

Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Departamento de Alimentos e Nutrição

**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**

Simone Canuto Bergamim

Araraquara – SP 2012

Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Alimentos e Nutrição

**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**

Simone Canuto Bergamim

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Alimentos e Nutrição da Faculdade
de Ciências Farmacêuticas de
Araraquara, UNESP, para
obtenção do título de Mestre em
Ciências Nutricionais.

Orientadora: Prof. Dra. Thaís Borges César

Araraquara – SP/ 2012

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Bergamim, Simone Canuto
B494a 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 / Simone Canuto Bergamim. – Araraquara, 2012
45 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição
Orientador: Thais Borges César

1. Suco de laranja fresco. 2. Suco de laranja pasteurizado. 3. Estresse oxidativo. 4. Perfil glicêmico e insulínico. I. César, Thais Borges, orient. II. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Thais Borges Cesar

Prof^a. Dra. Fernanda Lopes Kinouchi

Prof. Dr. Antônio José Goulart

A minha filha Isadora, que desde a barriga me acompanha nos momentos mais importantes desse trabalho, e me fez ter paciência e entender que tudo acontece no tempo certo.

AGRADECIMENTOS

Ao SER SUPREMO, PAI DIVINO e MÃE DIVINA, obrigada pelas imensas bênçãos de cura, paz, felicidade, saúde e prosperidade.

Ao Grão Mestre Choa Kok Sui, pelos ensinamentos e a todos os terapeutas prânicos do mundo, por sermos uma família.

À professora Dr. Thais Borges César, pelo amparo e confiança que depositou em mim.

Ao Antonio Sérgio Valladão por ter me incentivado no caminho da pós graduação, e aos funcionários do Laboratório São Lucas pelos serviços prestados.

Às amigas do laboratório de nutrição, Ana Lúcia, Delfina, Fernanda, Jaqueline, Grace e Cláudia pela amizade e apoio.

Aos professores e funcionários da pós graduação, pelo auxílio e atenção dispensados.

Aos voluntários da pesquisa, pela boa vontade em ajudar a pesquisa científica.

À empresa Citrosuco, Grupo Fisher por fornecer as laranjas e o suco NFC, representada por Helton.

À prima Aline Thomaz, por me confortar nos momentos de dificuldade.

À amiga Sônia Marques por me ajudar emocionalmente e tecnicamente.

Ao Prof. Dr. Júlio Sérgio Marchini e ao Sr. Gilberto João Padovan, por liofilizar as amostras em seu laboratório.

À USDA(Departamento de Agricultura Americano), pelas análises das amostras.

SUMÁRIO

RESUMO	2
ABSTRACT	3
INTRODUÇÃO GERAL	4
OBJETIVOS	6
Objetivo Geral	6
Objetivos Específicos	6
CAPÍTULO I	7
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
<i>1.1. Suco de Laranja</i>	7
<i>1.2. Glicose e insulina</i>	12
<i>1.3. Estresse oxidativo</i>	13
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
CAPÍTULO II	26
RESUMO	27
ABSTRACT	28
1. Introdução	29
2. Material e métodos	30
<i>2.1. Casuística</i>	30
<i>2.2. Desenho Experimental</i>	30
<i>2.3. Suco de laranja</i>	30
<i>2.4. Avaliação do estresse oxidativo</i>	31
<i>2.5. Análise Estatística</i>	32
3. Resultados e discussão	32
<i>3.1. Análise do suco de laranja</i>	32
<i>3.2. Avaliação do perfil bioquímico</i>	35
<i>3.3. Avaliação do Estresse Oxidativo</i>	37
4. Conclusão	38
Referências	39
ANEXOS	42
ANEXO 1. Protocolo CEP/FCF/CAr nº 26/2009.....	43
ANEXO 2. Termo de Consentimento Livre Esclarecido	45

RESUMO

O suco de laranja é fonte de vários tipos de compostos bioativos. A atividade antioxidante do suco de laranja, relacionada a benefícios à saúde, derivam não somente da vitamina C, um dos principais nutrientes do suco de laranja, mas também dos flavonoides cítricos, denominados flavanonas. O presente estudo teve como objetivo avaliar o estresse oxidativo e a resposta glicêmica e insulínica em indivíduos adultos normais submetidos a uma dose única de suco de laranja fresco em comparação ao suco de laranja pasteurizado. Participaram do estudo 21 voluntários que foram submetidos a duas colheitas de sangue, a primeira após ingestão de suco de laranja fresco, e a segunda depois de um intervalo de 30 dias, após a ingestão de suco de laranja pasteurizado. Foram realizadas dosagem das variáveis bioquímicas: triglicérides (TG), colesterol total (CT), colesterol de LDL (LDL-C), colesterol de HDL (HDL-C), glicemia de jejum e insulina de jejum. Para determinar o estresse oxidativo no soro dos pacientes foram realizados os ensaios de TBARS e DPPH, antes e após o consumo de cada suco de laranja. Após 24h da ingestão de suco de laranja fresco, houve diminuição nos níveis de colesterol total, efeito não observado após a ingestão do suco de laranja pasteurizado. Os níveis de glicose se mantiveram dentro da normalidade após à ingestão dos sucos de laranja, fresco e pasteurizado. Os níveis de insulina aumentaram após a ingestão do suco pasteurizado em relação ao suco fresco. A capacidade antioxidante apresentou diferença significativa nos períodos pré e pós a ingestão de suco de laranja fresco, com redução da porcentagem do radical DPPH no soro dos indivíduos, entretanto tal diferença não foi significativa para a ingestão do suco de laranja pasteurizado. Não houve diferença significativa nos níveis de TBARS em relação ao tipo de suco (fresco e pasteurizado), nem em relação ao tratamento (antes e após o consumo do suco).

ABSTRACT

Orange juice is a source of various bioactive compounds. The antioxidant activity of orange juice, related to health benefits derive not only vitamin C, one of the main nutrients in orange juice, but also of citrus flavonoids, called flavanones. The present study was to evaluate oxidative stress and glicemic and insulin response in health adults who underwent a single dose of fresh orange juice compared with orange juice. Participants were 21 volunteers who underwent two blood samples, the first after ingestion of fresh orange juice, and the second after na intervalo f 30 days after ingestion of orange juice. Were performed dosage of biochemical variables: triglycerides (TG), total cholesterol (TC),LDL cholesterol (LDL-C), HDL cholesterol (HDL-C), ratio LDL/HDL, fasting glucose and fasting insulin. To determine the oxidative stress in patientes serum assays were performed TBARS DPPH and before and after consumption of each orange juice. After 24 hours of ingestion of fresh orange juice, there was a decrease in total choleseterol leves, an effect not observed after ingestion of orange juice. Glucose levels remained within the normal range after ingestion of orange juice, fresh and pasteurized. Increased insulin levels after taking the pasteurized juice in relation to the fresh juice. The antioxidante capacity showed a significant difference in the periods before and after the intake of fresh orange juice, whith a reduction of the percentage of DPPH in the serum of individuals, however this difference was not significant for the intake of orange juice. There was no statistically significant difference in the levels of TBARS, 24 hours after ingestion of fresh orange juice over orange juice (NFC). Also there was no difference statistically significant for the levels of thiobarbituric acid reactive substances before and after consupcion of fresh orange juice and NFC.

INTRODUÇÃO GERAL

As frutas e sucos cítricos são fontes de vários tipos de compostos bioativos e sua atividade antioxidante, relacionada a benefícios à saúde, derivam não somente da vitamina C, um dos principais nutrientes do suco de laranja, mas também dos flavonoides cítricos, denominados flavanonas (MARTI et al., 2009). A ingestão de quantidades significativas de suco de laranja melhora os níveis de colesterol sanguíneo, reduz o estresse oxidativo, previne a oxidação do LDL colesterol e diminui a agregação plaquetária, contribuindo para a prevenção das doenças cardiovasculares (AVIRAM et al, 2000; YONG et al,1999).

A absorção de vitamina C se dá por transporte ativo na parede do intestino, onde o ácido ascórbico é parcialmente oxidado a ácido dehidroascórbico, e posteriormente é transportado através da membrana celular (MARTI et al, 2009). A vitamina C participa da preservação da membrana e função celular e impede a oxidação das biomoléculas, reduzindo assim a prevalência de doenças crônicas (VAN POPEL et al, 1997; BRIGELLIUS-FLOHE et al, 2002). Estudos epidemiológicos sugerem que a vitamina C obtida de frutas e hortaliças, mas não de suplementos (SO et al, 1996), se associa com a redução do risco de doença arterial coronariana (DECHAUD et al, 1999). Por outro lado, a ingestão regular de suco de laranja aumentou a atividade antioxidante no plasma de mulheres (VAN ACKER et al, 2000) enquanto nos homens reduziu os radicais livres do sangue (BORRAIDELE et al, 1999).

Os flavonoides cítricos também presentes no suco de laranja apresentam efeito cardioprotetor e atividade antioxidante sobre as biomoléculas. As flavanonas mais abundantes no suco de laranja, hesperidina e naringina (KAWAII et al,1999) têm sido associadas a ações antioxidante(VAN ACKER et al, 2000), hipolipidêmica (BOK et al, 1999; BORRADAILE et al, 1999; SANTOS et al, 1999; SHIN et al, 1999) anti-inflamatória e anticarcinogênicas (SO et al, 1996; TANAKA et al, 1997; YANG et al, 1997).

Nos alimentos os flavonoides cítricos se apresentam conjugados a açúcares formando moléculas glicosídicas. Após serem ingeridos e chegarem ao intestino grosso a molécula de açúcar é degradada por enzimas de enterobactérias e os flavonoides passam para forma aglicona, podendo então ser absorvidos (CRESPY et al, 2002; NEMETH et al, 2003; DAY et al, 1998; GEE et al, 2000; BOKKENHEUSER et al, 1987).

Gil-Izquierdo et al (2002) avaliaram as propriedades antioxidantes dos flavonoides cítricos e da vitamina C de sucos produzidos por diferentes técnicas: (1) doméstica, onde a laranja é espremida manualmente e (2) por processo industrial de extração do suco: (a) pasteurização padrão e resfriamento (NFC), (b) concentração e congelamento. Os resultados demonstraram que o suco comercial possui maior teor de compostos fenólicos (22%) e menor

de vitamina C (25%) que o suco doméstico. A técnica de pasteurização aumentou a concentração de vitamina C, em relação ao suco concentrado, e o congelamento não apresentou mudanças significativas no teor deste componente. Portanto, as técnicas de pasteurização (NFC) e de congelamento parecem não afetar as propriedades antioxidantes do suco.

De acordo com a USDA (2007) a concentração de vitamina C e folato são maiores no suco fresco em relação ao suco pasteurizado, enquanto o teor de flavonoides é o dobro no suco pasteurizado em relação ao suco fresco. Em uma porção de 250g de suco fresco há em média 125mg de vitamina C, 76µg de folato e 0,5mg de ferro, enquanto na mesma porção de suco pasteurizado há 86mg de vitamina C, 46µg de folato e 1mg de ferro.

Apesar destas similaridades em relação à composição nutricional entre os diferentes tipos de suco de laranja, eles se diferenciam em relação às suas características sensoriais peculiares. O sabor do suco de laranja integral pasteurizado (NFC) é o que mais se aproxima do suco de laranja fresco, enquanto o suco obtido da diluição do suco concentrado e congelado apresenta o maior sabor residual (*off flavor*). Devido a este fato tem-se atualmente uma demanda maior do suco integral-pasteurizado (NFC), buscando-se, de acordo com a indústria de sucos, atender consumidores cada vez mais exigentes e de maior poder aquisitivo (MENDES, 2009).

Considerando-se a relevância do suco de laranja integral pasteurizado no mercado atual, é evidente a importância de trabalhos que avaliem as diferenças entre a capacidade funcional e as propriedades antioxidantes dos compostos bioativos em relação ao suco fresco.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar o estresse oxidativo, a resposta glicêmica e insulínica em indivíduos adultos saudáveis sujeitos a uma dose única de suco de laranja fresco em comparação ao suco de laranja comercialmente extraído e pasteurizado.

