

MILENA CRISTINA FILLA

CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO SUCO DE LARANJA FRESCO VERSUS
PASTEURIZADO NO SANGUE DE INDIVÍDUOS ADULTOS

Araraquara

2014

MILENA CRISTINA FILLA

CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO SUCO DE LARANJA FRESCO VERSUS
PASTEURIZADO NO SANGUE DE INDIVÍDUOS ADULTOS

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

Orientadora: Profa. Dra. Thais Borges Cesar

Co-Orientadora: Dra. Jacqueline Queiroz da Silveira

Araraquara

2014

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me transmitir força e entusiasmo, principalmente nos momentos mais difíceis ao longo do curso.

À minha família, principalmente aos meus pais, Mônica e Vitório, ao meu irmão Vinícius e aos meus avós Therezinha e João pelo imenso apoio e estímulo a continuar lutando pelo sucesso.

À minha orientadora Profa. Dra. Thais Borges Cesar, por ter me aceitado como sua aluna de iniciação científica, estando sempre pronta para sanar minhas dúvidas, além de ótima aconselhadora.

À minha co-orientadora Dra. Jacqueline Queiroz da Silveira, pelo auxílio e paciência, sempre pronta a ajudar no desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Ana Lúcia Martiniano Nasser, por me acompanhar ao longo de todo o trabalho no laboratório, com muita disposição a fim de obter os melhores resultados nos ensaios.

Aos colegas e alunos da pós-graduação, especialmente a Me. Paula Souza Ferreira, pelos momentos bons e divertidos que passei ao longo do curso.

À todos os amigos e colegas da graduação, que permitiram que eu percorresse o árduo caminho acadêmico de forma intensa e enriquecedora.

SUMÁRIO

Resumo.....	4
1. Introdução	7
2. Objetivos	11
3. Material e Métodos	12
1. Indivíduos	12
2. Suco de Laranja Fresco e Pasteurizado	12
3. Desenho Experimental.....	12
4. Avaliação do Estado Nutricional.....	13
1 Avaliação Bioquímica.....	13
5. Determinação da Atividade Antioxidante.....	13
1. Ensaio ABTS [2,2'azinobis(3-etilbenzenotiazolina 6-sulfônico)].....	13
2. Ensaio de TBARS.....	17
4. Resultados.....	21
5. Discussão.....	26
6. Conclusão.....	29
7. Referências.....	30
Anexo.....	33
Apêndice.....	35

RESUMO

O suco de laranja é um alimento rico em substâncias antioxidantes, como os flavonoides cítricos, vitamina C e carotenoides, que podem reduzir o estresse oxidativo que está relacionado à gênese das doenças cardiovasculares, diabetes e câncer. No entanto, o processamento da laranja para obtenção do suco interfere no tipo e quantidade dos compostos antioxidantes, podendo comprometer as ações esperadas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antioxidante do suco de laranja, comparando os resultados após a ingestão aguda do suco de laranja fresco e do suco de laranja pasteurizado comercialmente em indivíduos adultos saudáveis. Cada voluntário foi submetido a dois tratamentos: ingestão aguda de suco de laranja fresco e, após intervalo de 30 dias, ingestão aguda de suco de laranja pasteurizado. Nos dois tratamentos foram colhidas amostras de sangue dos indivíduos antes e após a ingestão do suco de laranja. O efeito antioxidante total foi mensurado pelo ensaio do radical $ABTS^+$ (2,2'-azinobis (3-etilbenzenotiazolina 6-sulfônico) e pelo ensaio de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) nas amostras de sangue. Observou-se um aumento de 2,2% na capacidade antioxidante do sangue a partir de 4 horas após a ingestão do suco de laranja fresco e que se manteve estável até 24 horas do consumo ($p < 0.05$). Já com a ingestão do suco de laranja pasteurizado, a capacidade antioxidante se manteve estável e equivalente ao suco de laranja fresco nas primeiras 4 horas, mas aumentou 1,4% após 8 horas, permanecendo neste nível até as 24 horas seguintes ($p < 0.05$). Após a ingestão do suco fresco, os níveis de peroxidação lipídica, diminuíram 27% nas primeiras 4 horas. Porém, a partir das 8 h retornaram ao valor inicial. Os resultados após o consumo do suco pasteurizado mostraram uma redução da peroxidação lipídica em 18% a partir das 4 horas e 8 h ($p < 0.05$), e esta redução se acentuou (27%) às 24 h ($p < 0,05$). Infere-se, portanto, que num único consumo dos sucos de laranja testados: fresco e pasteurizado, houve aumento significativo da capacidade antioxidante e redução da peroxidação lipídica, sugerindo não haver diferenças nas propriedades antioxidantes, *in vivo*, dos dois sucos avaliados.

Palavras-chaves: suco de laranja fresco, pasteurizado, capacidade antioxidante, peroxidação lipídica, soro humano

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	[2,2'azinobis(3-etilbenzenotiazolina 6-sulfônico)]
IMC	Índice de Massa Corporal
HDL-C	<i>High Density Lipoprotein-Cholesterol</i>
LDL-C	<i>Low Density Lipoprotein-Cholesterol</i>
MDA	Malondialdeído
SLF	Suco de Laranja Fresco
SLP	Suco de Laranja Pasteurizado
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TEAC	Capacidade Antioxidante em Equivalentes de Trolox

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Preparação das soluções-padrão de Trolox.....	15
Tabela 2	Absorbâncias obtidas em 734 nm para as soluções-padrão de Trolox(mM).....	16
Tabela 3	Preparo das soluções-padrão de MDA a partir de solução 125 μ M para a curva de calibração.....	18
Tabela 4	Absorbâncias obtidas em 532 nm para as soluções-padrão de MDA (μ M).....	19
Tabela 5	Caracterização antropométrica dos voluntários.....	21
Tabela 6	Variáveis bioquímicas dos voluntários antes da ingestão do suco de laranja fresco.....	22
Tabela 7	Variáveis bioquímicas dos voluntários antes da ingestão do suco de laranja pasteurizado.....	23
Tabela 8	Capacidade Antioxidante em Equivalentes de Trolox (TEAC) após ingestão de suco fresco ou pasteurizado por indivíduos eutróficos.....	24
Tabela 9	Concentração, em μ M de MDA após ingestão de suco fresco e pasteurizado, ao longo do experimento.....	25

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Flavanonas cítricas.....	8
Figura 2	Curva de Calibração e Equação da Reta (Trolox).....	16
Figura 3	Curva de Calibração e Equação da Reta (MDA).....	19

1. INTRODUÇÃO

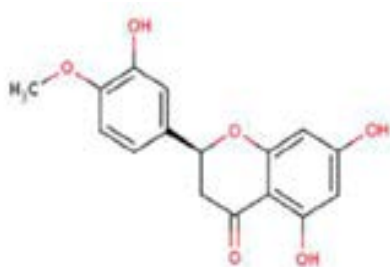
A busca por fontes naturais que retardam ou até mesmo inibam efeitos deletérios ao organismo, causados pelo desequilíbrio entre a produção e a neutralização dos radicais livres está a cada dia mais promissora. As frutas, dentre elas as cítricas, têm sido identificadas como fontes ricas em vários compostos dotados de alta capacidade neutralizadora destes radicais, apresentando propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anti-aterogênicas, associadas com a diminuição de fatores de risco de doenças crônicas degenerativas, como as doenças cardiovasculares e o câncer (LIU, 2013; FOROUDI et al, 2014).

O estresse oxidativo têm sua origem no excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) circulantes no organismo, causando danos oxidativos em estruturas celulares como membranas lipoproteicas e material genético (GIL-IZQUIERDO, 2013; GUIMARÃES et al, 2010). Estes radicais são formados naturalmente durante as reações metabólicas, e são produzidos excessivamente em patologias crônicas, como doenças cardiovasculares, diabetes e hepatite C (PARISOTTO, 2014). Felizmente o organismo possui mecanismos intrínsecos de neutralização destes radicais livres, como enzimas com atividade antioxidante. Porém, nem sempre estes mecanismos de defesa são suficientes, como nos casos exemplificados acima. Assim, a ingestão de frutas e hortaliças que contêm compostos antioxidantes, como polifenóis e o ácido ascórbico, é uma das premissas atuais da medicina preventiva, pois estes podem auxiliar o sistema de defesa antioxidante, reduzindo a ocorrência de doenças cardiovasculares, de câncer e doenças relacionadas à idade (ÇELIK, 2013; GIL-IZQUIERDO, 2013).

