CARLA DE OLIVEIRA BARBOSA ROSA

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE COMPOSTOS NATURAIS – CURCUMINA E HESPERIDINA NA HIPERLIPIDEMIA INDUZIDA EM COELHOS

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae.*

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA

Página BANCA

A DEUS,

"... Toda glória; pois Dele, para Ele e por meio Dele são todas as coisas".

À Santa Mãe de Deus,

que me protege em todos os momentos da minha vida.

Dedico

Ao meu esposo, José Francisco, e às minhas filhas, Mariana e Ana Carolina, que me compreenderam e me incentivaram - vocês são o grande presente de Deus na minha vida.

Ofereço.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força, pela vida e por esse presente especial.

Ao meu esposo José Francisco, pelo amor incondicional, pela ajuda, pelo carinho e, acima de tudo, por ser meu maior incentivador.

Às minhas filhas Ana Carolina e Mariana, pela paciência, pelo amor maravilhoso e por superarem com força a ausência física da mãe nessa fase.

Aos meus pais, irmãos, sobrinhos, cunhados e amigos que estiveram presentes com suas orações e preocupações, pelo carinho e exemplo.

À Lurdes das Dores Santos, pelo apoio e pela dedicação à minha família.

À professora Tânia Toledo, pela orientação, pelos ensinamentos, pela compreensão e, sobretudo, pela valiosa amizade.

Aos professores Adelson Araújo Tinôco e Jacqueline Isaura Alvarez Leite, pelos ensinamentos, pela colaboração, pelo incentivo constante e pela valiosa amizade.

Aos professores Tanus Nagem, Márcia Regina Pereira e Neuza Maria Brunoro Costa, pelas sugestões e críticas.

À minha amiga Luciana Cardoso, pelo auxílio durante a realização deste trabalho e pelo exemplo profissional e ético.

À Maria Aparecida, pelas oportunas colaborações.

Ao Departamento de Bioquímica e Imunologia Nutricional da Universidade Federal de Minas Gerais, pelo acolhimento.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Eduardo, pela ajuda e compreensão.

BIOGRAFIA

CARLA DE OLIVEIRA BARBOSA ROSA, filha de Geraldo Vaz de Melo Barbosa e Francisca de Oliveira Barbosa, nasceu em Viçosa, Minas Gerais, em 18 de agosto de 1971.

Em março de 1989, iniciou o curso de Nutrição na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em agosto de 1993.

Em setembro de 1993, ingressou no Programa de Pós-Graduação em nível de Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal de Viçosa e, em março de 1996, recebeu o título de *Magister Scientiae*.

Em maio de 2006, na mesma instituição, iniciou o Programa de Pós-Graduação em nível de Doutorado em Bioquímica Agrícola, submetendo-se à defesa de tese em maio de 2009.

SUMÁRIO

Página

FIGURAS E GRÁFICOS ix

QUADRO E TABELAS xii

RESUMO xiv

ABSTRACT xvi

1. INTRODUÇÃO 1

2. OBJETIVOS 5
   2.1. Objetivo Geral 5
   2.2. Objetivos Específicos 5

3. REVISÃO DE LITERATURA 7
   3.1. Colesterol 7
      3.1.1. Biossíntese do Colesterol 8
      3.1.2. Absorção de Colesterol 11
      3.1.3. Circulação Êntero-Hepática 13
      3.1.4. Transporte de Colesterol 14
      3.1.5. Degradação e Excreção do Colesterol 19
   3.2. Triacilgliceróis 20
   3.3. Flavonoides e Doenças Cardiovasculares 21
   3.4. Curcumina e Doenças Cardiovasculares 36

4. METODOLOGIA 47
4.1. Modelo Animal 47
4.2. Separação dos Animais em Grupos e Preparo da Dieta 47
4.3. Utilização das Substâncias-Teste 48
4.4. Análises de Lipídios Sanguíneos 49
4.4.1. Determinação do Colesterol 49
4.4.2. Determinação do Triacilglicerol 50
4.4.3. Determinação do Colesterol-HDL 51
4.5. Análise de Parâmetros de Toxicidade Aguda 51
4.5.1. Determinação da Transaminase Glutâmico Pirúvico (TGP)... 51
4.5.2. Determinação da Transaminase Glutâmico Oxalacético (TGO) 52
4.5.3. Determinação do Ferro 53
4.5.4. Fosfatases..... 54
4.5.5. Determinação do Gama GT..... 55
4.6. Análise Estatística 55

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 57

6. CONCLUSÕES..... 81

REFERÊNCIAS 84

FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1 – Síntese de colesterol. Após a ação da hidrometilglutaril (HMG) CoA redutase, o HMG é transformado em mevalonato – primeiro passo comprometido com a síntese de colesterol. Os demais passos ocorrem em inúmeras reações e dão origem ao esqualeno, o último precursor linear do colesterol, que originará o lanosterol, e este, através de várias reações, originará o colesterol. 10

Figura 2 – Metabolismo de lipoproteínas. O metabolismo das lipoproteínas está mostrado por linhas sólidas, e o transporte de colesterol, quando não contido nas lipoproteínas, está indicado por linhas pontilhadas. VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade; IDL: lipoproteína de densidade intermediária; LDL: lipoproteína de baixa densidade; HDL: lipoproteína de alta densidade; LCAT: lecitina: colesterol acil:transferase; CETP: proteína de transferência de éster de colesterol; Apo B-100, Apo B-48, Apo E, Apo C-II, Apo A-I e Apo A-II: apolipoproteínas B-100, B-48, E, C-II, A-I e A-II, respectivamente. 17

Figura 3 – Hidrólise enzimática da G-hesperidina a hesperetina. 32

Figura 4 – Cinética da hesperidina. 33

Figura 5 – Possível via da absorção de hesperidina e hesperidina-7-glicosídeo, mostrando a mudança proposta no sítio de absorção da hesperidina do cólon ao intestino delgado. 34

Figura 6 – Estrutura química da curcumina..... 37

Figura 7 – Estruturas químicas dos principais metabólitos de curcumina identificados em roedores ou em seres humanos. 37

Figura 8 – Caminhos metabólicos da curcumina demonstrados em modelos pré-clínicos. Os caminhos metabólicos mostrados foram demonstrados em ratos, em culturas *ex vivo* de hepatócitos de ratos ou em culturas *ex vivo* de hepatócitos humanos..... 39

Figura 9 – Propriedades biológicas da curcumina. 39

Figura 10 – Representação gráfica da atividade de curcumina em eventos redox celulares. A curcumina pode prevenir (cruzes escuras) ou facilitar a proteção contra (+) a geração de sequela celular de RNS e ROS, dependente da posição celular (CUR = curcumina; RNS = espécie de nitrogênio reativa; ROS = espécie de oxigênio reativa; e UV = luz ultravioleta). 45

Figura 11 – Representação gráfica do potencial da curcumina na proteção cardiovascular (AD = átrio direito; VD = ventrículo direito; AE = átrio esquerdo; VE = ventrículo esquerdo; IL = interleucina; MAPK = proteína quinase mitogênica ativada; MMP = matriz metaloproteinase; LDL = lipoproteína de baixa densidade; NF-B = fator-kappa nuclear B; NOS = óxido nítrico sintase; e TNF = fator de necrose de tumoral.... 46

Gráfico 1 – Percentuais de variação de colesterol total em relação ao G2 com hiperlipidemia induzida por colesterol (C) e ácido cólico (AC). 64

Gráfico 2 – Percentuais de variação de colesterol-HDL em relação ao G2 com hiperlipidemia induzida por colesterol (C) e ácido cólico (AC). 65

Gráfico 3 – Percentuais de variação de triacilgliceróis em relação ao G2 com hiperlipidemia induzida por colestrol (C) e ácido cólico (AC). 68

Gráfico 4 – Percentuais de variação de ferro em relação ao G2 com hiperlipidemia induzida por colesterol (C) e ácido cólico (AC). 71

Gráfico 5 – Percentuais de variação de TGO (UI/dL) em relação ao G2 com hiperlipidemia induzida por colesterol (C) e ácido cólico (AC). 73

Gráfico 6 – Percentuais de variação de TGP (UI/dL) em relação ao G2 com hiperlipidemia induzida por colesterol (C) e ácido cólico (AC). 74

Gráfico 7 – Percentuais de variação de fosfatase alcalina em relação ao G2 com hiperlipidemia induzida por colesterol (C) e ácido cólico (AC). 78

Gráfico 8 – Percentuais de variação de gama GT em relação ao G2 com hiperlipidemia induzida por colesterol (C) e ácido cólico (AC). 80

QUADRO E TABELAS

Quadro 1 – Características das lipoproteínas plasmáticas 16

Tabela 1 – Tratamento das cobaias conforme distribuição dos grupos . 48

Tabela 2 – Médias de colesterol total (mg/dL), em soro sanguíneo de coelhos machos avaliados após 30 dias em diferentes tratamentos, e seus respectivos percentuais de variação em relação ao grupo (G2) com hiperlipidemia induzida por colesterol (C) e ácido cólico (AC). Viçosa, Minas Gerais, 2008..... 58

Tabela 3 – Médias de colesterol-HDL (mg/dL), em soro sanguíneo de coelhos machos avaliados após 30 dias em diferentes tratamentos, e seus respectivos percentuais de variação em relação ao grupo (G2) com hiperlipidemia induzida por colesterol (C) e ácido cólico (AC). Viçosa, Minas Gerais, 2008..... 64

Tabela 4 – Médias de triacilgliceróis (mg/dL), em soro sanguíneo de coelhos machos avaliados após 30 dias em diferentes tratamentos, e seus respectivos percentuais de variação em relação ao grupo (G2) com hiperlipidemia induzida por colesterol (C) e ácido cólico (AC). Viçosa, Minas Gerais, 2008 . 67

Tabela 5 – Médias de ferro (mg/dL), em soro sanguíneo de coelhos machos avaliados após 30 dias em diferentes tratamentos, e seus respectivos percentuais de variação em relação ao grupo (G2) com hiperlipidemia induzida por colesterol (C) e ácido cólico (AC). Viçosa, Minas Gerais, 2008..... 70

Tabela 6 – Médias de TGO (UI/mL), em soro sanguíneo de coelhos machos avaliados após 30 dias em diferentes tratamentos, e seus respectivos percentuais de variação em relação ao grupo (G2) com hiperlipidemia induzida por colesterol (C) e ácido cólico (AC). Viçosa, Minas Gerais, 2008 73

Tabela 7 – Médias de TGP (UI/mL), em soro sanguíneo de coelhos machos avaliados após 30 dias em diferentes tratamentos, e seus respectivos percentuais de variação em relação ao grupo (G2) com hiperlipidemia induzida por colesterol (C) e ácido cólico (AC). Viçosa, Minas Gerais, 2008..... 74

Tabela 8 – Médias de fosfatase alcalina, em soro sanguíneo de coelhos machos avaliados após 30 dias em diferentes tratamentos, e seus respectivos percentuais de variação em relação ao grupo (G2) com hiperlipidemia induzida por colesterol (C) e ácido cólico (AC). Viçosa, Minas Gerais, 2008..... 76

Tabela 9 – Médias de GAMA GT, em soro sanguíneo de coelhos machos avaliados após 30 dias em diferentes tratamentos, e seus respectivos percentuais de variação em relação ao grupo (G2) com hiperlipidemia induzida por colesterol (C) e ácido cólico (AC). Viçosa, Minas Gerais, 2008 79

RESUMO

ROSA, Carla de Oliveira Barbosa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2009. **Avaliação do efeito de compostos naturais – curcumina e hesperidina na hiperlipidemia induzida em coelhos**. Orientadora: Tânia Toledo de Oliveira. Coorientadores: Adelson Luiz Araújo Tinoco, Tanus Jorge Nagem, Jacqueline Isaura Alvarez Leite e Aloísio da Silva Pinto.

Com o objetivo de avaliar o efeito dos compostos naturais na redução do colesterol e triglicerídeos sanguíneos, procedeu-se à experimentação com coelhos hipercolesterolêmicos. Foram estudados dois compostos naturais: o corante natural curcumina e o flavonoide hesperidina, isolados e de forma associada. As substâncias-teste foram fornecidas em diferentes doses de 20 e 40 mg, por via oral, em cápsulas. A hiperlipidemia dos coelhos foi alcançada suplementando-se as dietas com 1% de colesterol cristalino e 0,5% de ácido cólico. A concentração total de colesterol aumentou consideravelmente nos animais alimentados com dieta contendo colesterol + ácido cólico, quando comparada com o grupo que recebeu apenas ração. Os tratamentos com curcumina nas doses de 20 e 40 mg provocaram redução de 50 e 53%, respectivamente, no colesterol sanguíneo em relação ao grupo com hiperlipidemia induzida por colesterol e ácido cólico, e de 36 e 1% no parâmetro HDL-c; portanto, a dose de

40 mg foi mais eficaz. O grupo tratado com atorvastatina cálcica teve redução de 36% nos níveis de colesterol total e aumentou o HDL-c em 5%. A concentração total de triacilgliceróis foi 53,47% maior nos animais alimentados com dieta contendo colesterol + ácido cólico, em relação ao grupo que recebeu apenas ração. A hipertrigliceridemia produzida pela dieta rica em colesterol + ácido cólico foi significativamente reduzida nos animais tratados com curcumina a 20 e 40 mg, que tiveram porcentagens de redução de 54 e 15% nos níveis de triacilglicerol, respectivamente. O grupo tratado com hesperidina teve uma redução no colesterol de 12% na dose de 40 mg, porém na dose de 20 mg houve aumento no colesterol total em 12%. Os níveis de HDL-colesterol foram reduzidos em 9% na dosagem de 20 mg e apresentaram um aumento de 8% na de 40 mg. O grupo tratado com atorvastatina cálcica teve redução de 59% nos níveis de triacilglicerol. Também o grupo tratado com hesperidina mostrou redução de 50 e 43% nas doses de 40 e 20 mg, respectivamente. Quando se usou a associação curcumina + hesperidina (20 mg), verificou-se redução de 24% no colesterol total. Já a curcumina + hesperidina na dose de 40 mg reduziu o colesterol total em 9%. Ambas as associações provocaram a redução do HDL-colesterol em 13 e 25%, nas doses de 20 e 40 mg, respectivamente. As associações curcumina + hesperidina tiveram redução menor do que nas doses isoladas para triacilgliceróis, porém significativa (36 e 42%) nas doses de 20 e 40 mg, respectivamente. Na dose de 40 mg, a associação entre a hesperidina e a curcumina foi mais eficaz do que na dose isolada de curcumina a 40 mg. De maneira geral, os compostos naturais curcumina e hesperidina, com exceção da hesperidina a 20 mg, apresentaram ação farmacológica bastante acentuada no metabolismo lipídico de coelhos hiperlipidêmicos, sem, contudo, causar efeitos de toxidade aguda, evidenciados pelos níveis normais de TGO, TGP, GAMA GT, fosfatase alcalina e ferro.

ABSTRACT

ROSA, Carla de Oliveira Barbosa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2009. **Evaluation of the effect of the natural compounds curcumin and hesperidin on hiperlipidemia induced in rabbits**. Adviser: Tânia Toledo de Oliveira. Co-advisers: Adelson Luiz Araújo Tinoco, Tanus Jorge Nagem, Jacqueline Isaura Alvarez Leite and Aloísio da Silva Pinto.

This work aimed to evaluate the effect of natural compounds on the reduction of blood cholesterol and triglycerides in an experiment with hypercholesterolemic rabbits. Two natural compounds were analyzed: the colorant curcumin and the flavonoid hesperidin, isolated and in combination. The test-substances were supplied at different doses of 20 and 40 mg, orally, in capsules. Hiperlipidemia in the rabbits was attained by supplying the diets with 1% crystalline cholesterol and 0.55 colic acid. Total cholesterol concentration increased considerably in the animals fed diet containing cholesterol + colic acid, when compared with the group fed only ration. The curcumin treatments at doses of 20 and 40 mg provoked a reduction of 50 and 53%, respectively, in blood cholesterol in the group with hiperlipidemia induced by cholesterol and colic acid and of 36 and 1% in the HDL-c parameter; thus, the 40 mg dose was the most effective. The calcic atorvastatin-treated group had a reduction of 36% in the total

cholesterol levels and increased HDL-c in 5%. Triacylglycerol total concentration was 53.47%, higher in the animals fed diet containing cholesterol + colic acid than in the group fed only ration. Hipertriglyceridemia produced by diet rich in cholesterol + colic acid was significantly reduced in the animals treated with curcumin at 20 and 40 mg, with reduction percentages of 54 and 15% at the triacylglycerol levels, respectively. The hesperidin-treated group had a cholesterol reduction of 12% at the dose of 40 mg, but at the dose of 20 mg there was an increase of 12% in total cholesterol. The HDL-cholesterol levels were reduced in 9% at the dose of 20 mg and had an increase of 8% at the dose of 40 mg. The group treated with calcic-atorvastin had a reduction of 59% at the triacylglycerol levels. Also, the hesperidin-treated group showed a reduction of 50 and 43% at the doses of 40 and 20 mg, respectively. When the combination curcumin + hesperidin (20 mg) was used, a reduction of 24% in total cholesterol was verified, while the combination curcumin + hesperidin at the dose of 40 mg reduced total cholesterol in 9%. Both combinations led to an HDL-cholesterol reduction of 13 and 25%, at the doses of 20 and 40 mg, respectively. The combinations curcumin + hesperidin had a smaller, though significant, reduction (36 and 42%) at the doses of 20 and 40 mg, respectively, than in the isolated doses for triacylglycerols. At the dose of 40 mg, the combination hesperidin +curcumin was more effective than in the isolated dose of curcumin at 40 mg. Overall, the natural compounds curcumin and hesperidin, except for hesperidin at 20 mg, presented pharmacological action rather accentuated on the lipid metabolism of hiperlipidemic rabbits, without, however, causing acute toxicity effects, as evidenced by the normal levels of TGO, TGP, GAMA GT, alkaline phosphatase and iron.

1. INTRODUÇÃO

Os alimentos não são mais vistos meramente como uma forma de saciar a fome, de prevenir doenças causadas pela dieta deficiente e para prover os nutrientes necessários à construção, manutenção e reparo de tecidos, como água, proteína, carboidratos, lipídios, vitaminas e minerais. Os alimentos têm se tornado primariamente o veículo para nos transportar no caminho para a saúde ótima e bem-estar. A dieta tem sido reconhecida como a primeira linha de defesa na diminuição do risco de diversas doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como câncer, doenças cardiovasculares, osteoporose, artrite e degeneração macular relacionada à idade. O papel da alimentação equilibrada na manutenção da saúde tem despertado interesse da comunidade científica, que tem produzido inúmeros estudos com o intuito de comprovar a atuação de certos alimentos na prevenção de doenças.

As doenças cardiovasculares representam atualmente as patologias mais intimamente relacionadas com a dieta, e são elas as responsáveis pela elevada morbidade e mortalidade nos países industrializados. São caracterizadas como: doenças coronarianas, cardiovasculares e vasculares periféricas (MANCINI-FILHO, 2006).

Durante os últimos trinta anos tem-se presenciado declínio razoável da mortalidade por causas cardiovasculares em países desenvolvidos,

enquanto elevações relativamente rápidas e substanciais têm ocorrido em países em desenvolvimento, entre os quais o Brasil. De acordo com as projeções da Organização Mundial de Saúde (OMS), essa tendência de elevação na doença cardiovascular tende a persistir, agravando ainda mais o quadro de morbidade e mortalidade elevadas nesses países (IV DIRETRIZES..., 2007).

O desenvolvimento das doenças cardiovasculares é influenciado por diferentes fatores, relacionados com a fisiologia, a genética, as condições ambientais e o estresse. Os principais fatores de risco incluem, além do hábito de fumar, a pressão sanguínea elevada, o nível de colesterol aumentado, a obesidade, o diabetes e o teor elevado dos triglicerídeos, sendo eles na sua maioria associados, de alguma forma, aos alimentos, ao estilo de vida e aos hábitos alimentares (MANCINI-FILHO, 2006).

A maioria das doenças cardiovasculares é resultante de complicações da aterosclerose, a qual é caracterizada, essencialmente, pelo desenvolvimento de uma lesão na parede arterial. A aterosclerose desenvolve-se lentamente iniciando-se nos primeiros anos de vida e podendo culminar, posteriormente, em graves complicações clínicas, como ulcerações e rupturas, que podem evoluir para oclusões agudas trombóticas, contribuindo com a alta mortalidade e morbidade.

A formação da placa aterosclerótica inicia-se com a agressão ao endotélio vascular devido a diversos fatores de risco, como elevação de lipoproteínas aterogênicas (LDL, IDL, VLDL, remanescentes de quilomícrons), hipertensão arterial ou tabagismo. Como consequência, a disfunção endotelial aumenta a permeabilidade da íntima às lipoproteínas plasmáticas, favorecendo a retenção destas no espaço subendotelial. Retidas, as partículas de LDL sofrem oxidação, causando a exposição de diversos neoepítopos, tornando-as imunogênicas. O depósito de lipoproteínas na parede arterial, processo-chave no início da aterogênese, ocorre de maneira proporcional à concentração dessas lipoproteínas no plasma (IV DIRETRIZES..., 2007).

Estudos epidemiológicos têm estabelecido a importância de fatores dietéticos no desenvolvimento de doenças cardiovasculares em homens e animais, evidenciando relação direta entre o nível de lipídios no sangue,

principalmente o colesterol, e o grau de aterogênese. O colesterol sérico total e a fração LDL podem ser aumentados pela ingestão excessiva de calorias, gorduras saturadas e colesterol dietético e, possivelmente, por proteína animal. Entretanto, podem ser reduzidos por diminuição do peso corporal, substituição dietética dos ácidos graxos saturados por ácidos graxos polinsaturados, fibra solúvel e pelo consumo de alguns alimentos com componentes ativos hipocolesterolemiantes.

Entre os constituintes ativos dos alimentos estão os flavonoides, que são encontrados em quase todas as plantas e possuem várias propriedades farmacológicas e toxicológicas. Inúmeras pesquisas já constataram que eles possuem atividades múltiplas, como vasodilatadores, anticarcinogênicas, anti-inflamatórias, antibacterianas, antialérgicas, antivirais, antioxidantes e hipolipidêmicas.

Os flavonoides são compostos naturais amplamente encontrados em frutas e vegetais. Por possuírem atividade antioxidante pronunciada sobre a LDL e consequente ação inibidora sobre a formação da placa ateromatosa, essas substâncias apresentam o perfil adequado para terapia da doença aterosclerótica. Atualmente, os flavonoides aparecem como excelentes candidatos em pesquisa, uma vez que são capazes de atenuar o estresse oxidativo em doenças como câncer, diabetes melito, aterosclerose, entre outras.

A hesperidina é um flavonoide extraído de frutas cítricas. A alta ingestão dietética de flavonoides tem sido associada a uma significativa redução da mortalidade por doenças cardiovasculares, porém são necessários estudos de dosagem para o efeito desejado.

Também o corante extraído do rizoma seco de *Curcuma longa* L., cujo principal princípio ativo é a curcumina, tem sido usado no sistema tradicional da medicina indiana, sendo utilizada como digestivo, carminativo, antiespasmódico, antioxidante, antidiarreico, diurético, excitante, nas doenças do fígado, entre outras. As pesquisas atuais apontam uma diversidade de ações proporcionadas pela curcumina, como: antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral, antibacteriana e antifúngica, além de sua atuação hipoglicemiante e na redução dos níveis séricos de colesterol total, LDLc, VLDLc e triacilglicerol, entre outros.

Diante disso, a realização de estudos a fim de obter novos agentes químicos extraídos de plantas, bem como para buscar maior compreensão de seus mecanismos de ação, propriedades farmacológicas e funcionais, assume papel fundamental para a nutrição humana e os seus princípios como ciência.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar os possíveis efeitos do flavonoide hesperidina e do corante natural curcumina, isolados e de forma associada, no metabolismo lipídico de coelhos alimentados com dieta aterogênica.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da suplementação com cápsulas de hesperidina, em diferentes doses, na lipemia dos animais.
- Avaliar o efeito da suplementação com cápsulas de curcumina, em diferentes doses, na lipemia dos animais.
- Avaliar o efeito da suplementação com cápsulas de curcumina e hesperidina associadas, em diferentes doses, na lipemia dos animais.
- Avaliar o efeito da suplementação com cápsulas de *oxi free* e citoprópolis, em doses comercializadas, na lipemia dos animais.
- Determinar os níveis sanguíneos de colesterol total, colesterol HDL e triacilgliceróis dos coelhos.

- Verificar parâmetros sanguíneos que indiquem hepatotoxicidade aguda dos compostos estudados (TGO, TGP, Gama GT, Fosfatase Alcalina, Ferro).
- Comparar os efeitos dos compostos estudados com a atorvastatina cálcica.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Colesterol

Quando os nutrientes, na corrente sanguínea, atravessam as membranas celulares no organismo, eles entram nos processos metabólicos da célula. O metabolismo pode ser referido como um processo pelo qual as células convertem os nutrientes dos alimentos em energia útil, que pode ser utilizada para realização de trabalho, assim como para síntese de novos compostos vitais para estruturação e função celulares.

Por muitos anos, o metabolismo de colesterol tem sido objeto de grande interesse científico.

O colesterol, uma molécula anfipática que possui um núcleo esteroide e uma cauda ramificada de hidrocarboneto, é o constituinte essencial dos tecidos animais e desempenha papel de componente estrutural da maioria das membranas celulares. É também o precursor da vitamina D, ácidos biliares, hormônios adrenocorticais (aldosterona) e hormônios sexuais (estrogênio, testosterona e progesterona), além de controlar a biossíntese de fosfolipídios. Por outro lado, é um dos maiores constituintes das placas ateroscleróticas; é reconhecido que os níveis plasmáticos aumentados de colesterol são um dos fatores de risco mais importantes para as doenças cardiovasculares (DCV).

Em razão de sua baixa solubilidade, mecanismos especiais são requeridos para transporte de colesterol no organismo, entre os quais se incluem as lipoproteínas para transporte no plasma, receptores de membranas celulares e soluções micelares para excreção biliar e absorção intestinal.

Por ser um componente essencial de todas as células animais, o colesterol é ingerido exclusivamente nos alimentos de origem animal. Apesar de a dieta conter colesterol, a maior parte da sua composição corporal é originada da síntese endógena. Um adulto necessita de cerca de 1 g/dia de colesterol. Deste, 800 mg são sintetizados diariamente no fígado, pele e intestinos, sendo apenas 200 mg necessários da dieta.

3.1.1. Biossíntese do Colesterol

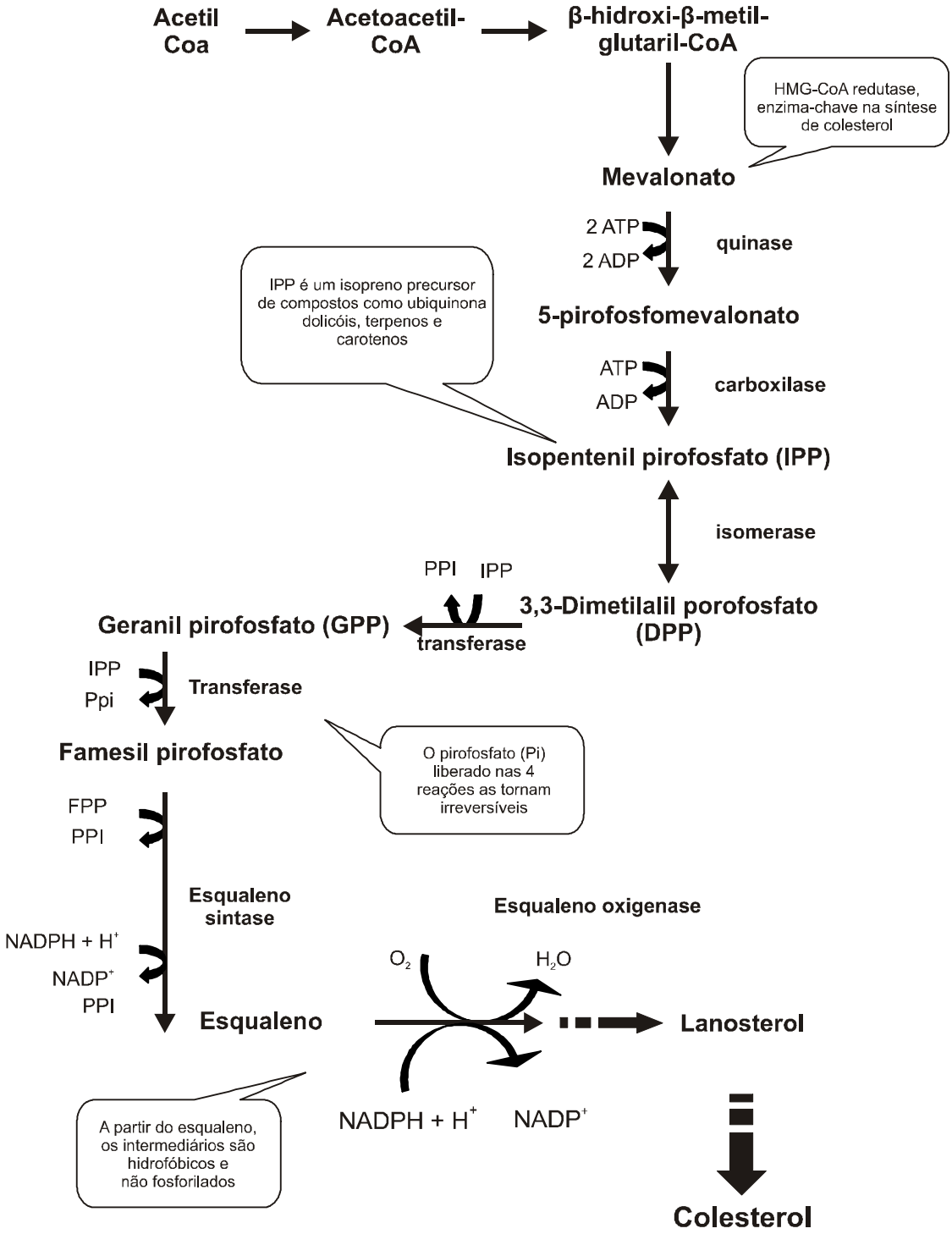
Todos os 27 átomos de carbono de cadeia de colesterol são derivados do acetil CoA. Na primeira etapa, duas moléculas de acetil-CoA condensam-se, originando a acetacetil-CoA. Esta, por sua vez, reage com uma terceira molécula de acetil-CoA, formando β-hidro-β-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), reação catalisada pela HMG-CoA sintase. Pela ação de outra enzima, HMG-CoA redutase, HMG-CoA é reduzida a mevalonato. Esse passo irreversível é a etapa limitante na síntese de colesterol, sendo a HMG-CoA redutase enzima-chave nessa reação (SABARENSE; PELUZIO, 2008):

$$\text{HMG CoA} + 2\ \text{NADPH} + 3H^{+} \rightarrow \text{Mevalonato} + 2\ \text{NADP}^{+}\ \text{CoA}$$

Essa etapa também é de importância clínica, uma vez que as drogas de primeira escolha no tratamento da hipercolesterolemia, como a lovastatina e mevastatina, são inibidores reversíveis e competitivos da HMG-CoA redutase. A enzima tem sua atividade regulada pelo colesterol intracelular, isto é, quando há excesso ou deficiência de colesterol no ambiente intracelular, a HMG-CoA redutase tem sua atividade diminuída ou aumentada, respectivamente (CHAMPE; HARVEY, 2002; ALVAREZ-LEITE; PELUZIO, 2003).

