somente da reatividade química do antioxidante, mas também de fatores como localização física, propriedades físico-químicas, interação com outros componentes e condições ambientais. Por este motivo, testes *in vivo* em sistemas biológicos são de grande valia para uma avaliação mais eficaz da atividade antioxidante.

Os resultados *in vitro* comprovaram a potente ação da hesperitina em sequestrar e reduzir o radical DPPH, atuando como eficiente doador de átomos de hidrogênio. Esta eficiência antioxidante foi superior aos seus derivados glicosilados, mostrando que a presença dos açúcares na hesperidina (rutinose) e na G-hesperidina (rutinose+ glicose) e consequente bloqueio do grupo hidroxila do C7 é capaz de reduzir a eficiência antioxidante destes compostos. Estes resultados são consistentes com os reportados anteriormente, os quais verificaram que a aglicona hesperitina apresenta maior constante de inibição ( $K_{inh}$ ) e, portanto é mais potente como antioxidante comparada a hesperidina (Hirata *et al.*, 2005) e também a neohesperidina (MAJO *et al.*, 2005). Segundo os autores a presença e o tipo de açúcar no C7 do anel B na estrutura das flavanonas influencia a habilidade antioxidante destes compostos.

Da mesma forma, a capacidade antioxidante da hesperitina em reduzir o íon férrico, medida pelo método FRAP, foi superior aos seus derivados glicosilados. É importante enfatizar que os três compostos possuem diferentes propriedades físico-químicas que podem influenciar na capacidade antioxidante. A G-hesperidina é mais hidrofílica que os outros dois compostos, com um valor de  $\log P < -3,2$ , enquanto a hesperidina e hesperitina possuem os valores de 1,78 e 2,9, respectivamente (MAJUMDAR E SRIRANGAM, 2009).

Os seres vivos dispõem de mecanismos protetores para evitar o acúmulo das EROs (Halliwell, 1995), evitando assim danos a lípidos, proteínas e ácidos nucleicos, essas defesas incluem mecanismos enzimáticos e não enzimáticos. As principais enzimas antioxidantes são a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD) e a glutathiona peroxidase (GPx), as quais para exercerem sua ação são dependentes da participação de cofatores. Estudos anteriores mostraram que a suplementação de hesperitina, hesperidina e também de G-hesperidina resulta em aumento da atividade de GPx, SOD, CAT e a redução dos níveis de MDA, produto da LPO, em diferentes modelos de estresse oxidativo em roedores (TIRKEY *et al.*, 2005; JAIN e PARMAR 2011; YASIM *et al.*, 2011; JASABI e ABDALLAH 2013).

O uso de modelos animais com estresse oxidativo é útil para avaliar o efeito dos flavonóides no sistema oxidante-antioxidante de animais. Os nossos dados mostraram que nos animais, os quais não houve nenhum estímulo de estresse, a atividade das enzimas CAT e SOD plasmáticas e os níveis hepáticos de TBARS e CAT não foram alterados com a suplementação. Por outro lado, foi verificado um acréscimo na atividade da SOD hepática nos grupos suplementados com hesperitina e hesperidina, sugerindo um possível efeito protetor destes antioxidantes contra as EROs. Segundo Jovanovic *et al.*(1994) a hesperidina tem propriedades de neutralizar o ânion superóxido, o oxigênio singlete e o radical hidroxil, contribuindo significativamente com o sistema antioxidante intracelular.

Os dados reportados no estudo de Tirkey *et al.* (2005) utilizando ratos *Wistar* machos que foram expostos a tetracloreto de carbono (tetracloretano) e suplementados com hesperidina mostraram o potencial desta flavanona na melhora do sistema antioxidante do fígado e rim dos animais. Os níveis aumentados de TBARS e a redução na atividade das enzimas antioxidantes (GSH, SOD e CAT) promovidos pelo tetracloreto de carbono foram revertidos com a suplementação de 200 mg/kg de hesperidina por 7 dias, mostrando a eficiência deste composto em aumentar as defesas antioxidantes.

Jain e Parmar (2011) reportaram que a hesperidina é um antioxidante e anti-inflamatório mais potente do que a indometacina e a naringina capaz de atenuar a

resposta inflamatória em ratos *Wistar* albinos em modelo de **inflamação** na **bolsa de ar** induzido pela carragenina. A suplementação de hesperidina (50mg/Kg) foi capaz de atenuar a LPO e a resposta inflamatória no exsudado, tecido e soro dos animais.

No estudo de Yasim *et al.* (2011) os autores reportaram que a suplementação da mistura hesperidina/diosmina (100mg/Kg e peso corpóreo) em ratos hipercolesterolêmicos aumentou os níveis plasmáticos de SOD e GPx e não promoveu alterações significativas nos níveis de MDA e de CAT. Foi verificado também um aumento significativo dos níveis séricos de HDL-c no grupo suplementado.

Os dados reportados por Oliveira *et al.* (2013) mostraram a redução nos níveis séricos de TBARS em ratos *Wistar* machos suplementados com G- hesperidina (100mg/Kg) por 4 semanas, submetidos a natação intervalada (60 segundos de exercício de alta intensidade seguido por um intervalo de 120 segundos por um período total de 50 minutos) comparado aos animais que não receberam a suplementação. Além disso, os autores mostraram que a suplementação com hesperidina combinada ou não com exercícios é capaz de reduzir os níveis de triacilglicerol, colesterol total e LDL-c no soro dos animais.