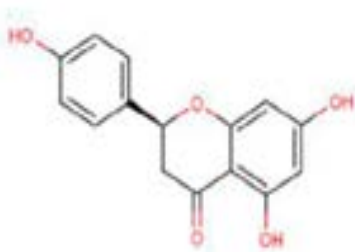
Uma das fontes antioxidantes naturais mais estudada, a laranja, tanto na forma de suco quanto sua polpa, leva ao aumento da capacidade antioxidante plasmática, aumento das enzimas hepáticas antioxidantes e à redução da peroxidação lipídica em modelos animais e humanos (FOROUDI et al, 2014). Dessa forma, a pesquisa por compostos do suco de laranja atuantes na redução de fatores de risco de doenças crônico-degenerativas levou ao conhecimento de que, não só a vitamina C e carotenoides presentes possuem atividade antioxidante, como também uma classe especial de flavonoides conhecidos como flavanonas (GUIMARÃES et al, 2010). O interesse nas flavanonas cítricas se dá pelos seus altos teores presentes na laranja e por esta fruta e seu suco ser de grande consumo na população mundial (BRETT et al, 2009; POLLARD, WHITEMAN, SPENCER, 2006; USDA, 2010).

Os flavonoides são metabólitos secundários presentes naturalmente nas plantas, dos quais se destacam as flavanonas, encontradas quase que exclusivamente em frutas cítricas e em algumas ervas aromáticas, podendo-se citar a hesperidina, naringina e eridictiol (MANACH, 2003). As formas glicosiladas, hesperidina e naringina são rutinosídeos, os quais são compostos pelas agliconas hesperitina e naringenina, respectivamente, ligadas a um açúcar (glicose ou ramnose), no carbono 7 de suas moléculas (CHANET, 2012).

Agliconas

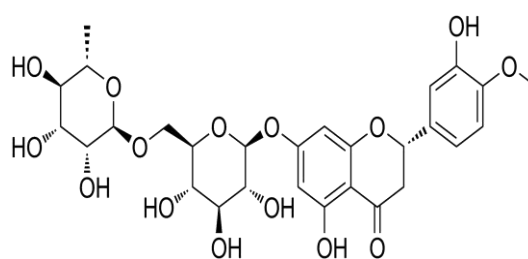


Hesperitina

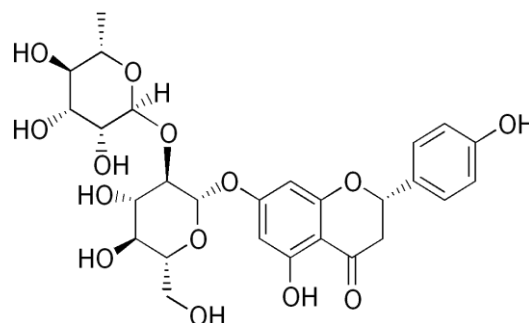


Naringenina

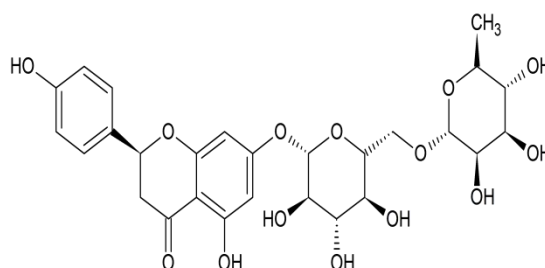
Principais glicosídeos



Hesperidina



Naringina



Narirutina

Figura 1. Flavanonas cítricas. (CHANET, 2012; WIKIPEDIA COMMONS, 2009).

Os resultados encontrados com a ingestão regular destes flavonoides são promissores, não só por exercerem efeito antioxidante, como também anti-inflamatório, redutor dos níveis sanguíneos dos lipídios e, inclusive, com atividade anticancerígena (KANAZE, 2007; YANG et al, 1997; BRETT et al, 2009; POLLARD, WHITEMAN, SPENCER, 2006). A hesperidina, principal flavanona do suco de laranja, também está relacionada à proteção vascular e à redução da pressão arterial, o que também reduz o risco de surgimento de doença cardiovascular em geral (MORAND, 2011).

No entanto, o processamento industrial do suco de laranja pode interferir na biodisponibilidade desses compostos, notadamente a vitamina C e os flavonoides em geral. Sabe-se, também, que há a predominância das flavanonas em algumas partes da fruta em detrimento de outras. As partes sólidas da laranja, particularmente o albedo e as membranas que separam seus segmentos, possuem mais flavanonas do que a polpa. Isso indica que o suco de laranja pasteurizado, no qual toda a fruta foi processada industrialmente, contém maior quantidade de flavanonas comparando-se com o suco fresco, no qual se extrai apenas a polpa e o resto é descartado (CHANET, 2012).

Adicionalmente, tem-se descrito que o suco de laranja fresco apresenta um teor 30% maior de vitamina C e 2,5 vezes mais polimetoxiflavonas do que o suco pasteurizado. Por outro lado, o suco pasteurizado apresenta 3,3 vezes mais flavanonas em comparação ao suco de laranja fresco (BALDWIN et al, 2012; MANACH et al, 2003, GIL-IZQUIERDO, 2002). Sendo assim, é provável que as diferenças na composição dos dois tipos de suco de laranja levem a propriedades antioxidantes distintas.

Portanto, para avaliar o efeito dos compostos bioativos presentes em dois tipos de suco de laranja, fresco e pasteurizado sobre a capacidade antioxidante e a peroxidação lipídica, algumas metodologias laboratoriais foram necessárias. Utilizou-se os ensaios de captura do radical $ABTS^{\cdot+}$ e das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), dentre elas o malondialdeído, para avaliação do efeito antioxidante em amostras de soro sanguíneo de um grupo relativamente homogêneo de indivíduos adultos e saudáveis. Por conseguinte, foi esperada neste estudo a ação antioxidante nos níveis sanguíneos, após a ingestão do suco de laranja, mesmo em situação de consumo agudo.

2. OBJETIVOS

- Avaliar o efeito da ingestão aguda do suco de laranja sobre a capacidade antioxidante e a peroxidação lipídica no sangue, num grupo de 24 indivíduos saudáveis
- Comparar os resultados obtidos do efeito antioxidante após a ingestão do suco de laranja fresco versus o suco de laranja pasteurizado
- Correlacionar os valores de atividade antioxidante com os dados antropométricos e bioquímicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Indivíduos

Participaram do estudo 24 indivíduos com idades entre 20 e 45 anos, saudáveis, não fumantes e não vegetarianos, sem histórico de doenças crônicas ou alterações hematológicas, e que não seguiam dieta para perda de peso corporal ou faziam uso de hormônios ou suplementos nutricionais. Os participantes foram informados detalhadamente sobre o protocolo experimental (objetivos, metodologia, benefícios e riscos) e assinaram voluntariamente o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A) previamente aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista (UNESP), CAAE nº 00558712.5.0000.5426 (Anexo A).

3.2. Suco de Laranja Fresco e Pasteurizado

Obteve-se o suco de laranja fresco a partir de laranjas (*Citrus sinensis* L. Osbeck, variedade Pera Rio) e o suco de laranja pasteurizado foi produzido a partir do mesmo lote das frutas frescas. As frutas e o suco pasteurizado foram fornecidos pelo Grupo Fisher (Matão, Brasil). O suco fresco foi obtido com o auxílio de um extrator de suco (Juice Matic MJ-20, Mulligan Associates, EUA) duas horas antes do início do experimento com os voluntários. O suco comercialmente pasteurizado, preparado industrialmente, foi armazenado em garrafas de 1L à -20°C e descongelado sob refrigeração.

