

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Silvana Maria Guida Cardoso

**EFEITOS DA POLPA DE LARANJA SOBRE LIPÍDEOS
PLASMÁTICOS, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E
PARÂMETROS CARDIOVASCULARES EM HAMSTERS
HIPERCOLESTEROLÊMICOS**

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Biologia Funcional e
Molecular, na área de Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas (Orientador) _____

Prof. Dr. Félix Guillermo Reyes Reyes _____

Prof. José Camillo Novello _____

Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri _____

Profa. Dra. Alba Regina Monteiro de Souza Brito _____

Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro _____

Prof. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes _____

Prof. Dra. Marta Helena Krieger _____

*Ao Juarez, meu amor, amigo e
companheiro de todas as horas.*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Aos meus pais, meus exemplos de vida.

À minha mãe **Irene**, por proporcionar um ambiente de amor onde cresci e onde fui, aos poucos, superando as minhas deficiências e dificuldades. Graças ao seu amor incondicional, estímulo e confiança, pude enfrentar e superar os obstáculos que surgiram em minha vida.

Ao meu pai **Clais**, sobretudo por ter sido meu modelo de retidão de caráter, honestidade, determinação, alegria e pela inesgotável capacidade de sonhar e lutar por seus sonhos.

A essas duas pessoas tão amadas, a minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas, pela confiança, incentivo, respeito e amizade. Seus exemplos de otimismo e amor à prática docente são exemplos que procuro seguir todos os dias. A essa pessoa tão importante, as palavras são incapazes de expressar a minha admiração e gratidão.

À Dra. Satie Hatsushika Ogo, por ceder seu laboratório para a obtenção dos dados bioquímicos aqui expostos.

Ao Prof. Dr. Félix Guilherme Reyes Reyes pelas preciosas sugestões, incentivo e apoio durante a realização deste estudo.

À Dra. Iara Lucca por ceder seu laboratório na confecção das lâminas de que trata deste estudo.

Ao Prof. Dr. Ari Gonçalves, por quem tenho um carinho todo especial, por alguns conselhos que me foram dados logo que ingressei na UNICAMP e que ainda hoje ecoam em minha lembrança.

Ao corpo docente do Departamento de Fisiologia e Biofísica do IB da UNICAMP, por todo o conhecimento que me foi transmitido.

Ao Ivo e Alexandra, funcionários da secretaria do Departamento de Fisiologia e Biofísica, pela boa vontade, alegria e convivência.

À Dona “Zefa”, funcionária do Departamento de Fisiologia e Biofísica, pelo auxílio indispensável no cuidado e manutenção dos animais utilizados neste trabalho.

Ao CNPQ e CAPES, pelo apoio financeiro

Ao meu esposo Juarez, por ter respeitado meu trabalho e meus sonhos e, na maioria do tempo, aceitar sem questionamentos minhas longas ausências em nome do trabalho.

Aos meus filhos Ricardo e Carolina, por darem sentido à minha vida e por fazerem de nossa casa um lugar para onde eu sempre quero voltar.

Ao meu querido amigo e companheiro de laboratório Wagner, pela amizade, apoio, estímulo, convivência e auxílios. Desejo que o fim desta jornada represente apenas o começo de novos desafios onde possamos percorrer convivendo e trabalhando juntos.

À Graziela Renata Stoppa, pela amizade e ajuda valiosa numa época em que muitos dos assuntos tratados neste estudo ainda eram grandes novidades para mim. Sua boa vontade tornou minha vida, naquela época, menos árdua.

À Maristela e Eriquinha pela alegria da convivência e pela ajuda sempre dada com disposição e bom humor.

À minha amiga Rosa Ema, pelo constante incentivo e pelo auxílio na língua espanhola.

SUMÁRIO

RESUMO	xi
--------------	----

THE ABSTRACT	xiii
--------------------	------

OBJETIVO	xv
----------------	----

CAPÍTULO I

REVISÃO: FIBRAS ALIMENTARES, POLIFENÓIS E FUNÇÃO CARDIOVASCULAR	01
ABSTRACT.....	02
RESUMEN.....	03
RESUMO	04
INTRODUÇÃO.....	04
RADICAIS LIVRES	06
DEFESAS ANTIOXIDANTES.....	08
ÓXIDO NÍTRICO, DISFUNÇÃO ENDOTELIAL E ATHEROSCLEROSE	11
FIBRAS ALIMENTARES	15
POLIFENÓIS.....	23
CONSIDERAÇÕES FINAIS	27
BIBLIOGRAFIA	27

CAPÍTULO II

INFLUENCE OF DIETARY FIBER ON THE ANTIOXIDANT STATUS OF HYPERCHOLESTEROLEMIC HAMSTERS	44
SUMMARY/RESUMEN.....	45
INTRODUCTION	45
MATERIAL AND METHODS	46

RESULTS	46
DISCUSSION	46
REFERENCES	47

CAPÍTULO III

DIETARY FIBER REDUCES LIPID PEROXIDATION AND MEAN ARTERIAL BLOOD PRESSURE IN HYPERCHOLESTEROLEMIC HAMSTERS	49
CARTA DE ACEITE PARA PUBLICAÇÃO.....	50
RESUMEN	51
ABSTRACT	52
INTRODUCTION	53
MATERIAL AND METHODS.....	54
RESULTS	56
DISCUSSION	58
REFERENCES	62

CAPÍTULO IV

EFEITO DA POLPA DE LARANJA SOBRE O REMODELAMENTO VASCULAR EM HAMSTERS HIPERCOLESTEROLÊMICOS	66
RESUMO	67
INTRODUÇÃO	68
MATERIAL E MÉTODOS	69
RESULTADOS	70
DISCUSSÃO	72
BIBLIOGRAFIA	76

CAPÍTULO V

CONCLUSÃO.....83

ANEXOS.....84

RESUMO

A hipercolesterolemia é um importante fator de risco para doenças cardiovasculares porque promove aumento da produção de radicais livres, principalmente, pela oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e pela geração de espécies reativas que reagem com o oxigênio na parede vascular. As drogas com efeitos hipocolesterolêmicos podem expor o paciente a efeitos adversos especialmente no fígado, rins e músculo esquelético. Como alternativa, produtos de origem vegetal têm recebido considerável atenção para o tratamento da hipercolesterolemia. Observa-se uma relação inversa entre a associação da ingestão de fibras alimentares e de polifenóis com o risco de doenças cardiovasculares. Fibras alimentares, especialmente as solúveis, reduzem os níveis de colesterol plasmático exercendo efeito protetor contra as doenças cardíacas. Por outro lado, a propriedade protetora mais importante dos polifenóis é a sua atividade antioxidante. Este trabalho avaliou o efeito da polpa de laranja, fonte natural de fibras, em hamsters submetidos à dieta hipercolesterolêmica. Os animais foram distribuídos em três grupos (n=8/grupo): Grupo I: alimentados com dieta controle; Grupo II: hamsters com dieta hipercolesterolêmica (20g colesterol/Kg dieta), e Grupo III: dieta hipercolesterolêmica contendo 20% de polpa de laranja. Foram determinadas as concentrações plasmáticas do colesterol total, triacilgliceróis, HDL e VLDL+LDL colesterol, bem como a pressão arterial média e a análise morfométrica da parede da aorta abdominal. Avaliou-se, também, o teor de polifenóis na polpa de laranja, a peroxidação lipídica (TBARS) nos eritrócitos e a atividade da superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT), glutathione reductase (GR) e glutathione (GSH). A polpa de laranja, em cuja composição foi demonstrada a presença de polifenóis, reduziu as concentrações plasmáticas de triacilgliceróis, VLDL+LDL, colesterol total e TBARS, bem como a atividade da SOD, GSH-Px, CAT e GR. Além disso, a polpa de laranja também reduziu a pressão arterial média e o espessamento da parede da aorta. Em conclusão, a polpa de laranja exerceu efeito protetor contra as

alterações induzidas pela hipercolesterolemia devido, principalmente, a suas propriedades físico-químicas e provavelmente, à presença de polifenóis entre seus constituintes.

ABSTRACT

Hypercholesterolemia is a high cardiovascular risk factor because cholesterol exerts a prooxidant effect and leads to enhanced production of oxygen free radicals, especially by oxidizing low-density lipoprotein (LDL) and generating species that can react with oxygen in the vascular wall. For most cholesterol lowering drugs to be effective they must be used for several weeks, but the procedure may expose the patient to various side effects, especially liver, kidney and esqueletic muscle injury. As an alternative, the use of products of plant origin for treating hypercholesterolemia has received considerable attention. Therefore, there is a negative relationship between the association of dietary fibers and polyphenol intake and the risk of cardiovascular diseases. Dietary fibers, especially the soluble type, decrease serum cholesterol levels and this may contribute to their protective role against heart disease. In contrast, the most important therapeutic property of polyphenols is their antioxidant activity. We studied induced hypercholesterolemia and its modulation by orange pulp, a natural source of fiber, in hamsters. The animals were distributed into three groups (n=8/group): Group I: fed a control diet; Group II: fed a hypercholesterolemic diet (20g of cholesterol/kg diet); and Group III: fed a hypercholesterolemic diet containing 20% orange pulp. Total cholesterol, triglycerides, total serum HDL- and VLDL+LDL-cholesterol concentrations were evaluated. In addition, concentration of polyphenols in orange pulp, erythrocyte lipid peroxidation (TBARS) and the activities of superoxide (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT), glutathione reductase (GR) and glutathione (GSH), mean arterial pressure and morphometrical examination in the abdominal aortic wall were all evaluated. Orange pulp reduced the triglycerides, VLDL+LDL, total plasma cholesterol concentration, TBARS levels, and the SOD, GSH-Px, CAT and GR activities, and mean arterial pressure, and abdominal aorta wall thickness. In conclusion, orange pulp had a protective effect against alterations induced by

hypercholesterolemia. This protection was probably due to the direct physical action on the gastrointestinal tract and, probably, by the presence the polyphenols in orange pulp.

OBJETIVO

Este trabalho teve por objetivo: avaliar os efeitos da polpa de laranja em hamsters submetidos à dieta hipercolesterolêmica determinando:

- teores plasmáticos de colesterol total, HDL-colesterol, VLDL+LDL-colesterol e triacilgliceróis;
- peroxidação lipídica em eritrócitos;
- atividade das enzimas antioxidantes: Superóxido Dismutase, Catalase, Glutathione Peroxidase e Glutathione Redutase;
- pressão arterial média;
- morfometria da parede da artéria aorta abdominal.

CAPÍTULO I

REVISÃO: FIBRAS ALIMENTARES, POLIFENÓIS E FUNÇÃO CARDIOVASCULAR

Silvana Maria Guida-Cardoso¹, Wagner J. Pinto¹, Félix G. R. Reyes², Miguel Arcanjo Areas¹

¹Departamento de Fisiologia e Biofísica, ² Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), SP, Brasil.

(Este artigo foi escrito de acordo com as normas da revista *Nutrire – Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição*, para publicação)

**REVISÃO: FIBRAS ALIMENTARES, POLIFENÓIS E FUNÇÃO
CARDIOVASCULAR**

**REVIEW: DIETARY FIBER, POLYPHENOLS AND CARDIOVASCULAR
FUNCTION**

Silvana Maria Guida-Cardoso¹, Wagner de Jesus Pinto¹, Félix Guillermo Reyes Reyes², Miguel Arcanjo Areas¹

¹ Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, SP, Brasil.

² Faculdade de Engenharia de Alimentos – FEA, Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, SP, Brasil

ABSTRACT

Human life expectancy continues to increase. Consequently, as a result of living longer, there has been a relative increase in diseases that tend to appear later in life. Cancers and cardiovascular diseases now account for > 66% of the cause of mortality in countries with a high per capita gross national product. Hypercholesterolemia is a significant cardiovascular risk factor because cholesterol, one of the main factors in the genesis of atherosclerosis, exerts a prooxidant effect that increase leads to enhanced production of free radicals, that play an important role in the pathogenesis of atherosclerosis. Considerable

epidemiological evidence suggests that habitual consumption of diets rich in fruits and vegetables decreases the risk of developing such conditions. Therefore, the benefits of a diet rich in plant products are well evidenced from epidemiological studies, especially concerning the prevention of cancers, lipid peroxidation and cardiovascular diseases.

Keywords: dietary fiber, polyphenols, free radicals, hypercholesterolemia.

RESUMEN

La expectativa de vida del hombre continua a aumentar. Consecuentemente como resultado de la mayor longevidad humana hay el aparecimiento de morbidades relacionadas al envejecimiento. Cânceres y enfermedades cardiovasculares son responsables por aproximadamente 66% de la causa *mortis* em países desarrollados con altas rendas *per capita*. La hipercolesterolemia es un importante factor de riezgo cardiovascular porque el colesterol, uno de los principales factores en la g nese de la aterosclerose, ejerce efecto pr  oxidante que genera el aumento en la producción de radicales libres, que tienen importante papel en la g nese de la aterosclerose. Estudios epidemiológicos segeren que, el consumo rutinerio de dietas ricas en frutas y vegetales reduce el riezgo del desarrollo de tales condiciones. De hecho, los beneficios provenientes de una dieta rica en vegetales son conprovados por estudios epidemiológicos, especialmente los relativos a la prevención de c ncer, peroxidación lipídica e enfermedades cardiovasculares.

Palabras clave: fibra dietética; polifenoles; radicales libres; hipercolesterolemia.

RESUMO

A expectativa de vida do homem continua a aumentar. Consequentemente, como resultado da maior longevidade humana há o aparecimento de morbidades relacionadas ao envelhecimento. Cânceres e doenças cardiovasculares são responsáveis por cerca de 66% da *causa mortis* em países desenvolvidos com elevadas rendas *per capita*. A hipercolesterolemia é um importante fator de risco cardiovascular porque o colesterol, um dos principais fatores na gênese da aterosclerose, exerce efeito pró oxidante que leva ao aumento na produção de radicais livres, que têm importante papel na gênese da aterosclerose. Estudos epidemiológicos sugerem que, o consumo habitual de dietas ricas em frutas e vegetais reduz o risco de desenvolvimento de tais condições. De fato, os benefícios decorrentes de uma dieta rica em vegetais são comprovados por estudos epidemiológicos, especialmente os relacionados à prevenção de câncer, peroxidação lipídica e doenças cardiovasculares.

Palabras clave: fibra alimentar; polifenóis; radicales libres; hipercolesterolemia.

INTRODUÇÃO

Estudos sobre padrões alimentares têm demonstrado que a ingestão habitual de carne vermelha, produtos lácteos integrais, bebidas adoçadas e

açúcares está diretamente relacionado ao desenvolvimento de patologias, dentre as quais encontram-se a obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares (GITTELSON *et al.*, 1998; ANDERSON e HANNA, 1999; FUNG *et al.*, 2001). Assim, em muitos países, particularmente os em desenvolvimento, que apresentam elevado consumo dos alimentos anteriormente citados, a prevalência de doenças crônico-degenerativas tem se elevado vertiginosamente (SARTORELLI e FRANCO, 2003). Por outro lado, compostos com ação antioxidante e fibras alimentares, presentes nos alimentos de origem vegetal, podem proteger o organismo contra essas patologias (NESS e POWLES, 1997). Assim, populações que consomem dietas ricas em frutas, verduras e legumes apresentam menor incidência dessas doenças quando comparadas às populações que fazem uso de alimentos refinados, uma vez que o processamento industrial elimina quase que totalmente as fibras alimentares presentes no alimento, alterando ainda, as suas características físicas e químicas (SELVENDRAN e VERNE, 1990). Por esse motivo é importante identificar uma fonte alimentar que possua além de fibras alimentares em sua composição (GUIDA-CARDOSO *et al.*, 2004), também componentes antioxidantes que possam atenuar e/ou prevenir o progresso de doenças crônico-degenerativas (FUHRMAN e AVIRAM, 2001; GUIDA-CARDOSO *et al.*, 2004).

Este artigo tem como objetivo discutir as alterações bioquímicas e morfológicas que ocorrem nos vasos sangüíneos, induzidas pela hipercolesterolemia, bem como os efeitos das fibras alimentares e polifenóis nessas alterações e, conseqüentemente, na prevenção da aterosclerose.

RADICAIS LIVRES

Os organismos aeróbicos estão continuamente expostos a concentrações basais de espécies reativas de oxigênio (EROs), subprodutos do metabolismo aeróbico (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989b). Esses radicais são átomos ou grupos de átomos que possuem, em sua última camada, um ou mais elétrons desemparelhados (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989). Como o oxigênio molecular já possui dois elétrons desemparelhados em sua última camada, ele é considerado um bom agente oxidante por receber elétrons de outras moléculas redutoras formando EROs. Essas EROs são formadas, nos sistemas biológicos, através de reduções parciais (um único elétron) do oxigênio molecular para formar o ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$), um radical livre citotóxico altamente reativo (LAVELLE *et al.*, 1973). Radicais livres também são resultantes da atividade de enzimas, tais como: xantina-oxidase, citocromo P450-oxidase, monoaminoxidase e NADH-oxidase (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989b). Além disso, as EROs podem, também, ser provenientes de fontes externas como alimentos, poluentes do ar e cigarro (THOMPSON, 1994). Tais espécies reativas causam danos em componentes celulares incluindo DNA, proteínas, aminoácidos livres, lipídios, carboidratos e lipídios de membrana, os quais, por sua vez, podem levar ao desenvolvimento de doenças.

A toxicidade dos radicais livres está relacionada com sua alta reatividade com as biomoléculas, principalmente através de reações de abstração e de adição de átomos de hidrogênio. Enquanto o radical ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio são considerados oxidantes fracos, o radical hidroxila é considerado

extremamente potente. Foi sugerido que o radical hidroxila reage com qualquer biomolécula num raio de 15 Å do seu local de formação (WARD *et al.*, 1985). Assim, pode reagir com ácidos graxos poliinsaturados (LH) das membranas ou partículas de lipoproteínas e formar o radical ácido graxo (L[•]). A reação do L[•] com O₂ produz peroxiradical lipídico (LOO[•]), o qual na presença de um outro lipídio (LH) ou outro doador de elétron, forma hidroperóxido lipídico (LOOH) e um outro radical lipídico L[•]. Esse radical L[•] é reativo e pode iniciar a formação de novos radicais livres e assim, continuar a cascata de reações. O LOOH pode sofrer degradação catalisada por metais de transição e produzir ainda mais radicais reativos (LOO[•] ou LO[•]), que irão continuar a reação em cadeia e produzir outros produtos (malondialdeído-MDA, pentano e etano). A formação de LOOH na membrana celular também pode causar a ruptura da arquitetura da membrana (THOMPSON, 1994)

A peroxidação lipídica tem um papel crucial em processos patológicos tais como, envelhecimento, carcinogênese, catarata (THOMPSON, 1994) e na patogênese da aterosclerose (PRASAD e KALRA, 1993).

Diversos autores relacionam um aumento na ingestão de colesterol com os processos de peroxidação lipídica (ISMAIL *et al.*, 1999) e com a elevação de aldeídos (malondialdeído, MDA), sugerindo que a hipercolesterolemia está diretamente relacionada o processo de formação de radicais livres.

DEFESAS ANTIOXIDANTES

Antioxidante é qualquer molécula que, quando presente em baixas concentrações, comparada com as concentrações das substâncias oxidáveis, diminui significativamente ou inibe sua oxidação (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).

A exposição do organismo aos efeitos dos radicais livres encontra resistência de um importante e complexo sistema antioxidante. Os mais importantes antioxidantes biológicos são glutathione peroxidase (MAHFOUZ e KUMMEROW, 2000), catalase e superóxido dismutase (SOD) (MAHFOUZ e KUMMEROW, 2000), transferrina e ceruloplasmina (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989), glutathione (GSH) (REED, 1990), bem como , vitamina C (ácido ascórbico) (WAYNER *et al.*, 1986), vitamina E (α -tocoferol) (HSIU-CHING *et al.*, 2001) e os flavonóides (DIPLOCK *et al.*, 1998).