O efeito quimiopreventivo da hesperidina foi recentemente reportado por Al-Jasabi e Abdallah (2013) em camundongos com câncer de pulmão induzido por benzo(a)pireno, um composto carcinógeno. Um grupo saudável recebeu hesperidina (100mg/Kg de peso corpóreo) por 16 semanas em dias alterados e outro grupo recebeu a mesma dose de hesperidina pelo mesmo tempo um dia antes da administração de benzopireno. O aumento de MDA e a redução da atividade das enzimas antioxidantes devido ao desenvolvimento do câncer foram atenuados com o uso de hesperidina, mostrando o potencial preventivo deste flavonóide.

Uma das consequências mais estudadas do estresse oxidativo é a peroxidação lipídica, que constitui uma reação em cadeia nos AGPI das membranas celulares. A LPO acarreta em alterações na estrutura e permeabilidade das membranas celulares, com perda de seletividade nas trocas iônicas além da formação de produtos citotóxicos, como o malondialdeído (MDA), resultando na morte celular (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Tem-se o conhecimento de que diferentes tecidos metabolizam preferencialmente certos ácidos graxos e, com isso, pode-se ter uma maior ou menor mobilização de um determinado ácido graxo, segundo os seguintes parâmetros: 1) ser fornecido na dieta, 2) oferecerem-se outros componentes que podem influenciar no seu percentual de incorporação, como os antioxidantes dietéticos, 3) ser afetado por fatores externos, como situações de estresse e doenças (MOREIRA E MANCINI-FILHO, 2004).

Considerando que o principal substrato do processo de LPO são os AGPI, o presente trabalho avaliou o perfil de ácidos graxos no fígado dos animais com a intenção de verificar o efeito destes antioxidantes na proteção à LPO. Verificou-se o mesmo perfil de ácidos graxos para os grupos controle e suplementados, mostrando, portanto que a suplementação, nas condições usadas, não foi suficiente para alterar o percentual de incorporação dos ácidos graxos no fígado dos animais, sem indícios, portanto de preservação ou maior proteção dos AGPI nos grupos suplementados.

Dados anteriores reportaram que os tecidos de animais possuem comportamentos distintos quanto à incorporação dos diferentes ácidos graxos, quando estão associados à ingestão de antioxidantes, levando-se a inferir, que há uma relação direta entre a presença de antioxidantes e a incorporação tecidual dos ácidos graxos (MOREIRA e MANCINI-FILHO, 2004; MARTINS *et al.*, 2009). Embora não há relatos na literatura do efeito protetor da hesperitina ou seus derivados glicosilados sobre a oxidação dos ácidos graxos e, portanto capaz de alterar o perfil destes ácidos nos lípidos de membrana, alguns autores têm verificado esta relação para outros antioxidantes, como os polifenólicos de chás (MOREIRA E MANCINI-FILHO, 2004; MARTINS *et al.*, 2009) e do pedúnculo de caju (BROINIZI *et al.*, 2008).

Martins *et al.*, (2009) reportaram que o chá-mate (*Ilex paraguariensis*) foi capaz de promover uma proteção significativa do processo de LPO, resultando em aumento nos percentuais de AGPI (18: 2n-6 e 20: 4n-6) e AGMI (18: 1n-9), no fígado de ratos tratados por 60 dias com uma dose de 2.0 g/kg de chá.

Moreira e Mancini-Filho, 2004 avaliaram o potencial antioxidante de uma mistura de especiarias (mostarda, canela e erva-doce) e observaram diferenças nos percentuais de incorporação dos ácidos graxos nos tecidos dos animais que receberam

a ração à base de óleo de soja e de peixe, quando comparados os grupos experimentais (chá) e controles (placebo). Os resultados obtidos sugerem uma provável atuação dos compostos polifenólicos presentes nos chás sobre o metabolismo lipídico, por meio de proteção contra a oxidação e também ação sobre enzimas da biossíntese dos eicosanóides.

Quando avaliada a oxidação lipídica nos tecidos de rato, Broinizi *et al.*,(2008) constatou que o extrato hidroalcoólico do bagaço do pedúnculo de caju (200 e 400 mg/kg de peso corpóreo) por 30 dias foi efetivo na redução da LPO no cérebro dos grupos tratados, reduzindo a formação de MDA e aumentando a quantidade de AGPI, em especial o ácido docosahexaenóico (DHA), caracterizando proteção à peroxidação lipídica.

Estudos anteriores mostraram o efeito hipolipidêmico da hesperidina pura ou em sucos de frutas (toranja e laranja) utilizando vários modelos animais. A ação hipocolesterolêmica de compostos polifenólicos tem sido atribuída à ocorrência comum dos grupos hidroxila na posição 3, 4 ou 5 da sua estrutura (MONFORTE *et al.*, 1995).