Nos passos seguintes o mevalonato, então, é convertido em isopentenil pirofosfato (IPP), um isoprenoide de cinco carbonos utilizado como bloco básico para construção do colesterol nas reações subsequentes (Figura 1). O IPP condensa-se ao seu isômero (dimetilalil pirofosfato), formando o intermediário de 10 carbonos, geranil pirofosfato (GPP), que, após nova condensação com IPP, resulta em farnesil pirofosfato (FPP) com 15 átomos de carbono. Duas moléculas de FPP unem-se para dar origem ao intermediário linear de 30 carbonos, o esqualeno. Na etapa final da síntese ocorre a ciclização do esqualeno a lanosterol, em várias etapas. Finalmente, o lanosterol é convertido em colesterol pela remoção de três grupos metila, redução de uma ligação por NADPH e migração de outra dupla ligação (ALVAREZ-LEITE; PELÚZIO, 2003).

O fígado desempenha um papel central na regulação do balanço corporal do colesterol. O colesterol presente no fígado provém de diversas fontes, incluindo o colesterol da dieta, o colesterol sintetizado pelos tecidos extra-hepáticos e a síntese de “novo” colesterol pelo fígado. Não existe uma via de catabolismo do colesterol, sendo este eliminado pelo fígado inalterado como sais biliares secretados na bile ou retirado da circulação pelas células que necessitem desse esterol como precursor de outras moléculas.



Fonte: Alvarez-Leite e Peluzio (2003).

Figura 1 – Síntese de colesterol. Após a ação da hidrometilglutaril (HMG) CoA redutase, o HMG é transformado em mevalonato – primeiro passo comprometido com a síntese de colesterol. Os demais passos ocorrem em inúmeras reações e dão origem ao esqualeno, o último precursor linear do colesterol, que originará o lanosterol, e este, através de várias reações, originará o colesterol.

3.1.2. Absorção de Colesterol

A absorção consiste primariamente na transferência de nutrientes do lúmen do intestino delgado, através do epitélio intestinal, para a lâmina própria, onde os nutrientes penetram na circulação e nos vasos linfáticos.

Com relação à absorção de colesterol, sabe-se que ele é somente absorvido na forma livre e incorporado aos quilomícrons (VIEIRA et al., 1995).

O colesterol existe nas formas livre e esterificada, as quais, ao chegarem ao duodeno, vão-se misturar com o colesterol livre, que é excretado com a bile e com o colesterol para o lúmen intestinal pelas células, em razão da descamação da mucosa intestinal, formando assim um “pool” de colesterol. O colesterol de origem biliar e o dietético diferem em vários aspectos. O colesterol dietético é esterificado em até 65%, enquanto o colesterol biliar existe na forma livre, o que provavelmente explica as diferenças de eficiência de absorção do colesterol da dieta (34%) e do biliar (46%). Este último também é absorvido em local mais proximal no intestino delgado (SHILLS, 2002).

A hidrólise do colesterol esterificado é catalisada pela enzima colesterol-esterase presente no suco pancreático e que é ativada pelos sais biliares, a qual produz colesterol e ácido graxo livre.

Por ser hidrofóbico, o colesterol requer um sistema especializado para que a digestão e a absorção possam ocorrer dentro do meio hidrossolúvel; por isso, ele é solubilizado e incorporado no centro hidrofóbico das micelas.

A formação de micelas é de extrema importância para melhor absorção do colesterol, pois é após essa solubilização na fase micelar que ele vai ser absorvido, por um mecanismo facilitado por proteínas carreadoras de esterol específicas residentes na membrana dos enterócitos.

Os ácidos biliares são responsáveis pelo efeito detergente das micelas e são essenciais para a absorção de colesterol. O principal fator limitante da velocidade de absorção, associado à absorção mais baixa de colesterol, é a sua baixa solubilidade micelar.

Diversos fatores podem causar decréscimo real ou aparente da absorção de colesterol. Desde a década de 1980, alguns desses fatores metabólicos foram descritos, como: baixa quantidade de ácidos biliares; aumento da velocidade do trânsito intestinal, com decréscimo no tempo disponível para absorção; redução na secreção da lipase pancreática, retirando assim o colesterol da fase micelar; deficiência na capacidade da mucosa intestinal em esterificar o colesterol; e competição para absorção do colesterol biliar com o colesterol exógeno (GRUNDY, 1983).

O tipo de dieta ingerida também pode ser um dos fatores que alteram a disponibilidade de absorção do colesterol, bem como os compostos bioativos presentes em alimentos.

A ação hipocolesterolemiante de alguns ácidos graxos poli-insaturados tem sido intensamente demonstrada. Os mecanismos de ação incluem a inibição da síntese endógena e da esterificação do colesterol, o aumento da excreção de colesterol na bile e o aumento da síntese de sais biliares (ALVAREZ-LEITE; ROSA, 2008).

A presença de fibra na dieta resulta em alta viscosidade do líquido intraluminal, e o maior volume do conteúdo intestinal pela retenção de água leva ao “sequestro” de ácidos biliares secretados pelo fígado (fruto do catabolismo do colesterol). O mecanismo pelo qual a fibra sequestra os ácidos biliares não está bem entendido, mas pode estar relacionado com interações hidrofóbicas (grupos fenólicos das fibras) e iônicas (ácidos urônicos das fibras), que levam ao aumento da excreção fecal desses ácidos, impondo ao fígado uma maior conversão de colesterol em ácidos biliares para manter estável o *pool* destes últimos. Além disso, a indisponibilidade dos ácidos biliares no intestino para a formação de micelas inibe a absorção de lipídios e colesterol (ALVAREZ-LEITE; ROSA, 2008).

A presença dos fitosteróis nos alimentos, em função da sua estrutura molecular, pode colaborar de forma efetiva com a diminuição da absorção do colesterol (SCALBERT et al., 2005). Apesar de a estrutura química dos fitosteróis ser semelhante à do colesterol, eles são pouco absorvidos pelo intestino, situando-se na faixa de 0,4 a 3,5% (MANCINI-FILHO, 2006).

A possível explicação para a baixa absorção dos fitosteróis é a pequena atividade que a acil coenzima A colesterol acil transferase (ACAT) apresenta nesses compostos (OSTLUND et al., 2002) Também foi observado que o colesterol, devido à baixa solubilidade, quando na presença dos fitosteróis, se precipita, não sendo dessa forma absorvido pelo intestino (AMSTRONG; CAREY, 1987). A inibição da absorção do colesterol induz consequentemente a deficiência deste; assim, o organismo, em resposta, aumenta a sua síntese endógena, procurando compensar a inibição da sua absorção (MANCINI-FILHO, 2006).

As saponinas formam complexos insolúveis com β-hidroxiesteroides, diminuindo a absorção intestinal de colesterol e aumentando a excreção fecal de esteróis. A adsorção de ácidos biliares à fibra alimentar é aumentada na presença de saponinas, formando micelas de grande peso molecular que impedem a reabsorção dos ácidos biliares, aumentando a conversão hepática de colesterol para ácidos biliares. A interação de saponinas com as células da mucosa intestinal conduz a um aumento na permeabilidade e subsequente perda nas funções celulares normais, incrementando a esfoliação e promovendo a proliferação. A perda aumentada das células intestinais contribui para um aumento adicional na excreção fecal de colesterol (MILGATE; ROBERTS, 1995).

3.1.3. Circulação Êntero-Hepática

A absorção de gorduras no intestino delgado depende da disponibilidade de ácidos biliares, que também contêm colesterol livre. Os ácidos biliares (95%) e o colesterol biliar são reabsorvidos por um processo dependente de energia no íleo terminal. Esse processo de reabsorção através da circulação êntero-hepática é rigorosamente controlado por um mecanismo de retroalimentação que é sensível aos níveis hepáticos de colesterol. Portanto, a reabsorção do colesterol infrarregula a atividade da 7-α-hidrolase, reduzindo a produção adicional de ácidos biliares. As substâncias na luz intestinal que são capazes de ligar ou competir com os ácidos biliares ligantes, como esteróis vegetais de ocorrência natural ou polissacarídeos não amiláceos solúveis, evitam sua reabsorção, que, na

verdade, interrompe a circulação êntero-hepática. Esse processo depleta o aporte do colesterol e acelera a produção de ácidos biliares, depletando o fígado de colesterol. Para repor essa perda, os hepatócitos respondem aumentando a captação de colesterol das lipoproteínas circulantes no sangue, com resultante redução nos níveis sanguíneos de colesterol. A interrupção da circulação êntero-hepática ajuda a explicar a ação redutora de colesterol de algumas drogas outrora conhecidas como redutoras de colesterol, mas também de componentes da dieta, como fitosteróis e fibras solúveis ou polissacarídeos não amiláceos (CUNNANE; GRIFFIN, 2002)

3.1.4. Transporte de Colesterol

O colesterol ingerido e o sintetizado no organismo precisam ser transportados para os tecidos, a fim de servirem como fonte de colesterol de membrana e como substrato para síntese de hormônios esteroides.

O colesterol não existe em estado livre no plasma e é insolúvel em água. Então, para ser transportado no meio aquoso, necessita de estruturas organizadas e de macroagregados moleculares, denominados lipoproteínas (LP).

As lipoproteínas são compostas por lipídios e proteínas denominadas apolipoproteínas (apos). As apos têm diversas funções no metabolismo das lipoproteínas, como formação intracelular das partículas lipoproteicas, ligantes a receptores de membrana ou como cofatores enzimáticos.

As lipoproteínas séricas podem ser subdivididas em classes distintas com base nas suas propriedades e/ou composição física, ambas refletindo o papel fisiológico no transporte dos lipídios dos locais de síntese (lipídios endógenos) e de absorção (lipídios exógenos, absorvidos no intestino) para os locais de armazenamento (tecido adiposo) e de utilização (musculatura esquelética) (CUNNANE; GRIFFIN, 2002).

Apesar de as lipoproteínas diferirem quanto à composição, todos os tipos apresentam características de apoproteínas hidrofóbicas, grupos de cabeças polares dos fosfolipídios e grupos hidroxila do colesterol voltados para o exterior, na interfase aquosa, com as caudas acil dos fosfolipídios e

núcleos esteroides do colesterol orientados para o interior do agregado (JONES; KUBOW, 2006).

Existem quatro grandes classes de lipoproteínas, separadas em dois grupos: i) as ricas em TG, maiores e menos densas, representadas pelos quilomícrons (QMs), de origem intestinal, e pelas lipoproteínas de densidade muito baixa ou *very low density lipoprotein* (VLDL), de origem hepática; e ii) as ricas em colesterol de densidade baixa ou *low density lipoprotein* (LDL) e de densidade alta ou *high density lipoprotein* (HDL). Existe ainda uma classe de lipoproteínas de densidade intermediária ou *intermediary density lipoprotein* (IDL) e a lipoproteína (a) [LP(a)], que resulta da ligação covalente de uma partícula de LDL à apo (a) (DIRETRIZES, 2007). O Quadro 1 mostra algumas características das lipoproteínas plasmáticas, como origem, densidade, tamanho, concentrações de colesterol e triglicerídeos, bem como as principais apolipoproteínas.

Os quilomícrons (QM) são responsáveis pelo transporte de lipídios absorvidos pelo intestino, originados da dieta e da circulação êntero-hepática. Na circulação, dentro de poucas horas após a alimentação, pela ação da enzima lipase lipoproteica, os QMs são depletados de triacilgliceróis, dando origem aos quilomícrons remanescentes (QMr). Estes são rapidamente retirados da circulação pelo fígado, por meio da interação entre a apoE e os receptores de apo E (ou receptores para remanescentes) nas membranas dos hepatócitos.

No fígado, o conteúdo de colesterol é regulado por três mecanismos principais: a) síntese intracelular de colesterol; b) armazenamento após esterificação; e c) excreção pela bile. Na luz intestinal, o colesterol é excretado na forma de metabólitos ou como ácidos biliares. Metade do colesterol biliar e aproximadamente 95% dos ácidos biliares são reabsorvidos e retornam ao fígado pelo sistema porta (circulação êntero-hepática) (DIRETRIZES ..., 2007).

Quadro 1 – Características das lipoproteínas plasmáticas

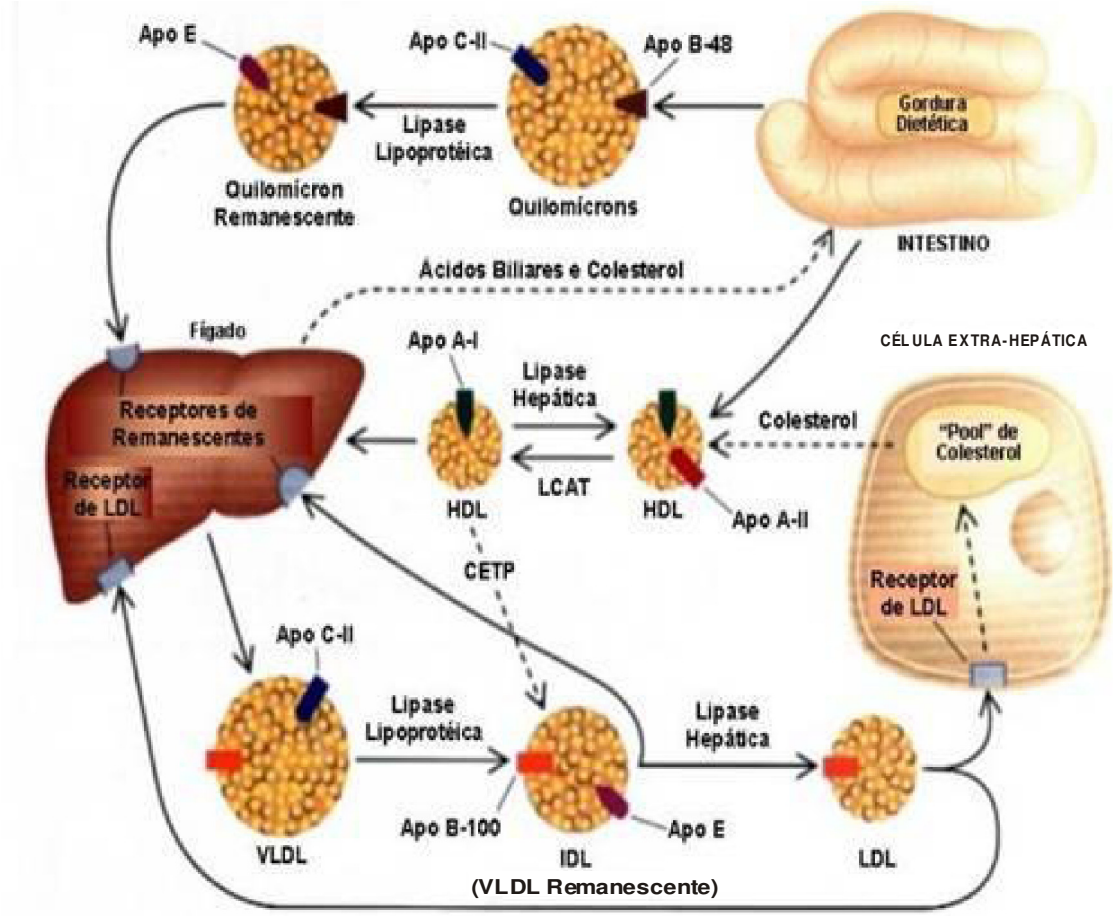
Lipoproteína	Origem	Densidade	Tamanho	Concentração Plasmática de Colesterol	Concentração Plasmática de Triglicerídeos	Apolipoproteínas
		(g/ml)	(nm)	(mmol/L)	(mmol/L)	
Quilomícron	Intestino	> 0,95	100-1000	0,0	0,0	B-48
VLDL	Fígado	> 1,006	40-50	0,1-0,4	0,2-1,2	B-100
IDL	VLDL	1,006-1,019	25-30	0,1-0,3	0,1-0,3	B-100, E
LDL	IDL	1,019-1,063	20-25	1,5-3,5	0,2-0,4	B-100
HDL	Tecidos	1,063-1,210	6-10	0,9-1,6	0,1-0,2	A-I
Lp (a)	Fígado	1,051-1,082	25			B-100, (a)

a: para mL/dL, multiplicar por 38,6; b: para mL/dL, multiplicar por 88,5.
Fonte: Genest (2003).

O transporte de lipídios de origem hepática ocorre por meio das VLDL, IDL e LDL (Figura 2).

As VLDL (*very low density lipoproteins*) são partículas ricas em triacilgliceróis derivadas do fígado e, além de outras apoproteínas, apresentam apoB-100 e apoE em sua constituição e são depletadas de triacilgliceróis por ação da lípase lipoproteína (que é estimulada pela apo CII e inibida pela apo CIII), dando origem a partículas mais densas, chamadas VLDL remanescentes ou IDL (*intermediate density liproteins*).

As IDL são removidas rapidamente do plasma e têm dois destinos: são captadas pelo fígado pela interação das apoproteínas com receptores E ou B/E (receptores LDL) de hepatócitos ou sofrem catabolismo adicional, envolvendo a ação da lipase hepática, e transformam-se em lipoproteínas de densidade baixa (LDL), que permanecem por longo tempo no plasma. Nesse catabolismo adicional, as LDL recebem colesterol esterificado contido nas HDL (*high density lipoproteins*) em troca de triacilgliceróis, por meio da proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP), aumentando o teor de colesterol e diminuindo o de triacilgliceróis em LDL, que contém uma única apolipoproteína: a apo B 100.



Fonte: Rader e Wilson (1995).

Figura 2 – Metabolismo de lipoproteínas. O metabolismo das lipoproteínas está mostrado por linhas sólidas, e o transporte de colesterol, quando não contido nas lipoproteínas, está indicado por linhas pontilhadas. VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade; IDL: lipoproteína de densidade intermediária; LDL: lipoproteína de baixa densidade; HDL: lipoproteína de alta densidade; LCAT: lecitina: colesterol acil:transferase; CETP: proteína de transferência de éster de colesterol; Apo B-100, Apo B-48, Apo E, Apo C-II, Apo A-I e Apo A-II: apolipoproteínas B-100, B-48, E, C-II, A-I e A-II, respectivamente.

As LDL são removidas pelo fígado através dos receptores B/E, que reconhecem a apo B100 nas partículas de LDL. A expressão desses receptores é a principal responsável pelo nível de colesterol no sangue e depende da enzima hidroxi-metil-glutaril (HMG) CoA redutase, que é a enzima-chave intracelular para a síntese do colesterol hepático (ALVAREZ-LEITE; PELÚZIO, 2003; IV DIRETRIZES..., 2007). Quando a demanda de colesterol pelas células é alta, os receptores B/E são ativados para

aumentar a captação da LDL. Inversamente, quando a célula está repleta de colesterol, o mecanismo de regulação negativa do receptor protege-a contra efeitos deletérios da acumulação deste lipídio (COBBE; SHEPHERD, 1993).

Os níveis plasmáticos elevados de colesterol, sobretudo LDL-colesterol, são, sem dúvida, um dos fatores de risco mais importantes para DCV. Isso não é verdade apenas para os níveis de colesterol muito altos, como aqueles observados nos distúrbios lipídicos geneticamente determinados (hipercoles-terolemia familiar, hipercolesterolemia combinada familiar, hiperlipidemia tipo III), mas também na grande maioria das pessoas (cerca de metade da população adulta nos países de alto risco) com níveis plasmáticos apenas moderadamente altos de colesterol. Todos os estudos transversais e prospectivos sobre este tópico mostraram claramente que a associação entre os níveis plasmáticos de colesterol total e a mortalidade por doença arterial coronária (DAC) é muito forte, não depende de outros fatores de risco e caracteriza-se pelo risco aumentado, com elevação das concentrações plasmáticas de colesterol. A relação causal com a aterosclerose também foi comprovada pelo fato de que as intervenções que reduzem os níveis de colesterol e de LDL-colesterol reduziram de forma significativa a taxa de mortalidade total e por doença arterial coronária (RICCARDI et al., 2006*)*.

As HDL são uma subclasse de lipoproteínas que apresentam apoA como principal apoproteína. Originam-se no intestino, fígado e a partir de remanescentes de lipoproteínas. São as mais densas lipoproteínas, e acredita-se que estão envolvidas no transporte reverso de colesterol – o único processo pelo qual o colesterol livre dos tecidos periféricos é transportado ao fígado para metabolismo ou excreção. Nesse processo, o colesterol é esterificado para ser mantido nas HDL, por ação da enzima LCAT (lecitina-colesterol-acil-transferase), tendo a apoA-I como cofator. Essas partículas são captadas pelo fígado pelos receptores E ou B/E (ALVAREZ-LEITE; PELÚZIO, 2003).

Os lipídios da dieta são absorvidos pelo intestino e transportados pelos QMs que contêm apoB-48. A lipase lipoproteica (LPL), ativada pela apoC-II, hidrolisa os QMs, gerando partículas remanescentes, que são

captadas pelo fígado pela ligação da apoE com seu receptor hepático. O fígado secreta os lipídios na forma de VLDL que contém apoB-100. A VLDL também é hidrolisada pela LPL, com formação de IDL, a qual pode ser captada pelo fígado ou transformada em LDL pela ação da lipase hepática. O fígado e os tecidos periféricos removem a LDL da circulação pela interação da apoB-100 com seu receptor. A HDL age na remoção do excesso de colesterol das células periféricas para o fígado, para excreção na bile.

As HDL, LCAT e proteínas podem representar papel importante na regulação do teor intracelular de colesterol, intensificando o efluxo de colesterol livre dos tecidos extra-hepáticos. Elas têm ações que contribuem para a proteção contra aterogênese, como a remoção de lipídios oxidados da LDL, inibição da fixação de moléculas de adesão e monócitos ao endotélio e estimulação da liberação de óxido nítrico, além da facilidade, como já citado, no transporte reverso de colesterol.

A associação inversa entre os níveis de HDL-colesterol e a incidência de doenças cardiovasculares foi confirmada em muitos estudos transversais prospectivos. Os níveis baixos de HDL são considerados um forte fator de risco para DCV, e a relação LDL/HDL-colesterol, um fator preditivo muito mais forte do que apenas níveis elevados de LDL-colesterol. Também existem evidências de que o HDL atua como antioxidante e que protege o LDL contra oxidação (RADER; WILSON, 1995).

3.1.5. Degradação e Excreção do Colesterol

A estrutura em anel do colesterol não pode ser metabolizada a CO_2 e H_2O em seres humanos. Em vez disso, o anel esterol intacto é eliminado do corpo por (1) conversão em ácidos biliares, os quais são excretados nas fezes, e (2) secreção do colesterol na bile, a qual o transporta ao intestino para eliminação. Uma parte do colesterol do intestino é modificada por bactérias antes da excreção. Os compostos primários são derivados reduzidos do colesterol – isto é, coprostanol e colestanol. Juntos, esses três compostos constituem o maior valor de esteróis fecais (CHAMPE; HARLEY, 2002).

O fígado serve tanto como principal fonte de colesterol como o principal agente de remoção.

O colesterol hepático pode ter três destinos, sendo um deles a transformação do colesterol em ácidos biliares (CHAMPE; HARLEY, 2002). O primeiro passo nessa conversão – a formação de 7-α-hidroxicolesterol – é um passo limitante da taxa para produção dos ácidos biliares primários: cólico e quenodesoxicólico.

Após a conjugação com taurina ou glicina, os ácidos biliares primários são secretados na bile e passam, através do trato biliar, para o duodeno. Por causa da reabsorção intestinal, os ácidos biliares retornam pela veia porta para o fígado, onde são rapidamente extraídos e secretados novamente na bile, para completar a circulação êntero-hepática.

Os ácidos biliares, retornando ao fígado, inibem a síntese hepática de novos ácidos biliares.

Após cada ciclo da circulação êntero-hepática, uma pequena fração dos ácidos biliares passa para o intestino grosso, onde, em contato com colônias de microrganismos, os grupos hidroxi dos núcleos esteroides são alterados, convertendo os ácidos biliares cólico e quenodesoxicólico em ácidos biliares secundários: desoxicólico e litocólico, respectivamente.

Um segundo destino do colesterol hepático é a secreção direta na bile, juntamente com o colesterol dietético, em que 30 a 60% dele é reabsorvido (GRUNDY, 1978). O colesterol não reabsorvido passa para o cólon, onde é transformado em dois outros esteroides neutros: coprostanol e coprostanona, que são excretados nas fezes.

Finalmente, um terceiro destino do colesterol hepático é a secreção nas lipoproteínas do plasma, como já visto anteriormente.

3.2. Triacilgliceróis

Muitos estudos revelam associações entre os níveis plasmáticos de triacilgliceróis (TAG) e DCV. Nos estudos transversais e prospectivos, níveis mais altos de TAG e de remanescentes de quilomícrons no período pós-prandial foram associados a maior risco de doença coronária. Ensaios intervencionistas recentemente publicados mostraram claramente que a

hipertrigliacilglicerolemia é, na verdade, um importante fator de risco modificável. Existem muitos mecanismos por meio dos quais os níveis plasmáticos elevados de TAG podem levar ao maior risco de DCV. Alguns estudos revelaram que os remanescentes de VLDL e dos quilomícrons que foram enriquecidos com colesterol podem ser captados pelos monócitos de forma semelhante ao LDL e formar a célula espumosa característica da lesão aterosclerótica. Entretanto, foi constatado também que níveis elevados de TAG também levam a alterações adversas no LDL-colesterol e no HDL-colesterol por meio da transferência excessiva de TAG para as partículas HDL e LDL e pela reação CETP-catalisada (proteína de transferência colesterol éster). Quando LDL e HDL adquirem grandes quantidades de TAG a partir das lipoproteínas ricas em TAG, este sofre hidrólise pela lipase hepática. A remoção do TAG do LDL e do HDL leva à formação de pequenas partículas densas de LDL e de HDL. As pequenas partículas densas de HDL são rapidamente catabolizadas pelo fígado, levando a reduções nas concentrações circulantes de HDL. Em contrapartida, a pequena partícula densa de LDL não é reconhecida de forma satisfatória pelo receptor LDL normal e permanece na circulação mais tempo que o normal. Por causa de seu tamanho e de sua meia-vida mais longa, o LDL pequeno e denso tem maior capacidade de penetrar no endotélio e contribuir para a aterogênese.

3.3. Flavonoides e Doenças Cardiovasculares

A doença cardiovascular aterosclerótica é a principal causa de morte e de incapacidade no Brasil e no mundo, determinando um impacto médico-social e econômico de grande magnitude (BRANDÃO et al., 2004).

O papel da dislipidemia na deflagração da aterosclerose coronariana está bem estabelecido, em especial, pelos níveis elevados do colesterol total e das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), acompanhada da redução da concentração da lipoproteína de alta densidade (HDL), embora esteja bem definido o caráter mutifatorial na etiologia da referida doença (KAJABA et al., 2008).

O conceito de que a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) nas paredes dos vasos desempenha um importante papel no desenvolvimento da aterosclerose tem sido demonstrado, cada vez mais, em estudos epidemiológicos e experimentais (AVIRAM et al., 2000; CRISTOFORI et al., 2004; HOMMA, 2004; SCOTT, 2004).

A oxidação de compostos orgânicos leva à formação de radicais livres, constituindo um processo fisiológico uma vez que existem mecanismos que controlam a concentração desses radicais. Entretanto, condições que favorecem um desequilíbrio entre os agentes pró-oxidantes e os antioxidantes, em detrimento dos últimos, definem um quadro de estresse oxidativo, levando a danos celulares e teciduais.

Muitos são os alimentos aos quais têm sido atribuídas propriedades antioxidantes e, portanto, muito se tem esperado dos efeitos potencialmente benéficos na modulação do estresse oxidativo. Nesse contexto, diversos estudos (BIANCHI; ANTUNES, 1999; ESTEVES; MONTEIRO, 2001; PRIOR, 2003; SCHOLZ et al., 2007) apontam para o potencial benéfico dos flavonoides.

Os flavonoides são antioxidantes polifenólicos encontrados nos alimentos, principalmente nas hortaliças (batata-inglesa, repolho, tomate, rabanete, couve, escarola, nabo) e nas frutas (cereja, amora, uva, morango, jabuticaba, laranja), grãos, sementes, castanhas, condimentos e ervas, bem como em bebidas como vinho, suco de uva e chá. São denominados fitoquímicos, devido à origem vegetal, sendo considerados princípios ativos em muitas plantas.

Uma vez que os flavonoides são encontrados em plantas, apresentando-se em maiores concentrações nas sementes e frutos, esses compostos podem ser ingeridos em altas quantidades como constituintes normais da dieta humana (HODEK et al., 2002; MENNEN et al., 2005). Até pouco tempo, a hidrólise dos flavonoides glicosilados só era conhecida em microrganismos. O metabolismo desses compostos é bastante conhecido e estudado em animais, porém há poucos dados concretos sobre o metabolismo em humanos. Recentemente, a ingestão de flavonoides de baixa toxicidade vem adquirindo destaque farmacológico por acumular-se nos principais órgãos, como o fígado, ou por modular o sistema

imunológico (BHATIA; JAIN, 2004). As razões mais importantes para a baixa toxicidade dos flavonoides são a pequena solubilidade em água da aglicona (flavonoide sem açúcar) e o rápido catabolismo do núcleo pirrólico no fígado.