Glutathione (GSH)

A glutathione (GSH) (L- γ -glutamyl-L-cysteinylglycine) uma molécula gerada através da glutathione oxidada (GSSG) e dinucleotídeo nicotinamida adenina fosfato (NADPH) pela ação da glutathione reductase (THOMPSON, 1994), é abundante em células de mamíferos e tem como função reverter o estresse oxidativo celular (SIES, 1999), eliminando aldeídos e peróxidos, que são tóxicos ao organismo e mantendo as formas reduzidas das vitaminas C e E, sendo também coenzima da glutathione peroxidase (REED, 1990; HSIU-CHING *et al.*, 2001).

A GSH, sintetizada primariamente no compartimento citoplasmático celular, é utilizado fisiologicamente em outros tecidos ou pelos diferentes compartimentos da própria célula, como núcleo, matriz mitocondrial, retículo endoplasmático e também em espaços extracelulares (SIES, 1999).

Superóxido Dismutase (SOD)

Superóxido dismutase (SOD) é um grupo de metaloproteínas que está presente em quase todos os organismos aeróbicos, principalmente nos eritrócitos, catalisando a dismutação do O_2^- para H_2O_2 . (SIMON *et al.*, 1998).

MANTHA *et al.* (1993), observou um aumento significativo na atividade da SOD na aorta de coelhos hipercolesterolêmicos. Tal aumento da atividade ocorre porque o estresse oxidativo durante a hipercolesterolemia pode elevar a atividade da glutathione peroxidase (GPx), a qual tem por função proteger a SOD da inativação pelo H_2O_2 (BRAY *et al.*, 1974; CESQUINI *et al.*, 1999).

Glutathione Peroxidase (GPx)

A glutathione peroxidase (GPx) tem importante papel na eliminação do H_2O_2 , sob condições fisiológicas (SIMON *et al.*, 1998). Glutathione peroxidase, assim como a catalase, requer GSH como um co-fator para a degradação do peróxido de hidrogênio (KURATA *et al.*, 1993), além de estar envolvida na redução do LOOH para álcool lipídico (LOH), prevenindo dessa forma, a reação em cascata do LOOH por mais radicais livres (THOMPSON, 1994).

Catalase (CAT)

A catalase (CAT) tem a mesma função da GPx, assim, catalisa a decomposição do H_2O_2 . É uma enzima extensamente distribuída na natureza, encontrada em todos os microorganismos aeróbicos, plantas e células animais. Os eritrócitos de mamíferos, em especial, são dotados de uma atividade extraordinariamente alta de CAT (KURATA *et al.*, 1993). Assim, segundo AL-ABRASH *et al.* (2000) nos eritrócitos de pacientes suscetíveis ao estresse oxidativo, verifica-se um aumento na atividade da CAT, como observado nas doenças cardiovasculares, tumores, inflamação, anemia e diabetes.

Um aumento na atividade da SOD poderia proteger a catalase e a glutathione peroxidase da inativação pelo O_2^- . Tal efeito poderia levar a um aumento na atividade da glutathione peroxidase e da catalase, uma vez que o O_2^- é conhecido como inativador da catalase (KONO e FRIDOVICH, 1982) e da glutathione peroxidase (BLUM e FRIDOVICH, 1985). De fato, MANTHA *et al.* (1993), em experimentos com coelhos hipercolesterolêmicos, observaram que esses animais apresentaram uma elevação da atividade da SOD, da GPx e da CAT na aorta em resposta ao estresse oxidativo.

Glutathione Redutase (GR)

A glutathione redutase (GR) é responsável pela manutenção das concentrações intracelulares de GSH, o qual exerce importante papel na proteção da hemoglobina e outras estruturas protéicas celulares contra danos oxidativos (KURATA, 1993). A glutathione redutase catalisa a redução da Glutathione oxidada

(GSSG) usando NADPH como um doador de H^+ . A GSSG pode ser formada durante a degradação do H_2O_2 pela GPx ou ainda pelo ataque de radicais livres ao GSH (WENDEL & CIKRYT, 1980).

A GR requer flavina adenina dinucleotídio (FAD) como uma co-enzima, sendo esta última produzida enzimaticamente por meio da riboflavina extracelular incorporada nas hemácias (KURATA *et al.*, 1993).

ÓXIDO NÍTRICO, DISFUNÇÃO ENDOTELIAL E ATEROSCLEROSE.

O endotélio vascular era tido como uma monocamada de células estáticas dentro do corpo, agindo como uma barreira semipermeável entre o sangue e os tecidos. No entanto, evidências experimentais e clínicas têm demonstrado que o endotélio é um tecido ativo e dinâmico envolvido na manutenção de processos homeostáticos (VANE *et al.*, 1995), sendo também, considerado um órgão endócrino (RAMIRES *et al.*, 1998). As principais funções endoteliais são a manutenção da circulação sanguínea e a sua fluidicidade, a regulação do tônus e inibição da proliferação da musculatura lisa vascular e a modulação da adesão plaquetária e transmigração e adesão de leucócitos (BROWN e HU, 2001).

FURCHOTT e ZAWADISKI (1980) propuseram que havia um fator relaxador derivado do endotélio vascular, posteriormente identificado como sendo o óxido nítrico (NO), reconhecido como o mais potente vasodilatador formado pelas células do corpo humano (RAMIRES *et al.*, 1998). Estudos mostraram que o NO está envolvido em diversas atividades biológicas vitais, tais como

neurotransmissão no sistema nervoso central e periférico (ZAYAS *et al.*, 2000), defesa imunológica inespecífica (BRYK e WOLFF, 1999) e regulação da atividade leucocitária e plaquetária, contribuindo, dessa forma, para a manutenção da homeostasia do sistema cardiovascular e na regulação da pressão sanguínea (HAYNES *et al.*, 1993; PAPAPETROPOULOS *et al.*, 1999).

O NO é produzido pelo endotélio vascular sob condições basais e sua produção é estimulada por uma variedade de receptores bem como pelo “shear stress” produzido pelo fluxo sangüíneo. O NO liberado pelas células endoteliais contrabalança com a vasoconstrição produzida pelo sistema nervoso simpático e pelo sistema renina-angiotensina (LI e FORSTERMANN, 2000). Além disso, NO é um potente inibidor da agregação e adesão plaquetária na parede vascular. A agregação plaquetária na luz do vaso sangüíneo altera a parede desse vaso, liberando fatores mitogênicos que estimulam a proliferação das células endoteliais que pode promover a oclusão do vaso (BUSSE *et al.*, 1987).

Quando a homeostasia endotelial é rompida, formam-se condições adequadas para o desenvolvimento da aterosclerose, um processo crônico caracterizado por resposta inflamatória e fibroproliferativa da parede arterial induzida por agressões da superfície arterial (ROSS, 1997), de alta morbidade, sendo hoje, uma das principais causas da mortalidade nas civilizações ocidentais (WHO-MONICA, 1994). O processo que dá origem a esta doença é multifatorial e, geralmente, relaciona-se à presença de fatores de risco não modificáveis (idade, sexo e antecedente familiar) e a fatores de risco modificáveis como, por exemplo, hipertensão arterial, diabetes, tabagismo, características hemorreológicas locais

(distúrbios no padrão de fluxo sanguíneo em segmentos tortuosos ou próximos a bifurcações dos vasos) e, sobretudo, à hipercolesterolemia (VERRI e FUSTER, 1997; RAMIRES *et al.*, 1998, STEINBER e WITZUM, 1999). Macroscopicamente, a lesão mais precocemente detectável ao longo do processo aterosclerótico é a estria gordurosa (*fatty streak*), que consiste em depósitos subendoteliais de macrófagos ricos em lipídios, denominados células espumosas (*foam cells*) e, em menores quantidades, células musculares lisas ricas em lipídios. Essa lesão primordial, potencialmente reversível, normalmente evolui de maneira lenta, ao longo dos anos, até constituir lesões mais avançadas, como as placas fibrosas, as quais podem obstruir os vasos podendo mesmo levar a eventos isquêmicos agudos (como o infarto do miocárdio) quando instabilizadas (ROSS, 1997; ROSS, 1999; PINTO *et al.*, 2003).

Uma das primeiras indicações de que o NO estava associado com a aterosclerose foi uma paradoxal observação de que os metabólitos do NO estavam aumentados na hipercolesterolemia; no entanto, o relaxamento da célula muscular lisa vascular em resposta ao NO era inibido sob essas condições (OHARA *et al.*, 1993). Além disso, outros efeitos anti e pró-ateroscleróticos do NO têm sido demonstrados (O'DONNELL *et al.*, 1999). Uma explicação para tais resultados é que o NO sozinho tem função de um antioxidante e anti-inflamatório, entretanto, em combinação com oxidantes pró-inflamatórios, superóxido, peróxido de hidrogênio ou hipoclorito, mediadores pró-aterogênicos são formados modificando proteínas e lipídios (BECKMAN e KOPPENOL, 1996). O papel anti-aterogênico do NO deriva da observação de que a L-arginina, substrato endógeno

para a formação da NO, inibe e pode mesmo regredir as lesões ateroscleróticas. (CANDIPAN *et al.*, 1996).

A redução da bioatividade do NO pode ser causada pela diminuição da expressão da NO sintase (eNOS) pelas células endoteliais, pela falta de substrato ou co-fator para a eNOS (POU *et al.*, 1992) ou pela acelerada degradação do NO pelas espécies reativas de oxigênio (EROS) (HARRISON, 1997; PINTO *et al.*, 2003), proporcionando, então, alterações patológicas. Esses dados sugerem a grande importância que tem a interação das EROs com o NO nos vasos sanguíneos (O'DONNELL *et al.*, 1999).

A interação entre o NO e $O_2^{\bullet}$ ocorre extremamente rápida na fração de $6.7 \times 10^9 \text{ mol/L}^{-1} \cdot \text{s}^{-19}$ (HARRISON, 2000). OHARA *et al.*, (1993) demonstraram um aumento na formação de $O_2^{\bullet}$ principalmente na íntima das artérias ateroscleróticas, levando à formulação da hipótese de que o prejuízo na vasodilatação endotelial na aterosclerose é devido a uma mais rápida oxidação do NO do que a diminuição da atividade da enzima óxido nítrico sintase.

O aumento da produção de EROs, durante a hipercolesterolemia, promove injúria nas células endoteliais e, conseqüentemente, disfunção endotelial, estágio primordial para o início da aterosclerose (PRASAD e KALRA, 1993). Por outro lado, a diminuição da permeabilidade endotelial e a redução do influxo de lipoproteínas na parede vascular (CARDONA-SANCLEMENTE e BORN, 1995) contribuem para a propriedade antiaterogênica do óxido nítrico (NO).

A formação basal de NO derivado do endotélio aparece diminuída também na maioria dos pacientes com hipertensão essencial, causada devido a uma

redução na síntese, na liberação ou aumento na sua degradação (PANZA *et al.*, 1993).

Uma das primeiras indicações que as EROs poderiam estar relacionadas à aterosclerose foi a demonstração de que a lipoproteína de baixa densidade (LDL) oxidada, principal lipoproteína carreadora do colesterol plasmático, possuía efeitos biológicos que contribuíam para o desenvolvimento da aterosclerose (DARLEY-USMAR e HASSALL, 1993). O processo de oxidação da LDL ocorre dentro da parede arterial, onde a maioria das células, incluindo células endoteliais, células da musculatura lisa e monócitos derivados dos macrófagos, pode oxidar a LDL (AVIRAM e ROSENBLAT, 1994). A interação da LDL com os macrófagos, sob estresse oxidativo, ativa oxigenases celulares, que produzem EROs e espécies reativas de nitrogênio que oxidam a LDL (AVIRAM *et al.*, 1996). Assim, nessas condições, podem ocorrer várias condições patológicas, incluindo redução nas propriedades anticoagulantes e antiinflamatórias do endotélio, prejuízo na modulação do crescimento vascular e desregulação do remodelamento vascular que podem levar a uma disfunção endotelial. No entanto, na maioria da literatura, esse termo tem sido utilizado para se referir à diminuição do vasorelaxamento dependente do endotélio, causado por uma diminuição da bioatividade do NO na parede do vaso (GIMBRONE, 1995).

FIBRAS ALIMENTARES

Apesar do fato das fibras alimentares serem, anteriormente, tidas como sendo material inerte e sem qualquer efeito fisiológico no organismo (KINGMA *et*

al., 1993), atualmente se reconhece que as fibras exercem suas ações em todo o trato digestivo devido, sobretudo, as suas características físico-químicas.

As fibras alimentares são substâncias presentes nas paredes das células vegetais que não sofrem digestão pelas enzimas digestivas e que, portanto, não são absorvidas pela mucosa intestinal (SLAVIN, 1987). Entretanto, a porção fibrosa dos alimentos pode ser parcialmente hidrolisada pela microbiota colônica (TROWELL, 1974; ROBERFROID, 1993; SEMBRIES *et al.*, 2003).

O termo fibra alimentar total (FAT) é, atualmente, mais utilizado para denominar as fibras alimentares por acrescentar à definição anterior polímeros resultantes da reação de Maillard, amidos resistentes (ex: amido retrogradado) e polidextroses (GORDON, 1989).

São fontes de fibra alimentares os alimentos de origem vegetal: frutas, verduras, legumes, raízes, tubérculos, nozes e grãos (SLAVIN, 1987; CAVALCANTI, 1989; MARLETT, 1992). Indivíduos adultos deveriam ingerir, diariamente, em torno de 20 a 30 gramas na base seca (EASTWOOD, 1992), o que poderia ser conseguido com uma dieta à base de cereais integrais, frutas, legumes e verduras.

As fibras são classificadas, segundo SCHNEEMAN (1986):

a) polissacarídeos estruturais: estão associados à parede celular e incluem as hemiceluloses, pectinas e celulose.

a.1) celulose: confere volume aos alimentos (THEANDER *et al.*, 1993), sendo parcialmente degradada pela microbiota colônica (KRITCHEVSKY, 1985);

a.2) hemiceluloses: sofrem degradação por bactérias colônicas (KRITCHEVSKY, 1985);

a.3) pectinas: sofrem total degradação pelas bactérias intestinais (KRITCHEVSKY, 1985) e formam soluções viscosas no trato gastrointestinal adsorvendo certos metabólitos, tais como sais biliares (VAHOUNY, 1982);

b) polissacarídeos não estruturais: incluem as gomas, mucilagens, substâncias pécticas, polissacarídeos de algas e derivados do endosperma e do espaço intracelular das células vegetais. São inteiramente degradadas pelas bactérias do cólon (KRITCHEVSKY, 1985), contribuindo para a viscosidade e geleificação das suas dispersões (MA e BARBOSA-CÁNOVAS, 1993).

MARLETT (1992), determinou o conteúdo e a composição das fibras alimentares de alimentos comumente consumidos na dieta humana. Assim, o teor de fibra alimentar total, em relação a 100g de peso fresco dos alimentos analisados, foi de $1,4 \pm 0,7$ g para as frutas, $2,0 \pm 0,8$ g para as verduras, $2,3 \pm 1,0$ g para grãos refinados, $4,0 \pm 0,7$ g para leguminosas e $6,4 \pm 2,1$ g para as nozes. Verificou-se, também, que o teor de fibra solúvel foi de 23% nos grãos refinados, 3% nos nozes, e 13 a 20% nos demais grupos de alimentos (frutas, verduras e leguminosas); além disso, a pectina apresentou valor desprezível em grãos e foi responsável por 15 a 30% do teor de fibra total das frutas. Particularmente em laranjas, a pectina, hemiceluloses e a lignina corresponderam, respectivamente a 50%, 20% e 0,1% de teor total de fibras. Quanto aos cereais refinados, em 41 fontes diferentes analisadas, o autor observou que o valor médio

de fibra alimentar total foi de 10 a 13g sendo que seus componentes principais hemicelulose, celulose e pectina apresentaram valores extremamente baixos.

As principais ações das fibras alimentares sobre o trato gastrointestinal são (SCHENEEMAN, 1989; THIBAUT *et al.*, 1992):

a - degradação microbiana: fibras solúveis são fermentadas pela microbiota do intestino grosso em graus variáveis produzindo ácidos graxos de cadeia curta os quais atingem a circulação por meio de veia porta; esses ácidos graxos podem influenciar o metabolismo lipídico, causando efeito hipocolesterolêmico (SCHEPPACH *et al.*, 1988; HUGHES, 1991; YOSHIDA *et al.*, 1991; McBURNEY e SAUER, 1993; ROBERFROID, 1993; SEMBRIES *et al.*, 2003).

b- capacidade de hidratação : a hidratação das fibras resulta na formação de uma matriz de gel podendo aumentar a viscosidade do conteúdo gastrointestinal, e como consequência, retarda o esvaziamento gástrico e diminuir a digestão e absorção de nutrientes (SCHENEEMAN, 1989; VAN-NIEUWENHOVEN *et al.*, 2001).

c - adsorção de macronutrientes : as fibras solúveis e insolúveis podem adsorver tanto os compostos tóxicos, impedindo que os mesmos fiquem disponíveis no intestino, assim como os ácidos biliares, reduzindo a formação de micelas, com consequências na absorção intestinal de colesterol com reflexo na colesterolemia (LEDERER, 1990; TOPPING, 1991; FAVIER *et al.*, 1998).

d - troca catiônica : fitatos e compostos fenólicos, elementos associados às fibras podem formar complexos insolúveis com minerais em pH fisiológico

promovendo redução da absorção intestinal desses micronutrientes (BRUNE *et al.*, 1989).

e - tamanho da partícula : o grau de trituração da fibra é um fator capaz de produzir diferentes efeitos: fibras menores que 200µm apresentam a maior capacidade de hidratação e fermentabilidade, pois possuem maior superfície de contato; fibras grandes, maiores que 800 µm são eficazes na estimulação da defecação, aumentando o volume fecal e evitando a ocorrência de constipação (LÓPEZ *et al.*, 1997; YU e PERRET, 2003).

As fibras alimentares podem exercer ações fisiológicas no sistema gastrointestinal sendo que suas frações, solúvel e insolúvel, afetam de forma distinta esse sistema. Enquanto as fibras solúveis produzem seus efeitos na porção superior do tubo digestivo, retardando o esvaziamento gástrico, a assimilação de nutrientes e aumentando o tempo de trânsito intestinal, as insolúveis agem, sobretudo no intestino grosso, promovendo o aumento do volume fecal e produzindo fezes mais macias (MONRO, 2002) atuando como agentes preventivos de doenças como a diverticulose (LATTO, 1978; GEAR *et al.*, 1979), hérnia de hiato (BURKITT, 1981), varicoses venosas (BURKITT, 1976) e hemorróidas (GEAR *et al.*, 1979; HUIBREGTSE, 1979), as quais estão associadas com o aumento de pressões intraluminais.

ERHARDT *et al.* (1997) confirmaram em seus estudos que dietas pobres em fibras alimentares e ricas em gorduras, aumentaram a formação do radical hidroxil nas fezes, e isto pode conduzir ao câncer colorretal. Constatou-se ainda

que a adição da fibra alimentar na dieta é capaz de diminuir o risco de formação de cálculos biliares (POMARE e EATON, 1973; HEATON *et al.*, 1975).

A capacidade que certas fibras têm de seqüestrarem monoglicerídeos, ácidos graxos, fosfolipídios, sais biliares ou mesmo frações de colesterol presentes na dieta evidencia sua importância na prevenção de doenças cardiovasculares (VAHOUNY, 1982; SIMONS *et al.*, 1982; HOZUMI *et al.*, 1995; PASQUIER *et al.*, 1996; MORICEAU *et al.*, 2000). Diversos mecanismos de ação têm sido propostos para explicar o efeito de redução de lipídios plasmáticos pelas fibras solúveis:

Efeito da viscosidade sobre a absorção de lipídeos:

A fibra solúvel pode diminuir a absorção de ácidos graxos e colesterol, graças a sua capacidade de hidratação que resulta na formação de uma matriz gelatinosa no lúmen intestinal, interferindo na digestão e absorção dos lipídios (SCHENEEMAN, 1989; TOPPING, 1991; YU e PERRET, 2003).