Neste trabalho optou-se por avaliar o efeito dos compostos em ratos alimentados com ração comercial sem acréscimo de gordura ou outros compostos capazes de alterar o metabolismo e promover algum estresse oxidativo. Os resultados apontaram uma tendência em reduzir o perfil lipídico e uma redução significativa do índice aterogênico (AI) nos três grupos suplementados comparados ao grupo controle.

Dados reportados por Oliveira *et al.*, (2012) relataram uma redução significativa nos níveis de lípidos séricos em ratos *Wistar* machos alimentados com dieta padrão e suplementados com G- hesperidina (100mg/Kg por 4 semanas). Foi observada uma redução de 13% de triacilglicerol e de 52% de LDL-c e um aumento de 35% de HDL-c comparado aos animais que não receberam a suplementação.

Na pesquisa de Vinueza *et al.*, (2008) os ratos *Wistar* tratados com dieta padrão acrescida de 17% de gordura saturada tiveram redução dos níveis de colesterol total e de HDL-c após a administração por 30 dias de hesperidina isolada (25mg/L) ou em associação com o suco de laranja, ambos oferecidos *ad libitum* por 30 dias, não havendo interferência nos níveis de triacilglicerol plasmáticos.

Em outro trabalho, as flavanonas cítricas retiradas da casca da tangerina e uma mistura de flavonóides contendo hesperidina e naringina (0.5 g/100 g) administradas a ratos hipercolesterolêmicos mostraram eficientes na redução das concentrações plasmáticas e hepáticas de colesterol, sugerindo uma diminuição da síntese de colesterol endógeno (BOK *et al.*, 1999).

Alguns autores reportaram que a ação hipocolesterolêmica da hesperitina e de seus metabólitos ocorre devido à inibição da hidroximetil glutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase) e colesterol aciltransferase (ACAT) enzimas presentes na cadeia de reações da biossíntese de colesterol (BOK *et al.*, 1999; PARK *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 2003). Dados mais recentes têm apontado que os metabólitos da hesperitina, em particular o ácido 3-metoxi-4-hidroxicinâmico (ácido ferúlico) é um agente hipocolesterolêmico mais potente do que a hesperitina (KIM *et al.*, 2010).

Alguns estudos têm mostrado também o efeito benéfico na redução de lípidos séricos com a utilização de hesperidina e seus derivados em humanos. Bonifácio (2007) avaliou a influência do consumo de suco de laranja oferecido *ad libitum* a 114 indivíduos normo e hiperlipidêmicos enquanto Garcia *et al.*, (2008) estudaram 110 homens normolipídicos que ingeriram 400 mL de suco de laranja durante 30 dias. Os autores observaram que o consumo de suco foi capaz de reduzir os níveis de lípidos independente dos níveis anteriores apresentados pelos indivíduos.

Por outro lado, Demontry *et al.*, (2010) observaram que a hesperidina não foi capaz de alterar as concentrações do perfil lipídico em homens e mulheres normolipídicos suplementados com 400 ml de suco de laranja. Resultados similares foram reportados por Araújo (2010) que suplementou 30 adultos de ambos os sexos com 750 mL/dia de suco de laranja para adultos eutróficos e com sobrepeso. Em nenhum dos grupos notou-se alterações significativas no colesterol total, LDL-c, LDL/HDL-c, e triacilglicerol.

Uma vez que não foi observada qualquer alteração significativa na atividade das transaminases nos grupos suplementados comparada ao controle, podemos assim afirmar que a quantidade e o tempo de administração destes compostos não foram capazes de causar toxicidade hepática aos animais. Segundo Ozer *et al.*,(2008) a ALT

e AST são ótimos biomarcadores para danos hepáticos e qualquer destruição significativa de tecido hepático dá origem a níveis elevados destas transaminases séricas.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que a flavanona hesperitina apresenta atividade antioxidante *in vitro* superior aos seus derivados glicosilados, hesperidina e G-hesperidina, os quais apresentaram similar potencial antioxidante.

Os dados observados pelo estudo *in vivo*, utilizando animais alimentados com dieta padrão e suplementados com os três antioxidantes, mostraram que os compostos não apresentaram uma ação antioxidante relevante nas condições testadas no trabalho. O uso de modelos animais com indução de estresse oxidativo poderá ser útil para esta avaliação.

A hesperitina e hesperidina mostraram um efeito antioxidante preventivo como sequestrantes do radical anion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), capazes de aumentar a atividade da SOD hepática nos animais. A G-hesperidina também mostrou uma tendência em aumentar a SOD hepática. Possivelmente pela atuação eficiente das enzimas glicosidases e ramnosidases presentes na mucosa gastrointestinal ou secretada pela microbiota colônica, os compostos glicosilados foram convertidos na forma aglicona, o que possibilitou a absorção e os efeitos similares dos três compostos no sistema oxidante-antioxidante dos animais.

A redução do índice aterogênico (IA) dos animais mostra um possível efeito hipolipidêmico para os três antioxidantes avaliados, o qual pode ser avaliado melhor utilizando modelos de obesidade.

Futuros trabalhos envolvendo estudos de biodisponibilidade e utilizando modelos animais com estresse oxidativo poderão trazer informações adicionais contribuindo para o entendimento do efeito da glicosilação na capacidade antioxidante dos flavonóides assim como na elucidação destes efeitos em relação à estrutura do composto.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL JASABI, S.; ABDULLAH, M.S. The role of antioxidant hesperidin in the attenuation of lung cancer caused by benzo [a] pyrene in Balb /c mice. **World Appl Sci J**, 22(8): 1106-10, 2013.