O açúcar presente nas estruturas moleculares dos flavonoides é um importante determinante para o sítio de absorção desses compostos. Dados obtidos em humanos sugerem que a absorção de flavonoides glicosilados em pequenas quantidades no intestino se deve à ação de bactérias alojadas no intestino grosso, que clivam os glicosídeos em flavonoides livres (agliconas) (BHATIA; JAIN, 2004). No fígado, os flavonoides são gradativamente hidroxilados e/ou desmetilados pelos citocromos P450 (fase I da bioconjugação) e então sofrem reações de conjugação (glucoronidação, sulfatação, O-metilação), catalisadas pelas enzimas da fase II da bioconjugação (HODEK et al., 2002). Os conjugados de glucoronídeos e sulfatos são rapidamente transportados no sangue e excretados na bile ou urina mais facilmente que seus parentes agliconas. Os produtos da conjugação podem ser espécie e origem-dependentes e seus metabólitos não são, necessariamente, inertes biologicamente.

Embora exista uma diversidade de substâncias flavonoides, estas têm em comum uma estrutura básica formada por três anéis. Os flavonoides incluem dois grandes grupos de compostos: as antocianinas e as antoxantinas. As antoxantinas incluem as flavonas, os flavonóis e as flavononas e são geralmente pigmentos de coloração pálida, ao contrário das antocianinas (COSTA, 2003). Já foram identificados mais de 6.000 compostos fenólicos em plantas, embora um número muito menor esteja relacionado a potenciais efeitos benéficos (ERLUND, 2004). É estimado que o consumo diário de flavonoides seja de centenas de miligramas por dia (HOLLMAN; KATAN, 1998). Eles foram primeiramente identificados como vitamina P e juntamente com a vitamina C e K, são importantes na manutenção da integridade e resistência dos capilares sanguíneos.

Além da ação antioxidante, os flavonoides também têm a propriedade de inibir a síntese de colesterol endógeno, além de inibir a ciclooxigenase, levando à menor agregação de plaquetas, o que reduz a tendência trombótica (COOK; SAMMAN, 1996).

A quercetina é um dos principais flavonóis encontrados nos alimentos e tem sido associada a características antioxidantes, reagindo com ânion superóxido, oxigênio singlet e radicais peroxil. Também, complexa com ferro, prevenindo a formação de radicais ativos de oxigênio, e pode preservar a vitamina C. Assim, a quercetina tem sido associada à prevenção da oxidação de LDL, lipoproteína aterogênica e à formação de placas ateroscleróticas. Outros flavonoides incluem morina, miricetina, naringenina, rutina, kaempferol, ácido tânico e ácido elágico (COSTA, 2003).

Kaliora et al. (2005), em trabalho de revisão, relataram diversos trabalhos associando os efeitos benéficos dos compostos fenólicos sobre a doença cardiovascular. Esses efeitos foram demonstrados em trabalhos realizados *in vitro, ex vivo* e *in vivo*, nos quais especificamente os flavonoides desempenham a função de regulação gênica de diversas moléculas e enzimas envolvidas na aterogênese, promovem a inibição da oxidação da LDL, diminuição da peroxidação lipídica e da extensão da lesão aterosclerótica.

Trabalhos tanto de caráter experimental quanto epidemiológico têm demonstrado o efeito protetor dos flavonoides sobre as doenças cardiovasculares, especialmente daqueles encontrados em chá verde e vinho tinto (MUKHTAR; AHMAD, 2000; FUHRMAN; AVIRAM, 2001; LEIKERT et al., 2002; CHYU et al., 2004; LUZ; COIMBRA, 2004).

O vinho tinto é rico em flavonoides, principalmente o resveratrol, e tem sido hipotetizado que suas propriedades antioxidantes são responsáveis pelo efeito protetor contra doenças cardiovasculares (CHO et al., 2008). Um desses estudos, conhecido como "paradoxo francês", evidenciou que indivíduos que consumiam uma média de 14 a 15% de total energético da dieta na forma de gordura saturada e apresentavam níveis elevados de colesterol sanguíneo (semelhantes aos dos americanos e ingleses) mostravam incidência de mortalidade por enfermidade cardiovascular tão baixa como a dos japoneses e chineses. Esse efeito protetor foi atribuído aos flavonoides do vinho tinto consumido, que reduziam a oxidação das LDL e a formação de trombos nessa população francesa (KOPP, 1998).

Também em estudos com animais tem sido demonstrado que os polifenóis presentes no vinho tinto inibem a progressão da aterosclerose (AUGER et al., 2005). Vários mecanismos têm sido propostos para a propriedade antiaterogênica do vinho e dos compostos polifenóis, incluindo inibição da oxidação da LDL, modulação da agregação plaquetária, redução da inflamação mediada por macrófagos e modulação dos níveis de colesterol no plasma.

Outros estudos têm demonstrado também que certos flavonoides têm seu grau de incorporação, uniformidade, distribuição e orientação em bicamadas lipídicas. Os flavonoides são conhecidos por quelar íons e alterarem a peroxidação cinética, bem como por modificar a fluidez de membranas lipossomais (relativo movimento de lipídios na bicamada lipídica). Muitas bebidas, como o chá preto consumido no norte da Europa e o chá verde consumido no Japão, são importantes fontes de flavonoides. Existem sugestões de que os flavonoides presentes nesses chás exercem um efeito benéfico na prevenção e na redução das taxas de doenças cardiovasculares, por apresentarem atividade antioxidante (CROUVEZIER et al., 2001). O chá do tipo verde é rico em substâncias polifenólicas antioxidantes, entre elas as catequinas, que são de extrema importância no controle de várias doenças. As principais catequinas presentes no chá são epigalocatequina-3-galato, epigalocatequina, epicatequina-3-galato e epicatequina.

Geleijnse et al. (2002) realizaram um estudo de corte prospectivo durante três anos para avaliar a ocorrência de doenças crônicas em uma população do distrito de Rotterdam, conhecido como *The Rotterdam Study*, e observaram associação inversa em relação ao consumo de chá e a incidência de infarto agudo do miocárdio na população estudada. Comparável a esse estudo, foi realizada a investigação dos fatores de risco para doenças crônicas por meio de um estudo longitudinal com uma população de aproximadamente 800 homens idosos, de 65 a 84 anos de idade, envolvendo sete países, durante cinco anos, denominado *The* Zutphen Elderly Study. A incidência de morte por enfermidade cardiovascular foi inversamente proporcional ao consumo de flavonoides, presentes no chá, após terem sido excluídos outros fatores de confundimento, como

idade, consumo de energia, ácidos graxos saturados, colesterol e álcool, entre outros (ANONYMOUS, 1994).

Os flavonoides exercem efeitos sobre a oxidação do LDL mediado pelos macrófagos. A capacidade dos macrófagos sobre a oxidação do LDL depende do estado oxidativo da célula, que é determinado pelo balanço entre pró-oxidantes e antioxidantes celulares. Dessa forma, os flavonoides poderão inibir as oxigenases celulares ou ativar antioxidantes celulares. Isso foi demonstrado pelo consumo de flavonoides purificados, como glabridina, catequina ou quercetina, por camundongos deficientes de Apo E, resultando na redução da capacidade de os macrófagos captarem o LDL e oxidá-lo (AVIRAM; FUHRMAN, 1998).

Em 2003, Rodrigues et al. conduziram experimento com ratos, recebendo dieta-padrão, com o objetivo de verificar se as alterações bioquímicas séricas, induzidas pela suplementação nutricional com o flavonoide rutina, estão associadas a propriedades antioxidantes. A administração de rutina (120 mg/kg/semana) durante 15 dias não induziu variação na glicemia de jejum e no teste de tolerância à glicose. Embora não tenham sido observadas mudanças significativas nas concentrações séricas de lipoperóxidos, triacilgliceróis, LDL-c e proteínas totais, a suplementação nutricional com rutina demonstrou importante papel na prevenção da aterosclerose, pois induziu elevação significativa da lipoproteína de alta densidade (HDL-c de 35,82 ± 2,31 mg/dL para 44,40 ± 3,11 mg/dL). Como não foram observadas alterações na glutationa peroxidase, enquanto as atividades da superóxido dismutase foram elevadas pela ingestão de rutina, pode-se concluir que os efeitos antioxidantes deste flavonoide, aumentando a concentração de colesterol-HDL, estão relacionados à elevação nas atividades da superóxido dismutase. A ação antioxidante da rutina pode estar relacionada à destruição do radical superóxido (O_2^-). Embora não tenham sido constatadas alterações nas atividades da glutationa peroxidase (GSH-Px), na presença de rutina foi evidenciada elevação significativa na atividade da superóxido dismutase (SOD). A SOD catalisa a destruição do radical superóxido pela formação de H_2O_2. A GSH-Px catalisa a conversão de H_2O_2 em água (NOVELLI et al., 2002). Não foram constatadas alterações na GSH-Px, enquanto as atividades da SOD foram

elevadas pelo tratamento com rutina, podendo-se afirmar que as atividades antioxidantes da rutina estão associadas à elevação nas atividades da SOD.

A rutina tem sido considerada um antilipoperoxidante, pois pode neutralizar radicais hidroxil e superóxido (METODIEWA et al., 1997). Segundo Cotelle et al. (1992), comparando o efeito do alfa-tocoferol, do ácido ascórbico e da rutina no processo de peroxidação, a rutina era o mais potente inibidor de radicais livres.

Haenen et al. (1997) verificaram que os flavonoides inibiam a ação do peróxido de nitrito. Para esses autores, essas atividades antioxidantes eram responsáveis pelos efeitos benéficos sobre o dano cardíaco coronariano. O peróxido de nitrito causa oxidação das lipoproteínas de baixa densidade, o que tem sido considerado a chave do processo na etiologia da aterosclerose. Radicais livres podem iniciar danos celulares por meio da lipoperoxidação, a qual é uma reação em cascata, pois propaga-se continuamente. A inibição da lipoperoxidação depende da presença de antioxidantes e das atividades de enzimas, como a SOD e a GSH-Px.

Foi testado o efeito do extrato da casca de mexerica e uma mistura de dois flavonoides extraídos de frutas cítricas sobre o colesterol sanguíneo em ratos hipercolesterolêmicos, durante 42 dias. Os animais foram alimentados com dieta hipercolesterolemiante e suplementados com extrato da casca de mexerica ou uma mistura de naringina e hesperidina na dose de 0,5 g/100 g. Os resultados mostraram que o extrato da casca de mexerica e a mistura dos dois flavonoides diminuíram significativamente os níveis de colesterol no plasma, colesterol hepático e triacilgliceróis. As atividades do 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA) redutase e acil CoA-colesterol O-aciltransferase (ACAT) foram também significativamente mais baixas nos grupos experimentais (BOK et al., 1999).

Estudos realizados por Borradaile et al. (2003) mostraram os efeitos de flavonoide naringenina na redução de lipídios no plasma *in vivo* e inibição de secreção da apo-B, esterificação de colesterol e atividade da MTP (proteína transferidora de triglicérides ribossomal).

Oliveira et al. (2002) realizaram experimentação com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes doses de baicaleína, morina, naringenina, naringina, quercetina e rutina no aumento dos níveis de colesterol-HDL e trigliceróis em ratos hiperlipidêmicos. Esses flavonoides foram administrados em três doses (5, 10 e 15 mg/animal) a ratos machos da raça Wistar, com 30 dias de vida, alimentados com dieta não purificada de fórmula da marca Labina®. A hiperlipidemia foi induzida pela administração de Triton, na dose de 300 mg/kg de peso vivo. Após 24 horas, os flavonoides foram administrados, sendo cada dose aplicada em grupos de oito animais. Após 48 horas da aplicação do Triton, os animais foram anestesiados e, por punção cardíaca, amostras de sangue foram coletadas para realização das análises de colesterol, colesterol-HDL e triacilgliceróis no soro. Os melhores resultados para a redução do colesterol foram obtidos com os flavonoides quercetina e rutina, na dose de 5 mg, e naringenina, na dose de 10 mg. A baicaleína, nas doses de 5 e 10 mg, foi a que apresentou as menores reduções para colesterol-HDL. Já para as concentrações de triacilgliceróis, a baicaleína foi a que mais reduziu esse parâmetro, independentemente da dose utilizada.

Outra pesquisa realizada com animais experimentais durante 4, 7 e 10 semanas, com hiperlipidemia induzida por colesterol a 2,5% e toucinho a 16,0%, misturados à dieta contendo também os flavonoides quercetina, morina ou o ácido tânico, mostraram reduções nos lipídios plasmáticos. Na sétima semana do experimento observou-se que a morina reduziu as concentrações dos triacilgliceróis plasmáticos em 65,0%, bem como a gordura do fígado, mas aumentou as concentrações de HDL em 47,0% na quarta semana. Morina também foi ativa na décima semana do experimento, reduzindo o colesterol total em 30,9% e o LDL em 29,3%. Já a quercetina provocou a elevação plasmática de HDL em 28,6% na sétima semana do experimento (YUGARANI et al., 1992).

Glicosídeos da quercetina e rutina mostraram efeito inibitório sobre a peroxidação lipídica (TAKAHAMA, 1984), ao passo que a quercetina, testada em ratos, reduziu os teores de lipídios (KATO; TOSA, 1983). Os isoflavonoides também mostraram redução na peroxidação lipídica de ácidos graxos e inibição na formação de malonaldeídos (NISHYAMA et al.,

1993). A catequina demonstrou efeito inibitório na oxidação de LDL (MANGIAPANE et al., 1993). A quercetina, diidroquercetina, 3-metil quercetina, rutina, toxirutina e fisetina foram potentes inibidores da agregação plaquetária em animais.

Pelo seu potencial antioxidante, os flavonoides poderão inibir a oxidação do LDL, atuando como agentes redutores; extinguindo a doação de moléculas como átomos de hidrogênio e oxigênio simpleto; quelando íons metais de transição; reduzindo assim a capacidade de formação de radicais livres pelos metais; poupando a vitamina E e os carotenoides nas partículas de LDL; impedindo sua oxidação; e preservando ou aumentando a atividade da paraoxonase sérica, promovendo assim a hidrólise de células arteriais e peróxidos associados a LDL (FUHRMAN; AVIRAM, 2001). Assim, em experimentos que utilizaram os flavonoides quercetina e ganhuangenina, verificou-se que eles inibiram a oxidação do LDL *in vitro* e *in vivo* (LIM et al., 1998). Além disso, o consumo de nutrientes ricos em flavonoides – como extrato de gengibre e seus flavonoides gingerol e shagaol; extrato de soja e suas isoflavonas daidzeína e genisteína; polpa e suco de uva e suas catequinas, inibiu a oxidação do LDL *in vitro* e *in vivo* (TIKKANEN et al., 1998; FUHRMAN et al., 2000).

Nijveldt et al. (2001) relataram que os flavonoides podem prevenir a injúria causada pelos radicais livres de várias maneiras, sendo uma delas a remoção direta destes. Dessa forma, os flavonoides podem inibir a oxidação da LDL *in vitro*, e esta ação tem efeito preventivo em relação à arteriosclerose. O LDL, quando oxidado, danifica o endotélio e inicia o processo de aterosclerose. A epicatequina e rutina possuem essa propriedade. A habilidade da rutina em remover radicais livres pode ser também devido à inibição da atividade da enzima xantina oxidase. Alguns pesquisadores relatam que o mecanismo da atividade antioxidante de flavonoides é duplo, pois atuam como captadores de radicais livres e têm a capacidade de quelar íons metálicos, reduzindo, assim, a peroxidação induzida por metais. Sabe-se que há grande número de alimentos que são contaminados com resíduos de metais pesados, e essa propriedade dos flavonoides impediria a oxidação de ácidos graxos e de outros lipídios, provocada pela presença desses metais, além do oxigênio.

Kim et al. (2004) verificaram os efeitos de flavonoides naringina e lovastatina como antioxidantes, potencializando as atividades das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutationa redutase (enzimas antioxidantes). Segundo essa pesquisa, o flavonoide naringina foi capaz de aumentar a atividade dessas enzimas antioxidantes. A naringina foi misturada à dieta dos camundongos Knout (sem receptor de LDL) a 0,02% da dieta durante seis semanas. Também foi observado que os flavonoides reduziram a atividade da HMG CoA-redutase em 30%.

Pesquisas têm demonstrado que o flavonoide eriocitina presente no limão causou efeitos protetores na peroxidação lipídica (MIYAKE et al., 2000). Gryglewski et al. (1987) estudaram o efeito de quercetina, rutina e cianidol na peroxidação lipídica não enzimática. Esses pesquisadores correlacionaram a atividade antitrombocítica dos flavonoides à sua propriedade antioxidante. Os resultados mostraram também que esses compostos inibem a atividade da lipoxigenase, ciclo-oxigenase e da fosfolipase A_2.

Jeon et al. (2004) verificaram que a naringina altera a concentração de lipídios plasmáticos, inibe as enzimas da rota de síntese do colesterol, aumenta a eliminação de esteroides fecais e altera a morfologia de hepatócitos, células cardíacas e de células endoteliais da parede da aorta de coelhos. Verificaram também que a naringina suprimiu a hipercolesterolemia induzida em coelhos de forma tão eficiente quanto a estatina. Naringina a 0,05% e lovastatina a 0,03%, testadas por oito semanas, diminuíram significativamente os níveis de lipídios hepáticos, o colesterol total do plasma e o colesterol LDL. Houve ainda aumento na relação HDL/colesterol total. Nas análises histopatológicas, somente o grupo controle exibiu a presença de partículas de lipídios e de infiltração nas células do miocárdio e um dano no endotélio da aorta, porém nas análises dos grupos suplementados com colesterol esses sinais aterogênicos apareceram tardiamente.

Flavonoides isolados de *S. melongena* mostraram atividade antioxidante potente. Concentração de malondialdeído, hidroperoxidase e conjugados estavam significativamente diminuídos. A atividade da catalase foi encontrada aumentada significativamente nos tecidos normais e com

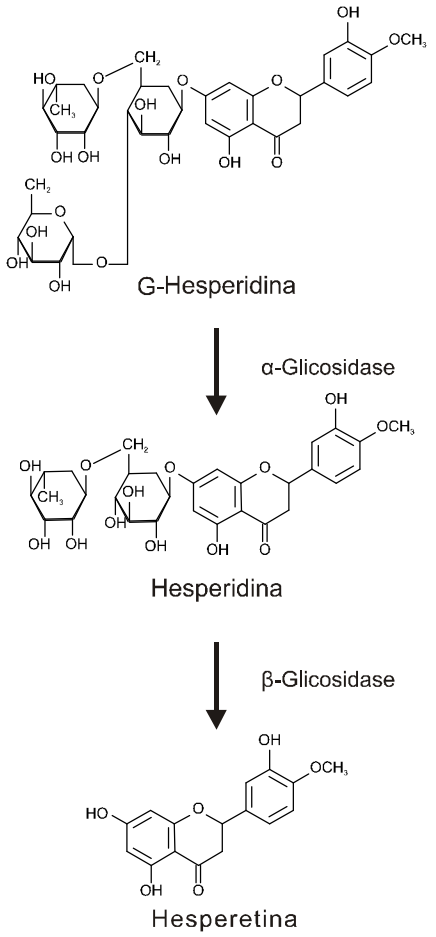
colesterol em ratos alimentados com 1 mg de flavonoides de berinjela. A concentração de glutationa também se mostrou elevada nos animais do experimento. Os elevados níveis de glutationa e a ação da catalase estimulada significativamente podem ser responsáveis pelo efeito antioxidante desses flavonoides (SUDHEESH et al., 1999).

O chocolate escuro contém alto nível de flavonoides, que exercem propriedades antioxidantes. Evidências sugerem um potente impacto benéfico de grande variedade de diferentes alimentos e bebidas ricos em flavonoides em eventos cardiovasculares, principalmente o cacau. Chocolate rico em flavonoide ou bebidas à base de cacau têm demonstrado melhorar a função vascular periférica em voluntários saudáveis e pacientes com doença cardiovascular. Flammer et al. (2007) avaliaram o efeito da ingestão de 40 g de chocolate amargo (70% de cacau, rico em flavonoides), comparado com controles (chocolate livre de cacau), na função coronariana e plaquetária de 22 pacientes recipientes de transplante cardíaco em trabalho duplo cego randomizado. A função vasomotora das coronárias foi avaliada duas horas após a ingestão do chocolate ou placebo. A ingestão de chocolate aumentou o diâmetro da artéria coronária significativamente, enquanto este ficou inalterado nos controles. Da mesma forma, a função endotelial foi significativamente melhorada e a adesão plaquetária diminuída pelo consumo de chocolate amargo. Esses efeitos eram associados à redução do estresse oxidativo positivamente correlacionado com as mudanças na concentração de epicatequina ocorridas pela ingestão do chocolate. Outros trabalhos clínicos ou experimentais reforçam o papel benéfico da ingestão do chocolate amargo, como mostrado por Vinson et al., (2006), nos quais animais alimentados com barras de chocolate amargo tiveram inibição significativa da aterosclerose, diminuição do LDL-c e dos TG, aumento do HDL-c e inibição da oxidação da LDL, porém o efeito protetor continua obscuro.

Dietas ricas em frutas cítricas têm sido negativamente correlacionadas com fatores de risco para doenças cardiovasculares, provavelmente pela presença dos flavonoides; contudo, estudos precisam ser conduzidos para esclarecimento dos mecanismos (LIU LI, 2008).

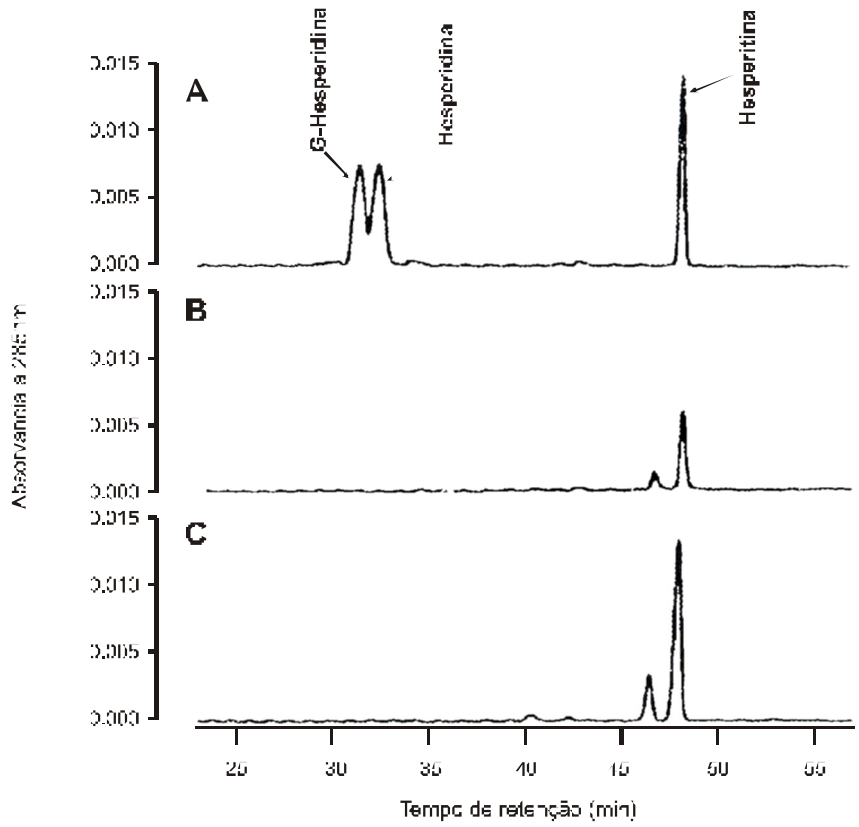
A hesperidina é uma flavonana glicosilada (Figura 3) abundantemente encontrada na laranja e limão (KAUR et al., 2006) e tem demonstrado várias atividades fisiológicas, como a redução da fragilidade capilar (GARG et al., 2001), propriedades antioxidantes (WILMSEN et al., 2005), efeitos anti-hipertensivo (GALATI et al., 1996) e hipocolesterolemiante (BOK et al., 1999).

A hesperidina é metabolizada para hesperetina em presença de β-glicosidase (Figura 3), antes de ser absorvida. A hesperetina é imediatamente metabolizada para metabólitos ligados a glicuronato e sulfato no epitélio intestinal e no fígado. A cinética da hesperetina encontra-se na Figura 4. Após doseamento com a hesperidina, a hesperetina glicoronídeo foi detectada às 6h, com seu pico máximo entre 9 e 12 h, a cerca de aproximadamente 1,3 µM. É a quantidade de substância livre no plasma que caracteriza sua ação farmacológica (YAMADA, 2006).

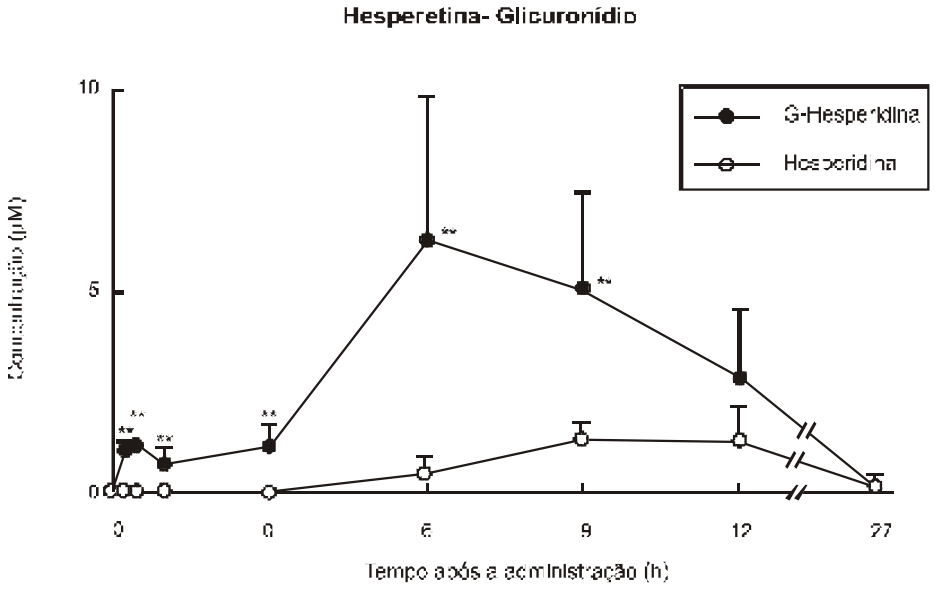


Fonte: Nielsen et al. (2006).

Figura 3 – Hidrólise enzimática da G-hesperidina a hesperetina.



Cromatogramas HPLC representativos das perdas de G-Hesperidina, Hesperidina e Hesperetina (A) e β-Glicuronidase hidrolisada de soro de rato tirados após 6 horas de administração de 1 mmol/kg de Hesperidina (B) ou G-Hesperidina (C).

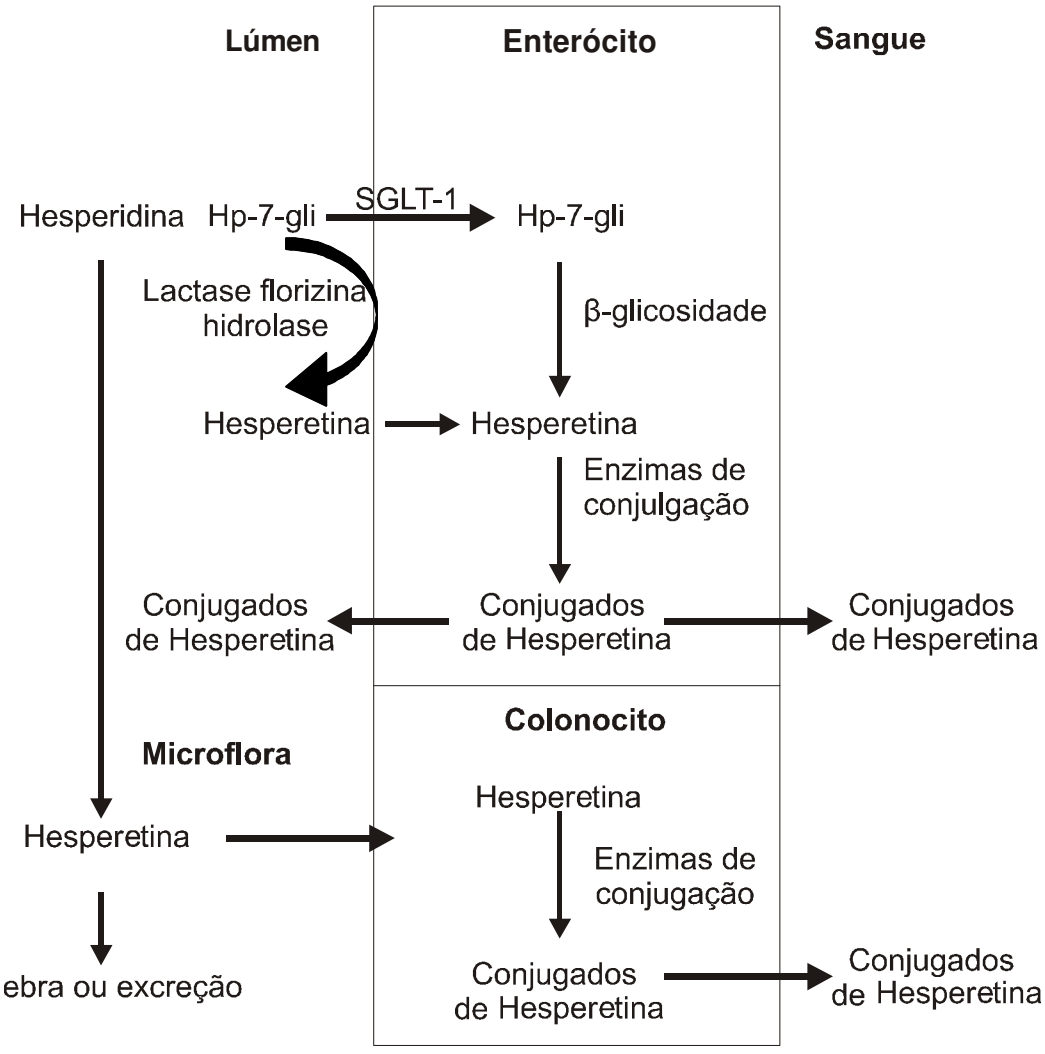


Mudanças na concentração no soro de Hesperetina-Glicuronídio em ratos em que se administrou G-Hesperidina ou Hesperidina. G-Hesperidina (●) ou hesperidina (○) foram administradas a ratos por intubação gástrica (1 mmol/kg). Amostras de soro foram tratadas com β-glicuronidase. Os valores são as média ±SD (n = 5). **Significativamente diferente do valor de administração de hesperidina a p < 0,01.

Fonte: Yamada (2006).

Figura 4 – Cinética da hesperidina.

