

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Efeito da ingestão de sucos de laranja, variedades Moro e Pera, sobre o estresse oxidativo de camundongos saudáveis e com resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica e hiperglicídica

Jéssica Ramos Rocha Pereira

Dissertação para obtenção do título de mestre

Orientadora: Profa. Dra. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto

São Paulo

2019

Jéssica Ramos Rocha Pereira

Efeito da ingestão de sucos de laranja, variedades Moro e Pera, sobre o estresse oxidativo de camundongos saudáveis e com resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica e hiperglicídica

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Ciência dos alimentos.

Área de concentração: Bromatologia

Orientadora: Profa. Dra. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto

São Paulo

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

F436e	<p>Pereira, Jéssica Ramos Rocha Efeito da ingestão de sucos de laranja, variedades Moro e Pera, sobre o estresse oxidativo de camundongos saudáveis e com resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica e hiperglicídica / Jéssica Ramos Rocha Pereira. - São Paulo, 2019. 92 p.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. Orientador: Hassimotto, Neuza Mariko Aymoto</p> <p>1. estresse oxidativo. 2. obesidade. 3. resistência à insulina. 4. dieta hiperlipídica e hiperglicídica. 5. suco de laranja. 1. T. II. Hassimotto, Neuza Mariko Aymoto, orientador.</p>
-------	--

Jéssica Ramos Rocha Pereira

Efeito da ingestão de sucos de laranja, variedades Moro e Pera, sobre o estresse oxidativo de camundongos saudáveis e com resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica e hiperglicêmicas

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Profª. Dra. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto (Orientadora/ Presidente)

1º examinador

2º examinador

3º examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2019

DEDICATÓRIA

A **Deus**, por ter me sustentado nos momentos mais difíceis da
minha vida e pelas bênçãos recebidas.

À minha **família** que confia e me apoia em todas as decisões e,
mesmo quando não souberam como oferecer ajuda, me apoiaram
sendo bons exemplos de caráter, humildade e perseverança.

À minha sobrinha e afilhada, **Heloise**, por ser meu ponto de paz e
equilíbrio, me fazendo sentir o amor mais puro e sincero.

Eu amo vocês!

AGRADECIMENTOS

“Eis que é chegada a hora, ainda aquele que se puser contra a ação do Espírito Santo, que toda a igreja seja um, em nome de Jesus”

Agradeço, primeiramente, a Deus, por ter me sustentado até aqui, me mantendo firme e fortalecendo a minha Fé.

À minha orientadora, professora Neuza, pela oportunidade fornecida sem ao menos me conhecer, permitindo a realização do meu sonho. Obrigada pelas aulas teóricas e práticas, pelas broncas e ensinamentos. Agradeço a compreensão nos momentos difíceis. A senhora me fez crescer como pessoa e profissional.

Sem dúvidas, à minha família, por suportar minha ausência, mau humor e aflição, vocês são meu alicerce.

Aos meus pais, Fátima e Welton, pela educação, amor, paciência e apoio em todas as decisões que venho a tomar em minha vida. É um grande prazer e incentivo sentir em vocês a torcida pelo meu crescimento.

Aos meus irmãos, Gabriela e Guilherme, pelas risadas, brigas, companheirismo e amor, sem o apoio de vocês eu nada seria.

À minha vida, Heloise, graças a você eu renasci, ser a tia Jesca foi a melhor coisa que aconteceu na minha vida, eu sou completamente apaixonada por você e amo te amar.

À minha eterna Tchutchu, por ter sido minha companheira durante 17 anos, obrigada por ter sido a melhor amiga que eu poderia ter, sinto tanto a sua falta.

Aos meus irmãos postigos, Chico, Duda e Sabrina, conviver com vocês é uma aventura diária, mas eu amo cada um do jeitinho que são.

Aos meus queridos amigos, Cristiane, Jessica e João, vocês fazem parte da minha família, são verdadeiros anjos na minha vida. Obrigada pela confiança, amizade, incentivo e amor. Prometo me fazer mais presente.

Aos colegas e amigos de laboratório, Alessandra, Aline, Elisa, Karina, Manuela, Mayara, Thais (Jacque), Telma, Thiago, Sara e Stephanie, pelo convívio diário, compartilhando momentos de alegria, apoio, desespero e angústias da vida de um pós-graduando.

À Alessandra, pela amizade e por navegar comigo desde o início neste barco, compartilhando risadas e os mesmos prazos.

À Karina, Manuela e Mayra, pela confiança que jamais esquecerei. Manu, o Rafa já é muito amado.

Às colegas de outros laboratórios, Mayra, Paola, Laís e Janayra, obrigada pelas conversas, risadas e ajuda.

À Ivanir, pela excelente aula teórica e prática de *Western blotting*. Obrigada pelas dicas e paciência.

À Audrey, pelo incentivo e apoio no ingresso ao mestrado, além dos socorros prestados, em especial, nas análises de *Western blotting* e na instalação e utilização do *software* para análise de dados. Obrigada por tudo.

À Gabriela e ao Victor, pelas dúvidas sanadas, auxílio com os equipamentos e explicações durante as diversas tentativas de *Western blotting*.

Às técnicas do laboratório, Aline, Luciene e Lúcia, pela ajuda em todas as análises.

Ao Professor Fernando Moreno e ao técnico Renato, pela colaboração com o ensaio do Cometa. Aos alunos, Thais, Juliana, Mayara, Gabriela e Ernesto, obrigada pela ajuda e receptividade.

À Professora Inar Castro, pela colaboração nas análises de enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica. Em especial, à Marina, por desde o início me socorrer em todas as análises. Muito obrigada.

Aos professores Ricardo Fock e Primavera Borelli, e ao técnico Edson, pela colaboração na análise de *Western blotting*.

À Flavia, do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pelo auxílio com os animais.

Aos animais, pelo sacrifício em favor do desenvolvimento científico.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de estudos.

À Irani, por me permitir fazer parte de sua excelente equipe e me apoiar na saída para o mestrado. Agradeço imensamente pela força para meu retorno e por me acolher tão bem.

Às nutricionistas, Juliana, Alessandra e Anne, pela amizade, motivação e risadas. Jú, te desejo toda a felicidade do mundo, obrigada pela confiança e ombro amigo.

À Denise, Débora, Fernanda e Franciele, pelo incentivo, preocupação, carinho e palavras de conforto.

À toda equipe da Educação e Nutrição, do Grupo NotreDame Intermédica, por me receber de braços abertos. Muito obrigada.

Aos meus pacientes, que fazem aumentar meu amor pela ciência.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para realização deste trabalho e que, por falta de memória, mas não de gratidão, eu possa ter esquecido de mencionar nestas linhas.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”

(Martin Luther King)

RESUMO

PEREIRA, J. R. R. **Efeito da ingestão de sucos de laranja, variedades Moro e Pera, sobre o estresse oxidativo de camundongos saudáveis e com resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica e hiperglicídica.** 2019. 92f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

As laranjas, das variedades Moro e Pera, são conhecidas por sua composição de flavonoides, em especial, a subclasse flavanona, além das antocianinas na laranja Moro. Ambas as subclasses apresentam capacidade antioxidante, anti-inflamatória e hipolipidêmica, podendo atenuar as alterações metabólicas decorrentes do consumo de uma dieta hiperlipídica e hiperglicídica. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da ingestão de sucos de laranja, das variedades Moro e Pera, sobre os parâmetros oxidativos de camundongos saudáveis e com resistência à insulina, esta última induzida por uma dieta hiperlipídica e hiperglicídica. Camundongos machos, da linhagem C57Bl/6, foram distribuídos em seis grupos, três grupos receberam uma dieta controle e três grupos uma dieta hiperlipídica e hiperglicídica, durante 12 semanas. Concomitante às dietas, dois grupos de cada tratamento receberam suco de laranja Pera e o outro suco de laranja Moro em substituição à água de beber. Na 10^a e 11^a semana, foram realizados o ipITT e o ipGTT. No final do tratamento, foram coletados o sangue, fígado e coração. As flavanonas majoritárias caracterizadas em ambos os sucos foram a narirutina e hesperitina. Além das flavanonas, a cianidina 3-glucosídeo foi a antocianina majoritária no suco de laranja Moro. O consumo de dieta hiperlipídica e hiperglicídica acarretou em ganho de peso e adiposidade corporal, além de alterações metabólicas, como intolerância à insulina e a glicose, com o desenvolvimento da resistência insulínica, de acordo com o índice de HOMA-IR. Contudo, o suco de laranja, da variedade Pera, foi capaz de atenuar os parâmetros metabólicos como a sensibilidade à insulina, além da adiposidade e peso corporal. No tecido hepático, foi observado redução da peroxidação lipídica e da expressão proteica da enzima catalase nos animais tratados com dieta hiperlipídica e hiperglicídica, quando comparado à dieta controle; e aumento na atividade de superóxido dismutase no tecido cardíaco. Não se observou diferenças significativas nas demais enzimas antioxidantes, bem como no dano oxidativo ao DNA avaliado pelo ensaio do cometa. No tecido cardíaco, foi observado aumento da peroxidação lipídica e de glutathiona peroxidase nos animais tratados com dieta controle mais suco de laranja Pera e suco de laranja Moro, respectivamente. Assim, a dieta hiperlipídica e hiperglicídica não acarretou em estresse oxidativo e, de maneira geral, os sucos não alteraram

este quadro. Como conclusão, o suco de laranja Pera, atenuou as alterações metabólicas relacionadas ao metabolismo de carboidratos, mas não alterou os parâmetros de estresse oxidativo.

Palavras-chave: estresse oxidativo; obesidade; resistência à insulina; dieta hiperlipídica e hiperglicídica; suco de laranja.

ABSTRACT

PEREIRA, J. R. R. **Effect of orange juices intake, cv. Moro and Pera, in oxidative stress of healthy and insulin resistant mice induced by high-fat and high carbohydrate diet.** 2019. 92p. Dissertation (Master degree). School of Pharmaceutical Science, University of São Paulo. São Paulo, 2019.

Oranges, Moro and Pera varieties, are known for their composition of flavonoids, especially the subclass flavanone, beyond the anthocyanins in the Moro variety. Both subclasses present antioxidant, anti-inflammatory and hypolipidemic capacities, and may attenuate the metabolic alterations due to the consumption of a hyperlipidemic and hyperglycemic diet. Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of orange juice intake, Moro and Pera varieties, on the oxidative parameters of insulin resistant mice induced by a high-fat and high carbohydrate diet. Mice (C57Bl/6 strain) were distributed in six groups: three groups received a control diet and three groups received a high-fat and high carbohydrate diet during 12 weeks. Concomitantly to the diets, two groups of each treatment received Pera and Moro orange juice in replacement of water. The ipITT and ipGTT were done at 11 e 12 week. At the ending of the treatment, blood, liver and heart were collected. The flavanones narirutine and hesperitin were the major flavanones in both juices. In addition, cyanidin 3-glycoside was the major anthocyanin in Moro orange juice. The consumption of high-fat and high carbohydrate diet resulted in weight gain and body adiposity, and metabolic alterations, such as decrease in insulin tolerance and development of insulin resistance, according to the HOMA-IR index. However, orange juice of the Pera variety was able to attenuate metabolic parameters increasing insulin sensitivity and decreasing adiposity and body weight. In hepatic tissue, decrease on lipid peroxidation and protein expression of the catalase were observed in animals treated with high-fat and high carbohydrate diet when compared to the control diet; and an increase activity of the superoxide dismutase in cardiac tissue. No significant differences were observed in the other antioxidant enzymes, as well as in the oxidative DNA damage assessed by the comet assay. In cardiac tissue, lipid peroxidation and glutathione peroxidase were increased in animals treated with control diet plus Pera and Moro orange juice, respectively. Thus, the high-fat and high carbohydrate diet did not promote oxidative stress and, in general, the juices did not alter oxidative parameters. In conclusion, Pera orange juice attenuate the metabolic alterations related to the metabolism of carbohydrates, but not alter oxidative stress parameters.

Keywords: oxidative stress; obesity; insulin resistance; high-fat and high carbohydrate diet; orange juice.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via de sinalização da insulina	27
Figura 2. Principais vias endógenas e exógenas de produção de ER	29
Figura 3. Etapas da oxidação lipídica e da catálise mediada por metais	30
Figura 4. Reações de <i>Fenton</i> e <i>Haber-Weiss</i> , resultando na geração de radicais hidroxilas, na presença de ferro	31
Figura 5. Regulação e ativação de Nrf2 sob condições basais e estresse	32
Figura 6. Laranjas, variedade Pera e Moro, e os principais flavonoides	34
Figura 7. Desenho experimental geral	40
Figura 8. Fórmulas utilizadas para obtenção da porcentagem de migração do DNA, classificado como momento da cauda de Olive (A) e fotomicrografia para ilustração de um nucleídeo com cauda (B), obtida de amostras de fígado de camundongos saudáveis na análise do ensaio cometa em microscópio óptico comum, submetido à coloração com prata. Aumento original 400x	49
Figura 9. Consumo médio diário das dietas controle (CTL) e hiperlipídica e hiperglicídica (HLG) em gramas (A) e em calorias (B), de camundongos (C57Bl/6) machos até a 12 ^a semana do protocolo experimental	54
Figura 10. Eficiência das dietas controle (CTL) e hiperlipídica e hiperglicídica (HLG), de camundongos (C57Bl/6) machos, durante todo o protocolo experimental	55
Figura 11. Consumo volumétrico e energético de água e de sucos de laranja Pera (SLP) e Moro (SLM) dos grupos de camundongos machos (C57Bl/6), submetidos às dietas controle (CTL) e hiperlipídica e hiperglicídica (HLG) (A e B), durante todo o protocolo	

experimental 56

Figura 12. Curva de crescimento e ganho de peso corporal total dos grupos de camundongos (C57Bl/6) machos, tratados com as dietas controle (CTL) e hiperlipídica e hiperglicídica (HLG) (A e B), até a 12^a semana do protocolo experimental 56

Figura 13. Massa relativa (massa tecidual/peso corporal) do tecido adiposo (TA), fígado e coração dos grupos de camundongos (C57Bl/6) machos, submetidos às dietas controle (CTL) e hiperlipídica e hiperglicídica (HLG) (A, B e C), até a 12^a semana do protocolo experimental 57

Figura 14. Curva glicêmica e taxa de decaimento da glicose (Kitt) do teste de tolerância intraperitoneal à insulina (ipITT) dos grupos de camundongos (C57Bl/6) machos, tratados com as dietas controle (CTL) e hiperlipídica e hiperglicídica (HLG) (A e B), na 11^a semana do protocolo experimental 58

Figura 15. Curva glicêmica e área sob a curva (ASC) dos grupos de camundongos (C57Bl/6) machos, tratados com as dietas controle (CTL) e hiperlipídica e hiperglicídica (HLG) (A e B), na 12^a semana do protocolo experimental 59

Figura 16. Glicemia de jejum dos grupos de camundongos (C57Bl/6) machos, tratados com as dietas controle (CTL) e hiperlipídica e hiperglicídica (HLG), anterior à eutanásia, na 12^a semana do protocolo experimental 59

Figura 17. Índice de HOMA-IR dos grupos de camundongos (C57Bl/6) machos, tratados com as dietas controle (CTL) e hiperlipídica e hiperglicídica (HLG), até a 12^a semana do protocolo experimental 60

Figura 18. Quantificação de malonaldeído no tecido hepático (A) e cardíaco (B), dos grupos de camundongos (C57Bl/6) machos, tratados com as dietas controle (CTL) e hiperlipídica e hiperglicídica (HLG) 61

Figura 19. Momento da cauda de Olive (OTM) dos grupos alimentados com as dietas

controle (CTL) e hiperlipídica e hiperglicídica (HLG) de camundongos (C57Bl/6) machos 61

Figura 20. Atividade enzimática da superóxido dismutase, catalase e glutationala peroxidase, no tecido hepático, dos grupos de camundongos (C57Bl/6) machos, tratados com as dietas controle (CTL) e hiperlipídica e hiperglicídica (HLG) (A, B e C) 62

Figura 21. Atividade enzimática da superóxido dismutase e glutationala peroxidase, no tecido cardíaco, dos grupos de camundongos (C57Bl/6) machos, tratados com as dietas controle (CTL) e hiperlipídica e hiperglicídica (HLG) (A e B) 63

Figura 22. Quantificação das proteínas superóxido dismutase, catalase, glutationala peroxidase e do fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2, no tecido hepático, dos grupos de camundongos (C57Bl/6) machos, tratados com as dietas controle (CTL) e hiperlipídica e hiperglicídica (HLG) (A, B, C e D) 64

Figura 23. Quantificação das proteínas superóxido dismutase e glutationala peroxidase, no tecido cardíaco, dos grupos de camundongos (C57Bl/6) machos, tratados com as dietas controle (CTL) e hiperlipídica e hiperglicídica (HLG) (A e B) 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição nutricional das rações	41
Tabela 2. Composição nutricional do leite condensado	41
Tabela 3. Composição química e de flavonoides dos sucos de laranja Pera e Moro	53
Tabela 4. Consumo médio de ração e leite condensado dos grupos de animais submetidos à dieta controle e hiperlipídica e hiperglicídica	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Akt	Proteína quinase B
ALG	Ácidos graxos livres
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
ANOVA	Análise de variância
ARE	Elemento de resposta antioxidante
AS160	Substrato de 160 kDa
ASC	Área sob a curva
BHT	Hidroxitolueno butilado
BSA	Albumina do soro bovino
CAT	Catalase
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CTL	Controle
DAD	Detector de arranjo de diodos
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DCV	Doenças cardiovasculares
DM	Diabetes melito
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAc	Ácido desoxirribonucleico complementar
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
ER	Espécies reativas
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GLUT-4	Transportador de glicose tipo-4
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GST	Glutaciona S-transferase
HE	Hematoxilina e Eosina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio

HLG	Dieta hiperlipídica e hiperglicídica
HOMA-IR	Modelo de avaliação da homeostase
HO-1	Heme oxigenase-1
HO•	Radical hidroxila
HOCl	Ácido hipocloroso
HOO•	Radical perhidroxila
IL-6	Interleucina-6
IpGTT	Teste de tolerância intraperitoneal à glicose
IpITT	Teste de tolerância intraperitoneal à insulina
IRS	Substrato do receptor da insulina
IRS-1	Substrato do receptor da insulina-1
Kcal	Quilocaloria
Keap1	Proteína associada a ECH de tipo Kelch 1
KI	Iodeto de potássio
Kitt	Taxa de decaimento da glicose
MDA	Malondialdeído
NaCl	Cloreto de sódio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NaOH	Hidróxido de sódio
NEPA	Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação
NBT	Nitroazul de tetrazólio
NO•	Óxido nítrico
NO ₂ •	Dióxido de nitrogênio
NOX	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido oxidase
Nrf2	Fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2
ONOO-	Peroxinitrito
OTM	Momento da cauda de Olive
O ₂ •-	Ânion radical superóxido
¹ O ₂	Oxigênio singlete
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PKD1	Fosfatidilinositol-quinase dependente de proteína 1

PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PI3K	Fosfatidil inositol 3-quinase
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PMS	Metossulfato de fenazina
RI	Resistência à insulina
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SLM	Suco de laranja moro
SLP	Suco de laranja pera
SOD	Superóxido dismutase
TA	Tecido adiposo
TACO	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloacético
TED	Eficiência das dietas
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
TEP	1, 1, 3, 3-tetraetoxipropano
TG	Triglicérides
TLR4	Toll-like receptor 4
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
Tris	(Hidroximetil)aminometano
UA	Unidade arbitrária

