

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
CURSO DE FARMÁCIA BIOQUÍMICA**

NATHÁLIA RAFAELA MEIRINHO ESPINA

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE FLAVANONAS CÍTRICAS EM
CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A DIETA INDUTORA DO ESTADO PRÓ-
INFLAMATÓRIO**

ARARAQUARA, SP

2014

NATHÁLIA RAFAELA MEIRINHO ESPINA

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE FLAVANONAS CÍTRICAS EM CAMUNDONGOS
SUBMETIDOS A DIETA INDUTORA DO ESTADO PRÓ- INFLAMATÓRIO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Araraquara, da Universidade Estadual Paulista
para obtenção do grau de Farmacêutica-
Bioquímica.

Orientador: Profa. Dra. Thais Borges César

Co-orientador: Ma. Paula Souza Ferreira

Araraquara, SP

2014

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha avó, Otília.

*“It is by going down into the abyss
that we recover the treasures of life.
Where you stumble,
there lies your treasure.
The very cave you are afraid to enter
turns out to be the source of
what you are looking for.”
(Joseph Campbell)*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Thais Borges Cesar pela oportunidade e confiança, e pelo carinho durante este período.

À Paula Souza Ferreira, pela oportunidade, pelo apoio constante e amizade.

Aos meus pais, pelo amor e suporte.

À minha tia, pelo carinho e por estar sempre presente.

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	9
LISTA DE TABELAS.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivos específicos.....	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1 Animais e condições experimentais.....	16
3.2 Suplementação antioxidante.....	17
3.3 Ganho de peso.....	17
3.4 Dietas.....	18
3.5 Coleta de sangue e remoção do fígado.....	19
3.6 Parâmetros do estresse oxidativo.....	19
3.6.1 Peroxidação lipídica no soro e fígado.....	19
3.6.2 Capacidade antioxidante no soro.....	20
3.7 Perfil bioquímico.....	21
3.8 Análise estatística.....	21
4. RESULTADOS.....	22
4.1 Ganho de peso e ingestão de suplementos	22
4.2 Perfil bioquímico.....	23
4.3 Parâmetros do estresse oxidativo.....	24
5. DISCUSSÃO.....	25
6. CONCLUSÃO.....	31
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
8. ANEXOS.....	38
9. DADOS FINAIS.....	40

RESUMO

Alimentos ricos em compostos antioxidantes têm sido difundidos como protetores à saúde devido a sua associação com a redução de fatores de risco para doenças crônicas, como o diabetes *mellitus* tipo 2, doenças cardiovasculares, entre outras. Tem sido sugerido que as flavanonas cítricas apresentam potencial para reduzir o estresse oxidativo em estados de inflamação crônica, como, por exemplo, na obesidade. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antioxidante da hesperidina, eriocitrina e eriodictiol em camundongos submetidos a uma dieta hiperlipídica, indutora da obesidade. Foram utilizados 50 camundongos C57BL/6J machos divididos aleatoriamente em 5 grupos (n=10 cada), sendo: (1) grupo controle, tratado com dieta padrão; (2) grupo tratado com dieta hiperlipídica; (3) grupo tratado com dieta hiperlipídica e hesperidina (100 mg/kg peso); (4) grupo tratado com dieta hiperlipídica e eriocitrina (200 mg/kg peso); e (5) grupo tratado com dieta hiperlipídica e eriodictiol (200 mg/kg peso). O estudo teve duração de 30 dias e cada grupo recebeu o composto específico juntamente com a dieta, com base na média de ingestão diária e peso corporal. Foram avaliados a glicose, triglicerídeos, colesterol total, HDL-C e LDL-C no soro através de métodos enzimático-colorimétricos, a capacidade antioxidante pelo método ABTS, e o estresse oxidativo no soro e fígado pelo método de TBARS. Os camundongos alimentados com dieta hiperlipídica tiveram aumento da glicose (20%), colesterol total (36%), LDL-C (55%) e peroxidação lipídica hepática (44%), quando comparados aos animais controle. O grupo suplementado com hesperidina reduziu 28% LDL-C em relação à dieta hiperlipídica. Todos os grupos suplementados com flavanonas apresentaram aumento da capacidade antioxidante total no soro ($\approx 9,3\%$), e redução do TBARS no fígado ($\approx 64\%$). Além disso, os grupos suplementados com eriocitrina e eriodictiol reduziram os níveis de TBARS no soro em 48 e 47%, respectivamente. Esta proteção antioxidante oferecida pelas flavanonas se deve à sua capacidade em neutralizar radicais livres, quelar íons catalisadores da peroxidação lipídica, doar elétrons e eliminar o excesso de radicais reativos impedindo a propagação do estresse oxidativo, prevenindo danos como a ruptura de membranas lipídicas e diminuindo o risco de complicações cardiovasculares.

Palavras-chave: flavanonas cítricas, atividade antioxidante, dieta hiperlipídica

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Comparação estrutural entre o núcleo fundamental de um flavonoide e a flavanona.....	12
Figura 2. Estruturas da hesperidina, hesperitina, eriocitrina e eriodictiol.....	13
Figura 3. Camundongo da linhagem C57BL/6J.....	17
Figura 4. Ração hiperlipídica (à esquerda) e ração padrão (à direita).....	19
Figura 5. Reação do ácido tiobarbitúrico.....	20
Figura 6. Desenho experimental.....	22
Figura 7. Possíveis sítios de quelação de metais.....	28
Figura 8. Estrutura da hesperidina, destacando os grupos responsáveis pela atividade.....	29
Figura 9. Mecanismo de ação proposto para a hesperidina.....	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das dietas hiperlipídica e padrão.....	18
Tabela 2. Massa corporal e ingestão de suplementos de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e suplementados com hesperidina, eriocitrina e eriodictiol.....	23
Tabela 3. Perfil bioquímico de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e suplementados com hesperidina, eriocitrina e eriodictiol.....	24
Tabela 4. Parâmetros do estresse oxidativo de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e suplementados com hesperidina, eriocitrina e eriodictiol.....	25

1. INTRODUÇÃO

Os flavonoides são compostos provenientes do metabolismo secundário de plantas e estão largamente distribuídos na natureza, apresentando como estrutura química fundamental dois anéis aromáticos ligados por três átomos de carbono a um heterociclo, sendo o heteroátomo um oxigênio. Diferenças na estrutura do heterociclo (anel C) classificam os flavonoides em seis classes: flavonóis, flavonas, isoflavonas, catequinas, flavanonas e antocianidinas (WOLFE; LIU, 2008; TRIPOLI et al, 2007). Atualmente os flavonoides são considerados como substâncias fitoquímicas, ou seja, substâncias encontradas em vegetais e frutas comestíveis e que, quando ingeridos diariamente, exibem potencial para modular o metabolismo de maneira favorável a prevenção de doenças crônicas e degenerativas (TRIPOLI et al, 2007). Dentre as atividades biológicas já atribuídas aos flavonoides estão: antialérgica, antibacteriana, anticarcinogênica, fortalecedora do sistema imunológico, antiviral e anti-inflamatória (RICE-EVANS et al, 1996).

