

Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” - UNESP
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição
Ciências Nutricionais

David Michel De Oliveira

**Efeito da glicosil hesperidina no perfil bioquímico e
oxidativo em ratos submetidos a exercício contínuo e
intervalado**

Araraquara - SP

2012

Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição

Ciências Nutricionais

David Michel De Oliveira

Efeito da glicosil hesperidina no perfil bioquímico e oxidativo em ratos submetidos a exercício contínuo e intervalado

Orientador: Dr^a. Thais Borges César

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Alimentos e Nutrição.

Ficha Catalográfica

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

Oliveira, David Michel de
O48e Efeitos da glicosil hesperidina no perfil bioquímico e oxidativo em
ratos submetidos a exercício contínuo e intervalado / David Michel de
Oliveira. – Araraquara, 2012
69 f.

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

1. Glicosil hesperidina. 2. Flavonóides cítricos. 3. Natação. 4.
Biomarcadores séricos. 5. Antioxidantes. 6. Ratos. I. César, Thais Borges,
orient. II. Título.

CAPES: 50700006

Folha de Aprovação

Prof. Dra. Thais Borges César

Prof. Dra. Ellen Cristini de Freitas

Prof. Dra. Nancy Preising Aptekmann

Prof. Dr. Enrico Fuini Puggina

Prof. Dr. Jair Garcia Rodrigues Junior

Araraquara, 31 de agosto de 2012.

Dedicatória

- A Deus, soberana energia que nos conforta e nos apoia.
- Aos meus pais, Donizete e Leny pelo apoio incondicional.
- A minha esposa, Lizandra e as filhas, Ana Laura e Lavínia pelo carinho, compreensão e amor.
- A minha sogra (Neire) e cunhados (Renan e Fernanda) pelo apoio indireto a mim e direto a nossa família.
- Ao amigo e irmão Daniel dos Santos pela força e amizade.
- Aos bons profissionais de Educação Física e Nutrição que zelam pela saúde humana através da orientação de uma alimentação equilibrada e a prática correta de atividade física.

Agradecimentos

- A Prof.^a Dr.^a.Thais Borges César por ter me acolhido em momento que mais necessitei e pela oportunidade de crescimento e aprendizado.
- A Prof.^a Dr.^a.Maria Jacira, por ter me aceitado no programa de pós-graduação
- A Pós-graduanda Grace Kelly Zanotti Simões Dourado pelas sugestões e empenho no desenvolvimento do trabalho.
- Ao Prof. Ms. Daniel Dos Santos, na luta por um ensino superior de qualidade.
- Ao Prof. Cassiano Merussi Neiva, por acreditar sempre no meu trabalho e ter aberto as portas da carreira acadêmica para que eu tenha entrado.
- Aos pós-graduandos com quem tive contato pela transferência de experiência e momentos de conhecimento e sabedoria.
- A técnica do Laboratório de Nutrição Ana Lúcia M. Nasser pelas análises laboratoriais realizadas.
- As secretárias Laura e Cláudia, que sempre no momento que precisei tiveram presteza e perspicácia no atendimento.
- À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP - Araraquara - SP.
- À Universidade de Franca, pelo apoio laboratorial e coleguismo em troca de horários para cumprimento desta missão, e em especial a técnica de Laboratório Marta Augusto pela ajuda operacional e dedicação em todo experimento.
- A Empresa Hayashibara Company Ltd. - Japão, pela doação da α -glicosil hesperidina para a realização deste trabalho.

Epígrafe

“O homem erudito é um descobridor de fatos que já existem - mas o homem sábio é um criador de valores que não existem e que ele faz existir”
Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
Introdução	11
Objetivo Geral	13
CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA	
1 Hesperidina e glicosil hesperidina: estrutura, absorção e metabolismo.....	15
1.2 Efeitos isolados da hesperidina no perfil bioquímico e oxidativo.....	19
2. Treinamento físico e perfil bioquímico.....	23
3. Treinamento físico e suplementação de flavonoide frente ao perfil bioquímico.....	26
4. Treinamento físico, estresse oxidativo e suplementação com flavonoides.....	30
REFERENCIAS	34
CAPÍTULO 2	
Glucosyl hesperidin combined with continuous and interval swimming improves biochemical and oxidative biomarkers in rats.....	44
ANEXOS	67

Resumo

Foram estudados os efeitos da natação contínua e intervalada combinada à suplementação com glicosyl-hesperidina (G-hesperidina) sobre os biomarcadores bioquímicos e estresse oxidativo em ratos. Os animais (n = 60) foram aleatoriamente divididos em seis grupos, como segue: controles negativos (C) e positivo (CH) para a suplementação com G-hesperidina; e natação contínua ou intervalada, sem (CS e IS, respectivamente) ou com G-hesperidina (CSH e ISH, respectivamente). A G-hesperidina foi administrada por método de gavagem durante quatro semanas (100 mg/kg de massa corporal) juntamente com os exercícios. A natação contínua foi realizada durante 50 min com uma carga de 5 a 8% da massa corporal da primeira à quarta semana, e a natação intervalada foi realizada durante 50 min, com 1 min de natação seguido por 2 min de repouso, com uma carga de 10% a 15, 20 e 25% do peso corporal que foi aumentada da primeira à quarta semana. Foi observado um declínio contínuo da glicose sérica em todos os grupos em relação ao controle negativo, como se segue: C (100%)> CH (97%)> CS (94%)> CSH (91%, p <0,05)> IS (87%, p <0,05)> ISH (80%, p <0,05). Além disso, a natação contínua ou intermitente associada à G-hesperidina resultou em menor colesterol total (-16%, p <0,05), LDL-C (-50%, p <0,05) e triglicerídeos (-19%, p <0,05), e aumentou o HDL-C (48%, p <0,05). Além disso, a G-hesperidina aumentou a capacidade antioxidante nos animais tratados com natação contínua (183%, p <0,05) e reduziu a peroxidação lipídica na natação intervalada (-45%, p <0,05). Em conclusão, a suplementação com G-hesperidina, isolada ou em combinação com a natação contínua ou intervalada, melhorou o perfil bioquímico e os biomarcadores antioxidantes no soro sanguíneo dos ratos, sugerindo que a utilização de flavanonas pode aumentar os benefícios à saúde promovidos pelos exercícios.

Palavras-chave: glicosil-hesperidina, flavonóides cítricos, natação, biomarcadores séricos, antioxidantes, ratos.

Abstract

We investigated the effects of continuous and interval swimming with glucosyl-hesperidin (G-hesperidin) supplementation on the biochemical and oxidative biomarkers in rats. The animals (n=60) were randomly divided into six groups as follows: negative (C) and positive controls (CH) for G-hesperidin supplementation; and continuous or interval swimming without (CS and IS, respectively) or with G-hesperidin supplementation (CSH and ISH, respectively). G-hesperidin was given by gavage for four weeks (100 mg/kg body mass) together with the exercises. Continuous swimming was performed for 50 min with a load from 5 to 8% of body weight from the first to fourth week, and interval swimming training was performed for 50 min with 1 min of swimming followed by 2 min of resting carrying a load from 10% to 15, 20 and 25% from the first to fourth week. A continuous decline of serum glucose was found with a combined effect of G-hesperidin and swimming as follows: C (100%) > CH (97%) > CS (94%) > CSH (91%; $p<0.05$) > IS (87%; $p<0.05$) > ISH (80%; $p<0.05$). Moreover, continuous or intermittent swimming with G-hesperidin supplementation resulted in lower total cholesterol (-16%; $p<0.05$), LDL-C (-50%; $p<0.05$) and triglyceride levels (-19%; $p<0.05$), as well as higher HDL-C levels (48%; $p<0.05$). Furthermore, G-hesperidin enhanced the antioxidant capacity with continuous swimming (183%; $p<0.05$) and lowered lipid peroxidation with interval swimming (-45%; $p<0.05$). In conclusion, G-hesperidin supplementation alone or in combination with swimming exercise protocols, including both continuous and interval swimming, improved the biochemical profile and antioxidant biomarkers of the rats, thereby suggesting that the use of flavanones may enhance the health benefits promoted by these exercises.

Keywords: glucosyl-hesperidin, citrus flavonoids, swimming, blood serum biomarkers, antioxidant, rats.

1. Introdução

A combinação entre uma dieta saudável e o treinamento físico tem sido amplamente recomendada com objetivo de reduzir os fatores de risco para doenças crônicas degenerativas. Fatores como o controle da glicemia plasmática, do perfil lipídico, da pressão arterial e manutenção do peso corporal tem sido associados com a ingestão equilibrada e com a prática regular de exercícios físicos (INSTITUTE OF MEDICINE FOOD AND NUTRITION, 2005, PHYSICAL ACTIVITY AND PUBLIC HEALTH, 2007, AMERICAN COLLEGE SPORT MEDICINE 2009).

Estudos anteriores têm evidenciado que compostos bioativos, como os flavonoides encontrados nas frutas cítricas, apresentam propriedades antiinflamatória, hipolipemiente, hipoglicêmica e antioxidante, e que podem contribuir na redução do risco de doenças crônicas. Entre eles, podemos citar a hesperidina e naringina, que tem sido estudados *in vivo* e *in vitro*. Entretanto, por possuírem baixa solubilidade foi desenvolvida uma forma sintética da hesperidina, denominada glicosil hesperidina (G-hesperidina), que apresenta alta solubilidade e biodisponibilidade, e, portanto, é adequado para estudos *in vivo* (HIJIYA et al., 1991, WILCOX, et al., 2001, GARG et al., 2001, YAMADA et al., 2006, JUNG U. J et al., 2006, YAMAMOTO et al., 2008).

Nos alimentos, a hesperidina é encontrada na forma glicosilada, e sua conversão a hesperitina, forma aglicona, ocorre no lúmen intestinal por ação da enzima β -glicosidase de bactérias. Posteriormente, nos enterócitos a hesperitina sofre conjugação com glicuronídeos e sulfatos,

sendo transportada via circulação entero-hepática ao fígado, local onde ocorre a transformação em metabólitos ativos (NIELSEN et al., 2005 , PRETONELLA et al., 2008).

Na literatura atual vários estudos tem avaliado o impacto de diferentes tipos de protocolos de treinamento físico frente ao controle da obesidade e indicadores bioquímicos relacionados à prevenção de doenças crônicas. Tem sido estudadas variáveis como o modalidade, o volume e a intensidade do exercício, que podem interferir na magnitude dos resultados obtidos (KRAUS et al, 2002, CHEIK N. et al., 2006, GUERRA et al. 2007, SENE-FIORESE et al., 2008, BEXFIELD et al.,2009, BOTEZELLI et al., 2011, HUANG et al., 2011, FRAJACOMO et al., 2012, SANAL, ARDIC E KIRAC 2012).

Todavia, o treinamento físico quando praticado de forma prolongada e extenuante pode aumentar o estresse oxidativo levando a processos inflamatórios e danos musculares (URSO E CLARKSON 2006 e POWERS, NELSON E HUDSON, 2011). Outros estudos tem evidenciado que a suplementação com alguns tipos de flavonóides, incluindo os cítricos, podem ter efeitos antioxidantes e atenuadores de marcadores do estresse oxidativo perante o exercício físico em modelo experimental (KATO et al., 2000, MINATO et al., 2003, MIYAKE et al., 2003, MORILLAS-RUIZ et al., 2006, MURASE, et al.,2008, HALEAGRAHARA et al.,2009, YU et al., 2010).