As fibras solúveis retardam o esvaziamento gástrico contribuindo para a redução da elevação pós-prandial dos lipídios da dieta (SCHENEEMAN, 1990; READ e EASTWOOD, 1992). Por outro lado, a absorção de nutrientes, provavelmente, torna-se lenta ou mesmo reduzida devido ao aumento da viscosidade do conteúdo intestinal e da espessura da mucosa absorptiva o que representa uma barreira física à absorção dos nutrientes, proporcionada pela ingestão de dietas ricas em fibras solúveis (ANDERSON *et al.*, 1990, BLACKWOOD *et al.*, 2000;). Ainda, as fibras solúveis, por serem altamente

viscosas, ligam-se facilmente aos sais biliares aumentando a excreção fecal dos mesmos e, conseqüentemente, reduzindo a biodisponibilidade dos sais biliares necessários para a absorção do colesterol da dieta (KHAN *et al.*, 1981; FAVIER *et al.*, 1998). Além disso, a redução da fração dos sais biliares que seriam reabsorvidos pela circulação êntero-hepática resulta em maior síntese hepática de sais biliares, numa tentativa de compensar a redução da biodisponibilidade dessas substâncias promovendo, portanto, um desvio do metabolismo do colesterol para essa finalidade; conseqüentemente, menos colesterol estaria disponível para síntese de lipoproteínas (ANDERSON *et al.*, 1990; KISHIDA, *et al.*, 2002).

Efeitos de metabólitos colônicos:

Ao sofrerem fermentação no cólon, as fibras solúveis possibilitam a formação de ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato e butirato), aos quais têm propriedades hipocolesterolêmicas (EASTWOOD, 1992, SEMBRIES *et al.*, 2003).

Redução da interação enzimático-digestiva:

Evidências experimentais sugerem que determinadas fibras solúveis podem inibir a atividade de lipases, as quais hidrolisam triacilglicerídeos a ácidos graxos livres, diglicerídeos e monoglicerídeos. De acordo com SCHENEEMAN (1986), as fibras que se solubilizam em água dificultam a ação enzimático-digestiva. As gomas agiriam nesse processo pelo fato de formarem géis e aumentarem a viscosidade do conteúdo intestinal diminuindo, assim, a motilidade entérica tendo

como consequência uma mistura pouco eficiente do alimento no tubo digestivo comprometendo ainda mais a ação das enzimas (VAHOUNY, 1982; BLACKWOOD *et al.*, 2000). A pectina, por sua vez, através dos seus resíduos ácidos negativamente carregados, forma complexos com as enzimas e/ou substratos reduzindo as reações de hidrólise (ACTON *et al.*, 1982; FURDA, 1990). SHAH *et al.*, (1982), relataram que a pectina, goma guar e lignina diminuem a atividade da pepsina, enquanto que ISAKSSON *et al.* (1982) verificaram que a tripsina, amilase e lipase foram inibidas por diferentes fibras solúveis.

Por outro lado, o consumo de fibras alimentares pode interferir na biodisponibilidade de nutrientes exercendo efeito negativo sobre a condição nutricional de uma determinada população (ACEVEDO e BRESSANI, 1989). Assim, cátions bivalentes tais como zinco, magnésio, ferro e cálcio, por exemplo, podem ter sua absorção comprometida na presença de alimentos ricos em fibras (OLIVEIRA *et al.*, 1991). Segundo LAJOLO *et al.* (1988) o efeito das fibras sobre a absorção de minerais torna-se importante quando as dietas forem deficientes nesses nutrientes ou quando a ingestão de fibras estiver associada às fases do desenvolvimento de grande atividade anabólica (crescimento) ou catabólica (senilidade).

Além disso, a fermentação das fibras alimentares promovida pela microbiota colônica produz gases (gás carbônico, metano, por exemplo), os quais podem acarretar distensão abdominal e flatulência exagerada, proporcionando desconforto ao indivíduo (FRITZ *et al.*, 1985; LAJOLO *et al.*, 1988).

POLIFENÓIS

Os compostos fenólicos ou polifenóis constituem um amplo grupo de substâncias químicas, considerados metabólitos secundários das plantas, com diferentes estruturas químicas e atividade, englobando mais de 8.000 compostos distintos. Sua forma mais freqüente são os polímeros ou lignina insolúvel e sua presença nos tecidos animais está relacionada ao consumo e ingestão de alimentos vegetais (SHAHIDI e NACZK, 1995).

Quimicamente os compostos fenólicos são substâncias que possuem um anel aromático, um anel benzeno, com um ou mais grupos hidroxilas, incluindo derivados funcionais (ésteres, metil ésteres etc) (TSIMIDOU, 1998). Na natureza os polifenóis variam desde moléculas simples como os ácidos fenólicos até compostos altamente polimerizados, como os taninos. Apresentam-se nas plantas em forma conjugada com um ou mais resíduos de açúcar unidos aos grupos hidroxilas e em alguns casos podem-se produzir uniões diretas entre uma molécula de açúcar e um carbono aromático. A forma mais comum encontrada na natureza é em forma de glicosídeos, sendo solúveis em água e solventes orgânicos (SHAHIDI e NACZK, 1995).

O grande grupo de polifenóis atrai grande interesse devido ao seu potencial anti-aterogênico (JUSTESEN *et al.*, 1998), bem como também possuem ação vasodilatadora (RICUPERO *et al.*, 2001). Desta forma, estudos recentes demonstraram que os polifenóis podem prevenir doenças degenerativas (SAKAKIBARA *et al.*, 2003), atuando como antioxidantes naturais. (JUSTESEN *et al.*, 1998). O comportamento antioxidante dos compostos fenólicos parece estar

relacionado à sua capacidade em quelar metais e captar radicais livres (MARTINEZ-VALVERDE *et al.*, 2000). No entanto, para que um composto fenólico possa ser classificado como antioxidante, deve cumprir algumas condições básicas. A primeira condição é que quando se encontre numa concentração baixa com relação ao substrato que será oxidado, possa atrasar ou prevenir a auto-oxidação ou a oxidação mediada por um radical livre. A segunda condição é que o radical formado seja estável e não possa atuar como um oxidante posterior (MARTINEZ-VALVERDE *et al.*, 2000).

Segundo HARBONE (1989), os compostos fenólicos podem se agrupar em diferentes classes, dependendo da sua estrutura química básica. A seguir descreveremos aquelas com um maior interesse nutricional:

a) Fenóis e ácidos fenólicos

Dentro deste grupo os fenóis simples como o fenol, cresol, timol e resorcinol estão amplamente distribuídos entre todas as espécies vegetais. Igualmente os ácidos fenólicos tais como o gálico, vanilínico também são abundantes nas plantas.

b) Ácidos cinâmicos

Os ácidos cinâmicos (caféico, ferúlico, p-cummárico) encontram-se raramente livres e por regra geral, apresentam-se em forma derivada. Assim, por exemplo, o ácido caféico encontra-se esterificado com ácidos.

c) Lignanos e neolignanos

São metabólitos das plantas, possuem baixo peso molecular formados pelo acoplamento oxidativo de unidade de p-hidroxi fenilpropano, os quais se unem mediante pontes de hidrogênio (SHAHIDI e NACZK, 1995).

d) Flavonóides

Entre os polifenóis, os flavonóides são um grupo de particular interesse porque possuem alta prevalência nos alimentos como frutas, vegetais e chás (JUSTESEN *et al.*, 1998). Dividem-se em várias subclasses com mais de 5.000 compostos (HARBONE, 1993), sendo os polifenóis mais distribuídos nas plantas. Seu número de flavonóides nas plantas é complexo pela ocorrência, principalmente, de formas O-glicosídicas com número de açúcar como glicose, galactose, ramnose, rabinose, xilose e rutinose (JUSTESEN *et al.*, 1998).

A glicosilação aumenta a polaridade dos flavonóides e dessa forma sua solubilidade em água, que é necessária para seu estoque nos vacúolos das células vegetais. A função desses flavonóides nos vegetais acredita-se ser, como um agente protetor contra a radiação UV e também contra microorganismo (JUSTESEN *et al.*, 1998).

Os flavonóides são substâncias polifenólicas de baixo peso molecular que compartilham o esqueleto comum de difenilpiranos: dos anéis benzênicos unidos através de um anil pirona ou piram heterocíclico. Compõem um grupo de compostos polifenólicos caracterizados por uma estrutura comum. Benzo- γ -pirona, que tem reportada ação antioxidante em vários sistemas (BENAVENTE-GARCIA, *et al.*, 1997). Estão presentes em grande variedade de plantas, especialmente em espécies de *Citrus*. Quatro tipos de flavonóides (flavononas,

flavonas, flavonois e antocianina, a última apenas em laranjas vermelhas) ocorrem em Citrus (HOROWITZ e GENTILI, 1977).

Os efeitos dos flavonóides em humanos não são totalmente claros, mas existe a teoria baseada na função dos flavonóides como antioxidantes e como seqüestrador de radicais livres. Assim, constituiriam grupos de antioxidantes fitoquímicos, e fazem parte da dieta humana (HERTOG *et al.*, 1995). A esse respeito, é especulado que os grupos (catequinas, antocianinas, flavonas, flavonóis, flavononas etc.) diferem em suas propriedades, dependendo do número e posição do grupamento hidroxil e a substituição do açúcar (JUSTESEN *et al.*, 1998). Utilizando a oxidação de lipoproteínas *in vitro* VINSON *et al.* (1995) demonstrou que os flavonóides eram mais efetivos e as flavonas e flavononas menos efetivos como antioxidantes.

A LDL, principal carreadora do colesterol plasmático, é protegida da oxidação pela paraoxonase presente no plasma humano, a qual é uma esterase associada com HDL que pode hidrolisar e reduzir os peróxidos lipídicos nas lipoproteínas e nas lesões ateroscleróticas (AVIRAM *et al.*, 1998). Pelo fato da oxidação da LDL na parede arterial ser um evento chave no início da aterogênese, os agentes que possam prevenir a oxidação dessa lipoproteína poderiam atenuar o desenvolvimento da aterosclerose. Dessa forma, a ingestão de flavonóides demonstrou ser inversamente relacionado à morbidade e mortalidade causada por doenças cardiovasculares e a esse efeito atribuiu-se a inibição da oxidação da LDL (HERTOG *et al.*, 1995).

e) Taninos

Os taninos são compostos fenólicos hidrossolúveis com um peso molecular compreendido entre 500 e 3000D. Estes compostos contém grande número de grupamentos hidroxila, entre outros grupos funcionais (1 a 2 por 100D), sendo portanto capazes de unirem-se a proteínas e a outras macromoléculas (ASHIDA *et al.*, 2000).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O interesse pelos benefícios que os alimentos podem trazer à saúde é antigo. Em quatro a.C. o grego Hipócrates, considerado o pai da medicina, dizia: "Faz da comida o teu remédio". No entanto, nos tempos atuais, nos países ocidentais o que se vê é o aumento de doenças crônico-degenerativas em função, entre outras possíveis causas, de uma dieta inadequada.

Assim, a ingestão de dieta rica em fibras alimentares e substâncias antioxidantes pode contribuir significativamente no tratamento e, principalmente, na prevenção de doenças crônico-degenerativas.

BIBLIOGRAFIA

- ACEVEDO, E.; BRESSANI, R. - Ingestión de fibra dietética en los países del istmo centroamericano: Implicaciones. *Arch. Lat. Am. Nutr.*, v.39, p.392-404, 1989.
- ACTON, J.C.; BREYER, L.; SATERLEE, L.D. - Effect of dietary fiber constituents on the *in vitro* digestibility of casein. *J. Food Sci.*, v.47, p.556-560, 1982.

- AL-ABRASH, A.S.; AL-QUOBAILI, F.A.; AL-AKAHRAS, G.N. Catalase evaluation in different human disease associated with oxidative stress. *Saudi. Med. J.*, v.21, n.9, p.826-830, 2000.
- ANDERSON, J.W.; DEAKINS, D.A.; BRIDGES, S.R. - Soluble fiber. In: KRITCHEVSKY, D.; BONFIELD, C.; ANDERSON, J.W. - *Dietary fiber: chemistry, physiology and health effects*. New York: Plenum Press, 1990, p.339-363.
- ANDERSON, J.W.; HANNA, T.J. - Impact of nondigestible carbohydrates on serum lipoproteins and risk for cardiovascular disease. *J. Nutr.*, v.129, n.7, p.1457S-1466S, 1999.
- ASHIDA, H.; FUKUDA, I.; YAMASHITA, T.; KANAZAWA, K. Flavones and flavonols at dietary levels inhibit a transformation of aryl hydrocarbon receptor induced by dioxin. *FEBS Lett*, v.476,p.213-217, 2000.
- AVIRAM, M.; ROSENBLAT, M. Macrophage mediated oxidation of extracellular low density lipoprotein requires an initial binding of the lipoprotein to its receptor. *J. Lipid. Res.*, v.35, p.385-398, 1994.
- AVIRAM, M.; ROSENBLAT, M.; BISGAIER, C.L. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J. Clin. Invest.*, v.101, p.1581-1590, 1998.
- AVIRAM, M.; ROSENBLAT, M.; ETZIONI, A.; LEVY, R. Activation of NADPH oxidase is required for macrophage mediated oxidation of low density lipoprotein. *Metabolism*, v.45, p.1069-109, 1996.

- BECKMAN, J.S.; KOPPENOL, W.H. Nitric oxide, superoxide, peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol.*, v.271, p.C1424-C1437, 1996.
- BENAVENTE-GARCIA, O.; CASTILLO, J.; MARIN, F.R.; OKUNO, A.; DEL RIO, J.A. Use and properties of *Citrus* flavonoids. *J. Agric. Food. Chem.*, v.45, p.4505-4515, 1997.
- BLACKWOOD, A.D.; SALTER, J.; DETTMAR, P.W.; CHAPLIN, M.F. - Dietary fibre, physicochemical properties and their relationship to health. *J. R. Soc. Health.* v.120, p.242-247, 2000.
- BLUM, J.; FRIDOVICH, I. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.240, p.500-508, 1985.
- BRAY, R.C.; COCKLE, S.A.; MARTIN-FIELDEN, E.; ROBERTS, P.B.; ROTILIO, G.; CALABRESE, L. Reduction and inactivation of superoxide dismutase by hydrogen peroxide. *Biochem. J.*, v.3, p.139-143, 1974.
- BROWN, A. A.; HU, F.B. Dietary modulation of endothelial functions: implications for cardiovascular disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.73, p.673-786, 2001.
- BRUNE, M.; ROSSANDER, L.; HALLBERG, L. - Iron absorption: on intestinal adaptation to high-phytate intake. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.49, p.542-545, 1989.
- BRUNE, M.; ROSSANDER, L.; HALLBERG, L. iron absorption and phenolic compounds: importance of different phenolic structure. *Eur. J. Clin. Nutr.*, v.43, p.547-557, 1989.
- BRYK, R.; WOLFF, D.J. Pharmacological modulation of nitric oxide synthesis by mechanism-based inactivator and related inhibitor. *Pharmacol. Ther.*, v.84, n.2, p.157-178, 1999.

- BURKITT, D.P. - Varicose veins , facts and fantasy. *Arch. Surg.*, v.111, p.1327-1332, 1976.
- BURKITT, D.P. - Hiatal hernia. Is it preventable? *Am. J. Clin. Nutr.*, v.34, p.428-431, 1981.
- BUSSE, R.; LUCKHOFF, A.; BASSENGE, E. Endothelium-derived relaxant factor inhibits platelet activations. *Arch. Pharmacol.*, v.336, p.566-571, 1987.
- CANDIPAN, R.C.; WANG, B.Y.; BUITRAGO, R.; TSAO, P.S.; COOKE, J.P. Regression or progression. Dependency vascular nitric oxide. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v.16, p.44-50, 1996.
- CARDONA-SANCLEMENTE, L.E.; BORN, G.V. Effect of inhibition of nitric oxide synthesis on the uptake of LDL and fibrinogen by arterial walls and other organs of the rat. *Br. J. Pharmacol.*, v.114, p.1490-1494, 1995.
- CAVALCANTI, M.L. - Fibras alimentares. *Rev. Nutr. PUCCAMP*, v.2, p.88-97, 1989.
- CESQUINI, M.; TORSONI, M.A.; OGO, S.H. Adaptive response to swimming exercise: antioxidant systems and lipid peroxidation. *J. Anti-Aging Med.*, v.2, p.357-364, 1999.
- DARLEY-USMAR, V.M.; HASSALL, D.G. The role of macrophages and the modification of LDL in the pathogenesis of atherosclerosis. In: CURTIS, M.J. *Immunopharmacology of the heart*. London: Academic Press, 1993, p.43-51.
- DIPLOCK, A.T.; CHARLEUX, J.L.; CROZIER-WILLI, G.; KOK, F.J.; RICE-EVANS, C.; ROBERFROID, M.; STAHL, W.; VINA-RIBES, J. Functional food science

- and defence against reactive oxidative species. *Br. J. Nutr.*, v.80, p.77-112, 1998.
- EASTWOOD, M.A - The physiological effect of dietary fiber: un update. *Ann. Rev. Nutr.*, v.12, p.19-35, 1992.
- ERHARDT, J.G.; LIM, S.S.; BODE, C. - A diet rich in fat and poor in dietary fiber increases the in vitro formation of reactive oxygen species in human feces. *J. Nutr.*, v.127, n.5, p.706-709, 1997.
- FAVIER, M.L.; BOST, P.E.; DEMIGNE, C.; REMESY, C. - The cholesterol-lowering effect of guar gum in rats is not accompanied by an interruption of bile acid cycling. *Lipids*. v.33, p.765-771, 1998.
- FRITZ, M.; SIEBERT, G.; KASPER, H. - Dose dependence of breath hydrogen and methane in healthy volunteers after ingestion of a commercial dissaccharide mixture. *Br. J. Nutr.*, v.54, p.389-400, 1985.
- FUHRMAN, B.; AVIRAM, M. Flavonoids protect LDL from oxidation and attenuate atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.*, v.12, p.41-48, 2001.
- FUNG, T.T.; RIMM, E.B.; SPIEGELMAN, D.; RIFAI, N.; TOFLER, G.H.; WILLWT, W.C.; HU, F.B. Association between dietary patterns and plasma biomarkers of obesity and cardiovascular disease risk. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.73, p.61-67, 2001.
- FURCHGOTT, R.F.; ZAWADISKI, J.V. The obrigatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, v.288, p.373-376, 1980.

- FURDA, I.; BRINE, C.J. Ed. New Developments in Dietary Fiber. Physiological *Physicochemical and Analytical Aspects*. New York: Plenum Press, 1990, p.67-82.
- GEAR, J.S.; WARE, A.; FURDSON, P.; MANN, J.I.; NOLAND, D.J.; BRODRIBB, A.J.; VESSEY, M.P. - Symptomless diverticular disease and intake of dietary fiber. *Lancet*, v.1, p.511-514, 1979.
- GIMBRONE, M.A. Jr. Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis. *Am. J. Cardiol.*, v.75, p.67B-70B, 1995.
- GITTELSON, J.; WOLEVER, T.M.S.; HARRIS, S.B.; HARRIS-GIRALDO, R.; HANLEY, A.J.G.; ZINMAN, B. Specific patterns of food consumption and preparation are associated with diabetes and obesity in a native Canadian community. *J. Nutr.*, v.128, p.541-547, 1998.
- GORDON, D.T. - Functional properties vs physiological action of total dietary fiber. *Cereal Foods World*, v.34, n.7, p.517-525, 1989.
- GUIDA-CARDOSO, S.M.; PINTO, W.J.; STOPPA, G.R.; OGO, S.H.; REYES, F.G.R.; AREAS, M.A. The influence of dietary fiber on the antioxidant status of hypercholesterolemic hamsters. *Alimentaria Technol. Hig. Alim.*, v.354, p.121-124, 2004.
- HALLIWEL, B.; GUTTERIDGE, J.M. Oxygen is poisonous: an introduction to oxygen toxicity and free radicals. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. (2a edition), Claredon Press, Oxford, 1989, p.1-21.