3.3. Desenho Experimental

Foi solicitado aos participantes que evitassem a ingestão de alimentos cítricos por 3 dias antes de cada tratamento. Cada voluntário foi submetido a dois tratamentos, o primeiro com ingestão de suco de laranja fresco e o segundo, após intervalo de 30 dias, com suco de laranja pasteurizado. No dia de cada experimento, após um jejum de 12 horas, 15 mL de sangue foram colhidos da veia do braço antecubital de cada voluntário, com uso de agulha calibre 19 conectada a uma seringa de plástico, por funcionários do laboratório. Após esta primeira coleta, pediu-se que o voluntário ingerisse, de uma só vez, o suco de laranja. O volume de suco ingerido foi estimado de acordo com o peso corporal de cada voluntário (11.5 mL de suco/kg de peso corporal). Em seguida, foi oferecido aos voluntários um café da manhã pobre em gordura (café, leite desnatado, pão francês com 3 fatias de peito de peru light) recém

preparado. Coletas de 10 mL de sangue foram retiradas após passadas 4, 8 e 24 horas a partir da primeira coleta. Um total aproximado de 45 mL de sangue foi coletado, sendo ao total 4 coletas ao longo do dia durante cada experimento (suco fresco e com o suco comercialmente pasteurizado).

No dia de cada experimento, um almoço pobre em fitonutrientes (arroz, feijão, frango grelhado e água) e um lanche (queijo branco, bolo de fubá, leite e café) foram fornecidos. Todas as amostras de sangue foram identificadas, centrifugadas para obtenção do soro no Laboratório de Análises Clínicas São Lucas e armazenadas a -20° C.

3.4. Avaliação do Estado Nutricional

As avaliações antropométrica e hemodinâmica foram realizadas pela nutricionista e doutoranda Jacqueline Queiroz da Silveira através da pesquisa intitulada “Biodisponibilidade de flavanonas e atividade antioxidante do suco de laranja fresco versus suco de laranja pasteurizado em humanos saudáveis” e gentilmente cedidas por ela para a realização dos testes de correlação entre TBARS e ABTS com estas variáveis.

3.4.1. Avaliação Bioquímica

As variáveis bioquímicas avaliadas no soro sanguíneo foram triglicérides, colesterol total, HDL-C, glicose e insulina. As análises dos lípides foram realizadas por método espectrofotométrico enzimático e o HDL-C foi determinado por inibição seletiva, sistema para determinação homogênea direta do colesterol HDL. O valor do LDL-C foi obtido pela fórmula de Friedewald et al (1972). A glicose foi determinada por método espectrofotométrico enzimático utilizando kit comercial Glicose PapLiquiform® (Labtest). A insulina foi determinada por imuno-ensaio de electroquímio-luminescência (“ECLIA” Módulo Elecys - Roche) com kit comercial Insulin® (Roche). Estas variáveis foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas acima citado.

3.5. Determinação da Atividade Antioxidante

3.5.1 Ensaio de ABTS [2,2'-azinobis (3-etilbenzenotiazolina 6-sulfônico)]

Este ensaio se baseia na formação de um radical monocátion $\text{ABTS}^{\cdot+}$ pela oxidação da molécula ABTS em presença de persulfato de potássio e consequente redução em presença de compostos antioxidantes. A atividade antioxidante se resume na doação de hidrogênio ao radical formado, sendo esta uma reação colorimétrica, pois ocorre perda de cor proporcional à concentração de espécies antioxidantes, o que é detectado espectrofotometricamente em comprimento de onda 734 nm (RE, 1999; JANASZEWSKA, 2002).

Foram utilizados os seguintes reagentes:

- ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzenotiazolina 6-sulfônico) 7 mM
- Tampão Fosfato de Sódio 10 mM com pH 7.4
- Trolox 2 mM
- Persulfato de Potássio 2.45 mM

Para obter o tampão fosfato de sódio 10 mM a pH 7.4, preparou-se duas soluções: Solução A: solução de 20 mM de fosfato de sódio monobásico (NaHPO_4 , PM=119,98). Em balança analítica pesou-se 0,1200 g de NaHPO_4 , e diluiu-se em 50 mL de água destilada, equivalente a 0,0600 g em 25 mL de água.

Solução B: solução de 20 mM de fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4 , PM=141,96). A massa de sal pesada foi de 0,7098 g para 250 mL de água, o que equivale a 0,2839 g em 100 mL. Para obter uma solução final com pH de 7,4, adicionou-se 19 mL da solução A a 81 mL da solução B (USP, 2012), completando-se o volume para 200 mL de água destilada em balão volumétrico de 200 mL.

O Trolox foi o padrão escolhido, sendo um análogo à vitamina E, solúvel em água em pH 7.4 e que apresenta atividade antioxidante. A massa pesada de Trolox 2 mM foi de 0,0025 g para solução de 5 mL de tampão fosfato de sódio ou 0,0050 g em 10 mL.

Para obter uma solução de ABTS 7 mM pesou-se 0,0190 g deste e 0,0033 g de solução de persulfato de potássio 2,45 mM. Após a pesagem de cada reagente (ABTS, persulfato de potássio e Trolox) em béqueres individuais foi adicionado tampão fosfato de sódio 20 mM e, após isso, estes são levados ao banho de ultra-som para sua completa dissolução individualmente. Posteriormente, mistura-se o ABTS e o persulfato de potássio em balão de 5 mL e completa-se o volume com o tampão fosfato de sódio 20 mM.

A solução de ABTS e persulfato de potássio foi mantida em repouso por aproximadamente 16 horas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, tempo necessário para a formação dos radicais reativos do $\text{ABTS}^{\cdot+}$. A diluição do ABTS foi realizada sempre alguns instantes antes do uso, até uma absorbância de 0,7 em 734 nanômetros.

Após os testes com as seguintes diluições 1:88, 1:80, 1:75, 1:70, estabeleceu-se a proporção 1:70 para se atingir a absorbância desejada (JANASZEWSKA, 2002).

Etapas do Ensaio:

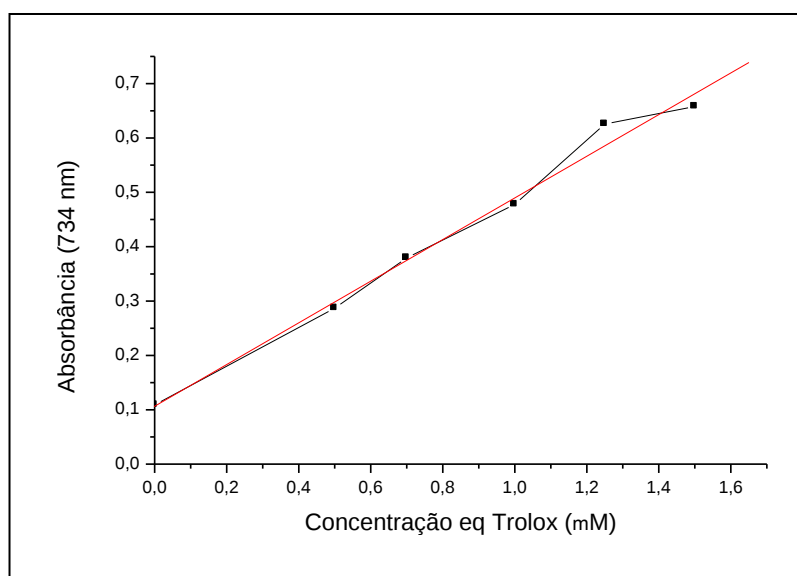
Foram pipetados 5 μL do padrão Trolox ou da amostra de soro em placa de 96 poços, adicionando-se 300 μL da solução de ABTS em cada poço com amostra ou controle, homogeneizando-se, com movimentos circulares e cuidadosos, a placa. Deixou-se reagir por 6 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz e fez-se a leitura da placa na leitora de placas a 734 nm.