Assim, existe grande interesse no estudo da suplementação com compostos bioativos, cuja associação com o treinamento físico possam melhorar o controle do perfil bioquímico, o estresse oxidativo e o

proprio desempenho físico (SZMITKO E VERMA 2005, MURASE et al.,2006a, MURASE et al 2006b, VELAYUTHAM, BABU E LIU 2008, CHOI et al., 2010, SMITH et al., 2010, SOARES FILHO, CASTRO E STAHLSCHMIDT, 2011).

O composto G-hesperidina apresenta uma gama de atividades biológicas que podem contribuir de forma significativa para o controle das lipoproteínas circulantes, além de apresentarem propriedades antioxidantes. Entretanto, pouco se sabe sobre sua associação com o treinamento físico, e, por isso é possível que este composto combinado com o exercício possa promover maior eficácia no controle de perfil bioquímico e atenuar marcadores do estresse oxidativo.

Baseados nas informações da literatura recente, no presente estudo foi analisada a interação da G-hesperidina com exercícios contínuo e intervalado em ratos submetidos a natação, buscando-se testar as seguintes hipóteses: (1) melhora das variáveis bioquímicas no soro sanguíneo dos animais, e (2) a redução da taxa de estresse oxidativo causado pelo exercício.

2. Objetivo Geral

Avaliar o efeito da suplementação com glicosil hesperidina combinada com protocolos de treinamento físico contínuo e intervalado sobre perfil bioquímico e oxidativo em modelo experimental.

CAPÍTULO 1

1. Hesperidina e glicosil hesperidina: estrutura, absorção e metabolismo

Estudos anteriores têm evidenciado que as frutas cítricas contêm compostos biologicamente ativos que desempenham funções anti-inflamatórias, antioxidantes, hipolipidêmicas, hipoglicêmicas e anticarcinogênicas em modelos *in vivo* e *in vitro*. Tais efeitos têm sido atribuídos à vitamina C, aos carotenoides e às flavanonas, como a naringina e hesperidina (KUROWSKA et al., 2000; KUROWSKA E MANTHEY, 2004; GORISTEIN et al., 2007; VINUEZA, FARIA E CESAR 2008; TITTAL et al., 2009; JAIN E PARMAR, 2011; AKIYAMA et al., 2010).

A hesperidina é um tipo de flavonoide cítrico, classificado como uma flavanona glicosídica, cuja estrutura química é constituída pela hesperitina (forma aglicona) ligada aos açúcares glicose e ramnose na posição 7 (YAMADA, et al., 2006). Está presente naturalmente em frutas cítricas, principalmente no suco de laranja, e sua concentração pode variar de acordo com o solo, clima, variedade da fruta e tipo de suco (MANTHEY et al., 2001). Apesar de ser reconhecida a importância biológica dos flavonóides cítricos, ainda não existe uma recomendação para sua ingestão (KNEKT et al., 2002).

São atribuídas múltiplas atividades biológicas a hesperidina, tais como anti-inflamatória, antiviral, hipoglicêmica, hipolipidêmica, antitumoral, antioxidante e outras (BENAVENTE-GARCIA e CASTILLO, 1997; BERKARDA et al., 1998; GARG et al., 2001;

MATSUMOTO et al., 2004, BENAVENTE-GARCIA e CASTILLO, 2008). Contudo, apesar de apresentar muitos efeitos benéficos, a hesperidina é pouco solúvel em água (<0,01%), revelando baixa biodisponibilidade para o organismo.

Em 1991, Hijiya et al., patentearam uma forma sintética da hesperidina, denominada glicosil hesperidina (G-hesperidina), obtida por transglicosilação com ciclodextrina glicoranotranferase da bactéria *Bacillus stearothermophilus*. A G-hesperidina sintética é dez mil vezes mais solúvel que a hesperidina de ocorrência natural, e apresenta as mesmas atividades biológicas e metabolismo que a forma natural (YAMADA et al., 2006). A estrutura química da hesperidina, G-hesperidina e hesperitina podem ser visualizadas na figura 1.

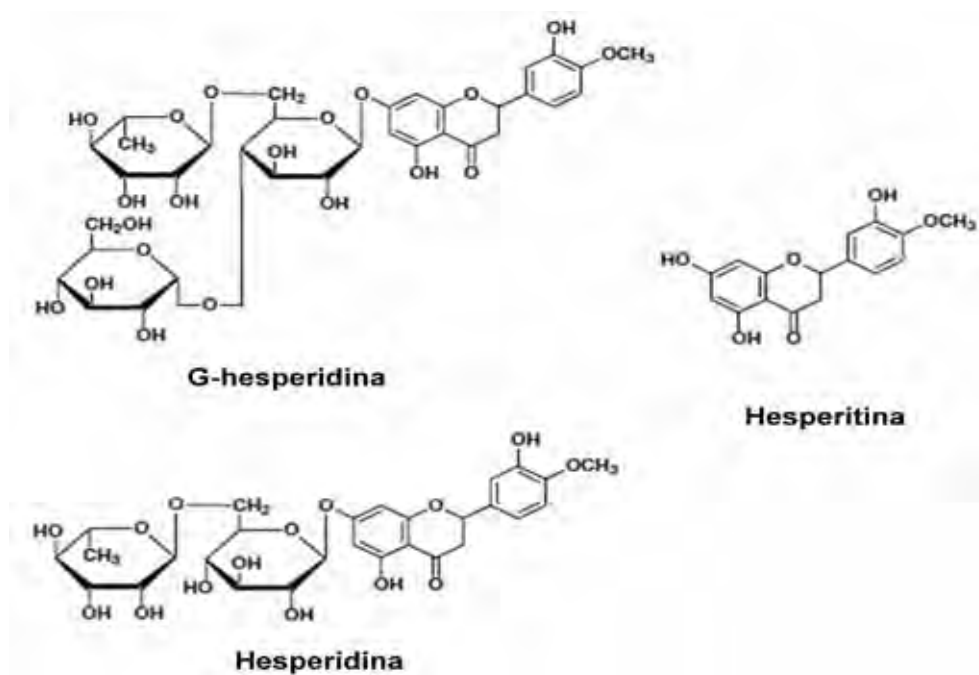


Figura 1. Estrutura química da G-Hesperidina, hesperidina e hesperitina (YAMADA et al., 2006).

O mecanismo de absorção, metabolismo e ação dos flavonoides cítricos no organismo ainda não estão totalmente esclarecidos, entretanto estudos demonstram, de forma geral, a absorção dos flavonoides ocorre no intestino delgado na presença de enzimas intestinais e por molécula de açúcar ligada ao composto, envolvendo transportadores de glicose dependentes de sódio 1 (SGLT 1) (ERLUND, 2004, YAMADA et al., 2006).

Estudos indicam que após a ingestão, a hesperidina é hidrolisada pela microflora intestinal e absorvida no cólon em sua forma aglicona (hesperitina) sendo que as principais enzimas envolvidas na hidrólise são as hidrolases (floridina hidrolase lactase (LPH) e glicosidases (α -glicosidases, glicosidade citosólica (CBG) (MANACH et al., 2003, ERLUND, 2004). Posteriormente, na parede intestinal, a hesperitina sofre reações de conjugação, tais como glicuronidação e metilação (MANACH et al., 1998; SPENCER et al., 1999), forma na qual é conduzida pelo sistema-porta dos enterócitos ao fígado, onde sofrerá outras reações, como metilação, sulfatação e glicuronidação, formando uma variedade de metabólitos (SCALBERT et al., 2002, MATSUMOTO et al., 2004).

É importante ressaltar que uma parte da hesperidina absorvida é convertida em hesperitina, entretanto a outra parte da hesperidina que não sofre deglicosilação é parcialmente conjugada, e imediatamente liberada da circulação e excretada sob a forma de metabólitos na urina sem que haja reabsorção renal tubular (MATSUMOTO et al., 2004; YAMADA et al., 2006,). Finalmente, os metabólitos (hesperitina-

glicuronídeos e sulfoglicoronídeos) podem ser excretados pela bile ou conduzidos aos tecidos periféricos pelo sistema sanguíneo, onde poderá desempenhar as atividades funcionais no organismo, amplamente descritas na literatura (HEIM et al., 2002).

Um estudo pioneiro realizado por Yamada et al. (2006) comparou-se a absorção e a excreção urinária da G-hesperidina em relação à hesperidina em ratos. Os resultados mostraram que G-hesperidina apresenta o mesmo perfil de metabólitos excretados na urina que a hesperidina, e que a G-hesperidina é mais eficientemente absorvida, devido à sua alta solubilidade. Os autores sugerem ainda que quando oralmente administrada a G-hesperidina é inicialmente hidrolisada pelas enzimas α -glicosidases no intestino delgado, onde ocorre a liberação da hesperidina e subsequentemente é hidrolisada a hesperitina pelas β -glicosidases por bactérias intestinais.

1.2 Efeitos isolados da hesperidina no perfil bioquímico e oxidativo

O aumento da produção hepática de glicose e a diminuição da síntese de glicogênio contribuem para a hiperglicemia no diabetes tipo 2. A hesperidina, por sua vez, parece promover o controle da glicose plasmática através da modulação das enzimas glicoquinase e glicose 6-fosfatase (JUNG et al., 2006). O fígado exerce uma importante função de produção de energia através da gliconeogênese, a hesperidina altera a expressão dos genes que codificam as enzimas reguladoras na quebra da glicose e gliconeogênese hepática, no qual pequenas modificações nestes genes podem melhorar o controle da homeostase da glicose plasmática (LIU et al., 2006).

A hiperglicemia provoca um aumento do estresse oxidativo ocasionando a destruição de células pancreáticas, enquanto a hesperidina promove efeito antioxidante neutralizando o dano oxidativo em animais diabéticos. Isto efeito parece recuperar as ilhotas pancreáticas, reativando a liberação de insulina e diminuindo os níveis de glicose plasmáticas, além de alterar o conteúdo de glicogênio nos tecidos diabéticos (JUNG et al., 2004, AKIYAMA et al., 2010).

Vários estudos tem descrito os mecanismos hipoglicêmicos da hesperidina (JUNG et al. 2006, LIU et al., 2008, AKIYAMA et al., 2010). Em um estudo com suplementação de hesperidina em modelo experimental foi demonstrado aumento significativo na quantidade de

glicotransportadores (GLUT 2 e GLUT4) que facilitam a entrada de glicose na célula juntamente com a insulina. De acordo com o autor, este mecanismo parece ter uma importante contribuição na diminuição da glicose plasmática induzida pelo flavonóide (JUNG et al.,2006). Outro achado importante na ação da hesperidina sobre a glicose plasmática seria sua interferência no aumento da expressão gênica da adiponectina, uma proteína metabolicamente ativa secretada pelos adipócitos que auxilia na regulação da glicose e diminuição dos lipídes plasmáticos (LIU et al., 2008).

Há considerável interesse na investigação da hesperidina e seus metabólitos como reguladores do metabolismo do colesterol, tendo particular importância na terapêutica para o tratamento de dislipidemias (KIM et al., 2003). A hesperidina age de forma eficiente na diminuição e absorção intestinal do colesterol e aumento de sua excreção fecal de esteróis contribuindo para sua eliminação (SELVARAJ E PUGALENDI, 2012).

A ação da hesperidina na diminuição do colesterol sérico e hepático está relacionada com a ação inibitória da hesperitina sobre a HMG-CoA redutase e colesterol aciltransferase que fazem a esterificação e absorção do colesterol em nível hepático, levando a menor oferta intracelular de colesterol (BOK et al.1999, WILCOX et al. 2001, NIELSEN et al. 2002, RADER et al. 2009). Por outro lado, a diminuição do LDL pode também estar associada aumento da expressão do gene que codifica o receptor de LDL estimulado pela hesperitina. De acordo com o estudo, 200 mmol/L de hesperitina aumenta os níveis do mRNA do

receptor de LDL de 3,6 a 4,7 vezes em relação ao controle não tratado (MORIN et al., 2008).