De modo geral, os flavonoides quando ingeridos na forma glicosilada chegam intactos ao intestino delgado e então são deglicosilados para serem absorvidos. No caso dos flavonoides contendo rutinose, eles podem ser absorvidos tanto no intestino delgado como no cólon, após hidrólise dos açúcares pela ação das bactérias intestinais. A porção aglicona, flavonoide sem açúcar ligado, pode então ser absorvida nos enterócitos e posteriormente conjugada com glucuronídeos ou sulfatos, sendo liberada na corrente sanguínea. O fígado é o principal órgão envolvido na metabolização dos flavonoides (NIELSEN et al, 2006; TRIPOLI et al, 2007).

Quanto ao perfil toxicológico, os flavonoides são largamente distribuídos em alimentos de origem vegetal e já foram utilizados anteriormente na medicina tradicional,

dessa forma, acredita-se que a margem de segurança para o uso terapêutico destes compostos seja ampla (SANDHAR et al, 2011).

Os compostos hesperidina, eriocitrina e eriodictiol são flavonoides pertencentes à classe das flavanonas que apresentam um centro estereogênico em C2 e que diferem do núcleo fundamental dos flavonoides pela ausência da dupla ligação entre C2 e C3 no anel C (Figura 1). A hesperidina é um O-glicosídeo, composto pela ligação entre uma rutinose (ramnosil- α -1,6-glicose), um dissacarídeo de ramnose e glicose, e a hesperitina. A eriocitrina é um O-glicosídeo formado pela ligação de uma rutinose e o eriodictiol. A hesperitina e o eriodictiol isolados são denominados agliconas (Figura 2) (TRIPOLI et al, 2007).

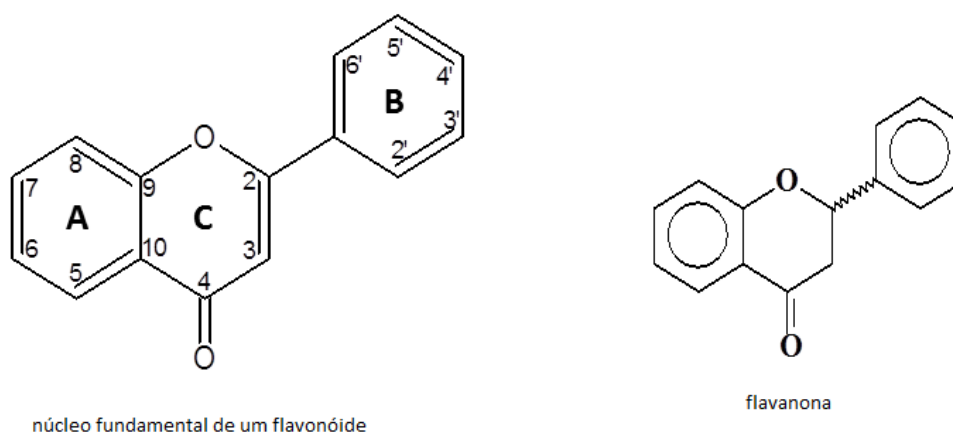


Figura 1. Comparação estrutural entre o núcleo fundamental de um flavonoide e a flavanona

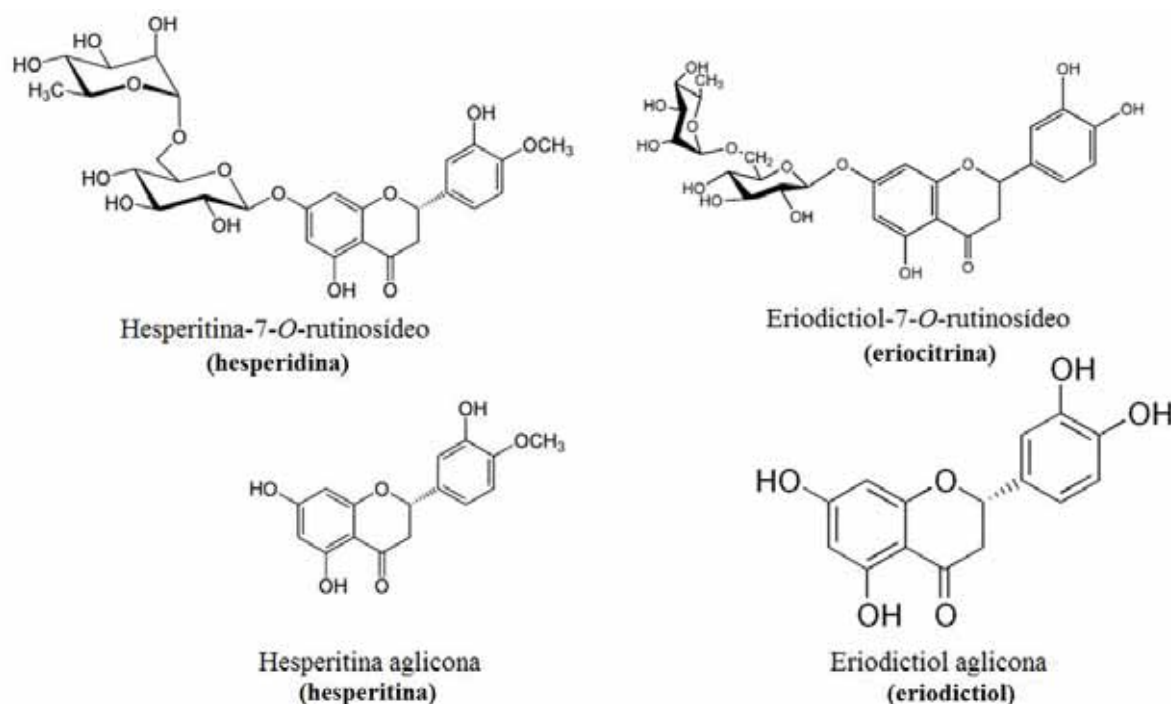


Figura 2. Estruturas da hesperidina, hesperitina, eriocitrina e eriodictiol.

A hesperidina é a principal flavanona encontrada em frutas cítricas e vem sendo reconhecida por apresentar atividades antioxidante, anti-inflamatória e anticarcinogênica (NIELSEN et al, 2006). Demonstrou-se ainda que a hesperidina é capaz de reduzir o colesterol e o triglicérides através de inibição enzimática e que apresenta efeitos benéficos sobre a hiperglicemia através de regulação de vias metabólicas (FUKUCHI et al, 2008).

A eriocitrina é encontrada em abundância nos limões e nas limas, sendo obtida a partir da casca destas frutas (DEL RÍO et al, 2004). Estudos demonstraram que a eriocitrina foi capaz de reduzir marcadores inflamatórios e a peroxidação lipídica, fatores envolvidos na patogênese da retinopatia, em cobaias com diabetes (BUCOLO et al, 2012).

Atualmente, sabe-se que o tecido adiposo além de servir como estoque de energia na forma de gordura, também é um tecido com rica atividade metabólica e existem evidências demonstrando que o estresse oxidativo no tecido adiposo apresenta um papel central em doenças metabólicas, como resistência à insulina, diabetes mellitus tipo 2 e obesidade (RUSKOVSKA; BERNLOHR, 2013).

O estresse oxidativo pode ser definido como “desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e das defesas antioxidantes”. É importante ressaltar que as espécies reativas de oxigênio (ROS) são metabólitos naturalmente produzidos na respiração aeróbia, fisiologicamente úteis, inclusive apresentando funções protetoras contra infecções bacterianas nos macrófagos. Entretanto, a exposição crônica aos radicais livres pode levar a danos teciduais. É conhecido que o radical hidroxila ($\text{OH}^\bullet$) e o peroxinitrito (ONOO^-) induzem a peroxidação lipídica, levando à produção de trans-4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) e de trans-4-oxe-2-nonenal (4-ONE), que são reconhecidos como mediadores e marcadores presentes em desordens oxidativas (RUSKOVSKA; BERNLOHR, 2013; ALVES et al, 2010).