Há duas hipóteses acerca de como os flavonoides glicosídeos são absorvidos no intestino delgado: 1) o glicosídeo é hidrolisado pela enzima lactase florizina hidrolase e a aglicona livre difunde-se passivamente pelas células epiteliais por difusão facilitada; 2) alternativamente, o glicosídeo pode ser transportado para o enterócito via transportador de açúcar como SGLT-1 e logo ser desglicolisado pela enzima β-glicosidase presente nas células intestinais. Ambos os caminhos de absorção dão origem a agliconas intracelulares, que ficam conjugadas a glicoronídeos ou sulfato. A Figura 5 indica os possíveis caminhos de absorção da hesperidina e hesperetina-7-glicosídeo.



Fonte: Nielsen et al. (2005).

Figura 5 – Possível via da absorção de hesperidina e hesperidina-7-glicosídeo, mostrando a mudança proposta no sítio de absorção da hesperidina do cólon ao intestino delgado.

Lee et al. (1999) relatam os efeitos do flavonoide hesperetina e hesperidina sobre as enzimas HGM CoA redutase e acil coenzima colesterol aciltransferase em ratos hiperlipidêmicos. Ratos tratados com hesperetina tiveram redução nos níveis de colesterol no plasma, e a atividade das enzimas HMG COA redutase e ACAT no fígado foi reduzida com o tratamento com esse flavonoide. A hesperidina e metilchalcona aumentaram a permeabilidade microvascular em hamster (BOUSKELA et al., 1993).

Liu et al. (2007) avaliaram o efeito inibitório da isorhamnetina e hesperidina na oxidação do LDL induzida por Cu_2+, *in vitro*. Os resultados sugeriram que a isorhamnetina e hesperidina podem substancialmente inibir a oxidação da LDL.

O óxido nítrico é produzido por diferentes tipos de células, incluindo as células endoteliais e macrófagos. A enzima óxido nítrico sintase é importante para manter a dilatação dos vasos sanguíneos. Um aumento na atividade desta enzima aumenta a produção de óxido nítrico e causa danos oxidativos. O óxido nítrico em excesso pode reagir com radicais livres, produzindo peroxinitritos. Eles podem oxidar o LDL, que danifica o endotélio e inicia o processo de aterosclerose. Diversos tipos de flavonoides afetam a atividade da enzima óxido nítrico sintase (SHUTENKO et al., 1999).

Kalpana et al. (2009) pesquisaram as atividades antioxidante da hesperidina e observaram que esse flavonoide é inibidor da produção do radical óxido nítrico. Além da ação antioxidante, é importante seu efeito anti-inflamatório, pois, ao diminuir a quantidade, está reduzindo também o efeito inflamatório provocado pelo óxido nítrico.

A hidroxila do anel B da hesperidina é o mais significativo determinante de sua ação antioxidante. O grupo hidroxila do anel B doa hidrogênio e um elétron para o radical peroxinitrito e então o estabiliza; por isso, a atividade da hesperidina depende da presença de uma hidroxila livre no carbono 3. O óxido nítrico produz diferentes espécies de nitrogênio reativas, formadas durante sua reação com o oxigênio ou com superóxidos (NO_2, N_2O_4, N_3O_4, NO^-_3 e NO^-_2), que são espécies mais reativas. Esses componentes são responsáveis por alterações estruturais e funcionais de vários

componentes celulares. Portanto, os efeitos antioxidante e anti-inflamatório da hesperidina são importantes, uma vez que no processo aterosclerótico, além do acúmulo de lipídios na circulação, ocorre também inflamação, aumento da formação de radicias livres e aumento da produção de óxido nítrico.

3.4. Curcumina e Doenças Cardiovasculares

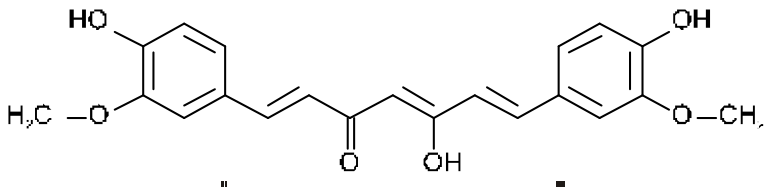
Atualmente tem-se dado ênfase a produtos naturais, que propiciam melhores condições de vida e saúde ao ser humano. Assim, o interesse das indústrias de alimentos na substituição dos corantes sintéticos pelos naturais tem aumentado. Esse contexto sugere a importância da cúrcuma como uma das fontes alternativas para corante amarelo, em substituição à tartazina, que causa problemas alérgicos.

A baixa toxicidade, associada a outras propriedades, potencializa a utilização de corantes naturais como aditivos de alimentos. Além de conferirem ou intensificarem a cor dos alimentos, alguns corantes apresentam propriedades antimicrobianas, antioxidantes e medicinais (MAIA et al., 2004).

Entre os corantes de origem vegetal encontra-se a curcumina, que é um pigmento amarelo extraído de *Curcuma longa* L., uma planta do sudeste da Ásia cuja disseminação para outras regiões do planeta se deu a partir do sul da Índia. A *Curcuma longa* L. é um rizoma de cultivo simples, que contém de 2,5 a 8,1% de curcumina, que é o principal cromóforo. Os produtos provenientes de sua secagem são: cúrcuma em pó, extrato de cúrcuma e curcumina purificada.

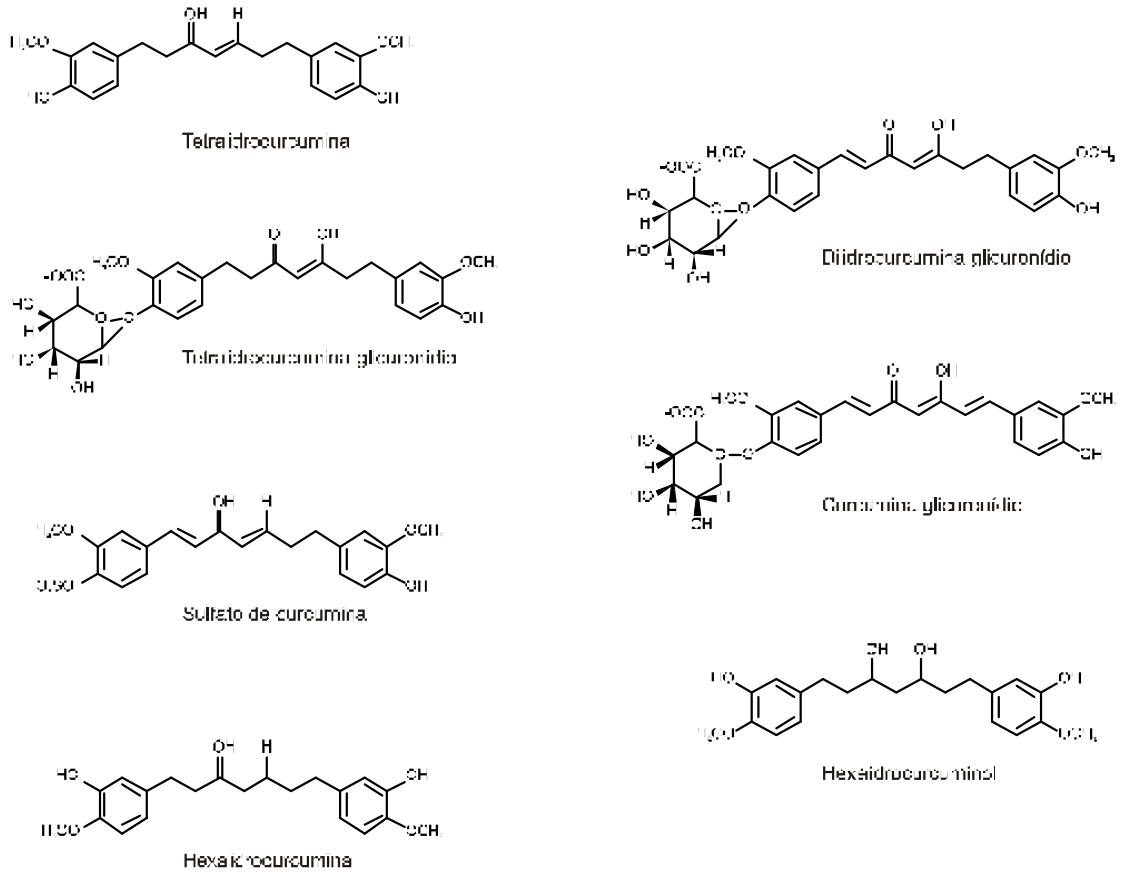
A planta tem boa produção em regiões tropicais, e a maior produtividade bem como o melhor rendimento em óleos essenciais, depende da época do ano, do tipo de solo e da densidade do plantio. O cultivo brasileiro está centralizado principalmente nos Estados de Goiás, Mato Grosso e São Paulo, sendo equivalente a apenas 1% da produção mundial, com pico no mês de novembro. Também no Brasil a *Curcuma Longa* L. é conhecida popularmente como cúrcuma, batatinha-amarela, gengibre-dourado, mangarataia, açafrão-da-índia ou açafrão-da-terra.

Estruturalmente, a curcumina consiste em uma molécula de dibenzoil-metano [1,7-bis-(hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona e dois grupos metaxila (OCH3) (Figura 6). Esse composto e seus derivados (Figura 7) formam um grupo raro de pequenas β-dicetonas, as quais têm sido alvo de pesquisas por apresentarem diversas propriedades farmacológicas.



Fonte: Antunes e Araújo (2000).

Figura 6 – Estrutura química da curcumina.



Fonte: Strimpakos e Sharma (2008).

Figura 7 – Estruturas químicas dos principais metabólitos de curcumina identificados em roedores ou em seres humanos.

A Figura 8 mostra as vias metabólicas da curcumina demonstradas em estudos pré-clínicos.

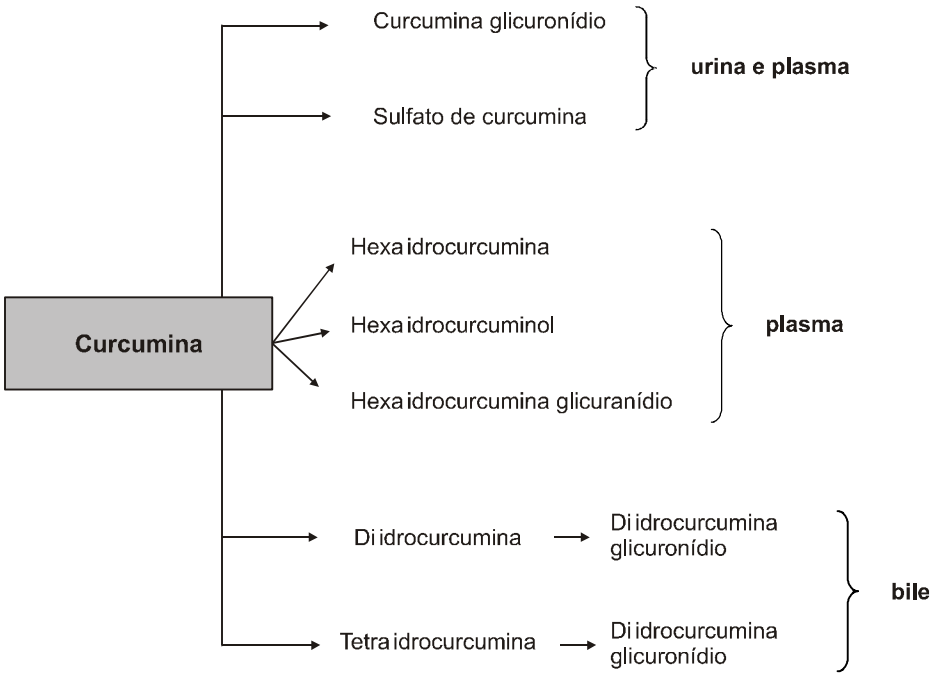
Estudos toxicológicos indicam que a curcumina não apresenta efeitos toxicológicos mesmo em altas doses, não sendo genotóxica e mutagênica.

Ratos alimentados com cúrcuma (500 mg/kg peso corpóreo) e o extrato alcoólico de cúrcuma (60 mg/kg peso corpóreo) foram examinados por três gerações. Não foram verificadas diferenças no índice de fertilidade, gestação, peso dos filhotes e lactação entre os animais experimentais e controle (BHAVANISHANKAR; MURTHY, 1987).

Segundo estudos desenvolvidos por Nhavanshankar et al. (1986), não há diferença significativa entre ratos e macacos submetidos, por 12 e nove meses, à ingestão de cúrcuma (500 mg/kg peso corpóreo) e de seu extrato alcoólico (60 mg/kg peso corpóreo) e o grupo controle com relação a crescimento, utilização de alimentos e de calorias, peso dos órgãos e análise dos componentes do sangue e urina.

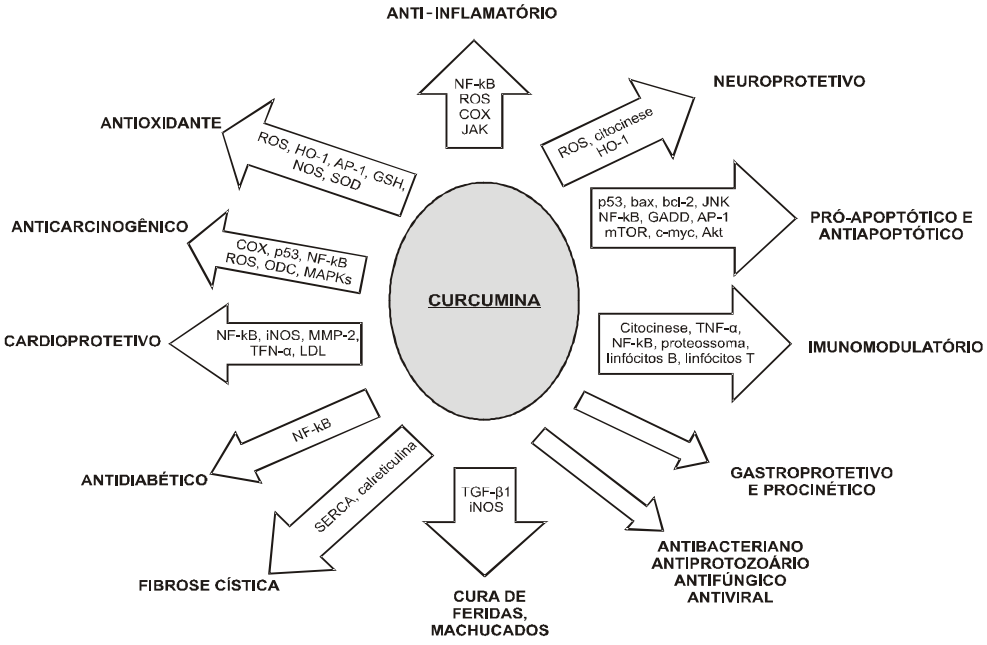
Sambaiah et al. (1982), utilizando os rizomas de *Curcuma* e curcumina na dieta de ratos nas dosagens de 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 5,0 e 10%, não observaram qualquer efeito adverso no crescimento, na taxa de eficiência alimentar, nos níveis de constituintes sanguíneos (hemoglobina, proteína total, albumina, globulina, aminotransferases séricas (TGO e TGP) e fosfatase alcalina e na contagem de leucócitos ou eritrócitos.

Vários estudos têm demonstrado que os corantes naturais apresentam propriedades biológicas, como antioxidante (SHUKLA et al., 2008), anti-inflamatória, hipolipidêmica, anticancerígena, antibacteriana e hipotensora (Figura 9). Além disso, o uso de corantes naturais em alimentos é atualmente uma tendência mundial, em razão da maior demanda por produtos naturais. Devido a essa diversidade de propriedades apresentadas pelos corantes naturais, esses compostos vêm se tornando promissores fármacos naturais, visto que ocorrem amplamente na natureza e são de fácil obtenção, constituindo uma nova fonte para o tratamento de diversas patologias (SILVA et al., 2002).



Fonte: Strimpakos e Sharma (2008).

Figura 8 – Caminhos metabólicos da curcumina demonstrados em modelos pré-clínicos. Os caminhos metabólicos mostrados foram demonstrados em ratos, em culturas *ex vivo* de hepatócitos de ratos ou em culturas *ex vivo* de hepatócitos humanos.



Fonte: Strimpakos e Sharma (2008).

Figura 9 – Propriedades biológicas da curcumina.

Estudos realizados por Valente et al. (1998) mostraram que o corante natural cúrcuma, a antocianina, o carmim e o monascus reduziram as concentrações de colesterol total e colesterol-HDL em ratos hipercolesterolêmicos. Observou-se também, diminuição nas concentrações de triacilgliceróis, com exceção do carmim, que não apresentou significância na redução desse parâmetro.

Silva et al. (2008) avaliaram os efeitos dos corantes naturais cúrcuma e norbixina no controle do metabolismo lipídico em pintos hipercolesterolêmicos. Os resultados mostraram que a cúrcuma e norbixina provocaram reduções significativas nos níveis de colesterol total, colesterol-LDL, colesterol-VLDL e triacilglicerol, não apresentando reduções nos níveis de colesterol-HDL.

Srinivasan e Sambaiah (1991), estudando enzimas retiradas dos tecidos hepáticos de ratos, verificaram efeitos da curcumina sobre o metabolismo dos ácidos biliares e colesterol. A atividade da enzima colesterol-7-α-hidrolase aumentou significativamente em ratos tratados com curcumina. Esta aumentou a excreção fecal de colesterol e ácidos biliares, sendo um potente eliminador de espécies reativas de oxigênio, protegendo a hemoglobina de oxidação induzida por nitrito e inibindo a peroxidação lipídica.

A curcumina também atua como anti-inflamatório, como observado em estudo de Joe e Lokesh (1997), onde o uso de curcumina reduziu a secreção de enzimas colagenase, elastase e hialuronidase em macrófagos ativados. Segundo Sreejayan e Rao (1997), a curcumina tem capacidade de eliminar óxido nítrico, que é um radical livre sintetizado por macrófagos ativados e está envolvido na inflamação, no câncer e em outras condições patológicas.

Outro estudo demonstrou que dieta rica em curcuminoides previne o acúmulo de triglicerídeos no fígado e no tecido adiposo, diminuindo também a concentração de VLDL e trigligerídeos em ratos alimentados com dieta rica em lipídios (ASAI; MIYAZAWA, 2001).

Ramírez-Tortosa et al. (1999) avaliaram o efeito do extrato hidroalcoólico obtido dos rizomas de *Curcuma longa* na suscetibilidade de oxidação da LDL e lipídios sanguíneos em coelhos com aterosclerose

induzida por dieta rica em gordura saturada e colesterol. Os animais foram divididos em três grupos: dois grupos receberam durante sete semanas curcuminoides em menor dose (1,66 mg/kg peso corporal) e em alta dose (3,2 mg/kg peso corporal), e o outro serviu como controle. A baixa dose, mas não a alta, diminuiu a suscetibilidade à peroxidação lipídica do LDL. Ambas as doses reduziram os níveis de colesterol total no plasma, em relação ao controle.

Também Quiles et al. (2002) estudaram o efeito do extrato de *Curcuma longa* no desenvolvimento de aterosclerose experimental em coelhos e a interação com outros antioxidantes plasmáticos. Coelhos brancos da raça Nova Zelândia foram divididos em dois grupos experimentais – um grupo controle e outro grupo recebendo 1,6 mg/kg de peso corporal de extrato de cúrcuma (CU) – alimentados com dieta aterogênica. Resultados histológicos das lesões da aterosclerose revelaram danos na aorta torácica e abdominal significativamente diminuídos no grupo (CU), comparado ao controle, ao final de 30 dias. Esses autores concluíram que a suplementação com *Curcuma longa* reduz o estresse oxidativo e atenua o desenvolvimento de aterosclerose em coelhos alimentados com dieta rica em colesterol.

Estudos mostram os efeitos benéficos da ingestão de cúrcuma nos níveis de peróxido do plasma lipídico em coelhos submetidos a dietas ricas em gordura. Mesa et al. (2003) administraram doses de 1,6 mg/kg peso vivo do extrato hidroalcoólico de cúrcuma em coelhos, equivalente a 0,15 mg por dia de curcuminoides. A suscetibilidade à oxidação das membranas dos eritrócitos em coelhos e cromossomos vivos *in vitro* foi reduzida com a ingestão do extrato de cúrcuma, o que pode contribuir para a prevenção dos efeitos causados por uma dieta rica em colesterol e gorduras durante o desenvolvimento de aterosclerose. Os dados são de grande relevância, visto que a dosagem de cúrcuma utilizada é nutricional e fisiologicamente relevante para humanos.

Doses de 100 mg/kg de cúrcuma foram ingeridas por ratos Wistar durante um mês. O efeito cardioprotetor foi relacionado com a supressão do estresse oxidativo e com a melhoria da função ventricular, sendo confirmado por exames histopatológicos (MOHANTY et al., 2004).

Alguns trabalhos têm mostrado que a cúrcuma e curcumina inibem a peroxidação lipídica. Além disso, a curcumina mostrou ser antioxidante *in vivo* e *in vitro*, atuando, provavelmente, pelo sequestro de espécies reativas de oxigênio (KUNCHANDY; RAO, 1990; TONNESEN; GREENHILL, 1992; REDDY; LOKESH, 1994; SREEJAYAN; RAO, 1996; SREEJAYAN et al., 1997). De acordo com Kunchandy e Rao (1990), a curcumina pode atuar sequestrando os radicais O_2^- e OH.

Os efeitos hipolipêmico e antioxidante de compostos como a curcumina e a capsaicina foram avaliados por Manjunatha e Srinivasan (2007). Curcumina (0,2%), capsaicina (0,015%) ou a combinação de ambos foram incluídas na dieta rica em gorduras (30% de gordura) por oito semanas. A indução da hiperlipidemia pela dieta rica em gorduras foi significativamente menor nas dietas contendo curcumina, capsaicina ou a combinação das duas em 20, 14 e 12%, respectivamente. Resultou também numa significativa redução do colesterol sérico total dos animais, sendo 12% para curcumina, 23% para capsaicina e 21% para combinação dos dois. A glutationa hepática foi aumentada pela curcumina (15%), capsaicina (24%) ou combinação das duas (12%) em ratos normais. A glutationa hepática teve similar aumento nos animais tratados com dieta rica em gorduras, sendo 22% pela curcumina e 35% pela curcumina + capsaicina. A concentração de fosfolipídios não foi influenciada pelos componentes estudados nos animais alimentados com dieta rica em gordura e a normal, porém a concentração de fosfolipídios foi 30% maior nos animais alimentados com dieta rica em gordura. A dieta com curcumina produziu uma grande redução no triacilglicerol hepático, em relação à dieta com capsaicina.

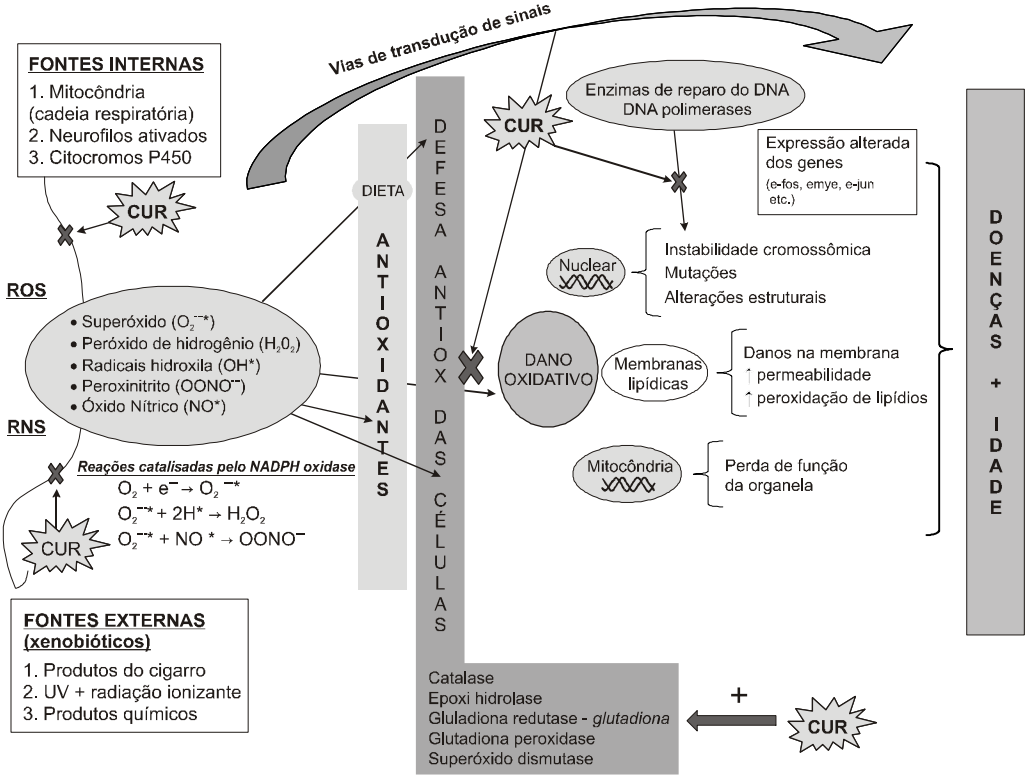
O estresse oxidativo e os danos oxidativos estão envolvidos na fisiopatologia de muitas desordens crônicas degenerativas e inflamatórias, em particular a aterosclerose, e as complicações clínicas do diabetes melito, cardiomiopatia isquêmica, doença de pulmão obstrutiva crônica (COPD), doença de Alzheimer e doença de Parkinson. A geração de espécie de oxigênio reativa (ROS), particularmente ânions superóxido e radicais hidroxil, e a peroxidação lipídica de membranas celulares alteram o equilíbrio de enzimas antioxidantes, com aumento nos níveis de

glutationa celular (GSH) e ativação da AP-1 induzida por estresse, desempenhando papel no desenvolvimento dessas desordens (WEBER et al., 2006). Consequentemente, a eliminação da espécie ativa do oxigênio ou a prevenção do dano celular que ela causa à proteína e ao DNA é um mecanismo importante potencialmente para impedir doenças crônicas como a doença cardiovascular (STRIMPAKOS; SHARMA, 2008).

Um estudo em macrófago peritoneal de ratos, cultivado *in vitro*, demonstrou prejuízo na geração ROS com 10 μM de curcumina (JOE; LOKESH, 1994). Os efeitos semelhantes foram observados no sangue vermelho de células em concentrações comparáveis (TONNESEN; GREENHILL, 1992). Também tem sido demonstrado que a curcumina é responsável pela eliminação de radicais de ânion superóxido e de radicais hidroxil (SREEJAYAN; RAO, 1996; KHOPDLE et al., 1999). Semelhantemente a outros fitoquímicos dietéticos, como o resveratrol (encontrado em uvas, vinho, amoras e amendoins) e EGCG (encontrado no chá verde), a curcumina pode possuir atividade pró-oxidante ou efeito antioxidante, dependente da dose e do ambiente químico (p. ex., disponibilidade de íons de Cu_2) (AZMI et al., 2005; BARIK et al., 2005). O equilíbrio entre o efeito antioxidante e a atividade pró-oxidante deve ser cuidadosamente considerado planejando provas de intervenção em voluntários sãos, em particular se a atividade pró-oxidante resulta potencialmente em danos, como sugerido por biomarcadores da oxidação do DNA, mostrado na Figura 10.

Wongcharoen e Phrommintikul (2009), em uma extensa revisão, pesquisaram os efeitos protetores da curcumina em desordens cardiovasculares e concluíram que: 1) a curcumina protege o organismo do efeito cardiotóxico da adriamicina, medicamento utilizado no tratamento do câncer. Curcumina na dose de 200 mg/kg durante sete dias antes da administração de adriamicina preveniu o efeito cardiotóxico desse medicamento. Esses autores sugerem que um dos efeitos protetores se deve ao aumento do conteúdo de glutationa, que é uma molécula detoxicante – além disso, metabólitos da curcumina, como curcumina sulfato, possuem grupos sulfidrilas e podem ajudar a manter a integridade da membrana celular, promovendo a detoxificação não enzimática de radicais hidroxilas e peróxidos de lipídios; 2) a curcumina também protege das complicações

cardiovasculares em diabéticos. O aumento do estresse oxidativo tem sido associado com a patogênese de complicações crônicas na diabetes, incluindo cardiomiopatia. Tem sido sugerido que a rota do óxido nítrico está envolvida no estresse oxidativo. O óxido nítrico é produzido sob ação da óxido nítrico sintase (NOS), óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e óxido nítrico sintase neuronal (nNOS). Essas enzimas (isoenzimas) convertem a L-arginina em L-citrolina, levando à geração do radical livre NO. A curcumina diminui a atividade dessas enzimas, diminuindo a produção de óxido nítrico. Tem sido demonstrado que o tecido de miocárdio de ratos diabéticos exibem alta atividade de eNOS e iNOS; 3) a curcumina tem efeito estabilizador de membrana no infarto do miocárdio. Tem sido observado que alterações nos lisossomos podem estar correlacionadas com danos miocelulares durante o infarto do miocárdio. A formação de vacúolos autofágicos, a ruptura dos lisossomos e a liberação dos componentes dos lisossomos têm sido encontradas em desordens cardíacas. A degradação anormal de componentes celulares provocada por hidrolases lisossômicas pode causar necrose no miocárdio de maneira irreversível. Também se observa no infarto do miocárdio um decréscimo da estabilidade dos lisossomos, que leva a aumento das enzimas lisossomais e a alterações no metabolismo de vários constituintes do tecido conectivo, como glicosamina glicanos, glicoproteínas e colágeno. Os efeitos estabilizadores da curcumina sobre os miócitos isquêmicos incluem a ação sobre membranas microssomais, podendo proteger as células de danos heterolíticos e autolíticos, alterando assim os danos no tecido. Os pesquisadores relatam também que a curcumina pode alterar as atividades de enzimas como betaglicuronidase, β-N-acetilglicosaminidase, catepsina B e D, fosfatase ácida, enzimas presentes no lisossoma e com alta atividade em infarto do miocárdio; e 4) a curcumina também atua na hipertrofia cardíaca, que pode elevar a falhas cardíacas. Quando ocorre a hipertrofia, inicia-se um número de rotas de sinalização e ocorrem alterações de expressão gênica. Fatores de trancrição, como fator-2, AP-I e GATA-4, são ativados durante o infarto. A curcumina interfere positivamente na expressão gênica e na ativação desses fatores.