Alguns estudos demonstraram os benefícios da suplementação de flavononas cítricas para reduzir os danos de dietas ricas em gorduras hipercalóricas e hiperlipídicas, indicando que a hesperidina promove efeitos hipolipemiantes desejáveis (MIWA et al. 2005, GORINSTEIN et al. 2007, VINUEZA, FARIA E CESAR, 2008). Os efeitos protetores da hesperidina na hipercolesterolemia e esteatose hepática foram examinados em ratos tratados com dieta rica em colesterol. Houve redução das concentrações séricas de colesterol total, da síntese e absorção de colesterol, e as concentrações de colesterol nas fezes foram maiores nos ratos suplementados com hesperidina (WANG et al., 2011).

Outro aspecto importante evidenciado em estudos com a suplementação de hesperidina são seus efeitos antioxidantes sendo seus principais mecanismos a capacidade de remoção de radicais livres, a redução da transferência de elétrons e superóxidos e o aumento de enzimas antioxidantes (GARG et al., 2001). O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre a atividade antioxidante e a produção de espécies reativas de oxigênio do organismo, sendo que uma das suas principais consequências é a peroxidação lipídica. Esta provoca diversas alterações nas organelas celulares, diminuindo a sinalização da membrana e aumentando a formação de subprodutos como o malonaldeído, podendo induzir a processos inflamatórios e a apoptose celular, que estão associados ao surgimento de doenças imunológicas, inflamatórias e

degenerativas, além de participar do processo do envelhecimento (KAWAGUCHI, MATSUMOTO, KUMAZAWA 2011).

A capacidade antioxidante dos flavonoides está diretamente relacionada à sua estrutura química, e no caso da hesperidina a presença de um grupo hidroxila na posição 3 do anel B de sua estrutura pode ser responsável pela capacidade de remoção de radicais gerados a partir de peroxidação e íons de hidrogênio. Esta estrutura é capaz de proteger as células sendo portanto um agente preventivo promissor contra as patologias relacionadas aos radicais livres. Por esta razão, há interesse atualmente em investigar a hesperidina em diversas situações experimentais (WILMSEN, SPADA e SALVADOR, 2005).

O estresse oxidativo promove alterações no tecido endotelial diminuindo a disponibilidade de óxido nítrico promovendo eventos hipertensivos. A suplementação de glicosil hesperidina parece melhorar a produção de óxido nítrico responsável pela dilatação arterial e aumento de enzimas antioxidantes. Esses resultados sugerem que a hesperidina apresente atividade hipotensiva e de proteção ao tecido vascular em animais hipertensivos (YAMAMOTO et al., 2008, YAMAMOTO, SUZUKI E HASE 2008, RIZZA et al., 2011). Outro estudo mostrou que, em cultura de células e em animais, a hesperidina aumentou as enzimas antioxidantes, como catalase e superóxido dismutase, responsáveis pela redução dos radicais livres e aumento da capacidade antioxidante (WELMSEN et al., 2005).

2. Treinamento físico e perfil bioquímico

Inúmeros relatos científicos atuais, utilizando modelo experimental e humano vem sendo realizados com diferentes tipos de protocolos de treinamento físico tanto contínuo quanto intervalado e suas respostas frente ao controle da obesidade e indicadores bioquímicos, porém variáveis como o modalidade, volume e intensidade do exercício físico interferem na magnitude dos resultados (KRAUS et al, 2002, CHEIK et al., 2006, GUERRA et al., 2007, BOTEZELLI et al., 2011, HUANG et al., 2011, SANAL, ARDIC E KIRAC 2012)

O exercício contínuo pode ser caracterizado pela não interrupção de movimentos e longa duração, utiliza predominantemente os ácidos graxos como fonte de energia. Nos minutos iniciais de exercício, ocorre liberação de hormônios catecolamínicos aumentando a atividade da enzima lípase hormônio sensível via AMP cíclico induzindo ao processo de lipólise e aumento da capacidade oxidativa. A lipólise resulta na mobilização de triglicerídeos dos tecidos intramuscular e adiposo, que são convertidos a ácidos graxos livres e glicerol, fornecendo energia para o trabalho muscular. Os ácidos graxos livres são transportados pela albumina ao tecido muscular, e o glicerol é conduzido para fígado onde será utilizado como precursor da gliconeogênese (JEPPESEN E KIENS, 2012).

Um dos principais fatores de risco para o surgimento de doenças cardiovasculares são as dislipidemias podendo ser consequência da inatividade física e consumo inadequado de alimento contendo níveis

elevados de colesterol, portanto a prática regular de exercício físico principalmente de caráter contínuo e aeróbio é considerado uma estratégia fundamental na prevenção e tratamento destas doenças, por melhorar os níveis de aptidão física, aumento da capacidade oxidativa, diminuir o volume do adipócito, controlar a glicemia e promover a modulação de lipoproteínas plasmáticas (DURSTINE et al., 2002, GUERRA et al., 2007).

De um modo geral, o treinamento intermitente ou intervalado se baseia no modelo da realização de esforço físico com sucessivos períodos de exercício, alternados com períodos de pausas vantajosas ou regenerativas, sobretudo, também pode ser caracterizado por utilizar a glicose como fonte de energia predominante (LUCAS, DENADAI E GRECO 2009).

O treinamento intermitente é mais efetivo no controle da glicemia devido a sua maior ação do transporte da glicose para o músculo em atividade e aumento significativo da enzima proteína quinase que está ligada ao aumento do número de glicotransportador GLUT-4 sugerindo sua eficiência no controle do metabolismo da glicose (FUJII et al., 2007, FUJIMOTO et al., 2010).

Durante o trabalho intenso ocorre a redução de glicogênio muscular, contudo os ácidos graxos torna-se o principal combustível no período de recuperação ocasionado pelo aumento do consumo de oxigênio, além do mais ocorre o aumento da síntese de albumina plasmática, podendo contribuir para o transporte de lipídes em roedores diminuindo as subfrações plasmáticas de colesterol, contribuem para controle do perfil

lipídico (SENE-FIORESE et al., 2008, BEXFIELD et al., 2009, BOTEZELLI et al., 2011, FRAJACOMO et al., 2012).

3. Treinamento Físico e suplementação com flavonoides frente ao perfil bioquímico

O treinamento físico e a dieta equilibrada rica em frutas e hortaliças conseqüentemente composta por flavonoides, têm sido amplamente investigados com objetivo de diminuir fatores de risco de doenças cardiovasculares e promover o saúde em humanos (AMERICAN COLLEGE SPORT MEDICINE 2009, EGERT E RIMBACH 2011).

Ainda que tal recomendação seja divulgada na literatura científica de forma exaustiva, existe escassez de estudos sobre o treinamento físico e sua combinação com a suplementação de flavonoides cítricos como a hesperidina. Entretanto, demais subclasses de flavonoides combinados com treinamento físico vem sendo pesquisados para verificar seus efeitos em variáveis bioquímicas e metabólicas (SZMITKO E VERMA 2005, MURASE et al., 2006a, MURASE et al 2006b, VELAYUTHAM, BABU E LIU 2008, CHOI et al., 2010, SMITH et al., 2010, SOARES FILHO, CASTRO E STAHLSCHMIDT 2011).

As catequinas são os principais compostos polifenólicos encontrados principalmente no chá verde, exercem atividades biofuncionais incluindo a ação hipolipemiante através de diversos mecanismos, tais como; inibição de enzimas-chave envolvidas na biossíntese do colesterol no fígado, regulação hepática de receptores do LDL e redução da absorção de lipídes intestinais melhorando assim o perfil lipídico, tais ações similares com a hesperidina (VELAYUTHAM, BABU E LIU 2008).

A combinação de extrato de chá verde e treinamento físico foram testados em modelo experimental com objetivo de verificar seus efeitos na estimulação da oxidação de lipídes durante exercício contínuo em esteira rolante em período experimental de 10 semanas em sessões de esforço até a exaustão. Ocorreu diminuição nos parâmetros bioquímicos como triglicérides e glicose, aumento da concentração de glicogênio muscular e da enzima malonil-coA responsável pela atividade oxidativa, diminuição significativa nos níveis de lactato e melhora em 30% da capacidade de consumo de oxigênio nos animais suplementados com o flavonoide, estes resultados sugerem que esta melhora do desempenho foi mediada pelo aumento da disponibilidade metabólica de ácidos graxos durante o exercício desencadeada pela suplementação crônica de catequinas (MURASE et al., 2006).

Foram estudados os efeitos da suplementação em longo prazo de catequinas enriquecidas na ração e combinada com treinamento físico aquático durante 15 semanas em sessões de exercício com duração de 30 minutos e periodicidade de três vezes por semana em animais alimentados com dieta obesogênica. A combinação do protocolo de natação associada ao flavonoide causou diminuição da gordura visceral, promoveu controle de lipídes plasmáticos, e aumento da oxidação lipídica, reduzindo assim os efeitos da dieta hiperlipídica (MURASE et al., 2006b).

O café contém diversos compostos flavonoides como demais classes das catequinas (epigallocatequina e epicatequinas 3-galatos), além disso, em sua composição contém cafeína que é amplamente aceita pelo seu

efeito lipolítico e termogênico no qual também vem sendo usado como suplemento associado ao exercício regular diante do perfil lipídico plasmático e perda de pesos em mulheres (SMITH et al., 2010).

O consumo moderado de vinho tinto tem mostrado uma relação inversa com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, por conter compostos polifenóis como catequinas e kempeferol que apresentam atividades antioxidantes somados aos efeitos do álcool que atua na síntese de colesterol hepático e aumento da atividade da lipoproteína lipase elevando a formação de HDL em humanos (SZMITKO E VERMA 2005). Em pesquisa experimental foram verificados os efeitos de 10 semanas de suplementação com vinho tinto contendo 12% álcool combinada com treinamento físico e seus efeitos nos níveis séricos de HDL. Durante 5 vezes por semana os animais receberam quantidades de 3,7 ml/kg de vinho por gavagem intragástrica juntamente com protocolo contínuo em esteira rolante com intensidade moderada entre 40 a 70% da capacidade máxima de esforço, com aumento progressivo da duração, iniciando com 20 perdurando até 60 minutos de treinamento. O grupo treinado e suplementados com vinho aumentou significativamente os níveis de HDL séricos, considerando que esta associação pode ter efeitos benéficos para o sistema cardiovascular (SOARES FILHO, CASTRO E STAHLSCHMIDT 2011).

A combinação do treinamento físico e a suplementação com flavonoides parecem promover efeitos benéficos no controle do perfil bioquímico, contudo, as variáveis do treinamento e os diferentes tipos de flavonoides interferem diretamente na eficácia destas estratégias.

4. Treinamento físico, estresse oxidativo e suplementação com flavonoides

Muito embora o treinamento físico seja importante estratégia não farmacológica e preventiva para doenças crônicas degenerativas, a prática extenuante e prolongada de esforço físico promove elevado aumento da difusão de oxigênio pelas células promovendo o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio que não compensadas por mecanismos de defesa antioxidantes do organismo e aumento da produção intracelular de radicais livres causando o estresse oxidativo, que é responsável por alguns dos processos inflamatórios e efeitos deletérios nas estruturas celulares (URSO E CLARKSON 2006, PHYSICAL ACTIVITY AND PUBLIC HEALTH 2007, POWERS, NELSON E HUDSON, 2011).