A peroxidação lipídica é iniciada pela reação de radicais livres com ácidos graxos insaturados presentes em membranas celulares e em lipoproteínas, resultando na formação de produtos como o malondialdeído (MDA), que pode ser detectado em amostras biológicas e utilizado como um indicativo na avaliação do estresse oxidativo (LIMA; ABDALLA, 2001).

Vários estudos vêm demonstrando que uma dieta rica em lipídeos pode levar ao estresse oxidativo no organismo, é sugerido que isso ocorre pelo aumento do processo de beta-oxidação. Também é importante ressaltar que o estresse oxidativo está intimamente ligado com a inflamação crônica de baixo grau presente em obesos (LAY et al, 2014).

O balanço redox realizado pelo organismo é composto por enzimas como a catalase e também por substâncias como a vitamina C e E. Estudos clínicos demonstram que o aumento do estresse oxidativo presente na obesidade pode ser reduzido pelo uso de antioxidantes exógenos, como os flavonoides, reduzindo as reações em cadeia que ocorrem na peroxidação lipídica pela sua capacidade de quelação aos radicais livres (RUSKOVSKA; BERNLOHR, 2013). Assim, os flavonoides são considerados como antioxidantes naturais, doando o hidrogênio da hidroxila presente em seu grupo fenólico para o radical, segundo a reação:

$$\text{FLAVONOIDE-OH} + \text{RADICAL}^\bullet \rightarrow \text{FLAVONOIDE-O}^\bullet$$

(radical aroxil estabilizado por

ressonância) + RADICAL-H. De forma que o radical livre altamente instável e reativo é eliminado formando-se um radical mais estável (PATIL, JADHAV, 2013; PATEL, 2008; SANDHAR et al, 2011). Além deste mecanismo, também já foi descrito que os flavonoides são capazes de: inibir as enzimas responsáveis pela produção de ânions superóxido; inibir as enzimas ciclooxigenase, lipooxigenase, monooxigenase microssomal, glutathione-S-transferase, succinoxidase mitocondrial, e NADH oxidase, todas envolvidas na geração de espécies de radicais livres e quelação de metais traço, que desempenham papel importante na formação de radicais livres e na oxidação do LDL (PIETTA, 2000).

De forma geral, a capacidade de doação de elétrons para atuar neutralizando radicais livres pode ser atribuída à presença do grupo catecol no anel B dos flavonoides. Uma das características também parcialmente responsáveis pela atividade antioxidante é a presença da insaturação entre os átomos de carbono 2 e 3 conjugado com um grupo 4-oxo no anel C. Grupos funcionais hidroxila no anel B e 5-hidroxi no anel A contribuem para a quelação de metais prevenindo assim a quebra catalítica do peróxido de hidrogênio com produção de radicais livres (reação de Fenton) (BUCCOLO et al, 2012).

O estresse oxidativo desempenha papel fundamental no desenvolvimento de doenças metabólicas, e a introdução de tratamentos que reduzem a produção de radicais livres mostram impactos positivos nos quadros de resistência insulínica, hiperlipidemia e esteatose hepática (LAY et al, 2014).

2. OBJETIVOS

Avaliar o estresse oxidativo sérico e hepático, e a capacidade antioxidante das flavanonas hesperidina, eriocitrina e eriodictiol em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica.

2.1 Objetivos específicos

Avaliar o efeito da suplementação sobre os seguintes parâmetros:

- Peso corporal
- Estresse oxidativo: peroxidação lipídica sérica, peroxidação lipídica hepática e capacidade antioxidante total sérica
- Perfil bioquímico: glicose, triglicerídeos, colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e condições experimentais

Foram utilizados 50 camundongos C57BL/6J (Figura 3) machos com idade de 9 semanas, procedentes do Biotério da Universidade de São Paulo, USP, Ribeirão Preto-SP. Esta linhagem de camundongos é comumente utilizada em estudos de obesidade e resistência à insulina induzidas por uma dieta (RUSKOVSKA; BERNLOHR, 2013). Desta forma, trata-se de um modelo apropriado para o estudo em questão.

Os animais foram abrigados em sistema isolado (raque ventilada), mantido em temperatura ambiente constante de 24-26°C, com ciclos claro/escuro de 12 horas, e passaram por um período de aclimação de 15 dias em que tiveram livre acesso à água e ração. Após este período os camundongos foram divididos aleatoriamente em 5 grupos (n=10 cada), sendo: (1) grupo controle, tratado com dieta padrão (AIN93 M, contendo 9,5% kcal gordura), (2) grupo controle positivo, tratado com dieta hiperlipídica (contendo 45% kcal em gordura), (3) grupo tratado com dieta hiperlipídica e hesperidina (100 mg/kg de peso corporal), (4) grupo tratado com dieta hiperlipídica e eriocitrina (200 mg/kg de peso corporal) e (5) grupo

tratado com dieta hiperlipídica e eriodictiol (200 mg/kg de peso corporal). A dose de hesperidina foi determinada a partir estudo anterior (De Oliveira, 2013), e as doses da eriocitrina e eriodictiol foram determinadas a partir de estudos anteriores de nosso laboratório, dados não publicados. O estudo teve duração de 30 dias, sendo que os camundongos foram pesados semanalmente e o consumo alimentar medido diariamente. Os suplementos foram adicionados na ração de acordo com o peso corporal e o consumo médio de ração/dia. Ao final do estudo os animais foram sacrificados e o sangue total foi colhido por punção cardíaca.



Figura 3. Camundongo da linhagem C57BL/6J

3.2 Suplementação antioxidante

A hesperidina, eriocitrina e eriodictiol foram extraídos e fornecidos pelo “Quality in Citrus and Subtropical Products” do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), Fort Pierce, Florida, EUA. Os suplementos foram ofertados juntos à dieta, com base no peso corporal (mg/kg de peso corporal). Para garantia do consumo dos suplementos foram adicionados 10% à quantidade diária recomendada de cada composto, e o consumo da dieta foi mensurado diariamente por meio do índice de resto ingesta, de acordo com a fórmula a seguir: **% de resto-ingesta** = peso do resto x 100 / peso da refeição distribuída.

3.3 Ganho de peso

O peso corporal foi mensurado semanalmente e utilizado para determinar a taxa de ganho de massa corporal: (Peso Final – Peso Inicial).

3.4 Dietas

A dieta hiperlipídica (com alto teor de gordura) consistiu na adição de gordura (banha de porco), caseína e açúcar à ração comercial, para conter 20% de proteína, 35% de carboidratos e 45% de gordura, com densidade calórica de 5,35 kcal/g (STEWART et al., 2008). A manufatura da dieta foi realizada pela Rhoster Indústria e Comércio LTDA, Araçoiaba da Serra, São Paulo. Enquanto a dieta padrão continha 14,7% de proteína, 75,8% de carboidratos, 9,5% de gordura, com densidade calórica de 4,22 kcal/g de ração. Na Tabela 1 é possível observar a composição detalhada das dietas e na Figura 4 é possível observar a aparência das rações hiperlipídica e padrão.