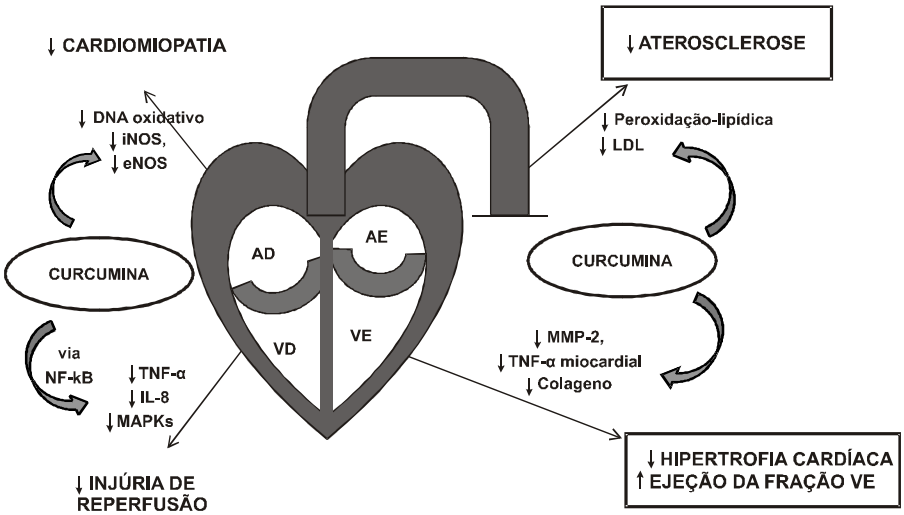


Fonte: Strimpakos e Sharma (2008).

Figura 10 – Representação gráfica da atividade de curcumina em eventos redox celulares. A curcumina pode prevenir (cruzes escuras) ou facilitar a proteção contra (+) a geração de sequela celular de RNS e ROS, dependente da posição celular (CUR = curcumina; RNS = espécie de nitrogênio reativa; ROS = espécie de oxigênio reativa; e UV = luz ultravioleta).

Por causa das suas propriedades antioxidantes bem documentadas, a curcumina tem sido extensivamente investigada pelo seu potencial de proteção cardiovascular (resumido na Figura 11).

Como visto, corantes naturais, especialmente a cúrcuma, têm apresentado propriedades farmacológicas benéficas na prevenção dos processos de aterosclerose e outras desordens do metabolismo lipídico.



Fonte: Strimpakos e Sharma (2008).

Figura 11 – Representação gráfica do potencial da curcumina na proteção cardiovascular (AD = átrio direito; VD = ventrículo direito; AE = átrio esquerdo; VE = ventrículo esquerdo; IL = interleucina; MAPK = proteína quinase mitogênica ativada; MMP = matriz metaloproteinase; LDL = lipoproteína de baixa densidade; NF-B = fator-kappa nuclear B; NOS = óxido nítrico sintase; e TNF = fator de necrose de tumoral.

4. METODOLOGIA

4.1. Modelo Animal

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biofármacos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais. Foram utilizados neste ensaio biológico experimental 66 coelhos machos da raça Nova Zelândia Branco, com 60 dias de vida ± 1.800 kg. Os animais foram provenientes do Setor de Cunicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (DZO-UFV).

4.2. Separação dos Animais em Grupos e Preparo da Dieta

Os coelhos foram acondicionados em gaiolas individuais, onde permaneceram por um período de adaptação de cinco dias, recebendo 120 g de ração comercial para coelhos da marca Purina e água *ad libitum*.

Após o período de adaptação, os animais foram divididos em 11 grupos de seis aleatoriamente, conforme mostrado na Tabela 1, permanecendo durante 30 dias.

A hiperlipidemia foi induzida fornecendo-se aos coelhos diariamente durante 30 dias a ração preparada (120 g de ração + 1% de colesterol cristalino da marca Vetec + 0,5% de ácido cólico da marca Vetec) para

todos os grupos, à exceção do grupo 1. O ácido cólico foi utilizado por atuar na emulsificação de lipídios, facilitando assim a absorção do colesterol.

A dieta hipercolesterolêmica foi preparada na fábrica de ração do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa. Para isso, triturou-se a ração comercial para coelhos da marca Purina, misturando com o colesterol e ácido cólico, sendo peletizada após tal procedimento.

Tabela 1 – Tratamento das cobaias conforme distribuição dos grupos

Grupo	Tratamento
G 1	Ração (R)
G 2	R + colesterol (1%) + ácido cólico (0,5%)
G 3	R + colesterol (1%) + ácido cólico (0,5%) + atorvastatina (10 mg)
G 4	R + colesterol (1%) + ácido cólico (0,5%) + curcumina (20 mg)
G 5	R + colesterol (1%) + ácido cólico (0,5%) + curcumina (40 mg)
G 6	R + colesterol (1%) + ácido cólico (0,5%) +curcumina (20 mg) + hesperidina (20 mg)
G 7	R + colesterol (1%) + ácido cólico (0,5%) + curcumina (40 mg) + hesperidina (40 mg)
G 8	R + colesterol (1%) + ácido cólico (0,5%) + hesperidina (20 mg)
G 9	R + colesterol (1%) + ácido cólico (0,5%) + hesperidina (40 mg)
G 10	R + colesterol (1%) + ácido cólico (0,5%) + oxy free (300 mg)
G 11	R + colesterol (1%) + ácido cólico (0,5%) + citoprópolis (700 mg)

4.3. Utilização das Substâncias-Teste

O pigmento natural curcumina em pó foi doado pela empresa Christian Hansen, e o flavonoide hesperidina em pó foi adquirido da empresa Sigma. A curcumina e a hesperidina foram encapsuladas em cápsulas duras, em doses de 20 e 40 mg, utilizando talco como veículo, em encapsuladora manual, no Laboratório de Biofármacos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa.

Durante o experimento também foi testado o *oxy free* (extrato seco da fração hidrossolúvel de própolis de *Baccharis dracunculifolia*, livre de álcool, açúcar e gorduras), em cápsulas de 300 mg, e o citoprópolis (própolis de *Baccharis dracunculifolia*), em cápsulas de 700 mg, contendo extrato seco

das frações alcoólico e aquoso, com 50% de princípio ativo, a pedido da empresa Pharma Néctar, que forneceu os produtos.

As cápsulas com as substânciais foram fornecidas por via oral, sempre às 14 h, por 30 dias.

A atorvastatina foi utilizada, para efeito de comparação, por ser um medicamento-padrão prescrito nas desordens lipídicas.

Ao final do experimento houve coleta de sangue pelo plexo retro orbital, para realização das análises de lipídios sanguíneos e parâmetros de hepatotoxicidade aguda. O material foi centrifugado em centrífuga Excelsa 2 205 N a 7.100 x g, durante 15 min, para obtenção do soro. As dosagens sorológicas foram efetuadas em equipamento multiparamétrico de Bioquímica Alizé, mod. Lisabio B.652, e kits da marca Bioclin.

4.4. Análises de Lipídios Sanguíneos

4.4.1. Determinação do Colesterol

A análise colorimétrica do colesterol no soro obtido baseou-se na transformação do colesterol esterificado em colesterol e ácidos graxos, mediado pelo colesterol esterase. O colesterol formado é oxidado pelo colesterol oxidase em colesten-4-ona-3, liberando água oxigenada. Esta, juntamente com o fenol e amino 4 antipirina, pela ação da peroxidase, é transformada no cromogênio (que absorve em 500 nm) e em água, segundo as equações:

$$\text{Ésteres do colesterol} \xrightarrow{\text{Colesterol esterase}} \text{Colesterol} + \text{Ácidos graxos}$$

$$\text{Colesterol} + O_2 \xrightarrow{\text{ColesterolOxidase}} \text{Colesterol-4-ona-3} + H_2O_2$$

$$2H_2O_2 + \text{Fenol} + 4-\text{Aminoantipirina} \xrightarrow{\text{Peroxidase}} 4H_2O + \text{Cromógeno}$$

Para dosagem, utilizou-se o equipamento muitiparamétrico de bioquímica (Alizé). Uma solução-tampão fosfato pH 7,00 a 0,1 mol/L foi colocada no aparelho, contendo as respectivas enzimas solubilizadoras e, separadamente, os soros sanguíneos a serem analisados.

Depois de programado o equipamento, este promoveu a mistura da solução mencionada com determinados soros, que foram incubados por um tempo programado a 37°C e analisados em um comprimento de onda de 500 nm.

O aparelho subtraiu a absorvância encontrada do branco (solução-tampão das enzimas com soro fisiológico) e comparou com a concentração padrão existente, fornecendo o resultado em mg/dL de colesterol no soro sanguíneo.

A fórmula geral para a conversão da absorvância na concentração em mg/dL foi a seguinte:

$$\frac{\text{Aamostra}}{\text{Apadrão}} \text{ x [padrão]}$$

em que A = absorbância.

4.4.2. Determinação do Triacilglicerol

Realizou-se a dosagem dos triacilgliceróis séricos por via inteiramente enzimática.

A lipase degrada os triacilgliceróis em glicerol e ácidos graxos. O glicerol obtido reagiu com ATP, em presença da glicerolquinase, obtendo glicerol-3-fosfato e ADP. O glicerol-3-fosfato é oxidado a diidroxiacetonafosfato pelo glicerol-3-fosfato, liberando água oxigenada. A água oxigenada, juntamente com paraclorofenol e amino 4 antipirina, em presença de peroxidase, transforma-se no cromogênio (que absorve em 505 nm), liberando água, segundo as reações.

$$\text{Triacilglicerol} \xrightarrow{\text{lipase}} \text{glicerol} + \text{Ácidos graxos}$$

$$\text{Glicerol} \xrightarrow{\text{glicerolquinase}} \text{Glicerol 3 fosfato} + \text{ADP}$$

$$\text{Glicerol 3 fosfato} \xrightarrow[\text{oxidase}]{\text{Glicerol 3 fosfato}} \text{dihidroxiacetonafosfato} + H_2O_2$$

$$2\,H_2O_2 + \text{paraclorofenol} + \text{amino} - 4 - \text{antipirina} \xrightarrow{\text{peroxidase}} \text{comogênio} + 4\,H_2O$$

Para dosagem, foi utilizado o equipamento multiparamétrico de bioquímica (Alizé). Foi colocado no equipamento uma solução-tampão fosfato pH 7,00 a 0,1 mol/L, contendo as respectivas enzimas solubilizadoras e, separadamente os soros sanguíneos a serem analisados.

Depois de programado o equipamento, este promoveu a mistura da solução anterior com os determinados soros, que foram incubados por um tempo programado a 37°C e analisados em um comprimento de onda de 505 nm.

O aparelho subtraiu a absorvância encontrada do branco (solução-tampão das enzimas do soro fisiológico) e a comparou com a concentração padrão existente, fornecendo o resultado em mg/dL de triacilglicerol no soro sanguíneo.

A fórmula geral para a conversão da absorvância na concentração em mg/dL foi a seguinte:

$$\frac{\text{Aamostra}}{\text{Apadrão}} \text{ x [padrão]}$$

em que A = absorvância.

4.4.3. Determinação do Colesterol-HDL

O método de dosagem baseou-se na precipitação dos quilomícrons e das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e de baixa densidade (LDL) contidos no soro a ser analisado, pela adição do ácido fosfotúngstico em presença do íon magnésio. O sobrenadante obtido por centrifugação contém as lipoproteínas de alta densidade (HDL), cujo colesterol é determinado pelo mesmo processo já descrito anteriormente.

4.5. Análise de Parâmetros de Toxicidade Aguda

4.5.1. Determinação da Transaminase Glutâmico Pirúvico (TGP)

A determinação cinética da atividade da TGP baseou-se na conversão da L-alanina e α-cetoglutarato em piruvato e L-glutamato, mediada por esta enzima. O piruvato formado reagiu com NADH e o íon

hidrônio, produzindo L-lactato e NAD^+, numa reação catalisada pela lactato desidrogenase (LDH), segundo as reações:

$$L-\text{alanina} + \text{alfa cetogltara to} \xleftrightarrow{TGP} \text{piruvato} + L-\text{glutamato}$$

$$\text{Piruvato} + NADH + H^+ \xleftrightarrow{LDH} L-\text{lactato} + NAD^+$$

Para dosagem, foi utilizado o equipamento multiparamétrico de bioquímica (Alizé). Foi colocado no equipamento uma solução contendo 0,18 mmol/L de NADH, LDH ≥ 1.200 U/l e 15 mmol/L de α cetoglutarato, solubilizados com um tampão contendo 100 mmol/L de tris pH 7,5 com 500 mmol/L de L-alanina, e, separadamente, os soros sanguíneos a serem analisados.

Depois de programado o equipamento, este promoveu a mistura da solução anterior com os determinados soros, que foram incubados por um tempo programado a 37°C e analisados em um comprimento de onda de 340 nm.

O aparelho subtraiu a absorvância encontrada do branco (solução-tampão das enzimas do soro fisiológico) e a comparou com a concentração padrão existente, fornecendo o resultado em U/l de TGP no soro sanguíneo.

A fórmula geral para a conversão da absorbância na concentração em U/l foi a seguinte:

U/l = absorbância encontrada x 1.746

4.5.2. Determinação da Transaminase Glutâmico Oxalacético (TGO)

A determinação cinética da atividade da TGO baseou-se na conversão da L-alanina e α cetoglutarato em oxalacetato e L-glutamato, mediada por esta enzima. O oxalacetado formado reagiu com NADH e o íon hidrônio, produzindo L-malato e NAD^+, numa reação catalisada pela malato desidrogenase (MDH), segundo as reações:

$$L-\text{alanina} + \text{alfa cetogltara to} \xleftrightarrow{GOT} \text{oxalacetat o} + L-\text{glutamato}$$

$$\text{oxalacetat o} + NADH + H^+ \xleftrightarrow{MDH} L-\text{malato} + NAD^+$$

A análise foi realizada em um comprimento de onda de 340 nm.

Para dosagem, foi utilizado o equipamento multiparamétrico de bioquímica (Alizé). Foi colocado no equipamento uma solução contendo 0,18 mmol/L de NADH, LDH ≥ 1200 U/l, MDH ≥ 500 U/l e 12 mmol/L de α cetoglutarato, solubilizados com um tampão contendo 80 mmol/L de tris pH 7,8 com 200 mmol/L de L-aspartato e, separadamente, os soros sanguíneos a serem analisados.

Depois de programado o equipamento, este promoveu a mistura da solução anterior com os determinados soros, que foram incubados por um tempo programado a 37°C e analisados em um comprimento de onda de 340 nm.

O aparelho subtraiu a absorbância encontrada do branco (solução-tampão das enzimas do soro fisiológico) e a comparou com a concentração-padrão existente, fornecendo o resultado em U/l de TGO no soro sanguíneo.

A fórmula geral para a conversão da absorvância na concentração em U/l foi a seguinte:

U/l = absorbância encontrada x 1746

4.5.3. Determinação do Ferro

O ferro sérico foi determinado pelo teste colorimétrico. O ferro é liberado da transferrina em meio ácido e reduzido ao seu estado ferroso por ação da hidroxilamina. Posteriormente, reage com ferrozine, levando à formação de um complexo de cor violácea.

Para dosagem, utilizou-se o equipamento multiparamétrico de bioquímica (Alizé). Foram marcados três tubos de ensaio com as letras B (branco), P (padrão) e A (amostra). No tubo B, adicionaram-se 2,0 mL de reagente-tampão redutor (ácido succínico 250 mmol/L, hidroxilamina 140 mmol/L, surfatante e estabilizador) e 500 μL de água destilada. No tubo P foram adicionados 2,0 mL do reagente-tampão redutor e 500 μL do reagente-padrão, contendo 100 μg/dL de ferro; e no tubo A, 2,0 mL do reagente-tampão redutor e 500 μL da amostra. Homogeneizou-se e determinou-se a absorbância da amostra em 560 nm, acertando o zero com o branco. Esta foi a absorbância A_1.

Em seguida, adicionou-se nos três tubos uma gota do reagente-padrão, contendo 100 µg/dL de ferro. Depois de programado o equipamento, este promoveu a mistura da solução anterior, que foi incubada por 10 min a 37°C. Determinaram-se as absorbâncias da amostra e do padrão (Apadrão) em 560 nm, acertando o zero com o branco. Esta absorvância correspondeu a A_2.

O ferro sérico foi calculado segundo a fórmula:

$$\text{Ferro sérico (µg/dL)} = (A_2 - A_1) \times 100$$

Como a reação de cor segue a lei de Lambert Beer, usou-se o seguinte fator de calibração:

$$\text{Fator de calibração} = \frac{100}{\text{Apadrão}}$$

$$(\text{µg/dL}) = (A_2 - A_1) \times \text{fator de calibração.}$$

Os resultados foram expressos em µg/dL.

4.5.4. Fosfatases

A fosfatase alcalina foi determinada por meio de teste cinético, segundo a reação:

P-NFF + Amino-Álcool _____ ALP → ρ- nitro Fenol + Amino-alquil Fosfato

A fosfatase alcalina (ALP) hidrolisa o ρ-nitrofenilfosfato (ρ-NFF), que é incolor, produzindo fosfato e ρ-nitrofenol em pH 9,0. A velocidade de aparição do ânion ρ-nitrofenolato (amarelo) a 405 nm é proporcional à atividade enzimática da amostra. A dietanolamina (DEA), além de regular o pH da reação, intervém ativamente nesta, atuando como receptor de fosfato liberado pela enzima.

Para dosagem, utilizou-se o equipamento muitiparamétrico de bioquímica (Alizé). Misturaram-se nove partes do tampão dietanolamina 1,0 mol/L, pH 9,0, e azida sódica a 15 mmol/L com uma parte do substrato ρ-NFF (ρ-nitrofenilfosfato) a 10 mmol/L e azida sódica 15 mmol/L, para preparo do reagente de trabalho. Depois disso, foram adicionados 20 µL da amostra e

1 mL do reagente de trabalho, que foram incubados a 37°C por um, dois e três minutos e analisados em um comprimento de onda de 405 nm.

Calculou-se a média das diferenças de absorvância por minuto (Δ A/min) e utilizou-se esse valor para cálculo do resultado em U/L, de acordo com a fórmula:

$$ALP\ (U/L) = \Delta\ A/min \times 2.757$$

4.5.5. Determinação do Gama GT

O gama GT foi determinado através de teste cinético, seguindo a metodologia de Szasz modificado, segundo a reação:

$$Gama\ GPNA + GG \xrightarrow{GamaGT} GamaGGG + PNA$$

A elevada absorção da p-nitroanilina (PNA) formada na reação de transferência do grupamento glutamil p-nitroanilida (gama GPNA) para glicilglicina (GG) é proporcional à atividade do gama GT na amostra biológica.

Para dosagem, utilizou-se o equipamento muitiparamétrico de bioquímica (Alizé). Misturaram-se 4 mL do tampão Tris 133 mmol/L, glicilglicina 138 mmol/L e azida sódica 15,38 mmol/L com γ-glutamil ρ-nitroanilida (gama GPNA) 23 mmL/L e azida sódica 15,38 mmol/L, para preparo do reagente de trabalho. Depois disso, foram adicionados 50 μL da amostra e 1 mL do reagente de trabalho, que foram incubados a 37°C, por um, dois e três minutos e analisados em um comprimento de onda de 405 nm.

Calculou-se a média das diferenças de absorbância por minuto (Δ A/min) e utilizou-se esse valor para cálculo do resultado em U/L, segundo a fórmula:

$$Gama\ GT\ (U/L) = (\Delta\ A/min) \times 2.121$$

4.6. Análise Estatística

Utilizou-se o teste de Dunnett a 5% de probabilidade para comparação entre as médias de cada grupo com o grupo controle (G2). Esse teste foi escolhido por utlilizar contrastes não ortogonais e comparar

cada média apenas com a testemunha – no caso, o grupo controle. Ele é feito quando as únicas comparações que interessam ao experimentador são as realizadas entre um determinado tratamento-padrão, geralmente a testemunha, e cada um dos demais tratamentos, não havendo interesse na comparação dos demais tratamentos entre si.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados na Tabela 2 indicam a eficiência do acréscimo de 1% de colesterol e 0,5% de ácido cólico na indução da hipercolesterolemia nos animais do grupo 2 (G2), uma vez que os níveis de colesterol foram aumentados acima de 20 vezes em relação ao grupo 1 (G1), que corresponde aos animais alimentados com ração.

De acordo com os dados obtidos (Tabela 2), os tratamentos com curcumina nas doses de 20 e 40 mg provocaram redução de 50 e 53%, respectivamente, no parâmetro colesterol. Esses resultados foram os melhores de todos os tratamentos e melhores do que o grupo tratado com atorvastatina cálcica, que reduziu apenas 36%. Quando se usou a associação curcumina + hesperidina, verificou-se redução de 24% (20 mg), havendo assim um sinergismo de adição em relação à hesperidina isolada na dose de 40 mg.

A hesperidina (20 mg) isoladamente aumentou em 12% o colesterol; quando associada com a curcumina, ambas a 20 mg, reduziu em 24%.

A homeostase do colesterol é muito importante para a prevenção de doenças cardiovasculares. Geralmente, as concentrações plasmáticas são reguladas pela biossíntese de colesterol, remoção do colesterol circulante, absorção do colesterol da dieta e de sua excreção pela bile e fezes (LEE et al., 2003).

Tabela 2 – Médias de colesterol total (mg/dL), em soro sanguíneo de coelhos machos avaliados após 30 dias em diferentes tratamentos, e seus respectivos percentuais de variação em relação ao grupo (G2) com hiperlipidemia induzida por colesterol (C) e ácido cólico (AC). Viçosa, Minas Gerais, 2008

Grupos e Tratamentos	Colesterol (mg/dL)	% Variação
G2 ração + colesterol (C) e ácido cólico (AC)	2.020,67 a	0
G1- ração (R)	101,27 b	-95
G3 ração + C + AC + atorvastatina	1.283,91 b	-36
G4 R + C + AC + curcumina (CUR) 20 mg	1.017,45 b	-50
G5 R + C + AC + curcumina (CUR) 40 mg	957,78 b	-53
G6 R + C + AC + CUR (20 mg) + HES (20 mg)	1.533,98 b	-24
G7 R + C + AC + CUR (40 mg) + HES (40 mg)	1.839,72 a	-9
G8 R + C + AC + hesperidina (HES) 20 mg	2.267,99 b	+12
G9 R + C + AC + hesperidina (HES) 40 mg	1.768,79 b	-12
G10 R + C + AC + oxy free	2.062,91 a	+2
G11 R + C + AC + citoprópolis	1.900,95 a	-6

Letras iguais equivalem a tratamentos não diferentes do doente pelo teste de Dunnett a 5% de significância.

As duas enzimas que estão diretamente envolvidas na regulação do metabolismo de colesterol são: a 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), enzima limitante na via da biossíntese do colesterol, e a acil coenzima A colesterol aciltransferase (ACAT), uma enzima que esterifica o colesterol nos tecidos, incluindo o fígado e o intestino delgado, contribuindo com a secreção hepática de VLDL. Assim, a redução da síntese de colesterol pela inibição da HMG-CoA redutase reduzirá o colesterol plasmático, e uma redução na atividade da ACAT poderá diminuir a secreção da VLDL no fígado (CARR et al., 1992); isso poderá contribuir com uma menor incidência de doenças cardio-vasculares, devido à presença reduzida do colesterol esterificado nas lesões ateroscleróticas.

A atorvastatina foi utilizada por ser um dos medicamentos prescritos em desordens lipídicas. Esses agentes são inibidores competitivos da 3-hidroxi-3-metilglutaril coezima A redutase (HMG-CoA redutase), enzima que catalisa, de forma precoce e limitante, a síntese de colesterol hepático

(BROWN; GOLDSTEIN, 1998). Sua inibição reduz o conteúdo intracelular de colesterol e, como consequência, há aumento do número de receptores de LDL nos hepatócitos, que então removem mais VLDL, IDL e LDL da circulação para repor o colesterol intracelular. Esse medicamento reduz o LDL-c de 15% a 55% em adultos e os triacilgliceróis de 7 a 28% e eleva o HDL-c de 2% a 10% (IV DIRETRIZES..., 2007). No experimento, a redução do colesterol foi de 36% no grupo que recebeu a atorvastatina; o HDL-c foi aumentado em 5% e os trialcilgliceróis reduzidos em 59%, coincidindo com a literatura.

Flavonoides derivados de frutas cítricas exercem diversas funções biológicas, incluindo efeitos preventivos e terapêuticos para várias doenças. A hesperetina e a naringerina inibem a secreção da apo B do hepatócito via redução da expressão e da atividade da ACAT-2 (*colesterol acil transferase*) e MTP (proteína transferidora de triacilglicerol microssomal) (WILCOX et al., 2001). A hesperetina reduz a biodisponibilidade de lipídios, afetando lipoproteínas que contêm apo B, como LDL, por: a) redução da atividade de ACAT 1 e ACAT 2; b) diminuição da expressão da ACAT 2; c) redução da atividade da MTP, junto com o aumento do receptor do LDL. Isso explica o efeito hipocolestero-lemiante dos flavonoides cítricos. É importante lembrar também que o LDL contém 1.000 moléculas de éster de colesterol. A enzima que faz a esterificação do colesterol chama-se colesterol aciltransferase, que é inibida por hesperetina.

Foram testados por Bok et al. (1999) os efeitos do extrato da casca de mexerica e uma mistura de dois flavonoides (hesperidina + naringina), extraídos de frutas cítricas, sobre o colesterol sanguíneo em ratos alimentados com dieta rica em colesterol, suplementados com extrato da casca de mexerica ou uma mistura de naringina e hesperidina na dose de 0,5 g/100 g. Foi observado que o extrato da casca de mexerica e a mistura dos dois flavonoides abaixaram significativamente os níveis de colesterol no plasma, colesterol hepático e triacilglicerol hepático. Hisatomi et al. (1995) e Monforte et al. (1995) também reportaram efeito hipocolesterolemiante da hesperidina e hesperetina em ratos alimentados com dieta hipercolestero-lêmica.

Morin et al. (2008) relataram mecanismos de ação para flavonoides hesperetina e nobiletina. De acordo com seus estudos, a hesperetina na dose de 200 μmol/L provocou aumento nos níveis de RNA mensageiro, responsáveis pela síntese do gene do receptor de LDL.

A hesperetina age vias elementos regulatórios de esteróis (SREBP) para síntese do receptor de LDL e tem papel crucial na região de expressão do gene porque uma mutação neste sítio atenua fortemente a indução em uma resposta à hesperetina. O gene responsável pela síntese do receptor de LDL é um alvo positivo para fatores de transcrição. Vários flavonoides aumentam a síntese dessas proteínas (SREBP). O LDL, por ser a lipoproteína que transporta colesterol da circulação para os tecidos periféricos, precisa ser reduzido na circulação. Quando aumenta a síntese de receptores, ele é captado e diminui na circulação.

Liu et al. (2008) mostraram os efeitos da naringenina e hesperidina na produção de óxido nítrico por células endoteliais. Nesse trabalho, o autor relata que alguns flavonoides podem ligar-se a receptores de estrogênio, o qual tem sido considerado por ter um papel importante nas desordens cardiovasculares. Recentes evidências sugerem que as ações vasculares do estrogênio são mediadas por super-regulação do óxido nítrico por células endoteliais vasculares. O óxido nítrico, por sua vez, exerce importante papel na regulação da pressão sanguínea, agregação plaquetária, adesão de leucócitos, migração e proliferação de células do músculo liso. Em lesões ateroscleróticas, a função regulatória do relaxamento dependente do endotélio é imperfeita e está ligada a um decréscimo da produção do óxido nítrico derivado do endotélio.

Apesar de vários autores relatarem diversos mecanismos de ação dos flavonoides sobre a homeostase do colesterol, ainda não está claro se todos os flavonoides derivados naturais exercem essas propriedades e a dose ideal recomendada para esses efeitos benéficos. Isso, de certa forma, explica a ação da hesperidina neste experimento: na dose isolada de 20 mg ela aumentou em 12% o colesterol e, na dose de 40 mg, reduziu em 12%. Sabe-se que todo fitoterápico é dose-dependente.

Em relação à curcumina, os resultados mostraram redução significativa do colesterol sanguíneo dos grupos tratados em relação ao

grupo controle (Tabela 2). O resultado encontrado coincide com os apresentados por Ramirez-Tortosa et al. (1999), onde coelhos machos foram divididos em três grupos: dois receberam durante sete semanas extrato de curcumina em dose de 1,66 mg/kg de peso corporal, e o outro, 3,2 mg/kg de peso corporal; e o outro serviu como controle. Ambas as doses reduziram os níveis de colesterol total no plasma, em relação ao controle, em 57%.

Silva et al. (2008) avaliaram o efeito da curcumina na redução dos lipídios sanguíneos em pintos hipercolesterolêmicos. A cúrcuma, na dosagem de 20 mg, o que equivale a aproximadamente 7 mg/kg, reduziu em 57% os níveis de colesterol em relação ao grupo controle. Resultados semelhantes foram obtidos por Arafa (2005), que conduziu experimentação em 30 ratos albinos. Os animais foram divididos em três grupos de dez cada um, sendo um grupo controle, outro com dieta com alto teor de colesterol e o outro com a mesma dieta suplementada com 0,5% w/w de curcumina durante sete dias consecutivos (1 mL 100 g^{-1}). A dieta enriquecida com curcumina reduziu o colesterol total em 21% e aumentou o HDL-c em 50%.

A curcumina também reduziu os níveis de colesterol em ratos alimentados com dieta hipercolesterolemiante, de acordo com o estudo desenvolvido por Manjunatha e Srinivasan (2007), em que os animais alimentados com dieta rica em gordura e tratados com curcumina a 0,2% tiveram redução significativa de 12% no colesterol sanguíneo em comparação com o grupo controle, que recebeu somente dieta rica em gordura. Contudo, o colesterol e os fosfolipídios hepáticos não foram afetados pela curcumina, o que pode sugerir que a redução dos níveis sanguíneos de colesterol foi obtida por outras vias metabólicas.

Segundo Arafa (2005), os mecanismos de ação hipocolesterolemiante da curcumina são obscuros, porém esse autor sugere que ela atua inibindo a absorção do colesterol dietético e não na síntese, uma vez que a concentração de curcumina nas fezes é muito maior do que no sangue, devido à baixa absorção. Também Manjunatha e Srinivasan (2007) testaram o efeito da curcumina na colesterolemia de ratos alimentados com ração e não observaram modificação significativa

nos níveis séricos de colesterol em comparação com o grupo que recebeu somente ração, o que pode também colaborar com essa teoria.

Estudo em humanos (n = 36) não comprovou efeito da curcumina em diminuir o colesterol, quando alimentados com dieta normolipídica e 1 g/dia ou 4 g/dia de curcumina ou placebo (BAUM et al., 2007). A concentração de colesterol foi positivamente correlacionada com a dose de curcumina no soro, o que sugeriu que a curcumina pode elevar o colesterol e não diminuí-lo (apesar de ter ocorrido aumento na fração HDL), porém o próprio autor considerou um n pequeno, tendo em vista as variações individuais de absorção e também a alta dosagem, comparada com a de outros estudos. Outro estudo em humanos não comprovou esses dados (SONI; KUTTAN, 1992).