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
1.1. Revisão de literatura	25
1.1.1. Doenças Crônicas Não-Transmissíveis (DCNT) e padrão alimentar	25
1.1.2. Obesidade, estresse oxidativo e inflamação acarretando na progressão da resistência à insulina	26
1.1.3. Capacidade antioxidante de sucos de laranja, variedades Pera e Moro	32
2. JUSTIFICATIVA	36
3. HIPÓTESE DO ESTUDO	37
4. OBJETIVO	38
4.1. Objetivo geral	38
5. MATERIAL E MÉTODOS	39
5.1. Material	39
5.2. Delineamento experimental	39
5.2.1. Animais	39
5.2.2. Desenho experimental	39
5.3. Teste de tolerância intraperitoneal à insulina	42
5.4. Teste de tolerância intraperitoneal à glicose	42
5.5. Eutanásia dos animais e coleta das amostras	42
5.6. Cálculo do índice HOMA-IR (<i>Homeostasis Model Assessment</i>)	43
5.7. Caracterização química dos sucos de laranja	43
5.7.1. Quantificação de sólidos solúveis - Grau Brix	43
5.7.2. Açúcares totais	43
5.7.3. Ácido orgânico	43
5.7.4. Identificação e caracterização de flavonoides	44
5.7.4.1. Extração e separação em fase sólida	44
5.7.4.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector Diodo Array	44

5.8. Determinação de biomarcadores de estresse oxidativo e lipoperoxidação	45
5.8.1 Quantificação de proteínas	45
5.8.2 Atividade enzimática da Superóxido dismutase	45
5.8.3 Atividade enzimática da Catalase	46
5.8.4 Atividade enzimática da Glutathiona peroxidase	46
5.8.5 Quantificação de Malonaldeído	47
5.9. Marcadores de dano oxidativo ao DNA	48
5.9.1 Eletroforese alcalina em gel em hepatócitos (Ensaio do Cometa)	48
5.10. <i>Western blotting</i>	49
5.10.1 Extração de proteína	49
5.10.2 Quantificação de proteína	50
5.10.3 Preparo do gel de poliacrilamida	50
5.10.4 Preparo de lisado de proteínas para SDS-PAGE e “western blotting”	50
5.10.5 Transferência de proteínas do gel para a membrana (nitrocelulose)	50
5.10.6 Sondagens das proteínas com anticorpos	51
5.10.7 Revelação com sistema quimioluminescente	51
5.11. Análise estatística dos dados	51
6. RESULTADOS	52
6.1. Caracterização química dos sucos de laranja	52
6.2. Efeito do consumo da dieta e da suplementação com sucos de laranja sobre peso corporal, ingestão calórica, consumo alimentar e homeostase glicêmica	53
6.3. Peroxidação lipídica	60
6.4. Marcadores de dano oxidativo	61
6.5. Atividade de enzimas antioxidantes	62
6.6. Quantificação de enzimas antioxidantes e Nrf2	63
7. DISCUSSÃO	66
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	70

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
ANEXO 1. Aprovação do trabalho pela Comissão de Ética no Uso de Animais	85
ANEXO 2. Tabela de composição nutricional do mix de minerais, que fornece as concentrações recomendadas de vitaminas para a dieta controle	86
ANEXO 3. Tabela de composição nutricional do mix de vitaminas, que fornece as concentrações recomendadas de vitaminas para a dieta controle	87
ANEXO 4. Ficha do aluno gerada pelo sistema administrativo da pós-graduação	88
ANEXO 5. Currículo do Sistema de Currículos Lattes	90

1. INTRODUÇÃO

O fácil acesso a alimentos hipercalóricos, a ingestão de refeições ricas em gorduras e açúcares, bem como o aumento expressivo do sedentarismo, contribuem diretamente com o aumento da progressão de indivíduos com sobrepeso e obesidade (POPKIN, 2015; NURWANTI et al., 2018). Tais fatores estão associados ao desenvolvimento de diversas doenças, tais como diabetes, hipertensão, dislipidemia, aterosclerose e câncer (MATSUDA; SHIMOMURA, 2013; WHO, 2017).

O estresse oxidativo é um dos mecanismos subjacentes a estas alterações ocasionadas pela sobrecarga nutricional, que concomitante à indução de uma resposta inflamatória subclínica, hiperglicemia, hiperlipidemia e redução das defesas antioxidantes, pode acarretar no desenvolvimento de resistência à insulina e posterior progressão para o desenvolvimento da diabetes melito (DM) tipo 2 (MENG et al., 2011; CHARRADI et al., 2013; HUANG e tal., 2015; LECHUGA-SANCHO et al., 2018). Em contraste, o consumo de compostos antioxidantes, presentes em frutas e vegetais, poderiam auxiliar na melhora do estado fisiológico, atenuando o quadro de estresse oxidativo e inflamatório (MATSUZAWA-NAGATA et al., 2008; SEN et al., 2010; NOWAK et al., 2018).

Os compostos bioativos da laranja da variedade Pera, entre eles as flavanonas hesperitina e naringenina, são potentes antioxidantes, além de apresentarem propriedades anti-inflamatória e hipolipidêmica (MANACH et al., 2003; CROZIER; JAGANATHB; CLIFFORD, 2009; SIMPSON; MENDIS; MACDONAL, 2016). Além das flavanonas, a laranja da variedade Moro, apresenta uma classe adicional de flavonoides, denominada antocianinas, também com elevada propriedade antioxidante e anti-inflamatória (HASSIMOTTO; PINTO; LAJOLO, 2008; GROSSO et al., 2013; JENNINGS et al., 2014; FALLICO et al., 2017).

Diante desse contexto, considerando as diferenças no perfil de flavonoides das laranjas Pera e Moro, o presente trabalho buscou avaliar o efeito da ingestão de sucos elaborados destas duas variedades sobre os parâmetros oxidativos de camundongos com resistência à insulina, induzida por uma dieta hiperlipídica e hiperglicídica, e também de camundongos saudáveis.

1.1. Revisão de literatura

1.1.1. Doenças Crônicas Não-Transmissíveis (DCNT) e padrão alimentar

As DCNT são classificadas como uma das principais causas mundiais de morbimortalidade. No Brasil, cerca de 80% das mortes são atribuídas a estas doenças, com destaque para as doenças cardiovasculares (DCV), alguns tipos de câncer, doenças respiratórias crônicas e DM tipo 2. Entre os principais fatores de risco envolvidos estão o tabagismo, consumo excessivo de álcool, sedentarismo e inadequação alimentar (STEMMER et al., 2012; WHO, 2017).

No Brasil, há um crescimento expressivo de indivíduos com obesidade, que acomete todas as faixas etárias, decorrente, principalmente, de alterações no padrão alimentar. De acordo com a Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica, o consumo exacerbado de alimentos processados e deficiente em frutas e verduras, caracteriza um dos principais fatores associados ao aumento do sobrepeso e obesidade (HEIJDEN et al., 2015; VARGAS-ROBLES et al., 2015; ABESO, 2015).

Este fato corrobora intimamente com o processo de transição nutricional. Entre os principais fatores envolvidos na alteração do comportamento alimentar, destaca-se a redução do número de refeições realizadas em domicílio e, conseqüentemente, o fácil acesso a alimentos com maior densidade energética e menor valor nutricional, que são intensificados na ausência de atividade física, contribuindo também com mudanças na composição corporal (POPKIN, 2015; BEZERRA et al., 2017).

Atualmente, este padrão alimentar assemelha-se a dieta amplamente conhecida e denominada como “dieta ocidental”, caracterizada pelo elevado consumo de alimentos calóricos e com alto teor de gordura. Considerando a alta concentração de sódio, sacarose, gorduras saturadas e *trans*, baixa quantidade de micronutrientes e de fibras alimentares, diversos estudos associam este padrão alimentar ao aumento do risco de obesidade, síndrome metabólica, DM tipo 2 e DCV (ASTRUP et al., 2008; KOBORI et al., 2011), com decorrente acúmulo de lipídeos no tecido adiposo, fígado, coração, artérias e músculos (LIRA et al., 2011; ZINÖCKER; LINDSETH, 2018).

Sendo assim, grande parte das disfunções metabólicas associadas às DCNT, entre elas as dislipidemias, resistência à insulina, hiperglicemia e hipertensão arterial sistêmica, podem ser atribuídas à baixa qualidade nutricional das dietas, paralela a outros fatores

relacionadas ao estilo de vida como o sedentarismo, tabagismo e a ingestão de bebidas alcoólicas, configurando o marco crescente da obesidade e outras DCNTs (NOEMAM; HAMOODA; BAALASH, 2011; PEÑA-OYARZUN et al., 2018).

1.1.2. Obesidade, estresse oxidativo e inflamação acarretando na progressão da resistência à insulina

A insulina é um hormônio secretado pelas células β das ilhotas pancreáticas de *Langerhans*, em resposta às variações no nível circulante de glicose e ácidos graxos, no período pós-prandial, estimulando a captação de glicose pelos tecidos periféricos. Atua na modulação de diversas funções celulares, como metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, crescimento e diferenciação celular e homeostase glicêmica (FU; GILBERT; LIU, 2013; RODER et al., 2016).

Os principais órgãos e tecidos que atuam em resposta a este hormônio são o fígado, músculo esquelético e tecido adiposo. O músculo esquelético é o local com maior índice de absorção e armazenamento de glicose, responsável por cerca de 75% da captação de glicose do organismo sob o estímulo da insulina, além de promover a síntese de glicogênio (LI et al., 2015). No tecido adiposo, a insulina suprime a lipólise, promovendo a captação de glicose e a lipogênese. No fígado, estimula a lipogênese e a síntese de glicogênio, inibindo a gliconeogênese (QATANANI; LAZAR, 2007; CARVAJAL, 2015).

De maneira geral, após secretada, a insulina se liga ao receptor de insulina formado por proteínas denominadas como substrato do receptor de insulina (IRS), este possui uma subunidade α na parte exterior da célula, com sítio de ligação para a insulina e uma subunidade β localizada no citoplasma celular, que leva a eventos de sinalização *downstream*. Essa ativação estimula a translocação do transportador de glicose tipo 4 (GLUT-4) para a membrana celular, permitindo a captação de glicose (**Figura 1**) (BOUCHER; KLEINRIDDERS; KAHN, 2014).

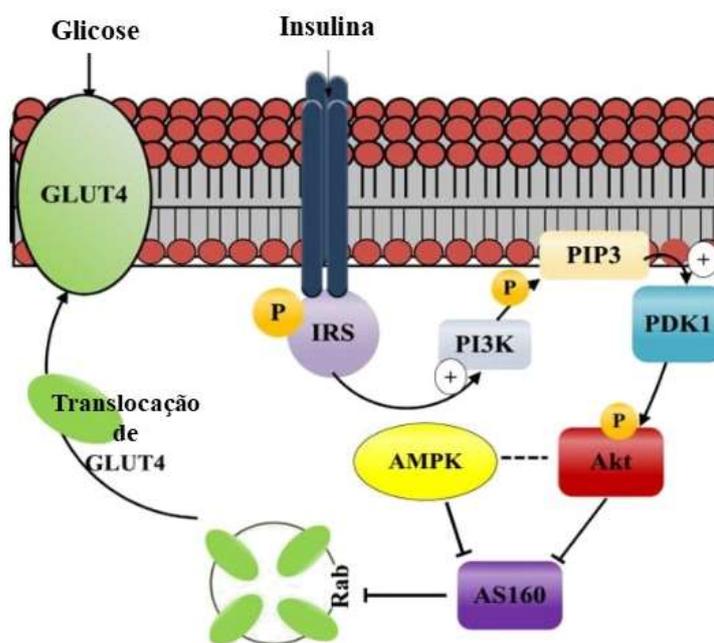


Figura 1. Via de sinalização da insulina. (AKT, proteína quinase B; AMPK, proteína quinase ativada por AMP; AS160, Akt substrato de 160 kDa; GLUT-4, transportador de glicose-4; IRS, substrato do receptor da insulina; P, fosforilação; PDK1, fosfatidilinositol-quinase dependente de proteína 1; PIP3, fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato; PI3K, fosfatidil inositol 3-quinase). Adaptado de: SILVA, 2016.

A resistência à insulina é uma condição onde os níveis normais ou elevados de insulina são insuficientes para promover uma resposta eficiente dos tecidos periféricos na captação de glicose. A hiperinsulinemia compensatória ocorre quando há uma secreção excessiva de insulina pelas células β pancreática afim de manter os níveis adequados de glicose no sangue, caracterizando a resistência periférica à insulina no músculo e no tecido adiposo. Além disso, a resistência hepática à insulina está associada com o prejuízo à supressão da gliconeogênese no fígado, resultando em hiperglicemia. Sendo assim, as alterações advindas da resistência à insulina podem ser devido a supersecreção ou resistência variável às suas ações (WILCOX, 2005).

Estudos demonstram que a administração de uma dieta hiperlipídica e hiperglicídica, contribui para a elevação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e ácidos graxos livres circulantes, provocando comprometimento da via de sinalização da insulina, resultando em um quadro de hiperinsulinemia compensatória, a qual, quando prolongada, promove a disfunção nas células β pancreáticas e hiperglicemia. Ademais, o comprometimento na via de

sinalização pode também acarretar na redução do número de vesículas de GLUT-4, menor captação de glicose e aumento do quadro de estresse oxidativo (CERIELLO; MOTZ, 2004; DE MOURA et al., 2012; ALAM; KAUTER; BROWN, 2013).

O aumento dos níveis de ácidos graxos livres circulantes, promove acúmulo de triglicérides e de metabólitos secundários do metabolismo lipídico, em diversos órgãos e tecidos, tais como fígado, tecido adiposo e coração (LI et al., 2015). O excesso destes metabólitos pode acarretar na apoptose de células β pancreáticas, redução da fosforilação do IRS-1 e inativação da PI 3-quinase, alterando a via de sinalização da insulina e contribuindo com o desenvolvimento da resistência a este hormônio (FU; GILBERT; LIU; 2013).

Ainda, a sobrecarga nutricional, decorrente da obesidade, também pode promover aumento na síntese de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, no tecido adiposo. O TNF- α é capaz de suprimir a fosforilação da tirosina presente no IRS-1, reduzindo sua atividade e desencadeando a resistência a ação da insulina (BASTOS; ROGERO; ARÊAS, 2009). Este processo também é caracterizado pelo comprometimento do transporte de glicose e inibição da lipólise. Todavia, a obesidade pode produzir resistência à insulina nos adipócitos através de mecanismos autônomos das células, ou como detalhado acima, através das interações entre os adipócitos e mediadores inflamatórios (HARDY; CZECH; CORVERA, 2012).

O estresse oxidativo gerado pelo acúmulo de lipídeos e carboidratos, advindos da alimentação, também contribui com o aumento do metabolismo celular, da cadeia transportadora de elétrons, da síntese de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, afetando de forma negativa a via de sinalização da insulina e facilitando o desenvolvimento da resistência à ação deste hormônio nos tecidos periféricos (PAULI et al., 2009; HARDY; CZECH; CORVERAA, 2012; FRANCISQUETI; NASCIMENTO; CORRÊA, 2015).

O estresse oxidativo consiste no estado de desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e as defesas antioxidantes pela disfunção de diversas vias de sinalização. As espécies reativas, radicalares ou não radicalares, podem ser produzidas por fatores endógenos ou exógenos (**Figura 2**) (PIZZINO et al. 2017). Dentre as principais espécies radicalares derivadas do oxigênio, também denominadas de EROs, estão o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical peroxila (HOO^{\bullet}) e o radical hidroxila (HO^{\bullet}). Dentre as espécies não radicalares estão o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$) e o oxigênio singlete (1O_2). As espécies radicalares derivadas do nitrogênio são representadas pelo óxido nítrico ($\bullet NO$) e o

dióxido de nitrogênio ($\bullet\text{NO}_2$), e as não radiculares pelo peroxinitrito (ONOO^-) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2015).

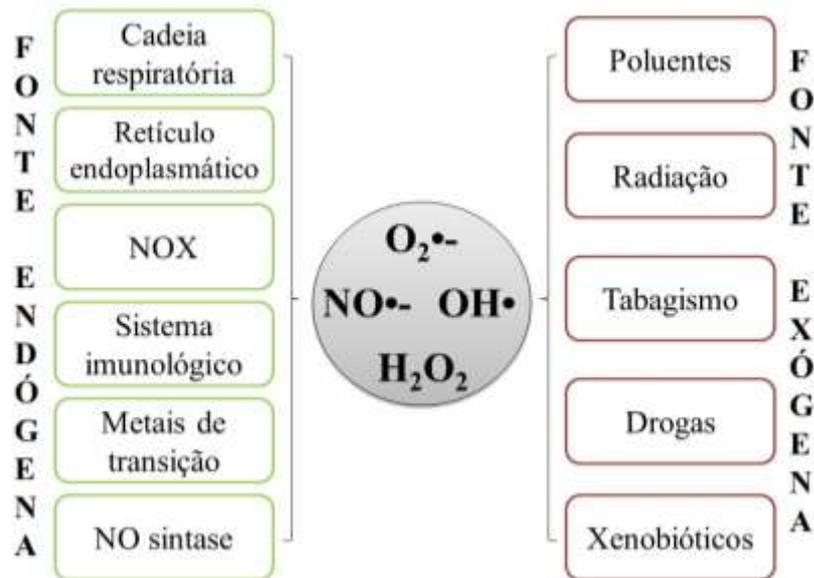


Figura 2. Principais vias endógenas e exógenas de produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Adaptado de: BHATTACHARYYA et al. 2014. ($\text{O}_2^{\bullet-}$) ânion radical superóxido, ($\text{HO}\bullet$) radical hidroxila, (H_2O_2) peróxido de hidrogênio, ($\bullet\text{NO}$) óxido nítrico, (NO sintase) óxido nítrico sintase.

O aumento da taxa de oxidação da glicose, ocasionada por uma dieta hiperglicídica e hiperlipídica, promove a elevação da síntese de produtos finais de glicação avançada e de lipídeos, respectivamente, estes estimulam a atividade da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase, gerando aumento da atividade do ciclo do ácido cítrico, NADH mitocondrial e EROs (LOPES; OLIVEIRA; FORTUNATO, 2008; MA, 2015).

No tecido adiposo é observado o estresse oxidativo e também a ativação de vias inflamatórias (VINCENT; TAYLOR, 2006). Vários são os fatores que contribuem para o estresse oxidativo na obesidade, tais como a hiperglicemia, o aumento dos níveis de lipídios nos tecidos, a inflamação crônica, o aumento da formação de radicais livres e a diminuição de defesas antioxidantes, sendo que o estresse oxidativo pode ser o mecanismo subjacente ao desenvolvimento das comorbidades relacionadas à obesidade (MORELLI et al., 2018).

As EROs também são responsáveis por iniciar o processo de peroxidação lipídica, caracterizado por três principais fases, sendo elas iniciação, propagação e terminação, responsáveis por promover a degradação oxidativa desses compostos (**Figura 3**) (AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014). Segundo Murdolo et al. (2013), as vias para produção de EROs aumentam tanto no fígado, quanto no tecido adiposo de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, concomitante à elevação de marcadores inflamatórios e ácidos graxos livres no sangue e fígado, sugerindo que o estresse oxidativo seja uma das etapas no processo inicial da obesidade.