Tabela 1. Preparação das soluções-padrão de Trolox

Padrão	Trolox 2mM (μL)	Tampão Fosfato (μL)	Trolox (mM)
A	0	1000	0
B	250	750	0,50
C	350	650	0,70
D	500	500	1,00
E	625	375	1,25
F	750	250	1,50
G	875	125	1,75
H	1000	0	2,00

Tabela 2. Absorbâncias obtidas em 734 nm para as soluções-padrão de Trolox (mM)

Trolox(mM)	Absorbância	Absorbância Corrigida
0,00	0,6207	0,1090
0,50	0,4427	0,2870
0,70	0,3503	0,3794
1,00	0,2517	0,4780
1,25	0,1040	0,6257
1,50	0,0720	0,6577
1,75	0,0453	0,6844
2,00	0,0450	0,6847

**Figura 2.** Curva de Calibração e Equação da Reta

$y = 0,10662 + 0,38325x$. (Onde y = absorbância e x = concentração)

Sendo $r = 0,9943$

4.2 Ensaio de TBARS (Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico)

Radicais livres advindos normalmente do metabolismo celular precisam ser continuamente neutralizados por receptores endógenos com propriedades antioxidantes. No entanto, muitas vezes a eliminação destes agentes pró-oxidantes não é satisfatória e muitos acabam se intercalando com as membranas lipídicas biológicas, levando à peroxidação das mesmas, sendo precursores de diversas desordens patológicas, como aterosclerose, danos hepáticos e outros.

Dessa forma, o ensaio utilizado para quantificação da peroxidação lipídica nas amostras de soro dos voluntários pode ser resumidamente descrita como sendo a reação entre os produtos secundários da peroxidação e o reagente adicionado TBA (ácido tiobarbitúrico). Um destes produtos secundários é o malondialdeído (MDA), o qual é o aldeído mais significativo e mais quantificado. Os resultados a serem comparados são indicados em equivalentes de MDA. Com o uso de condições adequadas à reação, como pH e temperatura, observa-se a formação de cor rósea. A reação é colorimétrica sendo medida em leitora de placas, em comprimento de onda de 532 nm (região do visível). Sendo assim, com a administração de compostos reconhecidamente antioxidantes presentes no suco de laranja (flavononas e vitamina C), pressupõe-se que os níveis de peroxidação lipídica sejam reduzidos, após a ingestão do suco (ESTEPA, 2001; OHKAWA, 1979).

Reagentes utilizados para o TBARS

- Ácido acético glacial 20%
- Hidróxido de sódio 2%
- Ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,26%
- Dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,45%
- Malondialdeído (MDA) 500 μ M

Foram pesados 0,1125 g de SDS para 25 mL de água. O malondialdeído (MDA) 500 μ M foi obtido pela hidrólise de 6 μ L de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) em 50 mL de água por 24 horas a temperatura ambiente. A partir desta solução foi preparada uma solução de MDA 125 μ M (2,5 mL de MDA 500 μ M para 10 mL de água). Para o reagente de coloração:

pipetou-se 10 mL de ácido acético glacial para 50 mL de água (completa-se o volume em balão de 50 mL). Em seguida, 1 g de hidróxido de sódio foi pesado para 50 mL de água. Pesou-se 0,520 g de TBA para uma solução de 100 mL de água. Este foi dissolvido em ácido acético 20%, adicionando-se a solução de hidróxido de sódio (pH 3.5). Por fim, acertou-se o volume com água para 100 mL. Observação: esta solução é estável por 24 horas.

Tabela 3. Preparo das soluções-padrão de MDA a partir da solução 125 μ M para a curva de calibração

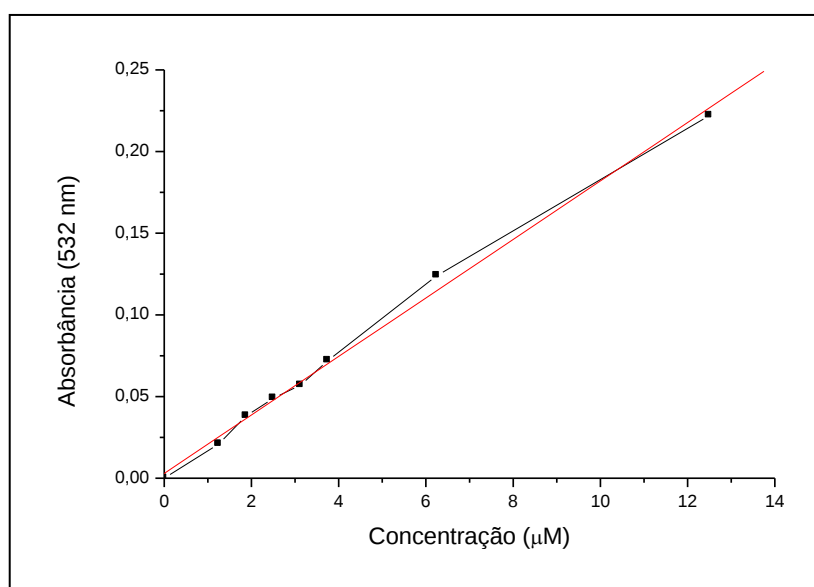
Padrões	MDA (μL)	Água (μL)	MDA (μM)
A	0	1000	0
B	10	990	1,25
C	15	985	1,875
D	20	980	2,5
E	25	975	3,125
F	30	970	3,75
G	50	950	6,25
H	100	900	12,5

Etapas do Ensaio:

Foram adicionados 200 μ L de padrão ou amostra nos tubos, juntamente com 200 μ L de SDS, levando-se ao misturador de soluções (vórtex). Adicionou-se 500 μ L de reagente de coloração, misturando-os no vórtex novamente. Fecham-se os tubos (2,5mL) contendo as amostras e padrões, aquecendo-os a 100° C por 1 hora. Após este tempo, removeu-se os tubos do aquecimento e colocou-os em banho de gelo por 15 minutos para parar a reação. Centrifugou-se os tubos por 10 minutos a 7000 rpm. Foram pipetados 200 μ L de cada padrão e amostra (sobrenadante), transferindo-os para placa de 96 poços. Por fim, fez-se a leitura da absorbância em 532 nm.

Tabela 4. Absorbâncias obtidas em 532 nm para as soluções-padrão de MDA(μM)

MDA (μM)	Média da Absorbância	Absorbância Corrigida
0	0,0422	0
1,25	0,0633	0,021
1,875	0,0803	0,038
2,5	0,0908	0,049
3,125	0,0988	0,057
3,75	0,1138	0,072
6,25	0,1662	0,124
12,5	0,2642	0,222

**Figura 3.** Curva de Calibração e Equação da Reta

$$y = 0,00294 + 0,0179x$$

onde x = concentração e y = absorbância

Sendo r = 0,9979

Análise Estatística

As características clínicas foram documentadas por estatística descritiva. Todos os resultados foram expressos em tabelas como média $\pm$ desvio padrão. As distribuições de dados foram testadas quanto à normalidade, e, subsequentemente, um t-teste foi aplicado usando Sigma Stat versão 3.11 (Systat Software Inc., EUA). Realizou-se teste de variância com Anova One-Way entre os tratamentos (sucos) e os tempos analisados (horas), com teste de *Tukey* posterior. Foram realizados testes de associação entre as variáveis (teste de correlação de Pearson). $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS

Na Tabela 5 podem-se observar as variáveis antropométricas e hemodinâmicas dos 24 voluntários, sendo 12 homens (28 ± 7 anos) e 12 mulheres (27 ± 5 anos). A partir da avaliação profissional da nutricionista responsável pelo projeto, observou-se que todos eram saudáveis, apresentando estado nutricional eutrófico ($18,5 \leq \text{IMC} \leq 24,9 \text{ kg/m}^2$). A bioimpedância elétrica permitiu a avaliação da porcentagem de gordura corporal e, somado aos valores obtidos pelas dobras cutâneas, observou-se que os homens possuíam gordura corporal moderadamente alta e as mulheres uma porcentagem alta. Pela medida da pressão arterial, concluiu-se que os voluntários eram normotensos, apresentando, em média, pressão arterial sistólica e diastólica dentro dos padrões de referência. A circunferência da cintura, uma indicadora de obesidade visceral e suas complicações, apresentou nos dois gêneros valores considerados fora de risco de doenças metabólicas.

Tabela 5. Caracterização antropométrica dos voluntários.