Tabela 1. Composição das dietas hiperlipídica e padrão

Composição	g/100g	
	Hiperlipídica	Padrão
Dieta		
Proteínas (%kcal)	21	14,7
Carboidratos (%kcal)	34	75,8
Gorduras (% kcal)	45	9,5
Energia (kcal/g)	5,35	4,22
Amido de milho	7,79	46,57
Caseína	24,00	14,00
L-Cisteína	0,35	0,18
Amido Dextrinizado	11,65	15,50
Sacarose	20,14	10,00
Fibra	5,83	4,00
Óleo de Soja	2,91	5,00
Banha de Porco	20,68	-
Mix Mineral	5,24	3,50
Mix Vitamínico	1,17	1,00
Bitartarato de Colina	0,23	0,25
Tert-Butilhidroquinona (TBHQ)	0,01	0,80
Total	100,00	100,00



Figura 4. Ração hiperlipídica (à esquerda) e ração padrão (à direita)

3.5 Coleta de sangue e remoção do fígado

No último dia do experimento (30º dia), os animais permaneceram em jejum de 12 horas, e então foram anestesiados com xilazina e cetamina na dose de 16 mg/kg (xilazina) + 60 mg/kg (cetamina) via intraperitoneal (i.p.) antes do procedimento de coleta de sangue. A coleta foi realizada através de punção cardíaca, o sangue foi centrifugado a 2800xg por 15 minutos em temperatura ambiente e o soro obtido foi transferido para tubos de 2 mL, devidamente identificados e armazenados a -80°C até realização das análises. O fígado foi coletado e armazenado a -80 °C para análise do estresse oxidativo.

3.6 Parâmetros do estresse oxidativo

3.6.1 Peroxidação lipídica no soro e fígado

A avaliação foi realizada através da determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), sendo que o malondialdeído (MDA) é um dos principais produtos finais da peroxidação lipídica, onde cada molécula de MDA se condensa com 2 moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) produzindo um cromógeno róseo ($C_{11}H_8N_4S_2O_4 \cdot H_2O$) que pode ser detectado por absorção no espectro visível a 532 nm (Figura 5). O método em questão denomina-se teste das substâncias reativas ao TBA e trata-se de um método simples e rápido, porém inespecífico, pois outras substâncias presentes em materiais biológicos também reagem

com o TBA (LIMA; ABDALLA, 2001; SILVA et al, 1999). A quantificação de TBARS no soro foi feita segundo NASSER e cols (2010) e os resultados foram expressos em μmol MDA.

Para a quantificação dos níveis de TBARS hepático foi utilizado o sobrenadante do homogenato do fígado feito em KCL (KOHN, 1944). Os resultados foram expressos em μM de MDA/ mg de proteína, sendo que a proteína foi quantificada a partir do método de Lowry (KROHN, 2011). Todas as análises foram realizadas em triplicata, utilizando-se as médias como resultado final.

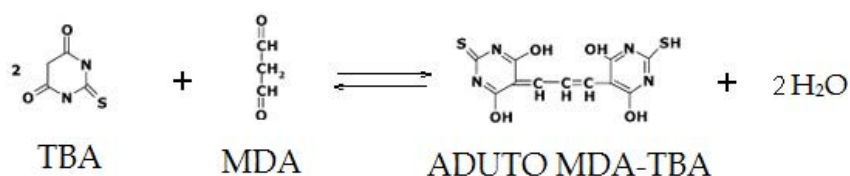


Figura 5. Reação do ácido tiobarbitúrico

3.6.2 Capacidade antioxidante no soro

O $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (2,2'-azino-bis -3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) é um dos compostos cromógenos mais utilizados para avaliação da atividade antioxidante de material biológico, tratando-se de um radical com boa estabilidade e solúvel tanto em água quanto em substâncias orgânicas. A presença do antioxidante no material analisado leva ao sequestro do radical cromógeno $\text{ABTS}^{\bullet+}$ formando um produto de cor verde menos intensa, desta forma, quanto maior a perda de cor, maior a capacidade antioxidante do analito. A curva dose-resposta obtida pode ser correlacionada com um antioxidante padrão (Trolox), sendo possível expressar a atividade antioxidante como equivalentes deste antioxidante padrão (ARNAO, 2000).

3.7 Perfil bioquímico

As dosagens bioquímicas foram realizadas pelo Laboratório de Análises Clínicas São Lucas, Araraquara, São Paulo. Os níveis de glicose, triglicerídeos, colesterol total, LDL-C e HDL-C foram quantificados por métodos enzimático-colorimétricos como descritos no bulário do fabricante do kits (Labtest®, Brasil), explicados resumidamente a seguir:

- A dosagem da glicose é realizada pelo método da hexoquinase, neste método a adenosina trifostato (ATP) é utilizada para fosforilar a glicose em reação catalisada pela enzima hexoquinase, na etapa subsequente a glicose fosforilada passa por nova reação catalítica com formação de NADH, a absorbância resultante é medida em 340 nm.
- Os triacilgliceróis e o colesterol total são dosados por dois diferentes ensaios enzimáticos acoplados, ambos produzindo no final o cromóforo antipirilquinoneimina, com absorbância em 500 nm.
- O HDL-C pode ser separado por precipitação seletiva das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e, após centrifugação, o colesterol ligado às lipoproteínas de alta densidade (Colesterol HDL) é determinado no sobrenadante pelo mesmo método do Colesterol Total.
- O valor de LDL-C é obtido a partir dos resultados do colesterol total (CT), triglicérides (TG) e HDL-C pela formula de Friedewald: $LDL = (CT - HDL) - (TG / 5)$.

3.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão das médias. As estatísticas realizadas por análise de variância (ANOVA) seguida por análise post-hoc (teste

de Student Newman Keuls) para avaliação dos efeitos dos diferentes suplementos e dietas entre os grupos, com nível de significância em $p < 0,05$ (Sigma Stat Software, USA).

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Unesp, campus de Araraquara, SP (Protocolo CEUA/FCF/CAR nº 18/2013, Parecer nº 03/2014). A Figura 6 mostra um esquema do desenho experimental.