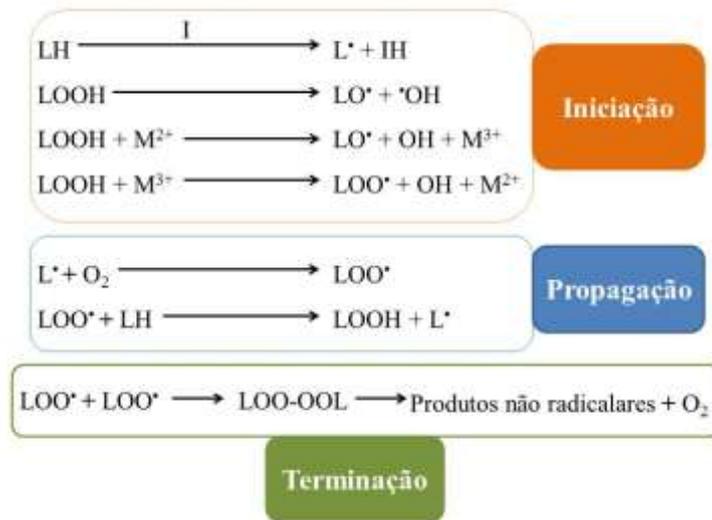


Figura 3. Etapas da oxidação lipídica e da catálise mediada por metais. (I, iniciador que pode ser uma espécie reativa; LH, ácido graxo; L^{\bullet} , ácido graxo com radical centrado no carbono; $LOO^{\bullet}/LO^{\bullet}$, radical peroxila e alcóxila; LOOH, hidroperóxido; M, metais). Adaptado de: AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014.

Como mecanismo de proteção contra estes danos oxidativos, o organismo possui sistemas de defesa antioxidante não enzimático e enzimático. As defesas antioxidantes não enzimáticas incluem as vitaminas (A, C e E), os carotenoides (licopeno, α e β caroteno), minerais (zinco e selênio), polifenóis (ácidos fenólicos e flavonoides), entre outros (RATNAM et al., 2006; SEN et al., 2010; PIZZINO et al. 2017). O sistema enzimático é constituído pela superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx)

(KATHIRVEL et al., 2009; TANGVARASITTICHAJ, 2015), que visam equilibrar a produção exacerbada de EROs (TIWARI et al., 2013).

A SOD é responsável pela conversão de ânion superóxido em H_2O_2 que, pela ação de duas enzimas, CAT e GPx, é reduzido a H_2O . Uma vez que ocorra comprometimento da atividade destas duas últimas enzimas, ocorre a formação de radical hidroxila a partir do H_2O_2 , através da reação de *Fenton* ou de *Haber-Weiss* (**Figura 4**) (WYDRA et al., 2015). Vale ressaltar que o H_2O_2 não é um radical livre, mas tem a capacidade de formar o radical hidroxila; esse radical é uma das EROs mais reativas, podendo iniciar reações em cadeia gerando peróxidos lipídicos e radicais orgânicos (FISCHBACHER; SONNTAG; SCHMIDT, 2017).

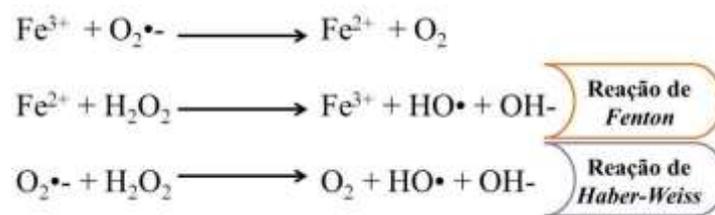


Figura 4. Reações de *Fenton* e *Haber-Weiss*, resultando na geração de radicais hidroxilas, na presença de ferro. Adaptado de: WYDRA et al., 2015.

A expressão dos genes que codificam as enzimas antioxidantes é regulada através da ligação do Fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) ao elemento de resposta antioxidante (ARE). Em particular, a expressão de enzimas antioxidantes, como Heme oxigenase-1 (HO-1), CAT, SOD, GPx e também enzimas de detoxicação de fase II, é regulada pelo Nrf2 (**Figura 5**) (KATHIRVEL et al., 2009; BRYAN et al., 2013; GUPTE; LYON; HSUEH, 2013).

O Nrf2 é expresso em muitos tecidos como fígado, rins, pele e pulmões, localizado no citoplasma ligado a Proteína associada a ECH de tipo Kelch 1 (Keap1). Quando as células estão expostas ao estresse oxidativo, este é desassociado da Keap1 e translocado para o núcleo, onde se liga ao elemento de resposta antioxidante (ARE), promovendo a expressão dos genes de enzimas antioxidantes, permitindo a atenuação do quadro de estresse oxidativo,

mediado por EROs ou outros radicais (**Figura 5**) (HYEONG-SEON et al., 2010; HWANG et al., 2011; HO et al., 2012; WU et al., 2014).

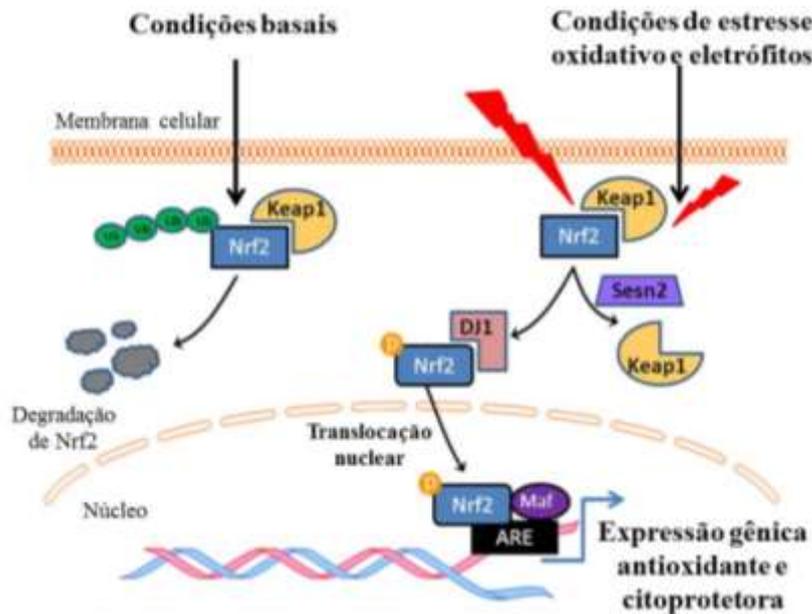


Figura 5. Regulação e ativação de Nrf2 sob condições basais e estresse. Em condições basais, Keap1 impede a translocação de Nrf2 para o núcleo, contribuindo com a degradação de Nrf2 mediada por ubiquitina. Em condições de estresse, Sens2 induz a degradação de Keap1, liberando Nrf2, que é fosforilado e ativado sob a proteção da proteína deglicase DJ1, e translocado para o nuclear. No núcleo, Nrf2 ativo interage com o elemento de resposta antioxidante (ARE) e em coordenação com diversos co-fatores (proteínas Maf) induz a expressão de genes antioxidantes. Adaptado de: GUPTE; LYON; HSUEH, 2013.

1.1.3. Capacidade antioxidante de sucos de laranja, variedades Pera e Moro

O aumento da ingestão de alimentos fontes em compostos antioxidantes pode auxiliar na melhora do estado fisiológico, bem como reduzir o risco de desenvolvimento de diversas doenças (SEM et al., 2010; PIZZINO et al. 2017). Os compostos bioativos advindos da dieta são capazes de modular a expressão de enzimas antioxidantes, em especial, os flavonoides, contribuindo de forma benéfica auxiliando no sistema de defesa antioxidante (HASSIMOTTO; LAJOLO, 2011) e, conseqüentemente, reduzem o quadro de estresse oxidativo, além de atuarem como antioxidantes (FERNANDEZ-PANCHON et al., 2008; DOURADO; CESAR, 2015).

A laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) é um dos frutos mais consumidos pela população brasileira, na forma de suco e também *in natura*. De acordo com a coloração da polpa são classificadas em três grupos, laranja clara, laranja sanguínea e a laranja falsa sanguínea (XU et al., 2006). O cultivo da laranja no Brasil é predominantemente da laranja clara, principalmente as variedades Pera, Valência, Natal e Hamlin (TAZIMA et al., 2010). O fruto possui elevada quantidade de flavonoides (ARABBI et al., 2004), em especial, as flavanonas, tais como eridictiol, hesperitina e naringenina (**Figura 6**), estas duas últimas glicosiladas à rutinose (MANACH et al., 2003; DEL RIO et al., 2013). A distribuição desses compostos é limitada nos alimentos (PANDEY; RIZVI, 2009) e estão presentes, exclusivamente, em frutas cítricas e algumas ervas aromáticas como a hortelã (ARBONA; IGLESIAS; GÓMEZ-CADENAS, 2015).

A naringenina apresenta ação anti-inflamatória e antioxidante e sua suplementação poderia ser utilizada como recurso de intervenção em quadros de obesidade, hipertensão, diabetes e síndrome metabólica (ALAM, et al., 2014). Alguns efeitos positivos foram observados pela suplementação de 100 mg/kg/dia de naringenina 7-*O*-glicosídeo em ratos tratados com dieta hiperlipídica e hiperglicídica, durante oito semanas. Dentre eles, a melhora na disfunção mitocondrial hepática e na intolerância à glicose, redução de concentrações plasmáticas de lipídeos, melhora na função e estrutura do fígado e coração e normalização da pressão arterial sistólica (ALAM; KAUTER; BROWN, 2013).

A laranja sanguínea (**Figura 6**) é uma fruta típica do leste da Sicília (sul da Itália), Espanha e Califórnia, que além de ser fonte de flavanonas, apresenta outra classe de flavonoides, as antocianinas. As antocianinas são denominadas pigmentos vegetais polifenólicos solúveis em água que conferem coloração azul, roxa ou vermelha aos frutos, neste caso, a cianidina 3-*O*-glucosídeo, é o pigmento majoritário responsável por conferir coloração vermelha ao fruto. Vale ressaltar que as antocianinas não estão presentes em outras frutas cítricas. As principais variedades da laranja sanguínea são a Moro, Tarocco e Sangunello (RISO et al., 2005; GROSSO et al., 2013).

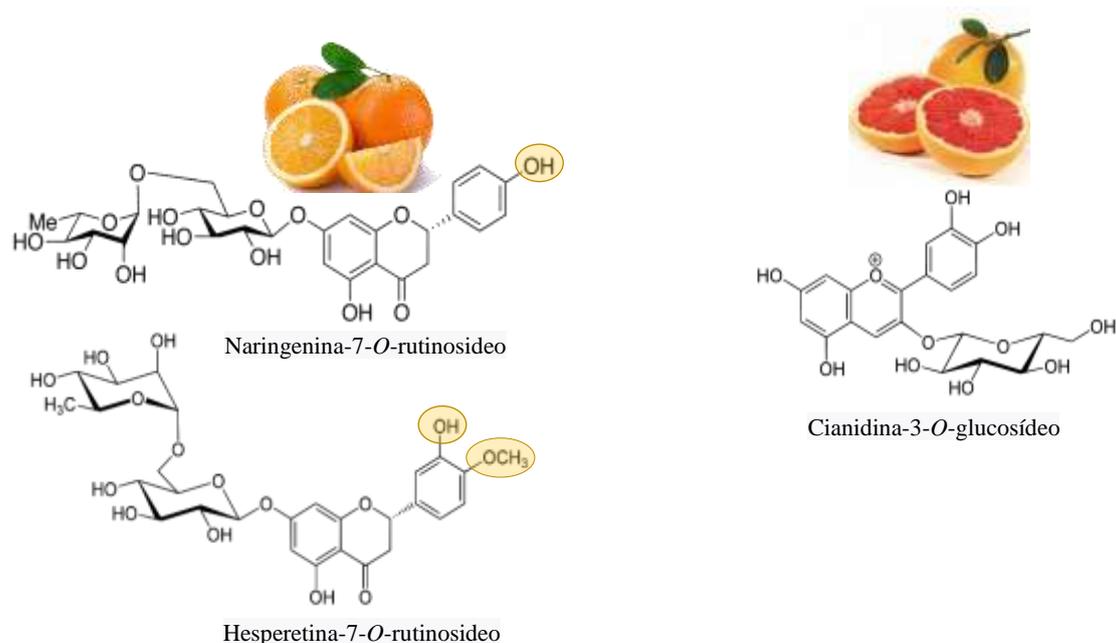


Figura 6. Laranjas, variedade Pera e Moro, e os principais flavonoides.

Diversas propriedades biológicas têm sido atribuídas a hesperidina (Hesperitina 7-*O*-rutinosídeo), tais como atividade anti-inflamatória, hipolipidêmica, imunomoduladora (DOURADO; CESAR, 2015), antioxidante (HAIDARI et al., 2009), anticarcinogênica (WANG et al., 2013) e quimiopreventiva (PANDEY; RIZVI, 2009).

Além disso, as antocianinas apresentam propriedades anticarcinogênica, anti-inflamatória, neuroprotetora e antioxidantes, e também poderiam ser utilizadas como recurso adicional na terapêutica de doenças cardiovasculares, obesidade e diabetes (LI et al, 2015). Os alimentos ricos em antocianinas, tais como uva, *berries*, vinho, entre outros, auxiliam na redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias, e na modulação do GLUT-4 permitindo a adequada captação de glicose sob o estímulo da insulina (JENNINGS et al., 2014).

De acordo com Grosso et al. (2013), a ingestão de suco de laranja sanguínea apresentou efeito positivo sobre o metabolismo lipídico, como redução do colesterol total e triglicérides, permitindo o aumento da sensibilidade à insulina, em humanos (GROSSO et al., 2013). Paralelamente a isso, a administração isolada de hesperidina e naringina pode auxiliar na atenuação do estresse oxidativo, em modelo de ratos diabéticos, ativando o sistema de defesa antioxidante e assim aumentando a atividade das enzimas antioxidantes CAT, GPx e SOD, bem como reduzindo os mediadores inflamatórios e, conseqüentemente as complicações oriundas do diabetes (LI et al., 2006; MAHMOUND et al., 2012).

Além da atenuação do quadro de estresse oxidativo, através da inibição de EROs e de genes pró-inflamatórios, observado pela ingestão de suco de laranja Pera ou de flavanonas isoladas (DANDONA et al., 2010), o consumo de suco de laranja sanguínea, também é capaz de elevar a capacidade antioxidante plasmática, relacionado principalmente ao aumento plasmático de antioxidantes exógenos, entre eles a vitamina C, a antocianina cianidina 3-*O*-glucosídeo, e os carotenoides zeaxantina e β -criptoxantina (RISO et al., 2005).

Logo, a ingestão de suco de laranja em indivíduos submetidos à dieta hiperlipídica e hiperglicídica poderia auxiliar na redução do quadro de estresse oxidativo, por meio da diminuição dos níveis de EROs, redução da peroxidação lipídica, elevação da capacidade antioxidante total, diminuição de lipídeos séricos, aumento dos níveis plasmáticos de vitamina C, potássio e ácido fólico e redução de citocinas pró-inflamatórias (DOURADO; CESAR, 2015).

2. JUSTIFICATIVA

Na obesidade, a sobrecarga nutricional decorrente de uma dieta hiperlipídica e hiperglicídica, resulta em alterações no perfil lipídico em diversos órgãos e tecidos, tais como fígado, coração e tecido adiposo. Estas alterações promovem o desenvolvimento do quadro de estresse oxidativo, devido aumento da formação de EROs, disfunção da via de sinalização da insulina, hiperglicemia e, conseqüente, resistência à ação da insulina (ALAM; KAUTER; BROWN, 2013).

Os compostos antioxidantes, presentes em frutas e hortaliças, podem melhorar o estado fisiológico, através da redução do estresse oxidativo e do processo inflamatório (SEN et al., 2010). O suco de laranja Pera é classificado como um potente antioxidante, devido a elevada quantidade de flavanonas (MANACH et al., 2003; CROZIER; JAGANATHB; CLIFFORD, 2009; YANG et al., 2012; WANG et al., 2013). Além das flavanonas, o suco de laranja sanguínea apresenta uma classe exclusiva de flavonoides, denominada de antocianinas, com também elevada propriedade antioxidante e anti-inflamatória (HASSIMOTTO; PINTO; LAJOLO, 2008; GROSSO et al., 2013; JENNINGS et al., 2014; LI et al., 2015).

Assim, considerando as diferenças no perfil de flavonoides dos sucos de laranja, das variedades Pera e Moro, no presente trabalho buscou-se avaliar o efeito do consumo de uma dieta hiperlipídica e hiperglicídica, bem como os efeitos da ingestão de ambos os sucos, sobre a modulação dos parâmetros oxidativos associados ao quadro de resistência à insulina.

3. HIPÓTESE DO ESTUDO

A dieta hiperlipídica e hiperglicídica, além do desenvolvimento da obesidade, contribui com alterações metabólicas em diversos órgãos e tecidos, tais como fígado e coração, acarretando em um quadro de estresse oxidativo e resistência à insulina. No entanto, possivelmente, os compostos bioativos presentes nos sucos de laranja, das variedades Moro e Pera, podem ser capazes de atenuar o quadro de estresse oxidativo, decorrente da sobrecarga nutricional, atenuando um dos fatores responsáveis pelo agravo decorrente deste tipo de dieta.

4. OBJETIVO

4.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito da ingestão crônica de sucos de laranja, variedades Moro e Pera, sobre os parâmetros oxidativos de camundongos saudáveis e com resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica e hiperglicídica.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Material

Os sucos de laranja (*C. sinensis*) sanguínea (variedade Moro) e clara (variedade Pera) pasteurizados em frascos de 1 litro, foram fornecidos pelo Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS) situada em Araraquara, SP. Após a pasteurização, os sucos foram congelados em freezer a -20 °C. Para o oferecimento dos sucos aos animais, estes foram centrifugados a 3.200 x g/15 min/ 4°C.

5.2. Delineamento experimental

5.2.1. Animais

Neste estudo foi utilizado 52 camundongos da linhagem C57Bl/6 machos, com três semanas de idade (após desmame), pesando, aproximadamente, 14 g, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP). Os camundongos foram mantidos em ambiente climatizado a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, com umidade relativa do ar de $55 \pm 10\%$ e ciclo de iluminação 12h claro/12h escuro. Este protocolo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCF-USP sob protocolo 66.2016-P529 (**Anexo 1**).

5.2.2. Desenho experimental

Os animais foram divididos em seis grupos (n=8/9) (**Figura 7**), três grupos foram alimentados com dieta controle, composta por ração AIN 93G, descrita pela *American Institute of Nutrition* (REEVES; FORREST; FAHEY JUNIOR, 1993) e três grupos foram tratados com dieta hiperlipídica e hiperglicídica, constituída de ração AIN-93G modificada com 45% do valor energético total advindo de gordura saturada e suplementação com leite condensado, administrado em recipientes de vidro alocados dentro das gaiolas. Concomitantemente, dois grupos de cada tratamento receberam suco de laranja Moro (SLM) ou Pera (SLP), em substituição à água de beber, enquanto o terceiro grupo recebeu água, durante 12 semanas. As rações, o leite condensado, a água e os sucos de laranja foram fornecidos *ad libitum* e substituídos a cada dois dias. As composições das dietas e do leite

condensado estão discriminadas na **Tabela 1 e 2**. Foram alocados de três a quatro animais por gaiola. Vale ressaltar que, semanalmente, foi realizada a correção do leite condensado com *mix* de vitaminas e minerais, estabelecido por Reeves et al. (1993) (**Anexo 2 e 3**), baseando-se no consumo de ambas as rações.