	Homens	Mulheres	Ambos
N	12	12	24
Idade (anos)	$27,7 \pm 6,7$	$26,8 \pm 5,0$	$27,2 \pm 5,8$
Peso (kg)	$74,5 \pm 10,1$	$62,2 \pm 10,2$	$68,3 \pm 11,7$
Altura (m)	$1,7 \pm 0,05$	$1,6 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,1$
IMC (kg/m^2)	$24,5 \pm 2,7$	$23,6 \pm 3,3$	$24,0 \pm 3,0$
Circ. Cintura (cm)	$85,5 \pm 10,2$	$73,7 \pm 7,6$	$79,6 \pm 10,7$
Bioimpedância (%)	$23,4 \pm 4,8$	$32,7 \pm 3,1$	$28,1 \pm 6,2$
Gordura Corporal (%)	$21,5 \pm 6,3$	$31,6 \pm 4$	$26,5 \pm 7,3$
Pressão Arterial Sistólica (mmHg)	122 ± 10	112 ± 12	117 ± 12
Pressão Arterial Diastólica (mmHg)	$67,1 \pm 8,5$	$72,3 \pm 10,3$	$69,7 \pm 9,6$

Classificação do IMC ($18,5 - 24,99 \text{ kg/m}^2$): Eutrofia.

Circunferência da Cintura: $<102\text{cm}$ para homens e $<88\text{cm}$ para mulheres.

% Gordura Corporal (dobras cutâneas): Densidade Corporal (Durnim e Wormsley) e % GC (Siri).

% Gordura Corporal Adequada (bioimpedância e dobras cutâneas): homens: 20% e mulheres: 25%

A avaliação dos parâmetros bioquímicos do plasma sanguíneo dos voluntários (perfil lipídico, glicêmico, insulinêmico e hemograma completo) realizada em dois momentos do experimento: 1) antes da ingestão do suco de laranja fresco (Tabelas 6) e, antes do suco de laranja pasteurizado (Tabela 7), mostraram que todas as variáveis avaliadas estavam dentro dos padrões de referência, sugerindo um estado nutricional saudável, com ausência de anemia (células vermelhas) ou infecção (células brancas). Não houve alterações entre estes parâmetros no período entre as duas etapas do experimento.

Tabela 6. Variáveis bioquímicas dos voluntários antes da ingestão do suco de laranja fresco.

Suco de Laranja Fresco				
	Homens	Mulheres	Ambos	Valores Referência
N	12	12	24	
Colesterol Total (mg/dl)	186 ± 30	167 ± 22	176 ± 27	< 200 mg/dl
HDL-C (mg/dl)	46 ± 9	63 ± 9	54 ± 13	≥ 40 mg/dl
LDL-C (mg/dl)	119 ± 24	88 ± 23	104 ± 28	< 110 mg/dl
Triglicérides (mg/dl)	102 ± 49	77 ± 27	90 ± 41	< 150 mg/dl
Glicemia (mg/dl)	85 ± 7	81 ± 4	83 ± 6	70 a 99 mg/dl
Insulinemia (uU/ml)	8 ± 7	11 ± 8	10 ± 8	< 25 uU/ml
Células Sanguíneas				
Glóbulos Brancos (mm3)	6,6 ± 5,3	7,3 ± 2,2	6,9 ± 1,8	4,0 a 11
Eritrócitos (mm3)	5,3 ± 0,3	4,8 ± 0,2	5,0 ± 0,4	4,5 a 6,1
Hemoglobina (g/dl)	15,6 ± 0,8	14,1 ± 0,8	14,8 ± 1,1	12,8 a 17,8
Hematócrito (%)	47,4 ± 2,7	43,4 ± 2,9	45,4 ± 3,4	40 a 54
VCM (fL)	90,0 ± 4,7	91,1 ± 2,8	90,6 ± 3,9	77 a 92
HCM (pG)	29,7 ± 1,3	29,6 ± 0,7	29,6 ± 1,0	27 a 32
Plaquetas (mm3)	222 ± 47	259 ± 44	240 ± 49	150 a 400
RDW-CV (%)	13,3 ± 0,7	13,3 ± 0,4	13,3 ± 0,5	11,6 a 14,6
Plaquetócrito	0,20 ± 0,05	0,27 ± 0,04	0,30 ± 0,10	0,15 a 0,34
Neutrófilos (%/mm3)	3,3 ± 0,8	4,7 ± 2,0	4,0 ± 1,6	2,0 a 7,5
Linfócitos (%/mm3)	2,5 ± 0,5	2,1 ± 0,4	2,3 ± 0,5	1,5 a 4,0
Monócitos (%/mm3)	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,1	2,3 ± 0,5	0,2 a 1,5
Eosinófilos (%/mm3)	0,2 ± 0,1	0,09 ± 0,05	0,1 ± 0,1	0,1 a 0,4
Basófilos (%/mm3)	0,04 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,02	0,0 a 0,1

HDL: High Density Lipoprotein, LDL: Low Density Lipoprotein, VCM: Volume Corpuscular Médio, HCM: Hemoglobina Corpuscular Médio, RDW-CV Red Blood Cell Distribution Width measured by Variation Coefficient.

Tabela 7. Variáveis bioquímicas dos voluntários antes da ingestão do suco de laranja pasteurizado.

N	Suco de Laranja Pasteurizado			Valores Referência
	Homens 12	Mulheres 12	Ambos 24	
Colesterol Total (mg/dl)	185 ± 36	166 ± 24	175 ± 31	< 200 mg/dl
HDL-C (mg/dl)	43 ± 10	58 ± 12	51 ± 13	≥ 40 mg/dl
LDL-C (mg/dl)	118 ± 29	94 ± 25	175 ± 31	< 110 mg/dl
Triglicérides (mg/dl)	114 ± 73	66 ± 27	90 ± 59	< 150 mg/dl
Glicemia (mg/dl)	81 ± 7	76 ± 5	79 ± 7	70 a 99 mg/dl
Insulinemia (uU/ml)	10 ± 8	8 ± 4	9 ± 6	< 25 uU/ml
Células Sanguíneas				
Glóbulos Brancos (mm3)	6,4 ± 1,4	6,7 ± 1,6	6,9 ± 1,8	4 a 11
Eritrócitos (mm3)	5,2 ± 0,3	4,6 ± 0,3	5,0 ± 0,4	4,5 a 6,1
Hemoglobina (g/dl)	15,3 ± 0,7	13,7 ± 0,9	14,8 ± 1,1	12,8 a 17,8
Hematócrito (%)	47,4 ± 3,5	41,5 ± 3,8	45,4 ± 3,4	40 a 54
VCM (fL)	90,9 ± 8,7	89,3 ± 4,2	90,6 ± 3,9	77 a 92
HCM (pG)	29,3 ± 1,3	29,2 ± 1,3	29,6 ± 1,0	27 a 32
Plaquetas (mm3)	221 ± 45	267 ± 49	240 ± 49	150 a 400
RDW-CV (%)	13,7 ± 1,3	13,2 ± 0,6	13,3 ± 0,5	11,6 a 14,6
Plaquetócrito	0,20 ± 0,05	0,30 ± 0,1	0,30 ± 0,1	0,15 a 0,34
Neutrófilos (%/mm3)	3,2 ± 0,7	4,0 ± 1,4	4,0 ± 1,6	2,0 a 7,5
Linfócitos (%/mm3)	2,4 ± 0,7	2,1 ± 0,4	2,3 ± 0,5	1,5 a 4,0
Monócitos (%/mm3)	0,6 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,2 a 1,5
Eosinófilos (%/mm3)	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 a 0,4
Basófilos (%/mm3)	0,03 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,02	0,0 a 0,1

HDL: High Density Lipoprotein, LDL: Low Density Lipoprotein, VCM: Volume Corpuscular Médio, HCM: Hemoglobina Corpuscular Médio, RDW-CV Red Blood Cell Distribution Width measured by Variation Coefficient.

A análise da atividade antioxidante, com o uso do ensaio do radical ABTS⁺, foi realizada com as amostras de plasma coletadas no período de jejum (0h), 4h, 8h e 24 horas após a ingestão do suco de laranja fresco na primeira etapa. Quanto à avaliação dos níveis de peroxidação lipídica, obtidos com ensaio TBARS, utilizou-se das mesmas amostras.