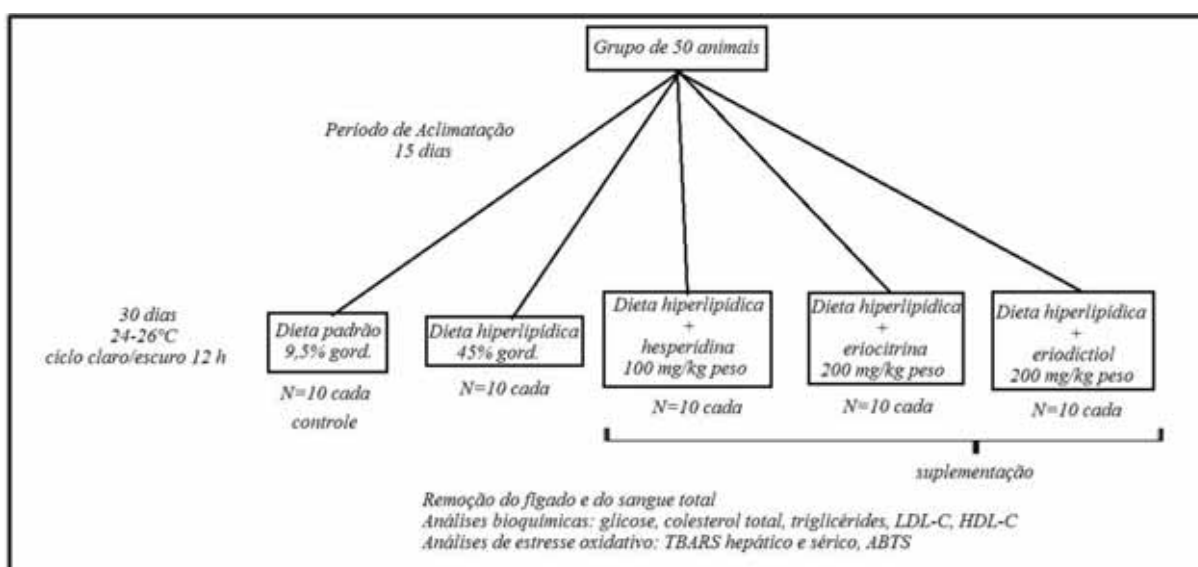


Figura 6. Desenho experimental

4. RESULTADOS

4.1 Ganho de peso e ingestão de suplementos

Na Tabela 2 é possível observar que os animais que receberam somente a dieta hiperlipídica, com ou sem suplemento, apresentaram ganho de peso significativo quando comparados aos animais que receberam uma dieta padrão, como seria o esperado, já que essa dieta possui alto teor lipídico. Mas o grupo suplementado com hesperidina não apresentou alterações no ganho de peso corporal.

O grupo alimentado com dieta padrão consumiu 29% mais dieta do que os grupos alimentados com dieta hiperlipídica. E entre os grupos que receberam dieta hiperlipídica o menor consumo alimentar foi do grupo suplementado com eriocitrina, enquanto que os grupos hesperidina e eriodictiol consumiram quantidades intermediárias. Também observamos que a ingestão dos suplementos atingiu em média 97% das doses ofertadas.

Tabela 2. Massa corporal e ingestão de suplementos de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e suplementados com hesperidina, eriocitrina e eriodictiol

Variáveis	Dieta Padrão	Dieta Hiperlipídica			
	Sem suplemento	Sem suplemento	Hesperidina	Eriocitrina	Eriodictiol
Massa corporal inicial (g)	26,7 ± 1,5	27,0 ± 1,6	27,3 ± 1,8	26,6 ± 1,4	27,2 ± 1,4
Massa corporal final (g)	31,2 ± 1,8 ^a	34,2 ± 3,5 ^b	33,2 ± 2,4 ^b	33,6 ± 1,6 ^b	34,3 ± 2,7 ^b
Ganho de massa (g)	4,5 ± 0,9 ^a	7,2 ± 3,6 ^b	5,6 ± 0,9 ^{ab}	7,0 ± 1,4 ^b	7,5 ± 2,5 ^b
Consumo alimentar (g/d)	4,6 ± 0,7 ^c	3,4 ± 0,5 ^b	3,2 ± 0,5 ^{ab}	3,1 ± 0,3 ^a	3,2 ± 0,4 ^{ab}
Ingestão de suplementos (%)	0	0	94 ± 10	97 ± 12	99 ± 11

Média ± desvio padrão. Diferenças estatísticas entre grupos detectadas por ANOVA, onde valores seguidos por letras diferentes diferem significativamente entre si (p<0,05).

4.2 Perfil bioquímico

Como esperado, é possível observar na Tabela 3 que houve aumento significativo nos valores de glicose, colesterol total, HDL-C e LDL-C nos animais que receberam a dieta hiperlipídica, com ou sem suplemento, quando comparados àqueles que receberam dieta padrão. Os animais suplementados com hesperidina apresentaram uma redução significativa de LDL-C (28%) quando comparados aos que receberam somente dieta hiperlipídica, indicando uma ação hipocolesterolêmica da hesperidina.

Tabela 3. Perfil bioquímico de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e suplementados com hesperidina, eriocitrina e eriodictiol

Parâmetros Bioquímicos	Dieta Padrão	Dieta Hiperlipídica			
	Sem suplemento	Sem suplemento	Hesperidina	Eriocitrina	Eriodictiol
Glicose (mg/dl)	302 ± 49 ^a	375 ± 59 ^b	337 ± 85 ^{ab}	332 ± 44 ^{ab}	316 ± 50 ^{ab}
Triglicerídeos (mg/dl)	81 ± 8	71 ± 14	84 ± 20	90 ± 18	88 ± 20
Colesterol total (mg/dl)	89 ± 14 ^a	138 ± 22 ^{bc}	122 ± 20 ^b	147 ± 34 ^c	157 ± 22 ^c
HDL-colesterol (mg/dl)	55 ± 9 ^a	83 ± 10 ^{bc}	77 ± 15 ^b	94 ± 22 ^c	99 ± 14 ^c
LDL-colesterol (mg/dl)	18 ± 9 ^a	40 ± 12 ^c	29 ± 9 ^b	36 ± 12 ^{bc}	40 ± 8 ^c

Media ± desvio padrão

Diferenças estatísticas entre grupos detectadas por ANOVA, onde valores seguidos por letras diferentes diferem significativamente entre si (p<0,05).

4.3 Parâmetros do estresse oxidativo

Houve um aumento de 44% nos níveis de TBARS hepático nos animais que receberam dieta hiperlipídica. Ao contrário, as concentrações de TBARS foram reduzidas em 52% no grupo suplementado com hesperidina, 59% no grupo suplementado com eriocitrina e 68% no grupo suplementado com eriodictiol. Enquanto no soro os níveis de TBARS dos animais suplementados com eriocitrina foram reduzidos em 48%, e 47% no grupo suplementado com eriodictiol em relação ao grupo que recebeu somente a dieta hiperlipídica. A capacidade antioxidante foi aumentada em todos os grupos tratados com flavanonas, em média 9,3%, quando comparados com o grupo alimentado com dieta hiperlipídica sozinha.

Tabela 4. Parâmetros do estresse oxidativo de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e suplementados com hesperidina, eriocitrina e eriodictiol

Parâmetros	Dieta Padrão	Dieta Hiperlipídica			
	Sem suplemento	Sem suplemento	Hesperidina	Eriocitrina	Eriodictiol
Peroxidação Lipídica Sérica MDA (μM)	$0,95 \pm 0,21_{ab}$	$1,19 \pm 0,64^b$	$0,81 \pm 0,17^{ab}$	$0,62 \pm 0,05^a$	$0,63 \pm 0,10^a$
Peroxidação Lipídica Hepática MDA (μM)	$0,080 \pm 0,027^a$	$0,142 \pm 0,076^b$	$0,068 \pm 0,011^a$	$0,058 \pm 0,023^a$	$0,045 \pm 0,006^a$
Capacidade antioxidante total sérica (mM)	$1,50 \pm 0,06_{ab}$	$1,46 \pm 0,07^a$	$1,56 \pm 0,08^{bc}$	$1,59 \pm 0,06^c$	$1,55 \pm 0,04^{bc}$

Media $\pm$ desvio padrão.