Ramirez-Tortosa et al. (1998) relataram que o extrato da cúrcuma aumentou *in vitro* a resistência à oxidação da LDL de humanos. Quando LDL foi submetido ao $CuSO_4$ para a oxidação, a adição desse extrato aumentou a fase (*lag phase*) e diminuiu a formação de dienos conjugados, porque este extrato interrompeu o processso de oxidação inicial. Em outro estudo em coelhos, os resultados indicaram que administração oral de extrato hidroalcoólico de cúrcuma, na dose de 1,6 mg/kg peso, reduziu a suscetibilidade da LDL à peroxidação lipídica em um modelo de aterosclerose experimental (RAMIREZ-TORTOSA et al., 1999).

A oxidação da LDL e os processos oxidativos em geral desempenham um importante papel na patogênese da aterosclerose. De fato, estudos *in vitro* têm identificado que a LDL oxidada é um agente aterogênico (RAMIREZ-TORTOSA et al., 1999). A LDL oxidada exerce uma magnitude de efeitos potencialmente aterogênicos *in vivo* e *in vitro*, e partículas de LDL, modificadas pela oxidação, têm sido isoladas de lesões ateroscleróticas (STEINBERG et al., 1989; WITZTUM; STEINBERG, 1991). As três maiores células da parede arterial, isto é, células endoteliais, monócitos/macrófagos e células musculares lisas, são capazes de modificar a LDL pela oxidação. Tem sido reportado que a modificação oxidativa da LDL no macrófago ocorre independentemente da ligação no receptor de LDL. Assim, a LDL oxidada pode ser proaterogênica por diferentes mecanismos: aumento na captação por macrófagos, levando ao

aumento de colesterol esterificado e à formação de células espumosas; ação quimiotática sobre monócitos e linfócitos T; e ações citotóxicas e alterações adversas na via de coagulação, mais especificamente na agregação plaquetária (REAVEN; WITZTUM, 1995). Os resultados dos estudos permitem sugerir que os efeitos do curcumina são dependentes da dose administrada.

Os níveis de enzimas antioxidantes, que constituem a defesa principal contra a espécie reativa de oxigênio, desempenham um papel significativo no controle da peroxidação lipídica e na proteção da oxidação da LDL-colesterol. Estudos têm demonstrado que a atividade das enzimas antioxidantes glutationa transferase sérica, glutationa redutase e glutationa peroxidase é mais alta em consequência do consumo de curcumina.

A glutationa hepática foi aumentada pela dieta contendo curcumina em animais alimentados com dieta rica em gordura em 22% (MANJUNATHA; SRINIVASAN, 2007). Também houve redução do peróxido de lipídio hepático em 23%. Um aumento semelhante na glutationa peroxidase hepática também ocorreu em ratos alimentados com dieta rica em gordura e que consumiram 1% de curcumina (REDDY; LOKESH, 1994). Outros estudos têm demonstrado que a curcumina causa aumento na atividade da glutationa transferase no fígado do roedor, o que pode contribuir para as propriedades anti-inflamatórias (PIPER et al., 1998), e também aumenta significativamente as atividades da glutationa peroxidase, glutationa redutase e catalase no fígado (IGBAL et al., 2003).

O Gráfico 1 mostra as variações em porcentagem dos níveis de colesterol no soro sanguíneo dos coelhos, de acordo com os grupos formados, em comparação com o grupo G2.

De acordo com a Tabela 3, observa-se que a hesperidina (40 mg) foi o melhor tratamento, uma vez que aumentou o parâmetro HDL-colesterol em 8% em 30 dias de tratamento e reduziu o colesterol total em 12%. Isso é importante, visto que a lipoproteína HDL transporta colesterol da circulação para o fígado, onde ele é metabolizado. Já a curcumina, a 20 mg, provocou redução do HDL em 36% em 30 dias, e na dose de 40 mg, redução de 1%. Portanto, na dose de 40 mg houve efeito melhor e a hesperidina a 40 mg provocou melhor resposta do que a atorvastatina cálcica.

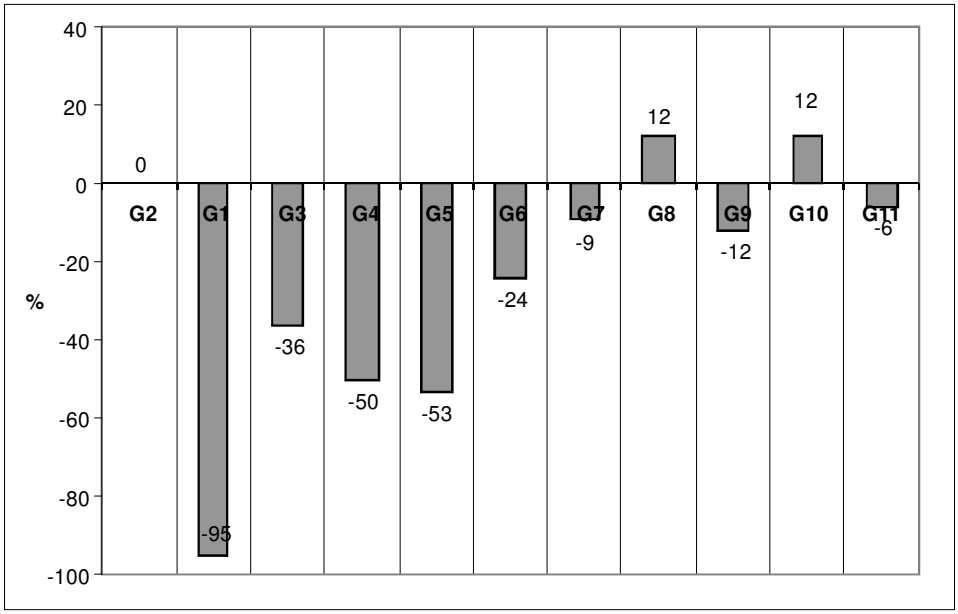


Gráfico 1 – Percentuais de variação de colesterol total em relação ao G2 com hiperlipidemia induzida por colesterol (C) e ácido cólico (AC).

Tabela 3 – Médias de colesterol-HDL (mg/dL), em soro sanguíneo de coelhos machos avaliados após 30 dias em diferentes tratamentos, e seus respectivos percentuais de variação em relação ao grupo (G2) com hiperlipidemia induzida por colesterol (C) e ácido cólico (AC). Viçosa, Minas Gerais, 2008

Grupos e Tratamentos	Colesterol-HDL (mg/dL)	% Variação
G2 ração + colesterol (C) e ácido cólico (AC)	57,16 a	0
G1 - ração (R)	37,20 b	-35
G3 ração + C + AC + atorvastatina	59,80 a	+5
G4 R + C + AC + curcumina (CUR) 20 mg	36,86 b	-36
G5 R + C + AC + curcumina (CUR) 40 mg	56,55 a	-1
G6 R + C + AC + CUR (20 mg) + HES (20 mg)	49,76 a	-13
G7 R + C + AC + CUR (40 mg) + HES (40 mg)	43,11 b	-25
G8 R + C + AC + hesperidina (HES) 20 mg	52,25 a	-9
G9 R + C + AC + hesperidina (HES) 40 mg	61,58 a	+8
G10 R + C + AC + oxy free	50,35 a	-12
G11 R + C + AC + citoprópolis	46,58 b	-19

Letras iguais equivalem a tratamentos não diferentes do doente pelo teste de Dunnett a 5% de significância.

Outros trabalhos não encontraram variações na HDL-colesterol nos grupos tratados com curcumina em relação ao grupo controle com dieta rica em lipídios (MANJUNATHA; SRINIVASAN, 2007; SILVA et al., 2008).

O Gráfico 2 mostra as variações em porcentagem dos níveis de HDL-colesterol no soro sanguíneo dos coelhos, de acordo com os grupos formados, em comparação com o grupo G2.

Em pesquisas anteriores que utilizaram mistura de flavonoides cítricos e extratos de casca de cítricos, bem como éter 7-O-cetílico da naringenina, em ratos alimentados com doses elevadas de colesterol, foi observado ligeiro aumento nas concentrações de HDL, comparadas às do grupo controle (BOK et al*.,* 1999; LEE et al., 2003). Em outros estudos com flavonoides em coelhos e ratos, os níveis de HDL permaneceram inalterados (KIRK et al., 1998; LEE et al., 2001; ANILA; VIJAYALAKSHMI, 2001). Esses estudos utilizaram modelos animais que apresentam diferenças metabólicas em relação ao perfil lipídico de cobaias, as quais possuem maiores concentrações plasmáticas de colesterol-LDL e menores concentrações de colesterol-HDL, ao passo que os ratos atingem a maioria do colesterol na fração LDL, e os coelhos, na fração VLDL (FERNANDEZ, 2001).

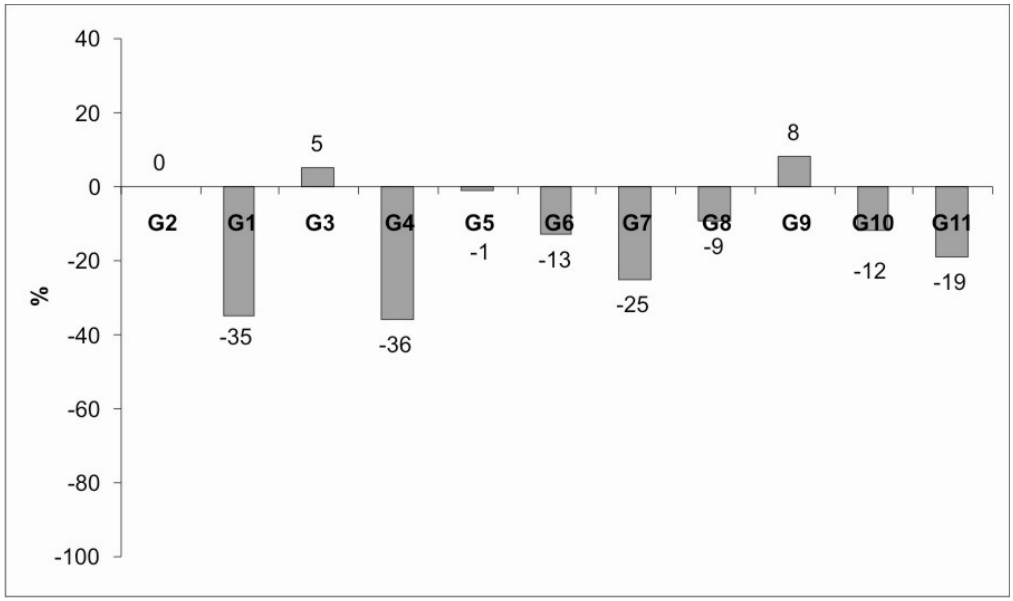


Gráfico 2 – Percentuais de variação de colesterol-HDL em relação ao G2 com hiperlipidemia induzida por colesterol (C) e ácido cólico (AC).

A concentração total de triacilgliceróis foi 53,47% maior nos animais alimentados com dieta contendo colesterol + ácido cólico, quando comparada com o grupo que recebeu apenas ração. A hipertrigliceridemia produzida pela dieta rica em colesterol + ácido cólico foi significativamente reduzida (Tabela 4) nos animais tratados com curcumina a 20 e 40 mg, que tiveram porcentagens de redução de 54 e 15% no parâmetro triacilglicerol, respectivamente.

Resultados semelhantes também foram obtidos por Manjunatha e Srinivasan (2007), em que animais alimentados com dieta rica em gordura tiveram aumento de 63% no perfil de TG, enquanto o grupo tratado com curcumina apresentaram redução de 20%. Quando a curcumina foi associada com a capsaicina a redução foi menor, de 12%, demonstrando que não houve sinergismo de ação. Também nesse estudo, os TG hepáticos mostraram redução de 38% no grupo que recebeu curcumina, o que pode sugerir que o mecanismo de ação hipotrigliceridemiante da curcumina seja em nível hepático.

Os triacilgliceróis são sintetizados no fígado e no intestino e incorporados nas lipoproteínas, VLDL e quilomícrons, respectivamente. O quilomícron e a VLDL sofrem rápido metabolismo via ação da lipase lipoproteica, lipase hepática e da proteína transferidora de éster. Qualquer perturbação que provoque a síntese aumentada de quilomícrons e/ou VLDL, ou diminuição do metabolismo, causará elevação dos triacilgliceróis no soro. No caso, a adição de colesterol + ácido cólico nas dietas pode ser a responsável pela elevação dos triacilgliceróis no grupo controle, que foi atenuada pela adição dos constituintes pesquisados, conforme mostrado no Gráfico 3.

A hipertrigliceridemia é correlacionada com um risco aumentado de doença cardiovascular e é independente de níveis de colesterol sanguíneo, como sugerido por alguns estudos. A eficácia anti-hipertrigliceridêmica da curcumina também foi evidenciada em outro estudo, em ratos alimentados com dieta rica em gordura; essa influência resultou na modificação do perfil lipídico na membrana dos eritrócitos (KEMPAIAH; SRINIVASAN, 2006).

Tabela 4 – Médias de triacilgliceróis (mg/dL), em soro sanguíneo de coelhos machos avaliados após 30 dias em diferentes tratamentos, e seus respectivos percentuais de variação em relação ao grupo (G2) com hiperlipidemia induzida por colesterol (C) e ácido cólico (AC). Viçosa, Minas Gerais, 2008

Grupos e Tratamentos	Triacilgliceróis (mg/dL)	% Variação
G2 ração + colesterol e ácido cólico	129,12 a	0
G1 - ração (R)	84,13 b	-35
G3 ração + C + AC. C + atorvastatina	52,78 b	-59
G4 R + AC. C + curcumina (CUR) 20 mg	58,75 b	-54
G5 R + C. + AC. C. + curcumina (CUR) 40 mg	109,90 b	-15
G6 R + C + AC + CUR (20 mg) + HES (20 mg)	82,36 b	-36
G7 R + C + AC + CUR (40 mg) + HES (40 mg)	74,55 b	-42
G8 R + C + AC + hesperidina (HES) 20 mg	73,93 b	-43
G9 R + C + AC + hesperidina (HES) 40 mg	64,68 b	-50
G10 R + C + AC + oxy free	138,38 a	+7
G11 R + C + AC + citoprópolis	92,38 b	-28

Letras iguais equivalem a tratamentos não diferentes do doente pelo teste de Dunnett a 5% de significância.

A ação hipocolesterolemiante e hipotrigliceridemiante da curcumina (0,5%) foi também evidenciada em ratos com diabetes induzida por streptozotocina (BABU; SRINIVASAN, 1997). Tem sido reportada atividade hipotrigliceridêmica da curcumina, capsaicina e ácido garlico (SRINIVASAN et al., 2004).

Silva et al. (2008) relataram redução de 92% dos níveis de triacilgliceróis em pintos hipercolesterolêmicos, alimentados com dieta contendo 20 mg de cúrcuma.

Fujiwara et al. (2008) relataram os efeitos da curcumina sobre a gliconeogênese e a glicogenólise. Verificou-se que a curcumina a 25 µmolar provocou efeito inibitório aditivo com a insulina na gliconeogênese e na glicogenólise. Esses resultados indicaram que a curcumina inibe a produção de glicose hepática de modo insulino-dependente. As enzimas glicose-6-fosfatase

hepática (G6Pase) e fosfoenolpiruvato carboxinase (PEPCK) tiveram sua atividade reduzida em 30%. Também foi observado que a 25 μmolar a curcumina provocou aumento na atividade e na fosforilação da AMP quinase α-Thr^{-172}. Assim o efeito antidiabético da curcumina pode estar relacionado à redução na produção de glicose hepática causada por ativação da AMP quinase e inibição da G6Phase e da PEPCK.

Uma redução na glicose é importante, visto que esta é influenciada pela insulina e captada pelo tecido adiposo, onde ocorre intensa síntese de TG. Logo, a reduzição da glicose ajuda a reduzir TG.

Já o grupo 3, tratado com atorvastatina cálcica, mostrou redução de 59%. Também o grupo tratado com hesperidina teve excelente redução de 50% na dose de 40 mg. As associações curcumina e hesperidina tiveram uma redução menor que as citadas, porém significativa, de 36 e 42%, nas doses de 20 e 40 mg, respectivamente. Na dose de 40 mg a associação entre hesperidina e curcumina foi mais eficaz do que na dose isolada de curcumina a 40 mg, demonstrando um sinergismo de ação entre os dois compostos.

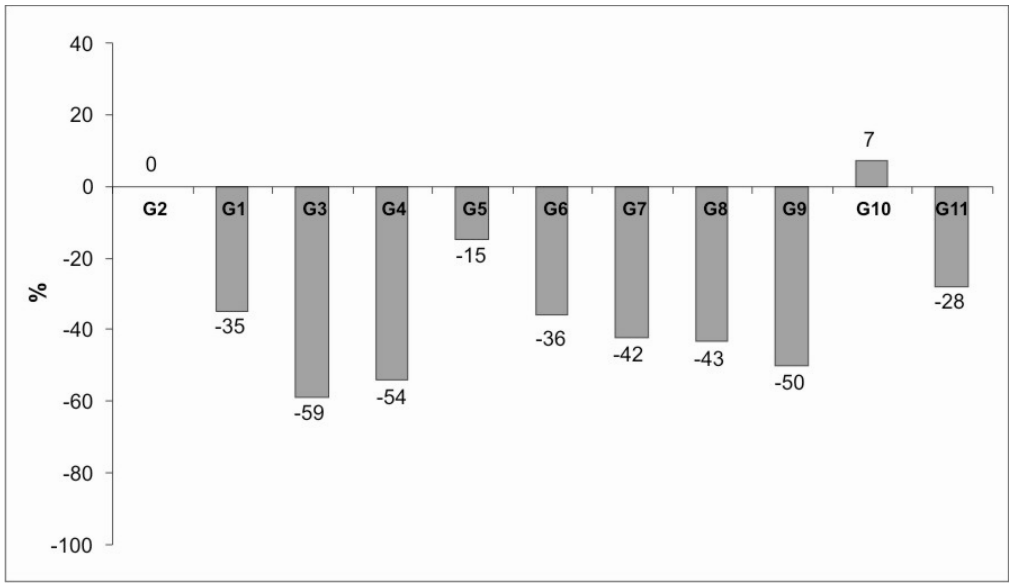


Gráfico 3 – Percentuais de variação de triacilgliceróis em relação ao G2 com hiperlipidemia induzida por colestrol (C) e ácido cólico (AC).

De acordo com Cha et al. (2001), a administração de hesperidina parece não influenciar a atividade de enzimas hepáticas envolvidas na síntese de triacilgliceróis, como a fosfo-hidrolase fosfatídeo (PAP), porém parece afetar o conteúdo de triacilgliceróis no fígado. Tem sido sugerido que o PAP microssomal é uma enzima que na forma ativa participa da síntese de triacilgliceróis. Outro possível mecanismo da hesperetina para reduzir TG seria a inibição da síntese de ácidos graxos, alteração de enzimas que geram NADPH, alteração na atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase e de enzimas málicas.

Estudos desenvolvidos por Choi et al. (1991) mostraram que a administração de formas glicosiladas de naringenina e hesperetina resultou numa significativa redução de triacilgliceróis e colesterol no plasma de ratos hiperlipidêmicos.

O citoprópolis apresentou redução de 28% nos triacilgliceróis, o que em um mês é um bom resultado.

Como o fígado desempenha papel importante no metabolismo de lipídios e colesterol, os estudos devem ser focados na ação dos compostos ativos sobre ele. Por isso, foram determinados o ferro, o TGO, o TGP, a fosfatase alcalina e Gama GT, com objetivo de pesquisar danos hepáticos dos flavonoides (hesperedina) e do corante natural curcumina, ou a associação dos dois, além do *oxi free* e do citoprópolis.

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 5), o grupo tratado com curcumina (40 mg) + hesperidina (40 mg) foi o que mais influenciou a redução do ferro (-49%). O grupo 4, tratado com curcumina, provocou aumento de 28% nesse parâmetro (Gráfico 4).

O ferro representa o metal de transição mais importante e abundante do organismo humano. É essencial à síntese de hemoglobina, cumprindo sua função de transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos, e de mioglobina, como forma de estoque e de transportador de oxigênio nos músculos. O ferro também está envolvido em reações de transporte de elétrons, através do sistema citocromo, e é parte integrante de metaloenzimas envolvidas em importantes reações enzimáticas (oxidases, proteínas Fe-sulfuradas, redutases, peroxidases). O ferro sérico encontra-se elevado nas anemias sideroblásticas, anemias hemolíticas, anemias hereditárias, hepatite aguda e moléstias crônicas do

fígado. Baixos níveis de ferro são encontrados nas infecções crônicas, neoplasias, parasitoses e deficiências alimentares.

O fígado desempenha um papel fundamental, sintetizando a transferrina, que é a maior proteína transportadora de ferro. Logo, se houver lesão no fígado, haverá comprometimento no transporte de ferro para os tecidos-alvo, ficando o ferro livre no plasma. No experimento, não houve elevação dos níveis de ferro dos animais, à exceção do grupo 4.

Estudos atuais indicam que muitas doenças crônicas, incluindo CVD, e pelo menos algumas formas de câncer são iniciadas por oxidação de radicais livres dos lipídios, dos ácidos nucleicos ou das proteínas. Por exemplo, atualmente suspeita-se que o mecanismo subjacente ao desenvolvimento da aterosclerose seja medido por componentes de radicais livres de espécies reativas de oxidação (ERO). Esses produtos incluem o radical superóxido, o radical hidroxil (OH) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (COSTA, 2008).

Tabela 5 – Médias de ferro (mg/dL), em soro sanguíneo de coelhos machos avaliados após 30 dias em diferentes tratamentos, e seus respectivos percentuais de variação em relação ao grupo (G2) com hiperlipidemia induzida por colesterol (C) e ácido cólico (AC). Viçosa, Minas Gerais, 2008

Grupos e Tratamentos	Ferro	% Variação
G2 ração + colesterol e ácido cólico	208,41 a	0
G1- ração (R)	325,21 b	+56
G3 ração + C + AC. C + atorvastatina	193,90 a	-7
G4 R + AC. C + curcumina (CUR) 20 mg	266,91 b	+28
G5 R + C. + AC. C. + curcumina (CUR) 40 mg	147,73 b	-29
G6 R + C + AC + CUR (20 mg) + HES (20 mg)	216,08 a	+4
G7 R + C + AC + CUR (40 mg) + HES (40 mg)	105,38 b	-49
G8 R + C + AC + hesperidina (HES) 20 mg	175,03 b	-16
G9 R + C + AC + hesperidina (HES) 40 mg	181,72 b	-13
G10 R + C + AC + oxy free	166,23 b	-20
G11 R + C + AC + citoprópolis	130,86 b	-37

Letras iguais equivalem a tratamentos não diferentes do doente pelo teste de Dunnett a 5% de significância.

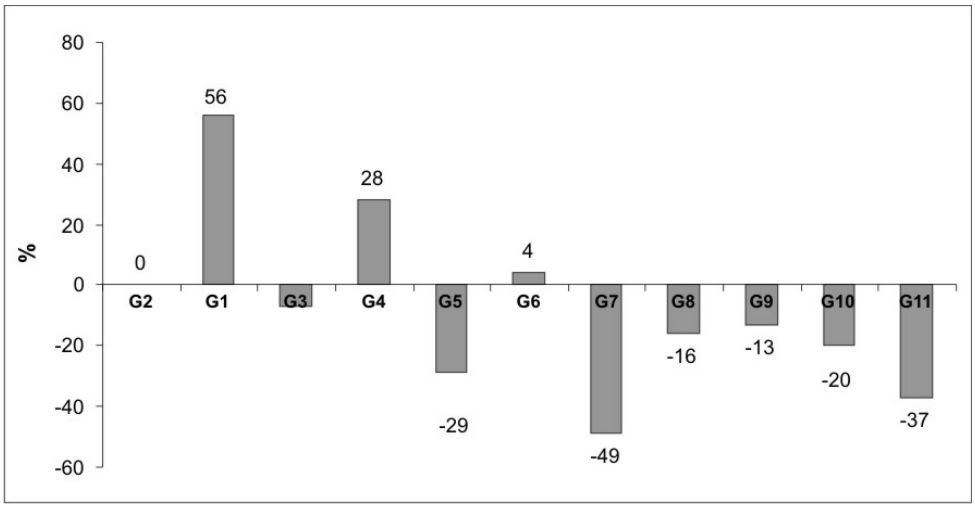


Gráfico 4 – Percentuais de variação de ferro em relação ao G2 com hiperlipidemia induzida por colesterol (C) e ácido cólico (AC).

A formação de ERO é algumas vezes, mas não sempre, mediada por certos oligoelementos essenciais (como por exemplo, o ferro); uma vez formadas, as EROs reagem com ácidos graxos insaturados localizados em LDL, criando peróxidos lipídicos, outras espécies de radicais livres. Como todos os radicais livres, os peróxidos lipídicos iniciam a oxidação de outros compostos, incluindo as proteínas presentes nas lipoproteínas (apoproteínas). Isso leva à formação de produtos radicais livres por toda a partícula ampla e heterogênea da lipoproteína. Células associadas com a parede arterial ingerem as lipoproteínas oxidadas resultantes. Uma vez presente nessas células, o metabolismo posterior desse complexo modificado parece não ocorrer. Após algum tempo, outras respostas fisiopatológicas estabilizam a lipoproteína oxidada depositada como placa aterosclerótica (COSTA, 2008). Logo, excesso de ferro no sangue não é uma situação desejável nesse experimento.

Pesquisas realizadas por Messner et al. (2009) mostraram que a curcumina reduz os efeitos tóxicos de ferro em células epiteliais do fígado. Altas doses do íon Fe podem causar toxicidade hepática, aumento do risco de falência do fígado ou carcinomas hepatocelulares em humanos. A curcumina (diferuloilmetano) pode ser consumida em altas doses, por ter baixa toxicidade (12 g/dia em humanos). Uma dose de 4 g de curcumina pode ligar-se a 600 mg do íon Fe, o que corresponde aproximadamente a 15% do total do íon Fe no corpo humano.

No experimento, na dose de 40 mg houve maior redução do íon ferro. Mesmo no grupo com 20 mg de curcumina o conteúdo de ferro foi menor do que o do grupo normal; talvez isso possa ser explicado pelo fato de a complexação (curcumina + ferro) ser dose dependente.

Pelo resultado, observou-se que o consumo de alimentos contendo curcumina e ao mesmo tempo sucos cítricos, que contêm hesperidina, pode aumentar o sequestro de ferro, o que é um dado importante para os profissionais de saúde, uma vez que a anemia ferropriva é um problema de saúde pública no Brasil; embora os sucos cítricos contenham vitamina C, também interferiram na absorção positiva do ferro.

Também é conhecido que alguns flavonoides quelam com o ferro, removendo assim o fator causal do desenvolvimento de radicais livres, pois o ferro, na presença de espécies reativas de oxigênio, causa peroxidação lipídica. Segundo Ferrali et al. (1997), a quercetina apresentou propriedades quelantes e estabilizantes do ferro.

De acordo com a Tabela 6, observou-se que todos os grupos tratados aumentaram o parâmetro TGO. Embora tenha ocorrido esse aumento, ele ainda foi inferior ao do grupo normal, que teve uma atividade de 112% em relação ao G2. O grupo G2 hipercolesterolêmico mostrou redução na atividade de TGO, apresentando 34,43 UI/mL. O grupo tratado com *oxy free* foi o que mais aumentou o parâmetro TGO: 94% (Gráfico 5).

A ação tóxica é caracterizada quando a atividade aumenta acima do valor normal, porém, se a atividade for muito baixa, também é caracterizada a hepatotoxidade. Esses resultados não caracterizam efeitos toxicológicos dos grupos tratados (G3 a G11).

Na Tabela 7, todos os tratamentos aumentaram a atividade de TGP; o grupo 4 aumentou em 77%. No entanto, todas as alterações na atividade de TGP em todos os tratamentos ainda foram inferiores às do grupo normal. O G2 hipercolesterolêmico teve redução de 257% em relação ao grupo G1 (Gráfico 6).

Por serem enzimas intracelulares, em geral os níveis séricos de TGO ou AST e TGP ou ALT são muito baixos. Qualquer destruição significativa do tecido dá origem a níveis elevados de transaminase sérica. Há alterações dos níveis séricos de TGO e TGP em algumas doenças hepáticas.

Tabela 6 – Médias de TGO (UI/mL), em soro sanguíneo de coelhos machos avaliados após 30 dias em diferentes tratamentos, e seus respectivos percentuais de variação em relação ao grupo (G2) com hiperlipidemia induzida por colesterol (C) e ácido cólico (AC). Viçosa, Minas Gerais, 2008

Grupos e Tratamentos	TGO (UI/mL)	% Variação
G2 ração + colesterol e ácido cólico	34,43 a	0
G1 - ração (R)	73,16 b	+112
G3 ração + C + AC. C + atorvastatina	54,50 b	+58
G4 R + AC. C + curcumina (CUR) 20 mg	62,91 b	+83
G5 R + C. + AC. C. + curcumina (CUR) 40 mg	62,63 b	+82
G6 R + C + AC + CUR (20 mg) + HES (20 mg)	49,16 b	+43
G7 R + C + AC + CUR (40 mg) + HES (40 mg)	57,50 b	+67
G8 R + C + AC + hesperidina (HES) 20 mg	54,00 b	+57
G9 R + C + AC + hesperidina (HES) 40 mg	60,50 b	+76
G10 R + C + AC + oxy free	66,83 b	+94
G11 R + C + AC + citoprópolis	57,33 b	+67

Letras iguais equivalem a tratamentos não diferentes do doente pelo teste de Dunnett a 5% de significância.