- HALLIWEL, B.; GUTTERIDGE, J.M. Protection against oxidants in biological systems: The Superoxide theory of oxygen toxicity. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. (2a edition), Claredon Press, Oxford, 1989b, p.23-36.
- HARBONE, J.B. General produceres and measurements of total phenolic. In: HARBONE J.B. *Plant Phenolic, vol 1, from "Methods in Plant Biochemistry Series"*. London: Academic Press, 1989, p.1-28.
- HARBONE, J.B. The flavonoids: *Advances in Research Since 1986*. Chapman y Hall ed., London: Academic Press, 1993.
- HARRISON, D.G. Endothelial function and oxidant stress. *Clin. Cardiol.*, v.20, p.II11-I117, 1997.
- HARRISON, D.G.; CAI, H. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Cir. Res.*, v.87, p.840-844, 2000.
- HAYNES, W.G.; NOON, J.P.; WALKER, B.R. Inhibition of nitric oxide synthesis increases blood pressure in healthy humans. *J. Hypertens.*, v.11, p.1375-1380, 1993.
- HEATON, J.W. - Food fiber as an obstacle to energy intake. *Lancet*, v.2, p.1418 - 1421, 1973.
- HEATON, K.W.; GALLSTONES, A.N. IN: BURKITT, D.P.; TROWELL, H.C. *Refined Carbohydrate Foods and Disease: Some implications of dietary fibre*. London: Academic Press, 1975, p.173-176.
- HERTOG, M.G.L.; KROMHOUT, D.; ARAVANIS, C.; BLACKBURN, H.; BUZINA, R.;FIDANZA. Flavonoids intake and long term risk of coronary heart disease

- and cancer in the Seven Counties study. *Arch. Intern. Med.*, v.155, p.381-386, 1995.
- HOROWITZ, R.M.; GENTILI, B. Flavonoid constituents of *Citrus*. In: *Citrus Science and Technology*; NAGY, S.; SHAW, P.E.; VELDHUIS, M. AVI Publisher, Westport, CT 1977, v.1, p.397-426.
- HOZUMI, T.; YOSHIDA, M.; ISHIDA, Y.; MIMOTO, H.; SAWA, J.; DOI, K.; KAZUMI, T. Long - term effects of dietary fibre supplementation on serum glucose and lipoprotein levels in diabetic rats fed a high cholesterol diet. *Endocr. J.*, v.42, n.2, p.187-192, 1995.
- HSIU-CHING, H.; YUAN-THE, L.; MING-FONG, C. Effects of fish oil and vitamin E on the antioxidant defense system in diet-induced hypercholesterolemic rabbits. *Prostaglandins & Lipid Med.*, v.66, p.99-108, 2001.
- HUGHES, J.S. - Potencial contribution of dry bean dietary fiber to health. *Food Tech.*, v.9, p.122-126, 1991.
- HUIBREGTSE, K. - Non surgical therapeutic possibilities in hemorrhoidal disease. In: *Hemorrhoids: Current Concepts in Causation and Management*. London: Acad. Press., 1979, p.102-115.
- ISAKSSON, G.; LUNDQUIST, I.; IHSE, I. *In vitro* inhibition of pancreatic enzyme activities by dietary fiber. *Digestion*, v.24, p.54- 59, 1982 .
- ISMAIL, M.F.; GAD, M.Z.; HAMDY, MA.A. Study of the hypolipidemic properties of pectin, garlic and ginseng in hypercholesterolemic rabbits. *Pharmacol. Res.*, v.39, p.157-166, 1999.

- JUSTESEN, U.; KNUTHSEN, P.; LETH, T. Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverage by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *J. Chromatog. A.*, v.799, p.101-110, 1998.
- KHAN, A.R.; KHAN, G.Y.; MITCHEL, A.; QADEER, M.A. - Effect of guar gum on blood lipids. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.34, p.2446 - 2449, 1981.
- KINGMA, J.J.; SILVA, J.N.; SANTOS, H.F.T. - Constipação, fibra alimentar e fecaloma. In DANI, R.; CASTRO, L.P. - *Gastroenterologia Clínica*, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993.
- KISHIDA, T.; NOGAMI, H.; OGAWA, H.; EBIHARA, K. -The hypocholesterolemic effect of high amylose cornstarch in rats is mediated by an enlarged bile acid pool and increased fecal bile acid excretion, not by cecal fermented products. *J. Nutr.*, v.132, p.2519-2525, 2002.
- KONO, Y.; FRIDOVICH, I. Superoxide radical inhibits catalase. *J. Biol. Chem.*, v.257, n.10, p.5751-5754, 1982.
- KRITCHEVSKY, D. - Physiological and metabolical effects of dietary fiber. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v.180, p.407-498, 1985.
- KURATA, M.; SUZUKI, M.; AGAR, N.S. Antioxidant systems and erythrocyte life-span in mammals. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.106B, p.477-487, 1993.
- LAJOLO, F.M.; MENEZES, E.W.; FILISETTI-COZZI, T.M.C.C - Considerações sobre carboidratos e fibras. *Arch. Latinoam. Nutr.*, v.38, p.519-542, 1988.

- LATTO, C. - Practical experiences. In: HEATON, H.W. ed. *Dietary Fiber: Current developments on Improvement to health*. London: Newman Publishing, 1978, p.151-157.
- LAVELLE, F.; MICHELSON, A.M.; DIMITRYEVIC, L. Biological protection by superoxide dismutase. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, v.55, n.2, p.350-357, 1973.
- LEDERER, J. - *O papel das fibras*. In: *Alimentação e Câncer*, 3^a ed. Ed. Manole Dois, 1990, p.199-206.
- LI, H.; FORSTERMANN, U. Nitric oxide in pathogenesis of vascular disease. *J. Pathol.*, v.190, p.244-254, 2000.
- LÓPEZ, G.; ROS, G.; RINCÓN, F.; PERIAGO, M.J.; MARTÍNEZ, C.; ORTUÑO, J. - Propriedades funcionales de la fibra dietética. Mecanismos de acción en el tracto gastrointestinal. *Arch. Lat. Am. Nutr.*, v.47, n.3, p.203-207, 1997.
- MA, L.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V - Review: Rheological properties of food gums and food gum mixtures. *Rev. Esp. Ciência Tec. Alimentos*, v.33, p.133-162, 1993.
- MAHFOUZ, M.M.; KUMMEROW, F.A. Cholesterol-rich diets have different effects on lipid peroxidation, cholesterol oxides, and antioxidant enzymes in rats and rabbits. *J. Nutr. Biochem.*, v.11, p.293-302, 2000.
- MANTHA, S.V.; PRASAD, M.; KALRA, J.; PRASAD, K. Antioxidant enzymes in hypercholesterolemia and effects of vitamin E in rabbits. *Atherosclerosis*, v.101, p.135-144, 1993.

- MARLETT, J.A. - Content and composition of dietary fiber in 117 frequently consumed foods. *J. Am. Diet. Assoc.*, v.92, n.2, p.175-186, 1992.
- MARTINEZ-VALVERDE, I.; PERIAGO, M.J.; ROS, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Arch. Latinoam. Nutr.*, v.50, p. 5-18, 2000.
- McBURNEY, M.I.; SAUER, W.C. - Fiber and large bowel energy absorption: Validation of the integrated ileostomy - fermentation model using pigs. *J. Nutr.*, v.123, n.4, p.721-727, 1993.
- MONRO, J.A. - Dietary fibre content and nutrient claims relative to the faecal bulking efficacy of breakfast cereals. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, v.11, p.274-284, 2002.
- MORICEAU, S.; BESSON, C.; LEVRAT, M.A.; MOUNDRAS, C.; REMESY, C.; MORAND, C.; DEMIGNE, C. - Cholesterol-lowering effects of guar gum: changes in bile acid pools and intestinal reabsorption. *Lipids*, v.35, p.437-444, 2000.
- NESS, A.R.; POWLES, J.W. Fruits and vegetables, and cardiovascular disease: a review. *Int. J. Epidemiol.*, v.26, p.1-13, 1997.
- O'DONNELL, V.B.; EISERICH, J.P.; CHUMLEY, P.H.; JABLONSKY, M.J.; KRISHINA, N.R.; KIRK, M.; BARBES, S.; DARLEY-USMAR, V.M.; FREEMAN, B.A. Nitration of unsaturated fatty acids by nitric oxide-derived reactive nitrogen species peroxynitrite, nitrous acid, nitrogen dioxide, and nitronium ion. *Chem. Res. Toxicol.*, v.12, p.83-92, 1999.

- OHARA, Y.; PETERSON, T.E.; HARRISON, D.G. Hypercholesterolemia increase endothelial superoxide anion production. *J. Clin. Invest.*, v.91, p.2546-2551, 1993.
- OLIVEIRA, S.P.; REYES, F.G.R.; SGARBIERI, V.C.; AREAS, M.A.; RAMALHO, A.C. - Nutritional attributes of sweer corn fibrous residue. *J. Agr. Food. Chem.*, v.39, p.740-743, 1991.
- PANZA, J.A.; CASINO, P.R.; KILCOYNE, C.M. Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension. *Circulation*, v.87, p.1468-1474, 1993.
- PAPAPETROPOULOS, A.; RUDIC, R.D.; SESSA, W.C. Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. *Cardiovascular Res.*, v.15, n.43, p.509-520, 1999.
- PASQUIER, B.; ARMAND, M.; CASTELAIN, C.; GUILLON, F.; BOREL, P.; LAIRON, D. Emulsification and lipolysis of triacylglycerols are altered by viscous soluble fiber in acid gastric medium in vitro - *Biochem. J.*, v.15; n.314, p.269-275, 1996.
- PINTO, W.J.; AREAS, M.A.; REYES, F.G.R. Óxido Nítrico e o sistema vascular: uma revisão. *Acta Científica - Biol. Saúde*, v.5, n.1, p.47-61, 2003.
- POMARE, E.W. EATON, K.W. - Alteration of bile salt metabolism by dietary fiber (bran) . *Brit. Med. Journal.*, v.4, p.262-264, 1973.
- POU, S.; POU, W.S.; BREDT, D.S.; SNYDER, S.H.; ROSEN, G.M. Generation ofsuperoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.*, v.267, p.24173-24176, 1992.

- PRASAD, K.; KALRA, J. Oxygen free radicals and hypercholesterolemic Atherosclerosis: effect of vitamin E. *Am. Heart.*, v.125, p.958-973, 1993.
- RAMIRES, J.A.F.; LAGE,S.;CESAR, L.A.M.; PILEGGI, F. - *Doença Coronária e Aterosclerose - Clínica, Terapia Intensiva , Emergências.* v.2., ed. Atheneu, 1998.
- READ, N.W.; EASTWOOD, M.A. - Gastro-intestinal Physiology and Function. In: SCHWEIZER, T.F.; EDWARDS, C.A. Dietary Fibre - A Component of Food. London: Springer-Verlag, 1992, p.103-112.
- REED, D.J. Glutathione: toxicology implications. *Ann. Ver. Pharmacol. Toxicol.*, v.30, p.603-631, 1990.
- RICUPERO, D.A.; POLIKS, C.F.; RISHIKOF, D.C.; KUANG, P.P.; GOKSTEIN, R.H. Apigenin decrease expression of the myofibroblast phenotype. *FEBS Lett.*, v.506, p.15-21, 2001.
- ROBERFROID, M. - Dietary fiber, inulin, and oligofructose: a review comparing their physiological effects. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v.33, p.103-148, 1993.
- ROSS, R. Atherosclerosis - an inflammatory. *N. Engl. J. Med.*, v.340, p.115-126, 1999.
- ROSS, R. The pathogenesis of atherosclerosis In: Braunwal heart disease: A *textbook of cardiovascular medicine*, 5th edition: 1997, p.1105-1125.
- SAKAKIBARA, H.; HONDA, Y.; NAKAGAWA, S.; ASHIDA, H.; KANAZAWA, K. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *Agr. Food. Chem.*, v.51, p.571-581, 2003.

- SARTORELLI, D.S.; FRANCO, L.J. Trends in diabetes mellitus in Brazil: the role of the nutritional transition. *Cad. Saúde Pública*, v.19 suppl., Rio de Janeiro , 2003.
- SCHENEEMAN, B.O. - Dietary fiber. A scientific status summary by the Institute of Food Technologists Expert Panel on food Safety & Nutrition. *Food Thech.*, p.133-139, 1989.
- SCHENEEMAN, B.O.; GALLAHER, D. - Effects of dietary fiber on digestive enzymes. In: SPILLER, G.A. *Handbook of dietary fiber in human nutrition*, CRC. Press: Boca Raton., 1986, p.305-312.
- SCHEPPACH, W.; WIGGNS, H. S.; HALLIDAY, D.; SELF, R.; HOWARD, J.; BRANCH, W. J.; SCHRENZMEIER, J.; CUMMINGS, J. H. - Effects of gut - derived acetate on glucose turnover in man. *Clinical Sci.*, v.75, p.363-368, 1988.
- SCHNEEMAN, B.O. - Gastrointestinal responses to dietary fiber. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v.270, p.37-42, 1990.
- SELVENDRAN, R.R.; VERNE, A.V.F.V. - The chemistry and properties of plant cell walls and dietary fiber. In: KRITCHEVSKY, D.; BONDIELD. C.; ANDERSON, J.W. ed. *Dietary Fiber, Chemistry, Physiology, and Health Effects*. New York: Plenum Press, 1990, p.1-14.
- SEMBRIES, S.; DONGOWSKI, G.; JACOBASCH, G.; MEHRLANDER, K.; WILL, F.; DIETRICH, H. - Effects of dietary fibre-rich juice colloids from apple pomace extraction juices on intestinal fermentation products and microbiota in rats. *Br. J. Nutr.*, v.90, p.607-615, 2003

- SHAH, N; ATALLAH, M.T.; MAHONEY, R.R.; PELLET, P.L. - Effect of dietary fiber components on fecal nitrogen excretion and protein utilization in growing rats. *J. Nutr.*, v.112, p.658-666, 1982.
- SHAHIDI, F.; NACZK, F. *Foods phenolis: Sources, chemistry, effects, application.* Tecnnomic, Publishing CO., INC, eds. Lancaster, Pensylvania, USA, 1995.
- SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic. Biol. Med.*, v.27, n.9, p.916-921, 1999.
- SIMON, E.; PAUL, J.L.; ATGER, V.; SIMON, A.; MOATTI, N. Erythrocyte antioxidant status in asymptomatic hypercholesterolemic men. *Atherosclerosis*. v.138, p.375-381, 1998.
- SIMONS, L.A.; GAYTS, S.; BALASUBRAMANIAM, S.; RUYS, J. - Long term treatment of hypercholesterolemia with a new palatable formulation of guar gum. *Atherosclerosis*, v.45, p.101-108, 1982.
- SLAVIN, J. - Dietary fiber: classification, chemical analyses, and food source. *J. Am. Diet., Assoc.*, v.87, p.1164-1171, 1987.
- STEINBERG, D.; WITZTUM, J.L. Lipoprotein, lipoprotein oxidation and atherosclerosis. In: CHIEN, K.R. *Molecular basis of cardiovascular disease.* Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1999, p.458-475.
- THEANDER, O.; WESTERLUND, E.; AMAN, P. - Structure and components of dietary fiber. *Cereal Foods World*, v.38, p.135-141, 1993.
- THIBAUT, J.F.; LAHAYE, M.; GUILLON, F. - Physico-chemical properties of food plant cell walls. In: Schweizer, T.F.; Edwards, C. A. - *Dietary fibre: A component of food.* New York: Springer Verlag, 1992, p. 21-39.

- THOMPSON, L.U. Antioxidants and hormone-mediated health benefits of whole grains. *Crit. Rev. Food Science Nutr.*, v.34, p.473-497, 1994.
- TOPPING, D.L. - Soluble fiber polysaccharides: Effects on plasma cholesterol and colonic fermentation, *Nutr. Rev.*, v.49, p.195-203, 1991.
- TROWELL, H. - Definitions of fibre (Letter). *Lancet*, v.1, p.503-517, 1974.
- TSIMIDOU, M. Polyphenols and quality of virgin olive oil in retrospect. *Ital. J. Food. Sci.*, v.2, p.99-116, 1998.
- VAHOUNY, G.V. - Dietary fiber, lipid metabolism, and atherosclerosis. *Fed. Proc.*, v.41, p.2801- 2806, 1982.
- VANE, J.R.; BORN, G.V.R.; WELZEL, D. *The endothelial cell in health and diseases*. Stuttgart: Schattauer, p.67-78, 1995.
- VAN-NIEUWENHOVEN, M.A.; KOVACS, E.M.; BRUMMER, R.J.; WESTERTERP-PLANTENGA, M.S.; BROUNS, F. - The effect of different dosages of guar gum on gastric emptying and small intestinal transit of a consumed semisolid meal. *J. Am. Coll. Nutr.*, v.20, p.87-91, 2001.
- VERRI, J.; FUSTER, V. - Mecanismos das Síndromes Isquêmicas Agudas e da Progressão da Aterosclerose Coronária. *Arq. Bras. Cardiol.*, v.68, n.6, p.461-467, 1997.
- VINSON, J.A.; DABBAGH, M.M.; SERRY, J.; JANG, J. Plant flavonoids, especially flavanols, are powerful antioxidants using an *in vitro* oxidation model for heart disease. *J. Agric. Food. Chem.*, v.43, p.2800, 1995.

- WARD, J.F.; BLAKELY, W.F.; JONER, E. Mammalian cells are not killed by DNA single-strand breaks caused by hydroxyl radical from hydrogen peroxide. *Radiat. Res.*, v.103, p.383-392, 1985.
- WAYNER, D.D.; BURTON, G.W.; INGOLD, K.U. The antioxidant efficiency of vitamin C is concentration-dependent. *Biochim. Biophys. Acta.*, v.29, p.119-123, 1986.
- WENDEL, A.; CIKRYT, P. The level and half-time of Glutathione in human plasma. *FEBS. Lett.*, v.120, n.2, p.209-211, 1980.
- WHO-MONICA project: Myocardial infarction and coronary deaths in the World Health Organization Monica Project: Registration procedures, event rates and case-fatality rates in 38 populations from 21 countries in four continents. *Circulation*, v.90, p.583, 1994.
- YOSHIDA, M.; SAWA, J.; HOZUMI, T.; MIMOTO, H.; ISHIDA, Y.; KAZUMI, T.; DOI, K. ; BABBA, S. - Effects of long-term high-fiber diet on macrovascular changes and lipid and glucose levels in STZ rats. *Diab. Res. Clin. Pathol.*, v.13, n.3, p.147-152, 1991.
- YU, L.L.; PERRET, J. -Effects of xylanase treatments on gelling and water-uptaking properties of psyllium. *J.Agric. Food Chem.*, v.51, p.492-495, 2003.
- ZAYAS, R.M.; QAZI, S.; MORTON, D.B.; TRIMMER, B.A. Neuron involved in nitric oxide-mediated cGMP signaling in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J. Comp. Neurol.*, v.419, n.4, p.422-438, 2000.

CAPÍTULO II

THE INFLUENCE OF DIETARY FIBER ON THE ANTIOXIDANT STATUS OF HIPERCHOLESTEROLEMIC HAMSTERS

Silvana Maria Guida-Cardoso¹, Wagner J. Pinto¹, Graziela R. Stoppa², Satie H. Ogo²,
Félix G. R. Reyes³, Miguel Arcanjo Areas¹

¹Departamento de Fisiologia e Biofísica, ² Departamento de Bioquímica, ³Faculdade de
Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), SP, Brasil

(Artigo publicado na revista *ALIMENTARIA Revista de Tecnologia e Higiene de los
Alimentos*, 354: 121-124 – junho/2004)

THE INFLUENCE OF DIETARY FIBER ON THE ANTIOXIDANT STATUS OF HYPERCHOLESTEROLEMIC HAMSTERS

Silvana M. Guida-Cardoso¹, Wagner J. Pinto¹, Graziela R. Stoppa², Satie H. Ogo², Felix G. R. Reyes³ y Miguel A. Areas¹

SUMMARY

The influence of a hypercholesterolemic diet with or without orange pulp on the activity of antioxidant enzymes was investigated in hamsters. The animals were divided into three groups (n = 8 each): Group I: hamsters receiving a control diet, Group II: hamsters on a hypercholesterolemic diet of 20 g of cholesterol/kg and Group III: hamsters on a hypercholesterolemic diet containing 20% orange pulp. Plasma cholesterol concentrations were determined by an enzymatic method. Erythrocyte superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT) and glutathione reductase (GR) activities and glutathione (GSH) levels were determined spectrophotometrically. The hypercholesterolemic diet significantly increased ($p < 0.05$) the total plasma cholesterol levels, and the SOD, GSH-Px, CAT and GR activities without affecting the GSH levels. The presence of orange pulp significantly reduced ($p < 0.05$) total plasma cholesterol levels and enzyme activities. These results indicate that the imbalance between free radical production and destruction in favor of prooxidant conditions in hypercholesterolemic hamsters can be reverted by orange pulp.