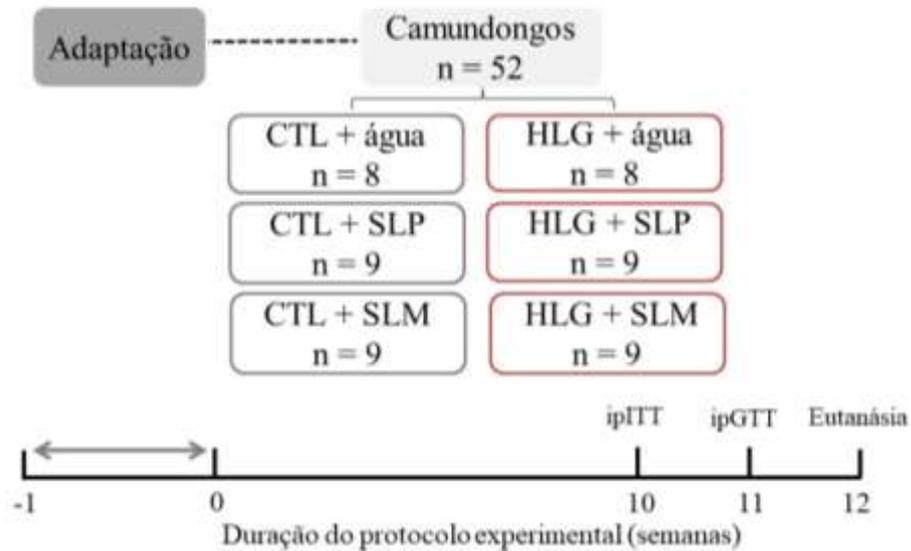


Figura 7. Desenho experimental geral. (CTL, dieta controle; HLG, dieta hiperlipídica e hiperglicídica; SLP, suco de laranja Pera; SLM, suco de laranja Moro).

O cálculo da eficiência das dietas (TED) foi realizado de acordo com a média de ganho de peso diário, dividido pela média de consumo de dieta total, em calorias, segundo fórmula abaixo (NASCIMENTO, 2006).

$$\text{TED} = \frac{\text{média de ganho de peso (g)}}{\text{média de consumo total (kcal)}}$$

O ganho de peso corpóreo, consumo alimentar de rações e leite condensado, e o volume de água e sucos ingeridos foram monitorados três vezes por semana, durante todo o experimento. O suco, no bebedouro, foi substituído a cada dois dias.

Tabela 1. Composição nutricional das rações.

Composição	Ração AIN-93G (dieta controle)	Ração AIN-93G - 45% gordura (dieta hiperlipídica)
Caseína	20,00	23,52
L-cisteína	0,30	0,35
Amido de milho	39,75	25,98
Maltodextrina	13,20	8,63
Sacarose	10,00	6,54
Celulose	5,00	5,88
Banha	0,00	15,28
Óleo de soja	7,00	8,23
Mix de minerais	3,50	4,12
Mix de vitaminas	1,00	1,18
Bitartarato de colina	0,25	0,30
Energia (Kcal/g)	3,96	4,71
Total	100,00	100,00

Valore expressos em g/100 g. Fonte: Adaptado de REEVES et al. (1993).

Tabela 2. Composição nutricional do leite condensado.

Composição	g/100g
Energia (Kcal/g)	313,0
Carboidratos	57,0
Proteínas	7,7
Gorduras totais	6,7
Gorduras saturadas	4,2
Colesterol	28,0
Cálcio	246,0
Fósforo	187,0
Sódio	94,0

Fonte: Adaptado do NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO (NEPA). Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO), 2014.

5.3. Teste de tolerância intraperitoneal à insulina (ipITT)

O ipITT foi realizado na 10^a semana. Os animais foram mantidos em jejum de oito horas, seguido de injeção intraperitoneal de insulina (Novolin R, 0,75 U/Kg de peso corporal). A glicemia foi determinada através da coleta de sangue da cauda nos tempos 0 (basal), 5, 10, 15, 30, 60 e 90 minutos após a administração de insulina. A medida da glicemia foi realizada com o auxílio de tiras *Active* e glicosímetro *Accu-Chek Advantage II* (Roche Diagnostics, Basel, Suíça). O cálculo da taxa de decaimento da glicose (Kitt) foi utilizado para avaliar a velocidade de redução da glicemia entre os grupos.

5.4. Teste de tolerância intraperitoneal à glicose (ipGTT)

O ipGTT foi realizado na 11^a semana. Os animais foram mantidos em jejum de oito horas, seguido de injeção intraperitoneal de 2 g de glicose/kg peso corporal, a partir de uma solução de glicose a 20% (WADA et al., 2010; WANG et al., 2010). Após esse procedimento, a glicemia foi determinada através de amostras de sangue coletadas da cauda nos tempos 0 (basal), 15, 30, 60, 90 e 120 minutos. A medida da glicemia foi realizada com o auxílio de fitas *Active* e glicosímetro *Accu-Chek Advantage* (Roche Diagnostics, Basel, Suíça). O sangue coletado foi utilizado para curva insulínica. O cálculo da ASC foi utilizado para avaliar a tolerância à glicose entre os grupos.

5.5. Eutanásia dos animais e coleta das amostras

Ao final do período de tratamento, de 12 semanas, os animais foram mantidos em jejum de 12 horas e, posteriormente, submetidos à anestesia inalatória de isoflurano, em seguida, eutanasiados por decapitação. Foram coletados o sangue, fígado coração e coxins adiposos (retroperitoneal e marrom).

O sangue foi coletado em tubos com EDTA, centrifugado a 2.800 x g/10 min/4 °C e as amostras de plasma foram armazenadas em freezer (-80 °C), para as análises bioquímicas. Os tecidos, fígado e coração, foram pesados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer (-80 °C).

5.6. Cálculo do índice HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment*)

Para a avaliação da resistência à ação da insulina foi utilizado o índice HOMA-IR, que possui como parâmetros a glicemia e a insulinemia de jejum. O índice HOMA-IR consiste no produto da concentração da glicose (mmol/L) e da concentração de insulina ($\mu\text{IU/mL}$), dividido pelo fator 22,5 (MATTHEWS et al., 1985). A concentração de glicose foi quantificada utilizando kit comercial validado da *Labtest*®, em analisador bioquímico automático. A concentração sérica de insulina foi quantificada por kit *Millipore ELISA*.

5.7. Caracterização química dos sucos de laranja

5.7.1 Quantificação de sólidos solúveis - Grau Brix (°Brix)

O teor de sólidos solúveis dos sucos foi avaliado com refratômetro digital portátil (modelo DR 201-95), em triplicata.

5.7.2 Açúcares totais

Amostras dos sucos foram filtradas em filtros PTFE (*Millipore* Ltda., i, USA) de 0,45 μm de poro e posteriormente analisados por CLAE acoplado a um detector pulsoamperométrico (Dionex, DX500, Sunnyvale, CA, USA). Foi utilizado uma coluna PA1 (250 x 4 mm, Dionex, Sunnyvale, CA, USA) e fase móvel constituído de NaOH 18 mM, em modo isocrático, por 25 min. O fluxo através da coluna foi de 1 mL/min. As amostras foram injetadas em duplicata e os açúcares identificados pelo tempo de retenção em comparação a padrões externos de sacarose, frutose e glicose (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) foram utilizados para a construção de uma curva de calibração com cinco pontos de concentração e aplicados em triplicata (GOMEZ; LAJOLO; CORDENUNSI, 2002). Os resultados foram expressos como g/L de suco.

5.7.3 Ácido orgânico

As amostras foram filtradas em filtros PTFE (*Millipore* Ltda., Bedford, USA) de 0,45 μm de poro. Em seguida, foram injetadas em sistema cromatográfico equipado com detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD) (Hewlett-Packard 1100, Agilent), em coluna $\mu\text{Bondpack C18}$ (300mm x 3.6 mm i.d., Waters, Milford, MA), com fase móvel de ácido

fosfórico a 0,1%, com fluxo de 0,5 mL/min. O monitoramento foi feito a 210nm. As amostras foram injetadas em triplicatas e os resultados expressos em mg/L de suco. O ácido orgânico foi identificado a partir do tempo de retenção e similaridade do espectro de absorção em comparação ao padrão comercial. O padrão de ácido ascórbico foi utilizado para a construção da curva de calibração utilizando cinco pontos de concentração e aplicado em triplicata (PASTERNAK et al., 2005). Os resultados foram expressos como mg/L de suco.

5.7.4 Identificação e caracterização de flavonoides

5.7.4.1 Extração e separação em fase sólida

Amostras dos sucos integrais foram centrifugadas a $3.200 \times g/15 \text{ min}/ 4^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante foi eluído em coluna de 1 g de Poliamida (CC 6, Macherey-Nagel), preparada em seringa própria de 6 mL (HPLC Technology), previamente pré-condicionadas pela passagem de metanol seguido por água deionizada. Após a passagem do extrato, a coluna foi lavada com água deionizada e a eluição dos compostos fenólicos foi realizada com metanol e posteriormente com metanol:NH₃ (99, 5:0,5, v/v). Os eluatos foram completamente secos através de rotaevaporação (Rotavapor, RE 120, Büchi, Flawil, Suíça), sob vácuo, a 40 °C. As amostras de suco de laranja cv. Pera, foram ressuspensas com metanol. Para amostras de suco cv. Moro, as amostras foram ressuspensas com metanol acidificado com ácido acético 5%, a seguir foram filtrados em filtros PTFE (Millipore Ltda., Bedford, USA) de 0,45 µm de poro. Quanto ao precipitado foi adicionado 20 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), sobre agitação, em temperatura ambiente *overnight*. Posteriormente foi filtrado em filtros PTFE (Millipore Ltda., Bedford, USA) de 0,45 µm de poro. A identificação de compostos fenólicos foi realizada por CLAE-DAD.

5.7.4.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector com Arranjo de Diodo (CLAE-DAD)

A quantificação de fenólicos foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em equipamento Agilent 2100 e Detector com Arranjo de Diodo (CLAE/DAD). Para a detecção de flavanonas, foi utilizada a coluna Prodigy 5 µ ODS3 (250 x 4,60 mm) (Phenomenex Ltd., Reino Unido) com fluxo de 1 mL/min, 25 °C. A eluição foi realizada com gradiente de solventes constituído por A: 0,5% ácido fórmico em água e B: 0,5% ácido fórmico em acetonitrila. O gradiente de concentração dos solventes constituiu em 8% de B no início, 10% em 5 min, 17% em 10 min, 25% em 15 min, 50% em 25 min, de 90% em 30 min,

50% em 32 min e 8% em 35 min – o tempo total de corrida foram de 35 minutos. O comprimento de onda para a leitura foi de 280 nm. Quanto a detecção de antocianinas, foi utilizada a coluna Prodigy 5 μ ODS3 (250 x 4,60 mm) (*Phenomenex Ltd.*, Reino Unido), com fluxo 0,8 mL/min, 25 °C. A eluição realizada com gradiente de solventes constituídos por A: água/ ácido fórmico/ acetonitrila (96:1:3 v/v/v) e D: água/ ácido fórmico/ acetonitrila (48:1:51 v/v/v). O gradiente de concentração dos solventes constituiu em 10% de D no início, 25% em 10 min, 31% em 15 min, 40% em 20 min, 50% em 30 min, 100% em 40 min, 10% em 45 min e 10% em 50 min – o tempo total de corrida foram de 50 minutos. O comprimento de onda para a leitura foi de 525 nm. A quantificação foi realizada utilizando curva de calibração com padrões de flavonoides e ácidos fenólicos identificados. Os resultados foram expressos como mg/L de suco.

5.8 Determinação de biomarcadores de estresse oxidativo e lipoperoxidação

5.8.1 Quantificação de Proteína

O conteúdo de proteínas do tecido hepático e tecido cardíaco foram quantificados, a partir do preparo de homogenato inicial das amostras, contendo o material biológico acrescido de tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,4, na proporção 1:5, com o auxílio de turrax (*Polytron, Kinematica*), em banho de gelo. A quantificação foi realizada utilizando o kit *BCA Protein Assay* da *Thermo Fisher Scientific*. As análises foram realizadas em triplicata. Este homogenato foi utilizado para a determinação da atividade de enzimas antioxidantes e quantificação de malonaldeído.

5.8.2 Atividade enzimática da Superóxido dismutase

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi determinada de acordo com metodologia proposta por Ewing; Janero (1995). A atividade é baseada em uma reação aeróbia entre Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo reduzido (NADH) e metossulfato de fenazina (PMS), gerando o radical $O_2^{\bullet-}$ sob pH não ácido. O nitroazul de tetrazólio (NBT) é utilizado como detector para avaliar dismutação do ânion superóxido através da redução do produto. Amostras de homogenato de tecidos hepático e cardíaco contendo 0,024 μ g/ μ L de proteína foram adicionadas aos poços da placa de microtitulação contendo 200 μ L de meio de reação preparado com 500 μ L de NBT, 730 μ L de NADH e 8,77 mL de fosfato de potássio

0,1M, pH 7,4 com EDTA 1 mM e, posteriormente, adiciona-se 25 μ L de PMS. A análise foi realizada a 26 °C, com leitura a cada 60 segundos a 560 nm, durante cinco minutos, em leitor de microplaca *Synergy H1* (*Biotek Instruments*, Winooski, VT, USA). Os resultados foram expressos em Unidade de Atividade (UA) por miligrama de proteína, a partir da curva padrão utilizando concentrações conhecidas de SOD (0,69 a 22,15 U SOD/mg de proteína) (Sigma, S8160).

5.8.3 Atividade enzimática da Catalase

A atividade da enzima catalase (CAT) foi determinada de acordo com metodologia proposta por Bonaventura et al. (1972). O método consiste, basicamente, na medida de decomposição de H_2O_2 pela CAT, através da leitura de absorbância a 240 nm. Amostras de homogenato de tecidos hepático e cardíaco na concentração de 0,05 μ g/ μ L de proteína foram adicionadas aos poços da placa de microtitulação de quartzo contendo 140 μ L de tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,4 com 10% de EDTA 1 mM e 40 μ L da solução de H_2O_2 30mM. A análise foi realizada a 30 °C, com leitura a cada 45 segundos a 240 nm, durante oito minutos, em leitor de microplaca *Synergy H1* (*Biotek Instruments*, Winooski, VT, USA). Os resultados foram expressos em UA por miligrama de proteína, a partir da curva padrão utilizando concentrações conhecidas de CAT (14,17 a 0,44375 U CAT/mg de proteína) (Sigma, C9322).

5.8.4 Atividade enzimática da Glutaciona peroxidase

A atividade da enzima glutaciona peroxidase (GPx) foi determinada de acordo com metodologia proposta por Flohé; Gunzler (1984). Amostras de homogenato de tecidos hepático e cardíaco na concentração de 2 μ g/ μ L de proteína foram adicionadas aos poços da placa de microtitulação de quartzo contendo 125 μ L de tampão de fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,4 com EDTA 1 mM, 5 μ L de glutaciona reduzida (GSH) e 5 μ L de glutaciona redutase (GR). A placa foi inicialmente incubada a 37 °C por cinco minutos e, em seguida, adicionada de 5 μ L de solução terc-butil hidroperóxido 0,46% e 30 μ L de solução de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzido (NADPH) 1,2 mM. A leitura da absorbância foi realizada a 37 °C, durante quatro minutos, a 340 nm, em leitor de microplaca *Synergy H1* (*Biotek Instruments*, Winooski, VT, USA). Os resultados foram expressos em UA por

miligrama de proteína, a partir da curva padrão utilizando concentrações conhecidas de GPx (1,5 a 50,0 U GPx/mg de proteína) (Sigma, G6137).

5.8.5 Quantificação de Malonaldeído

A peroxidação lipídica é analisada pela quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, em especial, o MDA (LEE et al., 2004). A quantificação de MDA no homogenato de tecido hepático e cardíaco foi determinada por CLAE acoplada a detector de fluorescência após reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA), como descrito por Hong et al. (2000), com adaptações. O método baseia-se na derivatização de MDA com TBA, no qual um mol de MDA, em meio ácido, reage com dois mols de TBA, formando um aduto (TBA-MDA). Inicialmente, 50 μ L de homogenato, diluído em tampão fosfato, foi adicionado de 12,5 μ L de hidroxitolueno butilado em etanol e 6,25 μ L de NaOH 10 M em microtubos de 1,5 mL. Posteriormente, as amostras foram mantidas em banho-maria a 60 °C, durante 30 minutos, logo após, foi adicionado 750 μ L de ácido tricloroacético 7,2% contendo 1% de iodeto de potássio e resfriado por 10 minutos. Em seguida, foram centrifugadas a 9.600 x g/4 °C/10 min, e o sobrenadante transferido para microtubos de 2,0 mL e adicionado de 250 μ L de TBA 0,6%. As amostras foram incubadas em banho-maria a 95 °C, durante 30 minutos e, após resfriadas, foi adicionado um volume de 750 μ L de butanol grau CLAE, homogeneizado em vortex por 15 segundos e centrifugado a 9.600 x g/4 °C/10 min. O sobrenadante foi filtrado em membrana de 13mm (Millex, *Millipore* Corp., Billerica, MA, USA).

A CLAE foi realizada em cromatógrafo modelo 1260 *Infinity* (Agilent), com injetor automático e detector de arranjo de diodos (DAD). O conjugado MDA-TBA (20 μ L) foi injetado em coluna analítica de fase reversa C18 5 μ m, 250 x 4.6 mm (*Phenomenex* AJ0-1287 – Torrance, USA) e a leitura acompanhada nos comprimentos de onda de excitação a 515 nm e emissão a 543 nm, com fluxo de 0,8 mL/min. A fase móvel foi constituída de 60% de tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,4 e 40% de metanol, em modo isocrático. A curva de calibração foi preparada com 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) nas concentrações 0,5 a 20 μ M e água milli-Q para o branco. Os resultados foram expressos como μ M de MDA/mg de proteína.

5.9 Marcadores de dano oxidativo ao DNA

5.9.1 Eletroforese alcalina em gel em hepatócitos (Ensaio do Cometa)

A versão alcalina do ensaio do cometa foi realizada de acordo com Ladeira et al. (2004), com adaptações. Amostras de fígado (0,3 g) foram picotados em 1000 μ L de tampão fosfato salino (PBS), formando uma suspensão celular. Para o preparo da lâmina, 200 μ l de agarose “*normal melting point*” foram colocadas sob uma lâmina limpa e deixadas em superfície horizontal *overnight*. Foi adicionado 15 μ L da suspensão celular e a agarose “*low melting point*” 0,5 % (Sigma, Cód. A9414) na lâmina previamente seca, e coberta com uma lamínula. Em seguida, as lâminas foram imersas em uma solução de lise gelada (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10mM Tris, 1% SDS, pH 10 com 1% Triton X-100 e 10% DMSO) a 4 °C, durante duas a 15 horas. Subsequentemente, foram expostas a um tampão alcalino (1 mM EDTA e 300 mM NaOH, pH ~13,4) por 20 minutos, a 4 °C. A eletroforese foi realizada neste tampão a 4 °C, por 30 minutos, a 25 V e 300 mA. Após a realização da eletroforese, as lâminas foram imersas em solução de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5) e deixadas secando em temperatura ambiente, *overnight*.

O processo de coloração com prata baseia-se no método proposto por Cerda et al. (1997). As lâminas foram transferidas para uma cubeta contendo solução de fixação (TCA 15%, Sulfato de zinco heptahidratado 5% e glicerol 5%), durante 10 minutos, seguido de lavagem com água destilada e secagem, *overnight*, a temperatura ambiente. As lâminas são submersas em solução de coloração composta por 32 mL de carbonato de sódio 5% e 68 mL de nitrato de prata (nitrato de amônio 0,02%, nitrato de prata 0,02%, ácido tungstosilícico 0,1% e formaldeído 0,05%), lavadas com água destilada e colocadas para secar, *overnight*, em temperatura ambiente.