Além do aumento da demanda energética durante o exercício físico, existem múltiplos mecanismos fisiológicos que contribuem para elevação da formação de radicais livres, tais como o aumento da autooxidação de catecolaminas que produzem radicais de oxigênio, produção de ácido lático que geram outros agentes oxidativos e aumento da resposta inflamatória causada por lesão muscular incidindo a hiperperoxidação (CLARKSON AND THOMPSON, 2000, PETERNELJ AND COOMBES, 2011).

As células dos organismos vivos possuem dois sistemas de defesa contra os danos produzidos pelos radicais livres, sendo o primeiro um sistema de defesa enzimático e o segundo um sistema de defesa não

enzimático, constituído por antioxidantes dietéticos, como a vitamina C, vitamina E e compostos polifenólicos, dentre eles os flavonoides (YILMAZ et al., 2004). Os flavonoides agem diretamente no sequestro ou varredura de radicais livres e supressão de enzimas oxidativas, neste contexto existe crescente interesse sobre os efeitos da suplementação de flavonoides frente a marcadores do estresse oxidativo induzidos pelo treinamento físico (MORILLAZ- RUIZ et al., 2006).

Foram investigados os efeitos de um extrato de flavonoides contendo catequinas, rutina e isoquercitrina extraídos de planta de origem oriental (*Cynomorium songaricum*) sobre a capacidade antioxidante mediada pelas enzimas superóxido dismutase e glutathione peroxidase, tendo como indicador do estresse oxidativo o malonaldeído (MDA) em animais submetidos a treinamento físico aquático. Os resultados indicaram aumento significativo da capacidade antioxidante das enzimas estudadas e diminuição do estresse oxidativo, além do aumento do desempenho dos animais frente a sessão exaustiva comprovando também a eficiência dos flavonoides na melhora da resistência dos animais (YU et al., 2010).

A quercetina é um importante flavonoide da classe dos flavonols, encontrado principalmente em alimentos como a cebola, a maçã, o chá e o vinho tinto, e sua atividade antioxidante foi investigada perante biomarcadores oxidativos (TBARS e enzimas antioxidantes) e corticosterona no tecido hipotalâmico de ratos treinados em água. A suplementação de quercetina foi conduzida via intraperitoneal em três diferentes doses uma hora antes de cada sessão de treinamento. O

treinamento aquático foi capaz de induzir ao dano oxidativo através do aumento de marcadores e diminuir as enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, glutathiona peroxidase e catalase) no hipotálamo de animais. Embora o tratamento com quercetina não tenha aumentado as enzimas antioxidantes e inalterado o hormônio estudado, foi observado atenuação da produção de espécies reativas de oxigênio no hipotálamo dos animais protegendo os neurônios de lesões oxidativas, podendo ser útil na prevenção ou tratamento para doenças neurodegenerativas (HALEAGRAHARA et al., 2009).

A eriocitrina tem sido relatada como sendo um dos principais bioflavonoides cítricos da casca do limão que apresenta elevada atividade antioxidante e antiinflamatória (MIYAKE *et al*2006). A fim de verificar seus efeitos antioxidantes e atenuadores do estresse oxidativo foi estudada a suplementação com eriocitrina em treinamento físico em esteira rolante. Os autores verificaram aumento da capacidade antioxidante pela redução do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e redução da peroxidação lipídica pela presença de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (KATO et al., 2000, MINATO et al., 2003, MIYAKE et al., 2004).

A suplementação de 0,2% de eriocitrina em dieta comercial foi testada em animais submetidos a treinamento em esteira rolante. A eriocitrina promoveu a ativação do mecanismo de defesa antioxidante induzindo enzimas antioxidantes e diminuindo o teor de marcadores primários do estresse oxidativo (KATO et al., 2000). Estudo similar examinou os efeitos da eriocitrina sobre o TBARS em tecido hepático de

animais submetidos a exercício agudo. Foi mostrado que o exercício agudo induziu aumento nos marcadores do estresse oxidativo no fígado de ratos; apesar disso o flavonoide suprimiu o aumento de TBARS e a oxidação de glutathione no teste agudo, e aumentou a capacidade antioxidante protegendo contra os danos oxidativos no fígado (MINATO et al., 2003).

REFERENCIAS

1. ACMS COLLEGE OF SPORTS MEDICINE. Position stand: appropriate physical activity i ntervention strategies for weight loss and prevention of weight regain for adults. **MEDICINE & SCIENCE IN SPORTS & EXERCISE**, 2009.
- 2 AKIYAMA S. et al. Dietary hesperidin exerts hypoglycemic and hypolipidemic effect streptozotocin-induced marginal type 1 diabetic rats. **J. Clin. Biochem. Nutr.**, 46, 87–92, January 2010.
- 3 BENAVENTE-GARCIA, O.; CASTILLO, J.; MARIN, F.R. et al. Uses and properties of citrus flavonoids. **Agric. Food Chem.**, v. 45, n. 12, p. 4504-4515, 1997.
- 4 BENAVENTE-GÁRCIA, O.; CASTILLO, J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. **J. Agric. Food. Chem.**, v.56, n. 15, p.6185-6205, 2008.
- 5 BERKARDA, B.; KOYUNKU, H.; SOYBIR, G.; BAYKUT, F. Inhibitory effect of hesperidin on tumor initiation and promotion in mouse skin. **Res. Exp. Med.**,v.198, n. 2 , p.93-99, 1998.
- 6 BEXFIELD et al. Adaptations to high-intensity intermittent exercise in rodents. **J Appl Physiol** 107: 749–754, 2009.
- 7 BOK S.H. et al. 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. **American Society for Nutritional Sciences**. 1999

- 8 BOTEZELLI et al. Different exercise protocols improve metabolic syndrome markers, tissue triglycerides content and antioxidant status in rats. **Diabetology & Metabolic Syndrome** 2011.
- 9 CHEIK N.C. et al. Efeito de diferentes frequências de exercício físico na prevenção da dislipidemia e da obesidade em ratos normo e hipercolesterolêmicos. **Rev. bras. Educ. Fís. Esp.**, São Paulo, v.20, n.2, p.121-29, abr./jun. 2006.
- 10 CLARKSON M.P. E THOMPSON H.S. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? **Am J Clin Nutr.** 2000.
- 11 DURSTINE J.L. et al. Lipids, lipoproteins, and exercise. **Journal of Cardiopulmonary Rehabilitation** 2002;22:385-398.
- 12 EGERT S. AND RIMBACH G. Which sources of flavonoids: complex diets or dietary supplements? **American Society for Nutrition. Adv. Nutr.** 2: 8–14, 2011.
- 13 ERLUND, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. **Nutr. Res.**, v. 24, n. 10, p. 851-874, 2004.
- 14 FRAJACOMO F.T.T. et al. The effects of high-intensity resistance exercise on the blood lipid profile and liver function in hypercholesterolemic hamsters. **Appl. Physiol. Nutr. Metab.** 37: 448–454 (2012).
- 15 FUJII N. et al. Role of AMP-activated protein kinase in exercise capacity, whole body glucose homeostasis transport in skeletal muscle-

- insight of a transgenic mouse model. **Diabetes Research and Clinical Practice** (2007) S92-S98.
- 16FUJIMOTO E. et al. Effects of non-exhaustive bouts of high-intensity intermittent swimming training on GLUT-4 expression in rat skeletal muscle. **J Physiol Sci** (2010) 60:95–101.
- 17GARG A. et al. Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. **Phytotherapy research. Phytother. Res.** 15, 655–669 (2001).
- 18GORINTEIN, S. et al. Effect of hesperidin and naringin on the plasma lipid profile and plasma antioxidant activity in rats fed a cholesterol-containing diet. **J Sci Food Agric**, 2007.
- 19GUERRA R.L.F. et al. Effects of 2 or 5 consecutive exercise days on adipocyte area and lipid parameters in Wistar rats. **Lipids in Health and Disease** 2007, 6:16
- 20HALEAGRAHARA N. et al. Flavonoid quercetin protects against swimming stress-induced changes in oxidative biomarkers in the hypothalamus of rats. **European Journal of Pharmacology** 621 (2009) 46–52.
- 21HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILVA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **J. Nutr. Biochem.**, v.13, n.10, p. 572-584, 2002.
- 22HIJIYA, H., MIYAKE, T. **European Patent** 0402049 (1991).
- 23HUANG H.H. et al. Exercise increases insulin content and basal secretion in pancreatic islets in type 1 diabetic mice. **Experimental Diabetes Research**, 2011.

- 24MANDIPIKA JAIN M. AND HAMENDRA P.S. Evaluation of antioxidative and anti-inflammatory potential of hesperidin and naringin on the rat air pouch model of inflammation. **Inflamm. Res.** (2011) 60:483–491
- 25JEPPESEN J. AND KIENS B. Regulation and limitations to fatty acid oxidation during exercise. **Physiol** 590.5 (2012) pp 1059–1068.
- 26JUNG J.U. et al. The hypoglycemic effects of hesperidin and naringin are partly mediated by hepatic glucose-regulating enzymes in c57bl/ksj-db/db mice. **American Society for Nutritional Sciences.** 2004
- 27JUNG U.J. et al. Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type-2 diabetic mice. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology** 38 (2006) 1134–1145.
- 28INSTITUTE OF MEDICINE, FOOD AND NUTRITION. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, frol, fiber, fat fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids. **Washington, D.C.: National Academic Press,** 2005
- 29KATO Y. et al. Preparation of a monoclonal antibody tone-(hexanonyl) lysine: application to the evaluation of protective effects of flavonoid. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 274, 389–393 (2000).
- 30KAWAGUCHI K., MATSUMOTO T., KUMAZAWA Y. Effects of antioxidant polyphenols on TNF-alpha-related diseases. **Curr Top Med Chem.** 2011; 11(14):1767-79.