Objetivos Específicos

Avaliação bioquímica:

- Perfil lipídico do sangue: triglicérides (TG), colesterol total (CT), colesterol de LDL (LDL-C), colesterol de HDL (HDL-C)
- Avaliação da resposta glicêmica e insulínica

Avaliação de variáveis antioxidantes:

- Peroxidação Lipídica utilizando-se o método de TBARS (Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico);
- Atividade antioxidante utilizando-se o método do radical DPPH (Difenilpicril-hidrazila)

CAPÍTULO I

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Suco de Laranja

As frutas cítricas são a principal fonte de nutrientes, como a vitamina C e o folato, também possuem fibras e compostos bioativos como os carotenóides e flavonóides. Estudos epidemiológicos sugerem que os carotenóides e flavonóides são responsáveis pela prevenção de câncer e doenças degenerativas, devido à atividade antioxidante (EJAZ et al, 2006).

O suco de laranja pasteurizado, obtido por processo comercial (NFC), é utilizado como bebida pronta sem a necessidade de reconstituição, e em termos de sabor é o que mais se aproxima do suco fresco, ao gosto do consumidor brasileiro. Este suco não permite muitas misturas de sucos de variedades de laranjas, mantendo-se mais fiel ao sabor e as características naturais da fruta e por isso, sua produção requer frutas de excelente qualidade. Durante o processamento do suco integral ocorre a pasteurização, a refrigeração e a estocagem. Com isso, o suco é mantido asséptico durante todo o processamento até a sua distribuição (MENDES, 2009).

O consumo de suco de laranja se tornou um hábito alimentar em todo o mundo e, como consequência, o consumo de suco industrializado tem aumentado ao longo dos anos. Não surpreendentemente, a quota de mercado deste produto é agora muito maior do que o de frutas frescas, especialmente nos países desenvolvidos. O produto industrializado tem um maior teor de flavonóides, tais como as flavanonas, hesperidina e naringina, quando comparado ao suco fresco, devido ao processo de moagem, que usa a fruta inteira para produzir o suco (MENDES, 2009).

1.1.1. Vitamina C

Vitamina C (ácido ascórbico) é um micronutriente essencial necessário para o funcionamento normal do metabolismo humano participando de várias vias metabólicas, obtido através da dieta, é especialmente abundante em frutas frescas, frutas cítricas, e hortaliças. Estudos epidemiológicos sugerem que a vitamina C diminui a incidência e a mortalidade em casos de doenças cardiovasculares e câncer, devido a sua capacidade de proteger o organismo da oxidação lipídica e danos no DNA (JAFFE, 1984).

De acordo com o National Research Council (1989) a recomendação atual de dieta (RDA) de vitamina C é de 60mg/d para adultos saudáveis e não fumantes. A dose de vitamina

C indicada pela RDA fornece uma margem de segurança que impede o desenvolvimento do escorbuto (doença desencadeada pela carência de vitamina C, causando hemorragia e morte).

Alguns estudos mostraram a associação entre altas concentrações plasmáticas de vitamina C e o aumento do HDL colesterol e a diminuição da concentração do LDL colesterol, prevenindo o risco do desenvolvimento de aterosclerose (JACQUES, 1992; SIMON, 1992; NESS et al, 1996).

Ness et al (1996) também encontraram correlação inversa entre os níveis de vitamina C e concentração de triglicérides no plasma. O risco de doenças cardiovasculares também está associado ao aumento de fatores de coagulação como o fibrinogênio. Outros estudos correlacionaram a diminuição de fibrinogênio às altas concentrações de vitamina C no plasma (WOODWARD et al, 1997; KHAW e WOODHOUSE, 1995).

Os efeitos benéficos de uma dieta rica em frutas cítricas são atribuídos à vitamina C e também à atividade antioxidante dos flavonoides, prevenindo doenças degenerativas e infecciosas (KUROWSKA e MANTHEY, 2004). As frutas cítricas e os sucos cítricos têm sido reconhecidos como um coadjuvante importante no tratamento da hipertensão. Os benefícios do suco de laranja, sobre a pressão arterial, são atribuídos principalmente à vitamina C e aos flavonoides cítricos, que apresentam ação antioxidante e vasoprotetora, respectivamente. A vitamina C atua removendo e interrompendo as reações dos radicais livres, enquanto a hesperidina atua no aumento da diurese e na manutenção da função endotelial; a ingestão regular de suco de laranja pode atuar positivamente para reduzir os fatores de risco para hipertensão (BONIFÁCIO e CÉSAR, 2009). De acordo com Beckman et al (2001) um estudo com administração intra arterial de vitamina C melhorou a disfunção endotelial, em sujeitos portadores de diabetes, obesidade, hipertensão e hipercolesterolemia.

Em vários estudos epidemiológicos tem sido demonstrado uma correlação inversa entre a ingestão de vitamina C e mortalidade (KATZ et al, 2000; KIM et al, 2005). Entre os efeitos benéficos com a suplementação de vitamina C, tem sido descritos a melhora da função vascular em pacientes com doenças coronarianas e da função endotelial em crianças com dislipidemias (ENGLER et al, 2003). Em diabéticos causa um declínio nos níveis de radicais livres plasmáticos e diminui a pressão arterial (KIM et al, 2002).

1.1.2. Flavonoides

De acordo com suas estruturas moleculares, os flavonóides são divididos em seis classes: flavonas, flavanonas, flavonols, isoflavonas, antocianinas e flavanols (ou catequinas) .

Os flavonoides constituem um grupo de pigmento encontrados em plantas e são responsáveis pela coloração de flores e frutas (MACHEIX, FLEURIET e BILLOT, 1990).

Os flavonoides são compostos fenólicos frequentemente encontrados em fontes alimentares vegetais (frutas e verduras) (BENAVENTE-GARCIA et al, 2008). Os flavonóides encontrados nas frutas cítricas, especialmente no gênero *Citrus* (Família Rutaceae) são denominados flavanonas, sendo a naringina e hesperidina, os mais abundantes. Os flavonóides podem ocorrer em sua forma livre (aglicona) ou conjugada a açúcares (glicosilada), nos alimentos estão na forma glicosilada, e após serem ingeridos e chegarem ao intestino grosso, à molécula de açúcar (glicose, galactose, ramnose, xilose ou arabinose) é hidrolisada e os flavonóides passam para a forma aglicona (HARBONE et al, 2000; KIM et al, 2003; LEE et al, 1999; MACHEIX, FLEURIET e BILLOT, 1990). Assim, os flavonóides das frutas cítricas, a hesperidina e a naringina são absorvidos no trato gastrointestinal e após deglicosilação por bactérias intestinais são denominadas hesperitina e naringenina, respectivamente (AMEER et al, 1996; KUROWSKA et al, 2004; KUROWSKA et al, 2000).

Além de sua importância fisiológica para as plantas, os flavonoides possuem valor comercial devido as suas múltiplas aplicações nas indústrias de alimentos e farmacêutica (BENAVENTE- GARCIA et al, 2008; BAR et al, 1990, DEL RIO et al, 1998; MARIN et al, 2007; DEL RIO et al, 2004).

Os flavonóides exercem atividade antioxidante em diferentes vias metabólicas; atividade anti-radicais livres e anti-lipoperoxidação. O poder antioxidante dos flavonóides é atribuído a sua capacidade de doar átomos de hidrogênio disponíveis nos grupos fenólicos, estabilizando o elétron desemparelhado do radical livre (BURDA e OLESZEK, 2001; DI MAJO et al, 2005).

A atividade anti-inflamatória dos flavonoides está relacionada com a inibição de enzimas (proteína C quinase, fosfodiesterase, fosfolipase, lipoxigenase e cicloxigenase), envolvidas na resposta inflamatória. Os flavonoides cítricos também agem na ativação de células envolvidas na resposta imune, incluindo linfócitos T e B (MANTHEY, GUTHRIE e GROHMANN, 2001).

A hesperidina inibe a migração de leucócitos de 48% para 34%, diminuindo o volume de exudatos em processos inflamatórios. A hipertermia induzida em ratos foi levemente reduzida com a administração de hesperidina. Esses resultados indicam que a hesperidina obtida de frutas cítricas tem um potencial terapêutico como agente anti-inflamatório (DA SILVA, OLIVEIRA e LAPA, 1994).

Segundo Cha et al, 2001, um estudo com ratos alimentados com ácido orótico para induzir o acúmulo de triacilglicerol hepático e colesterol, quando tratados com hesperitina, mostrou diminuição dos níveis séricos de triacilglicerol e colesterol.

Kurowska e Manthey 2004, estudaram o efeito hipolipidêmico e metabólico com formulações contendo hesperidina, naringina e tangeritina (polimetoxiflavona) em hamsters com hipercolesterolemia induzida experimentalmente, o estudo mostrou redução nos níveis séricos de lipoproteína de baixa densidade (VLDL), do LDL colesterol e dos triacilgliceróis. De acordo com os autores, elevados níveis de metabólitos de polimetoxiflavonas no fígado, são responsáveis pelos efeitos hipolipidêmicos in vivo.

Um estudo japonês também mostrou a relação inversa entre a ingestão de flavonoides e a concentração plasmática de colesterol (CHOI, YOKOZAWA e OURA, 1991).

Os flavonoides cítricos possuem atividade antiadesiva, capaz de inibir a agregação plaquetária. Flavonoides metoxilados (nobiletina e tangeritina) são mais ativos (antiadesivo) que compostos hidroxilados (naringina, hesperidina) e mostram uma atividade similar ao ácido acetilsalicílico (BERET e CAZENAVE, 1988; ROBBINS, 1976).

O efeito hipocolesterolêmico de uma dieta com suco de laranja foi investigado em coelhos com altos níveis de LDL-colesterol, após três semanas de ingestão de suco, os níveis de LDL-colesterol baixaram 43% (KUROWSKA et al., 2000). Outro estudo mostrou que uma dieta contendo 0,1% de naringenina, foi capaz de reduzir os níveis de colesterol plasmático, e também os níveis de colesterol e triacilglicerol hepáticos em ratos com dieta rica em colesterol (LEE et al, 1999; LEE et al, 1999).

Os efeitos anti-câncer atribuídos aos flavonóides cítricos estão envolvidos na inibição de diversos mecanismos como dano ao DNA, desenvolvimento de tumor e proliferação de tumor (MANTHEY, GUTHRIE, GROHMANN, 2001).

A laranja e o suco de laranja são boas fontes destes flavonoides e contém cerca de 40mg/100g do alimento. A ingestão média de flavanonas é de aproximadamente 25 mg/dia em muitos países da Europa, com variações em função dos hábitos alimentares. O consumo de flavonoides pela população do Estado de São Paulo foi estimado em cerca de 60 a 106mg/dia, representado por alimentos comuns na dieta típica brasileira (ARABBI et al, 2004).

As flavanonas são apontadas como redutores da hipercolesterolemia, da hipertensão e da obesidade (FUJOKA e LEE, 2007; KUROWSKA e MANTHEY, 2004; KUROWSKA et al, 2000a; KUROWSKA et al, 2000b; MANTHEY et al, 2001). Em estudos com animais, hesperitina e naringina reduziram a lipoproteína de baixa densidade, LDL-colesterol e

triglicérides. Os poucos estudos envolvendo o consumo de laranja ou extrato de flavonoides relataram efeitos benéficos sobre os lipídios plasmáticos. Em indivíduos com hipercolesterolemia, o consumo de 750 ml de suco de laranja, diariamente, aumentou a concentração de HDL em 21% (CESAR et al, 2010). Segundo Oliveira et al (2002) um trabalho realizado com administração de naringina sobre o metabolismo lipídico de aves hipercolesterolêmicas, observou-se reduções significativas dos níveis de colesterol total de 32%, aumento de 23% no HDL colesterol e redução do LDL colesterol de 50%.

Um dos diversos mecanismos de ação atribuídos aos flavonoides para explicar seus efeitos no metabolismo lipídico, se deve ao aumento de excreções biliares nas fezes, e a capacidade de elevar a atividade do sistema hepático, aumentando o metabolismo lipídico (NAGEM et al, 1994; NAGEM et al, 2001; PINTO et al, 1999). De acordo com estudos realizados por Vinueza et al (2008), ratos tratados com gordura saturada, tiveram redução dos níveis de colesterol total após a administração de hesperidina, não havendo interferência nos níveis de triacilgliceróis plasmáticos.