Foram confeccionadas duas lâminas por animal de cada tratamento. A leitura das lâminas foi feita em microscópio óptico comum, com aumento de 100 a 400 vezes, concomitantemente a utilização do *software Komet 6.0* (Kinetic Imaging Ltd. – USA).

A leitura fornece informações referentes a dezessete parâmetros envolvidos no dano oxidativo, tais como: área do cometa, área da cabeça, área da cauda, intensidade média do cometa, intensidade média da cabeça, intensidade média da cauda, comprimento da cabeça, comprimento da cauda, porcentagem da cabeça, porcentagem da cauda e momento da cauda de *Olive*. De acordo com Olive et al. (1992), o momento da cauda de *Olive*, amplamente

conhecido pelo termo em inglês *Olive tail moment* (OTM), consiste no produto da porcentagem de DNA (intensidade cauda e cabeça), multiplicado pelo comprimento da cauda. Os valores são expressos em unidades arbitrárias (UA) (**Figura 8**).

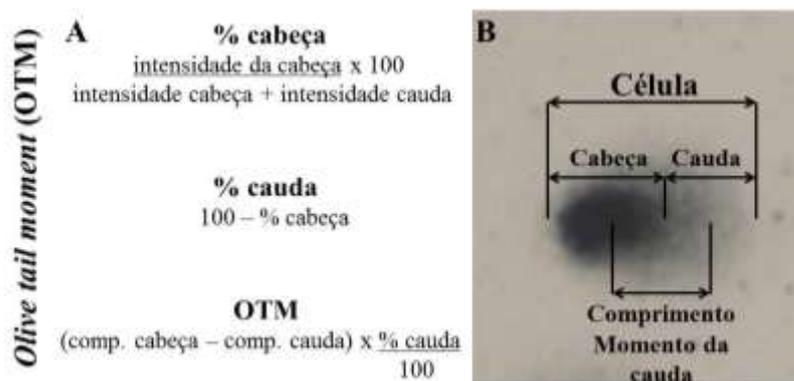


Figura 8. Fórmulas utilizadas para obtenção da porcentagem de migração do DNA, classificado como momento da cauda de Olive (A) e fotomicrografia para ilustração de um nucleíode com cauda (B), obtida de amostras de fígado de camundongos saudáveis na análise do ensaio cometa em microscópio óptico comum, submetido à coloração com prata. Aumento original 400x. Fonte: Laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular dos Alimentos da FCF/USP, 2018.

5.10 Western blotting

5.10.1 Extração de proteína

Após a dissecação dos tecidos hepático e cardíaco, 100 mg de amostras foram pulverizadas em nitrogênio líquido durante dez segundos e mantidas em microtubos para extração. Os tecidos foram homogeneizados em 1,2 mL de tampão para lise e extração das proteínas, contendo 20 mM Tris HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 2% Nonidet P-40, 1 mM EDTA (pH 8,00), 10% glicerol, 20 mM fluoreto de sódio, 30 mM pirofosfato de sódio, 0,2% SDS, 0,5% deoxicolato de sódio e água ultrapura. Foi acrescentado 1 mM PMSF, 1 mM ortovanadato de sódio, 50 mM leupeptina e 5 mM aprotinina (Sigma-Aldrich).

Foi utilizado homogeneizador elétrico tipo *polytron* (*Ika T10 basic*) na velocidade máxima, em 3 *burst* de cerca de 30 segundos cada. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 3.200 x g/15 min/ 4°C, resultando na separação de três camadas: “*fatcake*” (camada superior), proteínas extraídas (camada intermediária) e infranadante (camada inferior). Para a presente análise foi coletada a camada intermediária com auxílio de seringa e agulha, transferida para outro microtubo de 1,5 mL e armazenada em freezer -80 °C.

5.10.2 Quantificação de proteína

O conteúdo de proteínas do tecido hepático e tecido cardíaco foram quantificados utilizando o kit *BCA Protein Assay* da *Thermo Fisher Scientific*. As análises foram realizadas em triplicata.

5.10.3. Preparo do gel de poliacrilamida

Os géis foram preparados em bicamada, sendo a camada superior (gel de empilhamento) constituída de acrilamida a 5%, 125 mM Tris (pH 6,8), 0,1% SDS, 0,1% persulfato de amônia e 0,1% TEMED. Os géis inferiores (separação) foram preparados com poliacrilamida nas concentrações de 7,5 e 10%, 380 mM Tris (pH 8,8), 0,1% persulfato de amônia e 0,077% TEMED.

5.10.4. Preparo de lisado de proteínas para SDS-PAGE e “western blotting”

As amostras foram combinadas com tampão de amostra, contendo 240 mM Tris, (pH 6,8), 40% glicerol, 0,8% SDS, 200 mM beta-mercaptoetanol e 0,02% azul de bromofenol. Amostras com 0,25 µg de proteína foram aquecidas em banho-maria, por cinco minutos, com o intuito de desnaturar as proteínas, aplicadas no gel de poliacrilamida, com ponteiras para gel (diâmetro da ponta 0,57 mm), balizado por marcador padrão de peso molecular *Full-Range Rainbow* de 12.000 a 225.000 Da (*Amersham GE Healthcare*- RPN800E). A eletroforese foi realizada em cubas para gel (*Amersham GE Healthcare*), inicialmente a 60 V. Quando as proteínas atravessavam o gel de empilhamento, a voltagem foi aumentada para 120 V, sendo mantida até o final da corrida, cerca de 55 minutos.

5.10.5. Transferência de proteínas do gel para a membrana (nitrocelulose):

A membrana de nitrocelulose (*Amersham Hybond ECL Nitrocellulose*) foi, previamente, hidratada e posteriormente montados "sanduíches" na seguinte ordem: esponja, uma folha de papel filtro de 3mm (*Bio-Rad*), gel, membrana, uma folha de papel de filtro de 3 mm e esponja. A transferência de proteínas do gel para a membrana foi realizada em cuba de eletroforese (*Bio-Rad*), na presença de tampão de transferência (3 mM glicina, 48 mM Tris base, 0,037% SDS, 20% metanol, pH 8,3), sob corrente de 100 V, por 70 minutos.

5.10.6. Sondagens das proteínas com anticorpos

Para a sondagem das proteínas de interesse com os anticorpos, foi utilizado aparelho Snap ID (*Millipore*). As membranas de nitrocelulose foram bloqueadas com albumina do soro bovino (BSA) a 5%, em tampão PBS-T, por 2 horas, em seguida, foi realizada três lavagens com PBS-T durante 10 minutos. Após as lavagens, as membranas foram incubadas com anticorpo específico para cada proteína de interesse: SOD1 (1:1000 *Cell Signaling Technology*), CAT (1:1000 *Cell Signaling Technology*), GPx1/2 (1:200 *Santa Cruz Biotechnology*), Nrf2 (1:500 *Cell Signaling Technology*).

A β -actina e a GAPDH foram utilizados como normalizadores dos tecidos hepático e cardíaco, respectivamente. Sendo assim, foram utilizados os mesmos métodos e instrumentos para a incubação com anticorpo anti β -actina contendo peroxidase (1:25.000 *Sigma-Aldrich*) e GAPDH (1:1000 *Cell Signaling Technology*). A membrana foi lavada três vezes, com PBS-T, durante 10 minutos e incubada com anticorpo anti-IgG de coelho, conjugado com peroxidase de raiz forte, diluído 1:1000 em PBS-T, por 2 horas.

5.10.7. Revelação com sistema quimioluminescente

A solução de revelação foi preparada pela mistura de volumes iguais dos reagentes A e B do kit *ECL Prime* (*GE Healthcare*), composto por luminol, fenol e peróxido de hidrogênio. Os blots foram visualizados pelo sistema de bioimagem *ImageQuant*TM 400 (*GE Healthcare*) e analisados pelo *software Quantity One* (*Bio-Rad*).

5.11 Análise estatística dos dados

As análises dos dados foram avaliadas quanto à normalidade de distribuição pelo teste Kolmogorov-Smirnov. As comparações entre os grupos foram realizadas por meio de ANOVA *one-way*, com pós teste de Tukey. Para análise estatística de evolução de peso corporal, consumo em gramas de dietas, ipGTT e ipITT foi realizada ANOVA *two-way*, com pós teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de $p < 0.05$. Os dados foram analisados utilizando o *software GraphPad Prism*, versão 7.0. Os dados são expressos como média \pm desvio-padrão.

6 RESULTADOS

6.1. Caracterização química dos sucos de laranja

Os sucos de laranjas Pera e Moro apresentaram TSS de 9,4 e 10,9 °Brix, respectivamente. O conteúdo de ácido ascórbico encontrado nas duas variedades de suco foi semelhante, com 288,40 mg/L na variedade Pera e 252,40 mg/L na variedade Moro. Ademais, o total de açúcares solúveis foi de 5 e 4 % para as variedades Pera e Moro, respectivamente. A sacarose foi o açúcar majoritário, perfazendo aproximadamente 45-50% do total de açúcares (**Tabela 3**).

O conteúdo total de flavonoides do suco de laranja Pera e Moro foi de 224,39 e 173,85 mg.L⁻¹, respectivamente (**Tabela 3**). A hesperitina, flavanona majoritária, contribui com 89% e 73% do total de flavonoides nos sucos de laranja Pera e Moro, respectivamente. As flavanonas majoritárias caracterizadas em ambos os sucos foram: narirutina, hesperitina e didimina, além das flavanonas, o suco de laranja Moro apresentou antocianinas em sua composição (30,49 mg.L⁻¹ de antocianinas totais), prevalecendo a cianidina-3-Glicosídeo.

Tabela 3. Composição química e de flavonoides dos sucos de laranja Pera e Moro

Compostos	Suco de Laranja Pera	Suco de Laranja Moro
TSS (° Brix)	9,4 ± 0,15	10,9 ± 0,06
Açúcares Solúveis (g.L ⁻¹)		
Sacarose	22,05 ± 0,47	19,87 ± 3,25
Glicose	12,18 ± 0,16	9,26 ± 0,86
Frutose	14,15 ± 0,05	10,02 ± 2,01
Total	48,38 ± 0,68	39,14 ± 6,12
Ácidos orgânicos (mg.L ⁻¹)		
Ácido ascórbico	288,40 ± 0,10	252,40 ± 0,40
Total	288,40 ± 0,10	252,40 ± 0,40
Flavanonas (mg.L ⁻¹)		
Narirutina	19,29 ± 1,04	12,30 ± 2,91
Hesperitina	199,7 ± 15,53	148,37 ± 9,61
Didimina	5,4 ± 0,51	13,18 ± 3,57
Total	224,39 ± 17,08	173,85 ± 16,09
Antocianinas (mg. L ⁻¹)		
Cianidina 3-Glicosídeo (C3G)*	-	30,49 ± 2,58
Total	-	30,49 ± 2,58
Total de flavonoides	224,39	204,34

Os valores são expressos em média ± desvio-padrão

* Corresponde a soma da cianidina-3-O-glucosídeo e cianidina 3-O-(6" malonil glicosídeo).

6.2. Efeito do consumo da dieta e da suplementação com sucos de laranja sobre peso corporal, ingestão calórica, consumo alimentar e homeostase glicêmica

O consumo alimentar dos grupos submetidos à dieta controle (CTL), composta por ração AIN-93G (**Figura 9A**) e dos grupos alimentados com dieta hiperlipídica e hiperglicídica (HLG), baseada na ração AIN-93G modificada com 45% do valor energético total advindo de gordura saturada mais suplementação de leite condensado (**Figura 9B**), não diferiu entre os respectivos grupos tratados com água, suco de laranja Pera e Moro. Contudo, foi observado entre a 6 e 9ª semana um consumo alimentar superior no grupo com dieta HLG em relação a seu respectivo controle. Nos resultados de aporte calórico e consumo individualizado de ração e leite condensado, não foram observadas diferenças significativas

entre os grupos, possivelmente em virtude da elevada densidade energética da dieta (Tabela 4).

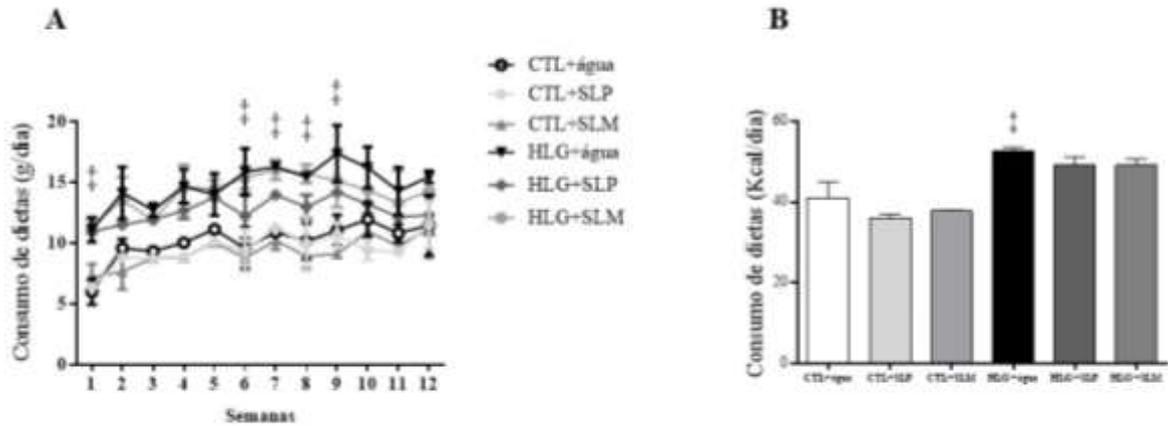


Figura 9. Consumo médio diário das dietas controle (CTL) e hiperlipídica e hiperglicídica (HLG) em gramas (A) e em calorias (B), de camundongos (C57Bl/6) machos, até a 12ª semana do protocolo experimental. Sucos de laranja Pera (SLP) e Moro (SLM). Os valores são expressos em média \pm desvio-padrão (n = 8-9/ grupo). Análise de variância ANOVA, seguido de teste de Tukey (p < 0.05). ‡ diferença significativa entre HLG+água e CTL+água.

Tabela 4. Consumo médio diário de ração e leite condensado dos grupos de animais submetidos à dieta controle e dieta hiperlipídica e hiperglicídica.

Grupos	Ração (g/dia)	Ração (Kcal/dia)	Leite condensado (g/dia)	Leite condensado (Kcal/dia)	Total (Kcal/dia)
Dieta controle					
CTL+água	10,41 \pm 1,58	41,21 \pm 6,24	-	-	41,21
CTL+SLP	9,16 \pm 0,79	38,75 \pm 5,66	-	-	38,75
CTL+SLM	9,57 \pm 1,57	37,92 \pm 6,25	-	-	37,92
Dieta hiperlipídica e hiperglicídica					
HLG+água	3,45 \pm 1,49	16,20 \pm 7,19	10,69 \pm 1,79	34,91 \pm 6,03	51,11
HLG+SLP	2,11 \pm 0,68	9,84 \pm 3,23	11,55 \pm 1,48	37,54 \pm 4,82	47,38
HLG+SLM	2,05 \pm 0,80	9,66 \pm 3,85	11,59 \pm 1,39	37,26 \pm 3,95	46,92

Os valores são expressos em média \pm desvio-padrão (n= 8-9/grupo). Análise de variância ANOVA, seguido de teste de Tukey. (CTL, dieta controle; HLG, dieta hiperlipídica e hiperglicídica; SLP, suco de laranja Pera; SLM, suco de laranja Moro).

Ademais, de acordo com a avaliação da eficiência energética das dietas, que visa identificar a relação entre o valor calórico total da dieta e o ganho de peso em grama, foi observada redução significativa ($p < 0.05$) no grupo tratado com suco de laranja Pera e dieta HLG. Além disso, o grupo HLG+água apresentou uma maior eficiência energética comparada ao grupo controle (**Figura 10**).

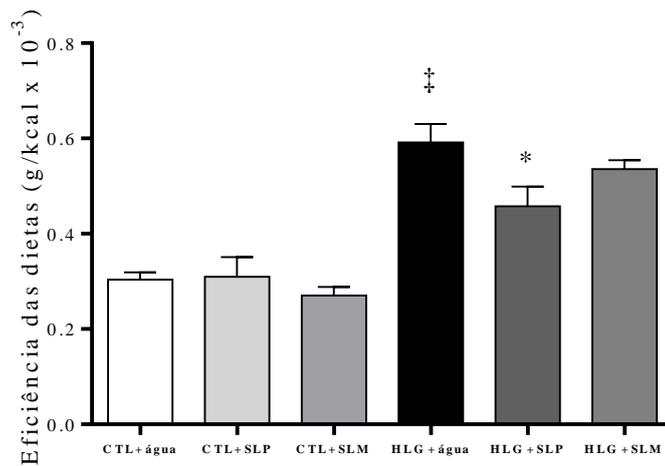


Figura 10. Eficiência energética das dietas controle (CTL) e hiperlipídica e hiperglicídica (HLG), de camundongos (C57Bl/6) machos, durante todo o protocolo experimental. Sucos de laranja Pera (SLP) e Moro (SLM). Os valores são expressos em média \pm desvio-padrão ($n = 8-9/$ grupo). Análise de variância ANOVA, seguido de teste de *Tukey* ($p < 0.05$). ‡ diferença significativa entre HLG+água e CTL+água; * diferença significativa entre HLG+SLP e HLG+água.

Paralelamente ao consumo alimentar, os animais tratados com dieta CTL e HLG não apresentaram diferença significativa na ingestão de líquidos, bem como no valor energético de ambos os sucos (**Figura 11**).

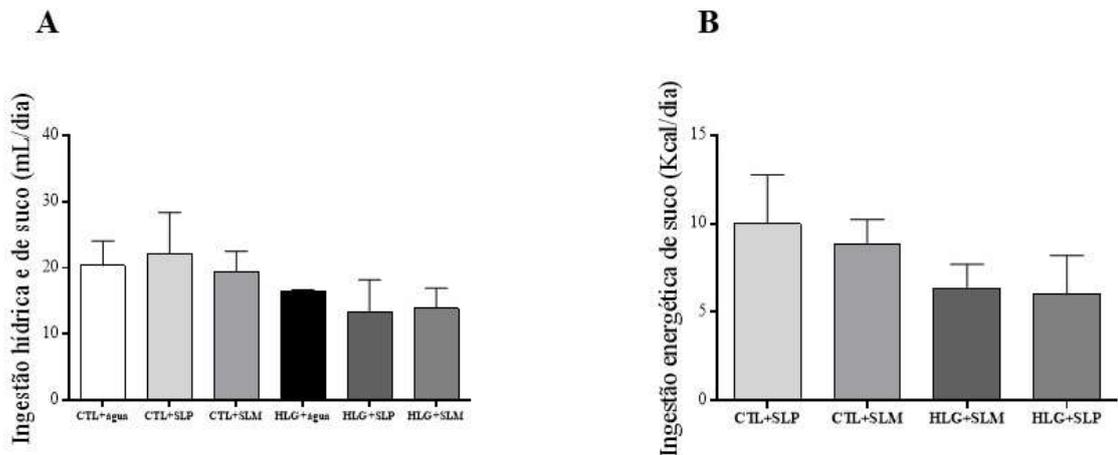


Figura 11. Consumo volumétrico e energético de água e de sucos de laranja Pera (SLP) e Moro (SLM) dos grupos de camundongos (C57Bl/6) machos, submetidos às dietas controle (CTL) e hiperlipídica e hiperglicídica (HLG) (A e B), durante todo o protocolo experimental. Os valores são expressos em média \pm desvio-padrão ($n = 8-9$ / grupo). Análise de variância ANOVA, seguido de teste de Tukey.