AL MEDHDI, A. B.; DODIA, C.; JAIN, M.K.; FISHER, A.B.A. Phospholipase A2 inhibitor decreases generation of thiobarbituric acid reactive substances during lung ischemia-reperfusion. **Biochim Biophys Acta**, 1167 (1): 56-62, 1993.

ALVES, C, Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Quim Nova**, 33(10): 2202-10, 2010.

AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY (AOCS) **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemist's Society**. 4.ed., Champaign, 2, Ce 2-66, 1993.

AMES, B. N.; SHIGENAGA, M. K.; HAGENT, M. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 90 (17): 7915–22. 1993.

ARAUJO, G.L. **Estudo de formulações de fitoderivados e flavonóide na inflamação e cicatrização de feridas em coelhos**. 134f. Tese (Mestrado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J.M.; DAVID, J, P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesas do organismo. **Quím Nova**, 29 (2): 113-23 2006.

BEHLING, E.; SENDÃO, M.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Flavonóide quercetina: Aspectos gerais e ações biológicas. **Alim Nutr Araraquara**, 15 (3): 285-292, 2004.

BENAVENTI-GARCIA, O.; CASTILO, J. Uses and properties of citrus flavonoids. **J Agric Food Chem**, 45 (12): 4505-15, 1997.

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. **Biochem Anal Biochem**, 239: 70-76, 1996.

BERGAMIM, S.C. **Avaliação da atividade antioxidante e da resposta glicêmica e insulínica do suco de laranja fresco em comparação ao suco de laranja pasteurizado no soro sanguíneo de indivíduos saudáveis**. 51 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Nutricionais) – Universidade Estadual Paulista "Julio Mesquita" Araraquara, 2012.

BEUTLER, E. **Red Cell Metabolism: In \_\_\_\_\_ Manual of biochemical methods**. 2º edição. New York: Grune & Stratton, 1975.

BEUTLER, E. **Red Cell Metabolism: a manual of biochemical methods**. 3º edição. Orlando: Grune & Stratton, 1984.

BOK, S.H.; LEE, S.H.; PARK, Y.B.; BAE, K.H.; SON, K.H. ; JEONG, T.S.; CHOI, M.S. Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coa reductase and acyl coa: cholesterol transferase are lower in rats fed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoids. **Am J Clin Nutr**, 129 (3): 1182-85, 1999.

BONIFÁCIO N.P.A. Influência do consumo de suco de laranja no perfil sérico dos lípides, apolipoproteínas e homocisteína em homens normais e hiperlipidêmicos. **Alim Nutr Araraquara**, 15 (2): 563-71, 2007.

BORRADAILE, N.M.; CARROLL, K.K.; KUROWSKA, E.M. Regulation of HepG2 cell apolipoprotein B metabolism by the citrus flavanones hesperetin and naringenin. **J Lipids Res**, 34 (2):591-98, 1999.

BROINIZI, P. R. B.; ANDRADE-WARTH.; E. R. S.; OLIVEIRA, A. M.; TORRES, R. P.; AZEREDO, H. M. C. ALVES, R. E.; MANCINI-FILHO, J. Propriedades antioxidantes em

subproduto do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.): efeito sobre a lipoperoxidação e o perfil de ácidos graxos poli-insaturados em ratos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 44(4):773- 81 2008.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radic Biol Med**, 22 (5): 749-60, 1997.

CHEN, F.; WANG, W.; EL-DEIRY, W.S. Current strategies to target p53 in cancer. **Biochem Pharmacol**, 80 (5): 724-30, 2010.

CHO, J. Antioxidant and neuroprotective effect of hesperidin and its aglycone hesperitina. **Arch Pharm Res**, 29 (8): 699-706,2006.

DAY , A.J.; HOLLMAN, A.J.; PETERS, M.F. Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin -4-glucoside in the rat small intestine: role of lactase phlorizin hydrolase and sodium-dependent glucose transporter. **Biochem Pharmacol**, 65 (3):1199-206, 2003.

DEMONTRY,I.; LIN, Y.; ZEBREGS, Y.E.; VERMEER, M.A.; VAN DER KNAAP, H.C.; JÄKEL, M.; TRAUTWEIN, E.A. The citrus flavonoids hesperidin and naringin do not affect serum cholesterol in moderately hypercholesterolemic men and women. **J Nutr**, 140 (9): 1615-20, 2010.

DUBICK, M. A.; OMAYE, S. T. **Modification of atherogenesis and heart disease by grape wine and tea polyphenols**. In: Wildman, R. E.C. (org). Handbook of Nutraceutical and Functional Foods.Ed. Boca Raton: CRC Press, 2001 p.143-153.

EMIM, J.A.; OLIVEIRA, A.B.; LAPA, A.J. Pharmacological evaluation of the anti inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, an the Isoflavonoids, duartin and claussequinose in rats and mice. **J Pharm Pharmacol**, 46(2):118-22, 1994.