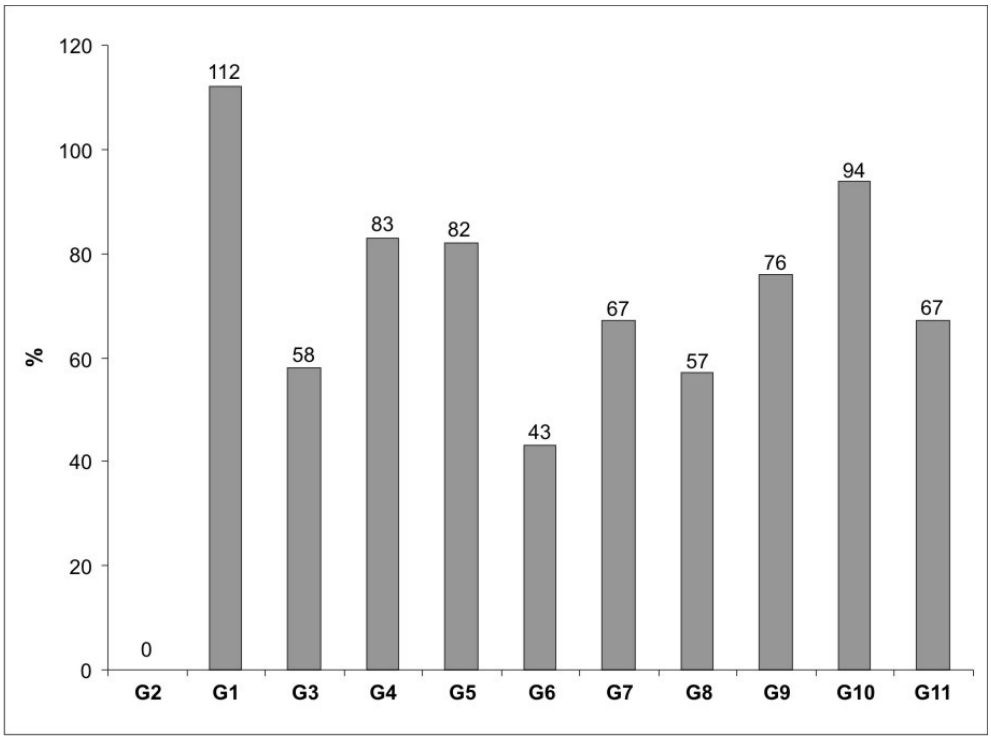


Gráfico 5 – Percentuais de variação de TGO (UI/dL) em relação ao G2 com hiperlipidemia induzida por colesterol (C) e ácido cólico (AC).

Tabela 7 – Médias de TGP (UI/mL), em soro sanguíneo de coelhos machos avaliados após 30 dias em diferentes tratamentos, e seus respectivos percentuais de variação em relação ao grupo (G2) com hiperlipidemia induzida por colesterol (C) e ácido cólico (AC). Viçosa, Minas Gerais, 2008

Grupos e Tratamentos	TGP (UI/mL)	% Variação
G2 Ração + colesterol e ácido cólico	40,10 a	0
G1- Ração (R)	143,00 b	+257
G3 ração + C + AC. C. + atorvastatina	66,50 b	+66
G4 R + AC. C + curcumina (CUR) 20 mg	70,83 b	+77
G5 R + C. + AC. C. + curcumina (CUR) 40 mg	57,16 b	+43
G6 R + C + AC + CUR (20 mg) + HES (20 mg)	42,83 a	+7
G7 R + C + AC + CUR (40 mg) + HES (40 mg)	52,16 a	+30
G8 R + C + AC + hesperidina (HES) 20 mg	43,00 a	+7
G9 R + C + AC + hesperidina (HES) 40 mg	58,50 b	+46
G10 R + C + AC + oxy free	60,33 b	+50
G11 R + C + AC + citoprópolis	49,16 a	+23

Letras iguais equivalem a tratamentos não diferentes do doente pelo teste de Dunnett a 5% de significância.

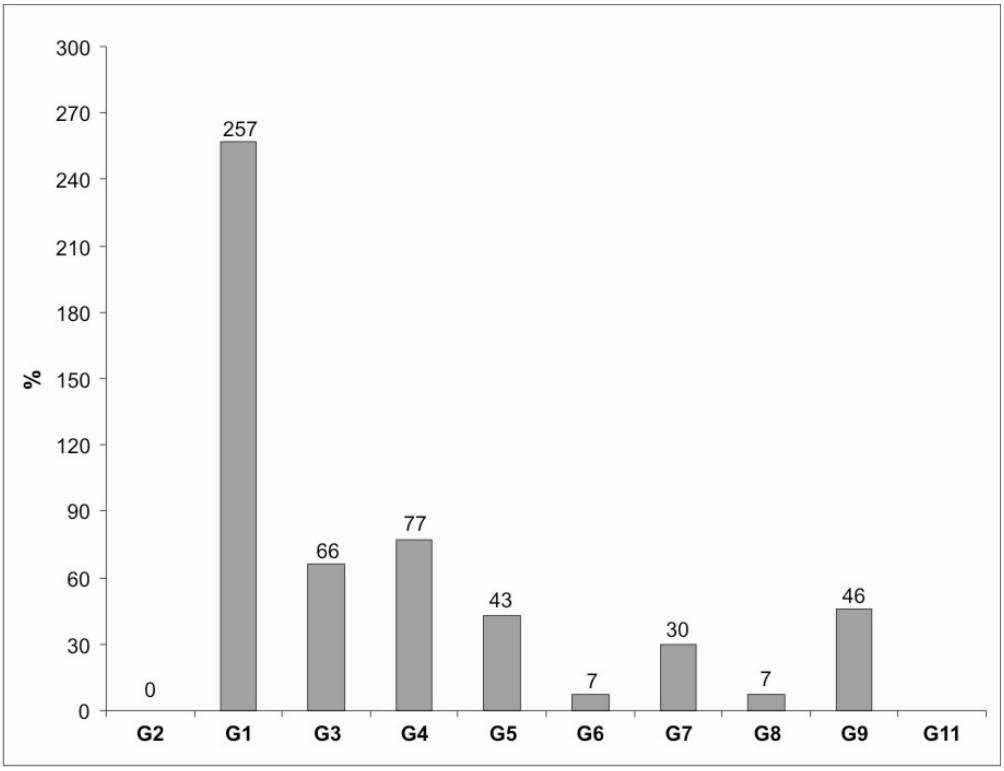


Gráfico 6 – Percentuais de variação de TGP (UI/dL) em relação ao G2 com hiperlipidemia induzida por colesterol (C) e ácido cólico (AC).

A disponibilidade de kits comerciais preparados tem tornado a prova da TGP ou ALT um procedimento amplamente aceito para detecção de hepato-patias celulares (COLES, 1984).

A ALT ou TGP é uma enzima que catalisa a transferência do grupamento amina de um aminoácido para um cetoácido (MEYER et al., 1995).

A AST ou TGO é uma enzima que catalisa a transaminação reversível da L-aspartato e 2-cetoglutarato a oxalacetato e glutamato (CARLSON, 1993). Suas mais elevadas concentrações estão localizadas nas células musculares esqueléticas e nos hepatócitos (MEYER et al., 1995).

Baum et al. (2007), com o objetivo de verificar a segurança na administração de curcumina a humanos, nas doses de 1 e 4 g/dia por seis meses, verificaram no soro dos voluntários os níveis de sódio, potássio, ureia, creatinina, proteína, albumina, bilirrubina, fosfatase alcalina e alanina aminotransferase (ALT/GPT). Somente a ALT/GPT se diferenciou entre grupos de dose por ANOVA em $p < 0,05$ (base, $p = 0,008$; um mês, $p = 0,04$; seis meses, $p = 0,06$). A diferença maior foi no grupo que recebeu 1 g/dia. Os níveis de ALT/GPT foram de 16,8 para o grupo de placebo, 24,6 para 1 g/dia de curcumina e 16,5 para o grupo que recebeu 4 g/dia de curcumina.

Subudhi et al. (2009) realizaram uma pesquisa sobre a suplementação de curcumina e vitamina E e seus efeitos em restaurar a histoarquitetura hepática em ratos com hipotireoidismo. A vitamina E foi utilizada como suplementação, uma vez que no hipotireoidismo ela está deficiente. O hormônio da tireoide aumenta o metabolismo e nesse estudo observou-se que o tratamento com curcumina e vitamina E resultou em aumento na atividade da TGP nos ratos com hipotireoidismo. Esse estudo também demonstrou que os animais tratados melhoraram a histoarquitetura hepática, assemelhando-se ao animal normal. Como o fígado é o órgão central do metabolismo, esses resultados são muito importantes.

Ansari et al. (2007) estudaram o efeito do pré-tratamento oral com curcumina (200 mg/kg) na indução de injúria de miocárdio em ratos tratados com isoproterenol. O uso de curcumina por 20 dias de pré-tratamento em ratos tratados com isoproterenol diminuiu significativamente ($p < 0,01$) os níveis séricos de lactato desidrogenase, creatina quinase,

aspartato transaminase, alanina transaminase e níveis de peróxidos do miocárdio e aumentou os níveis de antioxidantes endógenos do miocárdio (superóxido dismutase, catalase e glutationa), quando comparados com ratos controles.

A hesperidina, flavona glicosilada, possui atividades antioxidante, antibacteriana, anti-inflamatória e efeito anti-hepatotóxico, prevenindo os efeitos citotóxicos provocados por óxido nítrico, radicais livres e lipopolissaca-rídeos, segundo dados obtidos por Kaur et al. (2006), que usaram os lipopolissa-carídeos para induzir hepatotoxidade, na dose de 1 mg/kg peso via intraperito-nial. Os níveis séricos de ALT e AST foram aumentados, demonstrando o dano hepático, porém a hesperidina decresceu a elevação dos níveis de ALT e AST. A hesperidina, por si só, não afetou o AST ou ALT.

De acordo com a Tabela 8, observa-se que a curcumina a 20 mg reduziu em 35% a atividade da fosfatase alcalina.

Tabela 8 – Médias de fosfatase alcalina, em soro sanguíneo de coelhos machos avaliados após 30 dias em diferentes tratamentos, e seus respectivos percentuais de variação em relação ao grupo (G2) com hiperlipidemia induzida por colesterol (C) e ácido cólico (AC). Viçosa, Minas Gerais, 2008

Grupos e Tratamentos	Fosfatase Alcalina	% Variação
G2 Ração + colesterol e ácido cólico	217,16 a	0
G1- RAÇÃO (R)	212,33 a	-2
G3 RAÇÃO + C + AC. C + atorvastatina	220,33 a	+1
G4 R + AC. C + curcumina (CUR) 20 mg	142,00 b	-35
G5 R + C. + AC. C. + curcumina (CUR) 40 mg	173,50 b	-20
G6 R + C + AC + CUR (20 mg) + HES (20 mg)	156,66 b	-28
G7 R + C + AC + CUR (40 mg) + HES (40 mg)	192,83 a	-11
G8 R + C + AC + hesperidina (HES) 20 mg	210,16 a	-3
G9 R + C + AC + hesperidina (HES) 40 mg	192,66 a	-11
G10 R + C + AC + oxy free	179,00 b	-18
G11 R + C + AC + citoprópolis	279,16 b	+29

Letras iguais equivalem a tratamentos não diferentes do doente pelo teste de Dunnett a 5% de significância

A fosfatase alcalina (FA) é uma enzima associada à membrana, que está amplamente distribuída no organismo, sendo encontrada em altas concentrações nos ossos, na mucosa intestinal, nas células tubulares renais, no fígado e na placenta (COLES, 1984). Segundo Kaneko et al. (1997), a fosfatase alcalina hidrolisa vários tipos de ésteres de fosfato e catalisa a desfosforilação do ATP. Sua concentração enzimática pode ser mensurada diretamente como massa, ou indiretamente, pela sua atividade. A configuração tridimensional da enzima é responsável por sua ação catalítica específica, e qualquer alteração na sua conformação, ocasionada por fatores como temperatura, pH, concentração de proteína e ureia, resulta em redução ou perda de sua atividade.

A elevada atividade sérica da FA geralmente tem origem hepatobiliar, com exceção dos animais em crescimento ou pacientes com doença óssea (MEYER et al., 1995; LIMA; SILVA, 2002). Por outro lado, valores diminuídos de FA podem ser observados no hipotireoidismo e desnutrição grave.

As fosfatases são hidrolases que catalisam a desfosforilação de monoésteres de fosfatos. Essas enzimas podem ser divididas em três grupos: proteínas fosfatases, fosfatases ácidas e fosfatases alcalinas (BERNIER; WANG, 1996; JIA, 1997; AOYAMA et al., 2003). Essas hidrolases estão amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em animais (GRANJEIRO et al., 1997) e vegetais (FERREIRA et al., 1998, GRANJEIRO et al*.,* 1999).

Estudos citoquímicos revelaram a presença dessas enzimas em diferentes locais da célula: núcleo, mitocôndrias, membranas, lisossomo, complexo de Golgi e retículo endoplasmático. Enquanto as fosfatases ácidas apresentam um pH ótimo para catálise em torno de 5,0, as alcalinas apresentam o pH ótimo ao redor de 9,0. Ambas atuam em substratos de baixa massa molecular, como, por exemplo, os açúcares fosforilados; entretanto, elas possuem diferentes mecanismos de reação e somente as fosfatases alcalinas necessitam de íons bivalentes, como magnésio, cobalto ou manganês, para a catálise.

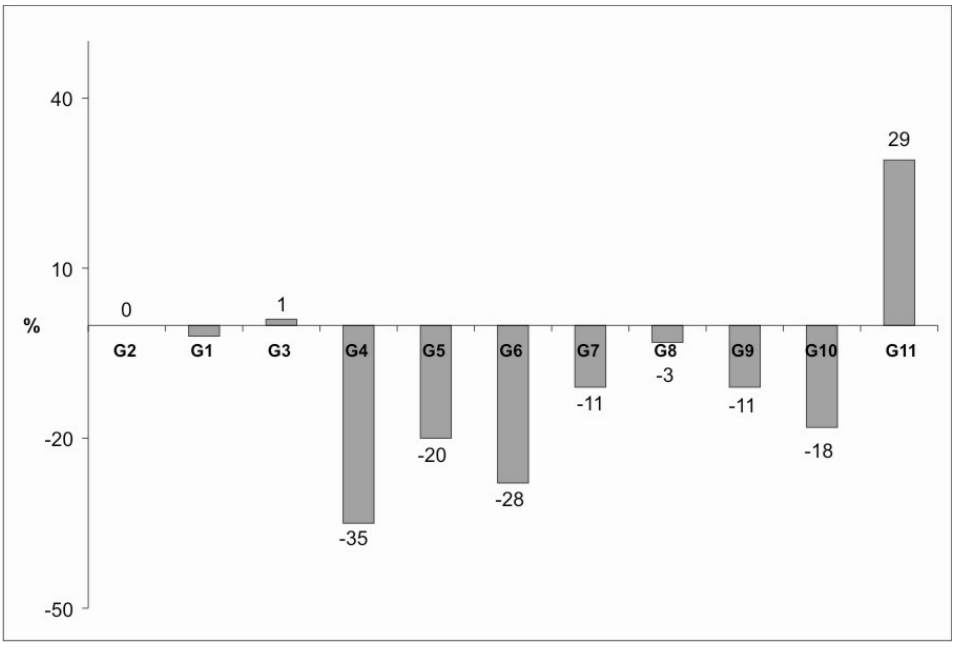


Gráfico 7 – Percentuais de variação de fosfatase alcalina em relação ao G2 com hiperlipidemia induzida por colesterol (C) e ácido cólico (AC).

Muitas proteínas no organismo – importantes nas catálises enzimáticas, na regulação gênica e nos componentes celulares – podem ser degradadas por oxidação e consideradas importantes marcadores biológicos para a ação do estresse oxidativo (MINATO et al., 2003). As fosfatases possivelmente podem ser uma dessas enzimas marcadoras do estresse oxidativo, principalmente as serina/treonina fosfatases e proteína tirosina fosfatase. Estas enzimas, por possuírem um grupo sulfidrila no sítio catalítico suscetível à ação de espécies reativas de oxigênio, podem ser inativadas por oxidação irreversível desses grupos (AOYAMA et al., 2003).

As fosfatases fazem parte de diversos mecanismos de controle celular e atuam antagonicamente com as proteínas quinases. Estudar o efeito desses compostos naturais com diferentes efeitos sobre esses sistemas pode ser uma maneira de compreendê-los e aplicá-los no tratamento de diferentes doenças envolvidas com o desbalanço entre quinases e fosfatases (CANNONS; SCHWARTZBERG, 2004).

De acordo com os resultados obtidos e apresentados na Tabela 9 e no Gráfico 8, o grupo 6 (associação de curcumina a 20 mg + hesperidina a 20 mg) aumentou em 106% a atividade de gama GT. O grupo 5, tratado

com curcumina 40 mg, aumentou em 54%, e o grupo 8, tratado com hesperidina a 20 mg, aumentou em 27%; logo, houve sinergismo de adição no grupo 6. O citoprópolis não teve nenhuma alteração na atividade da enzima, em relação ao G2.

A gama glutamiltransferase (GGT) é uma enzima de membrana associada a numerosos tecidos (MEYER et al., 1995), como fígado, rins, pâncreas e intestino (TENNANT, 1997). A maior quantidade de GGT celular está nas células tubulares renais e no epitélio dos ductos biliares (KRAMER; HOFFMAN, 1997). Mesmo que a GGT esteja presente em muitos tecidos, elevações na sua atividade sérica são observadas primariamente em desordens hepáticas (TENNANT, 1997).

Tabela 9 – Médias de GAMA GT, em soro sanguíneo de coelhos machos avaliados após 30 dias em diferentes tratamentos, e seus respectivos percentuais de variação em relação ao grupo (G2) com hiperlipidemia induzida por colesterol (C) e ácido cólico (AC). Viçosa, Minas Gerais, 2008

Grupos e Tratamentos	Gama GT	% Variação
G2 ração + colesterol e ácido cólico	9,95 a	0
G1- ração (R)	12,66 b	+27
G3 ração + C + AC. C + atorvastatina	11,38 a	+14
G4 R + AC. C + curcumina (CUR) 20 mg	10,16 a	+2
G5 R + C. + AC. C. + curcumina (CUR) 40 mg	15,33 b	+54
G6 R + C + AC + CUR (20 mg) + HES (20 mg)	20,46 b	+106
G7 R + C + AC + CUR (40 mg) + HES (40 mg)	12,50 b	+26
G8 R + C + AC + hesperidina (HES) 20 mg	12,66 b	+27
G9 R + C + AC + hesperidina (HES) 40 mg	12,66 b	+27
G10 R + C + AC + oxy free	12,33 b	+24
G11 R + C + AC + citoprópolis	9,96 a	0

Letras iguais equivalem a tratamentos não diferentes do doente pelo teste de Dunnett a % de significância.

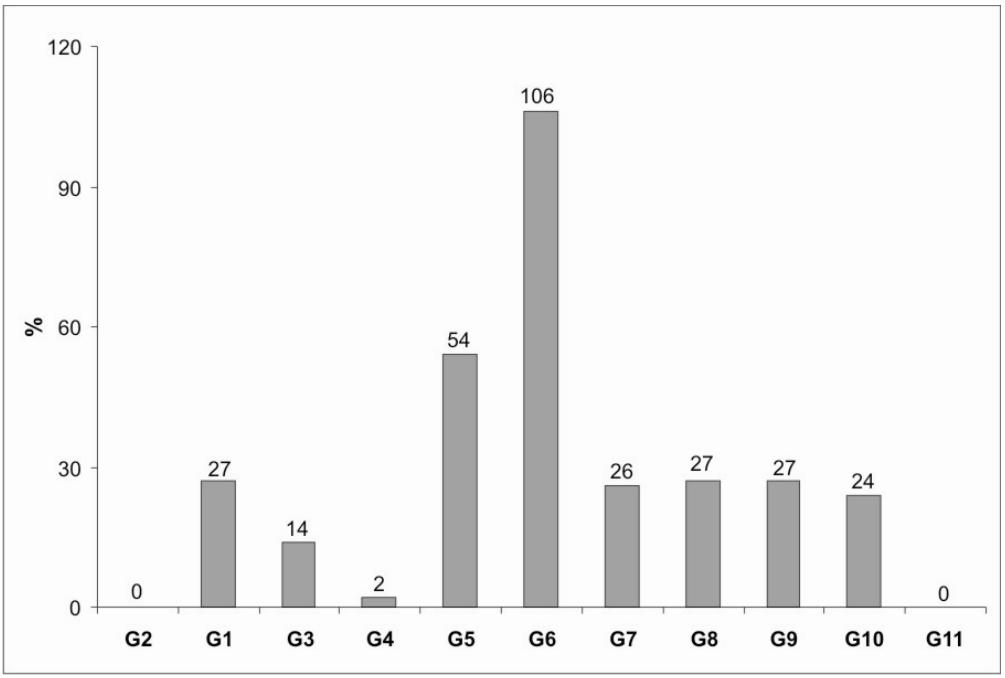


Gráfico 8 – Percentuais de variação de gama GT em relação ao G2 com hiperlipidemia induzida por colesterol (C) e ácido cólico (AC).

6. CONCLUSÕES

A adição de 1% de colesterol cristalino + 0,5% de ácido cólico foi eficaz em promover a hipercolesterolemia em coelhos, uma vez que aumentou acima de 20 vezes o valor do colesterol, em relação ao grupo que recebeu ração.

A adição de curcumina à dieta, nas doses de 20 e 40 mg, reduziu significativamente o colesterol total em 50 e 53%, respectivamente. Esses resultados foram os melhores de todos os tratamentos e melhores do que os do grupo tratado com atorvastatina cálcica, que reduziu apenas 36%. Os níveis de HDL-c foram reduzidos em 36 e 1%, o que é um aspecto positivo para a dosagem de 40 mg, pois reduziu o colesterol total e praticamente não afetou o HDL-c.

A concentração total de triacilgliceróis foi 53,47% maior nos animais alimentados com dieta contendo colesterol + ácido cólico, quando comparada com o grupo que recebeu apenas ração. A hipertrigliceridemia produzida pela dieta rica em colesterol + ácido cólico foi significativamente reduzida nos animais tratados com curcumina a 20 e 40 mg, que tiveram porcentagens de redução de 54 e 15% no parâmetro triacilglicerol, respectivamente.

De maneira geral, pode-se observar que a curcumina, em ambas as doses, apresentou ação farmacológica acentuada no metabolismo lipídico

de coelhos hiperlipidêmicos, sem sobretudo causar efeitos de toxidade aguda, como foi mostrado através das dosagens de TGO, TGP, GAMA GT, fosfatase alcalina e ferro.

Também o grupo tratado com hesperidina reduziu os níveis de colesterol em 12% na dose de 40 mg, porém na dose de 20 mg houve aumento no colesterol total em 12%. Os níveis de HDL-c foram reduzidos em 9% na dosagem de 20 mg e aumentados em 8% na dosagem de 40 mg.

O grupo tratado com atorvastatina cálcica promoveu redução de 59% nos níveis de triacilglicerol. Já o grupo tratado com hesperidina mostrou redução de 50 e 43% nas doses de 40 e 20 mg, respectivamente.

Observou-se que a hesperidina (40 mg) foi o melhor tratamento, visto que aumentou os níveis de HDL-colesterol em 8% em 30 dias de tratamento e reduziu o colesterol total em 12%. Isso é importante, uma vez que a lipoproteína HDL transporta colesterol da circulação para o fígado, onde o colesterol é metabolizado. A hesperidina a 40 mg também foi mais eficaz em reduzir os triacilgliceróis, sem sobretudo causar efeitos de toxidade aguda, como foi mostrado através das dosagens de TGO, TGP, GAMA GT, fosfatase alcalina e ferro.

Quando se usou a associação curcumina + hesperidina, verificou-se redução de 24% (20 mg) no colesterol total, havendo assim um sinergismo de adição em relação à hesperidina isolada na dose de 20 mg. Já a curcumina + hesperidina na dose de 40 mg reduziu o colesterol total em 9%. Ambas as associações provocaram redução do HDL-c em 13 e 25%, nas doses de 20 e 40 mg, respectivamente.

As associações curcumina + hesperidina promoveram redução menor do que nas doses isoladas para triacilgliceróis, porém significativa, de 36 e 42%, nas doses de 20 e 40 mg, respectivamente. Na dose de 40 mg a associação entre hesperidina + curcumina foi mais eficaz do que na dose isolada de curcumina a 40 mg, demonstrando um sinergismo de ação entre os dois compostos.

Em ambas as dosagens e associações não se verificaram efeitos de toxidade aguda, conforme demonstrado através das dosagens de TGO, TGP, GAMA GT, fosfatase alcalina e ferro.

Pode-se concluir que a curcumina e a hesperidina demonstraram efeitos benéficos no metabolismo de lipídios, porém mais estudos são necessários para que esses compostos sejam usados como suplemento, principalmente em relação aos mecanismos de ação, à biodisponibilidade e à interação com outros nutrientes da dieta.

REFERÊNCIAS

ALLEN, R.G.; VENKETARAJ, V.S. Oxidants and antioxidants in development and differentiation. **J. Nutr.**, v.122, p.631-635, 1992.

ALVAREZ-LEITE, J.I.; PELUZIO, M.C.G. Lípides. In: NETO, F.T. **Nutrição clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p.7-19.

ALVAREZ-LEITE, J.I.; ROSA, C.O.B. Alimentos funcionais e dislipidemias. In: COSTA, N.M.B.; ROSA, C.O.B. **Alimentos funcionais:** benefícios para saúde. 2008. p.161-184.

AMSTRONG, M.J.; CAREY, M.C. Thermodynamic and molecular determinants of sterol solubilities in bile salt micelles. **L. Lipid Res.**, v.28, p.1144-1155, 1987.

ANILA, L.; VIJAYALAKSHMI, N.R. Flavonoids from *Embilica officinalis* and *Mangifera indica* – effectiveness for dyslipidemia. **J. Ethnopharmacology**, v.79, p.81-87, 2002.

ANONYMOUS. Dietary flavonoids and risk of coronary heart disease. **Nutrition Reviews**, v.52, p.59-61, 1994.

ANSARI, M.N.; BHANDARI, U.; PILLAI, K.K. Protective role of curcumin in myocardial oxidative damage induced by isoproterenol in rats. **Human e Experimental Toxicology**, v.26, p.933-938, 2007.

ANTUNES, L.M.G.; ARAÚJO, M.C.P. Mutagenicidade e antimultagenicidade dos principais corantes para alimentos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.13, n.2, p.81-88, maio/ago, 2000.

AOYAMA, H.; SILVA, T.M.A.; MIRANDA, M.A.; FERREIRA, C.V. Proteínas tirosina fosfatases: propriedades e funções biológicas. **Quim. Nova**, v.26, p.896-900, 2003.

ARAFA, H.M. Curcumin attenuates diet-induced hypercholesterolemia in rats. **Med. Sci. Monit.**, v.11, p.228-34, 2005.

ASAI, A.; MIYAZAWA, T. **Dietary Curcuminoids prevent high fat diet-induced lipid accumulation in rat liver and epididymal adipose tissue**. Laboratory of Biodynamic Chemistry, Tohoku University Graduate School of Life Science and Agriculture, Sendai, JP, 2001.

AUGER, C.; TEISSEDRE, P.L.; GERAIN, P.; LEQUEUX, N.; BORNET, A.; SERISIER, S.; BESANCON, P.; CAPORICCIO, B.; CRISTOL, J.P.; ROUANET, J.M. Dietary wine phenolics catechin, quercetin, and resveratrol efficiently protect hypercholesterolemic hamsters against aortic fatty streak accumulation. **J. Agri. Food Chem.**, v.53, p.2015-2021, 2005

AVIRAM, M.; DORNFELD, L.; ROSENBLAT, M.; VOLKOVA, N.; KAPLAN, M.; COLEMAN, R.; HAYEK, T.; PRESSER, T.; FUHRMAN, B. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E–deficient mice. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.71, p.1092-1076, 2000.

AVIRAM, M.; FUHRMAN, B. Poliphenolic flavonoids inhibit macrophage-mediated oxidation of LDL and attenuate atherogenesis. **Atherosclerosis**, v.137, p.S45-S50, 1998.

AZMI, A.S.; BHAT, S.H.; HADI, S.M. Resveratrol-Cu(II) induced DNA breakage in human peripheral lymphocytes: implications for anticancer properties. **FEBS Lett.**, v.579, p.3131-3135, 2005.

BARIK, A.; MISHRA, B.; SHEN, L.; MOHAN, H.; KADAM, R.M.; DUTTA, S.; ZHANG, H.Y.; PRIYADARSINI, K.I. Evaluation of a new copper(II)-curcumin complex as superoxide dismutase mimic and its free radical reactions. **Free Radic. Biol. Med.**, v.39, p.811-822, 2005.

BAUM, L.; CHEUNG, S.K. K.; MOK, V.C.T.; LINDA, C. W. et al. Curcumin effects on blood lipid profile in a 6-month human study. **Pharmacological Research**, v.56, n.6, p.509-514, 2007.

BERNIER, L.; WANG, E. A prospective view on phosphatase and replicative senescence. **Experimen. Gerontol.**, v.31, p.13-19, 1996.

BHARAT, B.; AGGARWAL; BOKYUNG, S. Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.30, n.2, p.85-94, 2008.

BHATIA, A.L.; JAIN, M. *Cspinacia oleracea* L. Protects against gamma radiations: a study on glutathione and lipid peroxidation in mouse liver. **Phytomedicine**, v.11, p.607-615, 2004.

BHAVANISHANKAR, T.N.; SREENIVASA MURTHY, V. Reproductive response of rats feed turmeric (*Curcuma longa* L.) and its alcoholic extract. **Journal of Food Science and Technology**, v.24, p.45-49, 1987.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.**, v.12, n.2, p.123-130, 1999.

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

BORRADAILE, N.M.; DE DREU, L.E.; HUGH, P.; BARRET, R.; BEHRSIN, C.D.; HUFF, M.W. Hepatocyte apoB-containing lipoprotein secretion is decreased by the grapefruit flavonoid, naringenin, via inhibition of MTP-mediated microsomal triglyceride accumulation. **Biochemistry**, v.42, n.5, p.1283-1291, 2003.

BOUSKELA, E.; CYRINO, F.; MARCELON, G. Inhibitory effect of the Ruscus extract of the flavonoid hesperidine methylchalcone on incresead microvascular permeability induced various agents in the Hamster-Cheek Pouch. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, New York, v.22, n.2, p.225-230, 1993.

BRANDÃO, A.A.; MAGALHÃES, E.V.F.; POZZAN, A.P.B. Prevenção da doença cardiovascular: a aterosclerose se inicia na infância? **Revista da SOCERJ**, jan/fev/mar, 2004.

CANNONS, J.L.; SCHWARTZBERG, P.L. Fine-tuning lymphocyte regulation: what's new with tyrosine kinases and phosphatases? **Curr. Op. Immunol.**, v.16, p.1-8, 2004.

CARLSON, G.P. Testes de química clínica. In: SMITH, B.P. **Tratado de medicina interna de grandes animais**. São Paulo: Manole, v.1, 1993. p.395-427,

CARR, T. P.; PARKS, J.S.; RUDEL, J.S.; RUDEL, L.L. Hepatic ACAT activity in african green monkeys in higly correlated to plasma LDL cholesteryl enrichment and coronary artery atherosclerosis. **Arterioscler. Thromb.**, v.12, p.1274-1283, 1992.