De acordo com a evolução e ganho de peso corporal dos animais, submetidos à ambas as dietas, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos controle, tratados com água e sucos (**Figura 12B**). A dieta HLG acarretou em expressivo ganho de peso corporal quando comparado ao grupo alimentado com dieta controle (158%). Vale ressaltar que o suco de laranja Pera promoveu uma redução constante e significativa no ganho de peso corporal concomitante à alimentação com dieta HLG, a partir da 6^a semana até o final do protocolo experimental (**Figura 12A**), corroborando com os resultados de eficiência energética.

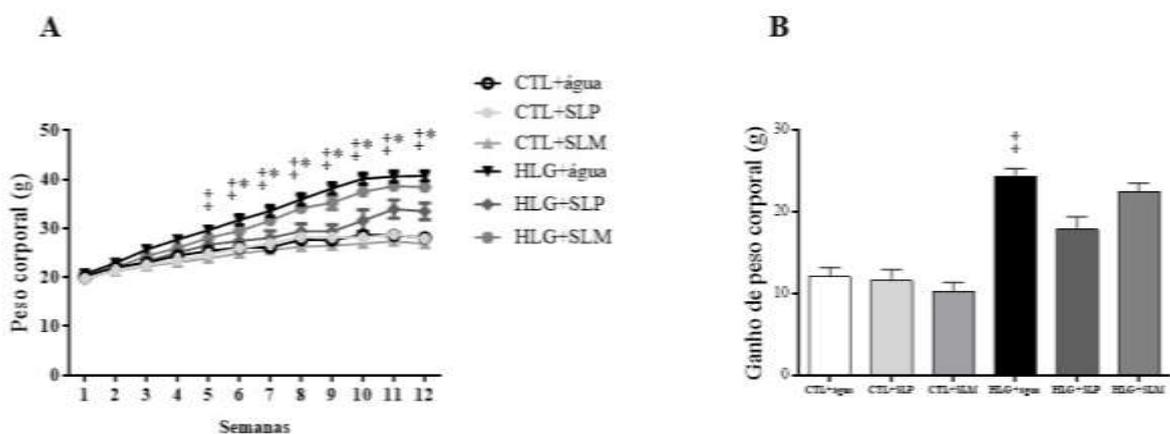


Figura 12. Curva de crescimento e ganho de peso corporal total dos grupos de camundongos (C57Bl/6) machos, submetidos às dietas controle (CTL) e hiperlipídica e hiperglicídica (HLG) (A e B), até a 12ª semana do protocolo experimental. Sucos de laranja Pera (SLP) e Moro (SLM). Os valores são expressos em média \pm desvio-padrão (n = 8-9/ grupo). Análise de variância ANOVA, seguido de teste de *Tukey* (p <0.05). ‡ diferença significativa entre HLG+água e CTL+água; * diferença significativa entre HLG+SLP e HLG+água.

De acordo com os valores obtidos da massa relativa dos tecidos, a dieta hiperlipídica e hiperglicídica foi capaz de promover aumento (p <0.05), de cerca de três vezes, da adiposidade, de acordo com a massa relativa do tecido adiposo retroperitoneal, comparado ao grupo controle. Em contrapartida, os animais tratados com suco de laranja Pera e dieta HLG apresentaram redução significativa da massa relativa do tecido adiposo retroperitoneal. Contudo, nos tecidos hepático e cardíaco não foram observadas diferenças entre os grupos de animais submetidos aos dois tipos de dieta (**Figura 13**).

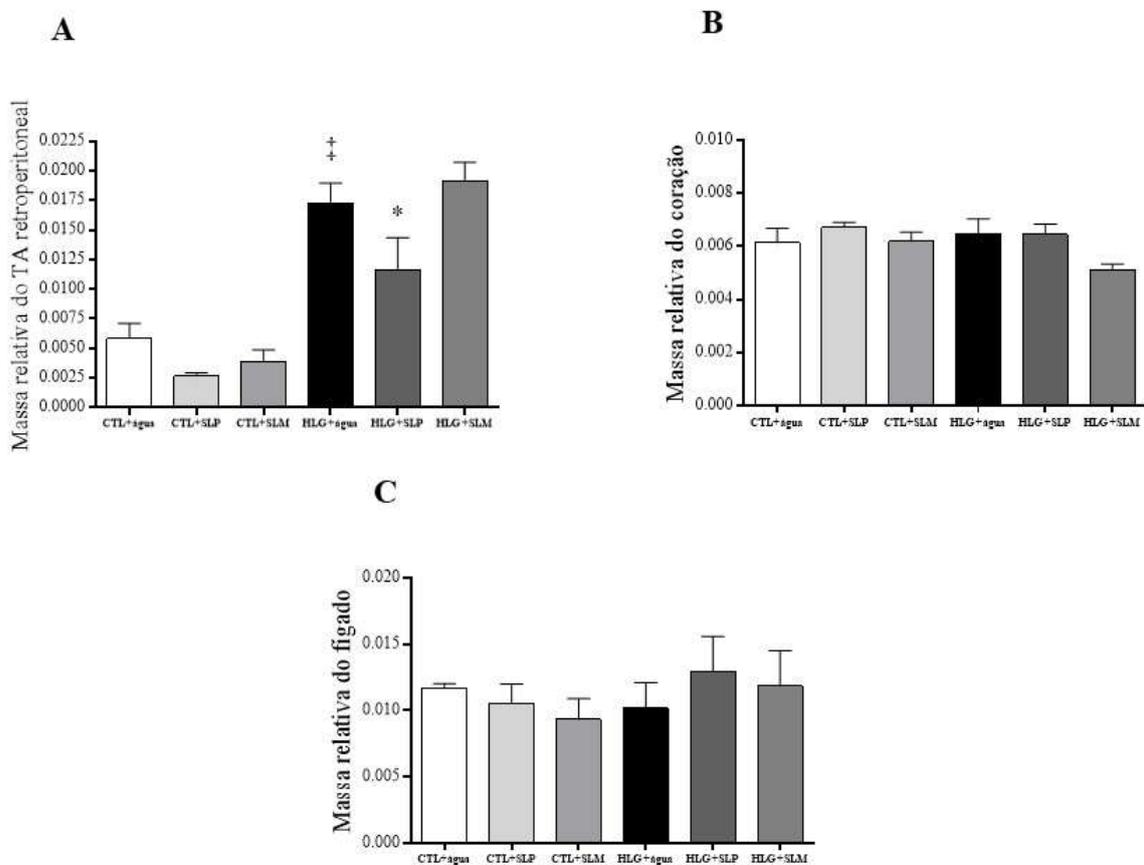


Figura 13. Massa relativa (massa tecidual/ peso corporal) do tecido adiposo (TA) retroperitoneal, fígado e coração dos grupos submetidos às dietas controle (CTL) e hiperlipídica e hiperglicídica (HLG) (A, B e C), de camundongos (C57Bl/6) machos, até a 12ª semana do protocolo experimental.

Sucos de laranja Pera (SLP) e Moro (SLM). Os valores são expressos em média \pm desvio-padrão (n = 8-9/ grupo). Análise de variância ANOVA, seguido de teste de *Tukey* ($p < 0.05$). ‡ diferença significativa entre HLG+água e CTL+água; * diferença significativa entre HLG+SLP e HLG+água.

Ao serem submetidos ao teste de tolerância intraperitoneal à insulina (ipITT), os animais alimentados com dieta CTL não apresentaram diferença significativa na curva glicêmica e na taxa de decaimento da glicose (Kitt) (**Figura 14A e 14B**). Entretanto, nos animais alimentados com dieta HLG foi observada menor resposta glicêmica ($p < 0.05$), no grupo tratado com suco de laranja Pera, indicando melhora na sensibilidade à insulina. Também foi observado um aumento desta resposta entre os tempos 5 e 30 nos grupos tratados com água comparado ao grupo controle. Ademais, considerando a taxa de decaimento da glicose, foi observado um aumento significativo na velocidade de decaimento no grupo com suco de laranja Pera e uma redução significativa no grupo tratado com água.

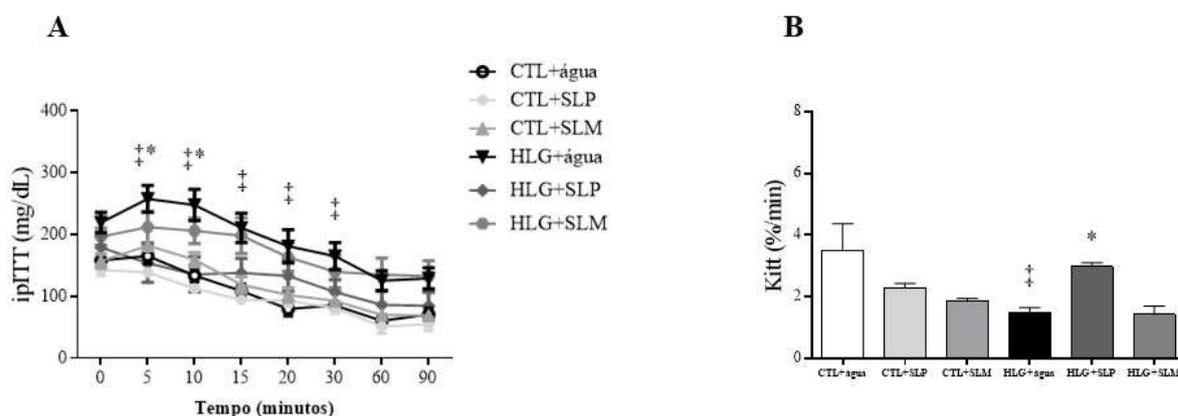


Figura 14. Curva glicêmica e taxa de decaimento da glicose (Kitt) do teste de tolerância intraperitoneal à insulina (ipITT) dos grupos de camundongos (C57Bl/6) machos, tratados com as dietas controle (CTL) e hiperlipídica e hiperglicídica (HLG) (A e B), na 11ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos em média \pm desvio-padrão (n = 8-9/ grupo). Análise de variância ANOVA, seguido de teste de *Tukey* ($p < 0.05$). * diferença significativa entre CTL+água e HLG+água; ‡ diferença significativa entre HLG+SLP e HLG+água.

No teste de tolerância intraperitoneal à glicose (ipGTT), também não foram observadas diferenças nos grupos tratados com dieta CTL. Entretanto, a dieta hiperlipídica e hiperglicídica promoveu aumento significativo na resposta glicêmica, onde o grupo tratado com suco de laranja Pera apresentou redução nesta resposta, similar aos resultados obtidos no

ipITT (**Figura 15A**). Corroborando com os resultados de ipITT e ipGTT, a glicemia de jejum dos animais alimentados com dieta HLG foi significativamente superior à dos animais tratados com dieta controle (**Figura 16**).

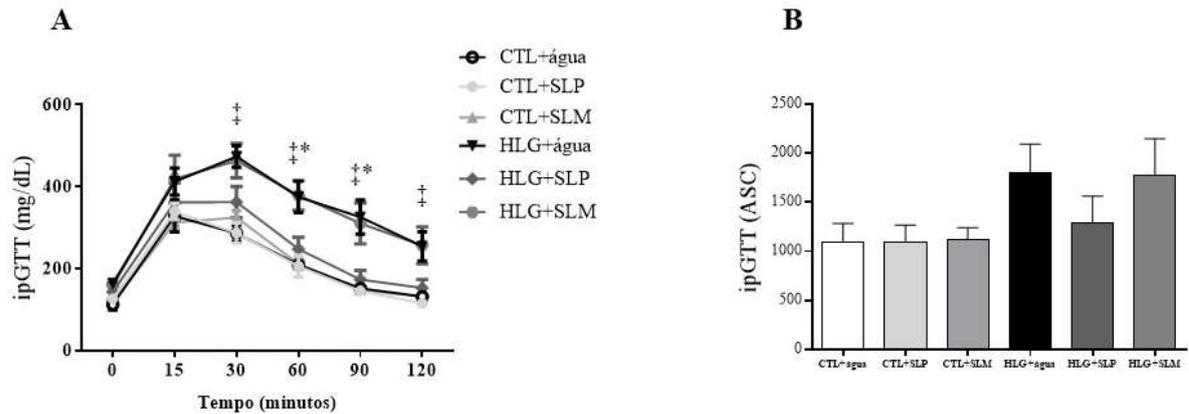


Figura 15. Curva glicêmica e área sob a curva (ASC) dos grupos tratados com as dietas controle (CTL) e hiperlipídica e hiperglicídica (HLG) (A e B) de camundongos (C57Bl/6) machos, na 12ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos em média \pm desvio-padrão (n = 8-9/ grupo). Análise de variância ANOVA, seguido de teste de *Tukey* ($p < 0.05$). * diferença significativa entre CTL+água e HLG+água; ‡ diferença significativa entre HLG+SLP e HLG+água.

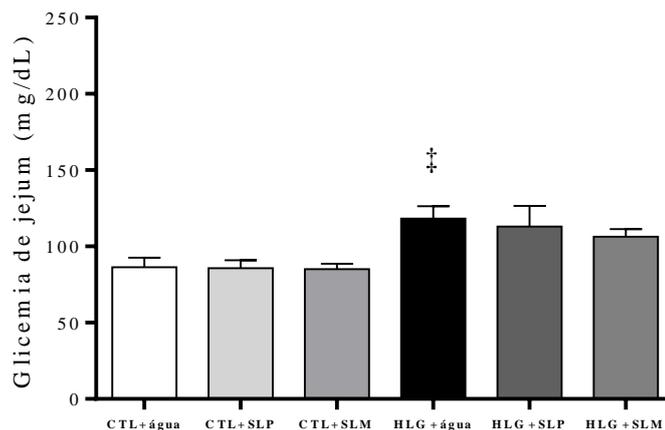


Figura 16. Glicemia de jejum dos grupos de camundongos (C57Bl/6) machos tratados com as dietas controle (CTL) e hiperlipídica e hiperglicídica (HLG), anterior à eutanásia, na 12ª semana do protocolo experimental. Os valores são expressos em média \pm desvio-padrão (n = 8-9/ grupo). Análise de variância ANOVA, seguido de teste de *Tukey* ($p < 0.05$). ‡ diferença significativa entre CTL+água e HLG+água.

Para a avaliação da resistência à ação da insulina foi utilizado o índice HOMA-IR, que utiliza como parâmetros a glicemia e a insulinemia de jejum. A dieta hiperlipídica e hiperglicídica acarretou em desenvolvimento da resistência à insulina e a ingestão de suco de laranja Pera, durante 12 semanas, foi capaz de reduzir significativamente estes valores (**Figura 17**).

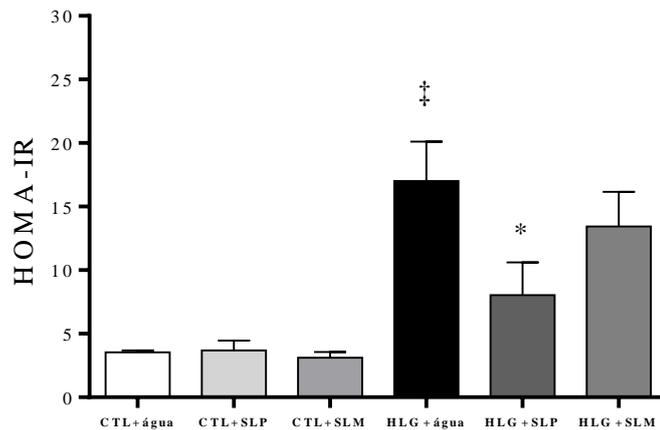


Figura 17. Índice de HOMA-IR dos grupos de camundongos (C57Bl/6) machos tratados com as dietas controle (CTL) e hiperlipídica e hiperglicídica (HLG), até a 12^a semana do protocolo experimental. Os valores são expressos em média \pm desvio-padrão (n = 8-9/ grupo). Análise de variância ANOVA, seguido de teste de *Tukey* (p <0.05). * diferença significativa entre HLG+SLP e HLG+água; ‡ diferença significativa entre HLG+água e CTL+água.

6.3. Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi analisada através da quantificação de substância reativa ao ácido tiobarbitúrico, o MDA, no tecido hepático e cardíaco. De maneira contrária ao esperado, no tecido hepático observou-se redução na peroxidação lipídica na dieta HLG em relação ao grupo controle (**Figura 18A**).

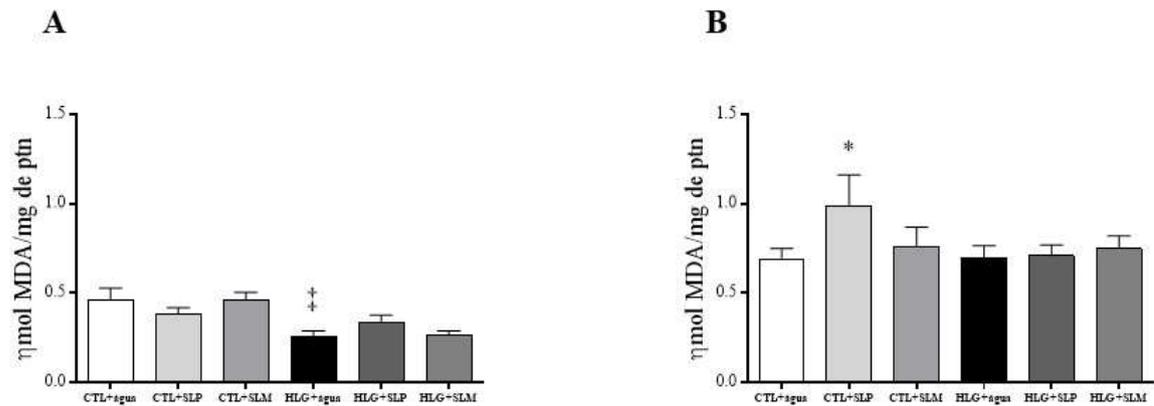


Figura 18. Quantificação de malonaldeído no tecido hepático (A) e cardíaco (B), dos grupos de camundongos (C57Bl/6) machos, tratados com as dietas controle (CTL) e hiperlipídica e hiperglicídica (HLG). Os valores são expressos em média \pm desvio-padrão (n = 8-9/ grupo). Análise de variância ANOVA, seguido de teste de *Tukey*. ‡ p <0.05 entre HLG+água e CTL+água; * p <0.05 entre CTL+SLP e CTL+água.

6.4. Marcadores de dano oxidativo

Não foram observadas diferenças no dano oxidativo ao DNA nos hepatócitos de camundongos, ocasionado pelo consumo dos dois tipos de dietas ou mesmo da ingestão de ambos os sucos (**Figura 19**), analisado por meio do ensaio cometa.

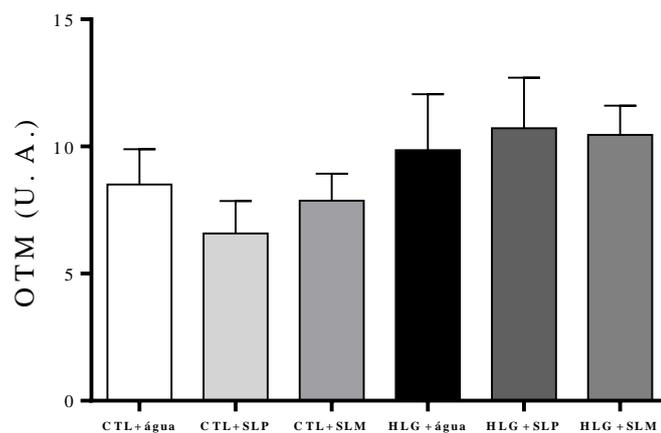


Figura 19. Momento da cauda de Olive (OTM) dos grupos alimentados com as dietas controle (CTL) e hiperlipídica e hiperglicídica (HLG) de camundongos (C57Bl/6) machos. Os valores são expressos em média \pm desvio-padrão (n = 8-9/ grupo). Análise de variância ANOVA, seguido de teste de *Tukey*.