ERLUND, I. ; MERIRINNE, E.; ALFTHAN, G.; ARO, A. Plasma kinetics and urinary excretion of the flavanones naringenin and hesperetin in humans after ingestion of orange juice and grapefruit juice. **J Nutr**,. 131: 235-41, 2001.

FARIA , A.; OLIVEIRA, J.; NEVES, P.; GAMEIRO, P.; SANTOS-BUELGA, C.; DE FREITAS, V.; MATEUS, N. Antioxidant properties of prepared blueberry (*vaccinium myrtillus*) extracts. **J Agric Food Chem**, 53( 17): 6896–902, 2005.

FELIPE, E.T. **Avaliação da citotoxicidade, citoproteção e efeitos dos flavonóides rutina e hesperidina sobre a funcionabilidade de células secretoras de insulina BRIN-BD11**. 89 f. Dissertação (Mestrado em Biologia)- Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2011.

FERRIS, C.D.; JAFFREY, S.R.; SAWA, A.; TAKAHASHI, M.; BRADY, S.D.; BARROW, R.K.; TYSOE, S.A.; WOLOSKER, H.; BARAÑANO, D.E.; DORÉ, S.; POSS, K.D.; SNYDER, S.H. .Haem oxygenase-1 prevents cell death by regulating cellular iron. **Nat Cell Biol**, 1(3): 152:7, 1999.

FOLCH, J.; LEE, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method of the isolation and purification of total lipids from animal. **J Biol Chem**, 226 (1): 947- 508, 1957.

FRIEDEWALD, W.T.; LEVY, R.I.; FREDRICKSON, D.R. Estimation of the concentration of low- density lipoprotein in cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin Chem**, 18( 6): 499-502, 1972.

GALILI, O.; VERSARI D.; SATTLER, K.J.; OLSON, M,L.; MANNHEIM, D.; MCCONNELL, J.P.; CHADE, A.R.; LERMAN L.O.; LERMAN, A.A. Early experimental obesity is associated with coronary endothelial dysfunction and oxidative stress. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 292,(2): H904-H911, 2007.

GARCIA, A.C.D.B. **Estudos do efeito do consumo de suco de laranja no perfil lipídico e nutricional de homens**. 135 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2007.

GARCIA, A.C.D.B.; BONIFÁCIO, N.P.; VENDRAMINI, R.C.; CÉSAR, T.B. Influência do consumo de suco de laranja nos lípides sanguíneos e na composição corporal de homens normais e com dislipidemias. **Alim Nutr Araraquara**, 33(2): 1-11, 2008.

GARDNER, H.W. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. **Free Radical Biol Med**, 7 (1): 65-86, 1989.

GOMES, A.; FERNANDES, E.; LIMA, J.L.F.C.; MIRA, L; CORVO, M.L.; Molecular mechanisms of anti inflammatory activity mediated by flavonoids. **Curr Med Chem**, 15(16):1586 – 1605, 2008.

GRAEFE , E.U.; WITTIG, J.; MUELLER, S.; RIETHLING, A.K.; UEHLEKE, B.; DREWELOW, B.; PFORTE, H.; JACOBASCH, G.; DERENDORF, H.; VEIT, M.Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycoside in humans. **J Clin Pharmacol**, 41: 492-9, 2001.

GREEN, K.; RAND, M. D; MURPHY, M. P. Prevention of mitochondrial oxidative damages a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**, 53 (1): 110-118, 2004.

GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL,B.. The measurement and mechanisms of lipid peroxidation in biological systems. **Trends biochem Sci**, 15:129–135,1990

GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. **Antioxidants in Nutrition, Health, and Disease**.Ed.Oxford University Press, 1994.p.41-62.

HALLIWELL, B. How to characterize an antioxidant: an update. **Biochem Soc Symp**, 61(2): 73–101, 1995.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3ª edição. New York: Ed. Oxford University 1999. p 936-1002.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE J.M.C, **Free Radicals in Biology and Medicine**. 10ª edição. Nova York: Ed. Oxford University Press, 2007. p.851-912

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean.**Br J Pharmacol**, 142(2): 231-255, 2004..

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships .**J. Nutri Biochem**, 13 (1):572-584, 2002.

HICKS, J. J.; ORRES-RAMOS, Y. D.; SIERRA- VARGAS, M. P. Estrés oxidante, concepto y clasificación. **Rev Argent Endocrinol Metab**, 14(4): 223-226, 2006.

HIRATA, A.; MURAKAMI, Y.; SHOJI, M.; KADOMA, Y.; FUJISAWA, S. Kinetics of radical scavebging activity oh hesperitina and hesperidin and their inhibitory activity on Cox<sub>2</sub> expression. **Anticancer Res**, 25: 3367-74, 2005

HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. **Biomed Pharmacother**, 51(2): 305-310, 1997.

HOLLMAN, P. C. H.; BIJSMAN, M.N.; VAN GAMEREN, Y.; CNOSSEN, E.P.; DE VRIES, J.H.; KATAN, M.B. The sugar moiety is a major determinat of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. **Free Radic Res** 31 (6): 569-73, 1999.