Key words: dietary fiber; orange pulp; cholesterol; antioxidant status.

RESUMEN

La influencia de la dieta hipercolesterolémica, en la presencia y ausencia de pulpa de naranja, en la actividad de enzimas antioxidantes fue estudiada en hámster. Los animales fueron divididos en tres grupos (n=8 cada): Grupo I: hámster que recibieron dieta control, Grupo II: hámster en dieta hipercolesterolémica con contenido de 20 g de colesterol/kg y Grupo III: hámster en dieta hipercolesterolémica conteniendo 20 % de pulpa de naranja. Las concentraciones de colesterol plasmático fueron determinadas por método enzimático. Las actividades de las enzimas superóxido dismutasa eritrocitaria (SOD), Glutathion peroxidasa (GSH-Px), catalasa (CAT) y glutathion reductasa (GR) y los niveles de glutathion (GSH) fueron determinados espectrofotométricamente. La dieta hipercolesterolémica aumentó significativamente ($p < 0,05$) los niveles plasmáticos de colesterol total, así como la actividad de las enzimas SOD, GSH-Px, CAT y GR sin afectar los niveles de GSH. La presencia de pulpa de naranja redujo significativamente ($p < 0,05$) los niveles de colesterol plasmático total y las actividades enzimáticas. Los resultados indican que el desequilibrio entre la producción y la destrucción de radicales libres en favor de las condiciones prooxidantes en hámster hipercolesterolémico puede ser revertida por la pulpa de naranja.

Palabras clave: fibra dietética, pulpa de naranja, colesterol, estatus antioxidante.

1. INTRODUCTION

Atherosclerosis is one of the major causes of morbidity, disability and premature mortality in industrialized countries. The oxidative hypothesis postulates that the presence and accumulation of oxidized low-density lipoprotein (LDL) in the subendothelium initiates a cascade of events that can culminate in the development of an atheroma (1, 2).

Hypercholesterolemia is a major risk factor for atherosclerosis and coronary heart disease (CHD) since it increases the levels of reactive oxygen species (ROS) and H_2O_2 . This can, in turn, lead to localized oxidative stress when LDL from the plasma enters the vessel wall in this region and undergoes lipid peroxidation. Peroxidation damages membrane lipids and proteins (3, 4). Under physiological conditions, the body generally has sufficient antioxidant reserves to cope with the production of ROS. This system of protection consists of antioxidant vitamins (vitamins E and C), glutathione (GSH) and antioxidant enzymes such as catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px), gluta-

thione reductase (GR) and superoxide dismutase (SOD) (5, 6). Thus the antioxidant defense systems maintain the homeostasis necessary for normal cell functions and normally protect the tissue from oxidant injury (7). The increase in ROS in hypercholesterolemia may result from their overproduction or from a decrease in the activity of ROS metabolizing enzymes (SOD, CAT, GSH-Px) (8, 9). For most hypocholesterolemic drugs to be effective, they must be used for several weeks. This prolonged treatment may expose the patients to several side effects, especially liver injury. Thus, the study of natural products for use in the treatment of a wide range of diseases, including heart

¹ Department of Physiology, State University of Campinas, São Paulo, Brazil.

² Department of Biochemistry, State University of Campinas, São Paulo, Brazil.

³ Department of Food Science, State University of Campinas, São Paulo, Brazil. E-mail: reyesfgr@fea.unicamp.br

disease, has gained considerable attention (10).

Much attention has been focused on the potential antiatherosclerotic effects of diet components (11). For example, epidemiological evidence supports a protective action of dietary antioxidants such as α -tocopherol and ascorbic acid against atherosclerosis and its associated vascular dysfunctions (12, 13). Wiseman (14) showed that flavonoids, isoflavonoids and organosulfur compounds protect LDL against oxidation in vitro. Over the past 20 years, numerous studies have examined the association between dietary fiber intake and the risk of cardiovascular disease and have concluded that there is a negative relationship between these two factors (15). Thus dietary fiber, especially soluble viscous fibers, effectively decrease serum cholesterol levels and this may contribute to their protective role against CHD (16, 17).

Recent approaches to the development of products with increased dietary benefits based on citrus peel have emphasized not only the recovery of carbohydrates and pectin (18) but also the production of potentially important secondary metabolites, such as polyphenols (19). Polyphenols constitute a complex group of substances (coumarins, xanthenes, stilbenes, flavonoids, lignans, tannins etc.), with a basic structure derived from benzoic and cinnamic acids and flavones (20). The most important therapeutic property of polyphenols is their antioxidant activity (21).

In this study, we investigated the effects of orange pulp on the plasma levels of total cholesterol and on the activities of antioxidant enzymes, as well as the GSH content of the erythrocytes. Orange pulp consists of vesicles that store the juice and membranes that separate the vesicles into buds. Orange pulp contains insoluble and soluble fibers, of which 55% are pectic substances, 36% is cellulose and 9% is hemicellulose and lignin.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Animals

Two week-old male Golden hamsters were housed at a constant temperature

on a 12 h light/dark cycle and were provided with rodent chow and water ad libitum for two weeks prior to use. The hamsters were divided into three groups of eight. The animals in Group I were fed a control diet (22), Group II received a hypercholesterolemic diet (20 g of cholesterol/kg) and Group III was fed the hypercholesterolemic diet containing 20% orange pulp.

After one month, the hamsters were killed with an overdose of sodium pentobarbital and blood samples were collected for analysis. All experiments involving animals were approved by the Institute of Biology Ethics Committee, State University of Campinas (São Paulo, Brazil).

2.2. Plasma cholesterol levels

Plasma cholesterol levels were determined enzymatically (Kit-E-CELM) (23).

2.3. Preparation of erythrocyte lysates

Heparinised blood samples were obtained by cardiac puncture. After centrifugation at 2,500 g for 5 min, the plasma was removed and the erythrocytes were washed three times in 5 ml of sterile 0.9% (w/v) NaCl solution. The cells were then lysed by diluting four-fold with distilled water followed by centrifugation to remove cellular debris. The concentration of hemoglobin (Hb) was determined by the Drabkin method (24).

2.3.1. GSH contents

GSH concentrations were determined according to the method of Beutler (25) using metaphosphoric acid for protein precipitation and 5'5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid for color development.

2.3.2. SOD activity

SOD activity was assayed based on the reduction of nitro blue tetrazolium (NBT) by superoxide anions generated through the hypoxanthine (HPX)/xanthine oxidase (XO) system at 37 °C (25).

2.3.3. CAT activity

CAT activity was assayed by monitoring the decrease in absorbance at 230 nm (25).

2.3.4. GSH-Px activity

GSH-Px activity was determined by following the reduction of oxidized glutathione (GSSG) by GR using NADPH as the reducer (25).

2.3.5. GR activity

The activity of this enzyme was measured spectrophotometrically at 340 nm by following the oxidation of NADPH (25).

2.4. Data analysis

All experiments were done at least in triplicate using RBC from eight hamsters. The results were expressed as the mean $\pm$ SEM and were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey test. P-values < 0.05 were considered to indicate significant difference. The GraphPad Prism statistical software was used for calculations.

3. RESULTS

The total plasma cholesterol concentrations and the erythrocyte SOD, GSH-Px, CAT, GR and GSH levels of the different groups of hamsters are shown in table 1. The hypercholesterolemic diet (group II) significantly increased the total plasma cholesterol level and the activities of SOD, GSH-Px, CAT and GR, whereas no change was observed in GSH when compared with group I (control diet). Orange pulp (group III) significantly reduced the total plasma cholesterol concentration and the SOD, GSH-Px, CAT and GR activities in hypercholesterolemic hamsters (group II). Again, there was no effect on GSH levels.

4. DISCUSSION

The aim of this study was to investi-

TABLE 1
Plasma cholesterol levels and erythrocyte enzyme activities in control and hypercholesterolemic hamsters

	Control (Group I, n = 8)	Hypercholesterolemic (Group II, n = 8)	Hypercholesterolemic + orange pulp (Group III, n = 8)
Cholesterol(mg/dL)	112 ± 4.20	216 ± 6.1a*	152 ± 3.2b*
GSH (mg/g Hb)	0.094 ± 0.01	0.087 ± 0.06	0.092 ± 0.01
SOD (mg/l)	21.2 ± 1.83	28.3 ± 4.17a*	23.0 ± 2.86b*
GSH-Px (IU/g Hb)	245.3 ± 30.48	768.4 ± 87.84a*	515.6 ± 136.6b*
CAT (IU/g Hb)	28.0 ± 4.17	61.1 ± 10.72a*	48.47 ± 5.0 b*
GR (IU/g Hb)	10.25 ± 3.52	41.36 ± 9.04a*	20.80 ± 7.61b*

* p< 0.05 for a group II vs Group I and b Group II vs Group III.

gate the effect of orange pulp on total plasma cholesterol levels and on erythrocyte GSH levels and antioxidant enzyme activities in hamsters fed a hypercholesterolemic diet. The dose of cholesterol used here was similar to that used by others (10). The hypercholesterolemic diet (group II) increased the plasma cholesterol levels compared to those of the control diet (group I), in agreement with other reports (26). The presence of orange pulp in the hypercholesterolemic diet (group III) reduced the cholesterol levels.

The protective action of orange pulp against hypercholesterolemia may be related principally to its soluble fraction which absorbs cholesterol by binding to bile acids (27). The interaction of bile acids with soluble fibers increases bile acid secretion and reduces their reabsorption by the liver. This increases the rate of cholesterol catabolism at the expense of bile acid biosynthesis (28).

Many studies have indicated that elevated plasma cholesterol concentrations may modify the biochemical properties of blood components and the arterial intima, thereby enhancing atherogenesis (29). As shown here, high cholesterol levels increased the antioxidant enzyme activities. The increase in these enzyme activities in the blood of cholesterol-fed hamsters could be the result of oxidative stress.

GSH protects protein sulfhydryl groups and detoxifies substances, including xenobiotics, metals, hydrogen peroxide and oxygen radicals (30). The antioxidant defense system counteracts the toxic activity of free radicals and peroxides (31) and an elevation in GSH-Px activity is commonly associated with an increase in oxidative stress

(32). An increase in oxygen radicals during hypercholesterolemia could increase GSH-Px activity which would in turn protect SOD against inactivation by H_2O_2 (33).

On the other hand, different forms of oxidative stress may increase SOD, CAT and GSH-Px activities (34). An increase in SOD activity would protect CAT and GSH-Px against inactivation by O_2^- . The net effect would be an increase in CAT and GSH-Px activities, since O_2^- inactivates CAT (35) and GSH-Px (36).

Maral et al. (37), investigated the O_2^- and H_2O_2 scavenging systems in erythrocytes of several species and observed that while SOD may be constitutively present only at low levels, this enzyme is highly inducible under oxidative stress, in contrast to GSH-Px, which is normally abundant and less inducible. Therefore, the increase in the SOD activity in response to cholesterol indirectly demonstrates the prooxidant action of cholesterol.

Hsiu-Ching et al. (38) showed that rabbits fed a high fat and cholesterol-enriched diet had decreased blood GSH levels and lower plasma GSH-Px, CAT and GR activities. However, Simon et al. (39) reported limited variation in the SOD and GSH-Px activities of asymptomatic hypercholesterolemic men. Erdinçler et al. (40) found increases in SOD activity and GSH levels in rat erythrocytes and Henriksson et al. (41) reported increased CAT and GSH-Px activities in the aortic tissue of cholesterol-fed rabbits. Our findings agree with Henriksson et al. (41) and suggest that these alterations may be a compensatory response to oxidative stress.

The levels of GSH were unchanged

in all groups. In contrast, Xin et al. (42) showed that the total GSH content in hypercholesterolemic rabbits was significantly decreased. Our results may reflect the increased activity of GR which transfers the reducing equivalent from reduced nicotinamide phosphate (NADPH) to regenerate intracellular supplies of GSH (32) following use of the latter as a co-factor by GSH-Px in the breakdown of H_2O_2 . Orange pulp reduced the enzyme activities in the erythrocytes from hypercholesterolemic hamsters. This protective effect may be related to the decrease in oxidative stress in response to low cholesterol levels. The protection may be enhanced by a direct physical action of the pulp in the gastrointestinal tract and, possibly, by the presence of polyphenols in orange pulp.

REFERENCES

1. Keaney, Jr.; Vita, J.F. (1995). Atherosclerosis, oxidative stress and antioxidant protection in endothelium-derived relaxing factor action. *Progress Cardiovasc Diseases*, 2, 129-154.
2. Meagher, E.; Rader, D.J. (2001). Antioxidant therapy and atherosclerosis: animal and human studies. *Trends Cardiovasc Med.*, 11, 162-165.
3. Mantha, S.V. (1999). Mediation of L-arginine-induced retardation of hypercholesterolemic atherosclerosis in rabbit by antioxidant mechanisms. *Nut Res*, 19, 1529-1539.
4. Lopez, F.A.; Casado, S. (2001). Heart failure, redox alterations, and endothelial dysfunction. *Hypertension*, 38, 1400-1405.
5. Machlin, L.J.; Bendich, A. (1987). Free radicals tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J.*, 1, 441-445.
6. Maytin, M.; Leopold, J.; Loscalzo, J. (1999). Oxidant stress in the vasculature. *Curr Atheroscler*, 1, 156-164.
7. Travacio, M.; Lleusy, S. (1996). Antioxidant enzymes and their modification under oxidative stress condition. *Free Radic Res Lat Am*, 48, 132-141.
8. Prasad, K.; Kalra, J. (1992). Free radicals and hypercholesterolemic atherosclerosis: effects of vitamin E. *Am Heart J*, 125, 958.
9. Schettler, V.; Methe, H.; Staschinsky, D.; Schuff-Werner, P.; Muller, G.A. (1999). Wieland E. Review: the oxidant/antioxidant balance during regular low density lipoprotein apheresis. *Ther Apher*, 3, 219-226.

10. Ismail, M.F.; Gad, M.Z.; Hamdy, M.A. (1999). Study of the hypolipidemic properties of pectin, garlic and ginseng in hypercholesterolemic rabbit. *Pharmacol Res*, 39, 157-166.
11. Wiseman, H.; O'Reilly, J.D.; Adlercreutz, H.; Mallet, A.I.; Bowey, E.A.; Rowland, I.R.; Sanders, T.A. (2000). Isoflavone phytoestrogens consumed in soy decrease F(2)-isoprostane concentrations and increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in human. *Am J Clin Nutr*, 72, 395-400.
12. Giugliano, D. (2000). Dietary antioxidants for cardiovascular prevention. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 10, 38-44.
13. Carr, A.C.; Zhu, B.Z.; Frei, B. (2000). Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and alpha-tocopherol (vitamin E). *Circ Res*, 87, 349-354.
14. Wiseman, H. (1996). Dietary influences on membrane function: importance in protection against oxidative damage and disease. *J Nutr Biochem*, 7, 2-15.
15. Anderson, J.W.; Hanna, T.J. (1999). Impact of nondigestible carbohydrates on serum lipoproteins and risk for cardiovascular disease. *J Nutr*, 129, 1457S-1466S.
16. Anderson, J.W.; Deakins, D.A.; Floore, T.L.; Smith, B.M.; Whitis, S.E. (1990). Dietary fiber and coronary heart disease. *Crit Rev Food Sci*, 29, 95-147.
17. Fernandez, M.L. (2001). Soluble fiber and nondigestible carbohydrate effects on plasma lipids and cardiovascular risk. *Curr Opin Lipidol*, 12, 35-40.
18. Baker, R.A. (1994). Potential dietary benefits of citrus pectin and fiber. *Food Technol*, 48, 133-139.
19. Manthey, J.A.; Grohmann, K. (1996). Concentration of hesperidin and other orange peel flavonoids in citrus processing byproducts. *J Agric Food Chem*, 44, 811-814.
20. Saura-Calixto, F.; Bravo, L. (1995). Determination of polyphenolic compounds associated with dietary fibre. In *Metabolic and Physiological Aspects of Dietary Fibre*. European Commission Denmark, 87-92.
21. Larrauri, J.A.; Rupérez, P.; Bravo, L.; Saura-Calixto, F. (1996). High dietary fibre powders from orange and lime peels: associated polyphenols and antioxidant capacity. *Food Res Internat*, 29, 757-762.
22. Reeves, P.G.; Nielsen, F.H.; Fahey, G.C.J. (1993). AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. *Am J Nutr*, 1939-1951.
23. Henry, R.J.; Cannon, D.C.; Winkelman, J. (1974). Enzymatic methods. In: Henry, R.J. (Ed.). *Clinical Chemistry Principles and Techniques*, 2nd Ed. New York, Harper & Row, p. 168.
24. Winterbourn, C.C. (1990). Oxidative reactions of hemoglobin. *Methods Enzymol*, 186, 265-72.
25. Beutler, R. (1975). *Red Cell Metabolism: a Manual of Biochemical Methods*. London: Academic Press.
26. Mantha, S.V.; Marion, P.; Kalra, J.; Prasada, K. (1993). Antioxidant enzymes in hypercholesterolemia and effects of vitamin E in rabbits. *Ather*, 101, 135-144.
27. Kritchevsky, D. (1978). Fiber, lipids and atherosclerosis. *Am J Clin Nutr*, 31, S65-S74.
28. Vahouny, G.V.; Tombes, R.; Cassid, M.M. (1980). Dietary Fibers: binding of bile salts, phospholipids and cholesterol from mixed micelles by bile acid sequestrants and dietary fibers. *Lipids*, 15, 1012.
29. Chen, M.F.; Hsu, H.C.; Lee, Y.T. (1994). Effect of acute exercise on the changes of lipid profiles and peroxides, prostanooids and platelet activation in hypercholesterolemic patients before and after treatment. *Prostaglandins*, 48, 157-174.
30. Byung, P.Y.U. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*, 14, 139-162.
31. Kuralay, F.; Akarca, U.S.; Ozutemiz, A.O.; Kutay, F.; Batur, Y. (1998). Possible role of glutathione in prevention of acetaminophen-induced hepatotoxicity enhanced by fish oil in male Wistar rats. *J Toxicol Environ Health*, 53, 223-229.
32. Frank, L. (1980) Messara D. Oxygen toxicity. *Am J Med.*, 69-117.
33. Bray, R.C.; Cockle, S.A.; Martin-Fiel-den, E.; Roberts, P.B.; Rotilio, G.; Calabrese, L. (1974). Reduction and inactivation of superoxide dismutase by hydrogen peroxide. *Biochem J*, 139-143.
34. Shull, S.; Heintz, N.H.; Periasamy, M.; Manohar, M.; Janssen, Y.M.; Marsh, J.P.; Mossman, B.T. (1991). Differential regulation of antioxidant enzymes in response to oxidants. *J Biol Chem*, 266, 24398-24403.
35. Kono, Y.; Fridovich, I. (1982). Inhibition and reactivation of Mn-catalase. *J Biol Chem*, 257, 5751.
36. Blum, J.; Fridovich, I. (1985) Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide dismutase radicals. *Arch Biochem Biophys*, 240: 500-504.
37. Maral, J.; Puget, K.; Michelson, A.M. (1977). Comparative study of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in erythrocytes of different animals. *Biochem. Biophys. Res Commun*, 77, 1525-1535.
38. Hsiu-Ching, H.; Yuan-Teh L.; Ming-Fong, C. (2001). Effects of fish oil and vitamin E on the antioxidant defense system in diet-induced hypercholesterolemic rabbits. *Prostaglandins & Other Lipid Mediat*, 66, 99-108.
39. Simon, E.; Paul, J.L.; Atger, V.; Simon, A.; Moatti, N. (1998). Erythrocyte antioxidant status in asymptomatic hypercholesterolemic men. *Atherosclerosis*, 138, 375-381.
40. Erdinçler, D.J.; Seven, A.; Inci, F.; Berger, T.; Candan, G. (1997). Lipid peroxidation and antioxidant status in experimental animals. Effects of aging and hypercholesterolemic diets. *Clin Chim Acta*, 265: 77-84.
41. Henriksson, P.; Bergström, K.; Edhag, O. (1985) Experimental atherosclerosis and a possible generation of free radicals. *Thromb Res.*, 38, 195.
42. Xin, L.M.; Lopez, B.L.; Liu, G.L.; Christopher, T.A.; Gao, Guo, Y.; Feuerstein, G.Z.; Ruffolo, R.R.; Barone, F.C.; Yue, T.L. (1997). Hypercholesterolemia impairs a detoxification mechanism against peroxynitrite and renders the vascular tissue more susceptible to oxidative injury. *Cir Res*, 80, 894-901.