- 31 KIM K.H. et al., 2003. Lipid-lowering efficacy of hesperetin metabolites in high-cholesterol fed rats. **Clinica Chimica Acta** 327, 129–137, 2003.
- 32 KNEKT, P.; KUMPULAINEN, J.; JÄRVINEN, R. et al. **Flavonoid intake and risk of chronic disease**. Am. J. Clin. Nutr., v. 76, n. 3, p. 560-568, 2002.
- 33 KRAUS et al. Effects of the amount and intensity of exercise on plasma lipoproteins. N Engl J Med, Vol. 347, No. 19, November 7, 2002
- 34 KUROWSKA E. M. e MANTHEY, J.A. Hypolipidemic effects and absorption of citrus polymethoxylated flavones in hamsters with diet-induced hypercholesterolemia. **J. Agric. Food Chem.** 2004.
- 35 KUROWSKA J.A. et al. HDL-cholesterol-raising effect of orange juice in subjects with hypercholesterolemia. **Am J Clin Nutr.**, 72:1095–100, 2000.
- 36 LIU L. et al. Naringenin and hesperetin, two flavonoids derived from citrus aurantium up-regulate transcription of adiponectin. **Phytother. Res.** 22, 1400–1403, (2008).
- 37 LUCAS R. D. L, DENADAI S.B. E GRECO C.C. Respostas fisiológicas durante o exercício contínuo e intermitente: implicações para a avaliação e a prescrição do treinamento aeróbio. **Motriz**, Rio Claro, v.15 n.4 p.810-820, out./dez. 2009.
- 38 MANACH, C.; MORAND, C.; CRESPIY, V. et al. Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. **FEBS Lett**, v. 426, n. 3, p. 331-336, 1998.
- 39 MANACH, C.; MORAND, C.; GIL-IZQUIERDO, A. et al. Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin after the ingestion

- of two doses of orange juice. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v.57, n. 2, p. 235-242, 2003.
- 40MANTHEY, 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.
- 41MATSUMOTO, H.; IKOMA, Y.; SUGIURA, M.; MASAMICHI Y.; HASEGAXA, Y. Identification and quantification of the conjugated metabolites derived from orally administered hesperidin in rat plasma. **Agric. Food Chem.**, v. 52, n. 21, p. 6653-6659, 2004.
- 42MINATO K. et al.,. Lemon flavonoid, eriocitrin, suppresses exercise-induced oxidative damage in rat liver. **Life Sciences**, 2003.
- 43MIWA Y. et al. glucosyl hesperidin lowers serum triglyceride level in hypertriglyceridemic subjects through the improvement of very low-density lipoprotein metabolic abnormality. **J Nutr Sci. Vitaminol**, 51, 460-470, 2005.
- 44MIYAKE Y. et al. Radical-Scavenging Activity in vitro of Lemon Peel Fermented with *Aspergillus saitoi* and Its Suppressive Effect against Exercise-Induced Oxidative Damage in Rat Liver.**Food Sci. Technol. Res.**, 2004.
- 45MIYAKE Y.et al. Lipid-lowering effect of eriocitrin, the main flavonoid in lemon fruit, in rats on a high-fat and high- cholesterol diet. Vol. 71, Nr. 9, 2006- **JOURNAL OF FOOD SCIENCE**.
- 46MORILLAS-RUIZ J.A. et al. Effects of polyphenolic antioxidants on exercise-induced oxidative stress. **Clinical Nutrition** (2006) 25, 444–453.

- 47MORIN B. et al. The citrus flavonoids hesperetin and nobiletin differentially regulate low density lipoprotein receptor gene transcription in hepg2 liver cells. **J Nutr.** 2008 July; 138 (7): 1274–1281.
- 48MURASE T. et al. Green tea extract improves running endurance in mice by stimulating lipid utilization during exercise **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 290: R1550–R1556, 2006.
- 49MURASE T. et al. Reduction of diet-induced obesity by a combination of tea-catechin intake and regular swimming **International Journal of Obesity** (2006) 30, 561–568 2006b
- 50MURASE T. et al. Tea catechin ingestion combined with habitual exercise suppresses the aging-associated decline in physical performance in senescence-accelerated mice. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 295: R281–R289, 2008.
- 51NIELSEN, I. L. F, et al. Bioavailability is improved by enzymatic modification of citrus flavonoid hesperidin in humans: a randomized, double-blind, crossover trial. **J. Nutr.**, v. 136, p. 404-408, 2005.
- 52PETERNEL T.T. AND COOMBES J.F. Antioxidant Supplementation during exercise training. **Sports Med.** 2011; 41 (12): 1043-1069
- 53PHYSICAL ACTIVITY AND PUBLIC HEALTH, Updated Recommendation for Adults From the **American College of Sports Medicine and the American Heart Association**, 2007.
- 54POWERS S.K., NELSON W.B.N. AND HUDSON M.B. Exercise-induced oxidative stress in humans: Cause and consequences. **Free Radical Biology & Medicine** 51 (2011) 942–950.

- 55PRETONELA et al. Metabolism and transport of the citrus flavonoid hesperetin in caco-2 cell monolayers. **The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics**. Vol. 36, No. 9, 2008.
- 56RADER D.J. et al. The role of reverse cholesterol transport in animals and humans and relationship to atherosclerosis. **Journal of Lipid Research April Supplement**, 2009.
- 57RIZZA S. et al. Citrus polyphenol hesperidin stimulates production of nitric oxide in endothelial cells while improving endothelial functions and reducing inflammatory markers in patients with metabolic syndrome. **Clin Endocrinol Metab**, May 2011, 96(5):E782–E792.
- 58SANAL E. ARDIC F. AND KIRAC S. Effects of aerobic or combined aerobic resistance exercise on body composition in overweight and obese adults: gender differences. a randomized intervention study. **European Journal of Physical and Rehabilitation Medical**. vol.48 – 2012.
- 59SCALBERT A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **J. Nutr.** v.130, Suppl 8S, p. 2073S-2085S, 2000.
- 60SELVARAJ P. AND PUGALENDI K.V. Efficacy of hesperidin on plasma, heart and liver tissue lipids in rats subjected to isoproterenol-induced cardiotoxicity. **Experimental and Toxicologic Pathology** 64 (2012) 449– 452.
- 61SENE-FIORESE M. et al. Efficiency of intermittent exercise on adiposity and fatty liver in rats fed with high-fat **Diet. Obesity** (2008) 16, 2217–2222. doi:10.1038/oby.2008.339.

- 62SMITH A.B. et al. Physiological effects of caffeine, epigallocatechin-3-gallate, and exercise in overweight and obese women. **Appl. Physiol. Nutr. Metab.** 35: 607-616 (2010).
- 63SOARES FILHO P R, CASTRO I, STAHLSCHMIDT A. Effect of red wine associated with physical exercise in the cardiovascular system of spontaneously hypertensive rats. . **Arq Bras Cardiol** 2011; 96 (4):277-283.
- 64SPENCER, J.P.E.; CHOWRIMOOTOO, G.; CHOUDHURY, R. et al. The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. **FEBS Lett.**, v. 458, n. 2, p. 224-230, 1999.
- 65SZMITKO P.E. AND VERMA S. Antiatherogenic potential of red wine: clinician update. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 288: H2023–H2030, 2005.
- 66TITTA, L. et al. Blood orange juice inhibits fat accumulation in mice. **International Journal of Obesity**, 2009.
- 67MARIA L. URSO M.L. AND CLARKSON PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology** 189 (2003) 41/54.
- 68VELAYUTHAM P., BABU A., LIU D. Green tea catechins and cardiovascular health: an update. **Curr Med Chem.** 2008; 15(18): 1840–1850.
- 69VINUEZA J.C., FARIA J.B. E CESAR T.C.. Hesperidina diminui o colesterol sanguineo de ratos alimentados com gordura saturada. **Alim. Nutr.**, Araraquara. v.19, n.4, p. 473-479, out./dez. 2008.

- 70 WANG X. et al. Effects of hesperidin on the progression of hypercholesterolemia and fatty liver induced by high-cholesterol diet in rats. **Journal of Pharmacological Sciences**, 2011.
- 71 WILCOX, et al. Secretion of hepatocyte apoB is inhibited by the flavonoids, naringenin and hesperetin, via reduced activity and expression of ACAT2 and MTP, **Journal of Lipid Research**, vol. 42, 2001.
- 72 WILMSEN P.K, SPADA D.S, SALVADOR M. Antioxidant activity of the flavonoid hesperidin in chemical and biological systems. **J. Agric. Food Chem.** 2005, 53, 4757-4761.
- 73 YAMADA, M.; TANABE, F.; ARAI, N. et al. Bioavailability of glucosyl hesperidin in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, v. 70, n. 6, p. 1386-1394, 2006.
- 74 YAMAMOTO M.. Glucosyl hesperidin prevents endothelial dysfunction and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. **Nutrition** 24 (2008) 470–476.
- 75 YAMAMOTO M., SUZUKI A. E HASE Short-Term effects of glucosyl hesperidin and hesperetin on blood pressure and vascular endothelial function in spontaneously hypertensive rats. **J Nutr Sci Vitaminol**, 54, 95-98, 2008.
- 76 YILMAZ Y, TOLEDO RT. Health aspects of functional grape seed constituents. **Trends Food Sci Technol**. 2004; 15:422-33.
- 77 YU F.R. et al. Effects of a flavonoid extract from cynomorium songaricum on the swimming endurance of rats. **The American Journal of Chinese Medicine**, Vol. 38, No. 1, 65–73, 2010.

CAPÍTULO 2

Glucosyl hesperidin combined with continuous and interval swimming improves biochemical and oxidative biomarkers in rats

David Michel de Oliveira^a, Grace Kelly Zanotti Simões Dourado^a, Thais Borges César^{a*}

Department of Food and Nutrition, Faculty of Pharmaceutical Sciences, UNESP – Univ Estadual Paulista, Araraquara, Brazil.

* Corresponding author: Address: Rodovia Araraquara-Jau km 1, Araraquara, SP, Brazil, 14802-901, Tel.: 55-16-3301-6927; fax: 55-16-3301-6020.

E-mail address: tcesar@fcar.unesp.br

Abstract

Objective. The aim of this study was to investigate the effects of continuous and interval swimming with glucosyl-hesperidin (G-hesperidin) supplementation on the biochemical and oxidative biomarkers in rats.

Materials/methods. The animals (n=60) were randomly divided into six groups as follows: negative (C) and positive controls (CH) for G-hesperidin supplementation; and continuous or interval swimming without (CS and IS, respectively) or with G-hesperidin supplementation (CSH and ISH, respectively). G-hesperidin was given by gavage for four weeks (100 mg/kg body mass) before the exercises. Continuous swimming was performed for 50 min with a load from 5 to 8% of body weight from the first to fourth week, and interval swimming training was performed for 50 min with 1 min of swimming followed by 2 min of resting carrying a load from 10% to 15, 20 and 25% from the first to fourth week.

Results. A continuous decline of serum glucose was found with a combined effect of G-hesperidin and swimming as follows: C (100%) > CH (97%) > CS (94%) > CSH (91%; p<0.05) > IS (87%; p<0.05) > ISH (80%; p<0.05). Moreover, continuous or intermittent swimming with G-hesperidin supplementation resulted in lower total cholesterol (-16%; p<0.05), LDL-C (-50%; p<0.05) and triglyceride levels (-19%; p<0.05), as well as higher HDL-C levels (48%; p<0.05). Furthermore, G-hesperidin enhanced the antioxidant capacity with continuous swimming (183%; p<0.05) and lowered lipid peroxidation with interval swimming (-45%; p<0.05).

Conclusion. G-hesperidin supplementation alone or in combination with swimming exercise protocols, including both continuous and interval swimming, improved the biochemical profile and antioxidant biomarkers of the rats, thereby suggesting that the use of flavanones may enhance the health benefits promoted by these exercises.

Keywords: glucosyl-hesperidin, citrus flavonoids, swimming, blood serum biomarkers, antioxidant, rats.

Introduction

The regular practice of exercise has been recommended by healthcare professionals as a non-pharmacological strategy to control metabolic, hormonal and cardiovascular parameters associated with the development of chronic diseases (Thompson et al 2003). Variables of the exercise, such as type, volume and intensity, can have crucial metabolic and physiologic effects. In this sense, continuous exercise is characterized by moderate to intense exercise with extended duration using fatty acids as the predominant energy source. In contrast, interval exercise is defined as high intense exercise with passive or active pauses using glucose as the predominant source of energy (Jeppesen and Kiens, 2012). Continuous and interval exercise protocols have been used as a strategy to control glucose and lipids in the blood stream (de Araujo et al 2012; Rogatto et al 2001, Durstine et al 2002, Botzelli et al 2011, Frajacomio et al 2012).