HSIEH, R.J.; KINSELLA, J.E. Oxidation of polyunsaturated fatty acids: mechanisms, products, and inhibition with emphasis on fish. **Adv Food Nutr Res**, 33( 1):233-341,1989..

JAIN, M.; PARMARK, H.S. Evaluation of antioxidant and anti-inflammatory potencial of hesperidin and narigin on the rats air pouch model of inflamation. **ISRN Inflamm**, 60(5):483-91,2011.

JI, C; ROUZER, C.A.; MARNETT, L.J.; PIETENPOL ,J.A. Induction of cell cycle arrest by the endogenous product of lipid peroxidation, malondialdehyde. **Carcinogeneses**, 19 (7): 1275–1283. 1998.

JOVANOVIC, S,V.; STEENKEN, S.; TOSIC, M.; MARJANOVIC, B.; SIMIC, M,G. Flavonoids as antioxidant. **J Am Chem Soc**. 116: 4846-51, 1994.

KALPANA, K.K.; SRINIVASAN, M.; MENON, V.P. Evaluation of antioxidant activity of hesperidin and its protective effect on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced oxidative damage on pBR322 DNA and RBC cellular membrane. **Mol Cell Biochem**, 323(1-2):21-29, 2009.

KAUR, G.; TIRKEY, N.; CHOPRA, K. Beneficial effect of hesperidin on lipopolysaccharide- induced hepatotoxicity. **Toxicology**, 226: 152–60, 2006.

KIM, H.K.; JEONG, T.S.; LEE, M.K.; PARK, Y.B.; CHOI, M.S. Lipidlowering efficacy of hesperetin metabolites in high-cholesterol fed rats. **Clin Chim Acta**, 327:129–37, 2003.

KIM, H.K.; JEON, S.M; LEE, M.K; YON-YOUNG, C; EUN- YOUNG, K; JIN, H.L; MYUNG-SOOK. C. Comparison of hesperitina and its metabolites for cholesterol-lowering and antioxidative efficacy in hypercholesterolemic hamsters. **J Med Food**, 13 (4): 808-14, 2010.

KRINSKY, N. I. Membrane antioxidants. **Ann NY Acad Sci**, 551 (1):17-32, 1988.

KRIS-ETHERTON, P.M.; HO, C.Y.; FOSMIRE, M.A. The effect of dietary fat saturation on plasma and hepatic lipoproteins in the rat. **J Nutr**, 114(9): 1675-1682, 1984.

LARSSON, S. L.; SKOGSBERG, J.; BJÖRKEGREN, J. The low density lipoprotein receptor prevents secretion of dense apoB100-containing lipoproteins from the liver . **J Biol Chem**, 279(2): 831-36, 2004.

LEE, S.H.; PARK, Y. B.; BAE, K.H. Hypocholesterolemic effect of hesperitin mediated by inhibition of 3-hidroxiacetil-CoA methylglutaril coenzyme A reductase and acyl coenzyme A: cholesterol diet. **Nutr Res**, 19(8): 1245-58, 1999.

LEELAVINOTHAN, P.; KALIST, S. Beneficial effect of hesperidin on cadmium induced oxidative stress in rats: an *in vivo* and *in vitro* study. **Eur Rev Med Pharmacol**, 15: 992-1002, 2011.

LEITE, H.P.; SARNI, R.S. Resumo radicais livres, antioxidante e nutrição. **Rev Bras Nutr Clin**, 18(2): 87-94, 2003.

LIEN E.J.;REN, S.; BUI H.H.; WANG, R.Quantitative structureactivity relationship analysis of phenolic antioxidants.**Free Radic Biol Med**, 26(3-4):285-294,1999.

LIMA, E. S. *et al.* Peroxidação dos ácidos graxos. In: CURI, R.; POMPÉIA, C.; MIYASAKA, C. K.; PROCOPIO, J. (Ed.). **Entendendo a gordura: os ácidos graxos**. São Paulo: Manole, 2002. p. 405-418.

LOPES, R. M.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S. , Flavonóides. **Rev. Biotecnolog Cienc Desenvolv**, 17: 18-22, 2000.

MAIESE, K.; MORHAN, S.D.; CHONG, Z.Z. Oxidative Stress Biology and Cell Injury During Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus. **Curr Neurovasc Res**, 4(1):66-71, 2007.

MAJO, D; GIAMMANCO, D.M; GUARDIA, M.L; FINOTTI, E. Flavanones in citrus fruit: Structure antioxidant activity relationships. **J Rese Intern**, 38: 1161 - 6; 2005.

MANACH, C.; MORAND, C.; CRESPIY, V.; DEMIGNÉ, C.; TEXIER, O.; RÉGÉRAT, F.; RÉMÉSY, C. Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. **FEBS Lett**, 426: 331-336, 1998.

MANACH, C.; MORAND, C.; GIL-IZQUIERDO, A.; BOUTELOUP-DEMANGE, C.; RÉMÉSY, C. Bioavailability in humans of the flavanonas hesperidin and nari rutin after the ingestion of two doses of orange juice. **Eur J Clin Nutr**, 57: 235-42, 2003.

MANENTE, F, A. **Estudo da associação entre hesperidina e anfotericina em danos hepáticos e renais e nas oxidações bioquímicas**. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2013.