As polimetoxiflavonas são um grupo de flavonoides exclusivos nas espécies cítricas e estão presentes principalmente na casca do fruto. São um importante componente de mecanismo de defesa contra doenças de plantas causadas por diversos patógenos (DEL RIO et al,1998). Ocorrem em proporções variáveis em diferentes espécies de frutas cítricas, sendo utilizados como compostos marcadores para a detecção de adulteração em sucos cítricos(GEOFFREY et al 2002) conferindo sabor de sumo as frutas e sucos cítricos(VELDHUIS et al 1970).

Vários estudos têm demonstrado o papel das polimetoxiflavonas na saúde humana como antiinflamatório (AKAO et al, 2008),anti cancerígeno (LI et al 2007; YUKITO et al 2001) e anti fúngico (ORTUÑO et al 2006). Guthrie e Kurowska (2004) relataram em um estudo feito com hamsters, que uma dieta rica em frutose, levou ao desenvolvimento de anormalidades metabólicas como resistência à insulina e dislipidemias. Após suplementação com polimetoxiflavonas, verificaram que os níveis séricos de colesterol e triglicérides diminuíram e os níveis de insulina foram normalizados.

1.1.3. Fibras Alimentares

A fibra dietética ou alimentar é composta de diferentes polissacarídeos interligados entre si formando uma rede tridimensional na presença de várias substâncias como proteínas de parede celular, lignina, compostos fenólicos, fitatos, oxalatos e outros (FILISSETTI, 2006).

A solubilidade das fibras alimentares está relacionada às propriedades fisiológicas permitindo uma divisão simples entre aquelas que têm efeitos principalmente sobre a absorção de glicose e lipídios no intestino delgado, que são facilmente fermentadas por bactérias no cólon (solúveis) e aquelas que são fermentadas lenta e incompletamente, tendo efeitos mais pronunciados nos hábitos intestinais (insolúveis) (REISER, 1997).

O consumo regular de fibras alimentares tem sido uma das mais constantes recomendações feitas por nutricionistas e órgãos oficiais para a prevenção de doenças do trato gastrointestinal, cardiovasculares, prevenção ou tratamento de diabetes, hipercolesterolemia e obesidade. Estas recomendações estão baseadas na constatação de que as fibras alimentares possuem efeitos fisiológicos que são responsáveis por alterações significativas nas funções gastrointestinais humanas, como redução na absorção de nutrientes, aumento da massa fecal, redução nos níveis de colesterol do plasma sanguíneo e redução na resposta glicêmica (LAJOLO et al., 2001; BOTELHO et al., 2002, KOLLER, 1994).

1.2. Glicose e insulina

A glicose é uma das principais fontes de energia para as células, entretanto para as células do sistema nervoso, é a única. Caso essas células fiquem sem energia por tempo prolongado podem sofrer danos severos e irreversíveis. Para garantir o bom funcionamento do organismo, a glicemia deve ser mantida dentro de limites estáveis, o que se consegue através da interação entre ingestão de glicose, sua liberação de depósitos endógenos e liberação de vários hormônios. Os hormônios da família dos glicocorticóides, adrenalina, glucagon, hormônio de crescimento e insulina participam da regulação dos níveis de glicose sérica (SBD, 2011). A insulina é o mais importante sendo produzido pelas células beta, localizadas nas ilhotas de Langerhans, no interior do pâncreas e tem a função de regular a quantidade de glicose existente no organismo. Além disso, tem importantes ações na econômica energética, como o aumento da síntese de glicogênio. Os níveis baixos de insulina faz com que as células do fígado convertam o glicogênio em glicose e excrete para o sangue. Esta é a ação clínica da insulina que é diretamente útil em reduzir níveis elevados de glicose no sangue, como no diabetes. Também aumenta a síntese de ácidos graxos (as células gordurosas recolhem lipídeos do sangue que são convertidos nos triglicérides), aumenta a esterificação dos ácidos graxos (tecido adiposo que sintetiza gorduras), diminui a proteinólise (redução da degradação das proteínas), diminui a lipólise (redução da conversão dos estoques lipídicos das células gordurosas em ácidos graxos sanguíneos), diminui a gliconeogênese (produção da glicose oriunda de vários substratos presentes no fígado), aumenta a absorção de aminoácidos e

potássio séricos, promove o relaxamento dos músculos das artérias, aumentando o fluxo sanguíneo (SBD, 2011).

A resistência a insulina é uma anormalidade metabólica, que compromete a habilidade da insulina de estimular a captação de glicose e modular o metabolismo lipídico no fígado e músculos. Em animais e humanos a resistência a insulina é compensada com a hiperinsulinemia causando defeitos no metabolismo lipídico como aumento de triacilgliceróis ricos em proteína de muito baixa densidade (VLDL) que se acumulam no fígado (TAGHIBIGLOU et al, 2000). Outro problema associado a resistência a insulina inclui prejuízo na vasodilatação do endotélio, reduzindo a produção de óxido nítrico, um importante mediador envolvido na proteção contra aterosclerose (LI e FORSTERMANN, 2000). A resistência a insulina comumente precede o diabetes tipo 2, e ambas desordens estão associadas com aumento do risco de doenças cardíacas. Para minimizar estes riscos é recomendada uma dieta com baixa ingestão de calorias especialmente gorduras e açúcar, e aumentar a ingestão de fibras (ROTTIERS, 2000). Dietas contendo 1% de polimetoxiflavona (tangeritina) diminuiu as concentrações de insulina no soro sanguíneo, e melhora os níveis de óxido nítrico no endotélio (KURIOKA et al, 2000; OSHIDA et al, 2000).

1.3. Estresse oxidativo

Oxidação é a conversão de uma substância química em um derivado com um menor número de elétrons, portanto é a perda de um ou mais elétrons para outra substância (LARSON,1997). A transferência de elétrons é um dos processos químicos fundamentais para a sobrevivência das células. O efeito colateral dessa dependência é a produção de radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio (ERO) que podem causar dano oxidativo. 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 (BAE et al, 1999). As principais fontes geradoras de radicais livres são as organelas citoplasmáticas que metabolizam oxigênio, nitrogênio e cloro (SHAMI e MOREIRA, 2004). Os radicais livres possuem funções diversas no organismo como produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas. No entanto seu excesso causa danos ao DNA, proteínas e organelas celulares, provocando alterações na estrutura e funções celulares, causando patologias como o câncer, envelhecimento precoce, doenças cardiovasculares, degenerativas e neurológicas, choque hemorrágico, catarata entre outras. Para combater os radicais livres os organismos

produzem substâncias que previnem danos oxidativos, ou obtém de fontes externas como alimentos e bebidas (HALLIWELL, GUTTERIDGE e CROSS, 1992).

O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes que resulta na indução de danos celulares pelos radicais livres é denominado estresse oxidativo (BARREIROS et al, 2006). Alguns dos muitos efeitos conhecidos da formação aumentada de ERO (Espécies Reativas de Oxigênio) em sistemas biológicos incluem a peroxidação de membranas lipídicas, dano oxidativo de ácidos nucleicos, carboidratos e oxidação de proteínas e lipídeos. Radicais livres causam dano ao DNA promovendo a carcinogênese, também possuem papel importante na aterosclerose, infarto, artrite e isquemia. A defesa antioxidante na detoxificação de ERO nas células é promovida por sistemas enzimáticos e não enzimáticos. Sistema enzimático inclui algumas enzimas como superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase entre outras que agem especificamente contra ERO (SIES, 1991).

Um antioxidante é definido como uma substância que mesmo em baixas concentrações em relação as de um substrato oxidável (proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos) é capaz de prevenir a oxidação desses substratos (HALLIWELL, 1996).

De acordo com Barreiros et al (2006), antioxidantes são substâncias capazes de inibir a oxidação, diminuindo a concentração dos radicais livres no organismo e/ou quelando íons metálicos, prevenindo a peroxidação lipídica. Os antioxidantes não enzimáticos mais importantes pela sua ação benéfica ao organismo são as vitaminas C e E (tocoferol), os carotenóides e os flavonóides.

Os flavonóides como antioxidantes reduzem a geração ou aumento de radicais livres nos macrófagos, ou impedem a oxidação da molécula de LDL, e também podem sequestrar íons como ferro e cobre diminuindo radicais livres no meio (FRANKEL et al, 1993). A capacidade antioxidante dos flavonóides foi demonstrada por estudos realizados por Santos et al (1999), onde a naringina reduziu os níveis de colesterol e triacilglicerol.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMEER, B. et al. Flavone absorption after naringin, hesperidin, and citrus administration. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v.60, p.34-40, 1996.

ARABBI, P.R.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. **J. Agric. Food Chem.**, v.52, n.5, p.1124 -1131, 2004.

AKAO, Y.; ITOH, T.; OHGUCHI, K.; IINUMA, M.; NOZAWA, Y. Interactive effects of polymethoxy flavones from Citrus on cell growth inhibition in human neuroblastoma SH-SY5Y cells, **Bioorg. Med. Chem.** v.16, p. 2803–2810 2008.

AVIRAM, M.; DORNFELD, L.; ROSENBLAT, M.; VOLKOVA, N.; KAPLAN, M.; COLEMAN, R.; HAYEK, T.; PRESSER, D.; FFURMAN, B. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 71, p.1062-1076, 2000.

BAE, G.U.; SEO, D.W.; KWON, H.K.; LEE, H.Y.; HONG, S.; LEE, Z.W., HA, K. S.; LEE, H.W.; HAN, J. W.; **J. Biol. Chem.** 274, 32596, 1999.

BAR, A.; BORREGO F.; BENAVENTE, O.; CASTILLO, J. DEL RIO, J. A. Neohesperidin dihydrochalcone, properties and applications. **Food Sci. Technol.** v.23, p.371-376, 1990.

BARREIROS, L.B.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesas do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v.29, n.1, 2006.

BENAVENTE-GARCIA, O., CASTILO, J., MARIN, F.R., ORTUNO, A., DEL RIO, J.A. Uses and properties of citrus flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.6185-6205, 2008.

BECKMAN, J.A.; GOLDFINE, A.B.; GORDON, M.B.; CREAGER, M.A. Ascorbate restores endothelium-dependent vasodilatation impaired by acute hyperglycemia in humans. **Circulation**, v.103, p.1618-1623, 2001.

BERET, A. e CAZENAVE, J. P. The effect of flavonoids on blood-vessel wall interactions. **Cellular, and medicinal properties, Progress in Clinical and Biological Research**, v.280, p. 187-200, 1988.

BOTELHO, L.; CONCEIÇÃO, A.; CARVALHO, V. D. Caracterização de fibras alimentares da casca e cilindro central do abacaxi '*Smooth cayenne*'. **Ciências Agrotécnicas**. v.26, n. 2, p. 362-367, 2002.

BOK S. H., LEE S. H., PARK Y. B., BAE K. H., SON K. H., JEONG T. S., CHOI M. S. Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase and acyl CoA: cholesterol transferase are lower in rats fed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoids. **J. Nutr.** 129:1182-1185, 1999.

BOKKENHEUSER VD, SHACKLETON CH, WINTER J. Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal Bacteroides from humans. **Biochem J.** 248:953-6, 1987.

BONIFÁCIO, N.P.; CESAR, T.B. Influência da ingestão crônica do suco de laranja na pressão arterial e na composição corporal. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.16, n 2, p.76-81, 2009.

BORRADAILE N. M., CARROLL K. K., KUROWSKA E. M. Regulation of HepG2 cell apolipoprotein B metabolism by the citrus flavanones hesperetin and naringenin. **Lipids**, v.34, p.591-598,1999.

BRIGELIUS-FLOHE, R., KELLY, F. J., SALONEN, J. T., NEUZIL, J., ZINGG, J. M. & AZZI, A. The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. **Am. J. Clin. Nutr.**v.76, p.703-716, 2002.

BURDA, S.; e OLESZEK, W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,v 49, p. 2774-2779, 2001.

CESAR, T.B.; APTEKMANN, N.P.; ARAUJO, M.P.; VINAGRE, C.C.; Raul C. MARANHÃO, R.C. Orange juice decreases low-density lipoprotein cholesterol in hypercholesterolemic subjects and improves lipid transfer to high-density lipoprotein in normal and hypercholesterolemic subjects. **Nutrition Research**, v.30, p.689-694, 2010.