Os resultados encontrados em equivalentes de Trolox (TEAC) com o ensaio de ABTS estavam dentro dos parâmetros aceitáveis para indivíduos saudáveis, assim como no ensaio do

TBARS (em equivalentes de MDA). As médias, com seus respectivos desvios-padrão, obtidas no ensaio de ABTS após experimento com o suco de laranja fresco (SLF) e com o pasteurizado (SLP), encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8. Capacidade Antioxidante em Equivalentes de Trolox (TEAC) após ingestão de suco fresco ou pasteurizado por indivíduos eutróficos.

TEAC (mM)	Suco de Laranja	
	Fresco	Pasteurizado
0h	1,39 ± 0,03 ^a	1,40 ± 0,02 ^a
4h	1,42 ± 0,04 ^b	1,40 ± 0,03 ^a
8h	1,41 ± 0,03 ^b	1,42 ± 0,02 ^b
24h	1,41 ± 0,02 ^b	1,41 ± 0,03 ^b

Média ± DP.

Letras diferentes significam diferenças significantes ($p \leq 0.05$).

Diferenças detectadas pelo teste ANOVA de duas entradas para medidas repetidas.

Observou-se que a capacidade antioxidante aumentou 2,2% a partir das 4 horas da ingestão do suco de laranja fresco e se manteve estável até 24 horas ($p < 0.05$). Já no consumo do suco de laranja pasteurizado, a capacidade antioxidante se manteve nas primeiras 4 horas, mas aumentou 1,4% após 8 horas, permanecendo neste nível até as 24 horas ($p < 0,05$).

Os níveis de concentração de TBARS (as médias e seus respectivos desvios-padrão), em equivalentes de MDA (μM), podem ser observados na Tabela 9. Verificou-se que, após a ingestão do suco fresco, houve uma rápida diminuição de 27% nas primeiras 4 horas. Porém, a partir das 8 h até as 24 h, retornaram ao valor inicial. Da mesma forma, o suco pasteurizado reduziu os níveis de TBARS em 18% a partir das 4 horas e 8 h ($p < 0.05$), e esta redução se acentuou (27%) às 24 h ($p < 0,05$).

Tabela 9. Concentração, expressa em μM de MDA, após ingestão de suco fresco e pasteurizado, ao longo do experimento.

MDA (μM)	Suco de Laranja	
	Fresco	Pasteurizado
0h	$4,47 \pm 1,04^b$	$5,81 \pm 1,81^c$
4h	$3,28 \pm 0,64^a$	$4,74 \pm 1,10^b$
8h	$5,25 \pm 1,39^b$	$4,44 \pm 2,17^b$
24h	$4,76 \pm 1,40^b$	$3,32 \pm 1,62^a$

Média $\pm$ DP.

Letras diferentes significam diferenças significantes ($p \leq 0,05$).

Diferenças detectadas pelo teste ANOVA de duas entradas para medidas repetidas.

Correlação do TBARS e ABTS com variáveis antropométricas e bioquímicas

Com relação ao experimento com a ingestão aguda do suco de laranja fresco, observou-se associações inversamente relacionadas à capacidade antioxidante, mensurada pelo ensaio do radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$, e aos fatores de risco para doenças crônicas. Houve correlação inversa entre o aumento dos níveis de capacidade antioxidante sanguínea (após 24 horas de ingestão do suco) e a diminuição da porcentagem de gordura corporal, medida pelo teste de bioimpedância elétrica ($r = -0,41$, $p < 0,05$). Com o fator peso corporal ($r = -0,04$, $p < 0,03$), índice de massa corporal ($r = -0,43$, $p < 0,04$), colesterol total ($r = -0,39$, $p < 0,06$), insulina ($r = -0,47$, $p < 0,02$) e triglicérides ($r = -0,81$, $p < 0,00$), estes foram associados negativamente aos níveis de capacidade antioxidante no sangue no tempo zero (jejum). Já com o experimento com suco de laranja pasteurizado, associações negativas foram encontradas entre porcentagem de gordura corporal ($r = -0,41$, $p = 0,05$) e capacidade antioxidante (tempo 24h). Níveis de triglicérides ($r = -0,55$, $p = 0,01$) e insulina ($r = -0,43$, $p < 0,04$) também eram inversamente proporcionais à capacidade antioxidante sanguínea dos indivíduos.

Correlações entre os resultados do ensaio de TBARS e as variáveis antropométricas e bioquímicas não foram consideradas, por não apresentarem significância estatística ($p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho, as características antropométricas, hemodinâmicas e bioquímicas dos indivíduos participantes apresentaram-se normais, ou seja, os voluntários possuíam parâmetros clínicos homogêneos. Por meio do índice de massa corporal (IMC) e da circunferência da cintura os indivíduos foram classificados com estado nutricional dentro da eutrofia e sem riscos de doenças cardiovasculares, respectivamente. Os níveis de pressão arterial, sistólica e diastólica, estavam normais e não apresentaram diferenças entre os sexos durante a intervenção. O perfil glicêmico, insulinêmico e lipídico de ambos os gêneros, também apresentaram valores dentro dos padrões de referência.

O estudo verificou que a ingestão de ambos os sucos de laranja aumentou a capacidade antioxidante no soro humano. Porém, tais resultados puderam ser visualizados apenas com uma ingestão única de suco de laranja, demonstrando a alta capacidade antioxidante da vitamina C, carotenoides e flavonoides presentes no suco. Assim, os resultados puderam ser vistos mesmo sem ingestões em longo prazo.

Os resultados encontrados para os níveis de TBARS, em equivalentes de MDA, mostraram que houve uma redução significativa de seus níveis plasmáticos nos indivíduos, com ambos os sucos, a partir das 4 horas da ingestão, confirmando também a propriedade antioxidante dos compostos bioativos presentes na laranja, em diminuir reações danosas às estruturas celulares, que podem levar às patologias crônicas.

De fato, estudos têm mostrado que o consumo regular de suco de laranja reduz efetivamente o marcador de peroxidação lipídica e aumenta a atividade antioxidante no sangue. Sanches-Moreno e colaboradores (2003) observaram algumas propriedades da vitamina C após duas intervenções distintas, sendo uma dose-resposta, com ingestão única de 500 mL de suco de laranja; e outra múltipla-dose-resposta, com duas doses de 250 mL por dia, durante duas semanas. O consumo de suco de laranja aumentou as concentrações plasmáticas de vitamina C em 40-64% após 3 horas da ingestão, e este aumento foi inversamente relacionado à diminuição das concentrações de prostaglandina 8-epi-PGF_{2α}. Como os níveis elevados de prostaglandinas estão presentes no estresse oxidativo, a redução observada da 8-epi-PGF_{2α} pela ação da vitamina C indica que esta possui papel importante na redução do surgimento de produtos da peroxidação lipídica por radicais livres de oxigênio, sendo uma excelente fonte de antioxidantes. Snyder e colaboradores (2011) também

relatarem, utilizando o ensaio ORAC, que o consumo de suco de laranja elevou a capacidade antioxidante e reduziu a oxidação lipídica plasmática (pelo método de oxidação plasmática induzida por cobre) no período pós-prandial, momento no qual se observa elevado estresse oxidativo. Outro dado consistente é de Foroudi e colaboradores (2014), indicando da mesma forma, que o consumo diário de dois copos e meio de suco de laranja aumenta a capacidade antioxidante total e reduz a concentração plasmática de MDA, que é um dos produtos da peroxidação lipídica. Guimarães e colaboradores (2010) constatarem que os níveis elevados de vitamina C e de flavonoides, principalmente hesperidina e narinrutina, foram os responsáveis por elevar significativamente a capacidade antioxidante sanguínea, confirmando que estes compostos bioativos agem como moléculas com alta capacidade neutralizadora dos radicais livres presentes no organismo, como as espécies reativas de oxigênio (EROS) e de nitrogênio (ERNS). O desequilíbrio dos níveis destas espécies radicalares em comparação com os níveis de moléculas antioxidantes é o grande causador de patologias crônicas como a aterosclerose, diabetes, inflamações crônicas e até alguns tipos de câncer.