6.5. Atividade de enzimas antioxidantes

Não foi observada diferença significativa na atividade das enzimas SOD, CAT e GPx no tecido hepático de camundongos alimentados com dieta controle e dieta hiperlipídica e hiperglicídica (**Figura 20**).

No tecido cardíaco a dieta HLG promoveu um aumento significativo na atividade SOD (**Figura 21B**). Não foi detectado atividade CAT no tecido cardíaco.

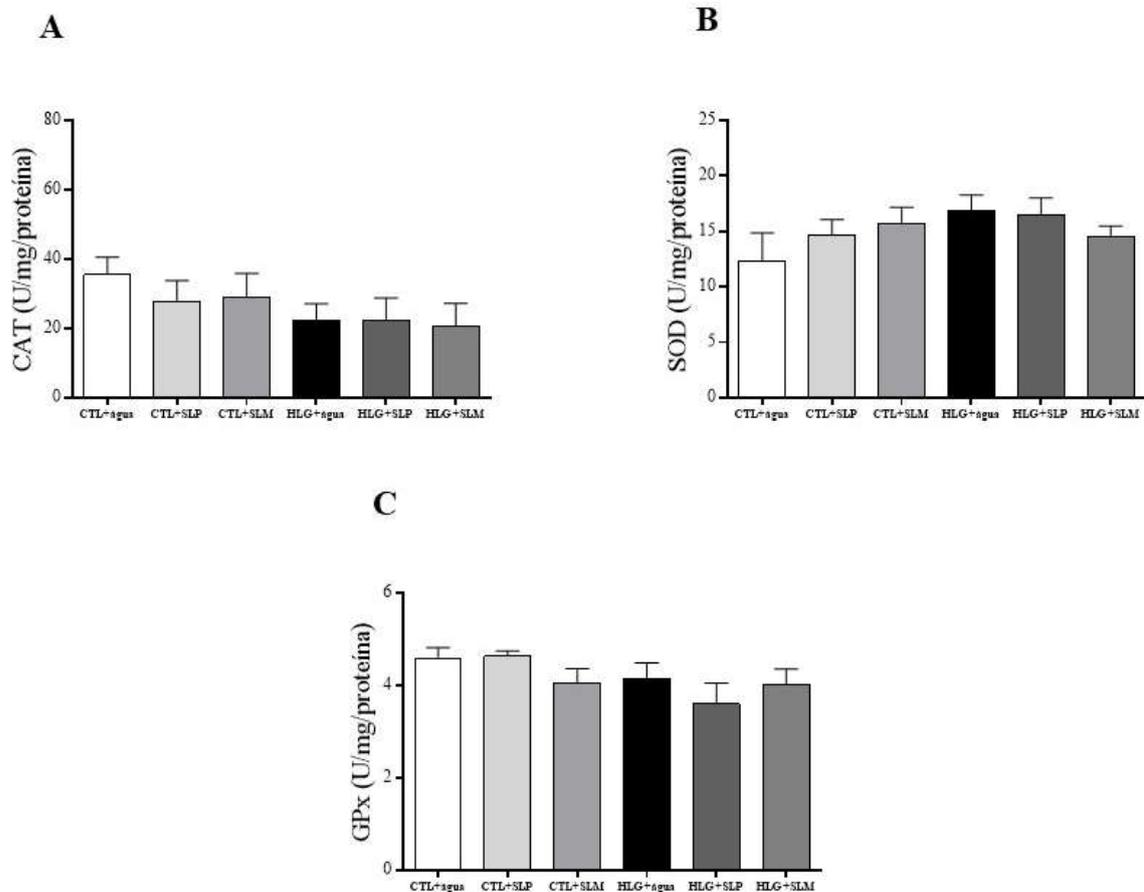


Figura 20. Atividade enzimática da superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase, no tecido hepático, dos grupos de camundongos (C57Bl/6) machos, tratados com as dietas controle (CTL) e hiperlipídica e hiperglicídica (HLG) (A, B e C). (SOD) superóxido dismutase; (CAT) catalase; (GPx) glutatona peroxidase. Os valores são expressos em média \pm desvio-padrão (n = 8-9/ grupo). Análise de variância ANOVA, seguido de teste de *Tukey*.

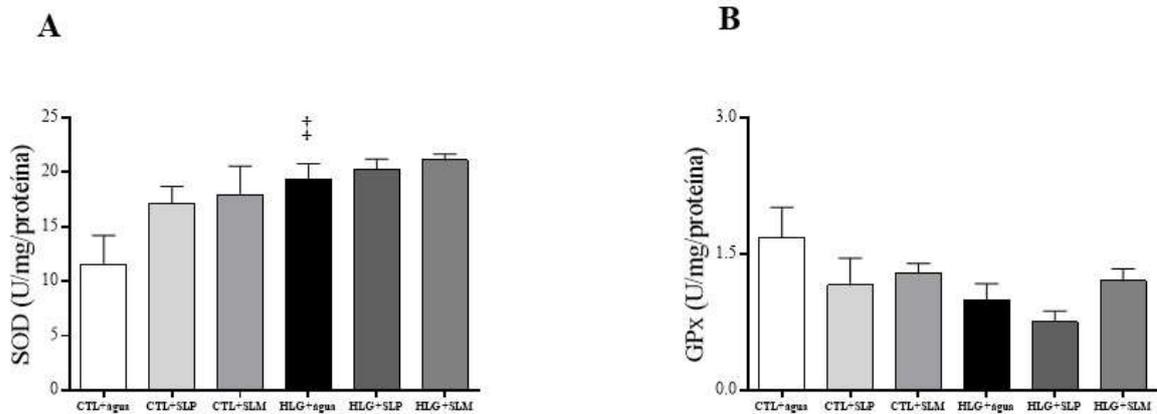


Figura 21. Atividade enzimática da superóxido dismutase e glutatona peroxidase, no tecido cardíaco, dos grupos de camundongos (C57Bl/6) machos, tratados com as dietas controle (CTL) e hiperlipídica e hiperglicídica (HLG) (A e B). (SOD) superóxido dismutase; (GPx) glutatona peroxidase. Os valores são expressos em média \pm desvio-padrão (n = 8-9/ grupo). Análise de variância ANOVA, seguido de teste de *Tukey*. ‡ p < 0.05 entre HLG+água e CTL+água.

6.6. Expressão proteica de enzimas antioxidantes e fator de transcrição Nrf2

No tecido hepático, foi observada redução significativa na expressão proteica da CAT no grupo tratado com a dieta hiperlipídica e hiperglicídica em comparação ao grupo controle (**Figura 22B**). Ademais, nos grupos tratados com dieta controle, foi observada uma redução significativa na expressão proteica da CAT nos camundongos que ingeriram suco de laranja Pera e suco de laranja Moro (**Figura 22B**).

No tecido cardíaco não foi possível detectar as concentrações das proteínas Nrf2 e catalase. Não foram observadas diferenças na expressão proteica da SOD nos grupos tratados com os dois tipos de dietas. A GPx apresentou aumento expressivo somente no grupo tratado com suco de laranja Moro e dieta controle (**Figura 23B**).

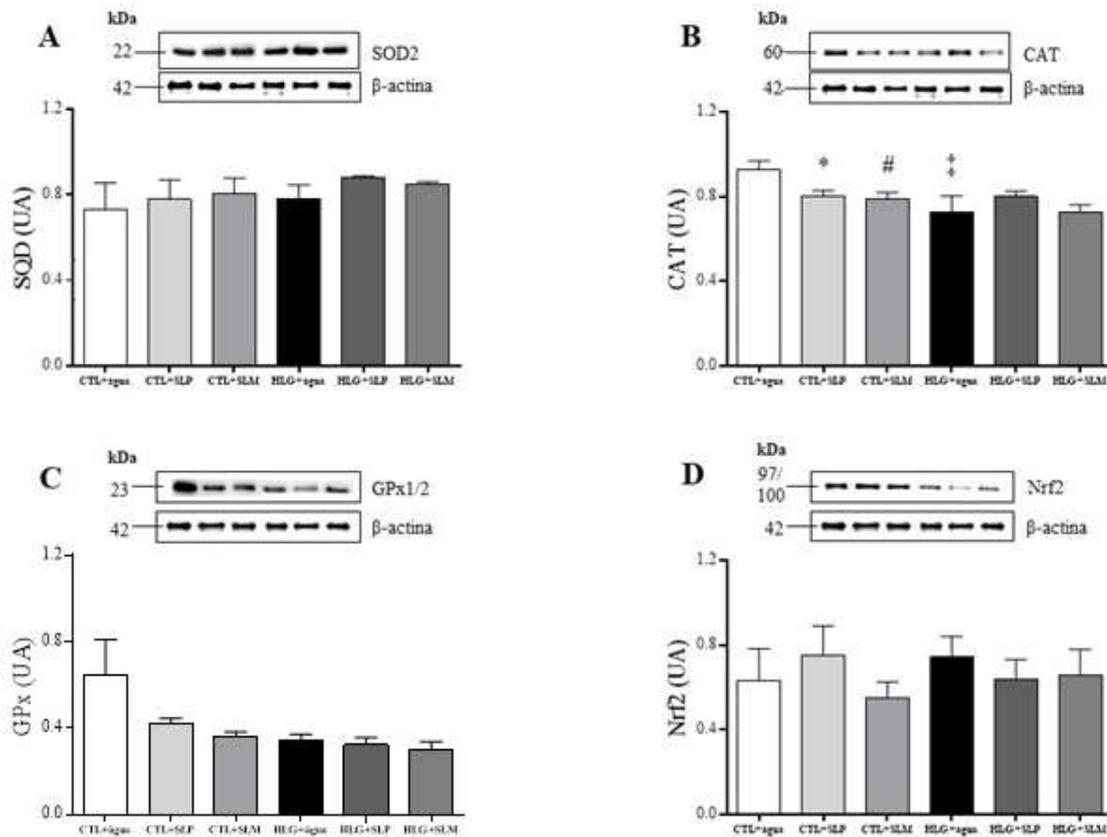


Figura 22. Quantificação das proteínas superóxido dismutase, catalase, glutatona peroxidase e do fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2, no tecido hepático, dos grupos de camundongos (C57Bl/6) machos, tratados com as dietas controle (CTL) e hiperlipídica e hiperglicídica (HLG) (A, B, C e D). (SOD) superóxido dismutase; (GPx) glutatona peroxidase; Fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2). Os valores são expressos em média \pm desvio-padrão (n = 8-9/ grupo). Análise de variância ANOVA, seguido de teste de *Tukey* ($p < 0.05$). * diferença significativa entre HLG+SLP e HLG+água; # diferença significativa entre HLG+SLM e HLG+água; † diferença significativa entre HLG+água e CTL+água.

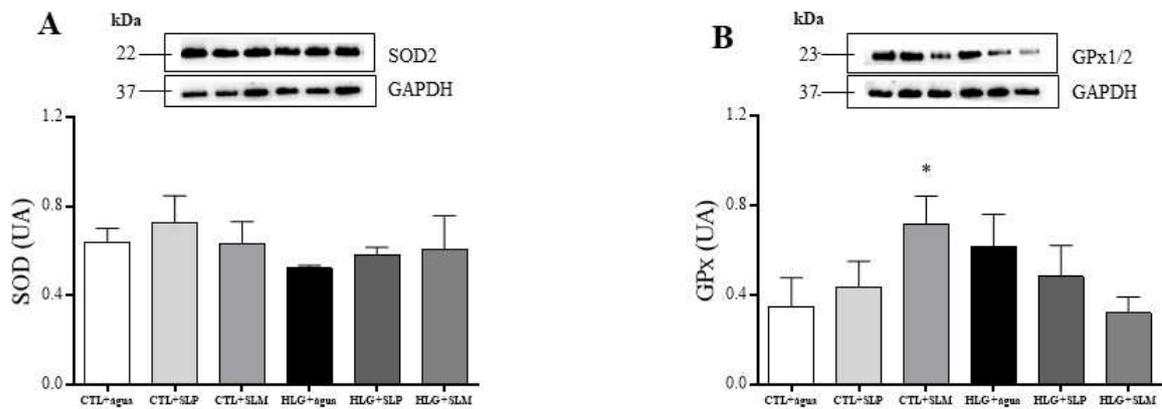


Figura 23. Quantificação das proteínas superóxido dismutase e glutathione peroxidase, no tecido cardíaco, dos grupos de camundongos (C57Bl/6) machos, tratados com as dietas controle (CTL) e hiperlipídica e hiperglicídica (HLG) (A e B). (SOD) superóxido dismutase; (GPx) glutathione peroxidase. Os valores são expressos em média \pm desvio-padrão (n = 8-9/ grupo). Análise de variância ANOVA, seguido de teste de *Tukey* ($p < 0.05$). * diferença significativa entre CTL+SLM e CTL+água.

7. DISCUSSÃO

A dieta com alto teor de lipídeos e carboidratos é amplamente empregada em modelos animais para a indução de obesidade e síndrome metabólica (PAULI et al., 2009; ROSINI; SILVA; MORAES, 2012; MARSEGLIA et al., 2015). Assim, considerando as propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias dos composto bioativos da laranja, o presente estudo investigou o efeito da ingestão de sucos de laranja na atenuação de parâmetros oxidativos induzidos por uma dieta HLG.

Os animais alimentados com dieta HLG apresentaram maior consumo de dieta HLG, especialmente leite condensado, maior eficiência energética, ganho de peso corporal e adiposidade, comparado a dieta CTL, decorrente principalmente da suplementação com leite condensado. Neste caso, a sobrecarga nutricional advinda da dieta contribuiu com o desenvolvimento da obesidade e de alterações metabólicas decorrentes deste quadro. Masi et al., (2017) observaram que o consumo de uma dieta obesogênica em camundongos machos da linhagem C57Bl/6, composta pela mesma dieta HLG, promoveu aumento do peso corporal, elevação na taxa de intolerância à glicose, hipertrofia dos adipócitos e aumento dos níveis de colesterol (MASI et al., 2017). O consumo concomitante de gordura saturada e sacarose, tende a potencializar os efeitos deletérios promovidos pelo alto teor de gordura na alimentação, tais como aumento do apetite, retardo da sensação de saciedade e aumento do armazenamento de energia (FANTINO, 2011; BERTHOUD; LENARD; SHIN, 2011; ALBERTSSON, 2010). No presente estudo, foi observada a preferência ao paladar doce, visto que o consumo de leite condensado foi significativamente maior que o consumo de ração hiperlipídica.

Apesar dos sucos de laranja apresentarem um acréscimo no conteúdo de açúcar, a sua adição à dieta não afetou o consumo alimentar e o peso corporal dos animais tratados com dieta CTL. Por outro lado, apesar de não haver diferença no volume ingerido de ambos os sucos entre os grupos HLG, e que estes apresentam valor energético similar, observou-se redução significativa do ganho de peso corporal, adiposidade e menor eficiência energética nos camundongos tratados com suco de laranja Pera.

Similar aos nossos resultados, Dourado; Cesar et al. (2015) observaram que a administração de suco de laranja Pera contribuiu com a redução do peso corporal e do perfil lipídico, conseqüentemente opondo-se à ideia de que o suco poderia contribuir com o ganho de peso ou obesidade (DOURADO; CESAR, 2015).

A hiperfagia caracterizada pelo consumo excessivo de calorias, tem sido relatada como uma das causas de aumento da adiposidade em animais (ALBERTSSON, 2010; SAVINI et al., 2013). Contudo, os animais que consumiram a dieta HLG apresentaram um ajuste espontâneo do consumo de ambos os tipos de rações e leite condensado, demonstrando uma constante ao longo de todo o protocolo experimental. Este equilíbrio crescente pode estar relacionado a composição nutricional da dieta, visto que há diferenças no impacto metabólico, de acordo com o tipo e a quantidade de gordura utilizada.

O consumo de dieta HLG está associado ao desenvolvimento de obesidade e outras alterações metabólicas que promovem disfunções no sistema de sinalização hormonal, contribuindo com o desencadeamento de resistência à insulina, aumento da síntese de mediadores inflamatórios, progressão de doenças neurodegenerativas e estresse oxidativo (CERIELLO; MOTZ, 2004; DE MOURA et al., 2012).

No presente estudo, a dieta HLG acarretou em alterações metabólicas como a intolerância à glicose e menor sensibilidade à insulina. Embora a suplementação com os sucos não tenha alterado a glicemia de jejum, a ingestão de suco de laranja Pera atenuou estes efeitos, aumentando a sensibilidade à insulina e reduzindo a resistência à insulina apresentado pela melhora no valor de HOMA-IR. Os sucos de laranja não alteraram os parâmetros metabólicos ou promoveram ganho de peso corpóreo nos animais alimentados com dieta controle.

Conforme discutido anteriormente, o consumo da dieta HLG pode ter contribuído com o comprometimento da resposta glicêmica e aumento da produção de EROs, que estão envolvidos no controle de peso corporal, exercendo também diferentes efeitos nos neurônios hipotalâmicos, responsáveis por controlar a saciedade e o comportamento alimentar (ASTRUP et al., 2008; ALBERTSSON, 2010; SAVINI et al., 2013). Além disso, esta intolerância também pode estar relacionada ao comprometimento das células β -pancreáticas em secretar insulina, resultando em menor captação de glicose pelas células. Estudos demonstram que dietas com alto teor de gordura saturada e sacarose, em roedores, contribuem com o desenvolvimento de resistência à insulina, dislipidemia, hiperglicemia, hipertensão arterial e aterosclerose (SUMIYOSHI; SAKANAKA; KIMURA, 2006; RAGAB et al., 2015; ANTUNES et al., 2016). Neste caso, o potencial efeito anti-inflamatório e antioxidante do suco de laranja Pera, pode ter contribuído com a atenuação da hiperglicemia, através da elevação da glicólise e redução da gliconeogênese hepática (ALAM; KAUTER; BROWN, 2013).

A ingestão de suco de laranja Pera, em animais e humanos, é capaz de promover efeitos benéficos sobre os lipídios sanguíneos, especialmente em indivíduos hipercolesterolêmicos, além de contribuir com a redução dos níveis inflamatórios e de estresse oxidativo (GHANIM et al., 2010; O'NEIL et al., 2012).

As alterações metabólicas ocasionadas pela disfunção na via de sinalização da insulina também podem ocorrer quando a quantidade de ácidos graxos livres e glicose excedem o gasto energético, gerando superatividade do ciclo do ácido cítrico, resultando em aumento da síntese de EROs e mediadores inflamatórios, progredindo para um quadro de estresse oxidativo (LOPES; OLIVEIRA; FORTUNATO, 2008; MA, 2015).

Aparentemente, o período de intervenção com a dieta HLG não foi suficiente para gerar um quadro de estresse característico nos animais, uma vez que não foi observado peroxidação lipídica ou dano oxidativo ao DNA de hepatócitos, ou mesmo de expressão e atividade das enzimas antioxidantes, CAT, SOD e GPx no tecido hepático e cardíaco.

No tecido cardíaco, a atividade de SOD foi superior nos grupos tratados com dieta HLG, comparado ao grupo alimentado com dieta controle. Entretanto, os sucos de laranja não alteraram este parâmetro. De acordo com Ighodaroab; Akinloyeb (2017), alguns tecidos, em especial o coração, possui alta expressão de SOD, considerada de suma importância, visto que é uma das principais defesas antioxidantes neste tecido. A CAT não foi detectada no tecido cardíaco, contudo, na ausência de CAT, a quebra de peróxido de hidrogênio é realizada pela enzima GPx (IGHODAROAB; AKINLOYEB, 2017).