CHA, J.Y.; CHO, Y. S.; KIM, I.; ANNO, T.; RAHMAN, S. M.; e YANAGITA, T.

Effect of hesperitin, a citrus flavonoid, on the liver triacylglycerol content and phosphatidate phosphohydrolase activity in orotic acid-fed rats. **Plants Foods for Human Nutrition**, v.56,p.349-358, 2001.

CHOI, J. S.; YOKOZAWA, T.; E OURA, H. Anthyperlipidemic effect of flavonoids from *Prunus davidiana*. **Journal of Natural Products**, v.54, p.218-224,1991.

CRESPY V, MORAND C, BESSON C, MANACH C, DEMIGNÉ C, RÉMÉSY C. Quercetin, but not its glycosides, is absorbed from the rat stomach. **J Agric Food Chem**. 50:618, 2002.

DA SILVA, E. J. A.; OLIVEIRA, A.S.; e LAPA, A. J. Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids, dauricin and claussequinone, in rats and mice. **Journal of Pharmacy and pharmacology**, v.46,p.118-122,1994.

DAY AJ, DUPONT MS, RIDLEY S, RHODES M, RHODES MJ, MORGAN MR, WILLIAMSON G. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. **FEBS Lett**. 436:71–5, 1998.

DECHAUD H., RAVARD C., CLAUSTRAT F., DE LA PERRIERE A. B., PUGEAT M. Xenoestrogen interaction with human sex hormone-binding globulin (hSHBG). **Steroids** 64:328-334, 1999.

DEL RIO, J. A., ARCAS, M. C., BENAVENTE-GARCIA, O., ORTUNO, A. Citrus polymethoxylated flavones can confer resistance against *Phitophthora citrophthora*, *Penicillium digitatum*, and *Geotrichum species*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.4423-4428,1998.

DEL RIO, J. A., FUSTER, M. D., GOMES, P., PORRAS, I., GARCIA- LIDON, A., ORTUNO, A. Citrus limon, A source of flavonoids of pharmaceutical interest. **Food Chemistry**, v.84, p.457-461, 2004.

DI MAJO, D.; GIAMMANCO, M.; LA GUARDIA, M.; TRIPOLI, E.; GIAMMANCO, S. e FINOTTI, E. Flavanones in Citrus fruit: Structure-antioxidant activity relationships. **Food Research Internacional**, v.38, p.1161-1166, 2005.

DORNAS, W.C.; OLIVEIRA, T.T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R.G.; SANTOS, A.F.; NAGEM, T.J. Flavonoides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista Ciência Farmacêutica Aplicada**, v.28, p.241-249, 2007.

EJAZ, S., EJAZ, A., MATSUDA, K. and CHAE, W. L. Limonoids as cancer chemopreventive agents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p.339-345, 2006.

ENGLER, M.M.; ENGLER, M.B.; MALLOY, M.J.; CHI E, Y.; SCHLOETTER, M.C.; PAUL, S.M.; STUEHHLINGER, M.; LIN, K.Y.; COOKE, J.P.; MORROW, J.D.; RIDKER, P.M.; RIFALIN.; MILLER, E.; WITZTUM, J.L. and MIETUS-SNYNDER, M. Antioxidante vitamins C and E improve endothelial function in children with hiperlipidemia: Endotelial Assesment of Risk from Lipids in Youth Trial. **Circulation**, v.108, p.1059-1063, 2003.

FILISETTI, T. M. C. C. Fibra alimentar: definição e métodos analíticos. In: Lajolo, F.M. Menezes, E.W. de. Edusp. (ed). **Carboidratos em alimentos regionales iberoamericanos**. São Paulo. cap.11, p.257-286. 2006.

FRANKEL, E. N.; KANNER, J.; GERMAN, J.B.; PARKS, E.; KINSELLA, J.E. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substance in red wine. **Lancet**. v.341, p.454-457, 1993.

FUJIOKA, K.; LEE, M.W. Pharmacologic treatment options for obesity: Current and potential medications. **Nutr. Clin. Prac.**, v.22, n.1, p. 50-54, 2007.

GEE JM, DUPONT MS, DAY AJ, PLUMB GW, WILLIAMSON G, JOHNSON IT. Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. **J Nutr**. 130:2765-71, 2000.

GEOFFREY, G. P.; PAUL, A. K.; BRONWEN, G.S.; LAURENCE, D. M. Detection of orange juice adulteration by tangelo juice using multivariate analysis of polymethoxylated flavones and carotenoids. **J. Sci. Food Agric.** 82 p.421-427,2002.

GIL-IZQUIERDO A, GIL MI, FERRERES F. Effect of processing techniques at industrial scale on Orange juice antioxidant and beneficial health compounds. **J Agric Food Chem.** Aug 28:50(18):5107-14, 2002.

GUTHRIE,N.; and KUROWSKA, E.M. Use of polymethoxylated flavones for treating insulin resistance, 2004.

HALLIWELL, B. Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo. **Free Radic Res** ;25:439–54,1996.

HALLIWELL, B, GUTTERIDGE ,J.M.C.; e CROSS, C.E.; **J. Lab. Clin. Med.**v.119, p.598,1992).

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoids since 1992. **Phytochemistry**, v.55, n.6, p. 481-504, 2000.

JACQUES PF. Effects of vitamin C on high-density lipoprotein cholesterol and blood pressure. **J Am Coll Nutr** ;11:139–44,1992.

JAFFE GM. Vitamin C. In: Machlin L, ed. Handbook of vitamins. New York: Marcel Dekker Inc, 199–244, 1984.

KATZ, A.; NAMBI, S.S.; MATHER, K.; BARON, A.D.; FOLLMANN, D.A.; SULLIVAN, G. and QUON, M.J. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. **J Clin Endocrinol Metabolism**, v.85, p.2402-2410, 2000.

KAWAII S., TOMONO Y., KATASE E., OGAWA K., YANO M. Quantitation of flavonoid constituents in *Citrus* fruits. **J. Agric. Food Chem** ; 47:3565-3571,1999.

KHAW, KT; WOODHOUSE P. Interrelation of vitamin C, infection, hemostatic factors, and cardiovascular disease. **BMJ** 310:1559–63,1995.

KIM, H.K. et al. Lipid-lowering efficacy of hesperetin metabolites in high-cholesterol fed rats. **Clin. Chim.**, v.327, p.129-137, 2003.

KIM, J.A.; KOH, K.K.; QUON, M.J.; The union of vascular and metabolic actions of insulin in sickness and in health. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v.25, p.889-891, 2005.

KIM, M.K.; SASAKI, S.; SASASUKI, S.; OKUBO, S.; HAYASHI, M.; TSUGANE, S. Lack of long-term effect of vitamin C supplementation on blood pressure. **Hipertention.** v.40, p. 797-803, 2002.

KOLLER, O. C. **Citricultura: laranja, limão e tangerina.** Porto Alegre: Rígel ,p.446, 1994

KURIOKA, S., KOSHIMURA, K., MURAKAMI, Y., NISHIKI, M. e KATO, Y. Reverse correlation Between Urine Nitric Oxide Metabolites and Insulin Resistance in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. **Endocr.J.**, n 47, p.77-81, 2000.

KUROWSKA, E.M.; MANTHEY, J.A. Hypolipidemic effects and absorption of citrus polymethoxylated flavones in hamster with diet-induced hypercholesterolemia. **J. Agric. Food Chem.**, v.52, p.2879-2886, 2004.

KUROWSKA, E.M. et al. HDL-cholesterol-raising effect of orange juice in subjects with hypercholesterolemia. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.72, p.1095-1100, 2000.

KUROWSKA, E.M.; MANTHEY, J.A. Hypolipidemic effects and absorption of citrus polymethoxylated flavones in hamster with diet-induced hypercholesterolemia. **J. Agric. Food Chem.**, v.52, p.2879-2886, 2004.

KUROWSKA, E. M.; BORRADAILE, N. M.; SPENCE, J. D.; e CARROL, K. K. Hypocholesterolemic effects of dietary citrus juices in rabbits. **Nutrition Research**, v.20, n.1, p.121-129, 2000.

LAJOLO, F. M.; CALIXTO, F. S.; PENNA, E. W.; MENEZES, E. W. **Fibra dietética em Iberoamérica: Tecnología y salud**. São Paulo: Varela, p. 472, 2001

LARSON, R.A.; Naturally Occurring Antioxidants, **Lewis Publishers**: New York, p.1,1997.

LEE, M. K.; MOON, S.S.; LEE, S. E.; BOK, S. H.; JEONG, T.; PARK, Y. B. Naringenina 7-O- cetyl ether as inhibitor of HMG-CoA reductase and modulator of plasma and hepatic lipids in high cholesterol-fed rats. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**. v.11, p.393-398, 2003.

LEE, S.; PARK, Y. B.; BAE, K. H.; BOK, S. H.; KWON, Y.K.; LEE, E. S. Cholesterol-lowering activity of naringin via inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and acyl coenzyme A: Cholesterol acyltransferase in rats. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v.43, p.173-180, 1999.

LEE, S.H. et. al. Hypocholesterolemic effect of hesperitin mediated by inhibition of 3-hydroximetil-3-methylgutaril coenzyme A reductase and acyl coenzyme A: cholesterol diet. **Nutrition Research**, v.19, n.8, p. 1245-1258, 1999.

LI, H. e FORSTERMANN, U. Nitric Oxide In The Pathogenesis of Vascular Disease. **J. Pathol.** n 190, p.244-254, 2000.

LI, S. ; PAN, M. H.; LAI, C.S.; LO, C.Y. ; DUSHENKOV, S. ; HO, C.T. Isolation and syntheses of polymethoxyflavones and hydroxylated polymethoxyflavones as inhibitors of HL-60 cell lines. **Bioorg. Med. Chem.** 15 p. 3381–3389, 2007.

LIN, N.; SATO, T.; TAKAYAMA, Y.; MIMAKI, Y.; SASHIDA, Y.; YANO, M.; ITO, A.; Novel anti-inflammatory actions of nobiletin, a citrus polymethoxy flavonoid, on human synovial fibroblasts and mouse macrophages, **Biochem. Pharmacol.** 65 ,p.2065–2071, 2003 .

MACHEIX, J.J.; FLEURIET, A.; BILLOT, J. The main phenolics of fruits. **In Fruit phenolics**.p.1-103, 1990.

MANTHEY, J.A.; GUTHRIE, N.; GROHMANN, K. Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. **Curr. Med. Chem.**, v.8, n.2, p. 135-153, 2001.

MARIN,F.R.,SOLER-RIVAS, C.,BENAVENTE-GARCIA,O., CASTILLO, J.,PEREZ-ALVAREZ, J. A. By products from different Citrus process as source of customized functional fibres. **Food Chemistry**,v.100, p.736-741, 2007.

MARTÍN, MENA P, CÁNOVAS JÁ, MICOL V, SAURA D. Vitamina C and the role of citrus juices as functional food. **Nat Prod Commun.** May; 4(5): 677-700, 2009.

MENDES M. A consolidação do NFC. **Citricultura Atual.** 2009.

MOURÃO, D. M.; SALES, N.S.; COELHO, S. B.; et al. **Rev. Nutr.**, jul./ago., vol.18, no.4, p.529-539. ISSN 1415-5273, 2005.

MULLEN, W.; ARCHEVEQUE, M.A.; EDWARDS, C.A.; MATSUMOTO, H.; CROZIER, A. Bioavailability and metabolism of orange juice flavanones in humans: impact of a full-fat yogurt. **Jornal Agric Food Chem.** v.10, p.11157-11164, 2008.

NAGEM TJ, ALBUQUERQUE TTO, MIRANDA LCG, PEREIRA CAS. Efeito de flavonoides sobre lipídios em ratos e sobre enzimas metabolizadoras de drogas. **Arq Biol Tecnol.** v.37,p.471-482,1994.

NAGEM TJ, PEREIRA WL, OLIVEIRA TT, PINTO AS, PINTO JG. Kaempferol e antocianina: redutores de lipídeos em ratos. **Rev Port Farm.** v.3,p.127-131,2001.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Recommended dietary allowances. 10th ed. Washington, DC: National Academy Press, 1989.

NEMETH K, PLUMB GW, BERRIN JG, JUGE N, JACOB R, NAIM HY, WILLIAMSON G, SWALLOW DM, KROON PA. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. **Eur J Nutr.**; 42:29–42, 2003.