Diferenças estatísticas entre grupos detectadas por ANOVA, onde valores seguidos por letras diferentes diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

Comparando os animais que receberam a dieta rica em gordura saturada com aqueles que receberam a dieta padrão, observou-se um aumento da glicose (20%), colesterol total (36%), LDL-C (55%) e TBARS hepático (44%), além do aumento de peso corporal. Dessa forma, foi possível demonstrar a eficiência de dietas hiperlipídicas em causar alterações metabólicas, como já foi observado em estudos anteriores. Em seres humanos o consumo de uma dieta rica em gordura saturada é capaz de promover hiperglicemia, resistência à insulina, obesidade e dislipidemias (BUETTNER et al, 2006). Também observamos que os animais que receberam a dieta padrão apresentaram um consumo alimentar maior do que aqueles que receberam a dieta hiperlipídica, o que pode ser explicado pela existência de um mecanismo de adaptação sensível à energia da dieta presente nos roedores, sendo que quando alimentados com dieta hipercalórica há uma renovação celular no hipotálamo dos animais ajustando

rapidamente o consumo de energia, fazendo com que reduzam o consumo alimentar (GOUAZÉ et al, 2013).

O desenvolvimento da obesidade pode estar relacionado com função mitocondrial prejudicada, redução da atividade lipolítica no tecido adiposo e redução da sensibilidade à leptina ocasionados pelo consumo desse tipo de dieta (COELHO et al, 2011). Ainda em 1908, Ignatowski identificou o surgimento de aterosclerose em coelhos alimentados com uma dieta rica em gordura, sendo que todas as meta-análises realizadas até o momento confirmam que dietas ricas em ácidos graxos saturados são capazes de elevar o colesterol total e o LDL-C no soro. Além disso, sabe-se que ácidos graxos saturados são capazes de provocar uma elevação de HDL-C, como resposta a elevação do colesterol como um todo (WU; WILLETT, 2002). Camundongos da linhagem C57BL/6J alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram obesidade, hiperglicemia e resistência à insulina em estudos anteriores, sendo que foi constatada uma queda da enzima antioxidante glutathione-S-transferase A4, responsável pela remoção de trans-4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) e trans-4-oxe-2-nonenal (4-ONE) das células (IKEMOTO et al, 1996, RUSKOVSKA; BERNLOHR, 2013).

Por outro lado, a suplementação da dieta hiperlipídica com flavanonas cítricas, melhorou o estresse oxidativo, como mostrado pela redução dos níveis de TBARS no soro dos camundongos suplementados com eriocitrina e eriodictiol, e no fígado em todos os grupos suplementados. Mas o peso corporal, glicemia e lipidemia não foram alterados com a suplementação, exceto pelo grupo hesperidina, que reduziu em 28% os níveis de LDL-C, além de apresentar uma tendência de redução do peso corporal. Estudos recentes demonstraram que os polifenóis são capazes de atuar em passos importantes do metabolismo que levam ao desenvolvimento da obesidade, um destes estudos demonstrou que os polifenóis do limão foram capazes de suprimir o ganho de peso e o acúmulo de gordura através do aumento da β -oxidação peroxissomal em camundongos C57BL/6J submetidos a uma dieta

rica em gordura, supondo que os polifenóis sejam ativadores naturais do Receptor Ativado por Proliferadores Peroxissomais δ (PPAR δ) (FUKUCHI et al, 2008).

A ação hipolipemiante da hesperidina na redução do LDL-C quando comparado ao grupo que recebeu somente a dieta hiperlipídica foi demonstrada anteriormente, através de sua capacidade em inibir a secreção da apolipoproteína B (apoB), componente das frações lipídicas aterogênicas, como é o caso do LDL (BORRADAILE et al, 1999). Superprodução hepática de ApoB é característica de dislipidemias associadas com resistência à insulina (ALLISTER et al, 2008). Dessa forma, a hesperidina pode auxiliar no controle e na prevenção de dislipidemias e, conseqüentemente, na redução de risco de doenças cardiovasculares.

Em estudos anteriores demonstrou-se efeito benéfico de flavonoides no diabetes mellitus tipo 2, atribuído à capacidade de inibir a aldose redutase, regenerar as ilhotas do pâncreas, aumentar a liberação de insulina e a captação de Ca^{2+} (SANDHAR et al, 2011). Sabe-se que a manutenção de altos níveis de glicose no sangue é um dos fatores responsáveis pela instalação de diabetes mellitus tipo 2. No entanto, não foi possível observar uma melhora no perfil bioquímico da glicose quando comparamos os animais que receberam apenas a dieta hiperlipídica com aqueles que receberam suplementação com flavanonas.

Sabe-se que o excesso de gordura favorece a produção de malonil-CoA, reduzindo a eficiência de GLUT4 e desacoplando temporariamente os ciclos do ácido tricarboxílico e da β -oxidação, com formação de subprodutos metabólicos que aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio (COELHO, 2011). No presente trabalho, a peroxidação lipídica, através dos níveis de TBARS, foi utilizada como indicador do estresse oxidativo, mas vale ressaltar que o processo de peroxidação lipídica é bastante complexo, o que o torna de difícil compreensão e avaliação, dessa forma, ainda não há um método considerado ideal em sua determinação, sendo o TBARS um dos métodos mais utilizados atualmente (LIMA; ABDALLA, 2001).

As flavanonas cítricas se mostraram capazes de melhorar o estresse oxidativo nos animais alimentados com dieta hiperlipídica e de elevar a capacidade antioxidante no soro. Ainda foi possível observar que somente a eriocitrina e o eriodictiol foram capazes de reduzir a peroxidação lipídica no soro, o que pode ser explicado pela presença do grupo 3',4'-o-diidroxil no anel B do composto (BORS et al, 1990; DI MAJO et al, 2005). No caso da eriocitrina e do eriodictiol a presença deste grupo, e de múltiplos grupos hidroxila, confere maior habilidade em neutralizar e quelar metais, participar de ligações de hidrogênio e da deslocalização dos elétrons, aumentando a proteção endógena contra a peroxidação lipídica. O grupo em questão confere maior estabilidade ao radical aroxil formado a partir do flavonoide, possivelmente por participar de ligações de hidrogênio e da deslocalização dos elétrons. Para atuar como agente quelante são possíveis como sítios de ação o 5,7-hidroxil-4-cromanona e o grupo 3',4'-diidroxil (Figura 7) (BUCOLO et al, 2012; TRIPOLI et al, 2007; DUGAS et al, 2000; MORA et al, 1990).

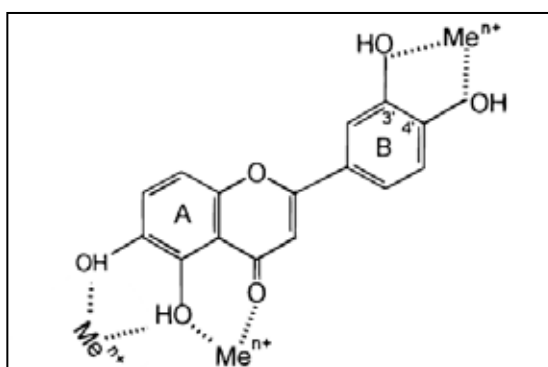


Figura 7. Possíveis sítios de quelação de metais

Por outro lado, as propriedades antioxidantes da hesperidina são atribuídas à sua estrutura química: 3''-o-hidroxi, sistema 4''-o-metoxi no anel B, configuração recíproca da dupla ligação C4'-C8' e do grupo 4-carbonil do anel C, e da configuração do grupo 5-hidroxil e a dupla ligação C5-C6 do anel A (Figura 8) (HUSSEIN; OTHMAN, 2011).