MAJUMDAR, S.; SRIRANGAM, R. Solubility, stability, physicochemical characteristics and *In Vitro* ocular tissue permeability of hesperidin: a natural bioflavonoid.**Pharm Res**, 26 (5): 1217-25, 2009.

MARTINEZ- FLORES, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS J.; M. TUÑÓN, J.M. Flavonóides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutr Hosp**, 17(6): 271-78, 2002

MARTINS, F.; SUZAN, A. J. ; ARCARI, D. P.; RIBEIRO, M. L.; BASTOS, D. H. M.; CARVALHO, P. O. Consumption of mate tea (*Ilex paraguariensis*) decreases the oxidation of unsaturated fatty acids in mouse liver. **Br J. Nutr**, 101: 519-24, 2009

MAYNE, S. T. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. **J Nutr**, 133:933-940, 2003.

MENEGUINI, R. A toxicidade do oxigênio. **Ciência Hoje**, 5(28): 57-62, 1987.

METHERALL, J. E.; LI, H.; WAUGH, K. Role of multidrug resistance P glycoproteins in cholesterol biosynthesis. **J Biol Chem**, 271(5): 2634-40, 1996.

MONFORTE, M. T.; TROVATO, A.; KIRJAVAINEN, S.; FORESTIERI, A. M.; GALATI, E. M.; LO.; CURTO, R. B. Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoide. (note II): Hypolipidemic activity on experimental hypercholesterolemia in rat. II **Farmaco**, 50(9): 595-99, 1995.

MOREIRA, A.V.B.; MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Rev Nutr**, 17(4):411-424, 2004

NASSER, A.L.; VALADÃO, A.S. ; CESAR, T.B.. Avaliação do estresse oxidativo no sangue de consumidores habituais de sucos de laranja. **Rev Ciênc Farm Apl**, 32(2): 275-79, 2011.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxyde in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem**, 95 (2): 351-58, 1979.

OHTSUKI, K.; ABE, A.; MITSZUMI, H.; KONDO, M.; UEMURA, K; IWASAKI, Y.; KONDO, Y. Glucosyl hesperidin improves serum cholesterol composition and inhibits hypertrophy in vasodilatation. **J Nutr Sci Vitaminol**, 49(6): 447-450, 2003.

OLIVARES-CORICHI, I. M.; MEDINA-NAVARRO, R.; TORRES-RAMOS, Y. D.; MONTES-CORTÉS, D. H. Daño a proteínas por estrés oxidante: lipoproteína de baja densidad e insulina. **Rev Endocrinol Nutr**, 14( 4): 237-240, 2006.

OLIVEIRA, D.M.; DOURADO, G.K.;CESAR, T.B.Hesperidin associated with continuous and interval swimming improved biochemical and oxidative biomarkers in rats. **J Int. Soc Sports Nutr**,85(7): 56–61, 2013.

OZER, J.; RATNER, M.; SHAW, M.; BAILEY, W.; SCHOMAKER, S.T he current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. **Toxicology**, 245: 194-205, 2008.

PARK, Y.B.; DO, K.M.; BOK,S.H.; LEE , M.K.; JEONG , T.S.; CHOI, M.S.;.Interactive effect of hesperidin and vitamin e supplements on cholesterol metabolism in high cholesterol-fed rats. **Int J Vitam Nutr Res**, 71(1): 36–44, 2001.

PARK, J.S.; RHO, H.S.; KIM, D.H.; CHANG, I.S.Enzymatic preparation of kaempferol from green tea seed and its antioxidant activity. **J Agric Food Chem**, 54(8): 2951-56, 2006.

PENG I. W.; KUO, S. M. Flavonoid Structure Affects the Inhibition of Lipid Peroxidation in Caco-2 Intestinal Cells at Physiological Concentrations. **J Nutr**, 133(7): 2184-87, 2003.

PETERSON, J. J.; DWYER, J.T; BEECHER, G.R.; BHAGWAT, S.A.; GEBHARDT, S.E.; HAYTOWITZ, D.S.; HOLDEN, J.M. Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature. **J. Food Compost Anal**, 19: 66–73, 2006.

PRADEEP,K.; PARK, S.H.; KO,K.C. Hesperidin a flavanoglycone protects against gamma-irradiation induced hepatocellular damage and oxidative stress in Sprague-Dawley rats. **Eur J Pharmacol**, 10(1-3): 273:280, 2008.

PURI, M.; KAUR, A.; SCHWARZ, W.H.; SINGH, S.; KENNEDY, J.F; Molecular characterization and enzymatic hydrolysis of naringin extracted from know peel wast. **Int J Biol Macromol**, 48(1): 45-58, 2011.

RAVISHANKAR, D.; DRAJORA, A.K.; GRECO, F.; OSBORN.H.M.I. Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. **Int J Biochem Cell Biol**, 45: 2821-31, 2013.

RICE-EVANS, C.A.; MILLE, N.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends Plant Sci**, 2(4):152-59, 1997.