NESS, AR, KHAW KT, BINGHAM S, DAY, NE. Vitamin C status and serum lipids. **Eur J Clin Nutr** ;50:724–9,1996.

OLIVEIRA, T.T.; GOMES, S.M.; NAGEM, T.J; COSTA,N.M.B.; SECOM, P.R. Efeito de diferentes doses de flavonoides em ratos hiperlipidêmicos. **Rev Nutr.** v.15, p.45-51, 2002.

ORTUÑO, A. ; BÁIDEZ, A. ; GÓMEZ, P. ; ARCAS, M.C. ; PORRAS, I.; GARCÍA-LIDÓN, A. ; RÍO, J.A.D. Citrus paradisi and Citrus sinensis flavonoids: their influence in the defence mechanism against *Penicillium digitatum*. **Food Chem.** 98 , p.351–358,2006.

OSHIDA, Y., TACHI, Y., MORISHITA, Y., et al. Nitric Oxid Decreases Insulin Resistance Induced By Hight-Fructose Feeding.Horm. **Metab. Res.**n 32,p339-342, 2000.

PINTO, A. S., OLIVEIRA T.T., NAGEM T.J., GOMES S.M., COSTA N.M.B., OLIVEIRA M.G.A. Ação de flavonoides sobre os níveis de lipídeos em ratos tratados com triton e seus efeitos antioxidantes. **Revista Esc Farm Odontol Alfenas**,v.8,p.21:21-8, 1999.

REISER, S. Metabolic effects of dietary pectinsrel ated to human health. **Food Technol.** v.4, n.2, p.91-99, 1997

ROBBINS, R. C. Regulatory action of phenylbenzeno-pyrone(PBP) derivates on blood constituents affeting rheology in patients with coronary heart disease (CHD).**International Journal for Vitamin and Nutrition Research**,v. 46, p.338-347, 1976.

ROTTIERS,R. Diabetes and Nutrition. **Inform.** n11, p.873-877, 2000.

SANTOS K. F., OLIVEIRA T. T., NAGEM T. J., PINTO A. S., OLIVEIRA M. G. Hypolipidaemic effects of naringenin, rutin, nicotinic acid and their associations. **Pharmacol. Res.** 40:493-496, 1999.

SBD. Sociedade Brasileira de Diabetes. Insulina: Produção e ações. Disponível em: <http://www.medicinageriatrica.com.br/2008/07/01/insulina-producao-e-acoas/>. Acessado em 14/fev/2012.

SHAMI, N.J.I.E.; MOREIRA,E.A.M. **Revista de Nutrição**, v. 17,p.227, 2004.

SHIN Y. W., BOK S. H., JEONG T. S., BAE K. H., JEOUNG N. H., CHOI M. S., LEE S. H., AND PARK Y. B. Hypocholesterolemic effect of naringin associated with hepatic cholesterol regulating enzyme changes in rats. **Int. J. Vitamin Nutr. Res.**;69:341, 1999.

SIES, H. Oxidative stress: From basic research to clinical application. **Am J.Med.**v.91, p.31-38, 1985.

SIMON, J.A. Vitamin C and cardiovascular disease: a review. **J Am Coll Nutr** ;11:107–25,1992.

SO F.V., GUTHRIE N., CHAMBERS A. F., MOUSSA M., CARROLL K. K. Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices. **Nutr. Cancer**, v. 262,p.167-181,1996.

TAGHIBIGLOU,C. ; CARPENTIER, A.;VAN IDERSTINE, S. C.; CHEN, B.; RUDY, D.; AILTON, A.; LEWIS, G. F. and ADELI, K Mechanism of Hepatic Very Low Density Lipoprotein Overproduction In Insulin Resistance.**J. Biol. Chem** n 275, p.8416-8425, 2000.

TANAKA T., MAKITA H., KAWABATA K., MORI H., KAKUMOTO M., SATOH K., HARA A., SUMIDA T., TANAKA T., OGAWA H. Chemoprevention of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by the naturally occurring flavonoids, diosmin and hesperidin. **Carcinogenesis**; v.18,p.957-965,1997.

USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 21. (2010). Disponível em <http://www.ars.usda.gov/main/site_main.htm?modecode=12-35-45-00> Acessado em 12/01/12.

VAN ACKER, F.A.A., SCHOUTEN O., HAENEN G.R.M.M., VAN DER VIJGH W.J.F., BAST A. Flavonoids can replace -tocopherol as an antioxidant. **FEBS Lett.** 473:145-148; 2000.

VAN POPEL, G. E VAN DEN BERG, H. Vitamins and cancer. **Cancer Lett.** 114:195-202, 1997.

VELDHUIS, M.K.; SWIFT, L.J.; SCOTT, W.C. Fully-methoxylated flavones in Florida orange juices, **J. Agric. Food Chem.** 18, 1970.

VINUEZA, J.C.; FARIA, J.B.; CESAR, T.B. Hesperidina diminui o colesterol sanguineo de ratos alimentados com gordura saturada. **Revista Alimentos e Nutrição**, v.19, n 4,p 473-479, 2008.

WOODWARD, M ; LOWE, G.D; RUMLEY, A, et al. Epidemiology of coagulation factors, inhibitors and activation markers: the third Glasco MONICA survey. **Br J Haematol** ;97:785-97,1997.

YANG M., TANAKA T., HIROSE Y., DEGUCHI T., MORI H., KAWADA Y. Chemopreventive effects of diosmin and hesperidin on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced urinary-bladder carcinogenesis in male ICR mice. **Int. J. Cancer.** 73:719-724, 1997.

YOUNG, J. F., NIELSEN, S. E., HARALDSDOTTIR, J., DANESHVAR, B., LAURIDSEN, S. T., KNUTHSEN, P., CROZIER, A., SANDSTROM, B. E DRAGSTED, L. O. Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status. **Am. J. Clin. Nutr.** 69:87-94, 1999.

YUKIKO, I ; YUKO, T ; MOTOHARU, J.-I. ; MASAMICHI, Y. ; CHIHIRO, I ; HIROSHI, F. ; TERUO, M. ; Masashi, K. ; Harukuni, T. ; Hoyoku. N. Cancer chemopreventive activity of 3,5,6,7,8,30,40-heptamethoxyflavone from the peel of citrus plants, **Cancer Lett.**163 p. 7-9,2001.

CAPÍTULO II

Avaliação do estresse oxidativo, perfil glicêmico e insulínico de indivíduos saudáveis submetidos à ingestão aguda de suco de laranja fresco e comercial pasteurizado.

Simone Canuto Bergamim; Thaís Borges Cesar

RESUMO

O suco de laranja é fonte de vários tipos de compostos bioativos relacionados a benefícios à saúde e a atividade antioxidante deriva não somente da vitamina C, um dos principais nutrientes do suco de laranja, mas também dos flavonoides cítricos, denominados flavanonas. O presente estudo teve como objetivo avaliar o estresse oxidativo e a resposta glicêmica e insulínica em indivíduos adultos saudáveis submetidos a uma dose única de suco de laranja fresco em comparação ao suco de laranja pasteurizado. Participaram do estudo 21 voluntários que foram submetidos a duas colheitas de sangue, a primeira após ingestão de suco de laranja fresco, e a segunda depois de um intervalo de 30 dias, após a ingestão de suco de laranja pasteurizado. Foram realizadas dosagem das variáveis bioquímicas: triglicérides (TG), colesterol total (CT), colesterol de LDL (LDL-C), colesterol de HDL (HDL-C), glicemia de jejum e insulina de jejum. Para determinar o estresse oxidativo no soro dos pacientes foram realizados os ensaios de TBARS e DPPH, antes e após o consumo de cada suco de laranja. Após a ingestão de suco de laranja fresco, houve diminuição nos níveis de colesterol total, efeito não observado após a ingestão do suco de laranja pasteurizado. Os níveis da glicose sanguínea se mantiveram dentro da normalidade após à ingestão dos sucos de laranja, fresco e pasteurizado enquanto os níveis de insulina aumentaram após a ingestão do suco pasteurizado em relação ao suco fresco. A capacidade antioxidante apresentou diferença significativa nos períodos pré e pós a ingestão de suco de laranja fresco, com redução da porcentagem do radical DPPH no soro dos indivíduos, entretanto tal diferença não foi significativa para a ingestão do suco de laranja pasteurizado. Não houve diferença significativa nos níveis de TBARS em relação ao tipo de suco (fresco e pasteurizado), nem em relação ao tratamento (antes e após o consumo do suco).

Palavras-chave: suco de laranja fresco, suco de laranja pasteurizado, estresse oxidativo, perfil glicêmico e insulínico.

ABSTRACT

The orange juice is a source of various types of bioactive compounds. The orange juice's antioxidant activity, related to health benefits, derive not only from vitamin C, one of the main nutrients of orange juice, but also of flavonoids citrus, called flavanones. The present study aimed to evaluate the oxidative stress and glycemic and insulinic response in normal adult individuals subjected to a single dose of fresh orange juice compared to pasteurized orange juice. Twenty one volunteers that participated in the study were subjected to two samples of blood, the first after ingestion of fresh orange juice, and the second after an interval of 30 days after ingestion of pasteurized orange juice. Dosage of biochemical variables were carried out: triglycerides (TG), total cholesterol (TC) and LDL cholesterol (LDL-C), HDL cholesterol (HDL-C), reason LDH/HDL, fasting plasma glucose and insulin of fasting. To determine oxidative stress in individuals' serum tests were performed and TBARS, DPPH before and after the consumption of each orange juice. After 24h from ingestion of fresh orange juice, there was decrease in total cholesterol level, non-observed after ingestion of pasteurized orange juice. Glucose levels have remained within normal after ingestion of orange juices, fresh and pasteurized. Increased insulin levels after ingestion of pasteurized juice on fresh juice. The antioxidant capacity presented significant difference in pre and post ingestion of fresh orange juice, with a reduction of the percentage of DPPH radical in serum of individuals, however this difference was not significant to the ingestion of pasteurized orange juice. There was no statistically significant difference in levels of TBARS, 24 h after ingestion of fresh orange juice in respect of pasteurized orange juice (NFC). Also not statistically significant difference was verified to the levels of thiobarbituric acid reactive substances before and after the consumption of fresh orange juice and NFC.

Keywords: fresh orange juice, pasteurized orange juice, oxidative stress and glycemic and insulinic profile.

1. Introdução

O suco de laranja é fontes de vários tipos de compostos bioativos, como a vitamina C e as flavononas. De acordo com a USDA (2010), um copo de suco de laranja de 240g (250mL) fornece 124mg de vitamina C, 7,2mg de hesperidina, 1,5mg de naringina, 0,72g de fibras totais, além de carboidratos, potássio, folato entre outros. A atividade antioxidante do suco de laranja, relacionada a benefícios à saúde, derivam não somente da vitamina C, um dos principais nutrientes do suco de laranja, mas também dos flavonoides cítricos, denominados flavanonas (MARTI et al., 2009). A ingestão de quantidades significativas de suco de laranja melhora os níveis de colesterol sanguíneo, previne a modificação do LDL colesterol, diminui a agregação plaquetária, contribuindo para a prevenção das doenças cardiovasculares e reduz o estresse oxidativo (AVIRAM et al, 2000; YONG et al,1999).

O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes que resulta na indução de danos celulares pelos radicais livres tem sido chamado de estresse oxidativo (BARREIROS et al, 2006). Alguns dos muitos efeitos conhecidos da formação aumentada de ERO's (Espécies Reativas de Oxigênio) em sistemas biológicos incluem a peroxidação de membranas lipídicas, danos oxidativos à ácidos nucleicos, carboidratos, proteínas e lipídeos. Os radicais livres causam danos ao DNA promovendo a carcinogênese, além de promoverem a aterosclerose, o infarto, a artrite e a isquemia. A defesa antioxidante na detoxificação de ERO's nas células é promovida por sistemas enzimáticos e não enzimáticos. O sistema enzimático inclui algumas enzimas como a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase (SIES, 1991). O sistema não enzimático inclui as vitaminas C e E (tocoferol), os carotenóides e os flavonoides.

Os flavonoides como antioxidantes reduzem a geração ou aumento de radicais livres nos macrófagos, ou impedem a oxidação da molécula de LDL, e também podem sequestrar íons como ferro e cobre diminuindo radicais livres no meio (FRANKEL et al,1993). Neste trabalho se buscou avaliar, em um grupo de indivíduos adultos saudáveis, o efeito da ingestão aguda do suco de laranja fresco e pasteurizado nos biomarcadores de estresse oxidativo e na avaliação do perfil glicêmico e insulínico.

2. Material e métodos

2.1. Casuística

Homens (n=11) e mulheres (n=10) adultos saudáveis, residentes em Araraquara (SP), com idades variando de 18 a 60 anos. A seleção dos voluntários foi realizada por entrevista individual, explicando os objetivos e procedimentos da pesquisa, e selecionando os indivíduos com disponibilidade para participar do projeto, de acordo com as normas do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara-SP, documento: CEP/FCF/CAr número 26/2009. Os 21 homens e mulheres foram submetidos a duas etapas de colheitas de sangue, a primeira após ingerir suco de laranja fresco, e a segunda colheita após trinta dias com a ingestão de suco de laranja pasteurizado. Os voluntários ficaram quinze dias antes de cada experimento sem ingerir frutas e sucos cítricos.

2.2. Desenho Experimental

Os 21 voluntários foram submetidos a duas etapas experimentais envolvendo colheitas de sangue para as análises bioquímicas e oxidativas. Em cada etapa foram colhidas quatro amostras de sangue, totalizando 32mL de sangue por pessoa e por etapa da pesquisa. A primeira etapa foi iniciada no dia zero com a primeira colheita de sangue em jejum de 12h, seguida pela ingestão de 750mL de suco de laranja fresco. Após 30 minutos foi feita a segunda colheita de sangue e subsequentemente as outras colheitas após 2 e 24 horas. O segundo experimento com o suco de laranja pasteurizado ocorreu em trinta dias após o primeiro experimento, e apresentou planejamento similar ao primeiro.

2.3. Suco de laranja

Foram utilizadas laranjas Valencia (*Citrus aurantium* L.) procedentes da região de Araras para o processamento dos sucos de laranja fresco e pasteurizado.

2.3.1. Modo de preparo

As laranjas foram lavadas manualmente, com detergente de uso doméstico e enxaguadas em água corrente. Após a lavagem foram higienizadas em uma solução de hipoclorito 200ppm com pH 6.8 por 3 minutos, secas e estocadas em refrigeração até o momento do uso. O suco fresco foi processado em extrator de suco (MJ-20 Basic, Mulligan Associates Inc., Jupiter, FL), armazenado em garrafas plásticas e consumido em menos de 40 minutos. O suco de laranja pasteurizado foi processado pela Citrosuco (Grupo Fisher) em

extrator JBT Food Tech., Lakeland, FL), posteriormente filtrado, centrifugado, pasteurizado, resfriado e mantido asséptico durante a estocagem.

2.3.2. Análise química do suco

Os sucos de laranja fresco e pasteurizado (Total) foram centrifugados à 10.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante (sobren.) e o precipitado (precipit.) foram separados. Estas frações foram analisadas por HPLC-ESI-MS a fim de se delinear o perfil cromatográfico dos sucos e quantificar as flavononas e polimetoxiflavonas. As análises foram realizadas em um HPLC-MS, 2695 Alliance HPLC (Waters) conectado em paralelo a um detector fotodiodo Waters 996 (PDA) e a um espectrômetro de massas de simples quadrupolo Waters/Micromass ZQ equipado com uma fonte de ionização por eletrospray. O split pós-coluna do PDA para o detector de massas foi de 10:1. Os compostos foram separados em coluna C8 (4,6mm x 150 mm d.i.) XBridge Waters. A eluição foi realizada utilizando um gradiente de 0.5% de ácido fórmico em água/acetonitrila, com composição inicial de 90:10 (v/v), e aumentando a composição de acetonitrila em um gradiente linear para 80:20, 75:25, 60:40, 30:70, 30:70 e então diminuindo para 90:10 (v/v) à 10, 15, 23, 40, 45, e 53 min, respectivamente, a um fluxo de 0.75 mL.min⁻¹. Os dados foram manipulados com o software MassLynx ver. 4.1 (Micromass, Division of Waters Corp., Beverly, MA). Os parâmetros para o espectrômetro de massas foram: modo de ionização, ES; voltagem capilar, 3.0 kV; extrator de voltagem, 5 V; temperatura da fonte, 100°C; temperatura de desolvatação, 225°C; desolvatação com N₂, 465 L.h⁻¹; cone de voltagem, 20V.

2.3.3. Análise bioquímica do soro

As variáveis bioquímicas foram determinadas no soro dos pacientes utilizando kits comerciais: triglicerídeos e colesterol total por método enzimático Trinder (LABTEST, Brasil), HDL-C por inibição seletiva (LABTEST, Brasil), LDL-C (equação de Friedwald et al, 1972), glicose (GOD-Trinder, LABTEST, Brasil) e insulina por imunoenensaio de electroquimioluminescência (ROCHE, USA).

2.4. Avaliação do estresse oxidativo

2.4.1. Ensaio do DPPH

A capacidade antioxidante no soro dos voluntários foi avaliada através da redução do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), em jejum e após 24h da ingestão de 750 mL de suco de laranja fresco e pasteurizado, segundo metodologia descrita por Chrzczanowicz et al. (2008) modificada por Nasser et al. (2011).

2.4.2. Ensaio do TBARS

A peroxidação lipídica no soro dos voluntários foi avaliada pela presença de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em jejum e após 24h da ingestão de 750 mL de suco de laranja fresco e pasteurizado, segundo metodologia descrita por Yagi (1998) adaptada por Nasser et al. (2011).

2.5. Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada com o programa Sigma Stat, versão 2.03. Foi aplicado o teste da Anova Two Way para os marcadores do estresse oxidativo, antes e após 24h a ingestão do suco de laranja fresco e pasteurizado. A significância estatística foi de $p < 0,05$ em todas as comparações efetuadas.

3. Resultados e discussão

3.1. Análise do suco de laranja

A Figura 1 apresenta uma comparação entre o suco de laranja fresco e o suco de laranja pasteurizado, quanto a quantidade das principais flavononas (naringina - t_R 25.2 min e hesperidina - t_R 26.6 min) presentes nestes sucos. Verificou-se que tanto a naringina como a hesperidina estão presentes em maior concentração no suco de laranja pasteurizado que no suco fresco, em todas as frações (Total, Sobrenadante e Precipitado). Sendo que a quantidade de naringina e hesperidina foram respectivamente, de 4,6 e 3,2 vezes maior no suco de laranja pasteurizado que no suco fresco. Corroborando nossos resultados a USDA (2010) descreve que o teor de flavonoides no suco de laranja pasteurizado é o dobro em relação ao suco fresco.

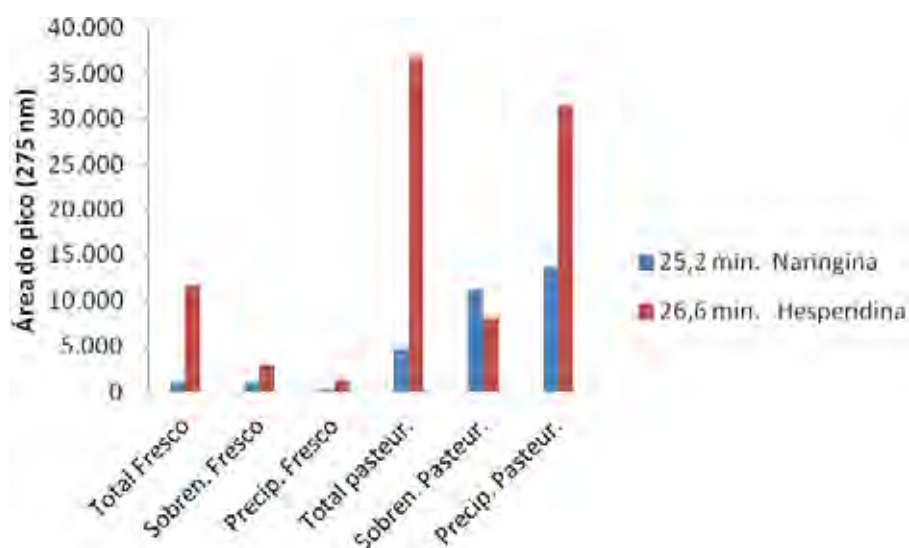


Figura 1. Quantidade das principais flavononas presentes nas diferentes frações do suco de laranja fresco e pasteurizado.

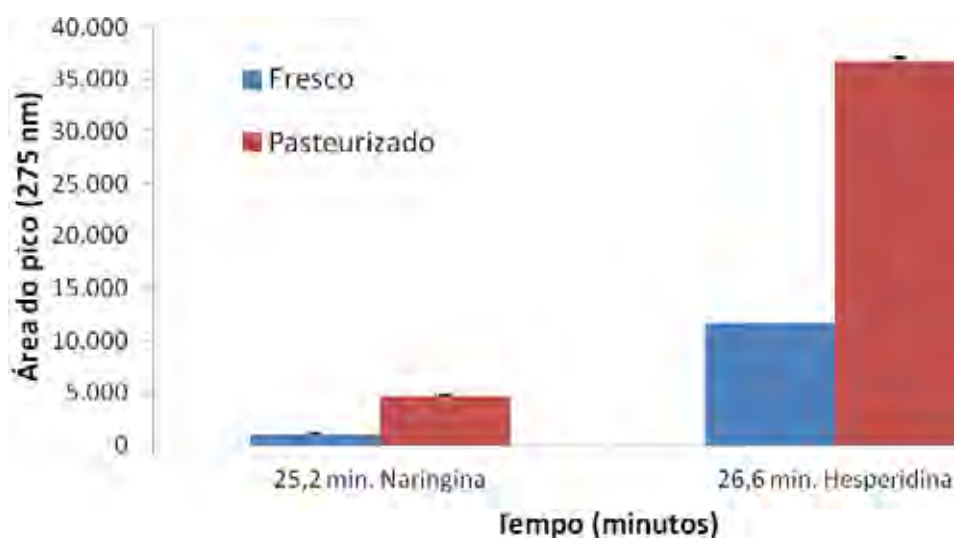


Figura 2. Comparação entre o suco de laranja fresco e o suco de laranja pasteurizado quanto a quantidade de polimetoxiflavonas.

A Figura 2 apresenta uma comparação entre o suco de laranja fresco e o suco de laranja pasteurizado, quanto a quantidade de polimetoxiflavonas [Sinensetina - t_R 37.8, Quercetagetina hexametil-éter (QHME) - t_R 38.9, Nobelitina - t_R 39.5, Tetrametilscutelareina (TMS) - t_R 39.9, Heptametoxiflavona (HMF) - t_R 40.5 e Tangeritina - t_R 40.7] presentes

nestes sucos. Verificou-se que todas as polimetoxiflavonas estão presentes em maior concentração no suco de laranja fresco que no suco de laranja pasteurizado, em todas as frações (Total, Sobrenadante e Precipitado). A nobelitina foi a polimetoxiflavona presente nos diferentes tipos de sucos em maior concentração e apresentou uma quantidade 2 vezes maior no suco de laranja fresco que no pasteurizado. A tetrametilscutelareína, sinensetina, tangeritina, heptametoxiflavona e quercetagetina hexametil-éter apresentaram uma quantidade de 3,1; 1,7; 3,3; 24,8 e 1,7 respectivamente, maior no suco de laranja fresco que no pasteurizado. Verificou-se também que há uma maior concentração destas polimetoxiflavonas no suco sem separação (Total), diminuindo no sobrenadante e diminuindo ainda mais no precipitado. Essa diferença na composição química do suco de laranja fresco em relação ao suco de laranja pasteurizado, provavelmente é resultado dos diferentes processos de extração, uma vez que a laranja utilizada foi a mesma nos dois processamentos.

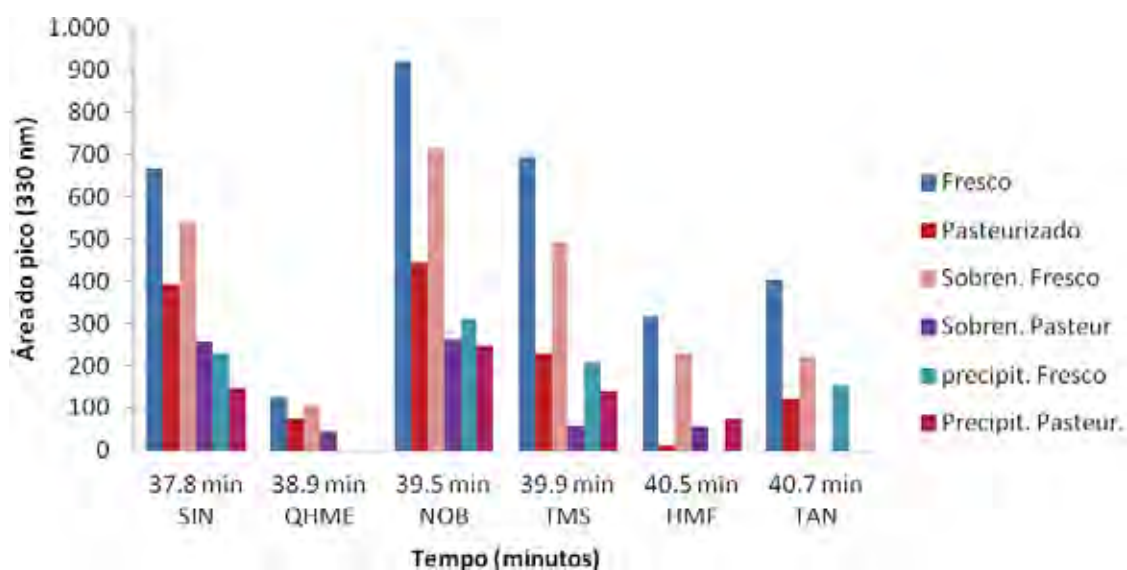


Figura 3. Quantidade das principais polimetoxiflavonas presentes nas diferentes frações do suco de laranja fresco e pasteurizado.

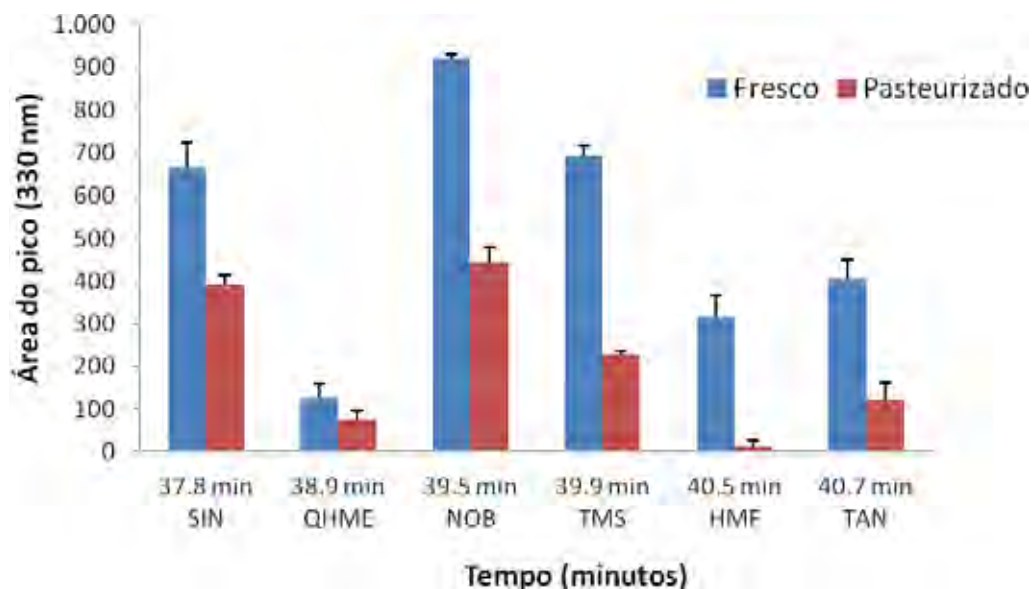


Figura 4. Comparação entre as quantidades de polimetoxiflavonas no suco fresco fresco em relação ao suco pasteurizado.

3.2. Avaliação do perfil bioquímico

As análises das variáveis bioquímicas basais mostraram que, para todos os voluntários, os níveis de lipídeos séricos apresentaram em média, valores normais quando comparados aos valores de referência recomendados pela Sociedade Brasileira de Cardiologia (Tabela 1).

Neste estudo, embora só estivessem presentes indivíduos normolipidêmicos, após 24h da ingestão de suco de laranja fresco, houve diminuição significativa nos níveis de colesterol total, efeito não observado após a ingestão do suco de laranja pasteurizado. O suco de laranja fresco aparentemente apresentou uma maior quantidade de fibras totais. Este fato, deve ter influenciando os níveis de colesterol, visto que as fibras auxiliam na diminuição do colesterol [Lajolo et al. (2001), Botelho et al. (2002) e KOLLER (1994)]. Além disso, as polimetoxiflavonas presentes em maior quantidade no suco de laranja fresco (Figura 2) devem estar associadas à diminuição do colesterol plasmático. Estes resultados são confirmados em estudos de Guthrie et al. (2006) que demonstraram que as polimetoxiflavonas reduzem o risco de doenças cardiovasculares, sendo um dos fatores favoráveis, a redução do colesterol.

A ingestão de uma só dose de suco de laranja pasteurizado aumentou o nível de triglicérides e não diminuiu o de colesterol total, em estudo anterior, César *et al* (2010) verificaram que o consumo de 750mL/d de suco pasteurizado, durante 2 meses, não alteraram os níveis séricos de triglicérides e glicose, no entanto, diminuiu o colesterol, em indivíduos normolipidêmicos.

Tabela 1. Variáveis bioquímicas de homens e mulheres, que consumiram suco de laranja fresco e pasteurizado.

<i>Variáveis</i>	Suco de laranja fresco		Suco de laranja pasteurizado	
	Antes	Após 24 h	Antes	Após 24 h
<i>Bioquímicas (mg/dl)</i>				
Colesterol total	206 ± 54,3	195 ± 45*	185 ± 41,1	187 ± 42,8
LDL-Colesterol	124 ± 33,4	119 ± 32,7	107 ± 35,1	104 ± 34,7
HDL-Colesterol	50,7 ± 14,9	49,7 ± 14,1	53,5 ± 13	53 ± 12,9
Triglicérides	106 ± 83	117 ± 78,2	126 ± 67,8	151 ± 96,9*

A resposta glicêmica e insulínica é mostrada no Gráfico 1. Os níveis de glicose se mantiveram dentro da normalidade após a ingestão dos sucos de laranja fresco e pasteurizado. Os níveis de insulina aumentaram consideravelmente após a ingestão do suco pasteurizado em relação ao suco fresco e permaneceram elevados após duas horas da ingestão. Essas diferenças na resposta glicêmica e insulínica provavelmente estão relacionadas aos diferentes teores de polimetoxiflavonas dos sucos. Guthrie e Kurowska (2004) patentearam que as polimetoxiflavonas reduzem a resistência à insulina, aumentando o metabolismo da glicose. De acordo com Nakajima et al (2007) foi demonstrado em estudo feito com animais, resistentes a insulina, que tiveram uma dieta suplementada com polimetoxiflavonas (nobiletina e tangeritina), onde foi observado uma melhora nos níveis de glicose e insulina. Os efeitos da nobiletina, no metabolismo da glicose e sensibilidade a insulina, em ratos diabéticos e obesos foram investigados, o tratamento com nobiletina, durante 5 semanas melhorou a hiperglicemia e a resistência a insulina (JUNG et al 2004).

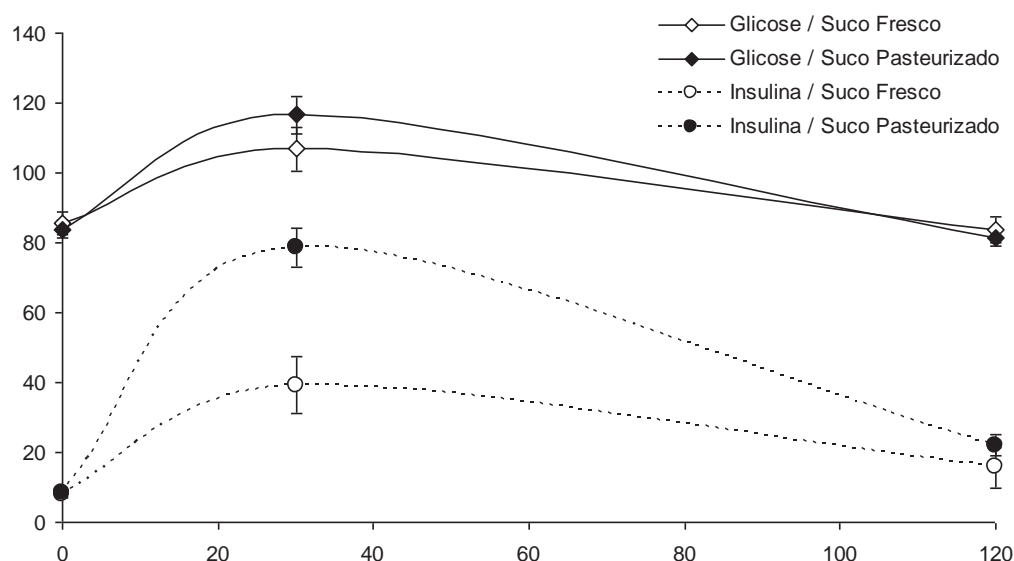


Figura 5. Resposta glicêmica e insulínica do suco de laranja fresco em comparação ao suco de laranja pasteurizado.

3.3. Avaliação do Estresse Oxidativo

Baseados na capacidade antioxidante do suco de laranja, foram avaliados no presente estudo a atividade dos compostos antioxidantes do suco da laranja fresco e pasteurizado utilizando os biomarcadores do estresse oxidativo DPPH e TBARS em indivíduos adultos saudáveis.

A capacidade antioxidante foi avaliada pelo método DPPH. Os resultados mostraram diferença significativa ($p < 0,001$) entre as médias dos períodos pré e pós a ingestão de suco de laranja fresco, com redução do DPPH no soro dos indivíduos, entretanto tal diferença não foi significativa para a ingestão do suco de laranja pasteurizado (Figura 1, Tabela 1). Tal fato mostra um aumento na capacidade antioxidante do soro dos indivíduos, que ingeriram o suco de laranja fresco devido, presumivelmente, à presença de uma maior quantidade de polimetoxiflavonas, em relação ao suco pasteurizado. Esterbauer (1993) demonstrou em ensaios *in vitro*, uma comparação entre a adição de nobelitina e de alfa tocoferol ao LDL colesterol e verificou que a nobelitina possui capacidade antioxidante de 10 a 20 vezes maior que o alfa tocoferol.

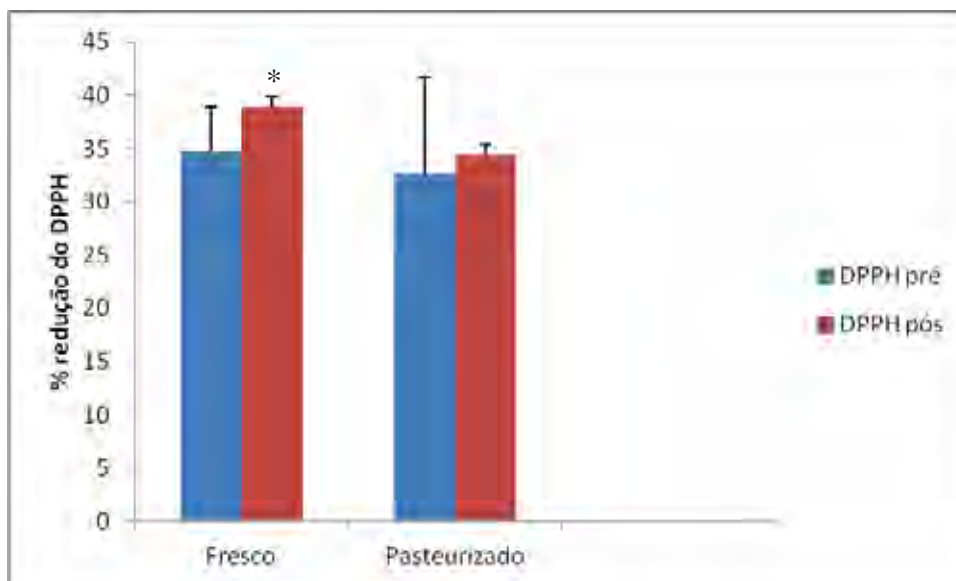


Figura 6. Redução da porcentagem do DPPH antes e 24horas após a ingestão do suco de laranja fresco e pasteurizado.