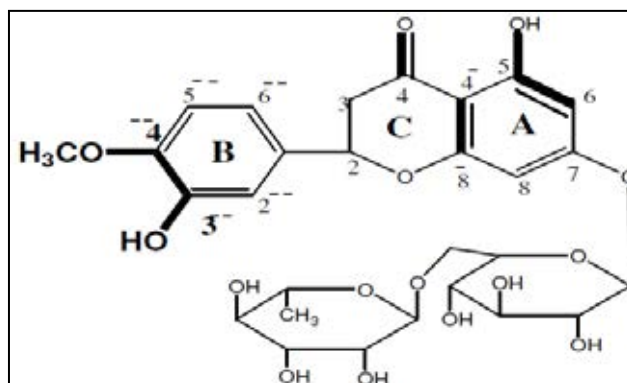


Figura 8. Estrutura da hesperidina, destacando os grupos responsáveis pela atividade

Na Figura 9, é possível observar um dos mecanismos de ação proposto para a hesperidina, como molécula doadora de hidrogênio para radicais livres, formando um radical mais estável através de ressonância (HUSSEIN; OTHMAN, 2011):

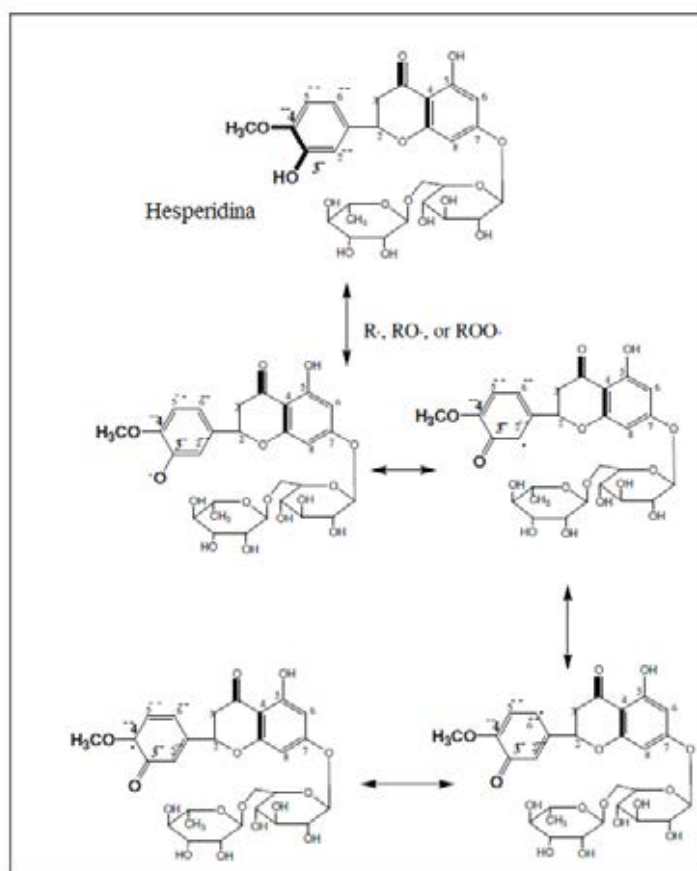


Figura 9. Mecanismo de ação proposto para a hesperidina

É importante ressaltar que estudos *in vitro* sobre a relação estrutura-atividade dos flavonoides são recorrentes, entretanto, sabe-se que no organismo estes são extensivamente degradados em uma série de ácidos fenólicos, podendo manter ou perder a capacidade de agir como antioxidante, o que torna uma análise mais detalhada dos resultados bastante difícil devido ao conhecimento limitado e à complexidade metabólica quando se trata de estudos *in vivo*, como no presente trabalho (PIETTA, 2000).

Vários estudos epidemiológicos já demonstraram que alta ingestão de flavonoides na dieta está relacionada à redução de risco de doenças cardíacas (FIRUZI et al, 2011). Alguns estudos demonstram que a ingestão de alimentos ricos em hesperidina é inversamente proporcional à incidência de doenças cerebrovasculares e que as flavanonas são fatores de proteção contra doenças crônicas (KNEKT et al, 2002). Devido às novas teorias de que os radicais livres estão envolvidos na etiologia de desordens como diabetes, aterosclerose e infarto do miocárdio, cada vez se faz mais presente a abordagem terapêutica dos antioxidantes e a visão de funcionalidade dos alimentos ricos nestes micronutrientes, que poderiam levar a benefícios fisiológicos (DEVASAGAYAM, 2004).

6. CONCLUSÃO

A incorporação dos flavonoides na dieta dos animais foi uma estratégia bem sucedida para garantir a dose dos suplementos de acordo com o planejamento experimental, e a dieta hiperlipídica foi capaz de desencadear distúrbios metabólicos necessários que auxiliaram no estudo da atividade das flavanonas.

As três flavanonas abordadas neste trabalho exibiram aumento da capacidade antioxidante e redução da peroxidação lipídica, sendo que a hesperidina exibiu também atividade hipolipemiante.

Foi possível demonstrar o potencial destas substâncias para auxiliar na prevenção do estresse oxidativo causado pelo consumo de dietas hiperlipídicas e obesidade, e no desenvolvimento de várias desordens metabólicas que envolvem o estresse oxidativo em sua patogênese.

As flavanonas apresentaram potencial de amenizar os efeitos deletérios da dieta hiperlipídica, apresentando, portanto, potencial nutracêutico para a prevenção de doenças cardiovasculares.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLISTER, E. M.; MULVIHILL, E. E.; BARRETT, P. H. R.; EDWARDS, J. Y.; CARTER, L. P.; HUFF, M. H. Inhibition of apoB secretion from HepG2 cells by insulin is amplified by naringenin, independent of the insulin receptor. *Journal of Lipid Research*, v. 49, p. 2218-2229, 2008.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para a determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Química Nova*, v. 33, n. 10, p. 2202-2010, 2210.

ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidante activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science & Technology*, v. 11, p. 419-421, 2000.

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, n. 6, Ontario, p. 591-598.

BORS, W.; HELLER, W.; MICHEL, C.; SARAN, M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* , v. 186, p. 343-355, 1990.

BUCOLO, C.; LEGGIO, G. M.; DRAGO, F.; SALOMONE, S. Eriodictyol prevents early retinal and plasma abnormalities in streptozotocin induced diabetic rats. *Biochemical Pharmacology*, v. 84, p. 88-92, Catania, 2008.

BUETTNER, R.; PARHOFER, K. G.; WOENCKHAUS, M.; WREDE, C. E.; Kunz-Schughart L. A.; SCHÖLMERICH, J.; BOLLHEIMER L. C. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *Journal of Molecular Endocrinology*, v.36, p. 485-50, 2006.

COELHO, D. F.; PEREIRA-LANCHI, L. O.; CHAVES, D. S.; DIWAN, D.; FERRAZ, R.; CAMPOS-FERRAZ, P. R.; POORTMANS, J. R.; LANCHI JUNIOR, A. H. Effect of high-fat diets on body composition, lipid metabolism and insulin sensitivity, and the role of exercise on these parameters. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 44, n. 10, p. 966-972, 2011.

DE OLIVEIRA, D.M.; DOURADO, G.K.; CESAR, T.B.; Hesperidin associated with continuous and interval swimming improved biochemical and oxidative biomarkers in rats. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, v.10, n. 1, p. 27, 2013.

DEL RÍO, J. A.; FUSTER, M. D.; GÓMEZ, P.; PORRAS, I.; GARCÍA-LIDÓN, A.; ORTUÑO, A. Citrus limon: a source of flavonoids of pharmaceutical interest. *Food Chemistry*, v. 84, p. 457-461, Murcia, 2004.

DEVASAGAYAM, T. P. A.; TILAK, J. C.; BOLOOR, K.K.; SANE, K. S.; GHASKADBI, S. S.; LELE, R. D. Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. JAPI, v. 52, p. 794-804, 2004.

DI MAJO, D.; GIAMMANCO, M.; LA GUARDIA, M.; TRIPOLI, E.; GIAMMANCO, S.; FINOTTI, E. Flavanones in Citrus fruit: Structure–antioxidante activity relationships. Food Research International, v. 38, p. 1161–1166, 2005.

DUGAS, A. J.; CASTANEDA-ACOSTA, J.; BONIN, G. C.; PRICE, K. L.; FISCHER, N. H.; WINSTON, G. W. Evaluation of the total peroxy radical-scavenging capacity of flavonoids: structure–activity relationships. Journal of Natural Products, v. 63, p. 327–331, 2000.

FIRUZI, O.; MIRI, R.; TAVAKKOLI, M.; SASO, L. Antioxidant Therapy: Current Status and Future Prospects. Current Medicinal Chemistry, v.18, p. 3871-3888, 2011.

FUKUCHI, Y.; HIRAMITSU, M.; OKADA, M.; HAYASHI, S.; NABENO, Y.; OSAWA, T.; NAITO, M. Lemon polyphenols suppress diet-induced obesity by up-regulation of mRNA levels of the enzymes involved in β -oxidation in mouse white adipose tissue. J. Clin. Biochem. Nutr., v. 43, p. 201-209, 2008.

GOUAZÉ A.; BRENACHOT, X.; RIGAULT C.; KREZYMON A.; RAUCH C.; NÉDÉLEC E.; LEMOINE A.; GASCUEL J.; BAUER S.; PÉNICAUD L.; BENANI A.; Cerebral cell renewal in adult mice controls the onset of obesity. Plos one, v. 8, n. 8, 2013.

HU, F. B.; WILLETT, W. C. Optimal diets for prevention of coronary heart disease. JAMA, v. 288, n. 20, p. 2569-2578, 2002.

HUSSEIN, M. A.; OTHMAN, S. M. Structure Activity Relationship of Antioxidative Property of Hesperidin. International Journal of Pharmaceutical Research and Development, v. 3, n.8, p. 19-29, 2011.

IKEMOTO, S.; TAKAHASHI, M.; TSUNODA, N.; MARUYAMA, K.; ITAKURA, H.; EZAKI O. High-Fat Diet-Induced Hyperglycemia and Obesity in Mice: Differential Effects on Dietary Oils. Metabolism, v.45, n. 12, p. 1539-1546, 1996.

LAY, S. L.; SIMARD, G.; MARTINEZ M. C., ANDRIANTSITOHAINA R. Oxidative Stress and Metabolic Pathologies: From na Adipocentric Point of View. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, v. 2014, 2014. 18 p.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

MORA, A.; PAYA, M.; RIOS, J. L.; ALCARAZ, M. J. Structure-activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation. Biochemical Pharmacology, v. 40, p. 793–797, 1990.

NASSER, A. L. M., DOURADO, G. K., MANJATE, D.A., CESAR, T. B. Avaliação do estresse oxidativo no sangue de consumidores habituais de suco de laranja. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, Araraquara, v. 32, n.2, p. 275-279.

NIELSEN, I. L. F. et al. Bioavailability Is Improved by Enzymatic Modification of the Citrus Flavonoid Hesperidin in Humans: A Randomized, Double-Blind, Crossover Trial. *The Journal of Nutrition*, p. 404-408, 2006.

PATEL, J. M. A Review of Potential Health Benefit of Flavonoids. *Lethbridge Undergraduated Reserch Journal*, India, v. 3, n. 2, 2008, 5 p.

PATIL, A. B.; JADHAV, A. S. Flavonoids na antioxidant: a review. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences Research and Development*, India, v. 01, n. 2, p. 07-20, 2013.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, Segrate, 2000.

Knekt, P.; Kumpulainen, J.; Järvinen, R.; Rissanen, H.; Heliövaara, M.; Reunanen, A.; Hakulinen, T.; Aromaa, A. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 76, p.560-568, 2002.

KOHN H. I.; LIVERSEDGE M. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 82, p. 292-300, 1944.

KROHN, R.I. The colorimetric detection and quantitation of total protein. Current Protocols in Cell Biology, Rockford, 2011.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biology & Medicine, v. 20, n.7, p. 933-956, 1996.

RUSKOVSKA, T.; BERNLOHR, D. A. Oxidative stress and protein carbonylation in adipose tissue-Implications for insulin resistance and diabetes mellitus. Journal of Proteomics, v. 92, p. 323-331, 2013.

SANDHAR, H. K.; KUMAR, B.; PRASHER, S.; TIWARI, P.; SALHAN, M.; SHARMA, P. A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. Internationale Pharmaceutica Scientia, v. 1, n. 1, p. 25-41, 2011.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. Química Nova, v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.

STEWART, L.K.; SOILEAU, J.L.; RIBNICKY, D.; WANG, Z.Q.; RASKIN, I; POULEV, A.; MAJEWSKI, M.; CEFALU, W.T.; GETTYS, T.W. Quercetin transiently increases energy expenditure but persistently decreases circulating markers of inflammation in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. Metabolism. v. 57, n.7, p. 39-46, 2008.

TRIPOLI, E.; LA GUARDIA, M.; GIAMMANCO, S.; DI MAJO, D.; GIAMMANCO, M. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chemistry*, v. 104, p. 466-479, Palermo, 2007.

WOLFE, K. L.; LIU, R. H. Structure-Activity Relationships of Flavonoids in the Cellular Antioxidant Activity Assay. *J. Agric. Food Chem.*, v. 56, p. 8404–8411, 2008.

8. ANEXOS

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 18/2013

Interessada: PAULA SOUZA FERREIRA

Orientadora: Profª Drª Thaís Borges César

Projeto: Estudo da Atividade antioxidante e anti-inflamatória de flavonóides cítricos em camundongos submetidos a dieta indutora do estado pró-inflamatório

Parecer nº 03/2014 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, reunida em 19 de março de 2014, analisou o pedido de inclusão da graduanda Nathália Rafaela Meirinho Espina como colaboradora da equipe de pesquisa do protocolo para uso de animais na pesquisa: "Estudo da Atividade antioxidante e anti-inflamatória de flavonóides cítricos em camundongos submetidos a dieta indutora do estado pró-inflamatório", apresentado pela Pós-graduanda PAULA SOUZA FERREIRA, sob orientação da Profª Drª Thaís Borges César, do Departamento de Alimentos e Nutrição desta Faculdade.

Diante da justificativa apresentada, foi verificado que o protocolo está estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, sendo esta Comissão FAVORÁVEL à alteração.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em JULHO de 2014, em formulário para este fim.

Araraquara, 25 de março de 2013.



Prof. Dr. CARLOS CÉSAR CRESTANI
Coordenador da CEUA

9. DADOS FINAIS

Araraquara, 17 de dezembro de 2014.

NATHÁLIA RAFAELA MEIRINHO ESPINA
ALUNA

De acordo,

PROF^a. DR^a. THAIS BORGES CESAR
ORIENTADORA