CAPÍTULO III

DIETARY FIBER REDUCES LIPID PEROXIDATION AND MEAN ARTERIAL BLOOD PRESSURE IN HYPERCHOLESTEROLEMIC HAMSTERS

Silvana M. Guida-Cardoso¹, Wagner J. Pinto¹, Satie H. Ogo², Felix G.R. Reyes³, Miguel A. Areas¹.

¹Departamento de Fisiologia e Biofísica, ² Departamento de Bioquímica , ³Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), SP, Brasil.

(Artigo aceito para publicação na revista *ALIMENTARIA Revista de Tecnologia e Higiene de los Alimentos*)

EYPASA

C/Sandoval, 12 - 1º J (28010-Madrid)

Telf: 914469659 - 914469601 - 914469858 / Fax: 915933744

e-mail: eypasa@retemail.es

FELIX G.R. REYES

DEPARTAMENTO DE CIENCIA DE ALIMENTOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPIÑAS

CAIXA POSTAL 6121

13.083.970 – CAMPIÑAS, SP

(BRASIL)

D.CARLOS BARROS SANTOS, Consejero Delegado de la revista ALIMENTARIA de Tecnología e Higiene de los Alimentos. **CERTIFICA** que se ha recibido para su publicación, y aceptado en tal sentido el artículo titulado: **“DIETARY FIBER REDUCES LIPID PEROXIDATION AND MEAN ARTERIAL BLOOD PRESSURE IN HYPERCHOLESTEROLEMIC HAMSTERS”**. Los autores son: Silvana M. Guida-Cardoso, Wagner J. Pinto,. Satie H. Ogo, Felix R.G. Reyes y Miguel A. Areas.

Madrid, 28 de Junio del 2004

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Carlos Barros Santos', with a long horizontal line underneath.

DIETARY FIBER REDUCES LIPID PEROXIDATION AND MEAN ARTERIAL BLOOD PRESSURE IN HYPERCHOLESTEROLEMIC HAMSTERS

Silvana M. Guida-Cardoso¹, Wagner J. Pinto¹, Satie H. Ogo², Felix G.R. Reyes³, Miguel A. Areas¹

RESUMEN

Se estudió la hipercolesterolemia inducida y su modulación por parte de la pulpa de naranja, un suplemento dietético natural, en hámsters alimentados con una dieta hipercolesterolémica. Los hámsters fueron divididos en tres grupos (n=8/grupo): Grupo I: hámsters alimentados con una dieta control, Grupo II: hámsters en dieta hipercolesterolémica (20 g de colesterol/kg) y Grupo III: hámsters en dieta hipercolesterolémica con contenido de 20% de pulpa de naranja. La peroxidación de los lípidos plasmáticos, determinada como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), las concentraciones plasmáticas de triglicéridos (TG), colesterol total, VLDL+LDL- y HDL-colesterol fueron determinadas por métodos enzimáticos. La presión arterial media (MAPA) se determinó en hámsters anestesiados con pentobarbital. La pulpa de naranja redujo la MAPA en 11%, los niveles de peroxidación lipídica en 42%, triglicéridos en 42%, VLDL+LDL en 70%, el colesterol total en 29% y aumentó el HDL en 18% en relación a los hámsters hipercolesterolémicos que no fueron alimentados con la pulpa. Estos resultados indican que la pulpa de naranja ejerció un papel de protección contra la hipercolesterolemia en hámster.

Palabras clave: pulpa de naranja, fibra dietética, hipercolesterolemia, hipertensión, peroxidación lipídica.

ABSTRACT

Induced hypercholesterolemia and its modulation by orange pulp, a natural dietary supplement, were studied in hamsters fed a hypercholesterolemic diet. The hamsters were divided into three groups (n=8/group): Group I: fed a control diet, Group II: hamsters on a hypercholesterolemic diet (20 g of cholesterol/kg), and Group III: fed a hypercholesterolemic diet containing 20% orange pulp. Lipid peroxidation of erythrocytes, determined as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), triglycerides (TG), total plasma cholesterol and plasma VLDL+LDL- and HDL-cholesterol concentrations were determined by enzymatic methods. The mean arterial blood pressure (MAP) was determined in pentobarbital anaesthetized hamsters. Orange pulp reduced the MAP by 11%, the levels of lipid peroxidation by 42%, triglycerides by 42%, VLDL+LDL by 70% and total cholesterol by 29%, and increased the HDL by 18% as compared to hypercholesterolemic hamsters not fed the pulp. These results indicated that the orange pulp exerted a protective role against hypercholesterolemia in hamsters.

Key words: orange pulp, dietary fiber, hypercholesterolemia, hypertension, lipid peroxidation

¹Department of Physiology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

²Department of Biochemistry, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

³Department of Food Science, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

E-mail: reyesfgr@fea.unicamp.br

INTRODUCTION

Atherosclerotic cardiovascular diseases, including hypertension, are the most common cause of mortality in Western countries, accounting for about 40% of all deaths (American Heart Association, 2000).

Hypercholesterolemia is a significant cardiovascular risk factor because cholesterol, one of the main factors in the genesis of atherosclerosis, exerts a prooxidant effect. In hypercholesterolemia, there is an increase in the cholesterol content of erythrocytes, platelets, polymorphonuclear leucocytes and endothelial cells. This increase leads to enhanced production of oxygen free radicals (Kok et al., 1991) that play an important role in the pathogenesis of atherosclerosis, mainly by oxidizing low-density lipoprotein (LDL) and generating species that can react with oxygen in the vascular wall (Witztum, 1987).

For most cholesterol lowering drugs to be effective, they must be used for several weeks. This may expose the patient to various side effects, especially liver injury. As an alternative, the usefulness of products of plant origin for the treatment of a wide range of diseases has received considerable attention (Ismail et al., 1999). Over the past 20 years, numerous studies have examined the association between dietary fiber intake and the risk of cardiovascular diseases and have concluded that there is a negative relationship between these two factors (Anderson & Hanna, 1999). Thus dietary fiber, especially soluble fibers, decreases the serum cholesterol levels and this may contribute to its protective role against heart disease (Fernandez, 2001).

The aim of this study was to investigate the effect of orange pulp on total plasma cholesterol, plasma triglycerides, total serum HDL- and VLDL+LDL-cholesterol concentrations, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) of erythrocytes and mean arterial blood pressure, in hamsters fed a hypercholesterolemic diet.

MATERIAL AND METHODS

Orange pulp

The orange pulp (OP) used as a source of fibers in this study consisted of the vesicles that stored the juice and the membranes that separated the vesicles into buds. Orange pulp contains soluble and insoluble fibers, of which 55% consist of pectin and its derivatives, 36% of cellulose and 9% of hemicellulose and lignin. The hydration capacity of the pulp was 16.3 g of water/g of dry matter and the viscosity was 4.5 cP (centipoise). The viscosity was measured using a model DV III LV Brookfield Viscometer with an SC4-18 spindle operated at 36 °C and 30 rpm.

Animals

Two-week-old male *Golden sirius* hamsters were housed at a constant temperature on a 12 h light/dark cycle and were provided with rodent chow and water *ad libitum* for two weeks prior to use. The hamsters were divided into three groups of eight animals each. Group I was fed a control diet (Reeves et al, 1993), group II received a hypercholesterolemic diet (20 g of cholesterol/kg of diet) and

group III was fed the hypercholesterolemic diet containing 20% orange pulp. The cholesterol dose used here was similar to that used by others (Ismail et al., 1999). After one month, the hamsters were killed with an overdose of sodium pentobarbital and blood samples were collected for analysis. All of the animal experiments were approved by the Institutional Ethics Committee for Animal Experimentation.

Mean arterial blood pressure (MAP)

One day before the end of the experiments, the hamsters were anaesthetized with pentobarbital (60 mg/Kg body weight) to determine the mean arterial blood pressure. The right common carotid was cannulated with PE10 tubing connected to an arterial blood pressure transducer (P23 Db Gould Statham). The MAP values were recorded on a polygraph of 4 channels (Hewlett Packard).

Plasma cholesterol, total VLDL+LDL- and HDL-cholesterol and triglycerides concentrations.

The plasma cholesterol and triglyceride levels were determined enzymatically using commercial kits (Kit-E-CELM) (Henry et al., 1974).

Lipid peroxidation

The lipid peroxidation of erythrocytes was assessed as previously described (Stocks & Dormandy, 1971). The experiments were done using a suspension of cells containing 1 mM hemoglobin (Hb) in the presence of (0.1-2 mM) t-BOOH.

After 30 min at 37°C, 500 µL of 25% trichloroacetic acid (TCA) was added to 1 mL of suspension and the mixture was then centrifuged at 1100 g for 5 min. To 1 mL of the resulting supernatant, 1 mL of 1% 2-thiobarbituric acid (TBARS) in 0.05 M NaOH was added, followed by boiling for 15 min. The formation of TBA-reactive substances (TBARS) was used as measure of lipid peroxidation. The TBARS concentration was determined using an ϵ of 516 mM⁻¹ cm⁻¹ at 532 nm.

Data analysis

The results were expressed as the mean $\pm$ SEM and were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test. A value of $p < 0.05$ indicated significance. All statistical calculations were done using GraphPad Prism software (version 2.01).

RESULTS

The plasma triglycerides and serum total cholesterol, HDL- and VLDL+LDL-cholesterol concentrations, as well as the levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) of erythrocytes, are shown in table 1. The hypercholesterolemic diet (group II) showed a significant increase in the plasma triglycerides (TG), the serum total and VLDL+LDL-cholesterol and the TBARS when compared to hamsters fed the control diet (group I). Orange pulp (group III) significantly reduced the plasma TG, serum total and VLDL+LDL-cholesterol and

TBARS concentrations, but increased HDL, when compared to hypercholesterolemic hamsters (group II).

Table 1 - Plasma triglycerides, plasma lipids and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in hamsters fed a normal diet (group I), a hypercholesterolemic diet (group II) and a hypercholesterolemic diet enriched with 20% of orange pulp (group III).

Parameters	Group I	Group II	Group III
Plasma TG (mg/dL)	74.3 ± 4.2	153.0± 6.4 ^{*a}	88.0 ±6.5 ^{*b}
Total cholesterol (mg/dL)	112 ± 4.2	216 ± 6.1 ^{*a}	152 ± 3.2 ^{*b}
VLDL+LDL- cholesterol (mg/dL)	35.6 ± 11.2	104.8±12.5 ^{*a}	31.3 ±9.8 ^{*b}
HDL-cholesterol (mg/dL)	81.2 ± 4.6	69.6± 6.2 ^{*a}	85.1±10.0 ^{*b}
TBARS (nmol/g Hb)	5.1 ±0.4	9.9±1.0 ^{*a}	5.7±0.4 ^{*b}

The results are expressed as the mean ± SD of eight hamsters per group.

*p< 0.05 for ^a Group II vs Group I and ^b Group II vs Group III

The mean arterial blood pressure (MAP) values are shown in figure 1. The hypercholesterolemic diet (group II) significantly increased this MAP values when

compared to hamsters fed the normal diet (group I). Orange pulp (group III) significantly reduced MAP when compared to hypercholesterolemic hamsters (group II). This parameter was not significantly different between control hamsters (group I) and hypercholesterolemic hamsters fed 20% of orange pulp (group III).

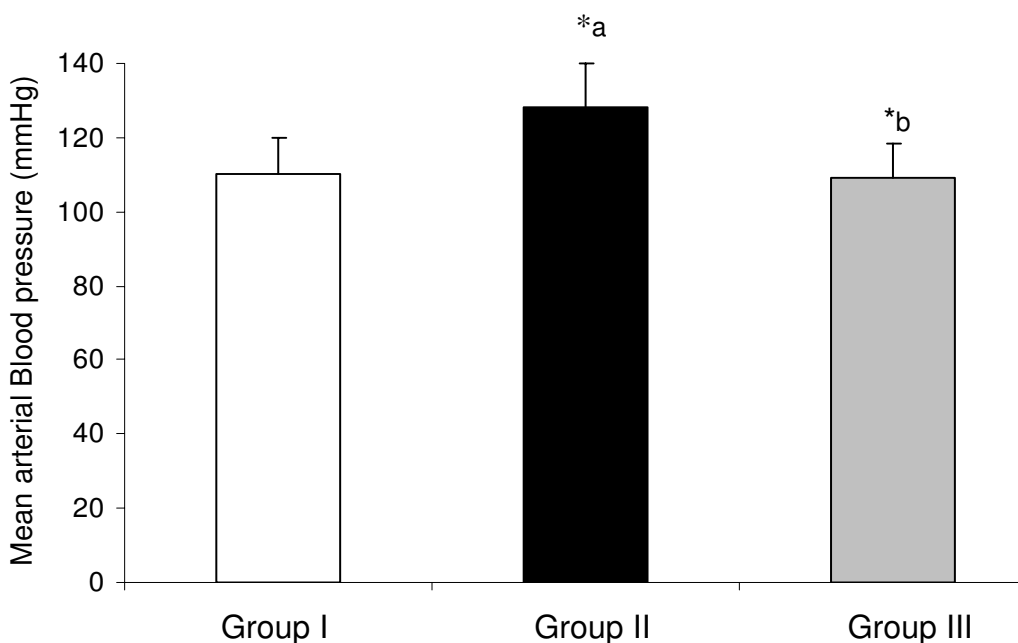


Figure 1 – Mean arterial blood pressure (mmHg) of hamsters fed a control diet (group I), hypercholesterolemic diet (group II) and a hypercholesterolemic diet containing 20% of orange pulp (group III).

The results are expressed as the mean $\pm$ SD of eight hamsters per group.

* $p < 0.05$ for ^a Group I vs Group II and ^b Group II vs Group III

DISCUSSION

The importance of cholesterol and lipoprotein plasma levels in the pathogenesis of atherosclerosis is well known (Lavy et al., 1991; Ismail et al., 1999) and changes in serum LDL levels appear to play a central role in the development of atherosclerosis (Ismail et al., 1999).

Clinical trials have confirmed the efficacy of dietary fiber in decreasing fasting serum triacylglycerol levels (Chandalia et al., 2000). Soluble dietary fiber, is particularly effective in decreasing serum LDL-cholesterol concentrations (Truswell, 2002).

As shown here, orange pulp (group III) also reduced the levels of triglycerides and VLDL+LDL-cholesterol and prevented a decrease in plasma HDL-cholesterol levels. This effect of orange pulp on HDL is important because HDL has also been shown to protect LDL from peroxidation (Mackness et al., 1993) and the modification of LDL is an important event in the early stages of atherosclerosis (Ismail et al., 1999).

The protective action of orange pulp against hypercholesterolemia may be related principally to its soluble fraction which absorbs cholesterol by binding to bile acids. The interaction of bile acids with orange pulp probably increased bile acid secretion and reduced its reabsorption by the liver. This interaction could possibly have increased the rate of cholesterol catabolism at the expense of bile acid biosynthesis (Kritchevsky, 1978; Slater et al., 1980).

The high capacity of hydration and the viscosity of the soluble fraction of orange pulp probably increased the viscosity of the intestinal contents, thereby

hindering the action of digestive enzymes and reducing the intestinal absorption of total lipids (Ehrlein & Stockmann, 1998).

Hypercholesterolemia can elevate the cholesterol content of platelets, polymorphonuclear leukocytes and endothelial cells, thereby initiating a cascade of reactions that can lead to the generation of oxygen free radicals and oxidative stress (Stuart et al., 1980; Quang-sang et al., 1987).

We have previously reported that orange pulp decreases oxidative stress in hypercholesterolemic hamsters (Guida-Cardoso et al., 2004). As shown here, hamsters fed a hypercholesterolemic diet (group II) showed an elevation in TBARS compared to those fed a normal diet (group I) or a hypercholesterolemic diet with 20% orange pulp (group III). The increase in TBARS in hamsters fed the hypercholesterolemic diet indicated that lipid peroxidation had occurred (Prada & Kalra, 1993).

The increase in TBARS levels in hypercholesterolemic hamsters probably resulted from severe hypercholesterolemia, since at supraphysiological cholesterol concentrations the protection offered by antioxidant systems was insufficient to scavenge the free radicals generated from this large substrate pool. These results indicate that the balance between free radical production and destruction is disturbed to a greater extent in hypercholesterolemic hamsters, with a tendency towards free radical production that was reflected in an increased lipid peroxidation. This alteration in ROS levels during hypercholesterolemia could be the result of increased ROS, production and/or destruction (Guida-Cardoso et al., 2004). Prasad & Kalra (1993) have shown increased ROS-production by

polymorphonuclear leukocytes during hypercholesterolemia and suggested that lipid peroxidation was involved in tissue damage by ROS. It has already been shown that lipid peroxidation is increased in hypercholesterolemic atherosclerosis (Ismail et al., 1999).

The vascular endothelium plays a crucial role in the maintenance of blood vessel tone and in the prevention of atherosclerosis principally through the formation of nitric oxide (NO) (Ross, 1993; Scott et al., 2001) and other endothelium-derived relaxing factors (EDRF), such as prostacyclin, and the release of endothelium-derived hyperpolarizing factors (Boulanger, 1999). These endothelial factors, particularly NO, are involved not only in the control of vascular smooth muscle but also in numerous other regulatory functions such as the inhibition of leucocyte, monocyte and platelet aggregation, inhibition of vascular smooth muscle proliferation, as well as in changes in vascular permeability and inflammatory responses (Boulanger, 1999; Scott et al., 2001).

An elevation in blood pressure is associated with increased ROS activity and enhanced NO inactivation in various models of genetic and acquired hypertension (Vaziri et al., 2000). These findings agree with our results showing an elevation in the mean arterial blood pressure of hamsters fed a hypercholesterolemic diet (group II) compared to those fed a normal diet (group I) or a hypercholesterolemic diet containing 20% of orange pulp (group III). The increase in mean arterial blood pressure in hypercholesterolemic hamsters (group II) probably reflected the inactivation of NO as a result of increased lipid peroxidation.

In conclusion, our results shows that orange pulp had a protective effect on hypercholesterolemic hamsters. This protection was most likely due to decreases in mean arterial blood pressure, oxidative stress, total cholesterol and VLDL+HDL-cholesterol levels, mediated by a direct physical action of the pulp on the gastrointestinal tract.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge the financial support from CNPQ and CAPES, Brazil.

REFERENCES

- American Heart Association (2000). 2000 Heart and Stroke Statistical Update, Dallas, TX: American Heart Association, pp. 1-32.
- Anderson, J. W. (2000). Dietary fiber prevents carbohydrate-induced hypertriglyceridemia. *Current Atherosclerosis Reports*, 2: 536-541.
- Anderson, J.W. & Hanna, T.J. (1999). Impact of nondigestible carbohydrates on serum lipoproteins and risk for cardiovascular disease. *Journal of Nutrition*, 129: 1457S-1466S.
- Boulanger, C.M. (1999). Secondary endothelial dysfunction: hypertension and heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 31: 39-49.
- Chandalia, M.J.; Garg, A.; Lutjohann, D.; Von Bergmann, K.; Grundy, S.; Brinkley, I. (2000). Beneficial effects of high dietary fiber intake in patients with type 2

diabetes mellitus. *Journal of the American College of Nutrition*, 19: 331S-338S.