Tabela 4. Marcadores do estresse oxidativo, TBARS e DPPH, em homens e mulheres que consumiram suco de laranja fresco e pasteurizado.

	TBARS		DPPH	
	Pré	Pós	Pré	Pós
Fresco	1,85 ± 0,46	1,34 ± 0,23	34,7 ± 4,2	38,9 ± 5,4 *
Pasteurizado	1,91 ± 0,38	1,73 ± 0,37	32,7 ± 8,9	34,4 ± 5,5

*p<0,001

Não houve diferença estatística significativa nos níveis de TBARS, 24h após a ingestão de suco de laranja fresco em relação suco de laranja pasteurizado. Também não foi verificada diferença estatística significativa para os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico antes e após o consumo de suco de laranja fresco e pasteurizado, sugerindo que os indivíduos deste trabalho não estavam em estresse oxidativo, pois eram indivíduos saudáveis.

4. Conclusão

Neste estudo foi determinado que o suco de laranja fresco apresentou uma maior quantidade de polimetoxiflavonas, enquanto que o suco de laranja pasteurizado apresentou maiores quantidades de flavononas. Houve diminuição significativa nos níveis de colesterol

total 24 horas após a ingestão de suco de laranja fresco. As polimetoxiflavonas contidas em maior quantidade no suco de laranja fresco possivelmente contribuíram para melhorar a resposta glicêmica e insulínica. A capacidade antioxidante do soro dos indivíduos que ingeriram o suco de laranja fresco foi estatisticamente maior que do soro dos indivíduos que ingeriram o suco de laranja pasteurizado, provavelmente devido a alta quantidade de polimetoxiflavonas que reduzem o estresse oxidativo. Também não foi verificada diferença estatística significativa para os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico antes e após o consumo de suco de laranja fresco e pasteurizado.

Referências

AVIRAM, M.; DORNFELD, L.; ROSENBLAT, M.; VOLKOVA, N.; KAPLAN, M.; COLEMAN, R.; HAYEK, T.; PRESSER, D.; FFURMAN, B. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 71, p.1062-1076, 2000.

BARREIROS, L.B.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesas do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v.29,n.1, 2006.

BOTELHO, L.; CONCEIÇÃO, A.; CARVALHO, V. D. Caracterização de fibras alimentares da casca e cilindro central do abacaxi '*Smooth cayenne*'. **Ciências Agrotécnicas**. v.26, n.2, p. 362-367, 2002.

CESAR, T.B.; APTEKMANN, N.P.; ARAUJO, M.P.; VINAGRE, C.C.; Raul C. MARANHÃO, R.C. Orange juice decreases low-density lipoprotein cholesterol in hypercholesterolemic subjects and improves lipid transfer to high-density lipoprotein in normal and hypercholesterolemic subjects. **Nutrition Research**, v.30, p.689-694, 2010.

CHRZCZANOWICZ J, GAWRON A, ZWOLINSKA A, GRAFT-JOHNSON J, KRAJEWSKI W, KROL M, MARKOWSKI J, KOSTKA T, NOWAK D. Simple method for determining human serum 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) radical scavenging activity – possible application in clinical studies on dietary antioxidants. **Clin Chem Lab Med**. 46(3): 342–9, 2008.

ESTERBAUER, H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. **Am. J. Clin. Nutr.** v.57 779S–785S discussion 785S-786S,(1993).

FRANKEL, E. N.;KANNER, J.;GERMAN,J.B.; PARKS,E.; KINSELLA, J.E. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substance in red wine. **Lancet.** v.341,p.454-457, 1993.

GUTHRIE,N.; and KUROWSKA, E.M. Use of polimethoxilated flavones for treating insulin resistence, 2006.

JUNG, U.J.; LEE, M.K.; JEONG, K.S.; CHOI, M.S. The hypoglycemic effects of hesperidin and naringin are partly mediated by hepatic glucose-regulating enzymes in C57BK/KsJ-db/db mice. **J Nutr.**v.134,p.2499–503,2004.

KOLLER, O. C. **Citricultura: laranja, limão etangerina.** Porto Alegre: Rígel, p.446, 1994.

LAJOLO, F. M.; CALIXTO, F. S.; PENNA, E. W.; MENEZES, E. W. **Fibra dietética em Iberoamérica: Tecnología y salud.** São Paulo: Varela, p.472, 2001.

MARTI, MENA P, CÁNOVAS JÁ, MICOL V, SAURA D. Vitamina C and the role of citrus juices as functional food. **Nat Prod Commun.** v. 4, n.5, p.677-700, 2009.

NAKAJIMA A, YAMAKUNI T, HARAGUCHI M, OMAE N, SONG SY, KATO C, et al. Nobiletin, a citrus flavonoid that improves memory impairment, rescues bulbectomy-induced cholinergic neurodegeneration in mice. **J Pharmacol Sci.**v.105,p.122–126, 2007.

NASSER, A.L.M.; DOURADO, G.K.; MANJATE, D.A.; CARLOS, I.Z.; Cesar, T.B. Avaliação do estresse oxidativo no sangue de consumidores habituais de suco de laranja. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.** v.32, n.2, p.275-279, 2011.

SIES, H. Oxidative stress: From basic research to clinical application. **Am J.Med.**v.91, p.31-38, 1985.

USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 21. (2010). Disponível em <http://www.ars.usda.gov/main/site_main.htm?modecode=12-35-45-00> Acessado em 12/01/12.

YAGI K. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. **Methods in Molecular Biology**. 108:101-6,1998.

ANEXOS

ANEXO 1. Protocolo CEP/FCF/CAr nº 26/2009



Protocolo CEP/FCF/CAr nº 26/2009

Interessado: Profa. Dra. Thais Borges Cesar

Projeto: Biodisponibilidade e atividade antioxidante dos flavonóides e vitamina C do suco de laranja fresco em comparação com o suco de laranja integral pasteurizado

Despacho nº 04/2010 – Comitê de Ética em Pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, em sessão de 05 de março de 2010, considerou com pendência o projeto de pesquisa intitulado "Biodisponibilidade e atividade antioxidante dos flavonóides e vitamina C do suco de laranja fresco em comparação com o suco de laranja integral pasteurizado" necessitando de adequações nos seguintes aspectos:

I - Item B – Casuística, Métodos e Critérios de Inclusão e Exclusão: Na introdução, são apontadas duas coletas de sangue. No entanto, no item 2.4, são relatadas 7 momentos de coleta de sangue na primeira ingestão e na segunda ingestão. Esclarecer, portanto a quantidade exata de coletas as quais os sujeitos da pesquisa serão submetidos. Descrever, ainda, como se dará a coleta de urina dos sujeitos da pesquisa;

II – Item E – Descrição dos desconfortos e riscos, inclusive relacionados à perda da confidencialidade e descrição das respectivas medidas preventivas e curativas: além dos desconfortos descritos, deve se mencionar a restrição a sucos de frutas cítricas durante o período mencionado e explicar melhor a coleta de sangue que será realizada 7 vezes, gerando considerado desconforto;

III – Item F – Análise Crítica dos Riscos e Benefícios: Descrever os benefícios diretos aos sujeitos da pesquisa, como acesso às informações resultantes das avaliações antropométricas, exames laboratoriais e posterior encaminhamento em caso de distúrbios encontrados;




IV – Item L.3 – Previsão de indenização dos sujeitos da pesquisa: Corrigir o item pois todo e qualquer dano moral ou pessoal que o sujeito da pesquisa venha a sofrer deverá ser indenizado, devendo o pesquisador determinar quem suportará este ônus;

V – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: Rever a quantidade de suco a ser ingerida. No item B são apontadas 500 mL e no TCLE 750 mL. Esclarecer melhor o modo como serão extraídos os 100 mL de sangue (7 vezes em cada momento). Ajustar a informação referente à indenização dos sujeitos conforme o item IV.

O projeto em questão terá prazo de até 60 dias para sua adequação conforme letra b do inciso VII.13 da Resolução nº 196/96 do Ministério da Saúde, posteriormente será reapreciado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

Solicita-se, ainda, que a resposta a este despacho seja enviada de forma ordenada, conforme os itens constantes deste despacho, e a indicação das possíveis alterações efetuadas no novo protocolo preenchido.

Araraquara, 20 de março de 2010.


Prof. Dr. AURELUCE DEMONTE
Coordenadora do CEP

ANEXO 2. Termo de Consentimento Livre Esclarecido

Termo de Consentimento Livre Esclarecido

Eu,.....,RG....., estado civil....., idade, residente à rua, bairro....., cidade, telefones de contato, declaro ter sido orientado e esclarecido sobre o protocolo de pesquisa a seguir:

Que a finalidade deste estudo será para verificar se a ingestão de 750 mL de suco de laranja integral pasteurizado e do suco de laranja fresco, tomado em duas ocasiões distintas com um intervalo mínimo de 30 dias, contribui para melhorar a capacidade antioxidante do corpo e reduzir o colesterol e açúcar do sangue prevenindo contra doenças do coração e o diabetes.

Que serei submetido à avaliação física e nutricional, em duas ocasiões distintas, no início do estudo e após 30 dias, e que responderei perguntas relativas à saúde pessoal e à dieta consumida por mim. Quando necessário poderei esclarecer minhas dúvidas em relação à pesquisa e receberei a orientação dietética adequada.

Que deverei tomar em duas vezes um total de 1500 mL de suco de laranja, sendo na primeira ocasião 750 mL de suco de laranja integral pasteurizado e na segunda ocasião 750 mL de suco de laranja fresco, havendo um período não inferior a 30 dias entre as ingestões de suco. Também, que ficarei sem consumir suco de laranja ou laranja durante os 15 dias que antecedem ao dia do consumo de suco de laranja de acordo com o experimento, evitando assim interferência nos resultados.

Que terei de doar um total de 100 mL de sangue em duas ocasiões (50 mL por vez), para a determinação dos exames bioquímicos e imunológicos. O local da coleta será o Laboratório de Análises Clínicas São Lucas, Avenida Feijó 1013, Centro, Araraquara, SP.

Que a pesquisa terá a duração de dois meses e minha participação será voluntária e livre de qualquer ônus, inclusive receberei ressarcimento para deslocamento quando necessário para o encontro com os pesquisadores.

Que durante a pesquisa eu não estarei sob tratamento medicamentoso para controle do colesterol e de triglicérides, ou fazendo suplementação com vitaminas, minerais ou bioflavonóides, e se necessitar de medicamentos ou suplementos informarei imediatamente os pesquisadores sobre esta nova condição de saúde.

Que os riscos são mínimos ao participar desta pesquisa, apenas terei o desconforto das coletas de sangue, e que todos os materiais utilizados serão descartáveis.

Que concordo em retornar ao laboratório toda vez que for solicitado pelos pesquisadores, com ressarcimentos de despesas com transporte.

Que os procedimentos que estou sendo submetido não acarretarão qualquer dano físico ou financeiro e por isso não haverá necessidade de ser indenizado por parte da equipe ou instituição responsável por essa pesquisa (FCF/UNESP).

Que meu nome será mantido em sigilo, assegurando, assim, minha privacidade e se desejar, receberei informações sobre o resultado da pesquisa.

Que poderei desistir da pesquisa em qualquer momento, sem nenhum prejuízo ou penalização, mas que avisarei os pesquisadores se isto ocorrer.

Que a notificação de qualquer situação de anormalidade relacionada à pesquisa, eu deverei entrar em contato com a equipe científica pelo telefone (0XX16) 33016927.

Pelo presente esclarecimento, concordo em participar do estudo: “Biodisponibilidade e atividade antioxidante dos flavonóides e vitamina C do suco de laranja fresco em comparação com o suco de laranja integral pasteurizado”, sob responsabilidade de Thaís Borges César.

Assinatura do voluntário: _____