CHA, J.-Y.; CHO, Y.-S.; KIM, I.; ANNO, T.; RAHMAN, S.M. YANAGITA, T. Effect of hesperetin, a citrus flavonoid, on the liver triacylglycerol content and phosphatidate phosphohydrolase activity in arotic acid-fed rats. **Plants Foods for Human Nutrition**, v.56, p.349-358, 2001.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R. A. **Bioquímica ilustrada**. 2.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2002. 446p.

CHOI, J.S.; YOKOZAWA, T.; OURA, H. Antihyperlipidemic effect of flavonoids from *Prunus davidiana*. **J. Nat. Prod.**, v.54, p.218-224, 1991.

CHOLZ, E.P.; ZITRON, E.; KIESECKER, C.; THOMAS, D.; KATHÖFER, S.; KREUZER, J.; BAUER, A.; KATUS, H.A.; REMPPIS, A.; KARLE, C.A.; GRETEN, J. Orange flavonoid hesperetin modulates cardiac hERG potassium channel via binding to amino acid F 656. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v.17, p.666-675, 2007.

CHYU, K.Y.; BABBIDGE, S.M.; ZHAO, X.; DANDILLAYA, R.; RIETVELD. A.G.; YANO, J.; DIMAYUGA, P.; CERCEK, B.; SHAH. P.K. Differential effects of green tea–derived catechin on developing versus established atherosclerosis in apolipoprotein E–null mice. **Circulation**, v.109, p.2448-2453, 2004.

COBBE, S.M.; SHEPHERD, J. Cholesterol reduction in the prevention of coronary heart disease: therapeutic rationale and guidelines. The British Hyperlipidemia Association. **British Heart Journal**, v.69, p.S63-69, 1993.

COLES, E.H. **Patologia clínica veterinária**. 3.ed. São Paulo: Manole, 1984. 566p.

COOK, N.C.; SAMMAN, S. Flavonoids- chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources- review. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.7, p.66-76, 1996.

COSTA, N.M.B. Alimentos: componentes nutricionais e funcionais. In: COSTA, N.M.B.; BORÉM, A. **Biotecnologia e nutrição**. 1.ed., Brasil: Nobel, 2003. p.31-69.

COSTA, M.J.C. **Interpretação de exames bioquímicos para o nutricionista**. São Paulo: Atheneu, 2008. 113 p.

COTELLE, N.; BERNIER, J.L.; HENICHART, J.P.; CATTEAU, J.P.; GAYDOU, F.; WALLET, J.C. Scavenger and antioxidant properties of tem synthetic flavones. **Free Radical Bio Med.**, v.12, p.211-219, 1992,

CRISTOFORI, P.; CRIVELLENTE, F.; CAMPAGNOLA, M.; PASINI, A.F.; GARBIN, U.; RIGONI, A.; TOSETTI, M.; TURTON, J.; FAUSTINELLI, I..; COMINACINI, L. Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice treated with lacidipine is associated with a decreased susceptibility of low-density lipoprotein to oxidation. **Int. J. Exp. Path.**, v.85, p.105-114, 2004.

CROUVEZIER, S.; POWELL, B.; KEIR, D.; YAQOOB, P. The effects of phenolic components of tea on the production of pro- and antiinflammatory cytokines by human leukocytes in vitro. **Cytokine**, v.13, p.280-286, 2001.

CUNNANE, S.C.; GRIFFIN, B.A. Nutrição e metabolismo de lipídios. In: GIBNEY, M. J.; VOSTER, H. H.; KOK, F. **Introdução à nutrição humana**. 2002. p.74-107.

DIRETRIZES BRASILEIRAS SOBRE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.88, 2007. 19p. (Suppl. I).

DONALD, J.; MESSNER, G.S.; KRIS, V. K. Curcumin reduces the toxic e¡ects of iron loading in rat liver epithelial cells. **Liver International**, p.63-72, 2009.

ERLUND, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. **Nutr. Res.**, v.24, p.851-874, 2004.

ESTEVES, E.A.; MONTEIRO, J.B.R. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. **Rev. Nutr.**, Campinas, v.14, n.1, jan./abr. 2001.

FERNANDEZ, M.L. Guinea pigs as model for cholesterol and lipoprotein metabolism. **J. Nutr.**, v.131, p.10-20, 2001.

FERREIRA, C.V.; GRANJEIRO, J.M.; TAGA, E.M.; AOYAMA, H. Purification and characterization of multiple forms of soybean seed acid phosphatases. **Plant Physiol. Biochem.**, v.36, p.487-494, 1998.

FLAMMER, A.J.; HERMANN, F.; SUDANO, I.; SPIEKER, L.; HERMANN, M.; COOPER, K.A.; SERAFINI, M.; LÜSCHER, T.F.; RUSCHITZKA, F.; NOLL, G.; CORTI, R. Dark Chocolate Improves Coronary Vasomotion and Reduces Platelet Reactivity. **Circulation**, v.116, p.2376-2382, 2007.

FUHRMAN, B.; AVIRAM, M. Flavonoids protect LDL from oxidation and attenuate atherosclerosis. **Curr. Opin. Lipidol.**, v.12, n.1, p.41-48, 2001.

FUJIWARA, H.; HOSOKAWA, X. Z.; SHIMPEI, F.; FUKUDA, K. et al. Curcumin inhibits glucose production in isolated mice hepatocytes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.80, p.185-191, 2008.

GALATI, E.M.; TROVATO, A.; KIRJAVAINEN, S.; FORESTIERI, A.M. et al. Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid. (note III): antihypertensive and diuretic activity in rat. **Il Farmaco**, v.51, p.219-21, 1996.

GARG, A.; GARG, S.; ZANEVELD, L.J.; SINGLA, A.K. Chemistry and pharmacology of citrus bioflavonoid hesperidin. **Phytother Res.**, v.15, p.655-669, 2001.

GELEIJNSE, J.M.; GILTAY, E.J.; GROBBEE, D.E.; DONDERS, A.R.; KOK, F.J. Blood pressure response´to fish oil supplementation: meta-regression analysis of randomized trials. **J Hypertens**, v.20, p.1493-9, 2002.

GRANJEIRO, J.M.; FERREIRA, C.V.; JUCÁ, M.B.; TAGA, E.M.; AOYAMA, H. Bovine kidney low molecular weight acid phosphatase: FMN – dependent kinetics. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, v.41, p.1201-1208, 1997.

GRANJEIRO, P.A.; FERREIRA, C.V.; GRANJEIRO, J.M.; TAGA, E.M.; AOYAMA, H. Purification and kinetic properties of a castor bean seed acid phosphatase containing sulfhydryl groups. **Physiol. Plant.**, v.107, p.151-158, 1999.

GRUNDY, S.M. Cholesterol metabolism in man (Medical progress). **West. J. Med.**, v.49, p.13-25, 1978.

GRUNDY, S.M. Absortion and metabolism of dietary cholesterol. **Annu. Rev. Nutr.**, v.3, p.71-96, 1983.

GRYGLEWSKI, R.J.; KORBUT, R.; ROBAK, J. et al. On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. **J. Bioch. Pharmac**, v.36, p.317-322, 1987.

HAENEN, G.R.M.M.; PAQUAY, J.B.G.; KORTHOUWER, R.E.M.; BAST, A. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.236, p.591-593, 1997.

HISATOMI, T.; HARA, E.; FURUKAWA, J.; CHA, J-Y; YANAGITA, T. Effect of dietary hesperedin and their aglycone on the lipid metabolism in rats. In: **Annual Regional Meeting of Agricultural Chemical Society of Japan**, Japan Hiroshima, Oct. 1995. p.121. (Abstract)

HODEK, P.; TREFIL, P.; STIBOROVÁ, M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. **Chem-Biol Inter.**, v.139, p.1-21, 2002.

HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man. **Arch. Toxicol.**, v.20, p.237-248, 1998.

HOMMA Y. Predictors of atherosclerosis. **Atheroscler. Thromb.**, v.11, n.5, p.265-270, 2004.

IGBAL, M.; SHARMA, S.D.; OKAZAKI, Y.; FUJISAWA, M.; OKADA, S. Dietary supplementation of curcumin enhances antioxidant and phase II metabolizing enzymes in ddY male mice: possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. **Pol J Pharmacol.**, v.56, p.581-586, 2004.

JEON, S.M.; BOK, S.H.; JANG, M.K.; LEE, M.K.; NAM, K.T.; YONG BOK PARK, Y.B.; SOON-JAE RHEE, S.J.; CHOI, M.S. Antioxidative activity of naringin and lovastatin in high cholesterol-fed rabbits. **Life Sci.**, v.69, n.24, p.2855-2866, 2001.

JIA, Z. Protein phosphatases: structures and implications. **Biochem. Cell. Biol.**, v.75, p.17-26, 1997.

JOE, B.; LOKESH, B.R. Effect of curcumin and capsaicin on arachidonic acid metabolism and lysosomal enzyme secretion by rat peritoneal macrophages. **Lipids**, v.32, p.1173-1180, 1997.

JOE, B.; LOKESH, B.R. Role of capsaicin, curcumin and dietary n-3 fatty acids in lowering the generation of reactive oxygen species in rat peritoneal macrophages. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1224, p.255-263, 1994.

JONES, P.J.H.; KUBOW, S. Lipídios, esteróis e seus metabólicos. In: GIBNEY, M.J; MAcDONALD, I.A.; ROCH, H.M. **Nutrição e metabolismo**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.71-102.

KAJABA, I.; SIMONCIC, R.; FRECEROVA, K.; BELAY, G. Clinical studies os the hypolipidemic and antioxidant effects of selected natural substances. **Bratisl Lek Listy.**, v.109, n.6, p.267-72, 2008.

KALIORA, A.C.; DEDOUSSIS, G.V.Z.; SCHMIDT H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. **Atherosclerosis**, 2005.

KALPANA, K.B.; SRINIVASAN, M.; MENON, V.P. Evaluation of antioxidant activity of hesperidin and its protective effect on H_2O_2 induced oxidative damage on pBR322 DNA and RBC cellular membrane. **Mol. Cell. Biochem.**, v.323, p.21-29, 2009.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5.ed. San Diego: Academic Press, 1997. 932 p.

KATO, N.; TOSA, N. Effects of dietary quercetin on serum lipids. **Agricultural Biological Chemistry**, v.47, n.9, p.2119-2120, 1983.

KAUR, G.; TIRKEY, N.; CHOPRA, K. Beneficial effect of hesperidin on lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity. **Toxicology**, v.226, p.152-160, 2006.

KEMPAIAH, R.K.; SRINIVASAN, K. Beneficial influence of dietary curcumin, capsaicin and garlic on erythrocyte integrity in high-fat fed rats. **J. Nutr. Biochem.**, v.17, p.471-478, 2006.

KHOPDE, M.; PRIYADARSINI, K.I.; VENKATESAN, P.; RAO, M.N. Free radical scavenging ability and antioxidant efficiency of curcumin and its substituted analogue. **Biophys. Chem.**, v.80, p.85-91, 1999.

KIM, H.J.; OH, G.T.; PARK, Y.B.; LEE, M.K; SEO, H.J.; CHOI, M.S. Naringin alters the cholesterol biosynthesis and antioxidant enzyme activities in LDL receptor-knockout mice under cholesterol fed condition. **Life Sciences**, v.74, p.1621-1634, 2004.

KIRK, E.A.; SHUTERLAND, P.; WANG, S.A. Dietary isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BL/6 mice, but not LDL receptor-deficient mice. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.128, n.6, p.954-959, 1998.

KOPP, P. Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the fresch paradox. **Eur. J. Endocrinol.**, v.138, p.619-620, 1998.

KRAMER, J.W.; HOFFMANN, W.E. Clinical enzymology. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. (Ed.). **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5.ed. New York: Academic Press, 1997. Cap.12, p.303-323.

KUNCHANDY, E.; RAO, M.N.A. Oxygen radical scavenging activity of curcumin. **International Journal of Pharmaceutics**, v.58, p.237-240, 1990.

LEE, C.H.; JEONG, T.S.; CHOI, Y.K. et al. Anti-atherogenic effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin with hepatic ACAT and aortic VCAM-1 and MCP-1 in high cholesterol-fed rabbits. **Biochem. and Biophys. Res. Communic.**, v.284, p.681-688, 2001.

LEE, M.K.; MOON, S.S.; LEE, S.E. et al. Naringenin 7-0-cetyl ether as inhibitor of HMG-CoA redutase and modulator of plasma and hepatic lipids in high cholesterol- fed rats. **Bioorganic e Med. Chem.**, v.11, p.393-398, 2003.

LEE, S.H.; JEONG, T.S.; PARK, Y.B.; KWON, Y.K.; CHOI, M.S.; BOK, S.H. Hypocholesterolemic effect of hesperetin mediated by inhibition of 3-hydroxy-3-methylgultaryl coenzyme a reductase and acyl coenzime a: Cholesterol acyltransferase in rats fed highcholesterol diet. **Nutrition Research**, v.19, n.8, p.1245-1258, 1999.

LEIKERT, J.F.; RÄTHEL, T.R.; WOHLFART, P.; CHEYNIER, V.; VOLLMAR, A.M.; DIRSCH, V.M. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. **Circulation**, v.106, p.1614-1617, 2002.

LI, LIU; DONG-MEI, XU; YI-YU CHENG. Distinct effects of naringenin and hesperetin on nitric oxide production from endothelial cells. **J. Agric. Food Chem.**, v.56, p.824-829, 2008.

LIM, B.; YU, B.P.; CHO, S.I. et al. The inibition by quercetin and ganhuangenin on oxidatively modified low density lipoprotein. **Phytother. Res.**, v.12, p.340-345, 1998.

LIMA, E.; SILVA, R.; BORTOLOZZI, J.; RAMOS, P.R.R.; DIERCKX, S.M. Polimorfismo genético-bioquímico de enzimas em éguas da raça mangalarga. **Arch. Latinoam. Prod. Anim.**, v.10, n.3, p.149- 152, 2002.

LUZ, P.L.; COIMBRA, S.R. Wine, alcohol and atherosclerosis: clinical evidences and mechanisms. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.37, p.1275-1295, 2004.

MAIA, S.R.; FERREIRA, A.C.; ABREU, L.R. Uso do açafrão (*Curcuma longa* L.) na redução da *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048) em ricota. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v.28, n.2, p.358-365, mar/abr 2004.

MANACH C.; MAZUR A.; SCHALBERT A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. **Curr. Oppin. Lipidol.**, v.16, n.1, p.77-84, 2005.

MANCINI-FILHO, J. Alimentos funcionais nas doenças cardiovasculares. In: COSTA, N.M.B.; ROSA, C.O.B. **Alimentos funcionais**. 2006. p.97-114.

MANDEVILLE, J.S.; FROEHLICH, E.; TAJMIR-RIAHI, H.A. Study of curcumin and genistein interactions with human serum albumin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.49, p.468-474, 2009.

MANGIAPANE, H.; THOMPSON, J.; SLATER, A.; BROWN, S.; BELL, G.D.; WHITE, D.A. The inhibition of the oxidation of Low-density-Lipoprotein by (+) catechin, a naturally ocurring flavonoid. **Biochemical Pharmacology**, v.43, n.3, p.445-450, 1993.

MANJUNATHA, H.; SRINIVASAN. Hypolipidemic and antioxidant effects of dietary curcumin and capsaicin in induced hypercholesterolemic rats. **Lipids**, v.42, p.1133-1142, 2007.

MENNEN, L.I.; WALKER, R.; BENNETAU-PELISSERO C.; SCALBERT, A. Risks and safety of polyphenol consumption. **Am.J. Clin. Nutr.**, v.81, p.326S-329S, 2005.

MESA, M.D.; AGUILERA, C.M.; RAMÍREZ-TORTOSA, C.L.; RAMÍREZ-TORTOSA, M.C.; QUILES, J.L.; BARÓ, L.; DE VICTORIA, E.M.; GIL, Á. Oral administration of a turmeric extract inhibits erythrocyte and liver microsome membrane oxidation in rabbits fed with an atherogenic diet. **Nutrition**, v.19, n.9, p.800-804, 2003.

MESSNER, D.J.; SIVAM, G.; KOWDLE, K.V. Curcumin reduces the toxic effects of iron loading in rat liver epithelial cells. **Liver International**, p.63-72, 2009.

METODIEWA D.; KOCHMAN, A.; KAROLCZAK, S. Evidence for antiradical and antioxidant properties of four biologically active N, N-Diethylaminoethyl-ethers of flavanone oximes: a comparison with natural polyphenolic flavonoid (Rutin) action. **Biochem Mol. Biol. Int.**, v.41, p.1067-75, 1997.

MEYER, D.J.; COLES, E.H.; RICH, L.J. **Medicina de laboratório veterinária**: interpretação e diagnóstico. 1.ed. São Paulo: Roca, 1995. 308p.

MILGATE J.; ROBERTS, D. The nutritional e biological significance of saponinas. **Nutr. Res.**, v.15, n.8. p.1223-1249, 1995.

MIYAKE, Y.; SHIMOI, K.; KUMAZAWA, S.; YAMAMOTO, K.; KINAE, N.; OSAWA, T. Identification and antioxidant activity of flavonoid metabolites in plasma and urine of eriocitrin-treated rats. **Journal of Agricultura Food Chemistry**, v.48, p.3217-3224, 2000.

MOHANTY, I.; ARYA, D.S.; DINDA, A.; JOSHI, S.; TALWAR, K.K.; GUPTA, S.K. Protective effects of *Curcuma longa* on ischemia-reperfusion induced myocardial injuries and their mechanisms. **Life Sciences**, v.75, n.14, p.1701-1711, 2004.

MONFORTE, M.T.; TROVATO, A.; KIRJAVAINEN, S. et al. Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid: hipolipidemic activity on experimental hipercholesterolemia in rat. **Pharmacology**, v.50, p.595-599, 1995.

MORIN, B.; NICHOLS, L.A.; ZALASKY, K.M.; DAVIS, J.W. et al. The Citrus Flavonoids Hesperetin and Nobiletin Differentially Regulate Low Density Lipoprotein Receptor Gene Transcription in HepG2 Liver Cells1–3, **J. Nutr**., v.138, p.1274-1281, July 2008.

MUKHTAR H.; AHMAD, N. Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.71, n.6, p.1698S-1702s, 2000.

NIELSEN, I.L.F.; CHEE, W.S.S.; POULSEN, L.; OFFORD-CAVIN, E.; RASMUSSEN, S.E. et al. Bioavailability is improved by enzymatic modification of citrus flavonoid hesperidin in humans: a randomized, double-blind, crossover trial. **The Journal of Nutrition**, p.404-408, 2006.

NISHYAMA, T.; HAGIAWARA, Y.; HAGIWARA, H.; SHIBAMOTO, T. Inhibition of malonaldeyde formation from lipids by an isoflavonoid isolated from young green barley leaves. **Journal of the American Chemistry Society**, v.8, n.7, p.811-813, 1993.

NJVELDI, R.J.; NOOD e VAN.; HOON, D.E.C.; BOELENS, P.G.; NOOREN, K.V.; LOEUVEN, P.A.M.V. Flavonoids: a review mechanism of action and potential aplications. **Am. J. Clin Nutr.**, v.74, 2001.

OLIVEIRA, T.T.; GOMES, S.M.; NAGEM, T.J.; COSTA, N.M.B.C.; SECOM, P. R. Efeito de diferentes doses de flavonoides em ratos hiperlipidêmicos. **Rev. Nutr.**, v.15, n.1, 2002.

OSTLUND, R.E.; McGILL, J.B.; ZENG, C.M. Gastrointestinal absorption and plasma kinetics of soy Delta (5) phytosterols and phytostanol in humans. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v.282, p.911-916, 2002.

PRIOR, R.L. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. **Am .J. Clin. Nutr.**, v.78, p.570S-578S, 2003.

QUILES, J.L.; MESA, M.D.; RAMIREZ-TORTOSA, C.L.; AGUUILERA, C.M.; BATTINO, M.; GIL, A.; RAMIREZ-TORTOSA, M.C. Curcuma longa extract supplementation reduces oxidative stress and attenuates aortic fatty streak development in rabbits. **Arterioscler. Tromb Vasc. Biol.**, p.1225-1231, July 2002.

RADER, D.J.; WILSON, J.M. Gene therapy for lipid disoprders. In: HARBER, E. (Ed.). **Molecular cardiovascular medicine**. New York: Scientific American, p.97-114, 1995.

RAMIREZ-TORTOSA, M.C.; AGUILERA, C.M.; CARRION-GUTIERREZ, M.A.; RAMIREZ-BOSCA, A.; GIL, A. Curcumin ethanol-aqueous extract inhibits in vitro human LDL lipoperoxidation.In: SADLER, M.J.; SALMARSH, M. **Functional foods**. The consumer, the products and the evidence. London, 1998.

RAMIREZ-TORTOSA, M.C.; MESA, M.D.; AGUILERA, M.C.; QUILES, J.L.; BARÓ, L.; RAMIREZ-TORTOSA, C.L.; MARTINEZ-VICTORIA, E.; GIL, A. Oral administration of tumeric extract inhibits LDL oxidation and hás hypocholesterolemic effects in rabbits with experimental atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v.147, p.371-378,1999.

REAVEN, P.; WITZTUM, J.L. The role of oxidation of LDL in atherogenesis. **Endocrinologist**, v.5, p.44-54, 1995.

REDDY, A.C.P.; LOKESH, B.R. Studies on the inhibitory effects of curcumin and eugenol on the formation of reactive oxygen species and the oxidation of ferrous iron. **Molecular Cell Biochemistry**, **The Hague**, v.137, n.1, p.1-8, 1994.

REDDY, A.C.P.; LOKESH, B.R. Studies on the inhibitory effects of curcumin and eugenol on the for reactive oxygen species and oxidation of ferrous iron. **Molecular Cell Biochemistry**, p.1-8, 1994.

RICCARDI, G.; RIVELLESE; A.; WILLIAMS, C. O sistema cardiovascular. In: GIBNEY, M.J.; MAcDONALD, I.A.; ROCH, H.M. **Nutrição e metabolismo**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.201-223.

RODRIGUES, H.G.; DINIZ, Y.S.; FAINE, L.A.; ALMEIDA, J.A.; FERNANDES, A.A.H.; NOVELLI, E.L.B. Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rutina na concentração de colesterol-HDL. **Rev. Nutr.**, Campinas, v.16, n.3 jul./set.2003.

RUIZ, M.G.M. Curcumina: antiinflamatorio natural com propiedades anticancerígenas. **inFÁRMAte**, año 2, número 8, junio-julio 2006. México.

SABARENSE, C.M.S.; PELUZIO, M.C.G. Lipídios. In: COSTA, N.M.B.; PELUZIO, M.C.G. **Nutrição básica e metabolismo**. Viçosa: Ed. UFV, p.155-181, 2008.

SCALBERT, A.; MANACH, C.; MORAND, C.; REMESCY, C.; JIMENEZ, J. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. **Rev. Food Sci. Nutr.**, v.45, n.4, p.287-306, 2005.

SCOTT, J. Pathophysiology and biochemistry of cardiovascular disease. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v.14, p.271-279, 2004.

SHILS, M.E. et al. **Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença**. 9.ed. São Paulo: Manole, v.2. 2002.

SHUNKLA, P.K.; KHANNA, V.K.; ALI-MOHD, M.; SRIMAL, R.C. Anti-ischemic effect of Curcumin in rat brain. **Neurochem. Res.**, v.33, p.1036-1043, 2008.

SHUTENKO, Z.; HENRY, Y.; PINARD, E.; SEYLAZ, J.; POTIER, P.; BERTHET, F.; GIRARD P.; SERCOMBE, R. Influence of the antioxidant quercetin *in vivo* on the level of nitric oxide determined by electron paramagnetic resonance in rat brain during global ischemia and reperfusion. **Biochemical Pharmacolology**, v.57, n.2, p.199-208, 1999.

SHUTENKO, Z.; HENRY, Y.; PINARD, E.; SEYLAZ, J.; POTIER, P.; BERTHET, F.; GIRARD P.; SERCOMBE, R. Influence of the antioxidant quercetin *in vivo* on the level of nitric oxide determined by electron paramagnetic resonance in rat brain during global ischemia and reperfusion. **Biochemical Pharmacolology**, v.57, n.2, p.199-208, 1999.

SILVA, R.R.S.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S.; ALBINO, L.F.; ALMEIDA, M.R.; LEÃO, M.A. Curcumina e norbixina: ação no metabolismo lipídico de aves domésticas. **Tecnol. and Ciênc. Agropec.**, João Pessoa, v.2, p.41-44, mar. 2008.

SILVA, R.R.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J.; VIEIRA, H.S. Propriedades farmacológicas dos corantes naturais cúrcuma e norbixina. **Rev. Ciênc. Farm.**, v.23, n.2, p.161-173, 2002.

SONI, K.B.; KUTTAN, R. Effect of oral curcumin administration on serum peroxides and cholesterol levels in human volunteers. **Indian J. Physiol. Pharmacol.**, v.36, p.273-5, 1992.

SREEJAYAN, N..; RAO, M.N.A. Free radical scavenging activity of curcuminoids. **Arzneim-Forsch Drug Research**, v.46, n.2, p.169-171, 1996.

SREEJAYAN, N..; RAO, M.N.A.; PRIYADARSINI, K.I.; DEVASAGAYAN, T.P.A. Inhibition of radiation-induced lipid peroxidation by curcumin. **International Journal of Pharmaceutics**, v.151, p.127-130, 1997.

SREEJAYAN, N.; RAO, M.N. Free radical scavenging activity of curcuminoids. **Arzneimittelforschung**, v.46, p.169-171, 1996.

SREEJAYAN; RAO, M.N. **Curcuminoids as potent inhibitors of lipid peroxidation**. Manipal, India: Department of Pharmaceutical Chemistry, College of Pharmaceutical Sciences, 1994.

SRINIVASAN, K.; SAMBAIAH, K. The effect of spices on colesterol levels 7 Hidroxilase activity and on serum e hepatic cholesterol levels in the rat. **Int. J. Vitam. Nutr. Res.**, v.61, p.364-369, 1991.

SRIVINASAN, K.; SAMBAIAH, K.; CHANDRASEKHARA, N. Spices as beneficial hypolipidemic food adjuncts: a review. **Food Rev. Int.**, v.20, p.187-220, 2004.

STEINBERG, D.; PARTHASARATHY, S.; CAREW, T.E.; KHOO, J.C. WITZTUM, J.L. Beyond cholesterol: modification of low density lipoprotein that increases its atherogenicity. **N. Engl. J. Med.**, v.320, p.915-924, 1989.

STOCLET, J.C.; CHATAIGNEAU, M.; SCHINI-KEITH, B. Vascular protection by dietary polyphenols. **Eur. J. of Pharmacology**, v.500, p.299-313, 2004.

STRIMPAKOS, A.; SHARMA, R.A. Curcumin: preventive and therapeutic properties in laboratory studies and clinical trials. **Antioxidants and Redox Signaling**, v.10, n.3, p.512-545, 2008.

SUBUDHI, U.; DAS, K.; BISWARANJAN, P.; BHANJA, S.; CHAINY, G.B.N. Supplementation of curcumin and vitamin E enhances oxidative stress, but restores hepatic histoarchitecture in hypothyroid rats. **Life Sciences**, v.84, p.372-379, 2009.

SUDHEESH S.; SANDHYA, C.; KOSHY, S.; VIJAYALASKSHMI, N.R. Antioxidant selevity of flavonoids from *Solanum melongena*. **Phytother Res.**, v.13, p.393-396, 1999.

SZASZ, G. **Clin. Chem.**, v.15, p.124-136, 1969 (Bioclin.)

TAKAHAMA, K.G. **Oxigen radicals in chemistry and biology**. Berlim: De Gryter, 1984. 387p.

TENNANT, B.C. Hepatic function. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5.ed. London: Academic Press, 1997. p.327-352.

TIKKANEN, M.J.; WAHALA, K.; OJALA, S. Effect of soybean phytoestrogen intake on low density lipoprotein oxidation resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** Washington DC, v.95, n.6, p.3106-3110, 1998.

TONNESEN, H.H.; GREENHILL, J.V. Studies on curcumin and curcuminoids: curcumin as a reducing agent and as a radical scavenger. **Int J Pharm.**, v.87, p.79-87, 1992.

UMAKANTA, S.; KAJARI, D.A.S.; BISWARANJAN, P.; SHRAVANI, B.; GAGAN, B.N.; CHAINY. Supplementation of curcumin and vitamin E enhances oxidative stress, but restores hepatic histoarchitecture in hypothyroid rats. **Life Sciences**, v.84, p.372-379, 2009.

VIEIRA, E.C.; FIGUEIREDO, E.A.; ALVAREZ-LEITE, J.I. et al. **Química fisiológica**. 2.ed. Belo Horizonte: Atheneu, 1995. 414p.

WANWARANG, W.; ARINTAYA, P. The protective role of curcumin in cardiovascular diseases. **International Journal of Cardiology**, v.133, p.145-151, 2009.

WEBER, W.M.; HUNSAKER, L.A.; GONZALES, A.M.; HEYNEKAMP, J.J.; ORLANDO, R.A.; DECK, L.M.; VANDER, JAGT, D.L. TPA-induced up-regulation of activator protein-1 can be inhibited or enhanced by analogs of the natural product curcumin. **Biochem Pharmacol**, v.72, p.928-940, 2006.

WILCOX, I.J.; BORRADAILE, L.E.D.; HUFF, M.W. Secretion of hepatocyte apoB is inhibited by the flavonoids, naringenin and hesperetin, via reduced activity and expression of ACAT 2 and MTP. **Journal of Lipid Research**, v.42, p.725-734, 2001.

WILMSEN, P.K.; SPADA, D.S.; SALVADOR, M. Antioxidant activity of the flavonoid hesperedin in chemical and biological systems. **J. Agric. Food Chem.**, v.53, p.4757-61, 2005.

WITZTUM, J.L.; STEINBERG, D. Role of oxidized low-density lipoprotein in atherogenesis. **J. Clin. Invest.**, v.88, p.1785-1792, 1991.

YAMADA, M.; TANABE, F.; ARAI, N.; MITSUMI, H.; MIWA, Y.; KUBOTA, M.; CHAEN, H.; KIBATA, M. Bioavailability of glucosyl hesperidin in rats. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v.70, n.6, p.1386-1394, 2006.

YUGARANI, T.*;* TAN, B.K.H.; TEH, M.; DAS, N.P. Effects of polyphenolic natural products on the lipid profiles of rats fed high fat diets. **Lipids,** Champaign, v.27, n.3, p.265-290, 1992.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo