

VERÔNICA TRÍCOLI DE SOUZA

AVALIAÇÃO DO PERFIL LIPIDÔMICO, DA  
LIPOPEROXIDAÇÃO E BIODISPONIBILIDADE EM  
RATOS SUPLEMENTADOS COM HESPERITINA E  
SEUS DERIVADOS GLICOSILADOS

Bragança Paulista

2015

VERÔNICA TRÍCOLI DE SOUZA

AVALIAÇÃO DO PERFIL LIPIDÔMICO, DA  
LIPOPEROXIDAÇÃO E BIODISPONIBILIDADE EM  
RATOS SUPLEMENTADOS COM HESPERITINA E  
SEUS DERIVADOS GLICOSILADOS

ORIENTADORA

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. PATRÍCIA DE OLIVEIRA CARVALHO

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

Bragança Paulista

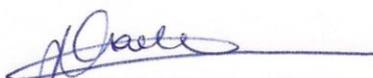
2015

QV 325 Souza, Verônica Tricoli de.  
S719a Avaliação do perfil lipidômico, da lipoperoxidação e biodisponibilidade em ratos suplementados com hesperitina e seus derivados glicosilados / Verônica Tricoli de Souza. -- Bragança Paulista, 2015.  
86 p.

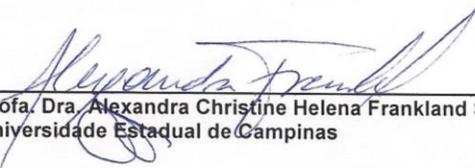
Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.  
Orientação de: Patrícia de Oliveira Carvalho.

1. Hesperidina. 2. Fosfolípidos. 3. Composição de ácidos graxos. 4. Dieta hiperlipídica. 5. Biodisponibilidade. 6. Ratos. I. Carvalho, Patrícia de Oliveira. II. Título.

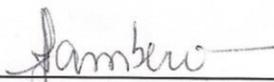
SOUZA T., Verônica, “Avaliação do perfil lipídômico, da lipoperoxidação e biodisponibilidade em ratos suplementados com hesperitina e seus derivados glicosilados”. Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em dezenove de fevereiro de dois mil e quinze pela Banca examinadora constituída pelos professores:



\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Patricia de Oliveira Carvalho  
Universidade São Francisco



\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya  
Universidade Estadual de Campinas



\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Alessandra Gambero  
Universidade São Francisco



**Apoio Financeiro: FAPESP**  
**Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo**  
**Processo: 2012/11050-6**

Dedico este trabalho à Regina, minha mãe e  
ao querido André por estarem presentes em  
minha vida; e aos que sempre olham por mim:  
Ica, Mingo, Landa e Gino  
*in memoriam*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus e ao Arcanjo Miguel por me protegerem e me guiarem.

À minha mãe Regina Helena Tricoli por fazer todo o possível e impossível para que meus objetivos se realizem e ao meu namorado André Lucas Pereira por toda força, ajuda, incentivos incansáveis e compreensão com minhas distrações e ausências.

A meu pai Antonio Carlos de Souza, minha sogra Marli Lucas, familiares, irmãos e amigos pelo incentivo e por perdoarem minhas faltas, em especial às tias Inez Triccoli e Rose Tricoli por sempre me apoiarem e ajudarem com tudo o que podem.

À Cia Mu-danças, Rosa de Istambul, Caminhos Dançantes; Cia de Dança e Adoração Movimento Livre, Linguagens da Dança, Ucha, Nina e Baco por me proporcionarem equilíbrio, paz de espírito e entusiasmo.

Aos colegas das disciplinas, e aos amigos e companheiros do laboratório multidisciplinar por toda a ajuda, companhia e risadas; principalmente Márcia C. F. Messias por ser tão amiga e prestativa, Jussara Ziegler pelo companheirismo e amizade, Cíntia R. P. Caria pela troca de conhecimentos e participação em publicação e Vivien Bonadio pelo auxílio com as coletas.

A todos os técnicos dos laboratórios e do biotério; principalmente ao responsável Fabiano Sallowics por toda a ajuda e paciência, além de boa vontade em ensinar.

A todos os professores da Pós, especialmente aos professores do multi: Denise Priolli, Thalita Rocha, Mario Claudino e Fernanda Priviero pelos auxílios, empréstimos e dicas, sempre procurando aperfeiçoar os experimentos; à professora Natalia Miyasaka e aluna Camila Ronqui Rodrigues por disponibilizarem de equipamento e tempo para me auxiliar; e ao Laboratório de Farmacologia da Unicamp pelo sacrifício dos animais.

Agradeço imensamente Alexandra C. H. F. Sawaya e Ildenize B. S. Cunha e ao Departamento de Biologia Vegetal do Instituto de Biologia e Laboratório Thompson do Instituto de Química da Unicamp pelas análises.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão da bolsa de mestrado (processo 2012/11050-6) e à Universidade São Francisco por todos esses anos de conhecimento adquirido, além da concessão do desconto na mensalidade; à Vilma Aparecida Tescke e Tatine Martins de Oliveira pela boa vontade e paciência e também à professora Alessandra Gambero pelo apoio. Também agradeço à CNPQ e CAPES pelo suporte.

Finalmente e principalmente agradeço a professora Patrícia de Oliveira Carvalho pela orientação, paciência e carinho, e por tornar essa conquista possível.

*“O atrativo do conhecimento seria pequeno se no caminho que a ele conduz não houvesse que vencer tanto pudor... ainda que não haja fatos eternos, como nenhuma verdade é absoluta ”*

*Friedrich Nietzsche*

## RESUMO

Estudos têm demonstrado que o consumo de flavonoides, potentes antioxidantes da dieta, pode produzir uma ação protetora contra os processos oxidativos que ocorrem no organismo. A hesperidina (HD) é um flavonoide glicosilado presente nas frutas cítricas com propriedades antioxidante, anti-inflamatória, anticarcinogênica e hipolipidêmica. Alguns relatos indicam que a retirada da fração glicosídica (aglicona hesperitina, HT) ou a inserção de uma molécula de glicose (glicosil-hesperidina, G-HD) pode alterar a sua bioatividade e biodisponibilidade. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação (0,5 mmol/kg/dia por 8 semanas) destes flavonoides (G-HD, HD e HT) no perfil lipidômico e na lipoperoxidação hepática em ratos alimentados com dieta hiperlipídica associada à frutose. Além disto, os metabólitos conjugados ao ácido glucurônico no plasma foram monitorados para avaliar a biodisponibilidade dos compostos. O perfil lipidômico foi avaliado por cromatografia a gás (CG) e por espectrometria de massas com ionização ambiente por *sonic-spray* (EASI-MS) e a peroxidação lipídica através da determinação das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS). A biodisponibilidade foi avaliada por cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (UHPLC-MS). Os resultados evidenciaram aumento no conteúdo total de lípidos hepáticos, aumento nos níveis de ácido oleico nas frações de triacilglicerol e ésteres de colesterol e redução dos ácidos graxos poli-insaturados da família n-3 (18:3, 22:5 e 22:6), o que refletiu no aumento da relação AGPI n-6/n-3 no fígado dos animais alimentados com dieta hiperlipídica (DHIPER) comparado a dieta normocalórica (DNORMO). Os antioxidantes parecem exercer um pequeno efeito sobre a composição de ácidos graxos, levando a redução dos níveis de ácido esteárico nos fosfolípides com o uso de G-HD e HD e redução de AGPI n-6 nos triacilgliceróis e nos ésteres de colesterol na presença de HT. A caracterização do perfil das frações por EASI-MS mostrou que a DHIPER levou a uma acentuada prevalência de triacilgliceróis contendo os ácidos palmítico e oleico, a DNORMO a prevalência de moléculas de fosfatidilcolina e não foi possível evidenciar alterações no perfil lipídico hepático após a suplementação com os antioxidantes. A suplementação dos animais com G-HD e HT levou a uma redução significativa nos níveis hepáticos de TBARS, e também foram detectados níveis superiores de metabólitos conjugados de hesperitina com ácido glucurônico no plasma destes animais. Os resultados evidenciam que a G-HD e a HT são mais eficientes do que a HD em reduzir a lipoperoxidação hepática provocada pela ingesta da DHIPER, efeito possivelmente associado a maior concentração de metabólitos antioxidantes presentes no plasma destes animais.

**Palavras-chave:** hesperidina, fosfolípides, composição de ácidos graxos, dieta hiperlipídica, biodisponibilidade

## ABSTRACT

Studies have shown that the consumption of flavonoids, powerful dietary antioxidants, can protect against oxidative processes that occur in the organism. Hesperidin (HD) is a glycosylated flavonoid present in citrus fruits and it has antioxidant, anti-inflammatory, anti-carcinogenic and hypolipidemic properties. Some reports have shown that the removal of the glucosyl fraction (the aglycone, hesperetin - HT) or the insertion of a glucose molecule (glucosyl-hesperidin, G-HD) can alter its bioactivity and bioavailability. Thus, the study seeks to assess the effects of supplementation (0.5 mmol/kg/day for 8 weeks) with these flavonoids (G-HD, HD and HT) on the lipidomic profile and on hepatic lipid peroxidation in rats fed with a hyperlipidic diet associated to fructose. In addition, metabolites conjugated to glucuronic acid in the plasma were monitored to assess the compounds' bio-availabilities. The lipidomic profile was evaluated using gas chromatography (GC). Easy Ambient Sonic- spray Ionization with mass spectrometry (EASI-MS) was used to ionize the environment. Lipid peroxidation was determined by Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) assay. Bio-availability was assessed using ultra high performance liquid chromatography coupled to a mass spectrometer (UHPLC-MS). The results showed evidence of an increase in total hepatic lipids, increased oleic acid levels in the triacylglycerol and cholesterol esters fractions and a reduction of poly-unsaturated fatty acids of the n-3 (18:3, 22:5 and 22:6) family, reflecting an increased AGPI n-6/n-3 ratio in the livers of animals kept on a hyperlipidic diet (DHIPER) compared to those on a normal calories diet (DNORMO). The antioxidants seem to have a slight effect on the fatty acid composition with G-HD and HD reducing stearic acid in the phospholipids, and a reduction of AGPI n-6 in the triacylglycerols and in the cholesterol esters in the presence of HT. The delineation of the EASI-MS fraction profiles showed that the DHIPER led to an accentuated prevalence of triglycerides containing palmitic and oleic acids. The DNORMO led to the prevalence of phosphatidylcholine molecules and there was no evidence found of alterations to the hepatic lipids profile after supplementation with antioxidants. Supplementation of the animals' diet with G-HD and HT led to a significant reduction in hepatic levels of TBARS and higher levels of conjugated metabolites of hesperetin with glucuronic acid were found in the plasma of those animals. The results show that G-HD and HT are more efficient than HD in reducing hepatic lipids peroxidation provoked by the ingestion of DHIPER; an effect that may be associated to the greater concentration of antioxidant metabolites present in the plasma of those animals.

**Keywords:** hesperidin, phospholipids, fatty acid composition, hyperlipidic diet, bioavailability.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\lambda$	comprimento de onda
Acetil-CoA	aceti coenzima a
ACP	proteína carreadora de acil
AGMI	ácidos graxos mono-insaturados
AGNE	ácidos graxos não esterificados
AGPI	ácidos graxos poli-insaturado
AGS	ácidos graxos saturados
AIN	American Institute of Nutrition
ASC	área sobre a curva
BF <sub>3</sub>	trifluoreto de boro
BHT	butil hidroxil tolueno
Ca	calico
CAT	catalase
CEMIB	Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas
CG	cromatografia a gás
CoA	coenzima a
COX	cicloxigenases
CYP	citocromo p450
DHA	ácido docosahexaenoico
DHUPER	dieta hiperlipídica
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNORMO	dieta normocalórica
EASI-MS	espectrometria de massas com ionização ambiente por <i>sonic-spray</i>
EC	ésteres de colesterol
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EPA	ácido eicosapentaenoico
ERO	espécie reativa de oxigênio
FAD	dessaturases de ácidos graxos
FAME	ésteres metílicos de ácidos graxos
FC	fosfatidilcolina
FE	fosfatidiletanolamina
FL	fosfolípidos
G-HD	glicosil-hesperidina
GE	gordura epididimal
GPx	glutathione peroxidase
GRd	glutathione reductase
GSH	glutathione reduzida
GSSG	glutathione oxidada
H•	radical hidrogênio

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrogênio
HD	hesperidina
HMG	hidroxi-3-methyl-glutaril
HT	hesperitina
IMC	índice de massa corporal
L•	radical lipídico
LH	ácido graxo poli-insaturado
LO•	radical alcoxila
LO <sub>2</sub> •	radical peroxila
LOO•	radical peroxila
LOOH	hidroperóxidos lipídicos
LOOL	hidroperóxido de ácido graxo
LOX	lipoxigenase
LPO	lipoperoxidação
LT	leucotrieno
LTH	lipídeos totais hepático
MDA	malondialdeído
MS-MS	espectro de massa-massa
N <sub>2</sub>	gás nitrogênio
NADPH	fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
nm	nanômetro
NOX	fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida oxidase
O•	radical de oxigênio livre ou oxigênio <i>singlet</i>
O <sub>2</sub>	oxigênio
O <sub>2</sub> •	radical superóxido
OH•	radical hidroxila
PE	polietileno
PG	prostaglandina
R•	radical livre
RH	radical ligado ao hidrogênio
rpm	rotações por minuto
SGLT-1	transportador lincado a glicose e sódio
<i>sn</i>	numeração estereoquímica
SOD	superóxido dismutase
SPE	extração em fase sólida
TAG	triacilglicerol
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TMP	tetrametoxipropano
TX	tromboxano
UHPLC	cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Classificação e funções dos lipídeos*	03
Quadro 2. Lista dos principais ácidos graxos naturais e seus pontos de fusão	04
Tabela 1. Principais grupos de flavonoides, compostos individuais e fontes alimentícias	27
Tabela 2. Suplementação e dieta dos animais	38
Tabela 3. Composição nutricional das dietas	39
Tabela 4. Composição de ácidos graxos (% relativa) das dietas	39
Tabela 5. Peso dos animais, ganho de peso, gordura epididimal e relação peso animal/gordura epididimal de animais controles e suplementados com hesperitina e seus derivados glicosilados	48
Tabela 6. Lipídeos totais hepático e relação peso animal/lipídeos totais hepático de animais controles e suplementados com hesperitina e seus derivados glicosilados	48
Tabela 7. Composição de ácidos graxos (% relativa) dos lípides totais no fígado de animais controles e suplementados com hesperitina e seus derivados glicosilados	51
Tabela 8. Composição de ácidos graxos (% relativa) nos fosfolípides presentes nas membranas (fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina) do fígado de animais controles e suplementados com hesperitina e seus derivados glicosilados	54
Tabela 9. Composição de ácidos graxos (% relativa) de triacilgliceróis (TAGs) presentes no fígado de animais controles e suplementados com hesperitina e seus derivados glicosilados	56
Tabela 10. Composição de ácidos graxos (% relativa) de ésteres de colesterol (EC) presentes no fígado de animais controles e suplementados com hesperitina e seus derivados glicosilados	57
Tabela 11. Perfil dos principais lípides hepáticos de ratos obtidos por EASI(+)-MS	64
Tabela 12. Concentração dos dois isômeros da hesperitina-glucuronídeo determinados no plasma dos animais 6 e 9 horas após a administração de G-HD, HD e HT	73

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ácido graxo saturado (A); ácido graxo insaturado (B)	05
Figura 2. Polaridade da molécula de ácido graxo	06
Figura 3. Nomenclatura IUPAC (A); Nomenclatura ômega (B)	06
Figura 4. Principais classes de lípides de armazenamento e de membrana	07
Figura 5. Estrutura de um triacilglicerol misto com destaque para o glicerol (A), estrutura dimensional do mesmo (B), síntese do triacilglicerol (C)	09
Figura 6. Estrutura dos principais fosfolípidos de membrana da célula animal: fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol (A). Estrutura molecular da fosfatidilcolina com os ácidos graxos esteárico e oleico (B)	10
Figura 7. Estrutura básica do colesterol	11
Figura 8. Formação de éster de colesterol a partir de uma molécula de colesterol e um ácido graxo saturado	12
Figura 9. Esquema do processo de alongação e dessaturação dos ácidos graxos linoleico e linolênico com a produção de prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos	14
Figura 10. Síntese de ácidos graxos	16
Figura 11. Quadro e gráfico da classificação internacional de adulto baixo peso, sobrepeso e obesidade de acordo com IMC	18
Figura 12. Respiração mitocondrial e a redução de O <sub>2</sub> em H <sub>2</sub> O	21
Figura 13. Etapas da lipoperoxidação	23
Figura 14. Integração dos sistemas de defesa enzimáticos	24
Figura 15. Estrutura geral dos flavonoides e numeração comum	25
Figura 16. Estrutura de alguns grupos de flavonoides	26
Figura 17. Estrutura da hesperitina, hesperidina e glicosil-hesperidina	30
Figura 18. Caminhos metabólicos da glicosil-hesperidina e hesperidina	35
Figura 19. Divisão dos animais nos grupos experimentais	38

Figura 20. Curva padrão para determinação da concentração de malondialdeído a partir de tetrametoxipropano.	43
Figura 21. Gordura epididimal (% em relação ao peso animal) de ratos controles e suplementados com hesperitina e seus derivados glicosilados.	49
Figura 22. Lipídeos totais hepático (% em relação ao peso animal) de ratos controles e suplementados com hesperitina e seus derivados glicosilados.	49
Figura 23. Composição de ácidos graxos (%) dos lípides totais (A) e das frações de fosfolípides (B), triacilgliceróis (C) e ésteres de colesterol (D) dos grupos controles e suplementados com hesperitina e seus derivados glicosilados.	61
Figura 24. Composição dos principais ácidos graxos (%) das frações de fosfolípides (FL), triacilgliceróis (TAG) e ésteres de colesterol (EC) dos grupos controle DHIPER e suplementados com hesperitina e seus derivados glicosilados.	62
Figura 25. Espectros de massas dos lípides hepáticos de ratos controle DNORMO (A) e DHIPER (B) obtidos por EASI(+)-MS	65
Figura 26. Espectros de massas dos lípides hepáticos de ratos suplementados com G-HD (A), HD (B) e HT (C) obtidos por EASI(+)-MS	66
Figura 27. Reação do malondialdeído (MDA) com o ácido tiobarbitúrico (TBA) para formação de um cromógeno de cor rosa	68
Figura 28. Concentração de malondialdeído (nM/g de tecido) em fígados de ratos controles e suplementados com hesperitina e seus derivados glicosilados.	69
Figura 29. Cromatogramas obtidos por UHPLC-MS do plasma de animais após 6 horas de administração de G-HD (A), HD (B) e HT (C)	71
Figura 30. Espectro de massa MS-MS da hesperitina-glucoronídeo demonstrando $m/z$ 477 e aglicona gerada após colisão da molécula ( $m/z$ 301)	72

## LISTA DE ÁCIDOS GRAXOS

C8:0	Ácido caprílico
C10:0	Ácido cáprico
C12:0	Ácido láurico
C14:0	Ácido mirístico
C15:0	Ácido pentadecanoico
C16:0	Ácido palmítico
C16:1 n-7	Ácido palmitoleico
C17:0	Ácido heptadecanoico
C18:0	Ácido esteárico
C18:1 n-9	Ácido oleico
C18:2 n-6	Ácido linoleico
C18:3 n-6	Ácido gama-linolênico
C18:3 n-3	Ácido alfa-linolênico
C20:1 n-9	Ácido eicosaenoico
C20:2 n-6	Ácido eicosadienoico
C20:3 n-3	Ácido eicosatrienoico
C20:3 n-6	Ácido dihomo-gama-linolênico
C20:4 n-6	Ácido araquidônico
C20:5 n-3	Ácido eicosapentaenoico
C22:1 n-9	Ácido erúcico
C22:5 n-3	Ácido docosapentaenoico
C22:6 n-3	Ácido docosahexaenoico
C23:0	Ácido tricosanoico
C24:0	Ácido lignocérico
C24:1 n-9	Ácido nervônico

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	01
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	03
2.1 Lípidos	03
2.1.1 Ácidos Graxos	04
2.1.1.1 Nomenclatura e classificação	04
2.1.1.2 Funções dos ácidos graxos no organismo e as frações lipídicas	08
2.1.1.3 Síntese de lípidos pelo organismo	15
2.1.1.4 Influência da dieta no perfil lipídico plasmático e tecidual	17
2.1.1.5 Estresse oxidativo, lipoperoxidação e sistema de defesa antioxidante	20
2.2 Flavonoides	25
2.2.1 Flavonoides e sua ação antioxidante	28
2.2.2 Hesperitina e seus derivados glicosilados	29
2.2.2.1 Biodisponibilidade da hesperitina e derivados glicosilados	31
<b>3 OBJETIVOS</b>	36
3.1 Objetivo Geral	36
3.2 Objetivos Específicos	36
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	37
4.1 Preparo das soluções	37
4.2 Animais e tratamento	37
4.3 Sacrifício dos animais, obtenção do plasma e tecidos.	38
4.4 Preparo do homogenato dos tecidos hepáticos	40
4.5 Análise lipídica do tecido hepático	40
4.5.1 Extração dos lipídeos totais	40
4.5.1.2 Quantificação dos lipídeos totais	40
4.5.2 Separação das classes de lípidos por extração em fase sólida	40
4.5.3 Determinação da composição de ácidos graxos por cromatografia a gás	41

4.5.4 Caracterização do perfil de lípidos por EASI-MS (espectrometria de massas com ionização ambiente por <i>sonic-spray</i> )	42
4.6 Quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no fígado	42
4.7 Biodisponibilidade da glicosil-hesperidina, hesperidina e hesperitina	43
4.7.1 Tratamento dos animais	43
4.7.2 Obtenção do plasma	44
4.7.3 Quantificação dos metabólitos por UHPLC-MS (cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas)	44
4.8 Análise estatística	45
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	46
5.1 Relação peso total, gordura epididimal e lípidos totais hepáticos dos animais	46
5.2 Composição de ácidos graxos dos lípidos totais do fígado	50
5.3 Composição de ácidos graxos das frações de lípidos do fígado separadas por SPE	53
5.4 Perfil de lípidos hepáticos caracterizados por EASI-MS	63
5.5 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no fígado dos animais	68
5.6 Identificação e quantificação dos metabólitos no plasma dos ratos	70
<b>6 CONCLUSÕES</b>	75
<b>7 REFERÊNCIAS</b>	76
<b>8 ANEXO</b>	86
Parecer do comitê de ética no uso de animal em pesquisa da Universidade São Francisco – Bragança Paulista.	86

## 1 INTRODUÇÃO

É de conhecimento que doenças cardiovasculares podem ser causadas através de alterações no metabolismo lipídico sérico e tecidual promovidas pelos ácidos graxos saturados, colesterol e carboidratos provenientes da dieta. Tanto o grau de saturação, como o tamanho da cadeia dos ácidos graxos e as suas distribuições posicionais nas moléculas de triacilgliceróis exercem efeitos significativos sobre a colesterolemia e lípidos celulares (Almeida *et al.* 2011; Araya *et al.* 2004).

Um grande fator que agrava as consequências na saúde de um indivíduo em situação de obesidade é a geração de espécies reativas de oxigênio (Barbosa *et al.* 2010). Os adipócitos produzem uma variedade de moléculas biologicamente ativas, adipocitocinas ou adipocinas, cuja produção desregulada está relacionada com o stress oxidativo e à patogenicidade de diversas doenças (Furukawa *et al.* 2004). Relatos indicam que o estresse oxidativo é o principal elo de associação entre dietas hiperenergéticas com o desenvolvimento de câncer, doenças degenerativas relacionadas ao envelhecimento, dislipidemia, aterosclerose e doenças cardiovasculares (Barbosa *et al.* 2010).

É conhecido que ácidos graxos insaturados nas membranas celulares podem ser oxidados na presença de espécies reativas de oxigênio. A oxidação leva à quebra de cadeias de ácidos graxos e compromete a integridade da membrana celular (Ji *et al.* 1998). O grau de insaturação do ácido graxo facilita o aparecimento de espécies reativas de oxigênio, sendo os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) mais susceptíveis à oxidação. A fluidez da membrana relaciona-se à presença de cadeias insaturadas dos fosfolípidos e do colesterol e o ataque das espécies reativas de oxigênio às cadeias de AGPI inicia o processo de lipoperoxidação (Franco, 2007).

A hesperidina (HD) ( $C_{28}H_{34}O_{15}$ , 610.57 g/mol) é um flavonoide glicosilado composto por uma aglicona hesperitina (HT) ( $C_{16}H_{14}O_6$ , 302.27 g/mol) ligada à glicose e ramnose. Apresenta-se em estado sólido e possui baixa solubilidade em água (Vinueza *et al.* 2008). A literatura atribui à hesperidina diversas propriedades como antioxidante, anti-inflamatória, anticarcinogênica, hipolipidêmica, vasoprotetora, entre outras (Emin *et al.* 1994). É quase exclusivamente encontrada em frutas cítricas e em altas

concentrações em cascas e partes membranosas da fruta, como no caso do albedo da laranja (Bok *et al.* 1999).

A forma sintética da hesperidina chamada de glicosil-hesperidina (G-HD) ( $C_{34}H_{44}O_{20}$ , 772.70 g/mol) foi sintetizada associando mais uma molécula de glicose na hesperidina. A glicosil-hesperidina é uma molécula mais hidrofílica, sendo considerada 10 mil vezes mais solúvel em água que a hesperidina (Yamada *et al.* 2006). Embora tenha mostrado perfil farmacocinético semelhante ao da hesperidina, mostrou ser absorvida mais rapidamente que a hesperidina (Yamada *et al.* 2006).

É conhecido que a natureza da glicosilação do flavonoide influencia tanto sua ação biológica quanto sua absorção pelo organismo. As formas agliconas dos flavonoides podem ser absorvidas diretamente a partir do intestino delgado (Heim *et al.* 2002), enquanto as formas glicosídicas requerem hidrólise preliminar por enzimas intestinais ou pela microflora do cólon (Scalbert & Williamson, 2000). Embora o metabolismo intestinal propicie a retirada das frações glicosídicas dos derivados glicosilados, relatos anteriores mostraram maior biodisponibilidade da hesperitina (Li *et al.* 2008) e da hesperitina 7-glicosídeo (Nielsen *et al.* 2006; Habauzit *et al.* 2009) comparada a hesperidina.

Relatos anteriores têm mostrado que parece existir uma relação entre a presença de antioxidantes na dieta e a capacidade de incorporação tecidual dos ácidos graxos (Moreira e Mancini-Filho, 2004; Martins *et al.* 2009) e de proteção à lipoperoxidação (Frémont *et al.*, 1998; de Oliveira, 2013; Pereira *et al.*, 2014). Embora seja amplamente relatada a importância antioxidante dos flavonoides, este estudo foi motivado pela necessidade de contribuir no conhecimento sobre o efeito destes flavonóides no perfil lipidômico e na lipoperoxidação, avaliados em animais alimentados com dieta hiperlipídica associada à frutose, conhecida por aumentar os níveis de lípidos hepáticos (Castro *et al.* 2011).

Assim, este estudo teve como objetivo principal avaliar o efeito da suplementação de hesperitina e de seus derivados glicosilados (hesperidina e Glicosil-hesperidina) no perfil lipidômico e na lipoperoxidação em fígado de ratos *Wistar* alimentados com dieta hiperlipídica associada à frutose e também verificar a biodisponibilidade desses flavonoides no plasma dos animais.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Lípidos

Lípidos são compostos orgânicos pouco solúveis em água e solúveis em solventes não-polares, como hidrocarbonetos ou álcoois. No corpo humano agem como formas de reserva e transporte de energia, além de serem componentes estruturais das membranas celulares. Eles abrangem um grupo heterogêneo de substâncias, e dentre eles estão os óleos e as gorduras da dieta, juntamente com os fosfolípidos presentes nas membranas celulares. São classificados de acordo com as suas funções, como descrito no Quadro 1 (Montgomery *et al.* 1994; Coultate, 2004).

Quadro 1. Classificação e funções dos lipídeos\* (Montgomery *et al.* 1994).

Lípido	Função
1. Ácidos Graxos	Combustível metabólico, unidades estruturais de outros lípidos
2. Acilgliceróis	Armazenamento e transporte de ácidos graxos, intermediários metabólicos e regulação
3. Fosfolípidos	Estrutura de membrana, transdução de sinal de membrana, armazenamento de ácido araquidônico
4. Esfingolípidos	Estrutura de membrana, antígenos de superfície
5. Corpos cetônicos	Combustível metabólico

\*Outros lipídeos: vitaminas lipossolúveis, colesterol e ácidos biliares, hormônios esteroides, prostaglandinas e produtos das lipoxigenases.

Além de uma importante fonte de energia para o corpo, os lípidos também fornecem a barreira hidrofóbica que permite a partição dos conteúdos aquosos das células e de estruturas subcelulares. Atuam em diversas funções do organismo, como as vitaminas lipossolúveis regulatórias; e as prostaglandinas e os hormônios esteroides exercem papéis fundamentais no controle da homeostasia do organismo (Harvey e Ferrier, 2012).

## 2.1.1 Ácidos Graxos

### 2.1.1.1 Nomenclatura e classificação

Ácidos graxos são ácidos carboxílicos com uma cadeia carbônica de 2 a 24 carbonos, geralmente apresentados em números pares, sem ramificações, saturados ou contendo uma ou mais insaturações, como demonstrado no Quadro 2.

Quadro 2. Principais ácidos graxos naturais e seus pontos de fusão (adaptação de Marzocco e Torres, 1990; Montgomery *et al.* 1994; Harvey e Ferrier, 2012 e Ciconini, 2012).

Ácidos graxos Nome Comum	Número de átomos de carbono			T (°C) Fusão
<b>Saturados</b>				
Butírico	4			7,9
Caprílico	8			17,2
Mirístico	14			52,0
Palmítico	16			63,1
Esteárico	18			69,1
Araquídico	20			75,4
Lignocérico	24			84,2
<b>Insaturados</b>		<b>Insaturações</b>	<b>Classe</b>	
Palmitoleico	16	$\Delta^9$	$\omega$ -7	- 0,5
Oleico	18	$\Delta^9$	$\omega$ -9	13,2
Linoleico	18	$\Delta^{9.12}$	$\omega$ -6	- 9,0
$\alpha$ -Linolênico	18	$\Delta^{9.12.15}$	$\omega$ -3	- 17,0
$\gamma$ -Linolênico	18	$\Delta^{6.9.12}$	$\omega$ -6	- 17,0
Araquidônico (AA)	20	$\Delta^{5.8.11.14}$	$\omega$ -6	- 49,5
Eicosapentaenoico (EPA)	20	$\Delta^{5.8.11.14.17}$	$\omega$ -3	
Docosahexaenoico (DHA)	22	$\Delta^{4.7.10.13.16.19}$	$\omega$ -3	

\* A designação “ $\omega$ ” indica a localização da primeira dupla ligação a partir da extremidade metil da molécula; os números subscritos no  $\Delta$  indicam a posição das duplas ligações a partir da extremidade carboxil da molécula.

O número de carbonos que compõe a cadeia carbônica define se o ácido graxo será de cadeia curta (dois a quatro átomos de carbono), média (seis a dez átomos de carbono) ou longa (acima de doze átomos de carbono) (Milinsk, 2007; Fennema, 1996). Há também autores que utilizam a nomenclatura cadeia muito longa, para os ácidos graxos que possuem mais do que 20 carbonos em sua cadeia (Martin *et al.* 2006).

Os ácidos graxos com uma única dupla ligação são denominados monoinsaturados, enquanto aqueles com duas ou mais duplas ligações são denominados ácidos graxos poli-insaturados, os quais são classificados comumente em grupos  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6, de acordo com a distância que a primeira ligação aparece em relação ao grupo metila terminal. Quando o ácido graxo não possui dupla ligação, é denominado ácido graxo saturado (Baynes e Dominiczak, 2010), como demonstrado na Figura 1.

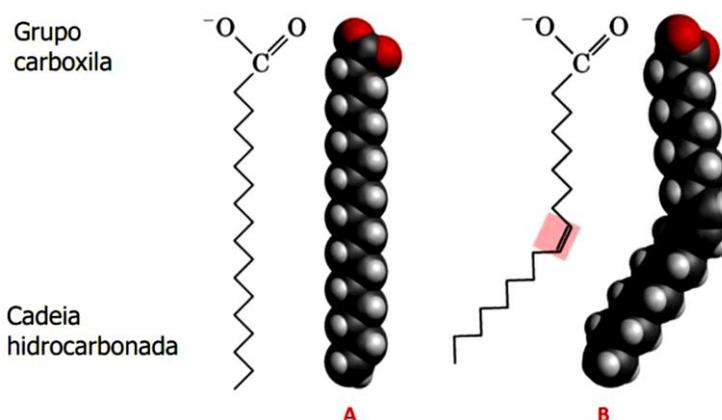


Figura 1. Ácido graxo saturado (A); ácido graxo insaturado (B) (adaptado de Nelson e Cox, 2011).

A cadeia hidrocarbonada dos ácidos graxos possui um grupo carboxila terminal, cuja natureza é anfipática (quando uma região é hidrofílica e outra hidrofóbica) (Figura 2). Quanto maior for essa cadeia, mais elevada é a característica apolar do ácido graxo (Ciconini, 2012).

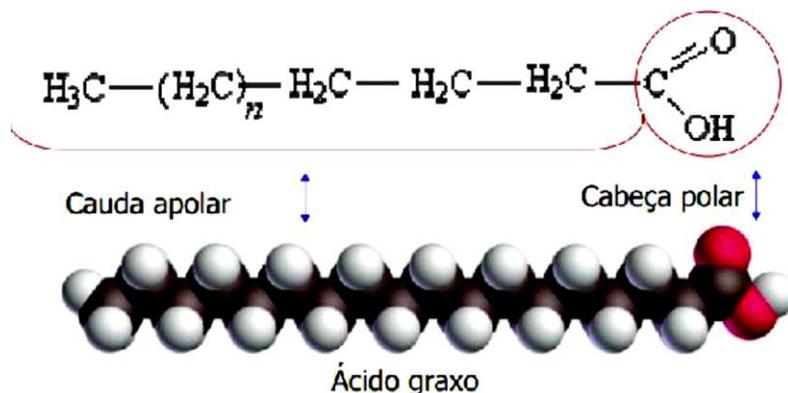


Figura 2. Polaridade da molécula de ácido graxo (adaptado de Ciconini, 2012)

Existem diversas nomenclaturas que podem ser aplicadas a ácidos graxos. Além da nomenclatura sistemática da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, 1979) que é realizada especificando a posição das duplas ligações - numeradas a partir do ácido carboxílico, antes do nome do ácido graxo, há a nomenclatura ômega ( $\omega$ ), onde o átomo de carbono adjacente ao carbono carboxílico é designado  $\alpha$ , e os carbonos seguintes são nomeados  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , etc. O átomo de carbono mais distante do carbono carboxílico é chamado de carbono  $\omega$  e, a partir dele, as duplas ligações são numeradas. A nomenclatura é expressa pelo número da dupla ligação mais próxima ao carbono  $\omega$  que precede o nome do ácido graxo (Figura 3) (Quadro 2) (Ciconini, 2012).

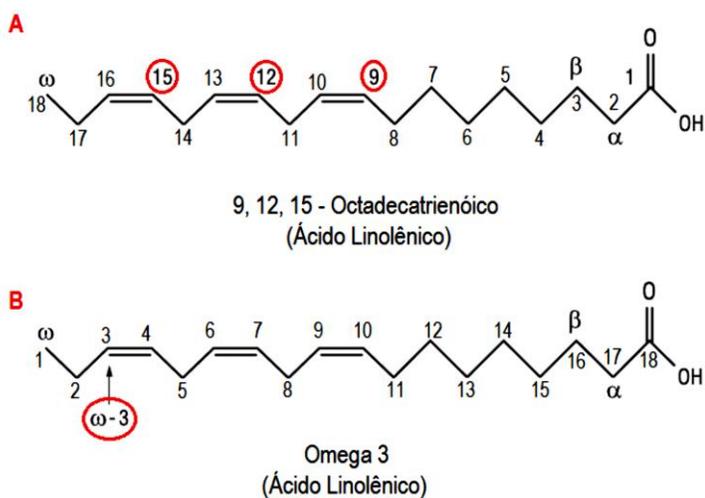


Figura 3. Nomenclatura IUPAC (A); Nomenclatura ômega (B) (adaptado de Ciconini, 2012).

A propriedade física utilizada como parâmetro para identificar ou em aplicação industrial de óleos e gorduras é a temperatura de fusão, que designa a temperatura na qual uma substância passa do estado sólido para o estado líquido. Ela é definida pelo tamanho da cadeia carbônica e a presença e número de insaturações (Ciconini, 2012). O ponto de fusão dos ácidos graxos, assim como o de lípides mais complexos aumenta com o comprimento do ácido graxo, porém diminui com o número de duplas ligações. As duplas ligações *cis* provocam uma torção na estrutura linear do ácido graxo, interferindo com o empacotamento justo, conseqüentemente requerendo uma temperatura mais baixa para congelar-se, ou seja, possui um ponto de fusão mais baixo (Baynes e Dominiczak, 2010)

Raramente os ácidos graxos são encontrados livres no organismo, estando normalmente esterificados a um álcool (glicerol) constituindo os glicerolipídeos, ou ligados por ligação amídica a outro álcool (esfingosina), formando os esfingolipídeos. Quando esterificados ao glicerol, constituem os acilgliceróis, podendo ser mono, di e triacilgliceróis, de acordo com a quantidade de ácidos graxos esterificados que formam sua molécula (Marzzocco e Torres, 1990). A Figura 4 ilustra as principais classes de lípides de armazenamento e de membrana. Quando encontrados na forma livre, os ácidos graxos não esterificados (AGNE) são transportados na circulação associados à albumina (Harvey e Ferrier, 2012).

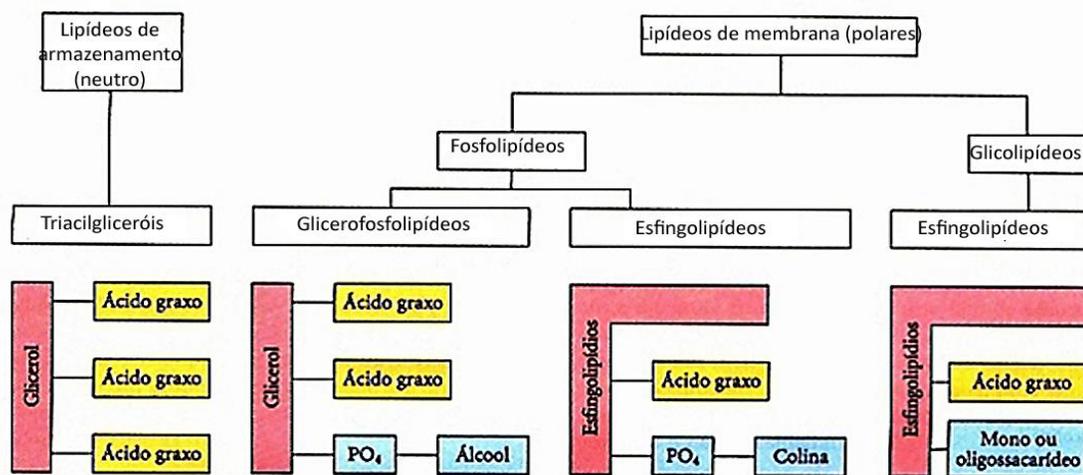


Figura 4. Principais classes de lípides de armazenamento e de membrana (adaptado de Harvey e Ferrier, 2012)

### 2.1.1.2 Funções dos ácidos graxos no organismo e as frações lipídicas

A maioria dos ácidos graxos está presente nos triacilgliceróis (Montgomery, *et al.* 1994), considerados os lipídeos mais simples construídos a partir destes (Nelson e Cox, 2011). Também chamados de triglicerídeos, gorduras, ou gorduras neutras, são compostos por três ácidos graxos, cada um com uma ligação éster e ligados com o mesmo glicerol (Nelson e Cox, 2011, Baynes e Dominiczak, 2010).

Eles são armazenados na forma sólida no tecido adiposo, atuando basicamente como substância de reserva, o que é muito favorável à célula, já que a gordura é rica em energia – na sua oxidação total são liberados 38,13 kJ (9,1 kcal)/g de gordura – e como são insolúveis em água, não contribuem para a pressão osmótica dentro da célula. Os adipócitos dos vertebrados armazenam grandes quantidades de triacilgliceróis em gotículas de gordura que quase preenchem a célula. As pessoas obesas, com 15 a 20 kg de triacilgliceróis depositados em seus adipócitos, poderiam suprir suas necessidades energéticas por meses utilizando seus depósitos de gordura (Nelson e Cox, 2011).

Eles são degradados a glicerol e ácidos graxos em resposta aos sinais hormonais, e a seguir liberados no plasma para o metabolismo em outros tecidos, principalmente músculo e fígado. Sua ligação éster, como em outros glicerolipídeos, é também prontamente hidrolisada *ex vivo* por uma base forte, como o NaOH (saponificação), dando origem ao glicerol e aos ácidos graxos livres. Apesar do glicerol por si só não possuir um carbono quiral, a numeração é padronizada utilizando o sistema de numeração estereoquímico (*sn*), colocando o grupo hidroxila do C-2 (carbono 2) no lado esquerdo; sendo todos os glicerolipídeos derivados do L-glicerol. Os triacilgliceróis são uma mistura de moléculas com composição de diferentes ácidos graxos, onde a distribuição e o tipo de ácido graxo variam de molécula para molécula (Baynes e Dominiczak, 2010).

Os três ácidos graxos que esterificam uma molécula de glicerol normalmente são de tipos diferentes. Em geral, o ácido graxo do carbono 1 é saturado, o do carbono 2 é insaturado e o do carbono 3 pode ser saturado ou insaturado. O fígado é o principal sítio de síntese de TAG, sendo o glicerol-fosfato o acceptor inicial dos ácidos graxos

durante a sua formação. As duas principais vias de produção de glicerol-fosfato são o fígado e o tecido adiposo a partir de glicose e com a participação da *glicerol-quinase* e *glicerol-fosfato-desidrogenase* (Harvey e Ferrier, 2012). A Figura 5 mostra a molécula de TAG e sua síntese. Essa fração lipídica é sintetizada no fígado e no tecido adiposo, sendo a fonte de glicerol-3-P diferente nos dois tecidos; no fígado é o glicerol, mas o tecido adiposo não possui atividade de *glicerol quinase*. Neste, o glicerol-3-P é formado a partir do intermediário da glicose, di-hidroxiacetona fosfato (Nelson e Cox, 2011; Baynes e Dominiczak, 2010).

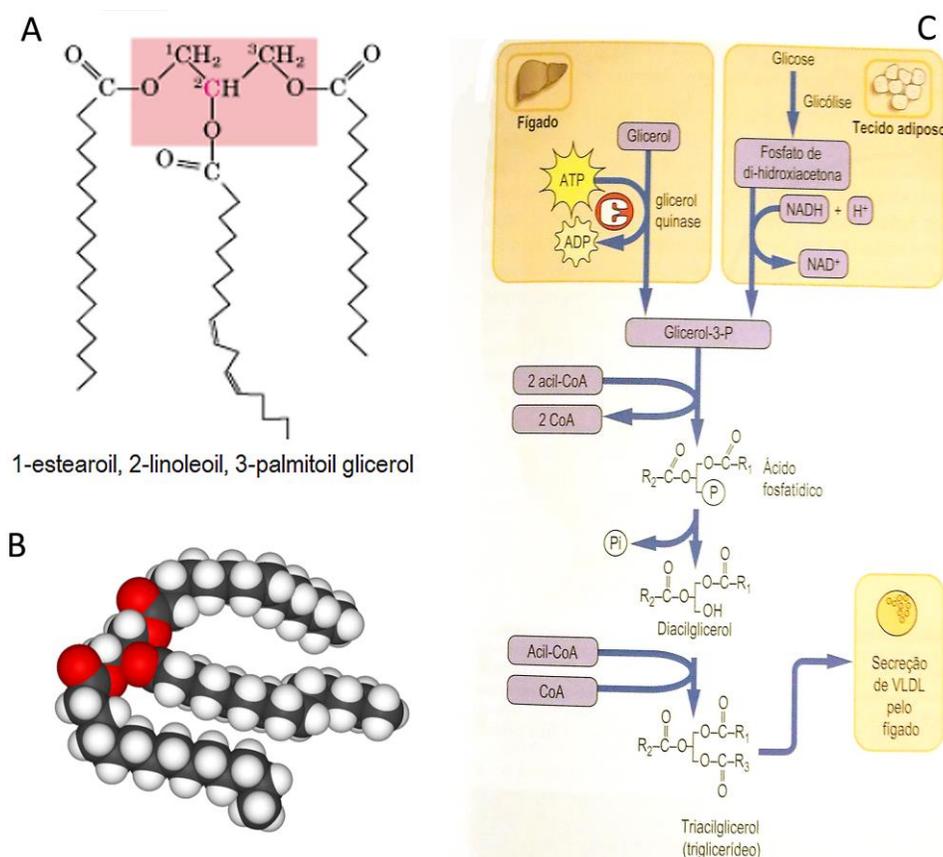
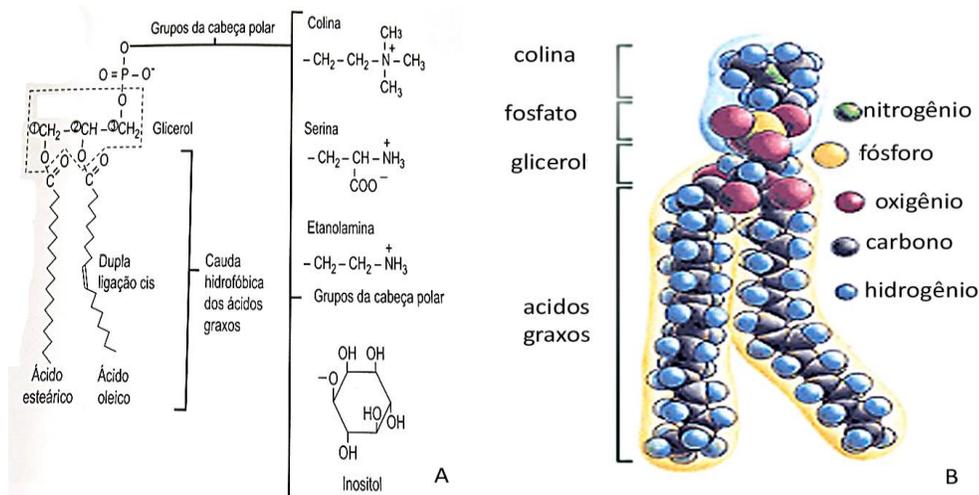


Figura 5. Estrutura de um triacilglicerol misto com destaque para o glicerol (A), estrutura dimensional do mesmo (B), síntese do triacilglicerol (C). (adaptação de Nelson e Cox, 2011; Baynes e Dominiczak, 2010).

Os fosfolípidos são lípidos polares derivados do ácido fosfatídico (1,2-diacilglicerol-3-fosfato). Eles contêm um espectro de ácidos graxos na posição *sn-1* e *sn-2*, assim como os triglicerídeos, mas a posição *sn-3* é ocupada pelo fosfato esterificado a

um composto amínico, que atua como uma ponte diéster, ligando o diacilglicerídeo a um composto nitrogenado polar, podendo ele ser mais comumente uma colina, serina ou etanolamina. O glicerol é pró-quiral: não apresenta carbonos assimétricos, mas a ligação de fosfato a uma extremidade converte-o em um composto quiral, que pode ser chamado corretamente de L-glicerol-3-fosfato, D-glicerol-1-fosfato, ou *sn*-glicerol-3-fosfato. Em todos esses compostos, o grupo da cabeça está unido ao glicerol por uma ligação fosfodiéster, onde o grupo fosfato possui uma carga negativa em pH neutro. O álcool polar pode estar carregado negativamente (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato), ser neutro (fosfatidilserina) ou estar carregado positivamente (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina), cargas que contribuem de modo significativo para as propriedades de superfície de membrana (Nelson e Cox, 2011; Baynes e Dominiczak, 2010).

Em geral, os glicerofosfolípídeos contêm um ácido graxo saturado C16 ou C18 em C-1 e um ácido graxo insaturado C18 ou C20 em C-2. A fosfatidilcolina (lecitina), por exemplo, contém geralmente o ácido palmítico ou o ácido esteárico em sua posição *sn*-1 e um ácido graxo insaturado com 18 átomos de carbono (oleico, linoleico ou linolênico) em sua posição *sn*-2 (Figura 6). A fosfatidiletanolamina (cefalina) possui geralmente um ácido graxo poli-insaturado de cadeia mais longa na posição *sn*-2, como o ácido araquidônico (Nelson e Cox, 2011; Baynes e Dominiczak, 2010).



Outro lipídeo importante das membranas biológicas é o colesterol, uma molécula hidrofóbica rígida, plana, com um grupo polar hidroxila (Baynes e Dominiczak, 2010). A estrutura característica desse grupo de lipídeos de membrana (Figura 7) é o núcleo esteroide, que consiste de quatro anéis fusionados, três com seis carbonos e um com cinco. É o principal esteroide nos tecidos animais, com caráter anfipático. Possui um grupo polar e um corpo hidrocarbonado apolar (Nelson e Cox, 2011).

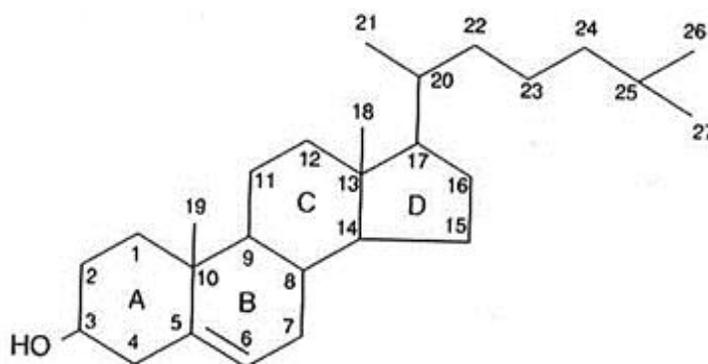


Figura 7. Estrutura básica do colesterol (adaptado de Baynes e Dominiczak, 2010; Vollhardt e Schore, 2013)

Ele desempenha o papel de componente estrutural de todas as membranas celulares, modulando sua fluidez e, em tecidos especializados, é o precursor dos ácidos biliares, dos hormônios esteroides e da vitamina D. A maior concentração plasmática de colesterol está na forma de éster (com um ácido graxo ligado ao carbono 3), como demonstrado na Figura 8 (Harvey e Ferrier, 2012).

Um éster de colesterol é uma molécula ainda mais hidrofóbica que o colesterol livre e não é encontrado nas membranas celulares, existindo apenas em pequenas quantidades na maioria das células. É na forma livre que se encontra a maior parte do colesterol da dieta, sendo que 10 a 15% está presente na forma esterificada. Os ésteres de colesterol sofrem a reação inversa, hidrolisados pela *hidrolase dos ésteres de colesterol (colesterol-esterase)* pancreática, que produz colesterol e ácidos graxos livres (AGNE) (Harvey e Ferrier, 2012)

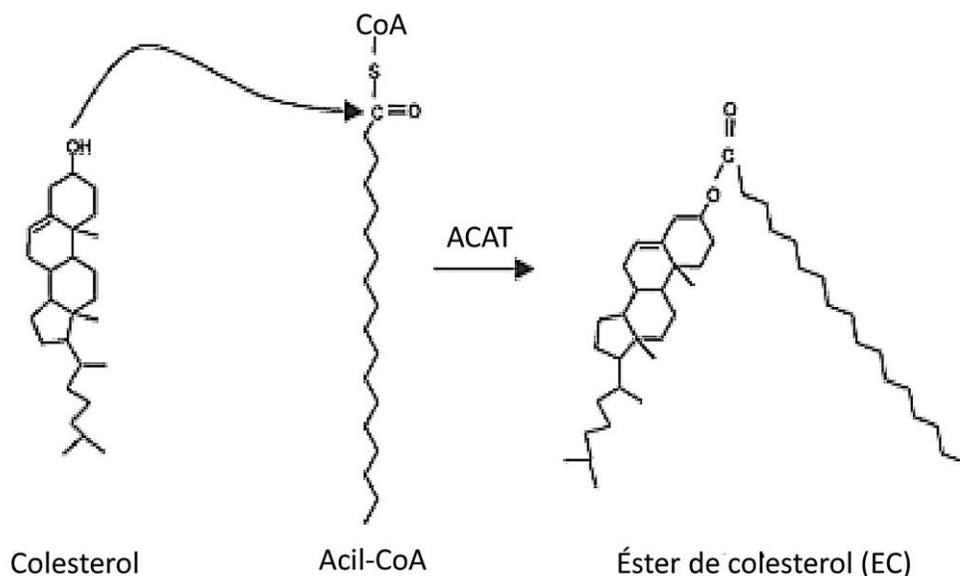


Figura 8. Formação de éster de colesterol a partir de uma molécula de colesterol e um ácido graxo saturado (adaptado de Alegret *et al.* 2004).

Além dos principais fosfolípidos e do colesterol, outros importantes lípidos de membrana incluem a cardiolipina e os esfingolípidos (esfingomielina e glicolípidos). A cardiolipina (difosfatidil glicerol) é um componente significativo da membrana interna mitocondrial, enquanto a esfingomielina, a fosfatidilserina e o colesterol estão enriquecidos na membrana plasmática. Alguns lípidos estão distribuídos de forma assimétrica na membrana, como a fosfatidilserina e a fosfatidiletanolamina, preferencialmente na face interna, e a fosfatidilcolina e a esfingomielina, na face externa dos glóbulos vermelhos do sangue. Os lípidos afetam a estrutura da membrana, a atividade de sistemas de transporte e das enzimas da membrana, e a função da mesma nos processos, como o reconhecimento celular e a transdução de sinais. O papel principal das membranas é manter a integridade estrutural e a barreira funcional das células e organelas, sendo a fluidez essencial para sua função e para a viabilidade celular, mediando a transferência de informações e de moléculas entre o interior e exterior da célula, incluindo o reconhecimento celular, processos de transdução de sinais e transporte de metabólitos e íons (Baynes e Dominiczak, 2010).

Os fosfolípidos de membrana também funcionam como reservatório de mensageiros intracelulares e, para algumas proteínas, servem como pontos de ancoramento às membranas celulares, além de apresentarem papéis adicionais no

organismo, como surfactantes nos alvéolos pulmonares e componentes fundamentais da bile (Harvey e Ferrier, 2012).

O fosfatidilinositol e seus derivados fosforilados atuam em vários níveis para regular a estrutura celular e o metabolismo. Os sinais extracelulares, como o hormônio vasopressina, ativam uma fosfolipase C específica na membrana, a qual hidrolisa o fosfatidilinositol-4,5-bifosfato liberando dois produtos que atuam como mensageiros intracelulares importantes: o inositol-1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) que provoca a liberação de Ca<sup>2+</sup> do retículo endoplasmático e ativa a enzima proteína *quinase C* (Nelson e Cox, 2011).

Grande parte dos ácidos graxos usados pelo organismo é suprido pela dieta. Carboidratos e proteínas obtidos da dieta em excesso, além das quantidades corporais necessárias desses compostos, podem ser convertidos em ácidos graxos e armazenados como triacilgliceróis. Dois ácidos graxos são essenciais na dieta dos humanos, já que somos incapazes de sintetizá-los: o ácido linoleico (C18:2 n-6), precursor do ácido araquidônico ω-6 (C20:4 n-6) (substrato para a síntese de prostaglandinas), e o ácido α-linolênico (C18:3 n-3), precursor de outros ácidos graxos ω-3 importantes para o crescimento, desenvolvimento, e para a geração de resposta antiinflamatória do organismo (Harvey e Ferrier, 2012; Serhan *et al.* 2008).

A partir do ácido α-linolênico (C18:3 n-3), os mamíferos conseguem sintetizar dois ácidos graxos poli-insaturados ω-3 importantes para o funcionamento celular: o ácido eicosapentaenoico (C20:5 n-3) (EPA) e o ácido docosahexaenoico (C22:6 n-3) (DHA). Um desequilíbrio entre os ácidos graxos poli-insaturados ω-6 e ω-3 na dieta está associado a um risco aumentado de doenças cardiovasculares. A proporção ótima de ácidos graxos poli-insaturados ω-6 para ω-3 na dieta está entre 1:1 e 4:1, mas a proporção nas dietas está próxima de 10:1 e 30:1 (Nelson e Cox, 2011). Todavia, existem estudos que recomendam manter uma proporção entre 6:1 - 10:1 (Franco, 2007; Moreira e Mancini-Fo, 2004), sendo verificada a convergência dos dados de diversos países para o intervalo de 4:1 a 5:1 (Martin *et al.* 2006)

Os eicosanoides são hormônios parácrinos, substâncias que atuam somente em células próximas ao ponto de síntese de hormônios, ao invés de serem transportadas ao sangue para atuar em células de outros tecidos ou órgãos. Esses derivados de

ácidos graxos têm uma variedade de efeitos significativos nos tecidos dos vertebrados, estando envolvidos na função reprodutiva, resolução da inflamação (Serhan *et al.* 2008), febre e na dor associadas aos ferimentos ou a doenças, na formação de coágulos sanguíneos, na regulação da pressão sanguínea, na secreção de ácido gástrico e em vários outros processos importantes. As três classes de eicosanoides, derivados do ácido araquidônico (C20:4 n-6), são: prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos (Figura 9) (Nelson e Cox, 2011).

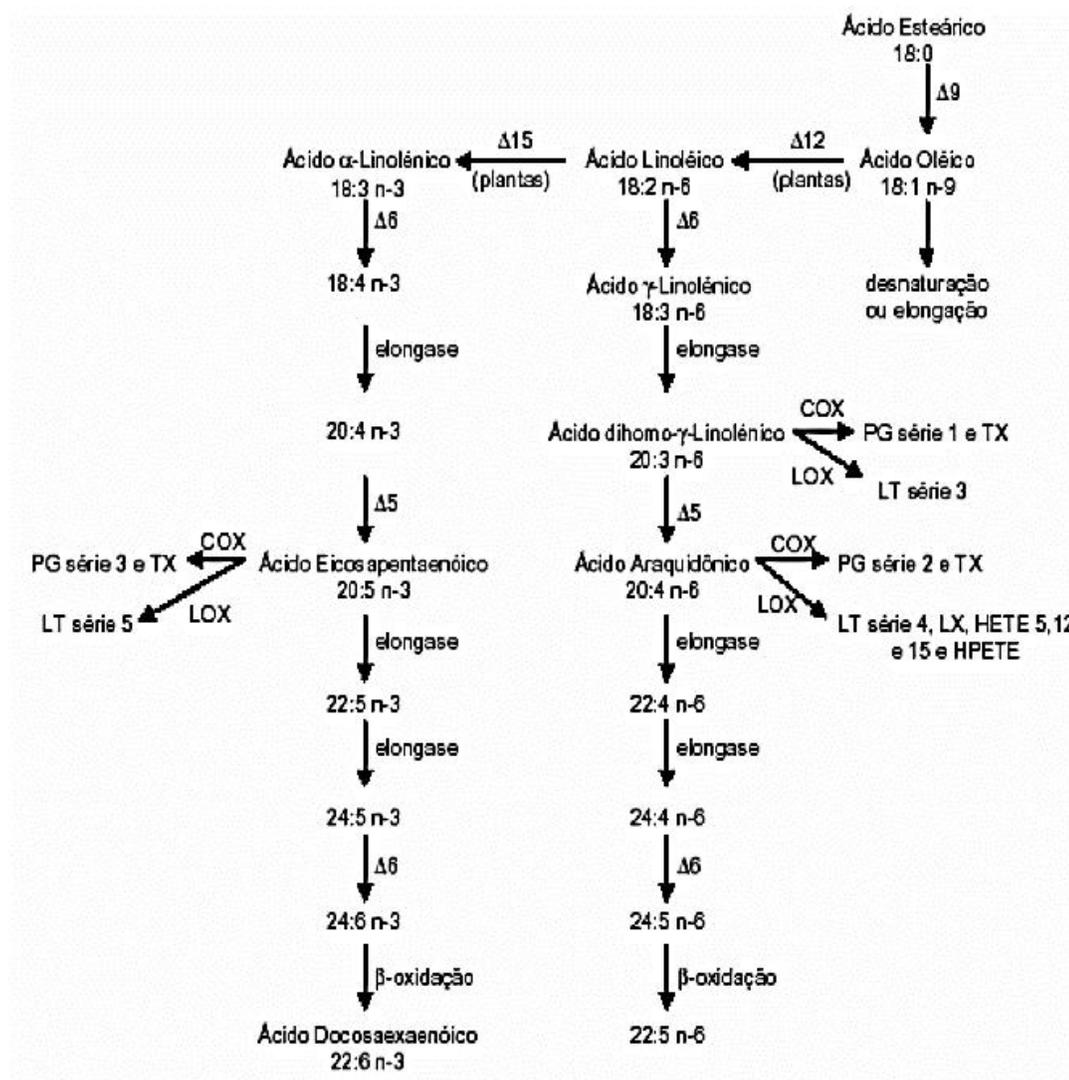


Figura 9. Esquema do processo de alongação e dessaturação dos ácidos graxos linoleico (C18:2 n-6) e linolênico (C18:3 n-3 ou n-6) com a produção de prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos (Franco, 2007).