Infere-se, portanto, que numa única dose (média de 786 mL) dos sucos de laranja testados: fresco e pasteurizado, houve aumento significativo da capacidade antioxidante e redução da peroxidação lipídica (um indicativo de dano estrutural das células), sugerindo que, em geral, não houve diferença no efeito antioxidante, *in vivo*, após a ingestão dos dois sucos de laranja.

O estudo de correlação indicou que indivíduos com maior peso corporal, IMC, colesterol total, insulina e triglicérides, possuem menor quantidade de compostos antioxidantes distribuídos pelo sangue, o que leva ao maior risco de desenvolvimento de patologias crônico-degenerativas. Em especial com o parâmetro triglicérides, observou-se que em 81% dos indivíduos, quanto maiores seus níveis de triglicérides, menor sua capacidade antioxidante, indicada por níveis menores de TEAC (capacidade antioxidante em equivalentes de Trolox).

Algumas correlações também puderam ser encontradas durante o experimento com o suco de laranja pasteurizado. No jejum, indivíduos com maiores níveis de triglicérides ($r = -0,55$, $p < 0,01$) e insulina ($r = -0,43$, $p < 0,04$) apresentaram menores níveis de TEAC, da mesma forma que no experimento anterior. Também, após as 24 horas de ingestão do suco pasteurizado, encontrou-se uma correlação inversa entre a capacidade antioxidante sanguínea dos indivíduos e a porcentagem de gordura corporal, ou seja, maiores níveis de antioxidantes

são encontrados naqueles com menores porcentagens de gordura no corpo, o que pode estar relacionado à maior capacidade antioxidante prévia observada nestes indivíduos.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho possibilitou a comparação da capacidade antioxidante do suco de laranja obtido por dois processos diferentes: fresco (espremido na hora) e pasteurizado (comercial), após a ingestão de uma dose aguda, em indivíduos saudáveis.

O estudo da correlação entre a atividade antioxidante, os dados antropométricos e bioquímicos dos voluntários mostrou que, em ambos os sucos, a porcentagem de gordura corporal interfere na ação antioxidante dos compostos dos sucos no soro sanguíneo, ou seja, quanto maior a quantidade de gordura distribuída pelo organismo menor é o efeito antioxidante.

Conclui-se que uma única dose de suco de laranja, tanto fresco quanto pasteurizado, aumenta a capacidade antioxidante no sangue, sugerindo que o suco pode prevenir o estresse oxidativo em humanos, se ingerido a curto prazo, comprovando que as ações benéficas dos flavanonas cítricas e vitamina C presentes nos sucos são indiferentes ao tipo de processamento do suco.

7. REFERÊNCIAS

BALDWIN, E.A.; BAI, J.; PLOTTO, A.; CAMERON, R.A.; LUZIO, G.; NARCISO, J.; MANTHEY, J.; WIDMER, W.; FORD, B. L. Effect of extraction method on quality of orange juice: hand squeezed, commercial-fresh squeezed and processed. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.92, p. 2029-42, 2012.

BRETT, G.M.; HOLLANDS, W.; NEEDS, P.W.; TEUCHER, B.; DAINITY, J.R.; DAVIS, B.D.; BRODBELT, J.S.; KROON, P.A. Absorption, metabolism and excretion of flavanones from single portions of orange fruit and juice and effects of anthropometric variables and contraceptive pill use on flavanone excretion. **British Journal of Nutrition**, v.101 (5), p. 664–675, 2009.

ÇELİK, E.E.; GÖKMEN, V.; FOGLIANO, V. Soluble antioxidant compounds regenerate the antioxidants bound to insoluble parts of foods. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 61 (43), p. 10329-34, 2013.

CESAR, T.B.; NANCY, A.P. Long-term orange juice consumption is associated with low LDL-cholesterol and apolipoprotein B in normal and moderately hypercholesterolemic subjects. **Lipids in Health and Disease**, v. 12:119, 2013.

CHANET, A.; MILENKOVIC, D.; MANACH, C.; MAZUR, A.; MORAND, C. Citrus flavanones: what is their role in cardiovascular protection? **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 60(36), p. 8809-22, 2012.

ESTEPA, V.; RÓDENAS, S.; MARTÍN, M.C. Optimización de um método para la determinación de la peroxidación lipídica em suero humano. **Anales de la Real Academia de Farmacia**, v.67, 2001.

FOROUDI, S.; POTTER, A.S.; STAMATIKOS, A.; PATIL, B.S.; DEYHIM, F. Drinking Orange Juice Increases Total Antioxidant Status and Decreases Lipid Peroxidation in Adults. **Journal of Medicinal Food**, p. 1–6, 2014.

GIL-IZQUIERDO, A.; ESCUDERO-LÓPEZ, B.; CERRILLO, I.; HERRERO-MARTÍN, G.; HORNERO-MÉNDEZ, D.; MEDINA, S.; FERRERES, F.; BERNÁ, G.; MARTÍN, F.; FERNÁNDEZ-PACHÓN, M.S. Fermented orange juice: source of higher carotenoid and flavanone contents. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 61 (37), p. 8773-82, 2013.

GIL-IZQUIERDO, A.; GIL, M.I.; FERRERES, F. Effect of processing techniques at industrial scale on orange juice antioxidants and beneficial health compounds. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 28:50(18), p.5107-14, 2002.

GUIMARÃES, R.; BARROS, L.; BARREIRA, J.C.; SOUSA, M.J.; CARVALHO, A.M.; FERREIRA, I.C. Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: grapefruit, lemon, lime and orange. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48(1), p.99-106, 2010.

INSTITUTE OF MEDICINE. The National Academies Press. Food and Nutrition Board. National Academy of Science. **Dietary Reference Intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids (Macronutrients)**, 2005.

JANASZEWSKA, A.; BARTOSZ, G. Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. **Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation**, v.62, p.231-6, 2002.

KANAZE, F.I.; BOUNARTZI, M.I.; GEORGARAKIS, M.; NIOPAS, I. Pharmacokinetics of the citrus flavanone aglycones hesperetin and naringenin after single oral administration in human subjects. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 61 (4), p.472-7, 2007.

LIU, R.H. Dietary bioactive compounds and their health implications. **Journal of Food Science**, v. 78, 2013.

MANACH, C.; MORAND, C.; GIL-IZQUIERDO, A.; BOUTELOUP-DEMANGE, C.; REMESY, C. Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.57, p. 235–42, 2003.

MORAND, C.; MILENKOVIC, D.; DEVAL, C.; DUBRAY, C.; MAZUR, A. Hesperidin displays relevant role in the nutrigenomic effect of orange juice on blood leukocytes in human volunteers: a randomized controlled cross-over study. **PLoS One**, v.6(11):e26669, 2011.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v.95, p.351-8, 1979.

PARISOTTO, E.B.; GARLET, T.R.; CAVALLI, V.L.; ZAMONER, A.; DA ROSA, J.S.; BASTOS, J.; MICKE, G.A.; FRÖDE, T.S.; PEDROSA, R.C.; WILHELM FILHO, D. Antioxidant intervention attenuates oxidative stress in children and teenagers with Down syndrome. **Research in Developmental Disabilities**, v. 35(6), p.1228-36, 2014.

POLLARD, S.E.; WHITEMAN, M.; SPENCER, J.P. Modulation of peroxynitrite-induced fibroblast injury by hesperetin: a role for intracellular scavenging and modulation of ERK signalling. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.347, p.916–923, 2006.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v.26, p.1231-7, 1999.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; CANO, M.P.; BEGOÑA, A.; PLAZA, L.; OLMEDILLA, B.; GRANADO, F.; MARTÍN, A. Effect of orange juice intake on vitamin C concentrations and biomarkers of antioxidant status in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.78, p.454–60, 2003.

SNYDER, S.N.; REBER, J.D.; FREEMAN, B.L.; ORGAD, K.; EGGETT, D.L.; T.L., PARKER. Controlling for sugar and ascorbic acid, a mixture of flavonoids matching navel

oranges significantly increases human postprandial serum antioxidant capacity. **Nutrition Research**, v.31, p.519–526, 2011.

USDA. **Nutrient Database for standard reference**, 2010. Disponível em <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/nut_search_new.pl>. Acesso em: 21 ago. 2013.