Exhaustive exercises and overtraining may increase the generation rate of free radicals, which may exceed the capacity of the cellular defense system and consequently impair cell viability, initiating skeletal muscle damage and promote inflammation (Sachdev and Davies et al 2008). To prevent this negative effect, antioxidant supplements can be an alternative to attenuate the side effects of exercise, and flavonoids, in general, can be used to improve antioxidant capacity (Minato et al 2003; Lyall et al 2009). Previous studies in humans and animals, especially rodents, have demonstrated that hesperidin and its metabolites decrease blood serum glucose and lipids, as well as neutralize markers of oxidative stress (Kurowska et al 2000; Kim et al 2003; Gorinstein et al 2007; Kim et al 2010). Although a body of evidence has shown these benefits, most of the mechanisms are still being explored (Minato et al 2003;

Miyake et al 2003; Cureton et al 2009; Di Giacomo et al 2009; Aptekmann and Cesar et al 2010).

The purpose of this study was to analyze the interaction of glucosyl hesperidin (G-hesperidin) and continuous or interval exercises with biochemical parameters and biomarkers of oxidative stress in rats. We have compared the glucose and lipid blood levels in rats submitted to continuous exercise and interval swimming protocols, and we also evaluated two oxidative biomarkers for both protocols plus the effect of G-hesperidin supplement. The present study tested if continuous and interval swimming alone or combined with G-hesperidin supplement could improve blood serum variables and reduce oxidative stress.

2. Material and Methods

2.1. Reagents

G-hesperidin was obtained from Hyashibara, Japan. Biochemical analyses (glucose, triglycerides, total cholesterol, and HDL-C) were performed using commercial kits (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brazil) and the Technicon RAXT chemistry analyzer (Bayer Diagnostic, Tarrytown, NY, USA). LDL-C was determined according to Friedewald et al (1972). Reagents for lipid hydroperoxide and antioxidant substances (TBARS and DPPH) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.2. Animals and experimental groups

Male Wistar rats (12 weeks old, 300-450 g) were maintained in collective cages (5 rats/cage, 350 cm²/animal, 18 cm in height) on a normal light/dark cycle in a climate-

controlled environment and fed with standard rodent chow diet and water *ad libitum*. The body weights were determined twice a week. This study was approved by the Ethics Committee on Animal Research at the University of Franca, Sao Paulo, Brazil (Protocol n. 0038/10). The animals (n=60) were randomly divided into six groups (n=10) as follows: 1) negative control (C), no swimming and no G-hesperidin; 2) positive control (CH), no swimming + G-hesperidin; 3) continuous swimming (CS); 4) continuous swimming + G-hesperidin (CSH); 5) interval swimming (IS); and 6) interval swimming + G-hesperidin supplement (ISH).

2.3. G-hesperidin supplementation

Groups supplemented with the isolated flavonoid received G-hesperidin diluted in saline (100 mg/kg body mass) by gavage for four uninterrupted weeks 30 min before the animals performed the exercises. The volume of G-hesperidin was adjusted in accordance to the weight of each animal.

2.4. Swimming protocols

The animals were trained on continuous or interval swimming for 50 min per day for four weeks after one week of adaptation. The rats swam in square polypropylene tanks (5 rats/tank) filled with water (40 cm depth) at 27°C. The rats were randomly divided into 6 groups with 4 groups subjected to two types of swimming: continuous or interval swimming. Continuous swimming was characterized by cyclical and uninterrupted movements between the arms and legs with a predominance of aerobic energy for 50 min carrying a weight equal to 5% of their body weight in the first week and gradually progressing to 6, 7 and 8% of their body weight in the second, third and fourth weeks, respectively (de Araujo et al 2012). Interval swimming training was

performed for a total period of 50 min, characterized by brief periods of high intensity exercise (60 s) and followed by rest periods (120 s) on a submerged platform with a predominance of anaerobic energy, carrying a weight equal to 10% of their body weight in the first week and gradually progressing to 15, 20 and 25% of their body weight in the second, third and fourth weeks, respectively. This protocol was adapted from Oliveira et al (2002).

2.5. Biochemical analysis

One day after the experimental period, the animals were food deprived fasted for 12 h and decapitated by guillotine. The blood was then collected and centrifuged to obtain serum, which was stored at -20°C. Serum glucose, total cholesterol, HDL-C and triglycerides were determined by commercial kits (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brazil).

2.6. Lipid hydroperoxide (TBARS assay)

A thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay was used to determine lipid peroxidation in animal serum (Yagi, 1998 modified by Nasser et al 2011). Two hundred milliliters of the MDA standard (0, 1.25, 1.88, 2.50, 3.13, 3.75, 6.25 and 12.50 M) and serum sample were mixed with 200 µL of SDS and 500 µL of staining reagent (5.3 mg/mL of TBA diluted in 20% acetic acid; pH 3.5). This mixture was vortexed and then incubated at 100°C for 60 min, followed incubation on ice for 10 min. The standards and samples were centrifuged at 10000 rpm for 10 min, and the absorbance of the supernatant was determined at 532 nm. The TBARS concentration was based on the molar extinction coefficient of malondialdehyde.

2.7. Antioxidant capacity (DPPH assay)

The antioxidant substances of the serum were determined by a 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical assay (Chrzczanowicz et al 2008, modified by Nasser et al 2011). The protein in the serum samples (200 μ L) was removed with acetonitrile (200 μ L). The serum supernatant (without protein) was mixed with 970 μ L of CH₃OH and 5 μ L of DPPH (10 mM in methanol), and the mixture was rested at room temperature for 20 min, followed by centrifugation at 10,000 rpm for 10 min at 4°C. Absorbance of the supernatant was determined at 517 nm.

2.8. Statistical analyses

Data were presented as the means \pm SD. Statistical analyses were performed by Sigma Stat v. 3.2 for Windows®. Statistical comparisons of the groups were made by One-Way ANOVA and the differences among groups were tested with Tukey test (glucose, triglycerides, total cholesterol, LDL-C, HDL- C) or Student-Newman-Keuls method (gain weight, TBARS, DPPH). Differences are considered significant when $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Body weight gain during the experimental period

There was no significant difference in weight gain between the C and CH groups or among the swimming groups with or without G-hesperidin (CS, IS, CSH, and ISH). However, there was a significant difference between the animals submitted to swimming (CS, IS, CSH, and ISH) and the sedentary rats (C and CH) ($p < 0.05$) (Table 1).

3.2. *Glucose*

There was a continuous decline of serum glucose levels from the negative control group to the interval swimming group as follows: negative control (C) > positive control (CH) > continuous swimming (CS) > continuous swimming + G-hesperidin (CSH) > interval swimming (IS) > interval swimming + G-hesperidin (ISH). These results suggest a combined effect of G-hesperidin with swimming on the serum glucose levels. The glucose levels were statistically higher in the C group and lower in the ISH compared to the other groups with intermediate values (Table 1).

3.3. *Triglycerides*

A 13% reduction of serum triglyceride levels was observed in the CH group compared to the C group. No differences in the triglyceride levels were observed among the exercised animals with or without G-hesperidin (CS, CSH, IS, and ISH) (Table 1).

3.4. *Total cholesterol and LDL-C*

There was a 15% decrease in serum total cholesterol levels in the CH group compared to the C group. The same response was observed for the ISH group compared to its control (IS; -15%), as well as for the CSH group related to its control (CS; -11%) (Table 1). LDL-C levels were 52% lower in the CH animals compared to the C animals. Similarly, LDL-C levels were 63% and 42% lower in the CSH and ISH groups, respectively, compared to their controls (CS and IS, respectively) (Table 1). These results followed the same tendency found for total cholesterol, thus showing a marked effect of G-hesperidin on cholesterol metabolism.

3.5. HDL-C

The CH animals had high levels of blood serum HDL-C (35%) compared to the C group. Moreover, the CS, IS, CSH and ISH groups showed increased levels of HDL-C. These results suggested that both G-hesperidin and exercise had a positive effect on HDL-C levels (Table 1).

3.6. Lipid hydroperoxide (TBARS assay)

A marked increase of lipid peroxidation (approximately 60%) was observed in IS rats in comparison to all groups. This event suggests that the intensity of the interval exercise promoted higher oxidative stress but that this effect was attenuated by the G-hesperidin as observed in the ISH group (Table 1).

3.7. Antioxidant capacity (DPPH assay)

Blood serum antioxidant capacity was 2.8-fold more in the CSH group compared to the CS group, and no changes in blood serum antioxidant capacity were found in the IS and ISH groups (Table 1).

4. Discussion

Exercise training intervention is a low-risk strategy that has been designed as adjuvant treatment for chronic illnesses for many decades, but the combination of regular exercise with bioactive compounds to reduce chronic disease risk factors has been reported as a recent approach (Lee et al 2012; O'Fallon et al 2012). The present

study tested if continuous or interval swimming in combination with G-hesperidin supplementation in rats can improve biochemical and oxidative stress parameters related to chronic diseases.

The findings of the current investigation show that G-hesperidin supplementation in addition to continuous swimming (CSH) or interval swimming (HSE) improved biochemical and oxidative biomarkers in rats. Swimming training by itself (CS and IS groups) or in combination with G-hesperidin (CSH and HSH groups) during four weeks not only improved glucose metabolism but also decreased levels of total cholesterol, LDL-C and triglycerides, as well as increasing HDL-C levels. Furthermore, the antioxidant capacity was enhanced by continuous swimming with G-hesperidin supplementation (CSH group). Supplementation with G-hesperidin did not affect the weight gain of rats during the 4-week period, but swimming training (continuous or interval) was an important factor to reduce the weight gain of all trained groups, thereby suggesting that energy expenditure by exercise was the key factor in maintaining body weight (Botezelli et al, 2011).

The serum glucose concentration was significantly decreased with G-hesperidin treatment alone or combined with swimming (IS and CS). The reduction of fasting glucose ranged from ISH (-20%), IS (-13%), CSH (-9%), CS (-6%) and CH (-3%) to the control group (100%). Recent reviews have shown that regular exercise (either continuous or interval) reduces serum glucose by improving insulin sensitivity (Kessler et al 2012, Colberg, 2012). According to the Little et al (2011), high intense aerobic exercise improves glucose control and adaptation in skeletal muscle, reduces blood glucose levels by 13% over the 24-h period following training and that postprandial glucose levels spike for several days afterwards. A recent study with rats subjected to interval swimming has reported a higher production of the GLUT-4

isoform transporter, which is a determining factor for the transport and uptake of glucose, in these rats (Fujimoto et al, 2010). Moreover, G-hesperidin supplementation has important hypoglycemic effects through the modulation of gene expression of hepatic enzymes, such as glucokinase and glucose-6-phosphatase, which are involved in the final step of catalyzing gluconeogenesis and glycogenolysis, thus playing a role in regulating homeostatic plasma glucose (Liu et al, 2008). Jung et al (2006) showed that isolated hesperidin in rats significantly increases the number of GLUT-2 and GLUT-4, thereby enhancing cellular signaling glucose and consequently reducing insulin resistance.

Increased levels of physical activity stimulate favorable changes in the levels of circulating lipoproteins, thus lowering the risks of metabolic disorders, such as dyslipidemias, metabolic syndrome and diabetes (Durstine et al 2002, Botzelli et al 2011, Frajacomio et al 2012). These changes can vary according to the volume and intensity of the training, which can decrease cholesterol and triglyceride levels and can increase HDL-C levels (Fahlman et al 2002; Kelley et al 2009). However, a significant increase in HDL-C is more common with high intensity resistance exercise (Hill et al 2005). Citrus flavonoids chemically isolated from citrus fruits and juices, such as hesperidin and naringin, have been associated with lower levels of LDL-C and triglycerides in humans (Miwa et al 2005) and animals (Ohtsuki et al 2003; Selvaraj and Pugalendi, 2012). Because the association between exercise training and hesperidin supplementation has not yet been addressed, we investigated whether rats submitted to swimming training (CS and IS) and supplemented with G-hesperidin (CSH and ISH) could have an effect on lipid and lipoprotein metabolism.