### 2.1.1.3 Síntese de lípidos pelo organismo

A via para a síntese *de novo* de ácidos graxos (lipogênese) a partir de compostos de 2 carbonos está presente em muitos tecidos como fígado, cérebro, rim, glândulas mamárias e tecido adiposo. Nos humanos o principal órgão lipogênico é o fígado, sendo que o tecido adiposo não é um local importante para a síntese de ácidos graxos, a qual é considerada nos sistemas de mamíferos, um processo com dois estágios, ambos dependendo de unidades de acetil-CoA e ambos empregando proteínas multifuncionais em complexos multienzimáticos, sendo eles: 1) formação do precursor-chave malonil-CoA a partir de acetil-CoA carboxilase; 2) alongamento da cadeia de ácido graxo em incrementos de 2 carbonos pela ácido graxo sintase. (Baynes e Dominiczak, 2010)

A síntese *de novo* de ácidos graxos sempre resulta em um produto contendo número par de átomos de carbono, uma vez que o acetato iniciador contém dois átomos de carbono. A síntese interrompe, normalmente, quando a cadeia tem 16 átomos de carbono (Figura 10). Isso ocorre devido a enzima que remove o grupo acil do grupo 4'-fosfopantoteína, uma *tiolase*, apresentar atividade máxima para os ácidos graxos de 16 átomos de carbono. Outra razão é o fato de o ponto de ligação sulfidril cisteinil para o qual a cadeia acil é transferida do 4'-fosfopantoteína não poder reter bem as cadeias que tenham mais de 14 átomos de carbono. Grande parte do NADPH necessário para a redução é obtido das reações iniciais da via das pentoses fosfato (desvio hexose monofosfato), na qual a D-glicose-6-fosfato é oxidada. O NADPH remanescente é fornecido pela oxidação de malato no citoplasma, catalisada pela enzima *málica* (Montgomery *et al.* 1994).

Como pode-se observar na Figura 10, a enzima acetil-CoA:ACP transacilase (a) ativa acetil-CoA por reação com malonil-ACP; malonil CoA:ACP transacilase (b) ativa malonil-CoA por reação com acetil-ACP; 3-cetoacil-ACP sintetase (c) reage levando o acetil-ACP com malonil-ACP como extensor da cadeia; 3-cetoacil-ACP redutase (d) reduz o carbono 3 a um grupo hidroxila; 3-hidroxilacil ACP desidrase (e) retira água e enoil-ACP redutase (e) reduz a ligação dupla.

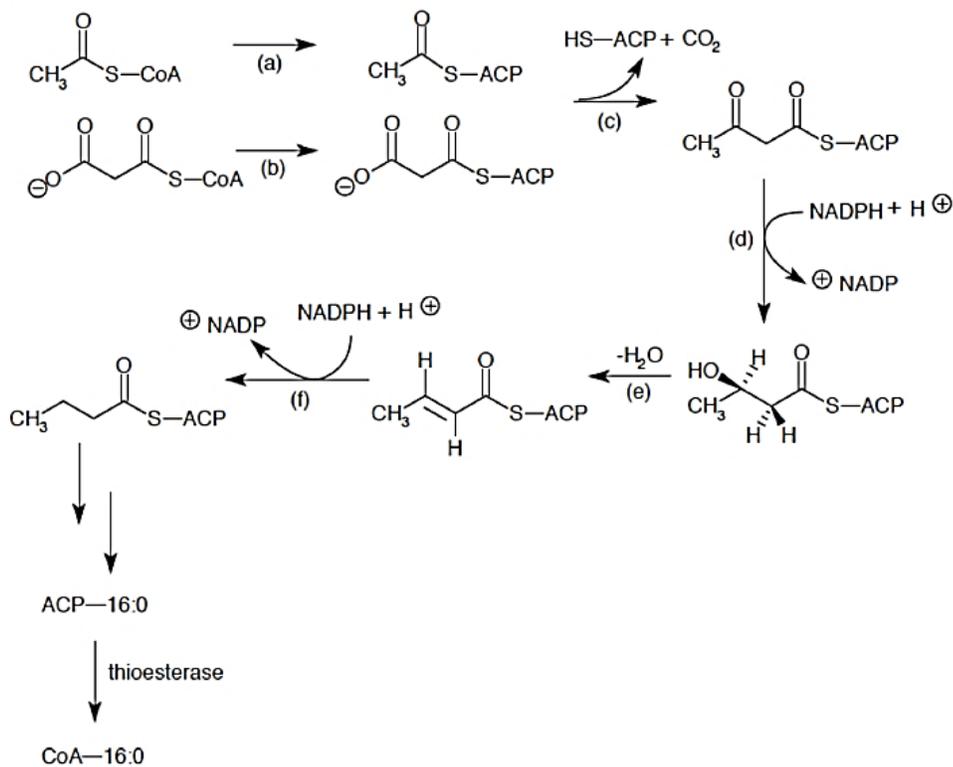


Figura 10. Síntese de ácidos graxos. ACP: proteína carreadora de acil. (Ficheiro, 2011)

As *dessaturases* de ácidos graxos (FAD) são enzimas presentes no retículo endoplasmático liso responsáveis pela dessaturação dos ácidos graxos de cadeia longa (adição de ligações duplas na configuração *cis*). As reações de dessaturação requerem NADPH, citocromo  $b_5$  e sua *redutase* ligada a FAD. As enzimas  $\Delta^5$  e  $\Delta^6$  *dessaturases* atuam na dessaturação dos AGPIs, enquanto a  $\Delta^9$  *dessaturase* atua na síntese dos ácidos graxos monoinsaturados. A primeira ligação dupla é tipicamente inserida entre os carbonos 9 e 10, produzindo principalmente ácido oleico (C18:1 n-9) e pequena quantidade de ácido palmitoleico (C16:1 n-7). Uma variedade de ácidos graxos poli-insaturados pode ser produzida por meio de dessaturação adicional combinada com alongação, mas os humanos possuem *dessaturases* para os carbonos 9, 6, 5 e 4, apenas, e não são capazes de introduzir duplas ligações a partir do carbono 10 até o carbono terminal ( $\omega$ ) da cadeia, razão pela qual os ácidos poli-insaturados linoleico (C18:2 n-6), linolênico (C18:3 n-3), eicosapentaenóido (C20:5 n-3) e docosahexaenóico (C22:6 n-3) são nutricionalmente essenciais (Harvey e Ferrier, 2012).

#### 2.1.1.4 Influência da dieta no perfil lipidômico plasmático e tecidual

Desde a década de 50 há um grande interesse pelo consumo de fontes alimentares ricas em ácidos graxos poli-insaturados, ao observar que o consumo de óleos de milho e peixe, e alimentos ricos nesses componentes promovia a redução da colesterolemia em pacientes com aterosclerose. Tanto o grau de saturação quanto o tamanho da cadeia dos ácidos graxos, bem como as suas distribuições posicionais nas moléculas de triacilgliceróis, exercem efeitos importantes sobre a colesterolemia e os lipídeos celulares (Almeida *et al.* 2011; Sabarense e Mancini Fo, 2003). Além do fígado, o coração é um dos tecidos capazes de alongar e dessaturar a cadeia carbônica dos ácidos graxos essenciais, gerando os compostos das famílias  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3. A dessaturação pelas enzimas  $\Delta^3$ ,  $\Delta^6$  e  $\Delta^9$  dessaturases é de grande importância porque esta etapa é controlada pela interação de hormônios com a quantidade dos ácidos linoleico (C18:2 n-6) e  $\alpha$ -linolênico (C18:3 n-3) na dieta (Sabarense e Mancini-Fo, 2003).

Em estudo realizado por Almeida *et al.* (2011), verificou-se alterações séricas de colesterol total, lipoproteínas de alta densidade, colesterol, triacilgliceróis e albumina, em ratos *Wistar* machos alimentados com óleo de soja, gordura de peixe, de porco e manteiga, além de apresentarem gotículas lipídicas nas paredes coronarianas e nos capilares cardíacos, sendo caracterizada como esteatose a deposição de gordura no fígado desses animais. Utilizando o mesmo modelo animal, Sabarense e Mancini Fo (2003) analisaram a incorporação de ácidos graxos *trans* no fígado e coração dos mesmos. Foi determinado que os ácidos graxos *trans*, ao serem incorporados, alteram as proporções entre os ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados, e que a porcentagem de incorporação varia entre os tecidos, apresentando-se maior no fígado. Uma dieta deficiente em ácido  $\alpha$ -linolênico (C18:3  $\omega$ -3) resulta em menor síntese de C22:6  $\omega$ -3 (DHA) e maior síntese de C22:5  $\omega$ -6 (DPA) nos tecidos, além da menor concentração de C18:2  $\omega$ -6 (linoleico) levar a menor síntese de C22:5  $\omega$ -6 (DPA).

Araya *et al.* (2004) por sua vez, analisaram o tecido hepático e adiposo de pacientes com Índice de Massa Corporal (IMC) variando entre  $45,6 \pm 8,3 \text{ Kg/m}^2$

(obesidade mórbida, Figura 11), com idade entre 39 e 45 anos e verificaram uma depleção em AGPI de cadeia longa nos triacilgliceróis hepáticos com diminuição na relação dos ácidos graxos 20:4, n-6/18:2 n-6 e (20:5, n-3 + 22:6, n-3)/18:3, n-3; enquanto os fosfolípidos dos fígados continham uma maior relação de AGPI de cadeia longa n-6/n-3, em comparação com o grupo controle. Estes achados acompanharam o aumento não apenas da relação n-6/n-3 no fígado e tecido adiposo, como também elevaram o índice de peroxidação lipídica hepática.

IMC	Classificação
< 16	Magreza grave
16 a < 17	Magreza moderada
17 a < 18,5	Magreza leve
18,5 a < 25	Saudável
25 a < 30	Sobrepeso
30 a < 35	Obesidade Grau I
35 a < 40	Obesidade Grau II (severa)
≥ 40	Obesidade Grau III (mórbida)

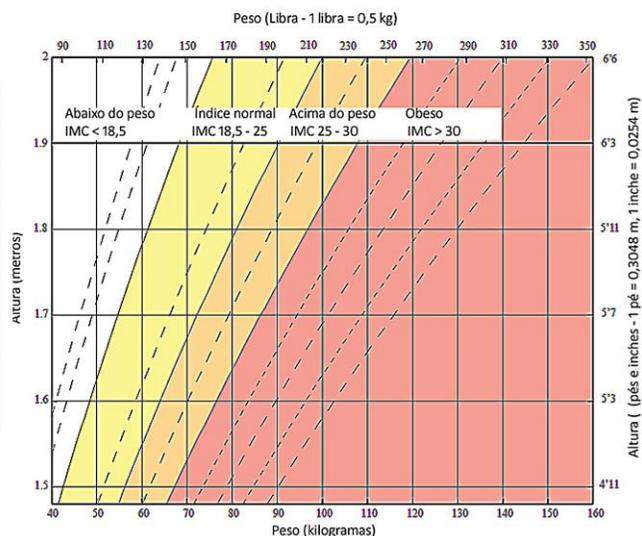


Figura 11. Classificação internacional de adulto baixo peso, sobrepeso e obesidade de acordo com IMC. As linhas tracejadas no gráfico representam subdivisões dentro das classes principais, por exemplo, acima do peso é dividido em "sobrepeso" e "pré-obeso". (adaptado de WHO, 2006)

Segundo pesquisa realizada por Zhang *et al.* (2004) uma dieta rica em banha aumentou a produção de EROs dependentes de NADPH em córtex de cérebros de ratos. Além disso, em estudo realizado por Walczewska *et al.* (2010) em ratos observou-se maior dano oxidativo nos fagócitos do sangue daqueles alimentados com dieta rica em óleo de girassol, em comparação com os alimentados com dieta pobre nesse óleo e rico em óleo de peixe.

Em estudo realizado por Vuković e colaboradores (2014), o índice de peroxidação lipídica em ratas alimentadas com dieta hiperlipídica foi significativamente maior em comparação com a dieta padrão. Outro estudo realizado com ratas fisher também alimentadas com dieta rica em gordura apresentou maior índice de LPO, além

de uma maior expressão da NADPH-oxidase (NOX). A NOX é uma enzima complexa que gera EROs em resposta a uma ampla gama de estímulos e foi reconhecida como elemento chave de sinalização intracelular de fibrogênese hepática. Em diversas patologias do fígado há um acréscimo na atividade da NADPH oxidase e predominância de agentes pro-oxidantes, excedendo a capacidade orgânica antioxidante de defesa. Sob essas circunstâncias, a homeostase intracelular no status redox é interrompida e algumas vezes o dano celular é induzido, resultando em apoptose ou necrose (de Abreu *et al.* 2014).

Furukawa *et al.* (2004) também estudou o estresse oxidativo na situação de obesidade em humanos e em camundongos, e verificou a relação que a obesidade tem com o estresse oxidativo sistêmico. Seu grupo de estudo verificou o aumento no índice de peroxidação lipídica e expressão da enzima NADPH oxidase e diminuição das enzimas antioxidantes no tecido adiposo branco e fígado de camundongos com obesidade induzida por dieta. Também foi verificado o aumento no estresse oxidativo via NADPH oxidase em culturas de adipócitos na presença de elevada concentração de ácidos graxos, causando também uma produção desregulada de adipocitocinas (hormônios derivados de gorduras).

Em outra pesquisa, realizada por Di Benedetto *et al.* (2010), com ratos alimentados com dieta AIN-76 (20% gordura) e suplementados com diferentes óleos de girassol otimizados (alto teor de ácido oleico; C18:1 n-9), foi verificada redução nos triglicérides e colesterol total do plasma e redução no índice de peroxidação lipídica nos animais que foram suplementados com os óleos com maiores concentrações de micronutrientes, em comparação com aqueles suplementados com óleo tradicional. De acordo com os autores, além da excelente composição de ácidos graxos do óleo de girassol, possuindo 90% de ácidos graxos poli-insaturados (C 18:1 n-9, 16-19% e C18:2 n-6, 68-72%), esse óleo vegetal pode possuir naturalmente antioxidantes e compostos hipolipidêmicos, como fitoesteróis e fosfolipídeos, que através de diversos mecanismos e efeitos, sequestram os radicais livres que levam à auto-oxidação de lípidos celulares.

### 2.1.1.5 Estresse oxidativo, lipoperoxidação e sistema de defesa antioxidante

O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes resulta na indução de danos celulares pelos radicais livres, o que é denominado estresse oxidativo. O aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs) em sistemas biológicos leva à peroxidação de membranas lipídicas, dano oxidativo de ácidos nucleicos, carboidratos e oxidação de proteínas e lipídeos. Os radicais livres causam dano ao DNA, promovendo carcinogênese, aterosclerose, infarto, artrite e isquemia (Bergamin, 2012), além de serem considerados hepatotóxicos em altas concentrações, devido ao seu potencial de reação com a maioria das macromoléculas celulares e enzimas inativas, o que leva à modificação de proteínas e indução à reações em cadeia de lipoperoxidação (LPO).

Os radicais livres são átomos ou moléculas produzidos continuamente durante os processos metabólicos e atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas. A transferência de elétrons é um dos processos químicos fundamentais para a sobrevivência das células e a conversão de uma substância química em um derivado com um menor número de elétrons, ou seja, a perda de um ou mais elétrons para outra substância, é conhecida como oxidação, gerando então os radicais livres (Bergamin, 2012), que são capazes de existir independentemente, como os intermediários da redução parcial do oxigênio: ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), oxigênio *singlet* ( $O^{\cdot}$ ) e radical hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ) (Ferrari, 2012).

Apresentam, em geral, uma grande instabilidade, têm uma vida muito curta e reagem rapidamente com diversos compostos, além de atacar alvos celulares. As reações em cadeia dos radicais livres são iniciadas pela remoção (abstração) do  $H^{\cdot}$  de outras moléculas, como por exemplo, durante a peroxidação lipídica. Suas reações podem levar à formação de complexos com proteínas, glicoproteínas, purinas e pirimidinas, formação de produtos de oxidação de tiois, peróxidos lipídicos, polímeros, epóxidos, endoperóxidos e produtos de cissão, como alquenais e hidroalquenais, que são citotóxicos (Jordão Jr *et al.* 1998).

As reações em cadeia ocorrem quando um radical livre reage com um composto não radical, formando outros radicais livres. Dessa forma, podem ser produzidos efeitos biológicos distantes do sítio de geração do primeiro radical livre formado (Ferrari, 2012).

Os radicais livres possuem diversas funções no organismo, como produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas (Bergamin, 2012). No tecido hepático essas moléculas em excesso levam à fibrose, inflamação crônica e apoptose (Vuković *et al.* 2014), além do que a peroxidação lipídica e a oxidação protéica de estruturas celulares têm sido reportadas como causa principal da morbidade e mortalidade em diabetes (Saravanan *et al.* 2014).

Nas membranas mitocondriais encontram-se as proteínas transportadoras de elétrons, principalmente do complexo citocromo que reduzem uma molécula de oxigênio ( $O_2$ ) à água ( $H_2O$ ) durante o processo de respiração (Figura 12). Esse processo também é conhecido por gerar as EROs. A redução completa de uma molécula de  $O_2$  a  $H_2O$  requer quatro elétrons. Sendo assim, 95 a 98% de  $O_2$  recebem quatro elétrons uma única vez através do sistema complexo citocromo-oxidase, na redução tetraeletrônica. Todavia, em cerca de 5% dos casos, a redução é monovalente, ou seja, a molécula de oxigênio recebe apenas um elétron de cada vez (Ferrari, 2012).

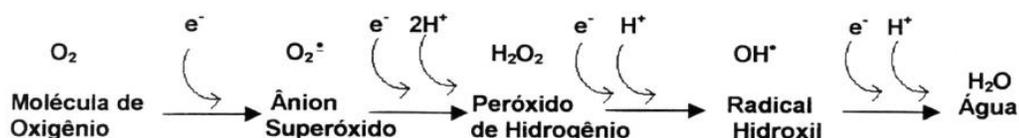


Figura 12. Respiração mitocondrial e a redução de  $O_2$  em  $H_2O$  (Ferrari, 2012).

É conhecido que ácidos graxos insaturados nas membranas celulares podem ser oxidados na presença de espécies reativas de oxigênio. A oxidação leva à quebra de cadeias de ácidos graxos e compromete a integridade da membrana celular (Ji *et al.* 1998).

Os efeitos gerais da peroxidação lipídica incluem diminuição da fluidez da membrana, dano às proteínas de membrana, desarranjo e inativação dos receptores das enzimas e de canais de íons, e potenciação de lise celular (Ferrari, 2012) É

conhecido que os ácidos graxos poli-insaturados contidos nas membranas celulares fazem com que estas sejam potentes geradoras de radicais alcoxila ( $LO\bullet$ ) e peroxila ( $LO_2\bullet$ ), por meio da lipoperoxidação (Barbosa *et al.* 2010).

O radical  $OH\bullet$ , por meio da retirada de um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos poli-insaturados da membrana celular, desempenha importante papel na lipoperoxidação, sendo considerado o principal iniciador deste processo, apesar da participação do ferro também ser considerada fator determinante, ressaltando-se a importância equimolar entre  $Fe^{3+}/Fe^{2+}$  para possibilitar a iniciação desse processo. Os íons ferro agem como catalisadores da conversão de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) em radicais  $LO\bullet$  e  $LO_2\bullet$  que, por serem potencialmente reativos, iniciam uma nova cadeia de reações, as quais podem ser rápidas ou lentas, de acordo com a valência do ferro (Barbosa *et al.* 2010).

Além da alteração nas membranas celulares, o estresse oxidativo também leva à formação do malondialdeído (MDA), produto final da peroxidação lipídica, também citotóxico. O MDA é derivado da  $\beta$ -ruptura de endociclicização de ácidos graxos poli-insaturados (Ji *et al.* 1998). Este produto é utilizado para quantificar o índice de peroxidação lipídica através de sua reação com o ácido tiobarbitúrico, formando um cromógeno de cor rosa (Ohkawa *et al.* 1979).

O alto grau de insaturação dos ácidos graxos, tendo óleos vegetais e óleos de animais marinhos como as principais fontes de poli-insaturados, facilita o aparecimento e/ou manutenção do estresse oxidativo. É bem conhecido que os AGPIs são mais susceptíveis à peroxidação lipídica que os ácidos graxos saturados, e que a oxidação é linearmente dependente da concentração de poli-insaturados. O alto consumo desses ácidos graxos leva a uma maior peroxidação lipídica das membranas a partir de radicais livres, já que as membranas das células e organelas contêm grandes quantidades de ácidos graxos poli-insaturados. Danos desta camada lipídica tendem a diminuir a fluidez da membrana. O ataque de algumas EROs, as quais abstraem um átomo de hidrogênio do grupo metileno das cadeias de ácidos graxos poli-insaturados, inicia o processo de peroxidação lipídica. As etapas da lipoperoxidação são mostradas na Figura 13 (Franco, 2007).

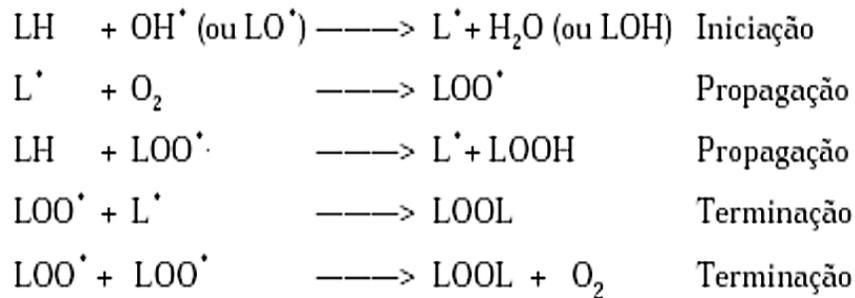


Figura 13. Etapas da lipoperoxidação. LH: ácido graxo poli-insaturado; OH•: radical hidroxila; LO•: radical alcoxila, L•: radical lipídico; LOO•: radical peroxila; LOOH: hidroperóxidos lipídicos; LOOL: hidroperóxido de ácido graxo (Franco, 2007).

Um antioxidante é definido como uma substância que mesmo em baixas concentrações em relação às de um substrato oxidável (proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos) é capaz de prevenir a oxidação desses substratos; ou seja, capazes de inibir a oxidação, diminuindo a concentração de radicais livres no organismo e/ou quelando íons metálicos, prevenindo a peroxidação lipídica (Bergamin, 2012).

As substâncias antioxidantes podem apresentar diferentes propriedades protetivas e agir em diversas etapas do processo oxidativo, agindo por diferentes mecanismos e são, portanto, classificadas em duas categorias principais: antioxidantes primários e secundários. São considerados primários os compostos de ação antioxidante capazes de inibir ou retardar a oxidação por inativação de radicais livres graças à doação de átomos de hidrogênio ou de elétrons, o que transforma os radicais em substâncias estáveis. Os antioxidantes secundários apresentam uma grande variedade de modos de ação: ligação de íons metálicos (alteração de valência); inativação de espécies reativas de oxigênio, conversão de hidroperóxidos em espécies não-radicalares ou absorção de radiação UV (Maisuthisakul *et al.* 2007).

O sistema de defesa antioxidante do organismo tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres e/ou espécies reativas não radicais. Esse sistema, usualmente, é dividido em enzimático e não-enzimático. No último caso, é constituído por grande variedade de substâncias antioxidantes, que podem ter origem endógena ou dietética, dentre as quais se destacam: vitaminas,

minerais e compostos fenólicos. O ácido ascórbico (vitamina C), o  $\alpha$ -tocoferol e  $\beta$ -caroteno, precursores das vitaminas E e A, respectivamente, são compostos vitamínicos potencialmente antioxidantes. O sistema de defesa enzimático inclui as enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx) (Figura 14). Essas enzimas agem por meio de mecanismos de prevenção, impedindo e/ou controlando a formação de radicais livres e espécies não-radicaais envolvidos com a iniciação das reações em cadeia que culminam com propagação e amplificação do processo e, conseqüentemente, com a ocorrência de danos oxidativos (Barbosa *et al.* 2010).

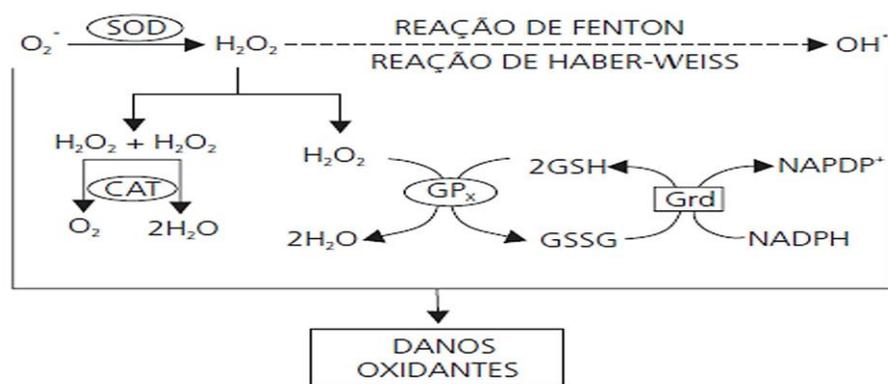


Figura 14. Integração dos sistemas de defesa enzimáticos. (Barbosa *et al.* 2010).

Por meio da reação de dismutação, a SOD catalisa a geração de  $H_2O_2$  a partir do radical superóxido ( $O_2^{\bullet}$ ). CAT e GPx se integram para impedir o acúmulo de  $H_2O_2$  que, apesar de não ser um radical livre, é igualmente reativo e capaz de promover danos potenciais. O acúmulo dessa espécie reativa ( $H_2O_2$ ) possibilita, por meio das reações de *Fenton* e *Haber-Weiss*, a geração do radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ), contra o qual não existe defesa enzimática. A GPx reduz o  $H_2O_2$  à água, no entanto o faz à custa da conversão da glutathione reduzida (GSH) em oxidada (GSSG), essa última que promove ação oxidante em função da ligação dissulfeto existente em sua estrutura. Assim, é de extrema importância a ação da glutathione redutase (GRd), responsável pela recuperação da glutathione reduzida (GSH), possibilitando a manutenção da

integralidade do ciclo redox da glutatona e, conseqüentemente, do equilíbrio adequado entre os sistemas de defesa enzimáticos (Barbosa *et al.* 2010)

Foi possível verificar, no estudo realizado por Walczewska *et al.* (2010), maiores níveis de atuação da glutatona nos eritrócitos e maior atividade antioxidante no plasma de animais alimentados com dietas ricas em ácido linoleico (C18:2 n-6) e menor capacidade de sequestro de radicais livres nos animais alimentados com dieta rica em banha e pobre em óleo de peixe.

## 2.2 Flavonoides

Os flavonoides são polifenóis encontrados nos alimentos, principalmente nas hortaliças (batata inglesa, repolho, tomate, rabanete, couve, escarola, nabo), nas frutas (cereja, amora, uva, morango, jabuticaba, laranja), grãos, sementes, castanhas, condimentos e ervas, bem como em bebidas como vinho, suco de uva e infusões de ervas (Rosa, 2009). Sua estrutura química varia em torno do anel heterocíclico de oxigênio, mas todos os flavonoides possuem a característica esquelética carbônica C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. No geral, são derivados do composto 2-fenilcromanona, e embora exista uma diversidade de substâncias flavonoides, estas possuem em comum uma estrutura básica formada por três anéis fenólicos referidos como A, B e C (Figura 15) (Yao *et al.* 2004).

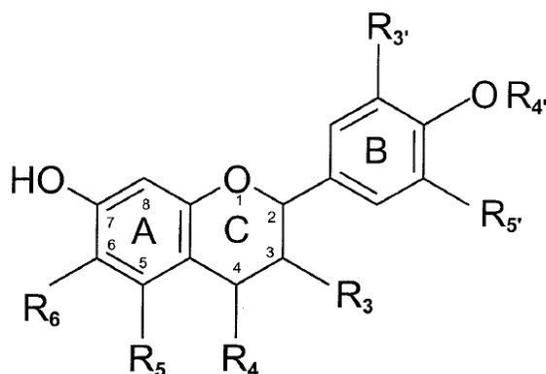


Figura 15. Estrutura geral dos flavonoides e numeração comum (Beecher, 2003)

Os flavonoides são considerados como princípios ativos em muitas plantas. Uma vez que encontrados em plantas e apresentam-se em maiores concentrações nas sementes e frutos. Podem ser ingeridos em altas quantidades, como constituintes normais da dieta humana. As razões mais apontadas para a baixa toxicidade dos flavonoides são a pequena solubilidade em água da aglicona e o rápido catabolismo do núcleo pirrólico no fígado (Rosa, 2009).

Os flavonoides incluem dois grandes grupos de compostos: as antocianinas e as antoxantinas. As antoxantinas incluem as flavonas, os flavonóis e as flavanonas e são geralmente pigmentos de coloração pálida, ao contrário das antocianinas (Rosa, 2009). Há também os taninos, ou flavanóis-3, onde são encontradas pelo menos dois tipos de estruturas: condensadas não hidrolisáveis, formadas por produtos que contém núcleos flavonóidicos e estruturas hidrolisáveis. Sua estrutura química básica é relacionada à estrutura da catequina (Figura 16) (Vaccari *et al.* 2009).

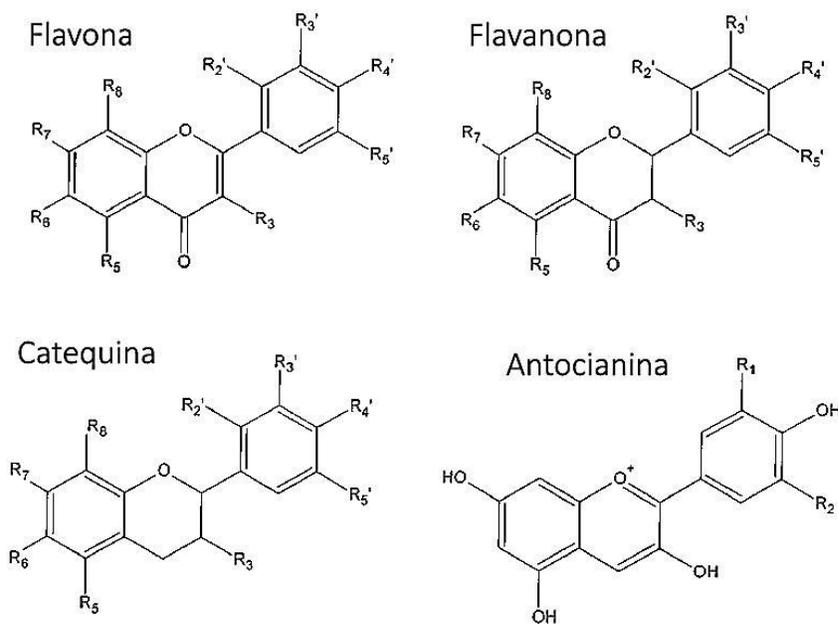


Figura 16. Estrutura de alguns grupos de flavonoides (adaptado de Nijveldt *et al.* 2001).

Os compostos fenólicos são alvo de pesquisas atuais devido suas ações biológicas associadas à prevenção de doenças e potencial curativo. Dentre as propriedades descritas, estão: antioxidante, anticarcinogenia, antimutagenia,

antiaterogenia, além de serem considerados inibidores da digestão e absorção de certos nutrientes, bem como eficientes em converter nutrientes absorvidos, em metabólitos ativos (Vinuela *et al.* 2008) . Além disto, os flavonoides são conhecidos por inibir a síntese de colesterol endógeno e inibir a cicloxigenase, levando à menor agregação de plaquetas, o que reduz a tendência trombótica (Rosa, 2009).

A Tabela 1 lista os principais grupos de flavonoides e seus compostos.

Tabela 1. Principais grupos de flavonoides, compostos individuais e fontes alimentícias (Adaptado de Nijveldt *et al.* 2001).

<b>Grupo</b>	<b>Composto</b>	<b>Fonte alimentar</b>
Flavonas	apigenina	casca de maçã
	crisina	grãos
	kaempferol	brócolis
	luteolina	aipo
	miricetina	pele de frutas
	rutina	cramberi
	sibelina	uva
Flavanonas	quercetina	alface, azeitona, cebola e salsa
	fisetina	frutas cítricas
	hesperitina	pele de frutas cítricas
	nariginina	
	naringenina	
Catequinas	taxifolina	
	catequina	vinho tinto
	epicatequina	chás
Antocianinas	epigallocatequina galato	
	cianidina	grãos
	delfinidina	cereja
	malvidina	uvas
	pelargonidina	framboesa
	peonidina	uva vermelha
petunidina	vinho tinto, morango, chás, pele de frutas com pigmentos escuros.	

### 2.2.1 Flavonoides e sua ação antioxidante

A propriedade mais bem-descrita da maioria dos flavonoides é sua capacidade de agir como antioxidante (Nijveldt *et al.* 2001; Bellocco *et al.* 2009) e a relação desta característica com a redução ao risco de diversas doenças crônicas (Liu, 2004). As flavonas e as catequinas parecem ser os mais poderosos flavonoides capazes de proteger o corpo contra espécies reativas de oxigênio. Células e tecidos estão em constante ameaça pelo dano causado pelos radicais livres e espécies reativas de oxigênio, os quais são produzidos durante o metabolismo homeostático de oxigênio ou são induzidos exogenamente (Nijveldt *et al.* 2001).

A capacidade antioxidante dos flavonoides já foi evidenciada *in vivo* e *in vitro* e sua funcionalidade na saúde de humanos é enfatizada pela habilidade que os flavonoides possuem de induzir seu sistema antioxidante enzimático (Yao *et al.* 2004). Além disso, os flavonoides exercem atividade antioxidante em diferentes vias metabólicas; atividade anti-radicais livres e anti-lipoperoxidação. Seu poder antioxidante é atribuído à capacidade de doar átomos de hidrogênio disponíveis nos grupos fenólicos, estabilizando o elétron desemparelhado do radical livre. Do mesmo modo, reduzem a geração ou aumento desses radicais nos macrófagos, ou impedem a oxidação da molécula de LDL, podendo também sequestrar íons como ferro e cobre, diminuindo as EROs do meio (Bergamin, 2012, Carletti *et al.* 2014). A capacidade dos flavonoides de doar átomos de hidrogênio é definida basicamente pela presença do anel B (grupo catecol – anel B dihidroxilado) (Carletti *et al.* 2014).

Segundo Hassimoto *et al.* (2008); as antocianinas apresentam alta capacidade antioxidante em diversos sistemas. Essa habilidade está relacionada com sua capacidade de inibir a peroxidação lipídica por sequestro de radicais e propriedade de quelar metais. Estudos na relação entre a estrutura e a capacidade antioxidante que esses compostos possuem mostraram que diferentes mecanismos de hidroxilação e glicosilação parecem modular essas propriedades.

Bellocco *et al.* (2009) relacionou a atividade anti-proliferativa da hesperitina e hesperidina, avaliadas em linhagens de células humanas de hepatomas Hep G2, com

sua capacidade antioxidante. Dos flavonoides testados, a hesperitina apresentou superior capacidade antioxidante.

Em estudo *in vitro* realizado por Parajuli *et al* (2012) com oito diferentes plantas do Nepal, as que apresentaram melhor capacidade de quelar metais possuíam maior concentração de flavonoides; e estudo semelhante realizado por Subedi *et al.* (2014) atribuiu a atividade antioxidante, de acordo com seus resultados, aos flavonoides, reafirmando sua ação como sequestrador de diversas espécies oxidantes, como ânions superóxido, radicais hidroxila ou peróxidos, e também como quelantes de oxigênio *singlet*.

A atividade anti-inflamatória dos flavonoides está relacionada com a inibição de enzimas (proteína C *quinase*, *fosfodiesterase*, *fosfolipase*, *lipoxigenase* e *cicloxygenase*) envolvidas na resposta inflamatória. Os flavonoides cítricos agem na ativação de células envolvidas na resposta imune, incluindo linfócitos T e B e, além disso, possuem atividade antiadesiva capaz de inibir a agregação plaquetária. Também foram observados os efeitos hipocolesterolêmico, anti-hipertensivo, anti-obesidade, antioxidante, cardioprotetor e anticancerígeno. Os efeitos anticancerígenos atribuídos às flavanonas estão envolvidos na inibição de diversos mecanismos como dano ao DNA e desenvolvimento e/ou proliferação de tumores (Bergamin, 2012).

### **2.2.2 Hesperitina e seus derivados glicosilados**

A hesperidina (hesperetina-7-O-rutinosídeo) é um tipo de flavonoide cítrico, classificado como uma flavanona glicosídica, cuja estrutura química é constituída pela hesperitina (forma aglicona) ligada aos açúcares glicose e ramnose na posição 7 (Figura 16). Apesar de apresentar muitos efeitos benéficos, a hesperidina é muito pouco solúvel em água (<0,01%) o que a torna pouco biodisponível para o organismo (Yamada *et al.* 2006).

Ela é encontrada principalmente no suco de laranja e suas quantidades podem variar de acordo com o solo, clima, variedade da fruta, e tipo de suco; e tem sido atribuído à este composto, propriedades: anti-inflamatórias, antioxidantes, antitumorais, antivirais, hipolipidêmicas, dentre outras. Devido à baixa solubilidade do produto

natural, foi desenvolvida uma forma sintética denominada glicosil-hesperidina por meio da transglicosilação com ciclodextrina glicoranotransferase da bactéria *Bacillus stearothermophilus* (Dourado, 2009). Desta forma, a Glicosil-hesperidina se torna mais solúvel (10.000 vezes) que a hesperidina. Além do mais, tem sido confirmado que as atividades biológicas da glicosil-hesperidina são iguais ou melhores do que a da hesperidina (Yamada *et al.* 2006). A Figura 17 mostra as estruturas dos flavonoides hesperitina, hesperidina e glicosil-hesperidina.

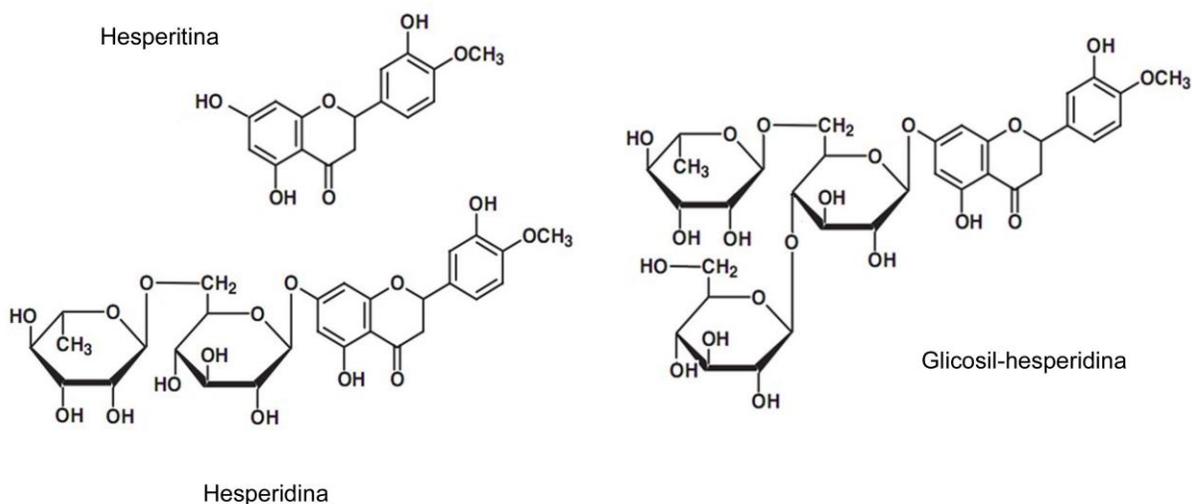


Figura 17. Estrutura da hesperitina, hesperidina e glicosil-hesperidina (Franco, 2014).

A hesperitina é conhecida por causar diversos efeitos benéficos para a saúde, dentre eles: antioxidante, anti-inflamatório, anticarcinogênico e de prevenir perda óssea (Nielsen *et al.* 2006). Do mesmo modo, foi reportado que a hesperidina possui potencial antialérgico, por agir na inibição da atividade do Citocromo P450 (CYP) (Fujita *et al.* 2008), além de inibir a migração de mastócitos induzida por *Stem Cells*, sendo um indicativo de sua capacidade anti-inflamatória (Jeong *et al.* 2011).

Estudos prévios em humanos e animais (especialmente roedores) demonstraram que a hesperidina e seus metabólitos reduzem a glicose e os lipídeos séricos e

neutralizam marcadores de dano oxidativo (de Oliveira *et al.* 2013). Outros estudos realizados por diversos autores demonstraram a capacidade da hesperidina de reduzir níveis séricos de colesterol, triacilglicerol e lipoproteínas de baixa densidade (Bergamin, 2012; Cesar *et al.* 2010; Cardoso, 2008).

Bok *et al.* (1999) verificou redução significativa do colesterol no plasma e fígado e de triacilgliceróis hepáticos de ratos tratados com extrato de casca de mexerica e/ou mistura dos flavonoides hesperidina e nariginina. Também foi observado redução nas atividades da HMG-CoA redutase e acil-CoA nos grupos experimentais, em relação ao controle (sem tratamento), respondendo à diminuição no esterol neutro fecal compensada pela biossíntese de colesterol diminuída no fígado desses animais.

Outro estudo realizado com hamsters verificou a capacidade antioxidante da hesperitina e seus metabólitos em situação hipercolesterolêmica. Eles foram capazes de diminuir os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e da peroxidação lipídica (Kim *et al.* 2010).

Knekt *et al.* (2002) analisou a ingestão total de diversos flavonoides associados ao risco de diversas doenças crônicas em mais de 10.000 indivíduos. Foi verificada uma menor incidência de doença cerebrovascular nos indivíduos com maior consumo de hesperitina, em relação ao grupo controle. Em outro estudo em humanos foi verificada a contribuição da hesperidina para a proteção vascular, diminuindo a pressão sanguínea diastólica (Morand *et al.* 2011).

### **2.2.2.1 Biodisponibilidade da hesperitina e derivados glicosilados**

Biodisponibilidade é um termo que define a fração da dose administrada de uma substância que atinge a circulação sistêmica e a velocidade com que este processo ocorre. Referindo-se a alimentos, a biodisponibilidade é definida como a proporção de um nutriente ou outra substância presente no alimento que é digerida, absorvida e metabolizada. Esta definição abrange vários processos integrados: liberação da substância da matriz alimentar, absorção pelo organismo, distribuição, metabolismo e excreção (D'Archivio *et al.* 2007).

A biodisponibilidade e a atividade biológica dos flavonoides dependem de vários fatores como a configuração, o número total de grupos hidroxila e a substituição de

grupos funcionais sobre a sua estrutura nuclear (Kumar e Pandey, 2013). Os polifenóis, que são os mais comuns na dieta humana, não são necessariamente os mais ativos *in vivo*, seja devido a sua menor atividade intrínseca ou porque são moléculas fracamente absorvidas a partir do intestino, altamente metabolizadas, ou rapidamente eliminadas. Além disso, os metabólitos que são encontrados no sangue e nos órgãos-alvo podem diferir das substâncias nativas em termos de atividade biológica (Yang *et al.* 2012).

Quando ingeridos, os compostos bioativos são extensivamente metabolizados por enzimas intestinais e hepáticas e pela microbiota presente no cólon intestinal, resultando em metabólitos conjugados diferentes dos compostos nativos (Kanaze *et al.* 2007).

Os rutinosídeos são absorvidos apenas na parte distal do intestino após hidrólise pela microbiota do cólon e este processo é provavelmente o passo limitador da velocidade de absorção. A  $C_{máx}$  da hesperitina tem sido captada em média 6 h após a ingestão do suco de laranja (Manach *et al.* 2003; Nielsen *et al.* 2006). Por outro lado, as agliconas e também os glicosídeos de flavanonas podem ser absorvidos no intestino delgado, local onde a absorção ocorre mais rapidamente ( $C_{máx}$  em 1 h para hesperitina) (Nielsen *et al.* 2006).

As flavanonas (hesperidina) estão naturalmente presentes nas frutas cítricas ligadas a moléculas ramnoglicosídeas, como os 7-O-rutinosídeos de hesperitina. A molécula de glicose é um dos principais determinantes do local de absorção e da biodisponibilidade dos flavonoides e tem sido relatado que a biodisponibilidade dos monoglicosídeos de flavonoides é superior aos rutinosídeos (Manach *et al.* 2005; Nielsen *et al.* 2006; Habauzit *et al.* 2009).

Um estudo duplo-cego, randomizado e controlado por placebo feito em humanos indicou uma melhora significativa na biodisponibilidade do metabólito da hesperidina do suco de laranja após modificação enzimática. O produto hesperitina-7-glucosídeo, gerado após remoção do grupo ramnose desse flavonoide pela hesperidinase, levou a uma concentração plasmática da aglicona (hesperitina) quatro vezes maior em comparação com a bebida não modificada (Nielsen *et al.* 2006).

Li *et al.* (2008) compararam a cinética de absorção da hesperidina pura, hesperidina hidrolisada por  $\beta$ -glucosidase (BglA) isolada de levedura, hesperitina pura e

aquela obtida de uma tradicional comida chinesa (chamada *Chenpi*). Os autores reportaram que a hesperidina apresenta menor biodisponibilidade que a hesperitina e que a biotransformação da hesperidina (tanto no extrato como na forma pura) levou a redução do T<sub>máx</sub> dos níveis plasmáticos de hesperitina. Além disto, o valor da área sobre a curva (ASC) da hesperitina, expresso como concentração *versus* tempo era quatro vezes maior na administração oral e três vezes maior na administração intravenosa na hesperidina hidrolisada com a levedura.

A absorção dos glicosídeos de flavonoides no intestino delgado pode ocorrer de duas maneiras: 1) o glicosídeo é hidrolisado pela lactase-florizina hidrolase, presente na borda em escova, e então a aglicona livre difunde-se através das células epiteliais por transporte passivo ou por difusão facilitada (Day *et al.* 2003) e 2) a molécula glicosídica pode ser transportada para o interior do enterócito por meio de um transportador de glicose, o SGLT-1 (*sodium glucose linked transporter*) e desglicosilada pelas  $\beta$ -glicosidases (glicocerebrosidases e glicosidases citosólicas) presentes intracelularmente. Ambas as vias de absorção originam agliconas intracelulares que, posteriormente, se tornam conjugados glucurônicos ou sulfatados (Nielsen *et al.* 2006; Day *et al.* 2003).

No intestino delgado e no epitélio do cólon, os flavonoides já poderão sofrer reações de conjugação, como a glucuronidação e a metilação (Brand *et al.* 2008). Após serem transportados dos enterócitos ao fígado pelo sistema-porta ligados à albumina ou via linfática, os flavonoides sofrem biotransformações por meio das enzimas de conjugação de fase II, UDP's glucuronosiltransferases e sulfotransferases, formando vários metabólitos com ácidos glucurônicos e de grupos sulfatos (Matsumoto *et al.* 2004).

Ao sofrerem essas modificações, os flavonoides podem tornar-se metabólitos mais ativos ou serem eliminados do organismo mais facilmente por tornarem-se mais polares; dessa forma, muitos desses produtos metabólicos podem ser detectados na urina e fezes humanas (Yang *et al.* 2012). A concentração dos principais metabólitos oriundos da metabolização da HD administrada em ratos que receberam uma dose de hesperidina (100mg/Kg) foi 51,6 % de hesperitina-7-O- $\beta$ -D- glucuronídeo e 41,4 % de hesperitina-3'-O- $\beta$ -D-glucuronídeo após 4 horas da ingesta (Matsumoto *et al.* 2004).

Finalmente, os metabólitos conjugados aos glucuronídeos e sulfoglucuronídeos podem ser excretados pela bile e/ou urina, dependendo do metabólito formado (Manach *et al.* 2003).

Em relação a biodisponibilidade da glicosil-hesperidina, um estudo conduzido por Yamada *et al.* (2006) comparou a absorção e a excreção urinária da glicosil-hesperidina em relação à hesperidina em ratos. Os resultados obtidos mostraram que G-HD apresenta o mesmo perfil de metabólitos excretados na urina que a hesperidina, e que a glicosil-hesperidina é mais eficientemente absorvida, devido à sua alta solubilidade. Segundo os autores, a administração de glicosil-hesperidina levou a um rápido aumento nos níveis séricos do metabólito hesperitina-glucuronídeo (após 15 min) alcançando o pico máximo após 6 horas. Os autores sugerem ainda que quando oralmente administrada a glicosil-hesperidina é inicialmente hidrolisada pelas enzimas  $\alpha$ -glicosidases no intestino delgado, onde há a liberação da hesperidina e subsequentemente é hidrolisada a hesperitina pelas  $\beta$ -glicosidases por bactérias intestinais.

Um estudo recente demonstrou que a solubilidade das flavanonas no suco, especialmente da hesperidina, é um fator chave para a absorção de flavanonas da laranja. Além disso, o processamento da bebida também pode afetar a composição de flavonoides e, portanto, a biodisponibilidade das flavanonas. Os autores mostraram que o aumento da concentração de flavanonas no suco pela adição de extrato de flavanona de laranja afetou a proporção de compostos solúveis/insolúveis, aumentou a absorção no intestino e a biodisponibilidade desses compostos (Vallejo *et al.* 2010).

A Figura 18 ilustra os caminhos metabólicos da glicosil-hesperidina e hesperidina conforme relatado por Nielsen *et al.* (2006) e por Yamada *et al.* (2006).

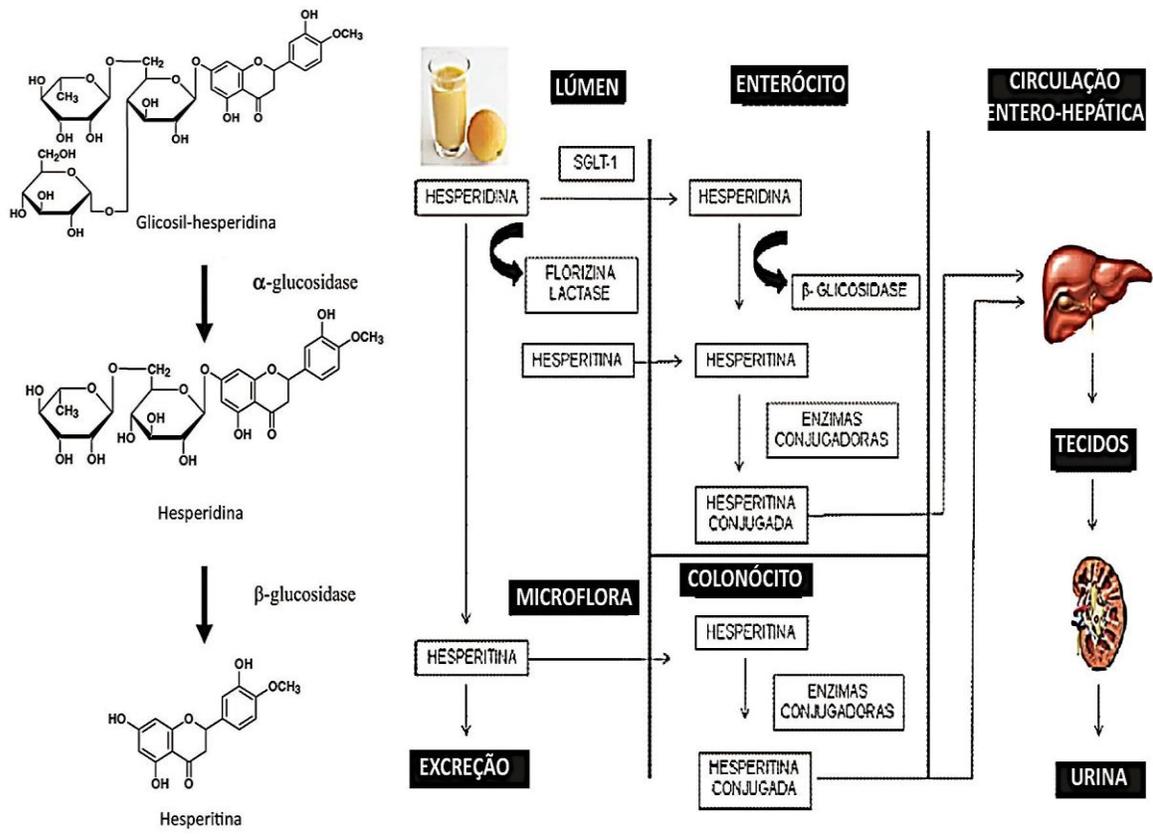


Figura 18. Caminhos metabólicos da glicosil-hesperidina e hesperidina (adaptado de Nielsen *et al.* 2006; Yamada *et al.* 2006; Dourado, 2009)

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar o efeito da suplementação de hesperitina e de seus derivados glicosilados (hesperidina e glicosil-hesperidina) no perfil lipidômico e na lipoperoxidação em fígado de ratos *Wistar* alimentados com dieta hiperlipídica associada à frutose e verificar a biodisponibilidade desses flavonoides no plasma dos animais. Além disto, comparar estes efeitos nos animais alimentados com dieta normocalórica (DNORMO) e dieta hiperlipídica (DHIPER) associada à frutose.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

Avaliar nos ratos suplementados com hesperitina e seus glicosídeos e nos animais controles (dieta normo e hiperlipídica), os seguintes parâmetros:

- Perfil lipidômico do tecido hepático: perfil de lípidos por EASI-MS (espectrometria de massas com ionização ambiente por *sonic-spray*) e a composição de ácidos graxos dos lípidos totais e das frações por cromatografia à gás (CG);

- Medida da lipoperoxidação no tecido hepático através da quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS);

- Biodisponibilidade dos compostos no plasma dos animais através da quantificação de seus metabólitos por cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (UHPLC-MS).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Preparo das soluções

As soluções padrões aquosas de hesperidina, hesperitina (padrão Sigma) e glicosil-hesperidina (Hyashibara, Japan) foram preparadas em água filtrada e administradas na dose de 0,5 mmol eq hesperitina/Kg de peso do animal.

### 4.2 Animais e tratamento

Foram utilizados ratos *Wistar*, machos, com peso inicial variando entre 90 e 122 g provenientes do CEMIB (Centro de Bioterismo da UNICAMP). O projeto de pesquisa foi submetido para aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade São Francisco e foi aprovado sob o registro: protocolo 001.10.2014 e IP.CIUCA 200.225.122.34. Todos os animais permaneceram 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 um período claro/escuro de 12 horas, temperatura  $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3$  e de umidade  $55\% \pm 3$ , com livre acesso a água e ração.

Como mostram a Figura 19 e a Tabela 2, os animais foram divididos em cinco grupos (4 animais cada), sendo um controle dieta normocalórica (DNORMO), outro controle dieta hiperlipídica (DHIPER) e os demais receberam a mesma dieta do grupo controle dieta hiperlipídica e foram suplementados na concentração de 0,5 mmol flavonoide/kg de peso do animal através de gavagem orogástrica diária durante 8 semanas com os seguintes compostos: glicosil-hesperidina (G-HD) hesperidina (HD) e hesperitina (HT).

Os grupos controles DNORMO e DHIPER receberam gavagem com água, e os animais eram pesados em dias alternados para ajuste da dosagem. Após a primeira semana de vida dos animais, eles permaneceram 4 semanas para adaptação com as dietas, antes ao início da suplementação com os flavonóides.

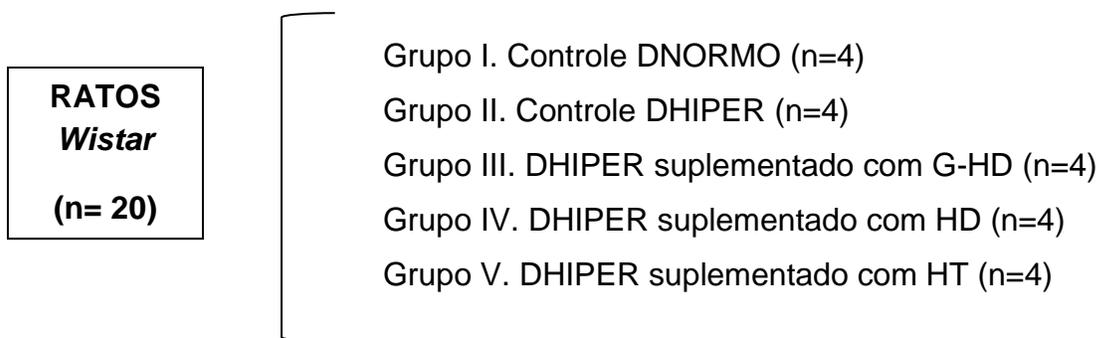


Figura 19. Divisão dos animais nos grupos experimentais. DNORMO: dieta normocalórica e DHIPER: dieta hiperlipídica.

Tabela 2. Suplementação e dieta dos animais

	Água	Água+ frutose 10%	Dieta normocalórica (Purina®)	Dieta hiperlipídica AIN 93	Suplementação
Grupo I	X		X		Água
Grupo II		X		X	Água
Grupo III		X		X	G-HD
Grupo IV		X		X	HD
Grupo V		X		X	HT

A Tabela 3 mostra a composição centesimal das dietas, DNORMO e DHIPER segundo informações do fabricante (Purina®) e dados coletados na literatura. A Tabela 4 exibe a composição de ácidos graxos das dietas.

#### 4.3 Sacrifício dos animais, obtenção do plasma e tecidos.

Após 8 semanas recebendo a suplementação diária com os flavonóides, os animais foram sacrificados no Laboratório de Farmacologia da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Os mesmos foram anestesiados por via respiratória com isoflurano. Amostras de fígado foram retiradas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, sendo posteriormente armazenadas em freezer a -80 °C. A gordura epididimal também foi retirada e pesada.

Tabela 3. Composição nutricional das dietas (Fruet, 2010; Pauli *et al.* 2008)

	<b>DNORMO*</b> <b>(Labina, Purina®)</b>	<b>DHIPER</b> <b>AIN 93</b>
Kcal/g	± 3,3	5,5
Carboidratos e Fibras	5,5%	-
Fibra (cel. microc.)	-	5,0%
Amido milho	-	11,5%
Amido dextrinizado	-	13,2%
Sacarose	-	10,0%
Lipídeos totais	4%	-
Óleo de soja	-	4,0%
Banha	-	31,2%
Proteína bruta	23%	
Caseína	-	20,0%
L-cistina	-	0,3%
Cloreto de colina	-	0,25%
BHT	-	0,0036%
Minerais	12%	3,5%
Mix vitamínico	-	1,0%

\*Composição básica: milho, farelo de soja, farelo de trigo, farinha de peixe, remoído de trigo, soja integral moída, fosfato bicalcico, feno de alfafa, calcário calcítico, cloreto de sódio, cloreto de colina, premix vitamínico mineral, aditivo antifúngico fungistático.

Tabela 4. Composição de ácidos graxos (% relativa) das dietas

<b>Ácidos Graxos</b>	<b>DNORMO</b> <b>(Labina, Purina®)</b>	<b>DHIPER</b> <b>AIN 93</b>
14:0	2,23 ± 1,33	1,83 ± 0,27
16:0	17,02 ± 0,18	22,29 ± 0,67
18:0	4,90 ± 0,32	15,20 ± 0,42
∑ AGS	24,15 ± 1,11	39,32 ± 0,58
16:1 n-7	1,26 ± 0,32	2,36 ± 0,55
18:1 n-9	27,47 ± 0,22	37,59 ± 0,41
∑ AGMI	28,73 ± 0,46	39,95 ± 0,68
18:2 n-6	42,74 ± 0,75	18,41 ± 0,16
∑ AGPI n-6	42,74 ± 0,75	18,41 ± 0,16
18:3 n-3	0,20 ± 0,14	0,49 ± 0,05
20:5 n-3	0,17 ± 0,11	0,03 ± 0,03
22:5 n-3	0,02 ± 0,04	0,03 ± 0,01
22:6 n-3	0,37 ± 0,18	0,01 ± 0,01
∑AGPI n-3	0,76 ± 0,46	0,57 ± 0,05

Os valores estão apresentados na forma de média e desvio padrão (n = 3). DNORMO: dieta normocalórica, DHIPER: dieta hiperlipídica, AGS: ácidos graxos saturados, AGMI: ácidos graxos mono-insaturados, AGPI: ácidos graxos poli-insaturados.

#### **4.4 Preparo do homogenato dos tecidos hepáticos**

Para a preparação dos homogenatos, fragmentos dos fígados ( $\pm 100$  mg) dos animais foram pesados e adicionados a solução salina tamponada PBS (800  $\mu$ L). A mistura foi triturada e homogeneizada (Rivelli *et al.* 2010).

#### **4.5 Análise lipidômica do tecido hepático**

##### **4.5.1 Extração dos lipídeos totais**

A extração total dos lipídeos das amostras foi realizada como descrito previamente por Folch *et al.* (1957). A cada 1 mL de amostra (dieta ou homogenato) adicionou-se 5 mL de solução clorofórmio:metanol (2:1, v/v) em temperatura ambiente, levados a vortex por 10 minutos, e adicionado mais 1 mL de NaCl 1M e novamente levado ao vortex por mais 1 minuto. Em seguida, foram centrifugadas por 10 min a 2000 rpm, e a fase inferior coletada e transferida para tubos de ensaio.

##### **4.5.1.2 Quantificação dos lipídeos totais**

Após extração, os lipídeos totais foram quantificados por secagem em estufa e pesagem. Em um becker previamente seco, dessecado e pesado (peso inicial) adicionou-se 1 mL de clorofórmio contendo os lipídeos que foram extraídos do fígado dos animais. Este foi levado à estufa a 110 °C por uma hora e posteriormente pesado (peso final). O resultado foi expresso como mg de lipídeos totais/g de fígado (Checchi, 2003).

##### **4.5.2 Separação das classes de lípidos por extração em fase sólida**

O procedimento utilizado para a separação dos lípidos por extração em fase sólida foi o descrito por Burdge *et al.* (2000). Neste processo, faz-se a separação preliminar dos lípidos polares, fosfolípidos e ácidos graxos não esterificados (AGNE) e dos lípidos

neutros, ésteres de colesterol (EC) e triacilgliceróis (TAG), no cartucho SPE de aminopropilsilica (BondElut® NH<sub>2</sub>, Agilent®) utilizando clorofórmio. Em seguida foi eluído sequencialmente fosfatidilcolina (FC), fosfatidiletanolamina (FE) e ácidos graxos não esterificados (AGNE) aumentando a polaridade dos solventes. As frações de FC e FE foram recolhidas em um mesmo tubo para análise. Um segundo cartucho SPE foi utilizado para separar TAG de EC. Os seguintes solventes foram utilizados para as eluições sucessivas: clorofórmio (TAG-CE); clorofórmio:metanol (60:40) (FC); metanol (FE); clorofórmio:metanol: ácido acético (AGNE) (100:2:2); hexano (CE); hexano:clorofórmio:etilacetato (100:5:5) (TAG).

#### **4.5.3 Determinação da composição de ácidos graxos por cromatografia a gás**

O solvente com os lípidos extraídos das dietas ou do fígado obtidos nas etapas anteriores foi seco sob atmosfera de N<sub>2</sub> e posteriormente os ácidos graxos foram convertidos em ésteres metílicos de ácidos graxos usando BF<sub>3</sub> metanol (AOCS, 1993). A cada tubo contendo as frações lipídicas foram adicionados 2 mL de NaOH 5N em metanol, para banho maria a 100°C por 5 minutos e, após, resfriado com água corrente. Em seguida, foram adicionados 2,5 mL de reagente esterificante BF<sub>3</sub> metanol, levado novamente ao banho Maria a 100°C por 5 minutos e, posteriormente, resfriado com água corrente. Foram adicionados 2 mL de solução saturada de NaCl e agitado em vórtex por 30 segundos. Acrescentou-se 2,5 mL de hexano, agitou-o em vórtex e em seguida foi centrifugado a 2000rpm por 5 minutos. O sobrenadante contendo os ésteres metílicos em hexano foram analisados por cromatografia à gás usando cromatógrafo CHROMPACK® (modelo CP 9001) com o detector de ionização e a coluna capilar CP-Sil 88 (WCOT Fused Silica 59 m x 0.25 mm), com detector a 280°C e injetor a 250 °C. A temperatura inicial foi de 180 °C por 2 minutos, programado para aumentar 10 °C por minuto até 210 °C por 30 minutos. O carregador a gás usado foi o hidrogênio na frequência de fluxo de 2,0 mL/ minuto. 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 injetados sob as mesmas condições (Supelco Chemical Co). A composição de cada ácido graxo foi expressa sobre o percentual de

ácidos graxos totais, analisada no software Chromatostation N2000, de acordo com a área de cada pico.

#### **4.5.4 Caracterização do perfil de lípides por EASI-MS (espectrometria de massas com ionização ambiente por *sonic-spray*)**

Os lípides presentes no tecido hepático foram avaliados por EASI-MS em colaboração com o Laboratório Thompson do Instituto de Química da Unicamp. Os espectros foram adquiridos no modo íon positivo utilizando um espectrômetro de massas quadrupolo único (Shimadzu LCMS, 2010) equipado com uma fonte EASI, cujo método é descrito em detalhes por Haddad e colaboradores (2008). As condições típicas de EASI-MS foram as seguintes: pressão de gás ( $N_2$ ) nebulização de 100 psi, ângulo de  $30^\circ$ , e o fluxo de metanol de  $20 \mu\text{L min}^{-1}$ . Uma pequena gota do lipídeo extraído como descrito em 4.5.1 ( $2 \mu\text{l}$ ) foi colocada diretamente sobre uma superfície de papel (papel de envelope pardo *Kraft*) e espectros de massa foram acumulados ao longo de 60 s, sendo digitalizados na faixa de 50 a 1000  $m/z$ .

#### **4.6 Quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no fígado**

Para avaliar a lipoperoxidação, foi utilizada a medida de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) de acordo com o método desenvolvido por Martins *et al.* (2009), baseada em Ohkawa *et al.* (1979). Conforme a técnica,  $250 \mu\text{L}$  de amostra (plasma ou homogenatos dos tecidos) foram misturados com  $25 \mu\text{L}$  BHT 4% em metanol, 1mL de ácido tricloroacético a 12%, 1mL de ácido tiobarbitúrico 0,73% e  $750 \mu\text{L}$  de tampão Tris-HCl 0,1 mol/L contendo 0,1mmol/L de EDTA em pH 7,4. Após 60 minutos de incubação em banho-maria em ebulição, as amostras foram rapidamente resfriadas em banho de gelo, e adicionado 1,5mL de n-butanol. A amostra foi homogeneizada por 30 segundos em vortex e centrifugada a 3.000 rpm por 10 minutos. As absorbâncias dos sobrenadantes obtidos com o ensaio foram lidas em

espectrofotômetro a 532 nm. A quantificação foi realizada utilizando uma curva de calibração com tetrametoxipropano (Figura 20)

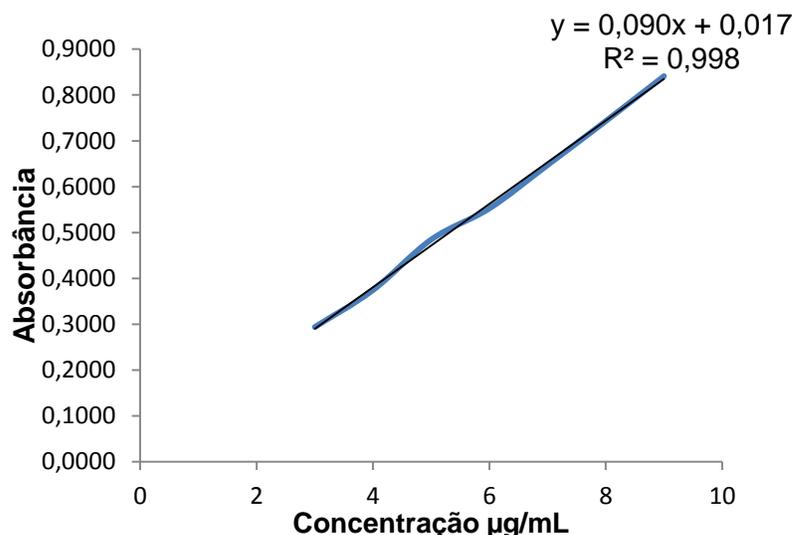


Figura 20. Curva padrão para determinação da concentração de malondialdeído a partir de tetrametoxipropano.

## 4.7 Biodisponibilidade da glicosil-hesperidina, hesperidina e hesperitina

### 4.7.1 Tratamento dos animais

Foram utilizados 9 ratos *Wistar* machos de peso aproximado de 350g. Três horas antes do experimento, os animais foram pesados e divididos aleatoriamente em 3 grupos de 3 animais e mantidos em jejum com acesso a água *ad libitum*. As soluções de G-HD, HD e HT preparadas por dissolução em água foram administradas aos animais por gavagem na concentração de 1 mmol/Kg de peso em 2 mL de água, conforme descrito por Yamada *et al.* (2006). Para controle, foi coletado sangue dos animais via punção caudal em eppendorfs heparinizados antes da suplementação com os flavonoides. Após a gavagem, os animais foram devolvidos às gaiolas e providos de água, sem a ração.

#### 4.7.2 Obtenção do plasma

Para obtenção do plasma, os ratos mantidos em jejum por 3 horas antes do procedimento, com acesso apenas a água *ad libitum*, foram anestesiados com isofurano (3%) e foi realizada punção caudal com seringa tipo insulina (0,13 x 0,45 mm) e agulha 30G para obtenção do material controle. Seis e nove horas após a administração dos flavonóides os ratos foram novamente anestesiados e o procedimento de coleta reproduzido. Os eppendorfs contendo aproximadamente 250 µL de soro heparinizado foram centrifugados a 2500 rpm por 15 minutos para obtenção do plasma.

#### 4.7.3 Quantificação dos metabólitos por UHPLC-MS (cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas)

A quantificação dos metabólitos por UHPLC-MS foi realizada em cooperação com o Departamento de Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da Unicamp

Uma alíquota de 50 µL de plasma foi suspensa em 200 µL de uma solução preparada com metanol, água e ácido fórmico 6:4:0,1 (v/v/v), e aplicada em unidade filtrante HV (Durapore) em PE com membrana DU Rapore de poro 0,45 µm, 13 mm não estéril (Millex™) (Yamada *et al.* 2006). O filtrado foi analisado por cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplado a espectrômetro de massas TQD Acquity (Waters - USA). Foi utilizada uma coluna C18 BEH Acquity Waters (1,7 µm x 2,1 mm x 50 mm) com temperatura do forno em 30 °C. A eluição foi feita por gradiente com fluxo de 200 µL/min, utilizando como fase móvel os solventes A (0,1% ácido fórmico em água) e B (metanol), de acordo com o gradiente: início 95% A + 5% B; em 8 min 100% B, mantido até 8,5 min e depois retorno às condições iniciais e estabilização até 10 min.

Foram injetados 7 µL de cada amostra, que ficaram armazenadas a 20 °C no auto injetor do equipamento. A detecção foi feita por um espectrômetro de massas triplo-quadropolar (TQD Acquity, Waters) com fonte de ionização por *electrospray* (ESI), realizando varredura em modo negativo nas seguintes condições: capilar de 3000 V,

cone de 35 V, temperatura da fonte de 150 °C e temperatura de dessolvatação de 300 °C.

Nas análises, foram monitorados os metabólitos conjugados ao ácido glucorônico, eridictiol-glucuronídeo ( $m/z$  463), hesperitina-glucuronídeo ( $m/z$  477) e o homoeridictiol- glucuronídeo ( $m/z$  478), metabólitos conjugados ao sulfato, hesperitina-sulfato ( $m/z$  380) além da HT ( $m/z$  301) e HD ( $m/z$  609).

A concentração do metabólito majoritário, hesperitina-glucuronídeo ( $m/z$  477) foi determinada comparando-se a área do pico com uma curva de calibração construída a partir da diluição seriada de uma solução padrão de hesperitina (Sigma®) preparada na concentração de 1 mg/mL em metanol, considerando a seguinte equação da reta:

$$\text{Hesperitina } (\mu\text{g/mL}) = (4 \times 10^{-5}) (\text{área do pico}) \times 112,28$$

#### **4.8 Análise estatística**

Foram realizadas análises de variância (ANOVA) das médias e desvio-padrão e quando esta apontou diferença estatisticamente significativa procedeu-se a comparação das médias de dois grupos pelo teste *t* student (não pareado) e de três ou mais grupos pelo teste Tukey, considerando o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). Todas as análises foram avaliadas estatisticamente no software Instat (GraphPad Software, San Diego, CA - versão 2.0) e os gráficos foram elaborados com auxílio do software Origin (OriginLab 2011, versão 8.6).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Relação peso total, gordura epididimal e lípidos totais hepáticos dos animais

A Tabela 5 mostra o peso final dos animais, da gordura epididimal e a média da relação individual peso do animal/gordura epididimal dos grupos controles e suplementados; e a Tabela 6 mostra a quantificação dos lipídeos totais do fígado e a relação peso animal/lipídeos totais dos mesmos grupos. O percentual de gordura epididimal e lipídeos hepáticos estão mostrados nas Figuras 21 e 22, respectivamente.

Conforme mostrado na Tabela 5, o peso corporal dos animais nos grupos analisados não mostrou diferenças significativas. Frente a esses resultados, pode-se supor que a diferença na quantidade de calorias das duas dietas utilizadas, as quais apresentavam  $\pm 3,3$  Kcal/g (controle DNORMO) e 5,5 Kcal/g (controle DHIPER), não foi suficiente para induzir a obesidade nos animais. Os percentuais de gordura utilizados em relação ao valor calórico total das dietas, que foram de 4% na DNORMO e 34% na DHIPER, também não apresentaram influência sobre o ganho de peso dos animais, ainda que tenha sido acrescido à dieta do grupo controle DHIPER níveis de gordura acima, do recomendado para a espécie (Reeves *et al.* 1993).

O grupo controle DHIPER manteve a menor relação peso/gordura epididimal ( $p=0,053$ ), o que significa que estes animais mostraram maior conteúdo de gordura abdominal quando comparado com o grupo DNORMO. Estes resultados sugerem que a DHIPER é a responsável por alterações desfavoráveis em relação ao acúmulo de gordura abdominal. É possível observar que a suplementação com a HT levou ao maior acúmulo de gordura epididimal, em comparação com o grupo controle DHIPER.

Na Tabela 6 observa-se um aumento significativo no conteúdo de lipídeos totais do fígado dos animais do grupo controle DHIPER comparado ao controle DNORMO. Os animais que receberam a suplementação com os antioxidantes também mantiveram altos teores de lípidos hepáticos. Quando relacionados os pesos dos animais aos teores de lípidos totais, foi possível observar uma redução significativa nesta relação ( $p=0,02$ ) para o grupo controle DHIPER, comparado ao grupo controle DNORMO, uma vez que houve aumento na concentração de lípidos hepáticos nesses animais, coerente

com a alta concentração de gordura da dieta. As suplementações com os flavonoides não alteraram o conteúdo de lípides totais hepáticos comparado ao controle DHIPER.

Além da quantidade de gordura e do valor calórico das dietas, a composição e/ou a relação dos ácidos graxos da dieta também podem ter influenciado os resultados. A DNORMO contém predominância de AGPI n-6, em especial de ácido linoleico (C18:2 n-6; 42,74%), enquanto a DHIPER contém altos teores de ácidos graxos saturados (39,32%) e monoinsaturados (39,95%) conforme mostrado anteriormente na Tabela 4. Jen *et al.* (2003) avaliaram os efeitos de diferentes fontes de ácidos graxos poli-insaturados sobre a regulação do peso corporal de ratas e verificaram que a dieta hiperlipídica que utiliza como fonte lipídica o óleo de soja, que contém altos teores de ácido linoleico (C18:2 n-6), induziu maior ganho de peso que outras fontes de gordura.

Dados similares foram reportados por Vinueza *et al.* 2008 em ratos com dieta rica em gordura saturada por 30 dias e suplementados com HD e/ou suco de laranja os quais mostraram o mesmo padrão de aumento em relação ao ganho de peso e tecido adiposo visceral comparado ao grupo não suplementado (controle).

Outro estudo realizado com ratos alimentados com uma dieta elevada em colesterol (1%) e suplementados com HT (0,02%), ácido m-hidroxicinâmico, ácido 3,4-dihidroxi-fenilpropionico e ácido 3-metoxi-4-hidroxi-cinâmico ou ácido ferúlico, não observou diferenças no ganho de peso, na ingestão alimentar e no peso dos órgãos entre os grupos experimentais (Kim *et al.* 2003). Dados similares também foram reportados por Franco (2007) quando comparou o peso de animais alimentados com dieta normocalórica (óleo de soja 7%) ou hiperlipídica (óleo de soja 14%) sedentários ou exercitados, não sendo observadas diferenças significativas de ganho de peso.

A síntese de acetyl-CoA a partir da frutose quando oferecida em excesso, leva ao excesso de ácidos graxos que serão armazenados na forma de TAGs no fígado. Além disso, este carboidrato é conhecido por levar ao ganho de peso, aumento de adiposidade visceral, hipertensão, hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia e resistência à insulina em ratos. Ratos *Wistar* alimentados com 63% de frutose tiveram acúmulo de gordura no fígado, comprometendo até 100% dos hepatócitos, dependendo do tempo de exposição ao carboidrato (Castro *et al.* 2011).

Tabela 5. Peso dos animais, ganho de peso, gordura epididimal e relação peso animal/gordura epididimal de animais controles e suplementados com hesperitina e seus derivados glicosilados

<b>Grupos</b>	<b>Peso final dos animais (g)</b>	<b>Ganho de peso dos animais (g)</b>	<b>Gordura epididimal (g)</b>	<b>Relação peso animal/gordura epididimal</b>	<b>Gordura epididimal (% em relação ao peso do animal)</b>
Controle DNORMO	465,2 ± 54,9	353,2 ± 45,7	9,6 ± 3,3	50,7 ± 9,9	2,1 ± 0,7
Controle DHIPER	470,5 ± 62,3	361,2 ± 56,4	12,6 ± 2,5	37,9 ± 3,9*	2,7 ± 0,5
DHIPER + G-HD	497,2 ± 66,7	382,5 ± 62,3	15,2 ± 2,4	32,7 ± 2,2	3,1 ± 0,5
DHIPER + HD	451,7 ± 44,6	347,2 ± 47,0	15,2 ± 4,7	31,3 ± 7,0	3,4 ± 1,0
DHIPER + HT	536,2 ± 44,6	424,2 ± 38,9	21,0 ± 3,1#	25,7 ± 2,6#	3,9 ± 0,6#

\* p=0,053 comparado ao grupo DNORMO, # p<0,05 comparado ao grupo DHIPER. Os valores estão expressos como média e desvio padrão (n = 4; teste t student entre as médias de dois grupos e teste Tukey entre as médias de três ou mais grupos). DNORMO: dieta normocalórica; DHIPER: dietahiperlipídica; G-HD: glicosil-hesperidina; HD: hesperidina; HT: hesperitina.

Tabela 6. Lipídeos totais hepático e relação peso animal/lipídeos totais hepático de animais controles e suplementados com hesperitina e seus derivados glicosilados

	<b>Lipídeos totais hepático (mg/g de tecido)</b>	<b>Relação peso animal/lipídeos totais hepático</b>	<b>Lipídeos totais hepático (% em relação ao peso)</b>
Controle DNORMO	73,79 ± 10,44	6,42 ± 1,54	15,86 ± 2,24
Controle DHIPER	124,27 ± 15,97*	3,85 ± 0,59*	26,41 ± 3,39*
DHIPER + G-HD	138,84 ± 31,53	4,25 ± 1,48	27,92 ± 6,34
DHIPER + HD	130,10 ± 17,24	3,45 ± 0,37	28,80 ± 3,81
DHIPER + HT	99,03 ± 33,85	4,99 ± 1,42	18,47 ± 6,31

\* p<0,05 comparado ao grupo DNORMO. Os valores estão expressos como média e desvio padrão (n = 4, teste t student entre dois grupos ou teste Tukey entre três ou mais grupos). DNORMO: dieta normocalórica; DHIPER: dietahiperlipídica; G-HD: glicosil-hesperidina; HD: hesperidina; HT: hesperitina, LTH: lipídeos totais hepático.

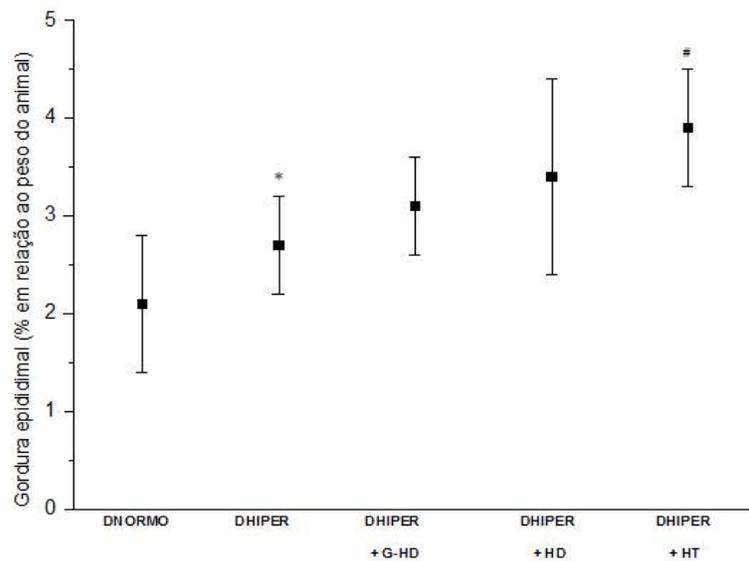


Figura 21. Gordura epididimal (% em relação ao peso animal) de ratos controles e suplementados com hesperitina e seus derivados glicosilados. Os valores estão apresentados na forma de média e desvio padrão (n = 4), teste *t* student. DNORMO: dieta normocalórica, DHIPER: dieta hiperlipídica, G-HD: glicosil-hesperidina, HD: hesperidina, HT: hesperitina. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo DNORMO # $p < 0,05$  comparado ao grupo DHIPER.

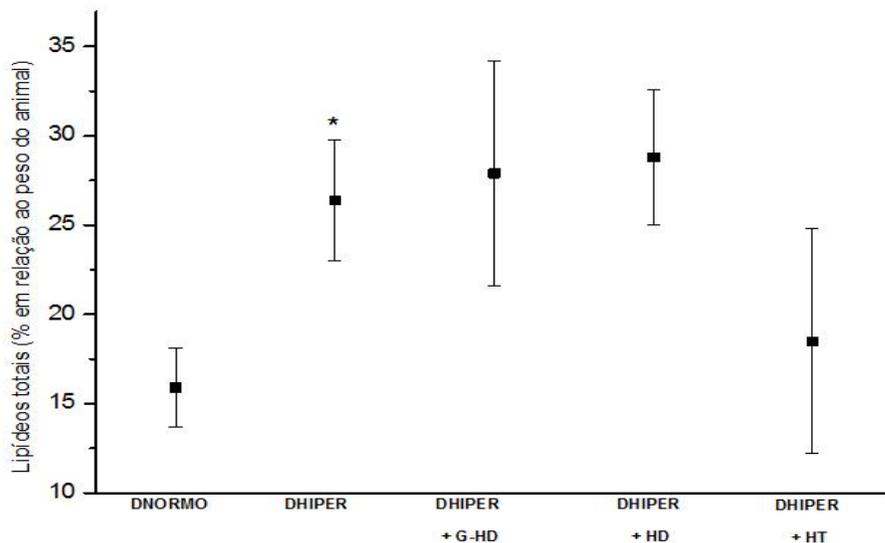


Figura 22. Lipídeos totais hepáticos (% em relação ao peso animal) de ratos controles e suplementados com hesperitina e seus derivados glicosilados. Os valores estão apresentados na forma de média e desvio padrão (n = 4), teste *t* student. DNORMO: dieta normocalórica, DHIPER: dieta hiperlipídica, G-HD: glicosil-hesperidina, HD: hesperidina, HT: hesperitina. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo DNORMO.

## 5.2 Composição de ácidos graxos dos lípides totais do fígado

A composição de ácidos graxos dos lípides totais reportada na Tabela 7 mostra que a dieta promoveu alterações significativas na composição de ácidos graxos do tecido hepático. É possível observar que a DHIPER influenciou a composição de AGS e de AGMI, mas não dos AGPI. No grupo DHIPER é possível verificar um acréscimo de 60% no conteúdo de ácido oleico (C18:1 n-9) e uma redução de 41 e 45% dos ácidos araquidônico (C20:4 n-6) e docosahexaenoico (DHA, 22:6 n-3) respectivamente, comparado ao controle DNORMO. O teor dos ácidos palmítico (C16:0) e linoleico (C18:2 n-6) não mostraram alterações em função da dieta. Por outro lado, não foi possível observar alterações significativas na composição de ácidos graxos dos lípides totais no fígado dos animais suplementados com os três antioxidantes.

Também é possível verificar um aumento significativo (por volta de 60-70%) na relação dos AGPIs das famílias n-6/n-3 nos lípides dos animais do grupo DHIPER (controle e suplementados).

Considerando a composição de ácidos graxos da dieta, conforme descrito na Tabela 4, pode-se observar que o menor consumo de ácidos graxos insaturados de cadeia longa das famílias n-6 e n-3 nos animais alimentados com DHIPER, composta basicamente de banha e óleo de soja, parece ter contribuído para a menor concentração desses ácidos no fígado dos animais e um aumento significativo do ácido oleico (C18:1 n-9), um ácido graxo mono-insaturado.

O óleo de soja é constituído basicamente de 11% de ácido palmítico (C16:0), 4% de ácido esteárico (C18:0), 22% de oleico (C18:1 n-9), 56% de ácido linoleico (C18:2 n-6) e 7% de linolênico (C18:3 n-3) enquanto a banha animal possui 39, 45 e 11% de AGS, AGMI e AGPI, respectivamente e 0,095% de colesterol, sendo predominantes os ácidos graxos oleico (C18:1 n-9), palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0) (USDA, 2012), dados coerentes com os valores observados na composição de ácidos graxos das dietas conforme relatado na Tabela 4.

Tabela 7. Composição de ácidos graxos (% relativa) dos lípides totais no fígado de animais controles e suplementados com hesperitina e seus derivados glicosilados

Ácidos graxos	Controle DNORMO	Controle DHIPER	DHIPER + G-HD	DHIPER + HD	DHIPER + HT
14:0	0,38 ± 0,04	0,30 ± 0,08	0,50 ± 0,09	0,40 ± 0,11	0,40 ± 0,11
16:0	23,75 ± 1,63	22,15 ± 1,10	23,10 ± 0,60	22,20 ± 0,70	23,10 ± 1,20
18:0	13,60 ± 1,91	10,50 ± 2,32	8,90 ± 3,10	9,90 ± 1,20	8,80 ± 2,20
Σ AGS	37,73 ± 2,41	32,95 ± 1,64* ↓	32,50 ± 3,35	32,50 ± 0,57	32,30 ± 1,17
16:1 n-7	3,75 ± 1,70	2,20 ± 0,60* ↓	2,80 ± 0,20	2,00 ± 0,50	2,10 ± 0,30
18:1 n-9	18,30 ± 2,50	29,30 ± 0,50* ↑	31,90 ± 5,10	30,00 ± 1,20	31,70 ± 3,40
20:1 n-9	0,70 ± 0,29	1,30 ± 0,44	1,10 ± 0,60	0,90 ± 0,19	1,10 ± 0,27
Σ AGMI	22,75 ± 4,96	32,80 ± 1,12* ↑	35,80 ± 5,97	32,90 ± 1,71	34,90 ± 3,60
18:2 n-6	20,50 ± 1,00	22,90 ± 1,80	21,60 ± 1,40	22,10 ± 1,70	22,40 ± 0,80
20:4 n-6	15,40 ± 3,10	9,10 ± 0,70* ↓	8,20 ± 2,90	9,80 ± 1,80	8,10 ± 2,30
Σ AGPI n-6	35,90 ± 4,56	32,00 ± 1,19	29,80 ± 2,86	31,90 ± 1,35	30,50 ± 2,14
18:3 n-3	0,60 ± 0,15	0,40 ± 0,08* ↓	0,40 ± 0,07	0,40 ± 0,05	0,40 ± 0,04
20:5 n-3	0,20 ± 0,05	0,10 ± 0,05	0,03 ± 0,04	0,03 ± 0,04	0,03 ± 0,04
22:5 n-3	0,50 ± 0,09	0,30 ± 0,07* ↓	0,20 ± 0,08	0,30 ± 0,07	0,30 ± 0,07
22:6 n-3	2,00 ± 0,48	1,00 ± 0,04* ↓	1,00 ± 0,27	1,20 ± 0,27	1,10 ± 0,20
Σ AGPI n-3	3,30 ± 0,36	1,80 ± 0,56* ↓	1,63 ± 0,50	1,93 ± 0,22	1,83 ± 0,54
Σ AGPI n-6/Σ AGPI n-3	10,88 ± 0,39	17,78 ± 2,56*	18,28 ± 2,93	16,53 ± 0,85	16,67 ± 1,81

\* p<0,05 comparado ao grupo DNORMO (média ± desvio padrão, n = 4; teste t student entre dois grupos). DNORMO: dieta normocalórica, DHIPER: dietahiperlipídica, G-HD: glicosil-hesperidina, HD: hesperidina, HT: hesperitina, AGS: ácidos graxos saturados, AGMI: ácidos graxos mono-insaturados, AGPI: ácidos graxos poli-insaturados.

Segundo Franco (2007), o ácido linolênico (C18:3 n-3) e o ácido linoleico (C18:2 n-6), apesar de pertencerem a famílias distintas, requerem as mesmas enzimas para o seu metabolismo e portanto competem entre si, especialmente no passo limitante da reação de dessaturação, ao nível da  $\Delta 6$  dessaturase, enzima que possui maior especificidade pelos ácidos graxos ômega 3. Assim, um maior consumo do ácido linoleico (C18:2 n-6), levará ao aumento dos níveis de ácido araquidônico (C20:4 n-6), conforme observado no grupo DNORMO do presente estudo.

O aumento dos níveis de ácido oleico (C18:1 n-9) em presença da dieta hiperlipídica pode ser proveniente da elongação do ácido esteárico e subsequente dessaturação para ácido oleico (C18:1 n-9), conforme observado por Oosterveer *et al.* 2009. Os autores avaliaram o efeito da dieta hiperlipídica no acúmulo de lípides hepáticos em fígado de roedores e observou que a dieta é capaz de induzir a expressão de genes lipogênicos (*Acc, Fas, Scd1, Elovl6*). A indução da síntese de ácidos graxos hepática levou a um aumento na elongação dos ácidos graxos e subsequente dessaturação em maior taxa do que a observada para a síntese *de novo* destes ácidos graxos.

Aoun *et al* (2010) observaram que o uso de dieta hiperlipídica acrescida de sacarose leva ao acréscimo de ácidos saturados (C12, 14, 16 e 18) e do ácido oleico (18:1 n-9) nos lípides totais do fígado de ratos. Os autores observaram ainda que o uso de extrato contendo uma mistura de polifenóis antioxidantes (Provinol®), embora tenha levado a redução significativa nos teores de lípides totais não promoveram alterações na composição de ácidos graxos hepático.

Bueno *et al.* 2010 avaliaram o perfil de ácidos graxos do fígado de ratos *Wistar* expostos a diferentes dietas contendo o óleo de soja (dieta padrão AIN-93), e dietas com 30 e 50% de substituição do óleo de soja pelo óleo experimental (64% triptanoína, 34% dieptanoína, 2% monoeptanoína). Os níveis hepáticos de ácido oleico (C18:1 n-9) foram mais elevados e os de esteárico, mais baixos, nos grupos expostos à dieta AIN-93, independente do tempo de exposição. O menor consumo de ácidos graxos de cadeia longa, por sua vez, de maneira geral, parece ter contribuído para a menor concentração desses ácidos graxos no fígado dos animais submetidos à substituição parcial do óleo de soja pelo óleo experimental.

### 5.3 Composição de ácidos graxos das frações de lípides do fígado

As classes de lípides foram separadas do extrato total lipídico por extração em fase sólida (*solid phase extraction* – SPE). Este método elui classes de lípides baseada na sua polaridade ou na sua afinidade de ligação à fase sólida. Após a separação das classes de lípides foi realizada a etapa de esterificação dos ácidos graxos, transformando-os em ésteres metílicos de ácidos graxos, tornando-os suficientemente voláteis para serem eluídos em uma temperatura razoável sem decomposição térmica, e avaliados por cromatografia à gás. (Fisk *et al.* 2014).

A Tabela 8 mostra o perfil de ácidos graxos dos fosfolípides (fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina) presentes no fígado dos animais controles e suplementados com HT e seus derivados glicosilados. Os principais componentes dos fosfolípides são os ácidos palmítico (28,09%), esteárico (25,33%), araquidônico (C20:4 n-6; 12,79%) e oleico (C18:1 n-9; 9,52%) nos animais do grupo controle DNORMO. Um perfil de ácidos graxos semelhante foi observado nos fosfolípides dos animais controle DHIPER: palmítico (25,45%), esteárico (34,54%), araquidônico (C20:4 n-6; 15,02%), e oleico (C18:1 n-9; 7,89%).

Nesta fração, é possível observar aumento significativo dos níveis de ácido esteárico nos animais do grupo DHIPER comparado aos animais DNORMO. Não foi observado diferenças na somatória dos ácidos graxos (saturados, mono e poli-insaturados) entre os grupos controles (DNORMO e DHIPER).

Denota-se, portanto, que o aumento do ácido oleico (C18:1 n-9) no grupo DHIPER, observado nos lípides totais (Tabela 7) não ocorre nos lípides de membrana, os quais parecem incorporar preferencialmente o ácido esteárico (C18:0) provindo da dieta.

Em relação à suplementação, é possível observar que a G-HD e a HD levaram a redução significativa no teor de ácido esteárico (C18:0), o que refletiu na redução da somatória dos ácidos graxos saturados nestes dois grupos. Percebe-se também, embora não significativa devido ao alto valor de desvio padrão, o aumento dos níveis de AGMI e AGPI n-6 e n-3 nos três grupos suplementados.

Tabela 8: Composição de ácidos graxos (% relativa) nos fosfolípides presentes nas membranas (fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina) do fígado de animais controles e suplementados com hesperitina e seus derivados glicosilados

Ácidos graxos	Controle DNORMO	Controle DHIPER	DHIPER + G-HD	DHIPER + HD	DHIPER + HT
14:0	5,50 ± 3,69	2,67 ± 1,40	5,58 ± 3,51	5,45 ± 3,62	1,58 ± 1,67
16:0	28,09 ± 2,24	25,45 ± 2,45	23,88 ± 4,99	20,33 ± 3,13	22,97 ± 6,41
18:0	25,33 ± 3,88	34,54 ± 3,90* ↑	26,62 ± 4,03# ↓	20,41 ± 5,02# ↓	36,85 ± 9,33
Σ AGS	58,23 ± 6,51	62,33 ± 5,53	56,08 ± 4,19# ↓	45,51 ± 7,87# ↓	61,40 ± 14,93
16:1 n-7	1,87 ± 0,98	1,97 ± 0,83	2,43 ± 2,35	4,60 ± 5,14	1,33 ± 1,28
18:1 n-9	9,52 ± 1,22	7,89 ± 1,87	10,42 ± 5,16	13,95 ± 7,05	9,29 ± 3,82
20:1 n-9	2,09 ± 1,82	1,14 ± 1,38	0,91 ± 0,77	1,12 ± 1,37	0,37 ± 0,82
Σ AGMI	12,43 ± 2,34	9,19 ± 2,82	13,75 ± 7,33	19,54 ± 10,94	10,73 ± 4,70
18:2 n-6	10,97 ± 2,77	9,86 ± 1,94	8,44 ± 1,79	10,47 ± 2,97	7,18 ± 2,99
20:4 n-6	12,79 ± 6,27	15,02 ± 1,15	16,61 ± 6,17	18,83 ± 6,89	13,86 ± 8,26
Σ AGPI n-6	23,76 ± 8,12	23,01 ± 4,78	25,06 ± 6,69	29,30 ± 5,88	21,04 ± 9,97
18:3 n-3	1,96 ± 1,65	2,39 ± 2,66	0,81 ± 0,45	1,50 ± 1,53	1,34 ± 1,12
20:5 n-3	1,82 ± 1,84	1,11 ± 0,48	0,83 ± 0,37	1,50 ± 0,42	0,82 ± 0,85
22:5 n-3	0,51 ± 0,16	0,40 ± 0,18	0,73 ± 0,57	0,72 ± 0,24	0,46 ± 0,25
22:6 n-3	1,62 ± 0,68	1,71 ± 0,16	2,82 ± 1,26	2,92 ± 1,71	2,24 ± 1,50
Σ AGPI n-3	4,74 ± 2,71	3,98 ± 2,51	4,37 ± 1,15	4,91 ± 1,81	4,58 ± 2,38
Σ AGPI n-6/Σ AGPI n-3	7,43 ± 5,14	7,87 ± 3,52	5,99 ± 1,69	7,91 ± 2,26	5,17 ± 2,39

\*p<0,05 comparado ao grupo DNORMO, # p<0,05 comparado ao grupo DHIPER (média ± desvio padrão, n = 4; teste t student entre dois grupos ou teste Tukey entre três ou mais grupos). DNORMO: dieta normocalórica, DHIPER: dietahiperlipídica, G-HD: glicosil-hesperidina, HD: hesperidina, HT: hesperitina, AGS: ácidos graxos saturados, AGMI: ácidos graxos mono-insaturados, AGPI: ácidos graxos poli-insaturados.

De acordo com os dados mostrados na Tabela 9, os triacilgliceróis presentes no fígado dos animais controle DNORMO possuem uma concentração predominante dos ácidos palmítico (C16:1), oleico (C18:1 n-9) e linoleico (C18:2 n-6). Esses dados conferem com os valores encontrados na literatura (Petridou *et al.* 2005; Zhukova *et al.* 2014). Nos animais do grupo DHIPER, que receberam dieta rica em ácidos graxos saturados é possível observar um aumento significativo na concentração do ácido oleico (C18:1 n-9). Por outro lado, os teores de ácido docosahexaenoico (C22:6 n-3), foram significativamente reduzidos (por volta de 72% de redução).

A suplementação com a HT levou a redução na concentração de ácido linoleico (C18:2 n-6), o que refletiu na redução na soma dos AGPI da família n-6. Também foi observada uma redução de 23% na soma de AGS em presença da HD.

A Tabela 10 mostra o perfil de ácidos graxos da fração de ésteres de colesterol presentes no fígado dos animais controle DNORMO, controle DHIPER e aqueles que receberam dieta hiperlipídica associada à frutose e suplementados com os flavonoides.

Pode-se observar que os ácidos graxos prevalentes nos ésteres de colesterol no fígado dos animais alimentados com dieta controle DNORMO são os ácidos palmítico (C16:0), oleico (C18:1 n-9) e linoleico (C18:2 n-6), perfazendo 29, 27 e 36% em relação aos ácidos graxos totais, respectivamente. Pode-se observar um aumento significativo nos teores de ácidos oleico (C18:1 n-9) e linoleico (C18:2 n-6) e uma redução nos níveis de ácidos graxos poli-insaturados da família n-3 (22:5 n-3 e 22:6 n-3) na fração de ésteres de colesterol nos animais controle DHIPER comparado ao controle DNORMO.

Pode-se observar ainda que a suplementação com a G-HD resultou em aumento na concentração de ácido oleico (C18:1 n-9), refletindo em um aumento na soma dos AGMI. Esse flavonóide também interferiu na incorporação de ácido linolênico (C18:3 n-3), refletindo no aumento de seus níveis no grupo DHIPER suplementado com G-HD.

Tabela 9. Composição de ácidos graxos (% relativa) de triacilgliceróis (TAGs) presentes no fígado de animais controles e suplementados com hesperitina e seus derivados glicosilados

Ácidos graxos	Controle DNORMO	Controle DHIPER	DHIPER + G-HD	DHIPER + HD	DHIPER + HT
14:0	2,70 ± 0,80	2,50 ± 1,33	1,90 ± 1,37	0,90 ± 0,15	1,88 ± 1,10
16:0	27,20 ± 4,47	24,00 ± 2,03	16,70 ± 5,50	20,00 ± 2,34	27,28 ± 4,33
18:0	2,80 ± 0,20	3,70 ± 1,89	4,80 ± 5,67	2,20 ± 0,32	2,78 ± 0,71
Σ AGS	32,70 ± 4,74	30,20 ± 3,35	23,40 ± 9,16	23,10 ± 2,43# ↓	31,95 ± 4,82
16:1 n-7	2,04 ± 0,58	1,40 ± 0,70	2,10 ± 1,21	1,40 ± 0,31	3,64 ± 1,21# ↑
18:1 n-9	26,60 ± 1,12	31,90 ± 1,43* ↑	27,40 ± 11,8	39,60 ± 8,37	34,59 ± 2,62
20:1 n-9	1,74 ± 0,84	1,30 ± 0,71	0,90 ± 0,62	0,80 ± 0,29	2,17 ± 2,13
Σ AGMI	30,38 ± 2,89	34,60 ± 1,31	30,40 ± 12,19	41,80 ± 7,99	40,40 ± 2,69# ↑
18:2 n-6	25,70 ± 3,12	30,60 ± 2,07	21,90 ± 9,16	28,20 ± 4,27	22,73 ± 5,19# ↓
20:4 n-6	3,40 ± 1,76	3,00 ± 0,43	2,20 ± 0,69	3,20 ± 0,52	2,45 ± 0,72
Σ AGPI n-6	29,10 ± 2,81	33,60 ± 2,04	24,10 ± 9,65	31,40 ± 4,56	25,18 ± 4,88# ↓
18:3 n-3	0,40 ± 0,33	0,70 ± 0,41	1,40 ± 2,18	0,80 ± 0,93	0,88 ± 1,02
20:5 n-3	0,80 ± 0,52	0,70 ± 0,25	2,00 ± 2,04	0,40 ± 0,21	0,39 ± 0,20
22:5 n-3	1,70 ± 0,98	0,90 ± 0,28	0,60 ± 0,24	0,70 ± 0,29	1,00 ± 0,85
22:6 n-3	2,90 ± 1,67	0,80 ± 0,20* ↓	2,80 ± 3,01	0,90 ± 0,21	0,73 ± 0,49
Σ AGPI n-3	5,80 ± 2,87	3,10 ± 0,84	6,80 ± 5,72	2,80 ± 1,48	2,47 ± 0,66
Σ AGPI n-6/Σ AGPI n-3	5,02 ± 7,34	10,84 ± 4,36	3,55 ± 6,47	11,21 ± 5,75	11,33 ± 4,66

\* p<0,05 comparado ao grupo DNORMO, # p<0,05 comparado ao grupo DHIPER (média ± desvio padrão, n = 4; teste t student entre dois grupos ou teste Tukey entre três ou mais grupos). DNORMO: dieta normocalórica, DHIPER: dietahiperlipídica, G-HD: glicosil-hesperidina, HD: hesperidina, HT: hesperitina, AGS: ácidos graxos saturados, AGMI: ácidos graxos mono-insaturados, AGPI: ácidos graxos poli-insaturados.

Tabela 10. Composição de ácidos graxos (% relativa) de ésteres de colesterol (EC) presentes no fígado de animais controles e suplementados com hesperitina e seus derivados glicosilados

Ácidos graxos	Controle DNORMO	Controle DHIPER		DHIPER + G-HD	DHIPER + HD	DHIPER + HT
14:0	4,95 ± 1,82	1,44 ± 0,72*	↓	0,91 ± 0,12	1,88 ± 2,43	1,47 ± 0,85
16:0	28,96 ± 5,36	24,42 ± 1,94		24,21 ± 1,78	23,19 ± 1,66	26,04 ± 2,28
18:0	2,58 ± 1,25	2,57 ± 0,56		2,17 ± 0,70	4,29 ± 1,61	3,11 ± 1,63
∑ AGS	36,49 ± 5,74	28,43 ± 1,01***	↓	27,29 ± 1,77	29,37 ± 1,77	30,63 ± 2,56
16:1 n-7	8,36 ± 2,44	1,44 ± 1,28*	↓	2,65 ± 0,44	1,96 ± 1,25	1,69 ± 1,06
18:1 n-9	26,67 ± 7,89	38,75 ± 1,18**	↑	42,33 ± 1,36#	↑ 41,61 ± 2,60	40,89 ± 2,37
20:1 n-9	1,74 ± 1,57	0,81 ± 0,42		0,98 ± 0,52	0,67 ± 0,79	0,96 ± 0,70
∑ AGMI	35,90 ± 7,44	41,00 ± 2,49		45,97 ± 1,39#	↑ 44,25 ± 3,24	43,53 ± 2,16
18:2 n-6	17,88 ± 5,16	27,52 ± 2,07*	↑	23,41 ± 2,17	23,35 ± 5,16	23,64 ± 0,66# ↓
20:4 n-6	1,57 ± 0,95	1,75 ± 0,28		1,69 ± 0,45	2,16 ± 0,69	1,24 ± 0,78
∑ AGPI n-6	19,45 ± 4,96	29,26 ± 1,78*	↑	25,10 ± 2,47	25,52 ± 5,85	24,88 ± 1,21# ↓
18:3 n-3	2,71 ± 1,68	0,26 ± 0,18***	↓	0,66 ± 0,13#	↑ 0,37 ± 0,19	0,69 ± 0,75
20:5 n-3	1,75 ± 1,36	0,17 ± 0,11		0,34 ± 0,42	0,38 ± 0,44	0,24 ± 0,16
22:5 n-3	1,13 ± 0,64	0,20 ± 0,09***	↓	0,21 ± 0,21	0,04 ± 0,03#↓	0,16 ± 0,12
22:6 n-3	2,58 ± 1,55	0,22 ± 0,05*	↓	0,29 ± 0,22	0,10 ± 0,02#↓	0,22 ± 0,15
∑ AGPI n-3	8,16 ± 3,23	0,84 ± 0,30*	↓	1,50 ± 0,65	0,87 ± 0,38	0,95 ± 0,39
∑ AGPI n-6/∑ AGPI n-3	3,36 ± 2,52	38,47 ± 10,77*	↑	19,11 ± 5,65##	↓ 32,82 ± 9,75	32,57 ± 16,44

\* p<0,05; \*\*p = 0,05 e \*\*\*p = 0,06 comparados ao grupo DNORMO, # p<0,05 e ## p = 0,05 comparado ao grupo DHIPER (média ± desvio padrão, n = 4; teste t student entre dois grupos ou teste Tukey entre três ou mais grupos). DNORMO: dieta normocalórica, DHIPER: dietahiperlipídica, G-HD: glicosil-hesperidina, HD: hesperidina, HT: hesperitina, AGS: ácidos graxos saturados, AGMI: ácidos graxos mono-insaturados, AGPI: ácidos graxos poli-insaturados.

É conhecido que a composição dos ácidos graxos da dieta determina a sua incorporação e o perfil em ácidos graxos das membranas biológicas, alterando diversas funções celulares, principalmente pela modulação dos ácidos graxos esterificados aos fosfolípidos de membrana (Nelson e Cox, 2011). Segundo Christie (1985), o fígado de ratos é formado predominantemente por fosfatidilcolina (55%), fosfatidiletanolamina (20%) e quantidades menores de triacilglicerol (7%) e de ésteres de colesterol (5%).

Nossos dados corroboram que a composição de ácidos graxos hepático está diretamente associada com o tipo de ácidos graxos da dieta (Banni *et al.* 2001; Giacometti *et al.* 2002; Barros *et al.* 2013; Fisk *et al.* 2014). Em estudo realizado por Giacometti *et al.* (2002) com camundongos *Balb c* alimentados com DHIPER, foi comprovado que o perfil lipídico é alterado de acordo com a concentração e o tipo de lípide da alimentação. Independentemente do tecido analisado (pulmão, baço, glândulas mandibulares), o ácido graxo predominante nos fosfolípidos foi o ácido palmítico, em concentração duas a três vezes maior que os demais. Os outros ácidos graxos predominantes nos fosfolípidos totais dos tecidos analisados foram: ácido esteárico, ácido oleico (C18:1 n-9), ácido linoleico (C18:2 n-6), ácido araquidônico (C20:4 n-6) e DHA.

Alterações significativas na composição de ácidos graxos nos fosfolípidos de ratos alimentados com DHIPER composta de gordura animal e colesterol (19 e 2% da dieta) por 90 e 180 dias foram relatados por Zhukova *et al.* (2014). Os autores observaram um aumento dos ácidos oleico (C18:1 n-9) e linoleico (C18:2 n-6) e redução do ácido araquidônico (C20:4 n-6) no fígado dos animais nos dois tempos de avaliação. Além disto, o aumento do ácido esteárico foi observado nos animais alimentados por 90 dias com dieta hiperlipídica.

Nossos resultados são similares aos relatados por Zhukova *et al.* (2014). O estudo foi conduzido com ratos machos que receberam DHIPER composta de gordura animal e colesterol (19 e 2% da dieta) por 180 dias. Após 30 dias de alimentação foi possível observar aumento dos níveis de ácido oleico (C18:1 n-9) e redução dos ácidos araquidônico (C20:4 n-6), eicosapentaenoico (C22:5 n-3) e de docosahexaenoico (C22:6 n-3) nos lípidos totais. Após 90 dias de uso, os autores observaram também o

aumento dos níveis de ácidos linoleico (C18:2 n-6) e linolênico (C18:3 n-3) na fração de TAG no fígado dos animais.

O aumento acentuado dos níveis de ácidos oleico (C18:1 n-9) e linoleico (C18:2 n-6) na fração de ésteres de colesterol também foi observado em ratos machos que receberam DHIPER composta de gordura animal e colesterol (19 e 2% da dieta) por 180 dias (Zhukova *et al.* 2014). Os autores observaram também redução nos teores dos ácidos esteárico (C18:0) e araquidônico (C20:4 n-6), o que não foi observado no presente trabalho.

Fisk *et al.* (2014) estudaram a composição de ácidos graxos de ésteres de colesterol de ratas alimentadas com dieta com óleo vegetal de alta ou baixa concentração de ácidos graxos poli-insaturados (óleo de soja e de linhaça). Os animais com a dieta normocalórica apresentaram o seguinte perfil: prevalência de ácido palmítico (43,7%) seguida dos ácidos esteárico (21,1%), linoleico (C18:2 n-6; 13,4 %) araquidônico (C20:4 n-6; 7,8%) e oleico (C18:1 n-9; 7,5%).

Dados semelhantes foram reportados por Caria *et al.* (2014), os quais avaliaram o efeito do café cafeinado e descafeinado em alterações metabólicas e inflamatórias associadas à obesidade utilizando modelo de camundongos e dieta hiperlipídica. Os autores observaram que a DHIPER levou ao aumento dos níveis de ácido oleico (C18:1 n-9) e linoleico (C18:2 n-6) e redução dos ácidos esteárico, araquidônico (C20:4 n-6) e DHA. A suplementação com os antioxidantes não alteraram o perfil de ácidos graxos hepático nos lípidos totais dos animais.

Aoun *et al.* (2010) observaram que a suplementação de ratos com um extrato de polifenóis rico em resveratrol (Provinol®), extraído de suco de uva vermelha, é capaz de reduzir os níveis de TAG hepáticos aumentados no grupo alimentado com dieta hiperlipídica (54,4% de AGS + 33,6% de AGMI), sem todavia alterar de forma estatisticamente significativa a composição de ácidos graxos dos lípidos totais. Os autores observaram pequeno decréscimo nos níveis de AGPI n-3, em especial do DHA no grupo que recebeu o antioxidante.

Moreira & Mancini-Filho (2004) avaliaram o efeito antioxidante dos compostos fenólicos de uma mistura de especiarias (mostarda, canela e erva-doce) sobre o metabolismo dos ácidos graxos em ratos alimentados com ração comercial acrescida

de óleo de soja ou de peixe. Os autores observaram um aumento significativo nos teores de ácido linoleico (C18:2 n-6) no tecido cardíaco e de EPA (C20:5 n-3) no tecido cerebral no grupo experimental, postulando um efeito protetor nos ácidos graxos do chá rico em compostos fenólicos.

Martins *et al.* (2009), relataram que a administração oral por 60 dias nas concentrações de 1.0 g/kg e 2.0 g/kg de peso do animal de chá mate solúvel (*Ilex paraguariensis*), uma rica fonte de polifenóis, é capaz de aumentar os níveis de AGMI (ácido oleico; C18:1 n-9) e de AGPI (ácidos linoleico, C18:2 n-6; e araquidônico, C20:4 n-6) nos lípides totais do fígado dos animais.

Os dados das porcentagens de AGS, AGMI, AGPI n-6, AGPI n-3 e da relação AGPI n-6/n-3 da DNORMO em relação a DHIPER podem ser visualizados na Figura 23 e os dados dos principais ácidos graxos e as alterações que a suplementação com os flavonóides promoveram estão exibidos na Figura 24.

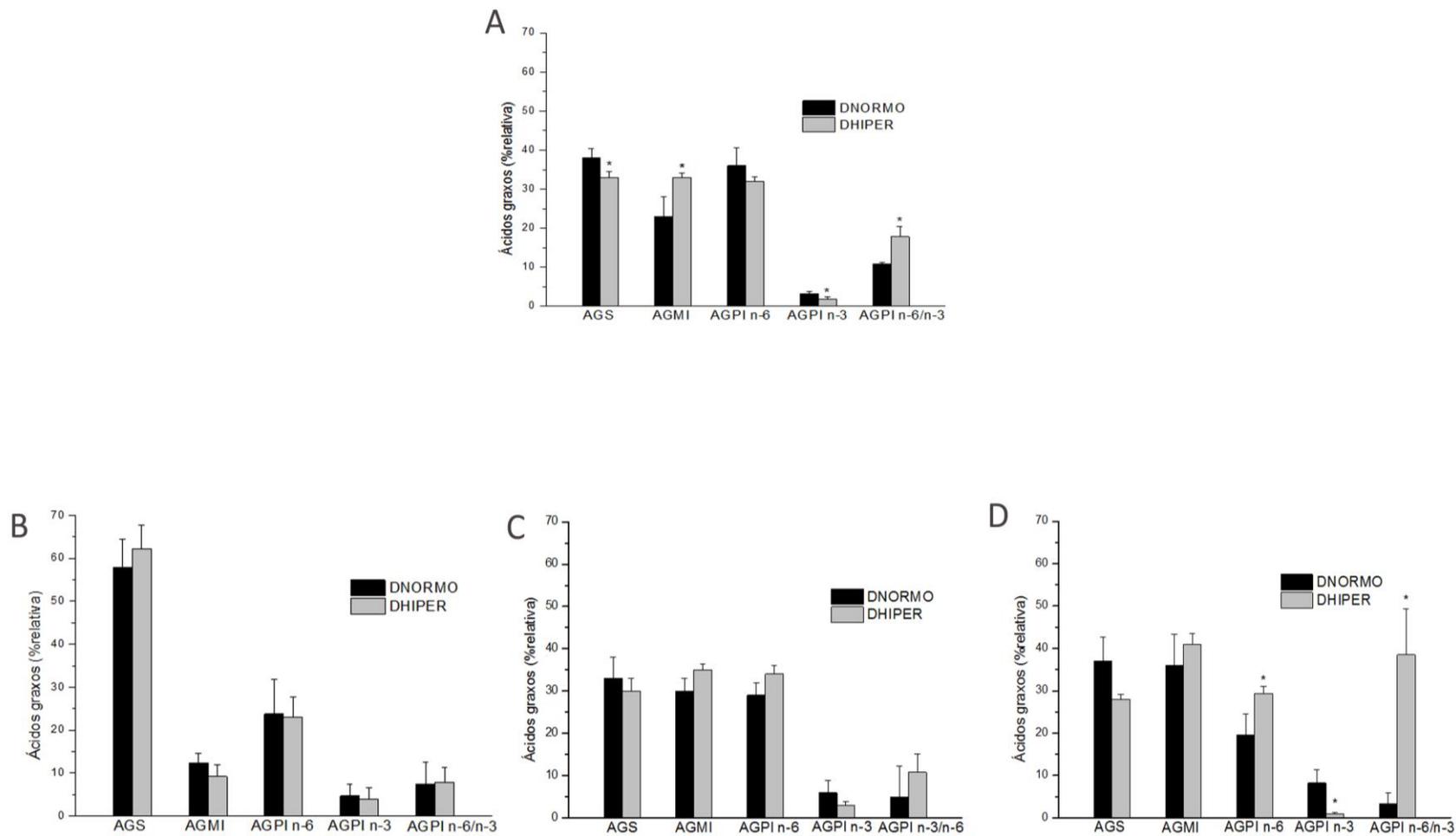


Figura 23. Composição de ácidos graxos (%) dos lípides totais (A) e das frações de fosfolípidos (B), triacilgliceróis (C) e ésteres de colesterol (D) dos grupos controles. Os valores estão apresentados na forma de média e desvio padrão (n = 4), teste *t* student. DNORMO: dieta normocalórica, DHIPER: dieta hiperlipídica, AGS: ácidos graxos saturados, AGMI: ácidos graxos monoinsaturados, AGPI: ácidos graxos poli-insaturados; \* $p < 0,05$  comparado ao grupo DNORMO

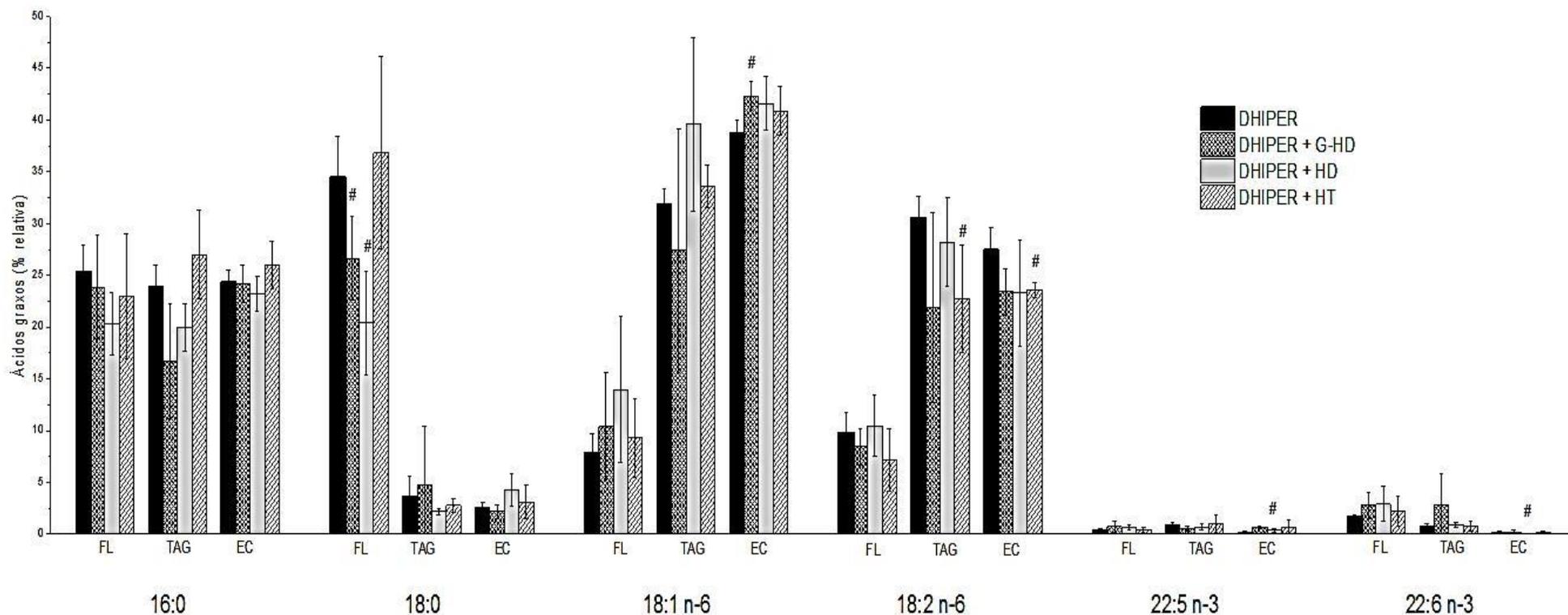


Figura 24. Composição dos principais ácidos graxos (%) das frações de fosfolípidos (FL), triacilgliceróis (TAG) e ésteres de colesterol (EC) dos grupos controle DHIPER e suplementados com hesperitina e seus derivados glicosilados. Os valores estão apresentados na forma de média e desvio padrão (n = 4), teste t student. DHIPER: dieta hiperlipídica, G-HD: glicosil-hesperidina, HD: hesperidina, HT: hesperitina. #p<0,05 em comparação com o grupo DHIPER.

#### 5.4 Perfil de lipídeos hepáticos caracterizados por EASI-MS

Espectrometria de massas com ionização ambiente por *sonic-spray* (EASI-MS) foi diretamente utilizada para a obtenção do perfil lipídico do fígado dos animais. A técnica é simples, rápida e confiável, além de não requerer nenhum tipo de hidrólise, derivatização ou separação cromatográfica, o que representa vantagens sobre outros procedimentos analíticos normalmente utilizados para este propósito. A discriminação dos íons analisados é obtida de acordo com a razão massa/carga ( $m/z$ ). Esta razão  $m/z$  reflete a massa molecular do íon (M), e dos íons carregados (M+1, se protonado; M+23, adutos de sódio; M+39, adutos de potássio). Os lipídeos presentes nas frações de triacilgliceróis (TAG) e à fosfatidilcolina (FC) no fígado dos animais foram detectados principalmente como adutos de sódio no modo positivo  $[M + Na]^+$  e também como moléculas protonadas  $[M + H]^+$  e adutos de potássio  $[M + K]^+$ , conforme discriminado na Tabela 11.

A Figura 25 mostra os espectros de EASI(+)-MS dos lipídeos totais onde se observa a predominância de TAG e FC no fígado dos animais controle DNORMO (A), DHIPER (B) e a Figura 26 mostra os espectros dos lipídeos hepáticos dos animais suplementados com G-HD (A), HD (B) e HT (C). Os TAGs aparecem na faixa de 850 a 1000  $m/z$  de razão massa/carga ( $m/z$ ), enquanto que as moléculas de FC foram detectadas na faixa de 760 a 840  $m/z$  de razão massa/carga ( $m/z$ ).

Comparando-se os espectros do fígado dos animais dos grupos controles, do DNORMO e DHIPER (Figura 25, A e B), percebe-se uma acentuada prevalência de íons acima de 850  $m/z$ , o que mostra níveis mais elevados de TAG no fígado dos animais do grupo DHIPER comparado ao grupo DNORMO, nos quais é possível verificar a prevalência de íons correspondentes à fração de FC ( $m/z$  abaixo de 850). Nos lipídeos do grupo DHIPER o íon de maior intensidade relativa da fração de TAG  $[TAG + Na]^+$  é o de  $m/z$  879 (52:3; POL), seguido 881 (52:2; POO),  $m/z$  877 (52:4; PLL) e 883 (52:1; POS/PoSS). Observa-se no espectro do fígado dos animais do grupo DNORMO a predominância de  $[FC + Na]^+$  com íons de  $m/z$  804 (36:4; LL - OLn - PA), 780 (34:2; PL), 806 (36:3; OL - SLn), 832 (38:4; SA), os quais estão reduzidos no espectro do fígado dos animais do grupo DHIPER.

Tabela 11. Perfil dos principais lípides hepáticos de ratos obtidos por EASI(+)-MS

MM	[M + H] <sup>+</sup>	[M + Na] <sup>+</sup>	[M + K] <sup>+</sup>	Classes de lípides <sup>a</sup>	Composição elementar	Composição de ácidos graxos
757	-	780	-	FC 34:2	C <sub>42</sub> H <sub>80</sub> NO <sub>8</sub> P	PL
759	-	782	-	FC 34:1	C <sub>42</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>8</sub> P	PO
781	782	804	-	FC 36:4	C <sub>44</sub> H <sub>80</sub> NO <sub>8</sub> P	LL - OLn - PA
783	784	806	-	FC 36:3	C <sub>44</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>8</sub> P	OL - SLn
785	-	808	-	FC 36:2	C <sub>44</sub> H <sub>84</sub> NO <sub>8</sub> P	SLn - OO
805	806	828	-	FC 38:6	C <sub>46</sub> H <sub>80</sub> NO <sub>8</sub> P	LA - PDHA - ODPHA
809	-	832	-	FC 38:4	C <sub>46</sub> H <sub>84</sub> NO <sub>8</sub> P	SA
806	807	-	-	TAG 48:0	C <sub>51</sub> H <sub>98</sub> O <sub>6</sub>	PPP
854	-	877	893	TAG 52:4	C <sub>55</sub> H <sub>98</sub> O <sub>6</sub>	PLL
856	-	879	895	TAG 52:3	C <sub>55</sub> H <sub>100</sub> O <sub>6</sub>	POL
858	-	881	897	TAG 52:2	C <sub>55</sub> H <sub>102</sub> O <sub>6</sub>	POO
860	-	883	899	TAG 52:1	C <sub>55</sub> H <sub>104</sub> O <sub>6</sub>	POS/PoSS
878	879	901	-	TAG 54:6	C <sub>57</sub> H <sub>98</sub> O <sub>6</sub>	LLL/OLLn
880	-	903	919	TAG 54:5	C <sub>57</sub> H <sub>100</sub> O <sub>6</sub>	OLL/OOLn
882	-	905	921	TAG 54:4	C <sub>57</sub> H <sub>102</sub> O <sub>6</sub>	OOL
884	-	907	923	TAG 54:3	C <sub>57</sub> H <sub>104</sub> O <sub>6</sub>	OOO/SOL
886	-	909	925	TAG 54:2	C <sub>57</sub> H <sub>106</sub> O <sub>6</sub>	SOO/SSL
902	-	925	-	TAG 56:8	C <sub>59</sub> H <sub>98</sub> O <sub>6</sub>	OLEPA/PLDHA
904	-	927	-	TAG 56:7	C <sub>59</sub> H <sub>100</sub> O <sub>6</sub>	SLEPA/PODHA
906	-	929	-	TAG 56:6	C <sub>59</sub> H <sub>102</sub> O <sub>6</sub>	SOEPA/PSDHA

MM: massa molecular; P: ácido palmítico (C16:0); Po: ácido palmitoleico (C16:1 n-7); S: ácido esteárico (C18:0); O: ácido oleico (C18:1 n-9); L: ácido linoleico (C18:2 n-6); Ln: ácido linolênico (C18:3 n-3); A: ácido araquidônico (C20:4 n-6); EPA: ácido eicosapentaenoico (C20:5 n-3), DPA: ácido docosapentaenoico (C22:5 n-3); DHA: ácido docosahexaenoico (C22:6 n-3). FC: fosfatidilcolina; TAG: triacilglicerol; Número de átomos de carbono seguido pelo número de insaturações.

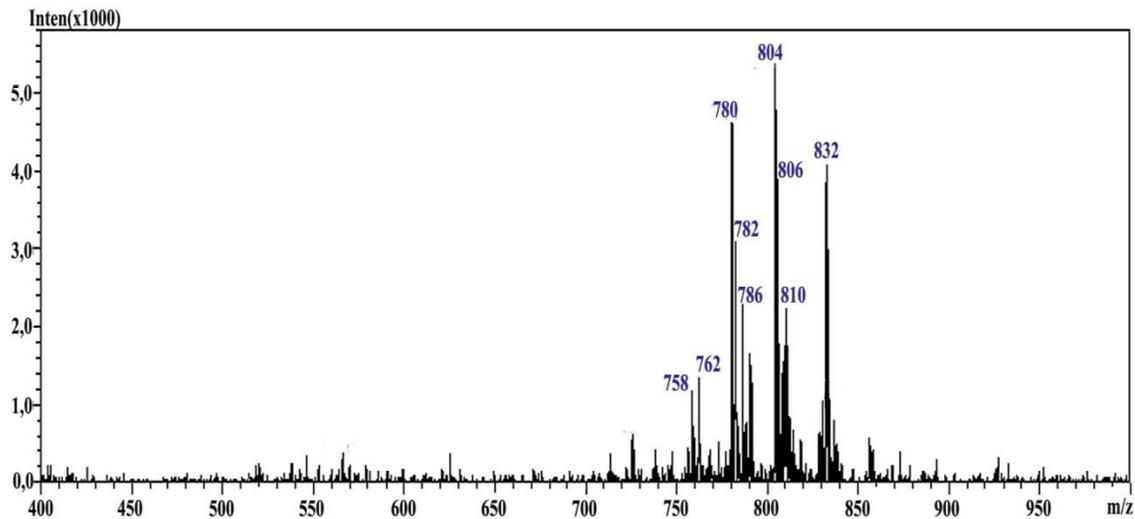
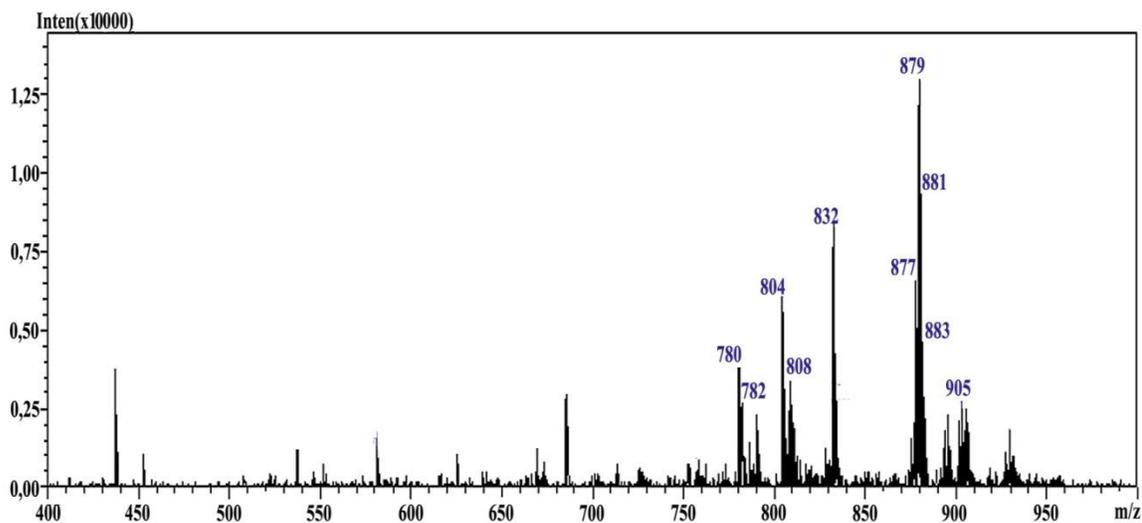
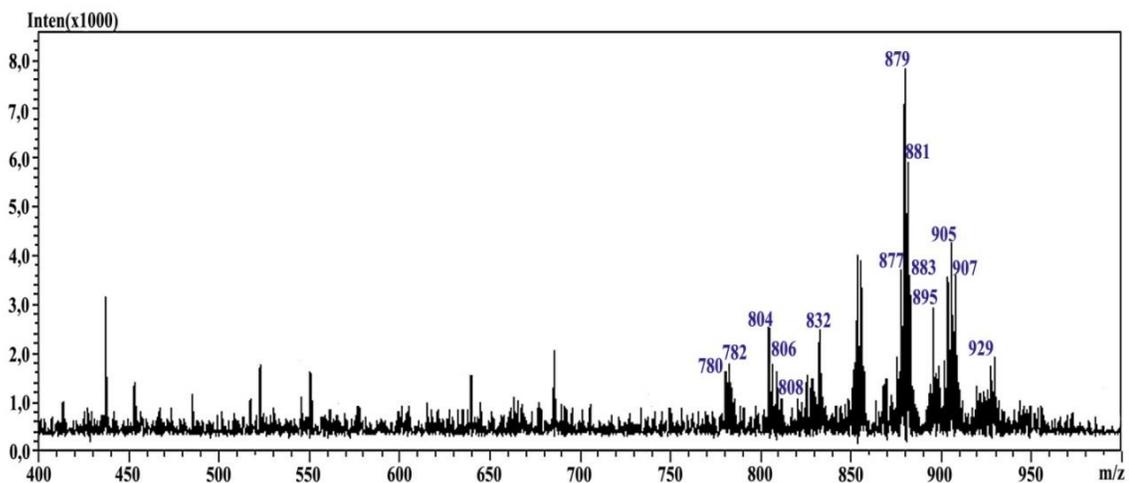
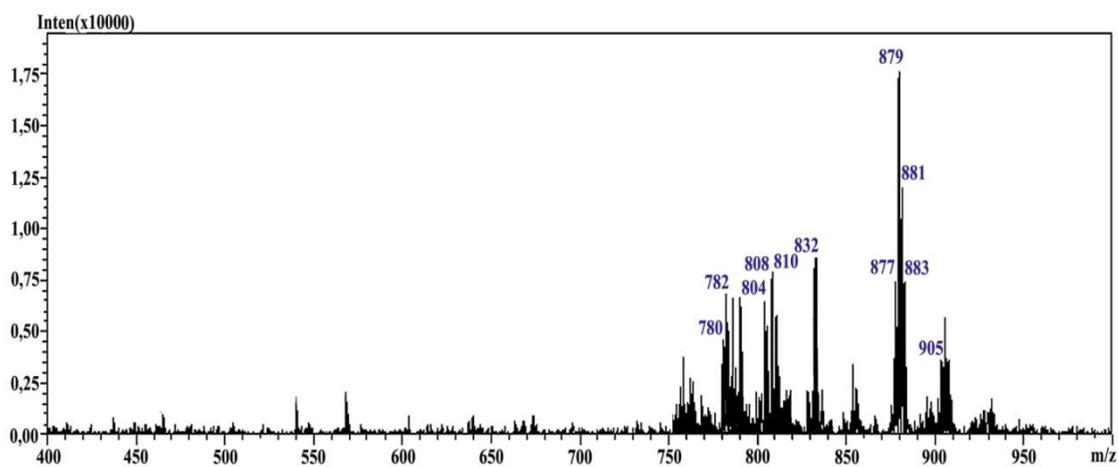
**A****B**

Figura 25. Espectros de massas dos lípides hepáticos de ratos controle DNORMO (A) e DHIPER (B) obtidos por EASI(+)-MS.

A



B



C

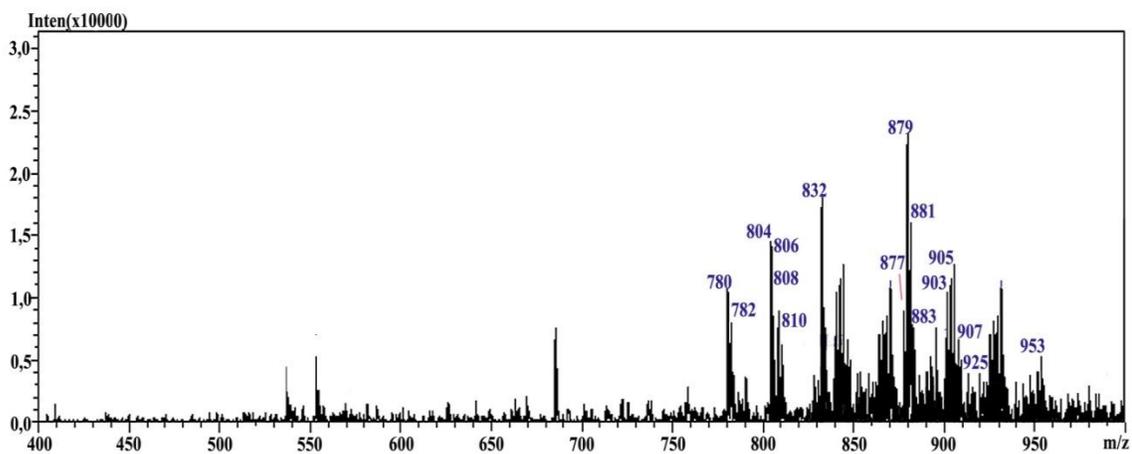


Figura 26. Espectros de massas dos lípides hepáticos de ratos suplementados com G-HD (A), HD (B) e HT (C) obtidos por EASI(+)-MS.

É possível observar ainda que o perfil de TAG e FC detectado por EASI-MS corresponde ao perfil de ácidos graxos analisados por CG, conforme mostrado na Tabela 11. Os ácidos graxos mais abundantes no fígado dos animais do grupo DNORMO são os ácidos palmítico (C16:0) > linoleico (C18:2 n-6) > oleico (C18:1 n-9) > araquidônico (C20:4 n-6), enquanto nos animais do grupo DHIPER observa-se a seguinte sequência: ácidos oleico (C18:1 n-9) > palmítico (C16:0) = linoleico (C18:2 n-6) > araquidônico (C20:4 n-6). Estes dados são coerentes com os espectros observados, os quais indicam que o íon TAG predominante nos lípides do fígado dos animais do grupo DHIPER de  $m/z$  879 (52:3) é provavelmente composto de ácido palmítico / ácido oleico (C18:1 n-9) / ácidos linoleico (C18:2 n-6). Na fração de FC destes animais houve redução da intensidade dos íons  $m/z$  780 (34:2; PL) e 832 (38:4; SA), o que confirma que o fígado destes animais apresenta maiores proporções de ácido oleico (C18:1 n-9) comparado ao grupo DNORMO.

Por outro lado, pode-se observar que os espectros do grupo DHIPER (Figura 25, B) e os suplementados (Figura 26 A B e C), apresentam grande similaridade. Isto mostra que a suplementação parece não alterar a composição de ácidos graxos das moléculas de TAG e FC, ou não é possível verificar pequenas alterações na composição de ácidos graxos das frações de lípidos utilizando a técnica EASI(+)-MS.

Alberici e colaboradores (2011) caracterizaram o perfil de lípidos hepáticos em camundongos com hipertrigliceridemia por EASI-MS. As análises foram realizadas na fração lipídica do tecido hepático sendo identificados fosfatidilcolina como adutos de sódio no modo positivo e fosfatidiletanolaminas e fosfatidilinositol desprotonados, no modo negativo. Os autores observaram maiores níveis de TAG com consequente redução na relação FC/TAG e uma maior inserção do ácido oleico (C18:1 n-9) nas moléculas de TAG destes animais, coerente com os dados observados neste estudo.

Em estudo realizado com indivíduos com doença hepática não alcoólica verificou-se aumento significativo dos níveis de TAG do fígado, sendo os ácidos graxos palmítico (C16:0) e oleico (C18:1 n-9) os que apresentaram alterações significativas, em relação ao grupo controle. Em contraste, houve um decréscimo significativo nos AGPI associados ao TAG, com depleção de ácido eicosapentaenoico (C20:5 n-3) e docosahexaenóico (C22:6 n-3) (Puri *et al.* 2007).

## 5.5 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no fígado dos animais

A medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), usada para avaliar a lipoperoxidação, consiste na análise de produtos finais da peroxidação lipídica (malondialdeído e demais aldeídos de baixo peso molecular) que, ao reagir com o ácido tiobarbitúrico formam bases de Schiff. O malondialdeído (MDA) é um produto secundário da peroxidação lipídica, derivado da  $\beta$ -ruptura de endociclicação de ácidos graxos poli-insaturados. O MDA reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) e forma um cromógeno de cor rosa, cuja absorção ocorre em  $\lambda$  de 532 nm (Figura 27).

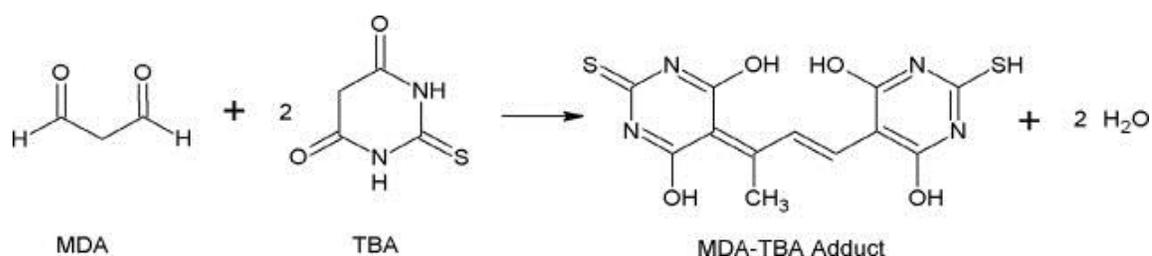


Figura 27. Reação do malondialdeído (MDA) com o ácido tiobarbitúrico (TBA) para formação de um cromógeno de cor rosa (Vasconcelos *et al.* 2007, com modificações).

A Figura 28 mostra a concentração de malondialdeído (MDA nmol/g de tecido) em fígados de ratos tratados com dieta hiperlipídica associada à frutose e suplementados com HT e seus derivados glicosídicos. Pode-se observar que houve redução significativa na concentração de MDA nos grupos suplementados com G-HD e HT comparados ao grupo controle DHIPER. Os dados indicam que estes flavonoides reduzem os níveis de MDA provenientes do aumento da lipoperoxidação hepática induzido pelo excesso de lípidos da dieta (controle DHIPER).

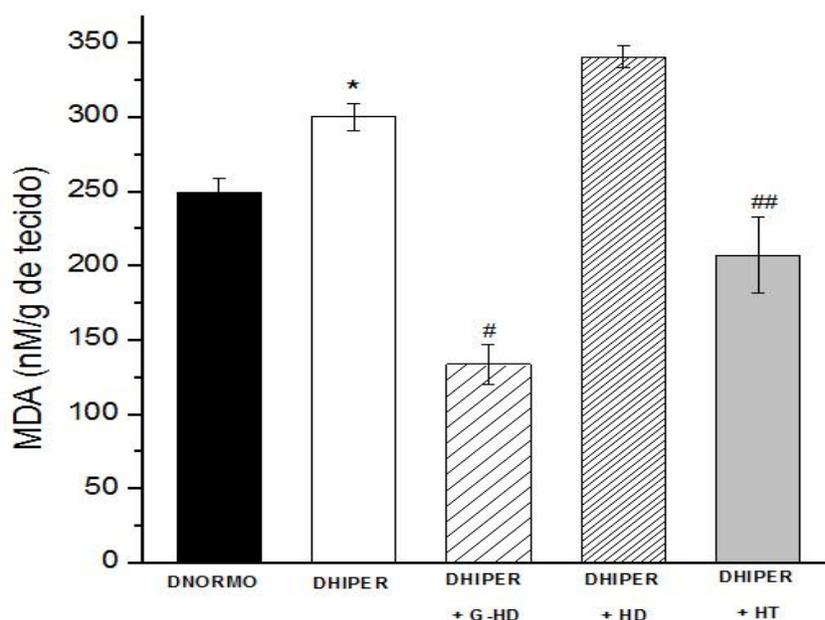


Figura 28. Concentração de malondialdeído (nM/g de tecido) em fígados de ratos controles e suplementados com hesperitina e seus derivados glicosilados. Os valores estão apresentados na forma de média e desvio padrão, teste *t* student. \* $p = 0,027$  quando comparado ao grupo controle DNORMO (dieta normocalórica); # $p < 0,01$ , ## $p = 0,05$  quando comparados ao controle DHIPER (dieta hiperlipídica). G-HD: glicosil-hesperidina, HD: hesperidina, HT: hesperitina

O processo de peroxidação lipídica gera uma cascata de eventos bioquímicos decorrentes da ação dos radicais livres sobre os lípidos insaturados das membranas celulares, propiciando a formação de radicais alquila, alcoxila e peroxila, destruindo sua estrutura, gerando falhas mecânicas durante as trocas metabólicas e desencadeando a morte celular quando exposto a condições extremas (Benzie, 1996; Lima e Abdalla, 2001). Sugere-se que o aumento dos lípidos insaturados da dieta hiperlipídica tenha influenciado na elevação da produção desses metabólitos do estresse oxidativo (Wagner *et al.* 1994).

Tirkey *et al.* (2005) mostraram que a HD apresentou atividade antioxidante, reduzindo o estresse oxidativo induzido pelo tetracloreto de carbono ( $\text{CCl}_4$ ) em fígados de ratos. Essa diminuição foi intensificada com o aumento da dosagem de Hesperidina associada ao  $\text{CCl}_4$ . O mesmo efeito pode ser avaliado durante a natação intercalada combinada à suplementação com HD (Oliveira *et al.* 2013).

Segundo Pari e Shagirtha (2010), a HT apresentou potencial antioxidante satisfatório mostrando ação positiva e reduzindo a lipoperoxidação induzida por cádmio no fígado de ratos *Wistar*, o mesmo observado por Leelavinothan e Kalist (2011).

Em estudo realizado no fígado de animais (hamsters) que receberam uma dieta alta em gordura (10% de óleo de coco acrescido de 0,2% de colesterol) e foram suplementados com HT (0,02%) ou seus metabólitos: ácido hidroxicinâmico, ácido 3,4-dihidroxi-fenilpropiónico e ácido 3-metoxi-4-hidroxi-cinâmico ou ácido ferúlico, foi observado que a HT e seus metabólicos aumentou a capacidade antioxidante dos animais por reduzir os níveis de peróxido de hidrogênio e de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Kim *et al.* 2010).

Em estudo citato anteriormente realizado por Moreira e Mancini-Fo (2004) com mistura de especiarias ricas em compostos fenólicos, foi verificado a inibição significativa da oxidação pelos compostos estudados, além do efeito inibitório da peroxidação lipídica. Os autores relataram que a presença dos antioxidantes alterou a incorporação dos ácidos graxos nos tecidos cerebral e cardíaco, condizendo com os dados observados no presente trabalho.

## **5.6 Identificação e quantificação dos metabólitos no plasma dos ratos**

O plasma dos animais foi analisado por UHPLC-MS nos tempos 6 e 9 horas após a administração dos flavonóides e os principais metabólitos identificados através da razão massa/carga  $m/z$  dos íons formados.

A Figura 29 apresenta os cromatogramas representativos do principal metabólito encontrado no plasma dos animais após 6 horas da administração de G-HD (A), HD (B) e HT (C). O pico majoritário, de  $m/z$  477 correspondente ao íon molecular  $[M-H]^-$  identificado como hesperitina-monoglucuronídeo, foi monitorado em todas as amostras. Na Figura 29 (A, B e C) percebe-se a presença de dois picos em cada cromatograma, com a mesma  $m/z$ , possivelmente isômeros identificados como: hesperitina-7-O- $\beta$ -D-glucuronídeo ( $t_r = 4,78$  min) e a hesperitina-3'-O- $\beta$ -D-glucuronídeo ( $t_r = 5,0$  min) baseado no estudo reportado por Matsumoto *et al.* (2004).

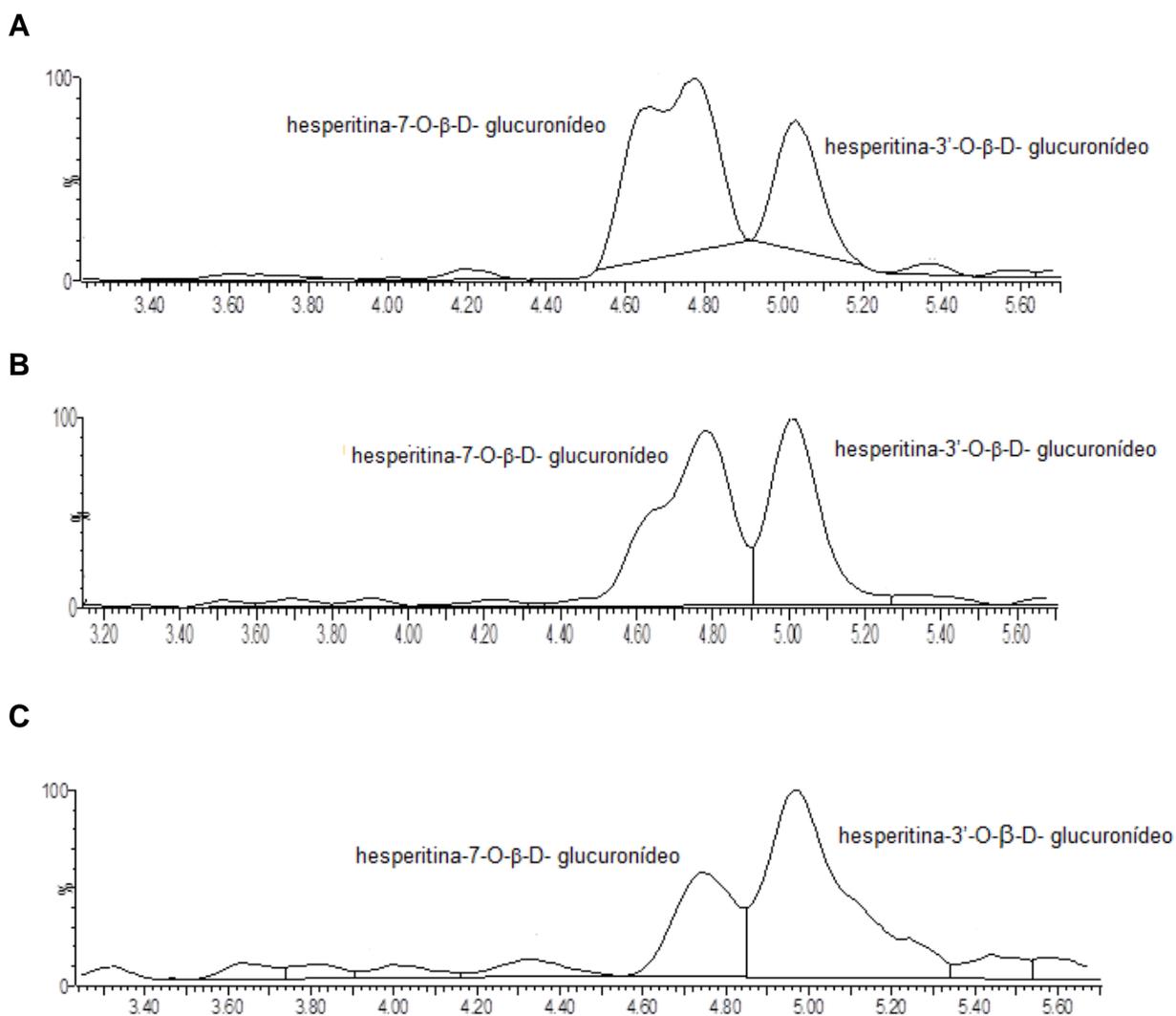


Figura 29. Cromatogramas obtidos por UHPLC-MS do plasma de animais após 6 horas de administração de G-HD (A), HD (B) e HT (C). O pico majoritário  $m/z$  477 corresponde a dois isômeros: hesperitina-7-O-β-D- glucuronídeo ( $t_r = 4,78$  min) e hesperitina-3'-O-β-D- glucuronídeo ( $t_r = 5,0$  min).

Além destes, também foram identificados dois outros metabólitos no plasma dos animais: hesperitina-sulfato ( $m/z=380$ ) e o homoeriodictiol- glucuronídeo ( $m/z=478$ ), presentes em quantidades muito pequenas. A HD ( $m/z$  609) e a HT ( $m/z$  301), a forma aglicona da HD não foram detectadas no plasma dos animais nas condições analisadas.

A Figura 30 apresenta o espectro de massa MS-MS da hesperitina-glucuronídeo ( $m/z$  477) e o surgimento de um fragmento de 301 (aglicona) gerado após colisão da molécula. A fragmentação deste composto coincide com os dados descritos na literatura (Brett *et al.* 2009).

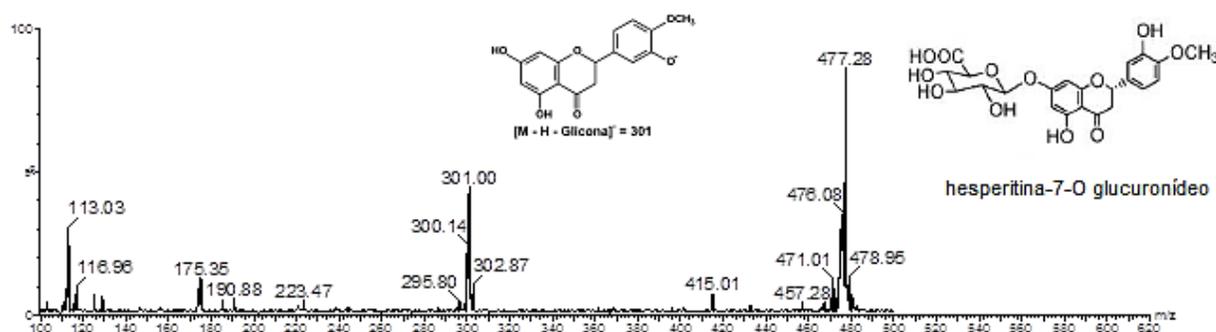


Figura 30. Espectro de massa MS-MS da hesperitina-glucuronídeo demonstrando  $m/z$  477 e aglicona gerada após colisão da molécula ( $m/z$  301).

A Tabela 12 mostra a concentração de cada isômero e da somatória dos metabólitos de HT conjugado ao ácido glucurônico no plasma dos animais após 6 e 9 horas de administração dos flavonoides.

Os resultados mostram que, nos dois tempos de avaliação, os maiores níveis da somatória dos dois metabólitos da HT foram alcançados após a suplementação com G-HD e HT, os quais foram superiores aos valores observados com a HD. Estes níveis foram reduzidos no plasma analisado após 9 horas de administração dos flavonoides.

Em relação à quantificação de cada metabólito é possível observar que o isômero hesperitina-7-O- $\beta$ -D-glucuronídeo aparece em maior concentração no plasma dos animais após 6 horas de administração da G-HD. Em relação ao outro isômero, a hesperitina-3'-O- $\beta$ -D-glucuronídeo, sua concentração foi similar no plasma dos animais que receberam HT e G-HD, a qual foi maior que aquela observada nos animais que receberam HD.

Os resultados mostram que, após 6 e 9 horas de administração dos flavonóides, a absorção tanto da G-HD quanto da HT são superiores aos valores observados para a HD, uma vez que níveis superiores de conjugados de HT com ácido glucurônico foram detectados no plasma destes animais.

Tabela 12. Concentração dos dois isômeros da hesperitina-glucuronídeo determinados no plasma dos animais 6 e 9 horas após a administração de G-HD, HD e HT

Flavonoide	Metabólitos da hesperitina conjugado ao ácido glucurônico ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	(após 6 hs de administração)		
	Hesperitina-7-O- $\beta$ -D- glucuronídeo	Hesperitina-3'-O- $\beta$ -D- glucuronídeo	Somatória dos Metabolites
<b>G-HD</b>	128,14 $\pm$ 0,84 <sup>a</sup>	122,92 $\pm$ 3,67 <sup>a,b</sup>	251,06 $\pm$ 2,92 <sup>a</sup>
<b>HD</b>	114,08 $\pm$ 0,94 <sup>b</sup>	114,80 $\pm$ 0,58 <sup>a</sup>	228,88 $\pm$ 0,36 <sup>b</sup>
<b>HT</b>	121,76 $\pm$ 3,41 <sup>c</sup>	131,08 $\pm$ 1,58 <sup>b</sup>	252,84 $\pm$ 4,99 <sup>a</sup>
	(após 9 hs de administração)		
<b>G-HD</b>	104,18 $\pm$ 2,37 <sup>a</sup>	122,31 $\pm$ 3,67 <sup>a</sup>	226,49 $\pm$ 4,54 <sup>a</sup>
<b>HD</b>	106,23 $\pm$ 3,49 <sup>a</sup>	104,54 $\pm$ 3,72 <sup>b</sup>	210,77 $\pm$ 3,04 <sup>b</sup>
<b>HT</b>	115,37 $\pm$ 6,82 <sup>a</sup>	116,08 $\pm$ 4,71 <sup>a,b</sup>	231,45 $\pm$ 7,59 <sup>a</sup>

Resultados expressos como média e desvio padrão (n=2). A comparação entre os grupos para cada tempo foi realizada pelo teste de Tukey e letras diferentes na mesma coluna expressam diferenças significativas entre os grupos. G-HD: glicosil-hesperidina; HD: hesperidina; HT: hesperitina

Matsumoto *et al* (2004) observaram que os dois isômeros, hesperitina-7-O- $\beta$ -D-glucuronídeo e hesperitina-3'-O- $\beta$ -D-glucuronídeo, são os metabólitos majoritários no plasma de animais que receberam HD. Os autores relataram 51,6 % de hesperitina-7-O- $\beta$ -D- glucuronídeo e 41,4 % de hesperitina-3'-O- $\beta$ -D- glucuronídeo após 4 horas e 62,3 % de hesperitina-7-O- $\beta$ -D- glucuronídeo e 34,9 % de hesperitina-3'-O- $\beta$ -D- glucuronídeo após 6 horas de administração de HD.

Segundo postulado por Yamada *et al.* (2006), a G-HD, devido a sua maior hidrofiliabilidade e facilidade de hidrólise pelas glicosidades intestinais, é absorvida mais

rapidamente e, portanto deve alcançar a circulação sistêmica em menor tempo que a HD. Segundo os autores, a administração da G-HD levou a um rápido aumento nos níveis séricos de hesperitina- glucuronídeo (após 15 min) alcançando o pico máximo após 6 horas. Por outro lado, este metabólito foi detectado no soro dos animais somente após 6 horas de administração da HD, alcançando o pico máximo após 9-12 horas. Também foi relatado que a excreção urinária dos metabólitos conjugados foi maior em ratos que receberam a G-HD comparada a HD.

Conforme descrito por Matsumoto *et al* (2004), além dos isômeros hesperitina-7-O- $\beta$ -D- glucuronídeo e hesperitina-3'-O- $\beta$ -D- glucuronídeo, também foi detectado outro isômero conjugado da HT, o homoeridictiol- glucuronídeo ( $m/z$  477) no plasma dos animais que receberam uma dose de HD (100mg/Kg). Segundo os autores, 4 horas após a administração da HD, a concentração plasmática dos conjugados de hesperitina-glucuronídeos eram superiores a de homoeridictiol-glucuronídeo. Por outro lado, 6-12 horas após a administração, a concentração plasmática de homoeridictiol-glucuronídeo era comparável àquela determinada para os conjugados de HT. Somente quantidades traços do metabólito hesperitina-sulfoglucuronídeo foram detectadas.

Li *et al* (2008) observaram que a HD apresenta menor biodisponibilidade que a HT e que a biotransformação via fermentação da HD (tanto no extrato como na forma pura) levou ao aumento da biodisponibilidade no extrato devido a redução do  $T_{máx}$  dos níveis plasmáticos de HT.

Habauzit *et al.* (2009) relataram que a remoção do grupo ramnose da HD, resultando na hesperitina-7-glucosídeo (H-7-glc), pode melhorar a biodisponibilidade de HD e também se mostrou mais efetiva em prevenir a perda óssea em ratas ovariectomizadas.

## 6 CONCLUSÕES

Este estudo contribui com evidências de que o tipo de dieta consumida (DNORMO ou DHIPER) é capaz de alterar quali e quantitativamente o perfil lipídico hepático. A DHIPER levou ao aumento dos níveis de lípidos totais e à alteração do perfil de lípidos e da composição de ácidos graxos, sendo possível evidenciar aumento da fração de TAG enriquecida com o ácido oleico (C18:1 n-9) e da relação AGPI n-6/n-3 nos lípidos totais hepáticos.

Os dados demonstraram que mesmo não ocorrendo diferenças significativas na composição de ácidos graxos nos lípidos totais em presença dos antioxidantes, foi possível observar uma redução dos níveis de ácidos graxos saturados e de AGPI n-6 e n-3 e aumento de ácidos graxos monoinsaturados nas frações isoladas dos lípidos. Pequenas alterações foram evidenciadas nas três frações avaliadas: fosfolípidos, triacilglicerol e ésteres de colesterol. Estes dados apontam para a necessidade de maior aprofundamento sobre a relação do efeito antioxidante dos flavonóides e sua influência no perfil lipídico tecidual e plasmático.

Os resultados evidenciaram ainda que a G-HD e a HT são mais eficientes do que a HD em reduzir a lipoperoxidação hepática provocada pela ingestão da DHIPER, efeito possivelmente associado à maior concentração de metabólitos antioxidantes detectados no plasma dos animais suplementados com estes flavonóides.

## 7 REFERÊNCIAS

Alberici, L. C.; Oviveira, H. C.; Catharino, R. R.; Verceso, A. E.; Eberlin, M. N., Alberici, R. M. Distinct hepatic lipid profile of hypertriglyceridemic mice determined by easy ambiente sonic-spray ionization mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem**, 401: 1651-9, 2011.

Alegret, M.; Llaverias, G.; Silvestre, J. S. Acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase inhibitors as hypolipidemic and antiatherosclerotic drugs. **Methods Find Exp Clin Pharmacol**, 26(7): 563, 2004.

Almeida, M. E. F.; Queiroz, J. H.; Costa, N. M. B.; Matta, S. L. P. Lipídeos séricos e morfologia hepática de ratos alimentados com diferentes fontes lipídicas (óleo de soja, gordura de peixe e porco, margarina e manteiga). **Rev Nutr**, 24(1): 143-52, 2011.

AOCS. **American Oil Chemists'Society. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemist's Society**. 3ª edição. Washington, 1993.

Aoun, M.; Michel, F.; Fouret, G.; Casas, F.; Jullien, M.; Wrutniak-Cabello, C.; Ramos, J.; Cristol, J-P.; Coudray, C.; Carbonneau, M-A.; Feillet-Coudray, C. A polyphenol extract modifies quantity but not quality of liver fatty acid content in high-fat-high-sucrose diet-fed rats: possible implication of the sirtuin pathway. **Br J Nutr**, 104: 1760-70, 2010.

Araya, J.; Rodrigo, R.; Videla, L. A.; Thielemann, L.; Orellana, M.; Pettinelli, P.; Poniachik, J. Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid *n-6/n-3* ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. **Clin Sci**, 106: 635-43, 2004.

Banni, S.; Carta, G.; Angioni, E.; Murru, E.; Scanu, P.; Melis, M. P.; Bauman, D. E.; Fischer, S. M.; Ip, C. Distribution of conjugated linoleic acid and metabolites in different lipid fractions in the rat liver. **J Lipid Res**, 42: 1056-61, 2011.

Barbosa, K. B. F.; Costa, N. M. B.; Alfenas, R. C. G.; de Paula, S. O.; Minim, V. P. R.; Bressan, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev Nutr**, 23(4): 629-43, 2010.

Barros, K. V.; Carvalho, P. O.; Cassulino, A. P.; Andrade, I.; West, A. L.; Miles, E. A.; Calder, P. C.; Silveira, V. L. F. Fatty acids in plasma, White and red blood cells, and tissues after oral or intravenous administration of fish oil in rats, **Clin Nutr**, 32(6): 993-8, 2013.

Baynes, J. W.; Dominiczak, M. H.[Tradução de Jacyara Maria Brito Macedo, *et al.*] **Bioquímica médica**. 3ª Edição, Rio de Janeiro: Ed. Elsevier Ltda, 2010. p. 26–30, 195-20.

Beecher, G. R. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. **J Nutr**, 133: 3248s-54s, 2003.

Bellocco, E.; Barreca, D.; Lagana, G.; Leuzzi, U.; Tellone, E.; Ficarra, S.; Kotyk, A.; Galtieri, A. Influence of L-rhamnosyl-D-glucosyl derivatives on properties and biological interaction of flavonoids. **Mol Cell Biochem**, 321: 165,171, 2009.

Benzie, I. F. F.; Strain, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": the FRAP assay. **Anal Biochem**, 239: 70-76, 1996.

Bergamin, 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**. 45 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"; Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2012.

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-hidroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase and acyl CoA: cholesterol transferase are lower in rats fed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoids. **J Nutr**, 129: 1182-85, 1999.

Brand, W.; Van Der Wel, P.A.I.; Rein, M.J.; Barron, D.; Williamson, G.; Van Bladeren, P.J.; Rietjens, I.M.C.M. Metabolism and transport of the citrus flavonoid hesperetin in Caco-2 cell monolayers. **Drug Metab and Dispos**, 36: 1794–802, 2008.

Brett, G. M.; Hollands, W.; Needs, P. W.; Teucher, B.; Dainty, J. R.; Davis, B. D.; Brodbelt, J. S.; Kroon, P. A. Absorption, metabolism and excretion of flavanones from single portions of orange fruit and juice and effects of anthropometric variables and contraceptive pill use on flavanone excretion. **Br J Nutr**, 101(5): 664-75, 2009.

Bueno, N. B.; Silva, M. A. F.; Melo, S. V.; Ataíde, T. R.; Oliveira, S. L.; Sant'Ana, A. E. G. Perfil em ácidos graxos hepáticos de ratos com esteatose induzida pela dieta AIN-93 atenuada pela substituição parcial do óleo de soja por dieptanoína e trieptanoína. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 54(6): 584-87, 2010.

Burdge, G.C.; Wright, P.; Jones, A.E.; Wootton, S.A. A method for separation of phosphatidylcholine, triacylglycerol, non-esterified fatty acids and cholesterol esters from plasma by solid phase extraction. **Br J Nutr**, 84: 781–87, 2000.

Cardoso, L. M. **Efeitos de tintura de café na osteoporose e no diabetes e do flavonóide hesperidina na osteoporose**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

Caria, C. R. P.; Oliveira, C. C.; Gotardo, E. F. M.; Souza, V. T.; Rocha, T.; Macedo, J. A.; Carvalho, P. O.; Ribeiro, M. L.; Cambero, A. Caffeinated and decaffeinated instant coffee consumption partially reverses high-fat diet-induced metabolic alterations in mice. **Food Res Int**, 61: 120-6, 2014.

Carletti, G.; Nervo, G.; Cattivelli, L. Flavonoids and melanins: a common strategy across two kingdoms. **Int J Biol Sci**, 10(10): 1159-70, 2014.

Castro, G. S. F.; Cardoso, J. F. R.; Vannucchi, H.; Zucoloto, S.; Jordão, A. A. Fructose and NAFLD: metabolic implications and models of induction in rats. **Acta Cir Bras**, 26(2): 45-50, 2011.

Cesar, T. B.; Rodrigues, L. E.; Araújo, M. S. P.; Aptekmann, N. P. Suco de laranja reduz o colesterol em indivíduos normolipidêmicos. **Rev Nutr**, 23(5): 779-89, 2010.

Checchi, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2ª Edição. Campinas, Ed. Unicamp, 2003, p. 38.

Christie, W. W. Rapid separation and quantification of lipid classes by high performance liquid chromatography and mass (light-scattering) detection. **J Lipid Res**, 26: 507-12, 1985

Ciconini, G. **Caracterização de frutos e óleo de polpa de macaúba dos biomas Cerrado e Pantanal do estado de Mato Grosso do Sul, Brasil**. 128 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, 2014.

Coultate, T. P. **Alimentos – a química de seus componentes**. 3ª Edição, Porto Alegre: Ed. Artmed, 2004. p. 63.

D'Archivio, M.; Filesi, C.; Di Benedetto, R.; Gargiulo, R.; Giovannini, C.; Masella, R.; **Ann. Ist. Super Sanità**, 43: 348, 2007.

Day, A.J.; Gee, J.M.; Dupont, M.S.; Johnson, I.T.; Williamson, G. Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-49-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter. **Biochem Pharmacol**, 65: 1199-206, 2003.

de Abreu, I. C. M. E.; Guerra, J. F. C.; Pereira, R. R.; de Lima, W. G.; Silva, M. E.; Pedrosa, M. L. Hypercholesterolemic diet induces hepatic steatosis and alterations in mRNA expression of NADPH oxidase in rat livers. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 58(3): 251-9.

de Oliveira, D. M.; Dourado, G. K. Z. S.; Cesar, T. B. Hesperidina associated with continuous and interval swimming improved biochemical and oxidative biomarkers in rats. **J Int Soc Sports Nutr**, 10(27): 1-7, 2013.

Di Benedetto, R.; Attorri, L.; Chiarotti, F.; Eusepi, A.; Di Biase, A.; Salvati, S. Effect of micronutrient-enriched sunflower oils on plasma lipid profile and antioxidant status in high-fat-fed rats. **J Agric Food Chem**, 58: 5328-33, 2010.

Dourado, G. K. Z. S. **Efeito do suco de laranja e da glicosil-hesperidina sobre o sistema imune inato de camundongos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Nutricionais) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2009.

Emin, J. A.; Oliveira, A. B.; Lapa, A. J.; Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid hesperidin, and the isoflavonoids duartin and claussequinoose im rats and mice. **J Pharm Pharmacol**, 46(2): 118-22, 1994.

Fennema, O. R. **Food Chem**. 3ª Edição, New York: Marcel Dekker, 1996. p. 226-312, 1996.

Ferrari, R. S. **Cirrose experimental induzida em ratos: avaliações hepáticas e pulmonares**. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Porto Alegre, 2012.

Ficheiro: Saturated Fatty Acid Synthesis.png, 2011. Disponível em <[http://gl.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Saturated\\_Fatty\\_Acid\\_Synthesis.png](http://gl.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Saturated_Fatty_Acid_Synthesis.png)>.

Fisk, H. L.; West, A. L.; Childs, C. E.; Burdge, G. C.; Calder, P. C. The use of gas chromatography to analyze compositional changes of fatty acids in rat liver tissue during pregnancy. **J Vis Exp**, 85: 1-10, 2014.

Folch, J.; Lees, M.; Stanley, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **J Biol Chem**, 226: 497–509, 1957.

Franco, E. P. D. **Avaliação do sistema oxidante-antioxidante e perfil lipídico de ratos suplementados com hesperitina e seus derivados glicosilados**. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade São Francisco, Bragança Paulista, 2014.

Franco, L. D. P. **Dieta hiperlipídica e exercício físico: consequências sobre o metabolismo e a peroxidação lipídica – estudo em modelo animal**. 107 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2007.

Frémont, L.; Gozzélino, T.; Franchi, M. P.; Linard, A. Dietary flavonoids reduce lipid peroxidation in rats fed polyunsaturated or monounsaturated fat diets. **J Nutr**, 128: 1495-502, 1998.

Fruet, A. C. **Avaliação da atividade da fibra alimentar de *Typha angustifolia* L. e de seus efeitos sinérgicos com a prednisolona no modelo de colite ulcerativa induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico em ratos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências de Botucatu, Botucatu, 2010.

Fujita, T.; Kawase, A.; Niwa, T.; Tomohiro, N.; Masuda, M.; Matsuda, H.; Iwaki, M. Comparative evaluation of 12 immature citrus fruits extracts for the inhibition of cytochrome P450 isoform activities. **Biol Pharm Bull**, 31(5): 925-30, 2008.

Furukawa, S.; Fujita, T.; Shimabukuro, M.; Iwaki, M.; Yamada, Y.; Nakajima, Y.; Nakayama, O.; Makishima, M.; Matsuda, M.; Shimomura, L. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **J Clin Invest**, 114(12):1752-61, 2004.

Giacometti, J.; Milosevic, A.; Milin, C. Gas chromatographic determination of fatty acids contained in different lipid classes after their separation by solid-phase extraction. **J Chromatogr A**, 976: 47-54, 2002.

Habauzit, V.; Nielsen, I-L.; Gil-Izquierdo, A.; Trzeciakiewicz, A.; Morand, C.; Chee, W.; Barron, D.; Lebecque, P.; Davicco, M-J.; Williamson, G., Offord, E.; compared with hesperidin results in more efficient prevention of bone loss in adult ovariectomised rats. **Br J Nutr**, 102:976-84, 2009.

Haddad, R.; Milagres, H. M. S.; Catharino, R. R.; Eberlin, M. N.; Easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry combined with thin-layer chromatography. **Anal Chem**, 80: 2744–50, 2008.

Harvey, R. A.; Ferrier, D. R. **Bioquímica ilustrada**. 5ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2012. p. 175, 182, 219, 220.

Hassimotto, N. M. A.; Genovese, M. I.; Lajolo, F. M. Absorption and metabolism of cyaniding-3-glucoside and cyaniding-3-rutinoside extracted from wild mulberry (*Morus nigra* L.) in rats. **Nutr Res**, 28:198-207, 2008.

Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R.; Bobilya, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **J Nutr Biochem**, 13:572-84, 2002.

IUPAC. International Union of Pure and Applied Chemistry. **Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives**. 6ª Edição, Oxford: IUPAC, 1979.

Jen, K. L. C.; Buisson, A; Pellizzon, M.; Ordiz Jr, F.; Ana, L. S.; Brown, J. Differential Effects of Fatty Acids and Exercise on Body Weight Regulation and Metabolism in Female Wistar Rats. **Exp Biol Med**, 228(7): 843-9, 2003.

Jeong, H-J.; Choi, Y.; Kim, K-Y.; Kin, M-H.; Kim, H-M. C-Kit binding properties of hesperidin (a major component of KMP6) as a potential anti-allergic agent. **Plos ONE**, 6(4): 1-8, 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. **Carcinogenesis**, 19(7): 1275-83, 1998.

Jordão Jr, A. A.; Chiarello, P. G.; Bernardes, M. S. M.; Vannucchi, H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. **Med Ribeirão Preto**, 31: 434-49, 1998.

Kanaze, F. I.; Bounartzi, M. I.; Georgarakis, M.; Niopas, I. Pharmacokinetics of the citrus flavanone aglycones hesperetin and narigenin after single oral administration in human subjects. **Eur J Clin Nutr**, 61: 472-477, 2007

Kim, H. K.; Jeong, T-S.; Lee, M-K.; Park, Y-B.; Choi, M-S. Lipid-lowering efficacy of hesperetin metabolites in high-cholesterol fed rats. **Clin Chim Acta**, 327: 129-37, 2003.

Kim, H-J.; Jeon, S-M.; Lee, M-K.; Cho, Y-Y.; Kwon, E-Y.; Lee, J. H.; Choi, M-S. Comparison of hesperetin and its metabolites for cholesterol-lowering and antioxidative efficacy in hypercholesterolemic hamsters. **J Med Food**, 13(4): 808-14, 2010.

Knekt, P.; Kumpulainen, J.; Järvinen, R.; Rissanen, H.; Heliövaara, M.; Reunanen, A.; Hakulinen, T.; Aromaa, A. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. **Am J Clin Nutr**, 76: 560-8, 2002.

Kumar, S.; Pandey, A.K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **ScientificWorldJournal**, doi: 10.1155/2013/162750, 2013.

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 Sci**, 15: 992-1002, 2011.

Li, Y-m.; Li, X-m.; Li, G-m.; Du, W-c.; Zhang, J.; Li, W-x.; Xy, J.; Hu, M.; Zhu, Z. *In Vivo* pharmacokinetics of hesperidin are affected by treatment with glucosidase-like BglA protein isolated from yeasts. **J Agric Food Chem**, 56(14): 5550-7, 2008.

Lima, E. S.; Abdalla, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Rev Bras Cien Farm**, 37: 293-304, 2001.

Liu, R. H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **J Nutr**, 134: 3479s-85s, 2004.

Maisuthisakul, P.; Suttajit, M.; Pongsawatmanit, R. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some thai indigenous plants. **Food Chem**, 100: 1409-18, 2007.

Manach, C.; Morand, C.; Gil-Izquierdo, A.; Bouteloup-Demange, C.; Remesy, C. Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice. **Eur J Clin Nutr**, 57: 235–42, 2003.

Manach, C.; Williamson, G.; Morand, C.; Scalbert, A.; Rémésy, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. **Am J Clin Nutr**, 81: 230S– 42S, 2005.

Martin, C. A.; Almeida, V. V.; Ruiz, M. R; Visentainer, J. E. L.; Matshushita, M.; Souza, N. E.; Visentainer, J. V. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Rev Nutr**, 19(6): 761-70, 2006.

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.

Marzzocco, A.; Torres, B. B. **Bioquímica Básica**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S.A., 1990. p. 60-2.

Matsumoto, H.; Ikoma, Y.; Sugiura, M.; Yano, M.; Hasegawa, Y. Identification and quantification of the conjugated metabolites derived from orally administered hesperidin in rat plasma. **J Agric Food Chem**, 52:6653-9, 2004.

Milinsk, M. C. **Análise comparativa entre oito métodos de esterificação na determinação quantitativa de ácidos graxos em óleo vegetal**. 92f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade de Maringá. Maringá, 2007.

Montgomery, R.; Conway, T. W.; Spector, A. A. **Bioquímica – uma abordagem dirigida por casos**. 5ª edição, São Paulo: 1994. p. 229.

Morand, C.; Dubray, C.; Milenkovic, D.; Lioger, D.; Martin, J. F.; Scalbert, A.; Mazur, A. Hesperidin contributes to the vascular protective effects of orange juice: a randomized crossover study in healthy volunteers. **Am J Clin Nutr**, 93: 73-80, 2011.

Moreira, A. V. B.; Mancini-Filho, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Ver Nutr**, 17(4): 411-24, 2004.

Nelson, D. L.; Cox, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5ª edição. Porto Alegre: 2011. p. 343, 344, 346, 347, 349, 350, 355-9.

Nielsen, I. L.; Chee, W. S.; Poulsen, L.; Offord-Cavin, E.; Rasmussen, S. E.; Frederiksen, H.; Enslin, M.; Barron, D.; Horcajada, M. N.; Williamson, G. Bioavailability is improved by enzymatic modification of the citrus flavonoid hesperidin in humans: a randomized, double-blind, crossover trial. **J Nutr**, 136(2): 404-8, 2006.

Nijveldt, R. J.; van Nood, E.; van Hoorn, D. E. C.; Boelens, P. G.; van Norren, K.; van Leeuwen, P. A. M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **Am J Clin Nutr**, 74:418-25, 2001.

Ohkawa, H.; Nobuko, O.; Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem**, 95: 351-8, 1979.

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.

Oosterveer, M.H.; Van Dijk, T.H.; Tietge, U.J.F.; Boer, T.; Havinga, R.; Stellaard, F.; Groen, A.K.; Kuipers, F.; Reijngoud, D-J. High fat feeding induces hepatic fatty acid elongation in mice. **PLoS One**, 4(6):1-10, 2009.

Parajuli, S.; Pun, N. T.; Parajuli, S.; Jamarkattel-Pandit, N. Antioxidant activity, total phenol and flavonoid contents in some selected medicinal plants of Nepal. **J Health All Sci**, 2(1): 27-31, 2012.

Pari, L.; Shagirtha, K. Hesperetin protects against oxidative stress related hepatic dysfunction by cadmium in rats. **Exp Toxicol Pathol**, 64: 513-520, 2012.

Pauli, J. R.; Ropelle, E. R.; Cintra, D. E.; Carvalho-Fo, M. A.; Moraes, J. C.; De Souza, C, T.; Velloso, L. A.; Carvalheira, J, B.; Saad, M. J. Acute physical exercise reverses S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1 and protein kinase B/Akt in diet-induced obese *Wistar* rats. **J Physiol**, 586(2): 659-71, 2008.

Pereira, A. C. S.; Dionísio, A. P.; Wurlitzer, N. J.; Alves, R. E.; Brito, E. S.; Silva, A. M. O.; Brasil, I. M.; Mancini-Fo, J. Effect of antioxidante potential of tropical fruit juices on antioxidante enzyme profiles and lipid peroxidation in rats. **Food Chem**, 157: 179-85, 2014.

Petridou, A. Nikolaidis, M. G.; Matsakas, A.; Schulz, T. Michna, H.; Mougios, V. Effect of exercise training on the fatty acid composition of lipid classes in rat liver, skeletal muscle, and adipose tissue. **Eur J Appl Physiol**, 94: 84-92, 2005

Puri, P.; Baillie, R. A.; Wiest, M. M.; Mirshahi, F.; Choudhury, J.; Cheung, O.; Sargeant, C.; Contos, M. J.; Sanyal, A. J. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, 46: 1081-90, 2007.

Reeves, P. G.; Nielsen, F. H.; Fahey, G. C. Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr**, 123(11): 1939-51, 1993.

Rivelli, D.P. **Biodisponibilidade, distribuição tecidual e atividade antioxidante do extrato hidroetanólico de *Ilex paraguariensis* hidrolisado e não hidrolisado.** Dissertação (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo , 2010.

Rosa, C. O.B. **Avaliação do efeito de compostos naturais – curcumina e hesperidina – há hiperlipidemia induzida em coelhos.** Dissertação (Doutorado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2008.

Sabarense, C. M.; Mancini Filho, J. Efeito da gordura vegetal parcialmente hidrogenada sobre a incorporação de ácidos graxos *trans* em tecidos de ratos. **Rev Nutr**, 16(4): 399-407, 2003.

Saravanan, G.; Ponmurugan, P. S-allylcysteine improves Streptozotocin-induced alterations of blood glucose, liver cytochrome p450 2E1, plasma antioxidant system, and adipocytes hormones in diabetic rats. **Int J Endocrinol Metab**, 11(4): 1-8, 2013.

Scalbert, A.; Williamson, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **J Nutr**, 130:2073S-85S, 2000.

Serhan, C. N.; Chiang, N.; Van Dyke, T. E. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. **Nat Rev Immunol**, 8: 349-61, 2008.

Subedi, L.; Timalseña, S.; Duwadi, P.; Thapa, R.; Paudel, A.; Parajuli, K. Antioxidant activity and phenol and flavonoid contents of eight medicinal plants from Western Nepal. **J Trad Compl Med**, 34(5): 584-90, 2014.

Tirkey, N.; Pilkhwal, S.; Kuhad, A.; Chopra, K. Hesperidin, a citrus bioflavonoid, decreases the oxidative stress produced by carbon tetrachloride in rat liver and kidney. **BMC Pharmacol**, 5(2): 1-8, 2005.

USDA U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, **National Nutrient Database for Standard Reference**. Nutrient Data Laboratory.. v 25, 2012. Disponível em <<http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>>

Vaccari, N. F. S.; Soccol, M. C. H.; Ide, G. M. Compostos fenólicos em vinhos e seus efeitos antioxidantes na prevenção de doenças. **Rev Cienc Agrovet**, 8(1): 71-83, 2009.

Vallejo, F.; Larrosa, M.; Escudero, E.; Zafrilla, M.P.; Cerda, B.; Boza, J.; Garcia-Conesa, M.T.; Espin, J.C.; Tomas-Barberan, F.A. Concentration and solubility of flavanones in orange beverages affect their bioavailability in humans. **J. Agric Food Chem**, 58: 6516-24, 2010,

Vasconcelos, S. M. L., Goulart, M. O. F. Moura, J. B. F., Manfredini, V., Benfato, M. S., Kubota, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim Nova**, 30(5): 1323-38, 2007.

Vinueza, J. C.; Faria, J. B.; Cesar, T. B. Hesperidina diminui o colesterol sanguíneo de ratos alimentados com gordura saturada. **Alim Nutr**, 19(4): 473-9, 2008.

Vollhardt, P.; Schore, N. **Química Orgânica – estrutura e função**. 6a Edição, Porto Alegre: Ed. Bookman, 2013. p. 206.

Vuković, R.; Blažetić, S.; Oršolić, I.; Heffer, M.; Vari, S. G.; Gajdoš, M.; Krivošíková, Z.; Kramárová, P.; Anton Kebis, A.; Has-Schön, E. Impact of ovariectomy, high fat diet, and lifestyle modifications on oxidative/antioxidative status in the rat liver. **Croat Med J**, 55: 218-27, 2014

Wagner, B. A.; Buettner, G. R.; Burns, C. P. Free radical-mediated lipid peroxidation in cells oxidizability is a function of cell lipid bis allyc hydrogen content. **Biochem**, 33(15): 4449-53, 1994.

Walkzewska, A.; Dziedzic, B.; Stepien, T.; Swiatek, E.; Nowak, D. Effect of dietary fats on oxidative-antioxidative status of blood in rats. **J Clin Biochem Nutr**, 47: 18-26, 2010.

WHO, 2006. World Health Organization, **BMI Classifications**; disponível em <[http://www.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro\\_3.html](http://www.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html)>

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.

Yang, H-L.; Chen, S-C; Kumar, S.; Yu, K-N; Chao, P-D. L.; Tsai, S-Y.; Hou, Y-C.; Hseu, Y-C. Antioxidant and anti-inflammatory potential of hesperetin metabolites obtained from

hesperetin-administered rat serum: an ex vivo approach. **J Agric Food Chem**, 60: 522-532, 2012.

Yao, L. H.; Jiang, Y. M.; Shi, J.; Tomás-barberán, F. A.; Datta, N.; Singanusong, R.; Chen, S. S. Flavonoids in food and their health benefits. **Plant Foods Hum Nutr**, 59: 113-22, 2004.

Zhang, X.; Dong, F.; Ren, J.; Driscoll, M. J.; Culver, B.; High dietary fat induces NADPH oxidase-associated oxidative stress and inflammation in rat cerebral cortex. **Exp Neurol**, 191: 318–25, 2004.

Zukhova , N. V.; Nocgorodtseva, T. P.; Denisenko, Y. K. Effect of the prolonged high-fat diet on the fatty acid metabolism in rat blood and liver. **Lipids Health Dis**, 13(49): 1-8, 2014.

## 8 ANEXO

Parecer do comitê de ética no uso de animal em pesquisa da Universidade São Francisco – Bragança Paulista.



**COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAL EM PESQUISA - CEUA**

Bragança Paulista, 30 de Outubro de 2014

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

**Projeto de Pesquisa:** Avaliação do perfil lipídômico e biodisponibilidade de ratos tratados com hesperitina e derivados glicosilados.

**ÁREA DE CONHECIMENTO:** Saúde e Biológicas

**Autor(es):** Profa. Dra. Patrícia de Oliveira Carvalho; Verônica Tricoli de Souza

**Instituição:** UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

**Protocolo:** 001.10.2014  
**IP. CIUCA:** 200.225.122.34

Prezado(a)(s) Pesquisador(a)(s),

O Comitê de Ética em Pesquisa com Uso de Animais de Pesquisa- CEUA, da Universidade São Francisco, analisou em reunião ordinária no dia 30/10/2014 o projeto de pesquisa supracitado, sob a responsabilidade de Vossa Senhoria.

Este Comitê, acatando o parecer do relator indicado, apresenta-lhe o seguinte resultado:

**Parecer:** Aprovado

  
Michelle Darrieux Sampaio Bertoncini  
**Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animal em Pesquisa**  
**Universidade São Francisco**

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