USP. **Manual de Técnicas em Histologia e Biologia Celular do Laboratório de Biologia Celular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, 2002. Disponível em <<http://www.direxlim.usp.br/download/manualtecnicas.pdf>>. Acesso em: 28 mar. 2014.

WIKIPEDIA COMMONS. **File: Hesperidin Structure.png**, 2007. Disponível em <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hesperidin_structure.png>. Acesso em: 28 nov. 2014.

WIKIPEDIA COMMONS. **File: Naringin Structure.png**, 2006. Disponível em <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Naringin_structure.png>. Acesso em: 28 nov. 2014.

WIKIPEDIA COMMONS. **File: Narirutin.png**, 2013. Disponível em <<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Narirutin.png>>. Acesso em: 28 nov. 2014.

YANG, M.; TANAKA, T.; HIROSE, Y.; DEGUCHI, T.; MORI, H.; KAWADA, Y. Chemopreventive effects of diosmin and hesperidin on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced urinary-bladder carcinogenesis in male ICR mice. **International Journal of Cancer**, v.73, p.719-24, 1997.

ANEXO

Anexo A. Aprovação Comitê de Ética

FACULDADES DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DO CÂMPUS DE ARARAQUARA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Biodisponibilidade de fitonutrientes e atividade antioxidante do suco de laranja fresco versus suco de laranja pasteurizado em humanos saudáveis

Pesquisador: Thais Borges Cesar

Área Temática: Área 8. Pesquisa com cooperação estrangeira.

Versão: 3

CAAE: 00558712.5.0000.5426

Instituição Proponente: Faculdades de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 129.084

Data da Relatoria: 30/10/2012

Apresentação do Projeto:

O projeto encontra-se bem redigido e contempla os itens necessários ao Protocolo de Pesquisa.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo é claro e encontra-se bem delimitado.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A análise crítica dos riscos e desconfortos está bem detalhada.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa pretende compreender a diferença entre a biodisponibilidade dos fitonutrientes e a capacidade antioxidante do suco de laranja fresco em comparação ao suco de laranja comercialmente pasteurizado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Protocolo adequado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Rodovia Araraquara Jaú, Km 1

Bairro: Campus Universitário

CEP: 14.801-902

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: 1633-0168

Fax: 1633-2200

E-mail: sta@fctar.unesp.br; diretor@fctar.unesp.br

APÊNDICE

Apêndice A. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Nome.....,
 RG....., estado civil....., idade.....,
 residente à rua

 bairro....., cidade....., telefones
 de contato, declaro ter sido orientado e esclarecido sobre o
 protocolo de pesquisa a seguir:

O senhor(a) está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa que pretende verificar se a ingestão de suco de laranja comercial pasteurizado e de suco de laranja fresco, tomado em duas ocasiões diferentes com um intervalo mínimo de 30 dias, contribui para melhorar a capacidade de neutralizar compostos nocivos produzidos pelo organismo (capacidade antioxidante), de reduzir o colesterol e o açúcar do sangue, prevenindo contra as doenças do coração e o diabetes.

Ao participar desta pesquisa, o senhor(a) será submetido(a) a avaliação física e nutricional em duas ocasiões distintas, no início do estudo e após 30 dias, e que será perguntado sobre sua saúde pessoal e sua alimentação usual. Também participará de duas avaliações bioquímicas, que incluem a colheita de sangue e urina em duas ocasiões distintas. O pesquisador responsável irá orientá-lo sobre os procedimentos que serão realizados durante a pesquisa e que são descritos a seguir, e também poderá orientá-lo sobre uma dieta adequada.

O senhor(a) deverá beber em duas ocasiões um total de aproximadamente 6 copos de suco de laranja, sendo na primeira ocasião oferecido 3 copos de suco de laranja fresco, e na segunda ocasião 3 copos de suco de laranja integral pasteurizado, havendo um período não inferior a 30 dias entre as ingestões de suco. Também é necessário para evitar interferência nos resultados que o senhor(a) se abstenha de consumir suco de laranja ou a laranja durante os 3 dias que antecedem o dia do consumo de suco de laranja fresca ou do suco de laranja pasteurizado do experimento.

O senhor(a) deverá doar um total de 160mL de sangue em duas ocasiões (80 mL por vez) para a determinação dos lípidos (colesterol e triglicérides), glicemia e insulina, e para avaliar a atividade contra compostos nocivos no sangue (atividade antioxidante). A colheita de sangue será feita durante 24 h, sendo que a primeira colheita, de 15 mL, antecede a ingestão do suco de laranja. As demais colheitas, de 10 mL cada, serão feitas após ingestão do suco, nos tempos de 4 h, 5 h, 6 h, 7h e 8 h. Haverá ainda uma colheita de sangue de 15 mL 24h após a ingestão do suco. A colheita de sangue será

realizada em sala específica para exames clínicos laboratoriais, utilizada para os exames de longa duração, com cadeiras reclináveis, ambiente com temperatura confortável, com televisão e revistas para entretenimento. O local de colheita será o Laboratório de Análises Clínicas São Lucas, Avenida Feijó 1013, Centro, Araraquara, SP.

O senhor(a) deverá realizar colheitas de urina nos dias relativos a ingestão do suco de laranja fresco e pasteurizado. A urina será colhida espontaneamente durante o período de 24 h após a ingestão do suco de laranja fresco ou pasteurizado, em local privado, com material descartável e após a higienização corporal, a ser instruída pelo pesquisador.

A sua participação na pesquisa será voluntária e livre de qualquer ônus, inclusive receberá ressarcimento para o deslocamento visando à colheita de dados dietéticos, físicos e exames clínicos, e também receberá alimentação (café da manhã, almoço e lanche da tarde) nas ocasiões em que efetuará a colheita de sangue e de urina.

É necessário informá-lo que durante a pesquisa o senhor(a) não poderá estar sob tratamento medicamentoso para controle do colesterol ou de triglicérides, ou fazendo suplementação com vitaminas, minerais ou bioflavonoides, e se necessitar de medicamentos ou suplementos, o senhor(a) deverá informar imediatamente o pesquisador sobre esta nova condição de saúde.

Os riscos que o senhor(a) será submetido(a) ao participar desta pesquisa são mínimos, apenas terá o desconforto das colheitas de sangue que serão feitas em local confortável, com material descartável para a retirada do sangue, buscando o menor desconforto possível com equipamentos que minimizem a punção venosa, como por exemplo agulhas ultrafinas e sistema de escalpo para redução do número de punções, sendo necessária três punções venosas para a colheita de 8 amostras de sangue durante um intervalo de 24 h. No total, contabilizando as duas etapas experimentais, a primeira com o suco de laranja fresco e a segunda com o suco de laranja pasteurizado, deverão ser realizadas 6 punções venosas (bem sucedidas) para a retirada do sangue.

O senhor(a) deverá retornar ao laboratório caso seja solicitado pelos pesquisadores, com ressarcimentos de despesas com transporte.

Para assegurar sua privacidade, o seu nome será mantido em sigilo antes, durante e após a pesquisa, e se desejar, receberá informações sobre o resultado da pesquisa.

O senhor(a) poderá desistir da pesquisa em qualquer momento, sem nenhum prejuízo ou penalização, mas que avisará os pesquisadores se isto ocorrer.

O senhor(a) deverá notificar qualquer situação de anormalidade relacionada à pesquisa e para tanto deverá entrar em contato com o pesquisador responsável pelos telefones: (16) 3301-6927 e/ou (16) 3301-4690. Para outros esclarecimentos e reclamações, o senhor(a) poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, Rodovia Araraquara-Jaú, km 1, Araraquara, São Paulo, telefone: (16)3301-6897.

Pelo presente esclarecimento, o senhor(a) concorda em participar do estudo: “Biodisponibilidade de fitonutrientes e atividade antioxidante do suco de laranja fresco versus suco de laranja pasteurizado em humanos saudáveis”, sob responsabilidade da pesquisadora Prof^a. Dra. Thais Borges Cesar.

Araraquara, ____/____/____

Assinatura do Voluntário

Assinatura do Pesquisador

DADOS FINAIS

Araraquara, de de 2014

De acordo,

Orientadora Profa. Dra. Thais Borges Cesar

Aluna Milena Cristina Filla