Ehrlein, H. & Stockmann, A. (1998). Intestinal absorption of nutrients is not influenced by soy fiber and does not differ between oligomeric and polymeric enteral diets. *Digestive Diseases and Sciences*, 43: 2099-2110.

Fernandez, M.L. (2001). Soluble fiber and nondigestible carbohydrate effects on plasma lipids and cardiovascular risk. *Current Opinion in Lipidology*, 12: 35-40.

Guida-Cardoso, S.M.; Pinto, W.J.; Stoppa, G.R.; Ogo, S.H.; Reyes, F.G.R.; Areas, M.A. (2004). The influence of dietary fiber on the antioxidant status of hypercholesterolemic hamsters. *ALIMENTARIA (In press)*.

Henry, R.J.; Cannon, D.C.; Winkelman, J. (1974). Enzymatic methods. In: Henry, R.J. Ed. *Clinical Chemistry Principles and Technics*, 2nd Ed. New York, Harper & Row; p.168.

Ismail, M.F.; Gad, M.Z.; Hamdy, M.A. (1999). Study of the hypolipidemic properties of pectin, garlic and ginseng in hypercholesterolemic rabbits. *Pharmacological Research*, 39: 157-166.

Kok, F.J.; Van Poppel, G.; Melse, J.; Verheul, E.; Shouten, E.G.; Kruyssen D.H.C.M.; Horfman, A. (1991). Do antioxidants and polyunsaturated fatty acids have a combined association with coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 31: 85-90.

- Lavy, A.; Brook, J.G.; Dankner, G.; Ben Amotz, A.; Aviram, M. (1991) Enhanced *in vitro* oxidation of plasma lipoprotein derived from hypercholesterolemic patients. *Metabolism*, 40: 794-799.
- Mackness, M.I.; Arrol, S.; Abbot, C.; Durrington, P.N. (1993). Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis*, 104: 129-135.
- Prasad, K. & Kalra, J. (1993). Oxygen free radicals and hypercholesterolemic atherosclerosis: effect of vitamin E. *American Heart Journal*, 125: 958-973.
- Quang-Sang, K.H.L.; Levenson, J.; Simon, A.; Meyer, P.; Devynck, M.A. (1987). Platelet cytosolic free Ca^{++} concentration and plasma cholesterol in untreated hypertensive rats. *Journal of Hypertension*, 5: S251-S254.
- Reeves, P.G.; Nielsen, F.H.; Fahey, G.C.J. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. *American Institute of Nutrition*, 1939-1951.
- Ross, R. (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 362: 801-809.
- Scott, T.W.M.; McMurray, J.J.V.; Spiers, A.; Jardine, A.G. (2001). Impaired endothelial function in isolated human uremic resistance arteries. *Kidney International*, 60: 1077-1082.
- Slater, H.R.; Packard, C.J.; Bicker, S.; Shepherd, A. (1980). Effects of cholestyramine on receptor-mediated plasma clearance and tissue uptake of

- human low density lipoproteins in the rabbit. *Journal of Biological Chemistry*, 255: 10210-10213.
- Stocks, J.; Dormandy, L. (1971). The autoxidation of human red blood cell lipids induced by hydrogen peroxide. *British Journal of Haematology*, 20: 95-98.
- Stuart, M.J.; Gerrard, J.M.; White, J.G. (1980). Effect of cholesterol on production of tromboxane B₂ by platelets *in vitro*. *New England Journal of Medicine*, 302: 6-10.
- Truswell, A. (2002). Cereal grains and coronary heart disease. *European Journal Clinical Nutrition*, 56: 1-14.
- Vaziri, N.D.; Ni, Z.; Tarnavsky-Hobbs, D.L. (2000). Effect of antioxidant therapy on blood pressure and nitric oxide synthase expression in hypertensive rats. *Hypertension*, 36: 957-964.
- Witztum, J.L. (1987). Intensive drug therapy of hypercholesterolemia. *American Heart Journal*, 113: 603-609.

CAPÍTULO IV

EFEITO DA POLPA DE LARANJA SOBRE O ESPESSAMENTO VASCULAR EM HAMSTERS HIPERCOLESTEROLÊMICOS

Silvana Maria Guida-Cardoso¹, Wagner J. Pinto¹, Félix G. R. Reyes², Miguel Arcanjo Areas¹

¹Departamento de Fisiologia e Biofísica, ² Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), SP, Brasil.

(Este artigo será enviado para publicação na revista *Nutrition Research*)

EFEITO DA POLPA DE LARANJA SOBRE O ESPESSAMENTO VASCULAR EM HAMSTERS HIPERCOLESTEROLÊMICOS

Silvana Maria Guida-Cardoso¹, Wagner J. Pinto¹, Félix G. R. Reyes², Miguel Arcanjo Areas¹

¹Departamento de Fisiologia e Biofísica, ² Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), SP, Brasil.

RESUMO

Neste estudo, foi avaliado o efeito da polpa de laranja (PL), fonte de fibra alimentar, sobre parâmetros bioquímicos e remodelamento vascular em hamsters submetidos à dieta hipercolesterolêmica. Os animais foram distribuídos em três grupos (n=8): Grupo I: dieta controle; Grupo II: dieta hipercolesterolêmica (20 g of colesterol/Kg de dieta) e Grupo III: dieta hipercolesterolêmica contendo 20% de PL. Após 30 dias de experimentação os animais foram sacrificados com pentobarbitol sódico. Foram determinados o teor de polifenóis totais da PL e a concentração plasmática de colesterol total por método enzimático. A aorta abdominal foi retirada para posterior preparo histológico e análise morfométrica utilizando software Image Pro-Plus versão 3.1. A PL apresentou polifenóis totais (24.49 ± 0.15 mg/g) e reduziu em 29% o teor de colesterol plasmático dos animais que ingeriram dieta hipercolesterolêmica (G III). A análise morfométrica revelou espessamento vascular com espessamento de 51,09% da musculatura lisa vascular da aorta abdominal dos animais do G II, quando comparados aos animais do G I. Por outro lado, a presença da polpa de laranja na dieta hipercolesterolêmica reduziu em 39,92% o espessamento da parede da aorta quando comparado aos do G II. Tais resultados indicam que a polpa de laranja exerceu efeito protetor contra o espessamento vascular induzido pela hipercolesterolemia devido à sua ação hipocolesterolêmica e, provavelmente, à presença de polifenóis em sua constituição.

palavras chaves: polpa de laranja, fibra alimentar, polifenóis, hipercolesterolemia, morfometria.

INTRODUÇÃO

Simultaneamente ao aumento da expectativa da vida nos países desenvolvidos observa-se um aumento na incidência de doenças crônicas degenerativas (Lutz et al., 1997). Cânceres e doenças cardiovasculares, dessa forma, contribuem, aproximadamente, com mais de 66% dentre as causas da mortalidade dessas populações (Duthie et al., 2003).

A hipercolesterolemia é uma das principais causas da produção de radicais livres no organismo (Kok et al., 1991), que, por sua vez, possuem importante papel na patogênese da aterosclerose principalmente pela oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e pela geração de espécies reativas que podem reagir com o oxigênio na parede vascular (Witztum, 1987). Estudos epidemiológicos evidenciam que o consumo habitual de dietas de frutas e vegetais, ricas em fibras alimentares, diminuem o risco de desenvolvimento de diversas patologias (Williams, 1995; Hollman & Katan, 1999; Anderson & Hanna, 1999; Hollman & Katan, 1999; Vinson et al., 2001) e, dentre elas, as doenças cardiovasculares (Goupy et al., 2003).

Além disso, alimentos de origem vegetal apresentam fenóis e polifenóis, que possuem ação antioxidante; isto é, previnem o estresse oxidativo causado pelos radicais livres (Vinson et al., 2001; Leontowicz et al., 2003).

A relação inversa que existe entre o consumo de fibras alimentares na dieta e o risco de doenças cardiovasculares ocorre, principalmente, devido à presença das fibras solúveis no trato gastrointestinal, que proporcionam redução nos níveis do colesterol plasmático (Fernandez, 2001; Guida-Cardoso et al., 2004b) e, conseqüentemente, redução no estresse oxidativo (Guida-Cardoso et al., 2004a).

A fonte de fibras utilizada em nosso estudo foi a polpa de laranja (PL), um subproduto na produção industrial de suco de laranja.

O objetivo do nosso trabalho foi investigar a presença de polifenóis na polpa de laranja e os efeitos dessa fonte de fibras nos níveis plasmáticos de colesterol total e na espessura da musculatura lisa vascular da aorta abdominal de hamsters alimentados com dieta hipercolesterolêmica.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Hamsters (24 animais), *Golden sirius*, machos com duas semanas de idade foram colocados em biotério com temperatura constante e ciclo claro/escuro de 12 horas durante o período experimental (30 dias). Os animais foram distribuídos em três grupos com oito animais cada. Grupo I (G I) recebeu dieta controle (Reeves et al., 1993), Grupo II (G II) recebeu dieta hipercolesterolêmica (20g de colesterol/Kg de dieta) (Ismail et al., 1999) e o Grupo III (G III) recebeu dieta hipercolesterolêmica acrescida de 20% de polpa de laranja.

Após o período experimental, os hamsters foram sacrificados com pentobarbitol sódico, o sangue foi retirado para análise do colesterol plasmático e a aorta abdominal foi removida para, após processamento histológico, realização de análise morfométrica da musculatura lisa vascular.

Quantificação de compostos fenólicos totais na polpa de laranja

Os fenóis totais foram determinados colorimetricamente pelo método de Folin-Ciocalteu, posteriormente modificado por Scalbert et al. (1989).

Concentração plasmática de colesterol total

O colesterol plasmático foi determinado enzimaticamente utilizando-se kit comercial (Kit-E-CELM) (Henry et al., 1974).

Histologia

A aorta abdominal de cada animal foi dissecada, lavada em solução salina 0,9% e fixada em bouin (24 horas). Após, todos os segmentos das aortas

abdominais foram incluídos em parafina e, posteriormente, seriadas em corte de 5µm de espessura. Os cortes foram corados seguindo-se a metodologia de Montes et al., (1985).

Análise morfométrica

A análise morfométrica da parede da aorta abdominal foi realizada em microscópio Leica (mod. 551505), objetiva de 40, sempre em área de tamanho padrão (632 u= µm²).

Foram realizadas 4 lâminas de cada animal e foram medidas seis diferentes áreas em cada lâmina. As imagens foram capturadas e analisadas pelo software Image-pro Plus, versão 3.1. (Mídia Cibernetics, 1996, Silver Spring, MD).

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão e foram analisados por teste de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. Os valores para p<0.05 indicam significância. Todos os cálculos estatísticos foram realizados no software GraphPad Prism (versão 2.01).

RESULTADOS

A polpa de laranja (PL) é composta pelas vesículas que armazenam o suco e pelas membranas que separam essas vesículas em gomos.

A PL utilizada neste estudo apresentou fibras insolúveis e solúveis, sendo 55% de pectina e derivados, 36% de celulose e 9% de lignina, capacidade de hidratação de 16.3 g de água/g de matéria seca, viscosidade 4.5 cP (centipoise), sendo constituída por partículas pequenas (29,82%), médias (69,83) e grandes (0,34%) (Áreas, 1994).

A PL apresentou 24,49 ± 0.15 mg/g PL de fenóis totais, indicando a presença de componentes antioxidantes.

A dieta hipercolesterolêmica (G II) aumentou de forma significativa as concentrações plasmáticas do colesterol total quando comparada aos animais que

receberam dieta controle (G I). Por outro lado, a polpa de laranja (G III) reduziu de forma significativa as concentrações plasmáticas do colesterol total quando comparada aos animais hipercolesterolêmicos (G II) (Tabela 1).

A morfometria (Figura 1) mostrou que a dieta hipercolesterolêmica causou um aumento de 51,09%, na espessura da musculatura lisa da aorta abdominal (7,65 μm) quando comparado aos animais que receberam dieta controle (5,03 μm). Por outro lado, a presença da polpa de laranja na dieta hipercolesterolêmica reduziu, significativamente, em 30,92% o espessamento da musculatura vascular da aorta abdominal (5,25 μm), quando comparado aos animais hipercolesterolêmicos.

Table 1 – Colesterol plasmático total em hamsters alimentados com dieta controle (G I), dieta hipercolesterolêmica (G II) e dieta hipercolesterolêmica enriquecida com 20% de polpa de laranja (G III).

Parameters	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Total cholesterol (mg/dL)	112 $\pm$ 4.2	216 $\pm$ 6.1 ^{*a}	152 $\pm$ 3.2 ^{*b}

Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=8/grupo).

*a: indica diferença significativa (p< 0.05) na comparação entre GII e GI.

*b: indica diferença significativa (p< 0.05) na comparação entre GIII e GII.

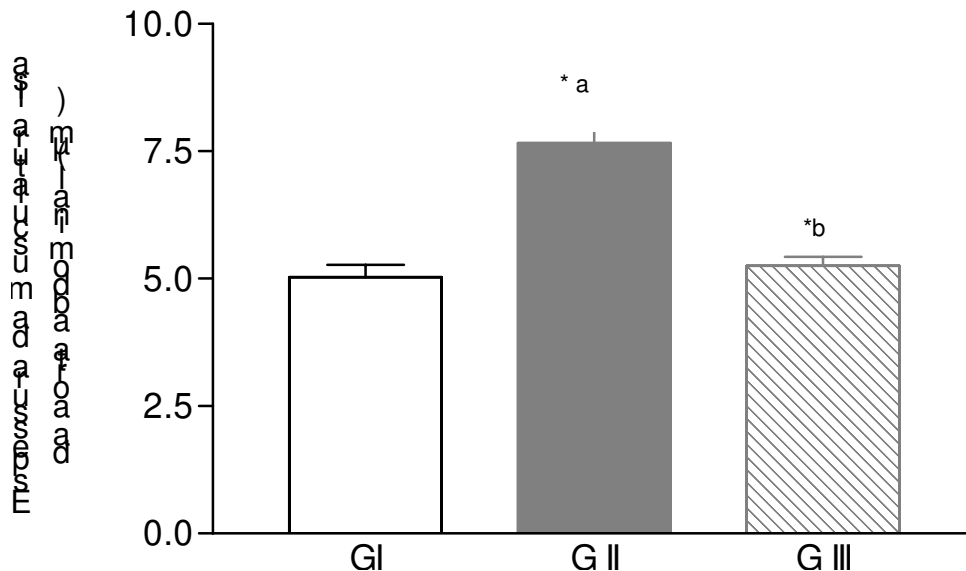


Figura 1 – Espessamento da parede muscular da aorta abdominal (μm). Os resultados são mostrados como média $\pm$ desvio padrão (n=8) com índice de significância $p < 0.05$.

*a: indica diferença significativa ($p < 0.05$) na comparação entre GII e GI.

*b: indica diferença significativa ($p < 0.05$) na comparação entre GIII e GII.

DISCUSSÃO

A importância dos níveis plasmáticos de colesterol na patogênese das doenças cardiovasculares, particularmente da aterosclerose, tem sido reportada por inúmeros autores (Ismail et al., 1999). O aumento dos níveis de colesterol plasmático leva a um aumento na produção dos radicais livres (Kok et al., 1991; Ismail et al., 1999), que podem causar danos no DNA, nas proteínas e lipídios de membrana (Halliwell, 1994) e reações locais na parede vascular (Witztum, 1987; Berk 2001). Esses danos podem ser críticos no desenvolvimento do câncer, diabetes, inflamações crônicas e aterosclerose (Halliwell, 1994; Griendling & Harrison, 1999). Como resposta a esses fatores, as células podem sofrer hiperplasia (aumento no número) ou hipertrofia (aumento no tamanho sem alterar o DNA). Assim, a aterosclerose e a hipertensão podem promover

remodelamento vascular pela interação entre as células endoteliais e as musculares lisas vasculares (Berk, 2001).

De fato, a injúria na carótida pode levar ao espessamento da camada íntima desse vaso em ratos (Clowes et al., 1983), porcos, camundongos, macacos e humanos e em outras artérias, tais como aorta, ilíaca, femoral e braquial (Rudic et al., 1998).

Muitas moléculas que regulam o crescimento das células musculares lisas vasculares têm sido estudadas e os resultados sugerem importante papel para o óxido nítrico (Rudic et al., 1998) e para estímulos (O_2^- , H_2O_2 e OH^-) oriundos do estresse oxidativo (Konneh et al., 1995; Gong et al., 1996; Berk, 2001) que pode, promover hipertrofia celular (Rao & Berk, 1992; Berk, 2001).

Resultados obtidos em nosso laboratório mostraram que hamsters alimentados com dieta hipercolesterolêmica apresentaram aumento na peroxidação lipídica em decorrência do aumento das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), sugerindo assim, aumento nos níveis de radicais livres (Guida-Cardoso et al., 2004b).

Um aumento na produção de radicais livres pode estar associado com a inativação do óxido nítrico, importante modulador biológico envolvido não apenas no controle da musculatura lisa vascular, mas também em inúmeras funções regulatórias como por exemplo, mecanismos de inibição da proliferação do músculo liso vascular (Boulanger, 1999; Vaziri et al., 2000; Scott et al., 2001; Scott et al., 2001; Pinto et al., 2003).

O remodelamento do vaso que leva a uma hipertrofia pode ser definido como uma redução do diâmetro no lúmen conseqüente ao espessamento da parede desse vaso, como ocorre na hipertensão arterial (Mulvany et al., 1996). Tal fato corrobora nossos resultados anteriores onde pudemos constatar aumento na pressão arterial média de hamsters alimentados com dieta hipercolesterolêmica (Guida-Cardoso et al., 2004b).

Nossos resultados morfométricos evidenciaram um remodelamento na parede vascular dos hamsters alimentados com dieta hipercolesterolêmica com

um espessamento na musculatura lisa vascular da aorta abdominal desses animais. Aragoncillo et al. (2000), realizando análises morfométricas de aorta de coelhos hipercolesterolêmicos, também observaram um espessamento da camada média desse vaso, com conseqüente estenose.

Dessa forma, creditamos nossos resultados ao aumento da produção de radicais livres causados pela hipercolesterolemia (Guida-Cardoso et al., 2004a) que, provavelmente, estimulou fatores de crescimento e inativou a síntese de óxido nítrico pelo endotélio. Tal hipótese é corroborada por outros estudos morfométricos que demonstraram a relação entre a diminuição na produção do óxido nítrico vascular e hipertrofia vascular, com conseqüente espessamento da camada média da aorta em ratos (Mujumdar et al., 2001).

Portanto, é de fundamental importância a redução dos níveis de colesterol plasmático para a prevenção efetiva de doenças cardiovasculares (Evans & Rees, 2002). No entanto, é importante determinar o grau de segurança das substâncias anti-aterogênicas utilizadas no tratamento da hipercolesterolemia devido a efeitos colaterais indesejáveis no fígado, nos rins e, na musculatura esquelética (Barnes, 1998; Evans & Rees, 2002).

Sabe-se que dietas ricas em frutas e vegetais previnem contra diversas patologias e, particularmente, doenças cardiovasculares (Ness & Powles, 1997). Substâncias antioxidantes presentes na dieta, bem como a presença de fibras alimentares são, provavelmente, os responsáveis por esse efeito protetor (Ross & Kasum, 2002). Estudos epidemiológicos têm evidenciado a relação inversa entre a ingestão habitual de fibras alimentares e o risco de doenças cardiovasculares (Anderson & Hanna, 1999). As fibras alimentares, especialmente as fibras solúveis, efetivamente reduzem os níveis plasmáticos de colesterol, o que pode contribuir de maneira direta na proteção contra as doenças cardiovasculares (Fernandez, 2001).

As fibras solúveis e insolúveis podem adsorver os ácidos biliares, reduzindo a formação de micelas, com conseqüências na redução da absorção intestinal de colesterol com reflexo na colesterolemia (Favier et al., 1998). Além disso, as fibras

solúveis são fermentadas pela microbiota do intestino grosso em graus variáveis produzindo ácidos graxos de cadeia curta os quais atingem a circulação por meio de veia porta. Uma vez no fígado esses ácidos graxos podem influenciar o metabolismo lipídico, causando efeito hipocolesterolêmico (Roberfroid, 1993; Sembries et al., 2003). Tais ácidos graxos, principalmente propionato, acetato e butirato, reduzem a atividade da HMG-CoA redutase a enzima hepática que limita a síntese do colesterol (Yokoyama et al., 2003). Nessa situação o fígado reduz *de novo* a síntese do colesterol e aumenta a expressão dos receptores de LDL. Assim, maior quantidade de LDL plasmática pode adentrar os hepatócitos reduzindo, dessa maneira, as concentrações plasmáticas da LDL (Yokoyama et al., 2003). Assim, em trabalho anterior demonstramos a significativa redução nas concentrações plasmáticas da VLDL+LDL em hamsters alimentados com dieta hipercolesterolêmica acrescida de polpa de laranja (Guida-Cardoso et al., 2004b).

Por outro lado, a presença de substâncias antioxidantes nos alimentos de origem vegetal também exerce efeito benéfico à saúde (Ross & Kasum, 2002). Entre tais substâncias antioxidantes podemos citar os polifenóis, que fazem parte da dieta humana e são até receitados como preparações medicinais (Sellappan et al., 2002).

O grande grupo de polifenóis atrai grande interesse devido ao seu potencial anti-aterogênico (Justesen et al., 1998), bem como também possuem ação vasodilatadora (Ricupero et al., 2001). Desta forma, estudos recentes demonstraram que os polifenóis podem prevenir doenças degenerativas (Sakakibara et al., 2003), atuando como antioxidantes naturais (Justesen et al., 1998). O comportamento antioxidante dos compostos fenólicos parece estar relacionado à sua capacidade em quelar metais e captar radicais livres (Martinez-Valverde et al., 2000). No entanto, tem sido reportado que o grau de polimerização dos polifenóis pode influenciar sua capacidade antioxidante, e os monômeros possuem menor capacidade antioxidante que estruturas maiores (Mao et al., 1999).

Apesar da polpa de laranja ter apresentado polifenóis em sua composição, acreditamos que sua capacidade antioxidante, provavelmente, estaria prejudicada levando em consideração o processamento industrial dessa fonte de fibras, que poderia ter polimerizado os compostos fenólicos, reduzindo sua capacidade funcional. No entanto, apesar do processamento anterior, as características físico-químicas da polpa de laranja permaneceram inalteradas (Guida et al., 2004 in press), o que, provavelmente, garantiram seu efeito antioxidante. Nossos resultados estão de acordo com Song et al., (1997) que, estudando a peroxidação lipídica em eritrócitos de ratos submetidos a dietas enriquecida em celulose ou pectina, demonstraram atividade antioxidante dessas fontes purificadas de fibras.

A polpa de laranja em estudo exerceu efeito protetor contra o remodelamento da aorta abdominal induzido pela hipercolesterolemia.

BIBLIOGRAFIA

- Alexander, R.W. (1995). Theodore Cooper Memorial Lecture. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective. *Hypertension*, 25: 155-161.
- Anderson, J.W. & Hanna, T.J. (1999). Impact of nondigestible carbohydrates on serum lipoproteins and risk for cardiovascular disease. *Journal of Nutrition*, 129: 1457S-1466S.
- Aragoncillo, P.; Maeso, R.; Vazquez-Perez, S.; Navarro-Cid, J.; Ruilope, L.M.; Diaz, C.; Hernandez, G.; Lahera, V.; Cachofeiro, V. (2000). The protective role of atorvastatin on function, structure and ultrastructure in the aorta of dyslipidemic rabbits. *Virchows Archiv*, 437(5): 545-554.
- Areas, M.A. (1994). Estudo dos efeitos da polpa de laranja sobre os parâmetros fisiológicos, nutricionais, bioquímicos e morfológicos em ratos normais e diabéticos. Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos.. Universidade Estadual de Campinas.

- Barnes, S (1998). Evolution of the health benefits of soy isoflavones. *Proceedings of Society for Experimental Biology and Medicine*, 217: 386-392.
- Berk, B.C. (2001). Vascular smooth muscle growth: autocrine growth mechanisms. *Physiological Reviews*, 81: 999-1030.
- Boulanger, C.M. (1999). Secondary endothelial dysfunction: hypertension and heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 31: 39-49.
- Clowes, A.W.; Reidy, M.A.; Clowes, M.M. (1983). Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium. *Laboratory Investigation*, 49: 327-333.
- Duthie, G.C.; Gardner, P.T.; Kyle, J.A.M. (2003). Plant polyphenols: are they the new magic bullet? *Proceedings of the Nutrition Society*, 62: 599-603.
- Ehrlein, H. & Stockmann, A. (1998). Intestinal absorption of nutrients is not influenced by soy fiber and does not differ between oligomeric and polymeric enteral diets. *Digestive Disease and Science*, 43: 2099-2110.
- Evans, M. & Rees, A. (2002) Effects of HMG-CoA reductase inhibitors on skeletal muscle: are all statins the same? *Drug Safety*, 25 (9): 649-663.
- Favier, M.L.; Bost, P.E.; Demigne, C.; Remesy, C. (1998). The cholesterol-lowering effect of guar gum in rats is not accompanied by an interruption of bile acid cycling. *Lipids*, 33: 765-771.
- Fernandez, M.L. (2001). Soluble fiber and nondigestible carbohydrate effects on plasma lipids and cardiovascular risk. *Current Opinion in Lipidology*, 12: 35-40.
- Gong, K.W.; Zhu, G.Y.; Wang, L.H.; Tang, C.S. (1996). Effect of active oxygen species on intimal proliferation in rat aorta after arterial injury. *Journal of Vascular Research*, 33: 42-46.
- Goupy, P.; Dufour, C.; Loonis, M.; Dangles, O. (2003). Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 615-622.
- Griendling, K.K. & Ushio-Fukai, M. (1998). Redox control of vascular smooth muscle proliferation. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 132: 9-15.

- Griendling, K.K. & Harrison, D.G. (1999). Dual role of reactive oxygen species in vascular growth. *Circulation Research*, 85: 562-563.
- Guida-Cardoso (a), S.M.; Pinto, W.J.; Stoppa, G.R.; Ogo, S.H.; Reyes, F.G.R.; Areas, M.A. (2004). The influence of dietary fiber on the antioxidant status of hypercholesterolemic hamsters. *Alimentaria Revista de Tecnologia e Higiene de los Alimentos*, 354 (121): 121-124.
- Guida-Cardoso (b), S.M.; Pinto, W.J.; Ogo, S.H.; Reyes, F.G.R.; Areas, M.A. Dietary Fiber reeuce lipid peroxidation and mean arterial blood pressure in hypercholesterolemic hamsters. *Alimentaria Revista de Tecnologia e Higiene de los Alimentos (no prelo)*.
- Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*, 344: 721-724.
- Henry, R.J.; Cannon, D.C.; Winkelman, J. (1974). Enzimatic methods in: Henry RJ. ed. *Clinical Chemistry Principles and Technics*, 2. Ed New York, Harper & How, p.168.
- Hollman, P.C. & Katan, M.B. (1999). Health effects and bioavailability of dietary flavonols. *Free Radicals Research*, (31): S75-80.
- Ismail, M.F.; Gad, M.Z.; Hamdy, M.A. (1999). Study of the hypolipidemic properties of pectin, garlic and ginseng in hypercholesterolemic rabbits. *Pharmacological Research*, 39: 157-166.
- Justesen, U.; Knuthsen, P.; Leth, T. (1998). Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverage by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 799: 101-110.
- Kok, F.J.; Van Poppel, G.; Melse, J.; Verheul, E.; Shouten, E.G.; Kruyssen D.H.C.M.; Horfman, A. (1991). Do antioxidants and polyunsaturated fatty acids have a combined association with coronay atherosclerosis? *Atherosclerosis*, 31: 85-90.
- Konneh, M.K.; Rutherford, C.; Li, S.R.; Anggard, E.E.; Ferns, G.A. (1995). Vitamin E inhibits the intimal response to balloon catheter injury in the carotid artery of

- the cholesterol-fed rat. *Atherosclerosis*, 113: 29-39
- Leontowicz, M.; Goristein, S.; Leontowicz, H.; Krzeminski, R.; Lojek, A.; Katrick, E.; Ciz, M.; Martin-Belloso, O.; Soliva-Fortuny, S.; Haruemkit, R.; Trakhtenberg, S. (2003). Apple and pear peel and pulp and their influence on plasma lipids and antioxidant potentials in rats fed cholesterol-containing diets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 5780-5785.
- Lutz, W. (1997). Doubling of world population unlikely. *Nature*, 387: 803-805.
- Mao, T.K.; Powell, J.J.; Water, J.; Keekn, C.L.; Schmitz, H.H.; Gershwin, M.E. (1999). The influence of cocoa procyanidins on the transcription of interleukin-2 in peripheral blood mononuclear cells. *International Journal of Immunotherapy*, 15: 23-29.
- Martinez-Valverde, I.; Periago, M.J.; Ros, G. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de nutricion*, 50: , 5-18.
- Montes, G.S.; Krisztan, R.M.; Junqueira, L.C. (1985). Preservation of elastic system fibers and of collagen molecular arrangement and stainability in an Egyptian mummy. *Histochemistry*, 83(2):117-119.
- Mujumdar, V.S.; Aru, G.M.; Tyagi, S.C. (2001). Induction of oxidative stress by homocyst(e)ine impairs endothelial function. *Journal of Cellular Biochememistry*, 82(3): 491-500.
- Mulvany, M.J.; Baumbach, G.L.; Aalkjaer, C.; Heagerty, A.M.; Korsgaard, N.; Schiffrin, E.L. Heistad, D.D. (1996). Vascular remodeling. *Hypertension*, 28: 505-506.
- Ness, A.R.; & Powles, J.W (1997). Fruits and vegetables, and cardiovascular disease: a review. *International Journal of Epidemiology*, 26: 1-13.
- Pinto, W.J.; Areas, M.A.; Reyes, F.G.R. Óxido Nítrico e o sistema vascular: uma revisão. *Acta Científica – Biologia e Saúde*, 5 (1): 47-61, 2003.
- Rao, G.N.; & Berk, B.C. (1992). Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circulation Research*, 70: 593-599.

- Rao, G.N.; Lassegue, B.; Griending, K.K.; Alexander, R.W.; Berk, B.C. (1993). Hydrogen peroxide-induced c-fos expression is mediated by arachidonic acid release: role of protein kinase C. *Nucleic Acids Research*, 21: 1259-1263.
- Rao, G.N. (1996). Hydrogen peroxide induces complex formation of SHC-Grb2-SOS with receptor tyrosine kinase and activates Ras and extracellular signal-regulated protein kinases group of mitogen-activated protein kinases. *Oncogene*, 13: 713-719.
- Reeves, P.G.; Nielsen, F.H.; Fahey, G.C.J. (1993). AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. American Institute of Nutrition, 1939-1951.
- Ricupero, D.A.; Poliks, C.F.; Rishikof, D.C.; Kuang, P.P.; Gokstein, R.H. (2001). Apigenin decrease expression of the myofibroblast phenotype. *Febs Letters*, 506:15-21.
- Ross, J.A. & Kasum, C.M. (2002). Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition*, 22: 19-34.
- Rudic, R.D.; Shesely, E.G.; Maeda, N.; Smithies, O.; Segal, S.S.; Sessa, W.C. (1998). Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *Journal of Clinical Investigation*, 101: 731-736.
- Sakakibara, H.; Honda, Y.; Nakagawa, S.; Ashida, H.; Kanazawa, K. (2003). Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 571-581.
- Scalbert Augustin, Monties Bernard, Janin Gerard (1989). Tannins in Wood: Comparison of different estimation methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37 (5): 1324-1329.
- Scott, T.W.M.; McMurray, J.J.V.; Spiers, A.; Jardine, A.G. (2001). Impaired endothelial function in isolated human uremic resistance arteries. *Kidney International*, 60: 1077-1082.

- Sellappan, S.; Akoh, C.C.; Krewer, G. (2002). Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-Grown blueberries and blackberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 2432-2438.
- Sembries, S.;¹ Dongowski, G.; Jacobasch, G.; Mehrlander, K.; Will, F.; Dietrich, H. (2003). Effects of dietary fibre-rich juice colloids from apple pomace extraction juices on intestinal fermentation products and microbiota in rats. *British Journal of Nutrition*, 90: 607-615.
- Song, Y.; Wu, H.; Lin, L.; Li, J. (1997). Effect of dietary fiber on antioxidation in rats. *Wei Sheng Yan Jiu*, 26 (5): 318-320.
- Vaziri, N.D.; Ni, Z.; Tarnavsky-Hobbs, D.L. (2000). Effect of antioxidant therapy on blood pressure and nitric oxide synthase expression in hypertensive rats. *Hypertension*, 36: 957-964.
- Vinson, J.A.; Su, X.; Zubik, L.; Bose, P. (2001). Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 49 (11): 5315-5321.
- Williams, C. (1995). Healthy eating: clarifying advice about fruit and vegetables. *British Medical Journal*, 310: 1453-1455.
- Witztum, J.L.(1987): Intensive drug therapy of hypercholesterolemia. *American Heart Journal*, 113 (2): 603-609.
- Yokoyama, M.; Origasa, H.; Jelis, investigators. (2003) Investigators - Effects of eicosapentaenoic acid on cardiovascular events in Japanese patients with hypercholesterolemia: rationale, design, and baseline characteristics of the Japan EPA Lipid Intervention Study (JELIS). *American Heart Journal*, 146(4): 613-620.

CAPÍTULO V

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

Pelo exposto, a polpa de laranja exerceu ação protetora contra os efeitos adversos da hipercolesterolemia sobre os teores de lipídeos plasmáticos, a peroxidação lipídica, a atividade de enzimas antioxidantes, a pressão arterial média e o espessamento do músculo liso da artéria aorta abdominal, em hamsters machos adultos.

ANEXOS



PUC
CAMPINAS
PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA

SOCIEDADE CAMPINEIRA DE EDUCAÇÃO E INSTRUÇÃO
PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE CAMPINAS
NÚCLEO DE EDITORAÇÃO SBI/CCV

REVISTA DE CIÊNCIAS MÉDICAS
JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES
INDEXADA EM BASES DE DADOS INTERNACIONAIS:
CAS ABSTRACT - CAS HEALTH
BASES NACIONAIS LILACS - INDEX PSI -
QUALIS B-NACIONAL
ISSN 1415-5796

Campinas, 9 de agosto de 2004

OFÍCIO/NE nº 2490/04

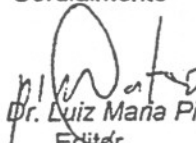
Ilustríssimo(a) Senhor(a)

Vimos por meio desta cumprimentá-lo(a) e, na oportunidade informar a V.Sª que o seu trabalho intitulado *Fisiologia dos adrenocéptores...* (protocolo 379), foi aprovado para publicação na Revista de Ciências Médicas, volume 14 número 1 de 2005.

Em fase final de editoração/normalização entraremos em contato.

Valho-me do ensejo para agradecer sua valiosa colaboração, esperando contar com futuras contribuições.

Cordialmente


Prof. Dr. Luiz Maria Pinto
Editor

Ilustríssimo(a) Senhor(a)
Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas
UNICAMP – Instituto de Biologia
Deptº de Fisiologia e Biofísica
Caixa Postal 6109
Cidade Universitária
13020-904 – Campinas – SP

2004
FEB

Certificamos que

SILVANA MARIA GUION CARDOSO

XIX Reunião Anual da
Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FESB
realizada na cidade de Águas de Lindóia - São Paulo,
de 25 a 28 de agosto de 2004

Guilherme Maluf
Comissão Organizadora

2004
FEB
FEB

Certificamos que

o resumo número 03.009 "FIBRA ALIMENTAR REDUZ A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E PRESSÃO ARTERIAL EM HAMSTERS HIPERCOLESTEROLÊMICOS" de autoria Guida-Cardoso, S. M.; Pinto, W. de J.; Ogo, S. H.; Reyes, F. G. R.; Arcanjo Areas, M. foi apresentado sob a forma de painel na

XIX Reunião Anual da
Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FeSBE,
realizada na cidade de Aguas de Lindóia - São Paulo,
de 25 a 28 de agosto de 2004.

Gerhard Malus
Comissão Organizadora

2004
FE
S
B
E

Certificamos que

o resumo número 03.010 "POLPA DE LARANJA/GOMA-GUAR
REDUZ ALTERAÇÕES CARDÍACAS ULTRAESTRUTURAIS E
ELETROCARDIOGRÁFICAS EM HAMSTER
HIPERCOLESTEROLEMÍCOS" de autoria Pinto, W. de J.;
Guida-Cardoso, S. M.; Juazeiro, P. P.; Reyes, F. G. R.; Areas,
M. A. foi apresentado sob a forma de painel na

XIX Reunião Anual da
Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FeSBE,
realizada na cidade de Aguas de Lindóia - São Paulo,
de 25 a 28 de agosto de 2004

Gerhard Malusch
Comissão Organizadora

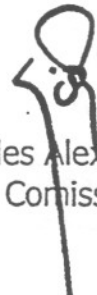
Presidente da Comissão Organizadora

XXXIV Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental

Águas de Lindóia , 28 a 31 de outubro de 2002

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho 11.036 intitulado **EFFECTS OF DIETARY FIBER ON ANTIOXIDANT STATUS IN HYPERCHOLESTEROLEMIC HAMSTER** de autoria de **Cardoso, S.M.G.; Pinto, W. de J.; Reyes, F.G.R.; Stoppa, G.R.; Ogo, S.H; Areas, M.A.** foi apresentado como painel durante o XXXIV Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental realizado de 28 a 31 de outubro de 2002 em Águas de Lindóia, São Paulo.

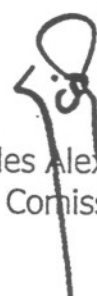

Prof. Giles Alexander Rae
Presidente da Comissão Organizadora

XXXIV Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental

Águas de Lindóia, 28 a 31 de outubro de 2002

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho 11.002 intitulado **Polpa de laranja/goma guar reduz a pressão arterial e lipídeos plasmáticos em hamsters alimentados com dieta hipercolesterolêmica** de autoria de **Pinto, W. de J.; Cardoso, S.M.G.; Krieger, M.; Sumatami, M.; Gomes Marcondes, M.C.C.; Reyes, F.G.R.; Areas, M.A.** foi apresentado como painel durante o XXXIV Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental realizado de 28 a 31 de outubro de 2002 em Águas de Lindóia, São Paulo.



Prof. Giles Alexander Rae
Presidente da Comissão Organizadora



Associação
Latinoamericana de
Farmacologia

XVI LATINAMERICAN CONGRESS OF PHARMACOLOGY
XXXII BRAZILIAN CONGRESS OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS
II IBEROAMERICAN CONGRESS OF PHARMACOLOGY
VII INTERAMERICAN CONGRESS OF CLINICAL PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS

This is to certify that

The poster 06.005 "Efeitos da polpa de laranja sobre parâmetros fisiológicos em ratos", by *Cardoso, S.M.G.; Areas, M.A.; Gomes-Marcondes, M.C.C.; Reyes, F.G.R.* was presented at the above mentioned Congresses, held in Águas de Lindóia, São Paulo, Brazil on 13 to 17, September, 2000.

Zuleika P. Picarelli
President of the Scientific Committee

Aron Jurkiewicz
President of the Organizing Committee



Associação
Latinoamericana de
Farmacologia

XVI LATINAMERICAN CONGRESS OF PHARMACOLOGY
XXXII BRAZILIAN CONGRESS OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS
II IBEROAMERICAN CONGRESS OF PHARMACOLOGY
VII INTERAMERICAN CONGRESS OF CLINICAL PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS

This is to certify that

The poster 06.004 "Efeito da polpa de laranja sobre o teste de tolerância à glicose (gtt) em ratos wistar", by *Cardoso, S.M.G.; Areas, M.A.; Gomes-Marcondes, M.C.C.; Reyes, F.G.R.* was presented at the above mentioned Congresses, held in Águas de Lindóia, São Paulo, Brazil on 13 to 17, September, 2000.

Zuleika P. Picarelli
President of the Scientific Committee

Aron Jurkiewicz
President of the Organizing Committee