In this study, we observed that CH rats had reduced levels of serum triglycerides, thereby suggesting that G-hesperidin is able to decrease the synthesis or

catabolism of triglyceride-rich lipoproteins. Miwa et al (2005) found that G-hesperidin supplementation in subjects with hypertriglyceridemia (>150 mg/dL) reduces serum triglycerides, presumably because the increase of triglyceride-rich lipoprotein catabolism. However, Wilcox et al (2001) showed that hesperitin, the aglycon form of hesperidin, inhibits VLDL secretion *in vivo* and *in vitro* by inhibition of microsomal triglycerides transfer protein (MTP) activity, transcription of HMG CoA-reductase, ACAT activity and synthesis of Apo B, thereby causing a 70% reduction in the secretion of hepatic ApoB-100/VLDL. Therefore, from these previous studies, we can deduce that G-hesperidin reduces both the synthesis and catabolism of triglycerides. Except for the negative control group, the other groups (CH, CS, IS, CSH, and ISH) had lower levels of triglycerides, which suggests that G-hesperidin and swimming exercise can improve triglyceride metabolism although the individual effects from exercise and supplement were not additive.

Regarding total cholesterol and LDL-C levels, we observed a marked reduction promoted by G-hesperidin in the CH, CSH and ISH groups compared to their controls without supplementation (C, CS, and IS, respectively). This result was corroborated by previous studies showing that hesperidin lowers plasma and liver cholesterol by inhibition of HMG CoA-reductase, ACAT and secretion of Apo B (Bok et al 1999; Choi et al 2004; Wilcox et al 2001). In addition, hesperidin increases expression of the gene encoding the LDL receptor and its specific metabolism (Morin et al 2008).

A recent study has shown that either high intensity or moderate intensity exercise training reduces cardiovascular risk factors in rats with the metabolic syndrome and that both types of exercise improve endothelial function, improve blood pressure, increase HDL cholesterol, and reduce blood glucose levels (Kessler et al, 2012). Moreover, both the exercises reducing the impact of the metabolic syndrome and the

magnitude of the effect depend on exercise intensity (Haram et al 2009). Another study has reported that acute resistance exercise at a moderate or high intensity, such as aerobic exercise, may have an antiatherogenic effect, particularly by modulating the lipid profile (Lira et al 2012). In the present study, a concomitant increase was observed in the HDL-C levels of the swimming groups (CS, IS) and G-hesperidin supplement groups (CH, CSH, and ISH), but the effects were not additive.

HDL-C is the sub fraction of cholesterol responsible for facilitating the reverse transport of cholesterol from peripheral tissues to the liver where it is catabolized and excreted, and the function of HDL-C is recognized as antiatherogenic (Rothblat and Phillips, 2010). Although there are many controversies, it is well known that HDL-C levels are generally responsive to aerobic training and increase in a dose-dependent manner with increased energy expenditure (Dustine et al 2002). Additionally, the exercise intensity and duration are also associated to positive changes in the levels of HDL-C (Haram et al 2009).

Because of the benefits that have been reported, regular physical exercise has been adopted as part of an overall strategy to normalize lipid profiles and to improve cardiovascular health (Grandjean et al 2000). However, it is questionable if all physical exercises are safe despite of the beneficial effects on lipid profiles. It has been reported that exhaustive exercises, such as swimming, induce oxidative stress due to excessive oxygen reception and elevated production of ROS (Goto et al 2007). However, moderate regular exercise can have positive effects by upregulating the activities of antioxidant enzymes, which can reduce oxidative stress (Ji, 2001).

Regarding oxidative stress and exercise, it is well established that prolonged or high intensity exercises, such as interval exercises, increase the production of oxygen free radicals and lipid peroxidation, which are related to oxidative damage to

macromolecules in blood and skeletal muscle (Powers et al 2011; Fogarty et al 2011). Therefore, we evaluated the protective role of G-hesperidin as an antioxidant compound with both continuous and interval exercises. No changes in lipid peroxidation were observed in the C, CH, CS, CSH groups. However, interval exercise (IS) had a greater than 50% reduction in lipid peroxidation triggered by G-hesperidin supplementation (ISH). A previous study has also suggested that hesperidin and naringin (and not vitamin C in orange juice) neutralize oxidative stress as a result of ingestion of a pro-inflammatory high fat and high carbohydrate meal (Ghanin et al 2007). In the present study, continuous swimming exercise increased the oxidative stress in animals, and supplementation with G-hesperidin markedly increased (over 100%) the antioxidant capacity in the CSH group. The antioxidant capacity was unchanged by G-hesperidin in the other groups (C, CH, CS, IS, and ISH).

The antioxidant effects of flavonoids, such as quercetin (Haleagrahara et al 2009) and eriocitrin (Minato et al 2003), have also been observed in swimming and running protocols, thereby suggesting that these flavonoids can prevent oxidative damage caused by these exercises in the brain and liver, respectively. Another study has demonstrated that antioxidants isolated from legumes inhibit xanthine oxidase (XO), which is the main enzyme related to the generation of free radicals during exercise (Gomez-Cabrera et al 2005), thereby revealing potential health benefits as natural antioxidants with therapeutic interest, i.e., dietary supplements (Spanou et al 2012). Moreover, hesperidin and its metabolites have antioxidant activity, as demonstrated by their ability to increase antioxidant enzymes and decrease oxidative stress (Tirkey et al 2005; Kim et al 2010).

In summary, the findings of the present study demonstrated that G-hesperidin supplementation alone or in combination with swimming exercise protocols (continuous

and interval) potentiates improvement of the biochemical profile and antioxidant biomarkers of rats, thereby suggesting that the use of citrus flavonoids may be beneficial to reduce risk factors of metabolic and cardiovascular diseases. Moreover, continuous swimming plus G-hesperidin supplementation presented hypolipidemic effects suggesting that G-hesperidin may be useful as an antioxidative compound to protect against oxidative damage during this type of exercise. Furthermore, G-hesperidin plus interval swimming exercise can help decrease increased levels of glucose in blood serum.

5. References

Thompson PD, Buchner D, Pina IL, Balady GJ et al; American Heart Association Council on Clinical Cardiology Subcommittee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention; American Heart Association Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism Subcommittee on Physical Activity. Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease: a statement from the Council on Clinical Cardiology (Subcommittee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention) and the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism (Subcommittee on Physical Activity). *Circulation*. 2003;107(24):3109-16.

Jeppesen J, Kiens B. Regulation and limitations to fatty acid oxidation during exercise. *J Physiol* 2012;590:1059-68.

de Araujo GG, Papoti M, Dos Reis IG, de Mello MA, Gobatto CA. Physiological responses during linear periodized training in rats. *Eur J Appl Physiol*. 2012;112(3):839-52.

Rogatto GP, Luciano E. Effects of high intensity training on glucose metabolism. *Rev Bras Ativ Fís Saúde* 2001;6:39-6.

Durstine JL, Grandjean PW, Cox CA, Thompson PD. Lipids, lipoproteins, and exercise. *J Cardiopulm Rehabil*. 2002;22(6):385-98.

Botezelli JD, Cambri LT, Ghezzi AC, Dalia RA, M Scariot PP, Ribeiro C, Voltarelli FA, Mello MA. Different exercise protocols improve metabolic syndrome markers, tissue triglycerides content and antioxidant status in rats. *Diabetol Metab Syndr*. 2011;3:35.

Frajacomo FT, Demarzo MM, Fernandes CR, Martinello F, Bachur JA, Uyemura SA, Perez SE, Garcia SB. The effects of high-intensity resistance exercise on the blood lipid profile and liver function in hypercholesterolemic hamsters. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2012;37(3):448-54.

Sachdev S, Davies KJ. Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radic Biol Med*. 2008;44(2):215-23.

Minato K, Miyake Y, Fukumoto S, Yamamoto K, Kato Y, Shimomura Y, Osawa T. Lemon flavonoid, eriocitrin, suppresses exercise-induced oxidative damage in rat liver. *Life Sci*. 2003;72(14):1609-16.

Lyall KA, Hurst SM, Cooney J, Jensen D, Lo K, Hurst RD, Stevenson LM. Short-term blackcurrant extract consumption modulates exercise-induced oxidative stress and lipopolysaccharide-stimulated inflammatory responses. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009;297(1):R70-81.

Kurowska EM, Spence JD, Jordan J, Wetmore S, Freeman DJ, Piché LA, Serratore P. HDL-cholesterol-raising effect of orange juice in subjects with hypercholesterolemia. *Am J Clin Nutr*. 2000;72(5):1095-100.

Kim HK, Jeong TS, Lee MK, Park YB, Choi MS. Lipid-lowering efficacy of hesperetin metabolites in high-cholesterol fed rats. *Clin Chim Acta*. 2003;327(1-2):129-37.

Gorinstein S, Caspi A, Libman I, Leontowicz H, Leontowicz M, Tashma Z, Katrich E, Jastrzebski Z, Trakhtenberg S. Bioactivity of beer and its influence on human metabolism. *Int J Food Sci Nutr*. 2007;58(2):94-107.

Kim HJ, Jeon SM, Lee MK, Cho YY, Kwon EY, Lee JH, Choi MS. Comparison of hesperetin and its metabolites for cholesterol-lowering and antioxidative efficacy in hypercholesterolemic hamsters. *J Med Food*. 2010;13(4):808-14

Minato K, Miyake Y, Fukumoto S, Yamamoto K, Kato Y, Shimomura Y, Osawa T. Lemon flavonoid, eriocitrin, suppresses exercise-induced oxidative damage in rat liver. *Life Sci.* 2003;72(14):1609-16.

Miyake Y, Minato K, Fukumoto S, Yamamoto K, Oya-Ito T, Kawakishi S, Osawa T. New potent antioxidative hydroxyflavanones produced with *Aspergillus saitoi* from flavanone glycoside in citrus fruit. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2003;67(7):1443-50

Cureton KJ, Tomporowski PD, Singhal A, Pasley JD, Bigelman KA, Lambourne K, Trilk JL, McCully KK, Arnaud MJ, Zhao Q. Dietary quercetin supplementation is not ergogenic in untrained men. *J Appl Physiol.* 2009;107(4):1095-104.

Di Giacomo C, Acquaviva R, Sorrenti V, Vanella A, Grasso S, Barcellona ML, Galvano F, Vanella L, Renis M. Oxidative and antioxidant status in plasma of runners: effect of oral supplementation with natural antioxidants. *J Med Food.* 2009;12(1):145-50.

Aptekmann NP, Cesar TB. Orange juice improved lipid profile and blood lactate of overweight middle-aged women subjected to aerobic training. *Maturitas.* 2010;67(4):343-7.

Oliveira CAM; Rogatto GP, Luciano E. Effects of high intensity physical training on the leukocytes of diabetic rats. *Rev Bras Med Esporte* 2002, 8(6):219-24 .

Yagi K. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. *Methods Mol Biol* 1998;108:101-6.

Nasser ALM, Dourado GKZS, Manjate DA, Carlos IZ, et al. Oxidative stress evaluation on the blood of regular consumers of orange juice. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2011;32:275-9.

Chrzczanowicz J, Gawron A, Zwolinska A, de 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.* 2008;46(3):342-9.