RISO P.; VISIOLI, F.; GARDANA, C.; GRANDE, S.; BRUSAMOLINO, A.; GALVANO, F.; GALVANO, G.; PORRINI, M.; Effects of blood orange juice intake on antioxidant bioavailability and on different markers related to oxidative stress. **J Agric Food Chem**, 53(4): 941-7, 2005

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; JIMÉNES, J.P.; CALIXTO, F.D.S. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP) **Embrapa Agroindústria Tropical**, 125 (1): 1-4, 2006.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **J Nutr**, 130(8):2073-85, 2000.

SCALBERT, A.; MORAND, C.; MANACH, C.; RÉMÉSY, C. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. **Biomed & Pharmacother**, 56: 276-82, 2002.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **Eur J Biochim**, 215(2): 213-19, 1993.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C,  $\beta$ -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **Am J Clin Nutr**, 62 (6): 1315-21, 1995.

SILVA, C.S.E.S. **Plantas utilizadas como chás com propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes**. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Lusófona de Humanidade e Tecnologias, Lisboa, 2012.

SIVAM, G. Analysis of flavonoids. **Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals**. 2ª edição. Danvers: CRC Press, 2002. p.350- 410.

SOARES, D.G.; ANDREAZZA, A.C.; SALVADOR, M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *saccharomyces cerevisia*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 41(1): 95- 100, 2005.

SPENCER, J. P. E. ; CHOWRIMOOTOO, G. ; CHOUDHURY, R.; DEBNAM, E.S. ; SRAI, S.K. ; RICE-EVANS, C. The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. **FEBS Lett**, 458: 224-30, 1999.

TIRKEY, N.; PILKHWAL, S.; KUHAD, A.; CHOPRA, K. Hesperidin, a citrus bioflavonoid decrease the oxidative stress produced by carbon tetrachloride in rat liver and kidney. **BMC Pharmacol**, 31: 2-5, 2005.

TWISK, J.; GILLIAN-DANIEL, D.L.; TEBON, A.; WANG, L.; BARRETT, P.H.; ATTIE, A.D. The role of the IDL receptor in apolipoprotein b secretion. **J Clin Invest**, 105 (4): 521-32, 2000.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; BENFATO, V.M.M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, antioxidante e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua detecção. **Quim Nova**, 30 (5): 1323-38, 2007.

VINUEZA, J. C.; FARIA J.B.; CÉSAR, T.B. Hesperidina Diminui Colesterol Sanguíneos com Ratos Alimentados com Gordura Saturada. **Alim Nutr Araraquara** 19 (4): 473-9, 2008

VISOLI, F.; GALLI, C.; BORNET, F.; MATTEI, A.; PATELLI, R.; GALLI, G.; CARUSO, D. Olive Oil Phenol are Dosage Dependently Absorbed in Humans. **FEBS Lett** 468 (2-3):159-160, 2000.

WALLE, T.; WALGREN, R.A.; WALLE, U.K.; GALIJATOVIC, A.; VAIDYANATHAN, J.B. Understanding the bioavailability of flavonoids through studies in Caco-2 cells. In: Rice-Evans C, Packer L. **Flavonoids in health and disease**. New York: Marcel Dekker, 2003. p. 349-362.

WILCOX, L. J.; PADA, D.S.; SALVADOR, M. Secretion of hepatocyte apoB is inhibited by the flavonoids, naringenin and hesperetin, via reduced activity and expression of ACAT2 and MTP. **J Lipid Res**, 42: 725-34, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Technical Report Series 916 – Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. **Joint WHO/FAO Expert Consultation**. Geneva: World Health Organization, 2011.

YAMADA, M.; TANABE, F.; ARAI, N.; MITSUZUMI, H.; MIWA, Y.; KUBOTA, M.; CHAEN, H.; KIBATA, M. Bioavailability of glucosyl hesperidin in rats. **Biosci Biotechnol Biochem**, 70(6):1386–94, 2006.

YAMAMOTO, M.; SUZUKI, A.; HASE, T. Short-term effect of glucosyl hesperidin and hesperitina on blood pressure and vascular endothelial function in spontaneously hypertensive rats. **J Nutr Sci Vitaminol**, 54: 95-8, 2008.

YANG, C.S.; LANDAU, J.M.; HUANG, M.T.; NEWMARK, H.L.; Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annu Rev Nutr**, 21: 331-406, 2001.

YANG, H.L.; CHEN, S.C.; KUMAR, K.J.S.; YU, K.N.; CHAO, P.D.L.; TSAI, S.Y.; HOU, Y.C.; HSEU, Y.C. antioxidant and anti-inflammatory potential of hesperitina metabolites obtained from hesperitina administered rat serum: an in vivo approach. **J Agric Food Chem**, 60: 522-52, 2012.

YASIM, A.;ÖZBAĞ,D.; KILINÇ, M.; ÇIRALIK, H.; TORU, I.The effect of diosmin-hesperidin combination treatment on the lipid profile and oxidative antioxidative system in high- cholesterol diet fed rats. **Turkish J Thoracic and Cardio Surg**, **19** (1): 55-61, 2011.

ZANNIS, V.I.; CHRONI, A.; KYPREOS, K.E.;; KAN, H.Y.; CESAR, T.B.;; ZANNI ,E.E.; KARDASSIS, D. Probing the pathways of chylomicron and hdl metabolism using adenovirus-mediated gene transfer. **Curr Opin Lipidol**, **15** (2):151- 66, 2004.