Lee J, Cho HS, Kim DY, Cho JY, Chung JS, Lee HK, Seong NH, Kim WK. Combined effects of exercise and soy isoflavone diet on paraoxonase, nitric oxide and aortic apoptosis in ovariectomized rats. *Appetite.* 2012;58(2):462-9.

O'Fallon KS, Kaushik D, Michniak-Kohn B, Dunne CP, Zambraski EJ, Clarkson PM. Quercetin Does Not Attenuate Changes in Markers of Muscle Function or Inflammation after Eccentric Exercise. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2012 Jul 4. [Epub ahead of print]

Botezelli JD, Cambri LT, Ghezzi AC, Dalia RA, M Scariot PP, Ribeiro C, Voltarelli FA, Mello MA. Different exercise protocols improve metabolic syndrome markers, tissue triglycerides content and antioxidant status in rats. *Diabetol Metab Syndr.* 2011;19;3:35

Kessler HS, Sisson SB, Short KR. The potential for high-intensity interval training to reduce cardiometabolic disease risk. *Sports Med.* 2012;42(6):489-509.

Colberg SR. Physical activity: the forgotten tool for type 2 diabetes management. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2012;3:70.

Little JP, Gillen JB, Percival ME, Safdar A, Tarnopolsky MA, Punthakee Z, Jung ME, Gibala MJ. Low-volume high-intensity interval training reduces hyperglycemia and increases muscle mitochondrial capacity in patients with type 2 diabetes. *J Appl Physiol.* 2011;111(6):1554-60.

Fujimoto E, Machida S, Higuchi M, Tabata I. Effects of nonexhaustive bouts of high-intensity intermittent swimming training on GLUT-4 expression in rat skeletal muscle. *J Physiol Sci.* 2010;60(2):95-101.

Liu L, Shan S, Zhang K, Ning ZQ, Lu XP, Cheng YY. Naringenin and hesperetin, two flavonoids derived from *Citrus aurantium* up-regulate transcription of adiponectin. *Phytother Res.* 2008;22(10):1400-3.

Jung UJ, Lee MK, Park YB, Kang MA, Choi MS. Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type-2 diabetic mice. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38(7):1134-45.

Fahlman MM, Boardley D, Lambert CP, Flynn MG. Effects of endurance training and resistance training on plasma lipoprotein profiles in elderly women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2002;57(2):B54-60.

Kelley GA, Kelley KS, Roberts S, Haskell W. Comparison of aerobic exercise, diet or both on lipids and lipoproteins in adults: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin Nutr.* 2012;31(2):156-67.

Hill S, Bermingham MA, Knight PK. Lipid metabolism in young men after acute resistance exercise at two different intensities. *J Sci Med Sport.* 2005;8(4):441-5

Miwa Y, Mitsuzumi H, Sunayama T, Yamada M, Okada K, Kubota M, Chaen H, Mishima Y, Kibata M. Glucosyl hesperidin lowers serum triglyceride level in hypertriglyceridemic subjects through the improvement of very low-density lipoprotein metabolic abnormality. *J Nutr Sci Vitaminol.* 2005;51(6):460-70.

Ohtsuki K, Abe A, Mitsuzumi H, Kondo M, Uemura K, Iwasaki Y, Kondo Y. Glucosyl hesperidin improves serum cholesterol composition and inhibits hypertrophy in vasculature. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2003;49(6):447-50.

Selvaraj P, Pugalendi KV. Efficacy of hesperidin on plasma, heart and liver tissue lipids in rats subjected to isoproterenol-induced cardiotoxicity. *Exp Toxicol Pathol.* 2012;64(5):449-52.

Wilcox LJ, Borradaile NM, de Dreu LE, Huff MW. Secretion of hepatocyte apoB is inhibited by the flavonoids, naringenin and hesperetin, via reduced activity and expression of ACAT2 and MTP. *J Lipid Res.* 2001;42(5):725-34.

Bok SH, Lee SH, Park YB, Bae KH, Son KH, Jeong TS, Choi MS. 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.* 1999;129(6):1182-5

Choi GS, Lee S, Jeong TS, Lee MK, Lee JS, Jung UJ, Kim HJ, Park YB, Bok SH, Choi MS. Evaluation of hesperetin 7-O-lauryl ether as lipid-lowering agent in high-cholesterol-fed rats. *Bioorg Med Chem.* 2004;12(13):3599-605.

Morin B, Nichols LA, Zalasky KM, Davis JW, Manthey JA, Holland LJ. The citrus flavonoids hesperetin and nobiletin differentially regulate low density lipoprotein receptor gene transcription in HepG2 liver cells. *J Nutr.* 2008;138(7):1274-81.

Haram PM, Kemi OJ, Lee SJ, Bendheim MØ, Al-Share QY, Waldum HL, Gilligan LJ, Koch LG, Britton SL, Najjar SM, Wisløff U. Aerobic interval training vs. continuous moderate exercise in the metabolic syndrome of rats artificially selected for low aerobic capacity. *Cardiovasc Res.* 2009;81(4):723-32.

Lira FS, Carnevali LC Jr, Zanchi NE, Santos RV, Lavoie JM, Seelaender M. Exercise intensity modulation of hepatic lipid metabolism. *J Nutr Metab.* 2012;2012:809576. Epub 2012 Apr 2.

Rothblat GH, Phillips MC. High-density lipoprotein heterogeneity and function in reverse cholesterol transport. *Curr Opin Lipidol.* 2010;21(3):229-38.

Grandjean PW, Crouse SF, Rohack JJ. Influence of cholesterol status on blood lipid and lipoprotein enzyme responses to aerobic exercise. *J Appl Physiol.* 2000;89(2):472-80.

Goto S, Naito H, Kaneko T, Chung HY, Radák Z. Hormetic effects of regular exercise in aging: correlation with oxidative stress. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2007;32(5):948-53.

Ji LL. Exercise at old age: does it increase or alleviate oxidative stress? *Ann N Y Acad Sci.* 2001;928:236-47.

Powers SK, Nelson WB, Hudson MB. Exercise-induced oxidative stress in humans: cause and consequences. *Free Radic Biol Med.* 2011;51(5):942-50.

Fogarty MC, Hughes CM, Burke G, Brown JC, Trinick TR, Duly E, Bailey DM, Davison GW. Exercise-induced lipid peroxidation: Implications for deoxyribonucleic acid damage and systemic free radical generation. *Environ Mol Mutagen.* 2011;52(1):35-42.

Ghanim H, Mohanty P, Pathak R, Chaudhuri A, Sia CL, Dandona P. Orange juice or fructose intake does not induce oxidative and inflammatory response. *Diabetes Care.* 2007;30(6):1406-11.

Gomez-Cabrera MC, Borrás C, Pallardó FV, Sastre J, Ji LL, Viña J. Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *J Physiol.* 2005;567(Pt 1):113-20.

Spanou C, Veskoukis AS, Kerasioti T, Kontou M, Angelis A, Aligiannis N, Skaltsounis AL, Kouretas D. Flavonoid glycosides isolated from unique legume plant extracts as novel inhibitors of xanthine oxidase. *PLoS One.* 2012;7(3):e32214.

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

Table 1.

Biochemical and oxidative biomarkers of rats submitted to continuous or intermittent swimming, with or without supplement of G-hesperidin.

Group Name [#]	C	CH	CS	CSH	IS	ISH
(n)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
Weight Gain, g	52.4 ± 13.0 ^a	51.4 ± 13.2 ^a	24.0 ± 11.6 ^b	25.3 ± 17.0 ^b	21.8 ± 13.9 ^b	22.0 ± 18.2 ^b
Glucose, mg/dL	93.9 ± 4.4 ^a	91.2 ± 2.5 ^{ab}	88.2 ± 2.5 ^{ab}	85.6 ± 3.9 ^{bc}	81.5 ± 6.4 ^c	75.3 ± 5.7 ^d
Triglycerides, mg/dL	147 ± 15 ^a	126 ± 13.1 ^b	122 ± 17 ^b	125 ± 7.7 ^b	115 ± 19 ^b	108 ± 12 ^b
Cholesterol, mg/dL	140 ± 22 ^{ab}	118 ± 9.7 ^c	120 ± 17 ^c	106 ± 7.1 ^d	146 ± 11.1 ^a	125 ± 10 ^b
LDL-C, mg/dL	64.9 ± 15.6 ^a	31.1 ± 14.4 ^b	31.2 ± 17.9 ^b	11.8 ± 8.3 ^c	55.2 ± 10.4 ^a	32.6 ± 10.1 ^b
HDL-C, mg/dL	45.4 ± 6.3 ^b	61.2 ± 5.2 ^a	63.9 ± 4.5 ^a	72.0 ± 8.1 ^a	68.2 ± 4.7 ^a	70.6 ± 4.9 ^a
TBARS, μM	1.30 ± 0.45 ^a	1.08 ± 0.31 ^a	1.24 ± 0.29 ^a	1.34 ± 0.18 ^a	2.23 ± 1.37 ^b	1.23 ± 0.33 ^a
DPPH, % reduction	25.2 ± 4.5 ^b	22.4 ± 3.3 ^b	9.9 ± 3.9 ^a	28.0 ± 3.6 ^c	16.4 ± 1.5 ^b	15.0 ± 13.4 ^b

[#] C = negative control, CH = positive control, CS = continuous swimming, CSH = continuous swimming + G-hesperidin, IS = interval swimming, ISH = interval swimming + G-hesperidin

Values are expressed as mean ± SD per group.

Values in the same row with different superscripts are significantly different ($p \leq 0.05$) as determined by One-Way ANOVA tested with Tukey (glucose, triglycerides, total cholesterol, LDL-C, HDL-C) or Student-Newman-Keuls (gain weight, TBARS, DPPH).

UNIVERSIDADE DE FRANCA

Pró-Reitoria de Pesquisa e de Pós-Graduação



CEUA
COMISSÃO DE
ÉTICA NO USO
DE ANIMAIS

DECLARAÇÃO

Declaro que o projeto de pesquisa (protocolo nº 0038/10), intitulado "Efeito da hesperidina glicosilada nos lípides sanguíneos e hepáticos e sobre o estresse oxidativo em ratos submetidos a exercício contínuo e intervalado", de autoria do(a) pesquisador (a) David Michel de Oliveira, por estar de acordo com os Princípios Éticos de Pesquisa em Animais adotado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de Franca - SP, foi deliberado APROVADO na reunião do dia 11 de novembro 2010.

Na oportunidade, lembramos da necessidade de entregar na Secretaria da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Franca o **RELATÓRIO FINAL** e demais documentos até **30 de maio de 2011**.

A Declaração de Aprovação para publicação dessa pesquisa será expedida pela Comissão de Ética no Uso de Animais, somente, **APÓS APROVAÇÃO DO RELATÓRIO FINAL**.

Franca, 11 de novembro de 2010.

Prof. Dr. Lucif Abrão Nascif Júnior
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade de Franca



DECLARAÇÃO

Declaro que o relatório final de pesquisa (protocolo nº 038/10), intitulado "Efeito da hesperidina glicosilada nos lípides sanguíneos e hepáticos e sobre o estresse oxidativo em ratos submetidos a exercício contínuo e intervalado", de autoria do(a) pesquisador (a) **David Michel de Oliveira**, por estar de acordo com os Princípios Éticos de Pesquisa em Animais adotado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de Franca - SP foi deliberado APROVADO em reunião EXTRAORDINÁRIA realizada no dia 28 de junho de 2012.

Franca, 28 de junho de 2012.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Lucif Nascif", is positioned above the printed name of the signatory.

Prof. Dr. Lucif Abrão Nascif Júnior
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade de Franca