Ademais, no tecido hepático, foi observado redução significativa da quantificação de MDA nos grupos tratados com dieta HLG. Diferentemente dos resultados obtidos no presente estudo, a dieta hiperlipídica induziu ao aumento da peroxidação lipídica nos tecidos cardíacos, renal e hepático de camundongos obesos (NOEMAM; HAMOODA; BAALASH, 2011).

A dieta controle, concomitante a ingestão de suco de laranja Pera, contribuiu com o aumento da peroxidação lipídica, no tecido cardíaco. Inversamente aos resultados obtidos, compostos biológicos são conhecidos por suas propriedades antioxidantes capazes de contribuir com a proteção de células e tecidos, por meio da remoção de EROs e outros radicais livres. Jarukamjorn et al., (2016) observaram aumento dos níveis de MDA e redução da atividade de enzimas antioxidantes no fígado de camundongos alimentados com dieta composta de alto teor de lipídeos e frutose (JARUKAMJORN et al., 2016). Ainda, a dieta de

cafeteria ou a dieta rica em lipídeos promoveu correlação negativa entre os níveis de MDA e atividade das enzimas GPx, GST e CAT no fígado, rim e coração, respectivamente (NOEMAM; HAMOODA; BAALASH, 2011).

Apesar da dieta HLG não acarretar em alteração na atividade de CAT no tecido hepático, observou-se redução na expressão proteica, sem alteração pelos sucos. Por outro lado, os sucos de laranja reduziram significativamente a expressão de CAT com a dieta controle. Ademais, no tecido cardíaco, foi observado aumento da concentração de GPx nos camundongos tratados com suco de laranja Moro e dieta controle.

8. CONCLUSÃO

As principais conclusões do presente estudo são: (i) o consumo de dieta hiperlipídica e hiperglicídica, composta por gordura saturada, oriunda de banha de porco, e sacarose, proveniente de leite condensado, acarretou em alterações metabólicas, como ganho de peso e adiposidade corporal, intolerância à glicose e resistência à insulina, (ii) contudo, essas alterações metabólicas não contribuíram com o desenvolvimento do quadro de estresse oxidativo, mas com a resistência à insulina, (iii) o suco de laranja, da variedade Pera, foi capaz de atenuar os parâmetros metabólicos associados ao metabolismo de carboidratos, alterado pela dieta hiperlipídica e hiperglicídica.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABESO – Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica: Prevalência de obesidade entre os brasileiros, 2015.

ALAM, M. A.; KAUTER, K.; BROWN, L. Naringin improves diet-induced cardiovascular dysfunction and obesity in high carbohydrate, high fat diet-fed rats. **Nutrients**, v. 5, n. 3, p. 637-650, 2013.

ALAM, M. A.; SUBHAN, N.; RAHMAN, M. M.; UDDIN, S. J.; REZA, H. M.; SARKER, S. D. Effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanisms of action. **Advances in Nutrition**, v. 5, n. 4, p. 404-417, 2014.

ALBERTSSON, C. E. **Fat-Rich Food Palatability and Appetite Regulation**. In: MONTMAYEUR, J. P.; COUTRE, J. Fat Detection: Taste, Texture, and Post Ingestive Effects. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, 2010. Cap. 14.

ANTUNES, L. C.; ELKFURY, J. L.; JORDANA, M. N.; FOLETTI, K. C.; BERTOLUCCI, M. C. Validation of HOMA-IR in a model of high-fat diet induced insulin-resistance in wistar rats. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 60, n. 2, p. 138-142, 2016.

ASTRUP, A.; DYERBERG, J.; SELLECK, M.; STENDER, S. Nutrition transition and its relationship to the development of obesity and related chronic diseases. **Reviews Obesity**, v. 9, n. 1, p. 48-52, 2008.

ARABBI, P. R.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the brazilian population. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 5, p. 1124-1131, 2004.

AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, p. 1-32, 2014.

BASTOS, D. H. M.; ROGERO, M. M.; ARÊAS, J. A. G. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 646-656, 2009.

BERTHOUD, H.; LENARD, N. R.; SHIN, A. C. Food reward, hyperphagia, and obesity. **The American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 300, n. 6, p. 1266-1277, 2011.

BEZERRA, I. N.; MOREIRA, T. M. V.; CAVALCANTE, J. B.; SOUZA, A. M.; SICHIERI, R. Food consumed outside the home in Brazil according to places of purchase. **Revista de Saúde Pública**, v. 51, n. 15, p. 1-8, 2017.

BOUCHER, J.; KLEINRIDDERS, A.; KAHN, C. R. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, p. 1-23, 2014.

BRYAN, H. K.; OLAYANJU, A.; GOLDRING, C. E.; PARK, B. K. The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation. **Biochemical Pharmacology**, v. 85, p. 705-717, 2013.

CARVAJAL, C. C. Tejido adiposo, obesidad e insulino resistencia. **Medicina Legal de Costa Rica**, v. 32, n. 2, p. 9-15, 2015.

CERDA, H.; DELINCÉE, H.; HAINE, H.; RUPP, H. The DNA 'comet assay' as a rapid screening technique to control irradiated food. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 375, n. 2, p. 167-181, 1997.

CERIELLO, A.; MOTZ, E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 24, p. 816-823, 2004.

CHARRADI, K.; ELKAHOUI, S.; LIMAM, F.; AOUANI, E. High-fat diet induced an oxidative stress in white adipose tissue and disturbed plasma transition metals in rat:

prevention by grape seed and skin extract. **The Journal of Physiological Sciences**, v. 63, n. 6, p. 445-455, 2013.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 8, p. 965-1096, 2009.

DANDONA, P.; GHANIM, H.; CHAUDHURI, A.; DHINDSA, S.; KIM, S. S. Macronutrient intake induces oxidative and inflammatory stress: potential relevance to atherosclerosis and insulin resistance. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 42, n. 4, p. 245-253, 2010.

DE MOURA, L. P.; DALIA, R. A.; DE ARAÚJO, M. B.; SPONTON, A. C. S.; PAULI, J. R.; DE MOURA, R. F.; DE MELLO, M. A. R. Alterações bioquímicas e hepáticas em ratos submetidos à uma dieta hiperlipídica/hiperenergética. **Revista de Nutrição**, v. 25, n. 6, p. 685-693, 2012.

DEL RIO, D.; RODRIGUEZ-MATEOS, A.; SPENCER, J. P. E.; TOGNOLINI, M.; BORGES, G.; CROZIER, A. Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 14, p. 1818-1892, 2013.

DOURADO; G. K. Z. S.; CESAR, T. B. Investigation of cytokines, oxidative stress, metabolic, and inflammatory biomarkers after orange juice consumption by normal and overweight subjects. **Food & Nutrition Research**, v. 59, p. 1-8, 2015.

EWING, J. F.; JANERO, D. R. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. **Analytical Biochemistry**, v. 232, n. 2, p. 243-248, 1995.

FALLICO, B.; BALLISTRERI, G.; ARENA, E.; BRIGHINA, S.; RAPISARDA, P. Bioactive compounds in blood oranges (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck): Level and intake. **Food Chemistry**, v. 215, p. 67-75, 2017.

FANTINO, M. Role of lipids in the control of food intake. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 14, n. 2, p. 138-144, 2011.

FERNANDEZ-PANCHON, M. S.; VILLANO, D.; TRONCOSO, A. M.; GARCIA-PARRILLA, M. C. Antioxidant activity of phenolic compounds: From *in vitro* results to *in vivo* evidence. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, p. 649-671, 2008.

FISCHBACHER, A.; SONNTAG, C.; SCHMIDT, T. C. Hydroxyl radical yields in the Fenton process under various pH, ligand concentrations and hydrogen peroxide/Fe(II) ratios. **Chemosphere**, v. 182, p. p. 738-744, 2017.

FLOHÉ, L.; GUNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 114-120, 1984.

FRANCISQUETI, F. V.; DO NASCIMENTO, A. F.; CORRÊA, C. R. Obesity, inflammation and metabolic complications. **Nutrire**, v. 40, n. 1, p. 81-89, 2015.

FU, Z.; GILBERT, E. R.; FIU, D. Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes. **Current Diabetes Reviews**, v. 9, n. 1, p. 25-53, 2013.

GHANIM, H.; SIA, C. L.; UPADHYAY, N.; KORZENIEWSKI, K.; VISWANATHAN, P.; ABUAYSHEH, S.; MOHANTY, P.; DANDONA, P. Orange juice neutralizes the proinflammatory effect of a high-fat, high-carbohydrate meal and prevents endotoxin increase and Toll-like receptor expression. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 91, n. 4, p. 940-949, 2010.

GROSSO, G.; GALVANO, F.; MISTRETTA, A.; MARVENTANO, S.; NOLFO, F.; CALABRESE, G.; BUSCEMI, S.; DRAGO, F.; VERONESI, U.; SCUDERI, A. Red orange: Experimental models and epidemiological evidence of its benefits on human health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, p. 1-11, 2013.

GOMEZ, M.; LAJOLO, F.; CORDENUNSI, B. Evolution of soluble sugars during ripening of papaya fruit and its relation to sweet taste. **Journal of Food Science**, v.67, n.1, p. 442-447, 2002.

GUPTE, A. A.; LYON, C. J.; HSUEH, W. A. Nuclear Factor (Erythroid-Derived 2)-Like-2 Factor (Nrf2), a key regulator of the antioxidant response to protect against atherosclerosis and nonalcoholic steatohepatitis. **Current Diabetes Reports**, v. 13, p. 362-371, 2013.

H Aidari, F.; KESHAVARZ, S. A.; RASHIDI, M. R.; SHAHI, M. M. Orange juice and hesperetin supplementation to hyperuricemic rats alter oxidative stress markers and xanthine oxidoreductase activity. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 45, n. 3, p. 285-291. 2009.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4 ed. Oxford: Clarendon Press, 2007.

HARDY, O. T.; CZECH, M. P.; CORVERA, S. What causes the insulin resistance underlying obesity?. **Current Opinion in Endocrinology and Diabetes and Obesity**. v. 19, n. 2, p. 81-87, 2012.

HASSIMOTTO, N. M. A.; LAJOLO, F. M. Antioxidant status in rats after long-term intake of anthocyanins and ellagitannins from blackberries. **Journal Science Food Agriculture**, v. 91, p. 523-531, 2011.

HASSIMOTTO; N. M. A.; PINTO, M. S.; LAJOLO, F. M. Antioxidant status in humans after consumption of blackberry (*Rubus fruticosus* L.) juices with and without defatted milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 11727-11733, 2008.

HEIJDEN, R. A.; SHEEDFAR, F.; MORRISON, M. C.; HOMMELBERG, P. P.; KOR, D.; KLOOSTERHUIS, N. J.; GRUBEN, N.; YOUSSEF, S. A.; BRUIN, A.; HOFKER, M. H.; KLEEMANN, R.; KOONEN, D. P.; HEERINGA, P. High-fat diet induced obesity primes inflammation in adipose tissue prior to liver in C57BL/6j mice. **Aging (Albany NY)**, v. 7, n. 4, p. 256-268, 2015.

HO, C.; CHENG, Y.; CHAU, C.; YEN, G. Effect of diallyl sulfide on in vitro and in vivo Nrf2-mediated pulmonary antioxidant enzyme expression via activation ERK/p38 signaling pathway. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 100-107, 2012.

HONG, Y.; YEH, S.; CHANG, C.; HU, M. Total Plasma Malondialdehyde Levels in 16 Taiwanese College Students Determined by Various Thiobarbituric Acid Tests and an Improved High-Performance Liquid Chromatography-based Method. **Clinical Biochemistry**, v. 33, n. 8, p. 619-625, 2000.

HUANG, C.; MCALLISTER, M. J.; SLUCHER, A. L.; WEBB, H. E.; MOCK, J. T.; ACEVEDO, E. O. Obesity –related oxidative stress: The impact of physical activity and diet manipulation. **Sports Medicine-Open**, v. 1, n. 32, p. 1-12, 2015.

HWANG, Y. P.; CHOI, J. H.; YUN, H. J.; HAN, E. H.; KIM, H. G.; KIM, J. Y.; PARK, B. H.; KHANAL, T.; CHOI, J. M.; CHUNG, Y. C.; JEONG, H. G. Anthocyanins from purple sweet potato attenuate dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats by inducing Nrf2-mediated antioxidant enzymes and reducing COX-2 and iNOS expression. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 1, p. 93-99. 2011.

HYEONG-SEON, L.; LI, L.; KIM, H.; BILEHAL, D.; LI, W.; LEE, D. KIM, Y. The protective effects of curcuma longa linn. Extract on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats via upregulation of Nrf2. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 9, p. 1331-1338, 2010.

IGHODAROAB, O. M.; AKINLOYEB, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 2017, p. 1-7, 2017.

JARUKAMJORN, K.; JEAPONG, N.; PIMSON, C.; CHATUPHONPRASERT, W. A high-fat, high-fructose diet induces antioxidant imbalance and increases the risk and progression of nonalcoholic fatty liver disease in mice. **Scientifica**, v. 2016, p. 1-10, 2016.

JENNINGS, A.; WELCH, A. A.; SPECTOR, T.; MACGREGOR, A.; CASSIDY, A. Intakes of anthocyanins and flavones are associated with biomarkers of insulin resistance and inflammation in women. **The Journal of Nutrition**, v. 144, n. 2, p. 202-208, 2014.

KATHIRVEL, E.; CHEN, P.; MORGAN, K.; FRENCH, S. W.; MORGAN, T. R. Oxidative stress and regulation of anti-oxidant enzymes in cytochrome P4502E1 transgenic mouse model of non-alcoholic fatty liver. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 25, n. 6, p. 1136-1143, 2010.

KOBORI, M.; MASUMOTO, S.; AKIMOTO, Y.; OIKE, H. Chronic dietary intake of quercetin alleviates hepatic fat accumulation associated with consumption of a Western-style diet in C57/BL6J mice. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 55, n. 4, p. 530-540, 2011.

LADEIRA, M. S. P.; RODRIGUES, M. A. M.; SALVADORI, D. M. F.; QUEIROZ, D. M. M.; FREIRE-MAIA, D. V. DNA Damage in Patients Infected by *Helicobacter pylori*. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention**, v. 13, n. 4, 2004.

LECHUGA-SANCHO, A. M.; GALLEGO-ANDUJAR, D.; RUIZ-OCAÑA, P.; VISIEDO, F. M.; SAEZ-BENITO, A.; SCHWARZ, M.; SEGUNDO, C.; MATEOS, R. M. Obesity induced alterations in redox homeostasis and oxidative stress are present from an early age. **PLoS One**, v. 13, n. 1, 2018.

LEE, K. J.; CHOI, C. Y.; CHUNG, Y. C.; KIM, Y. S.; RYU, S. Y.; ROH, S. H.; JEONG, H. G. Protective effect of saponins derived from roots of *Platycodon grandiflorum* on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative hepatotoxicity. **Toxicology Letters**, v. 147, p. 271–282, 2004.

LI, D.; WANG, P.; LUO, Y.; ZHAO, M.; CHEN, F. Health benefits of anthocyanins and molecular mechanisms: Update from recent decade. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 8, p. 1729-1741, 2015.

LI, H. B.; YANG, Y. R. Y.; MO, Z. J.; DING, Y.; JIANG, W. J. Silibinin improves palmitate-induced insulin resistance in C2C12 myotubes by attenuating IRS-1/PI3K/Akt pathway inhibition. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 5, p. 440-446, 2015.

LI, R. W.; THERIAULT, A. G.; AU, K.; DOUGLAS, T. D.; CASASCHI, A.; KUROWSKA, E. M.; MUKHERJEE, R. Citrus polymethoxylated flavones improve lipid and glucose homeostasis and modulate adipocytokines in fructose-induced insulin resistant hamsters. **Life Sciences**, v. 79, p. 365–373, 2006.

LIRA, F. S.; ROSA, J. C.; CUNHA, C. A.; RIBEIRO, E. R.; NASCIMENTO, C. O.; OYAMA, L. M.; MOTA, J. F. Supplementing alpha-tocopherol (vitamin E) and vitamin D3 in high fat diet decrease IL-6 production in murine epididymal adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes following LPS stimulation. **Lipids in Health and Disease**, v. 10, n. 37, 2001.

LOPES, J. P.; OLIVEIRA, S. M.; FORTUNATO, J. S. Stress oxidativo e seus efeitos na insulino-resistência e disfunção das células β -pancreáticas: Relação com as complicações da diabetes *mellitus* tipo 2. **Acta Médica Portuguesa**, v. 21, n. 3, p. 293-302, 2008.

MA, C. Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 53, p. 401-426, 2015.

MAHMOUD, A. M.; AHMED, O. M.; ASHOUR, M. B.; ABDEL-MONEIM, A. Hesperidin and naringin attenuate hyperglycemia-mediated oxidative stress and proinflammatory cytokine production in high fat fed/strptozotocin-induced type 2 diabetic rats. **Diabetes and its Complications**, v. 26, p. 483–490, 2012.

MANACH, C.; MORAND, C.; GIL-IZQUIERDO, A.; BOUTELOUP-DEMANGE, C.; RÉMÉSY, C. Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice. **European of Journal of Clinical Nutrition**, v. 57, p. 235-242, 2003.

MARSEGLIA, I.; MANTI, S.; D'ANGELO, G.; NICOTERA, A.; PARISI, E.; DI ROSA, G.; GITTO, E.; ARRIGO, T. Oxidative Stress in Obesity: A Critical Component in Human Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 1; p. 378-400, 2015.

MASI, L. N.; MARTINS, A. R.; CRISMA, A. R.; DO AMARAL, C. L.; DAVANSO, M. R.; SERDAN, T. D. A.; DA CUNHA DE SÁ, R. D. C.; CRUZ, M. M.; ALONSO-VALE, M. I. C.; MATSUDA, M.; SHIMOMURA, I. Increased oxidative stress in obesity: implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. **Obesity Research & Clinical Practice**, v. 7, n. 5, p. 330-341, 2013.

MATSUZAWA-NAGATA, N.; TAKAMURA, T.; ANDO, H.; NAKAMURA, S.; KURITA, S.; MISU, H.; OTA, T.; YOKOYAMA, M.; HONDA, M.; MIYAMOTO, K.; KANEKO, S. Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. **Metabolism**, v. 57, n.8, p. 1071-1077, 2008.

MATTHEWS, D. R.; HOSKER, J. P.; RUDENSKI, A. S.; NAYLOR, B. A.; TREACHER, D. F.; TURNER, R. C. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, v. 28, n. 7, p. 412-419, 1985.

MENG, R.; ZHU, D.; BI, Y.; YANG, D.; WANG, Y. Anti-oxidative effect of apocynin on insulin resistance in high-fat diet mice. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v. 41, n. 3, p. 236-243, 2011.

MORELLI, N. R.; SCAVUZZI, B. M.; MIGLIORANZA, L. H. S.; LOZOVY, M. A. B.; SIMÃO, A. N. C.; DICHI, I. Metabolic syndrome components are associated with oxidative stress in overweight and obese patients. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, v. 62, n.3, p. 309-318, 2018.

MURDOLO, G.; PIRODDI, M.; LUCHETTI, F.; TORTOIOLI, C.; CANONICO, B.; ZERBINATI, C.; GALLI, F.; IULIANO, L. Oxidative stress and lipid peroxidation by products at the crossroad between adipose organ dysregulation and obesity-linked insulin resistance. **Biochimie**, v. 95, p. 585-594, 2013.

NASCIMENTO, A. F. **Influência das dietas padrão e hipercalórica sobre o comportamento corporal e bioquímico de ratos *Wistar***. 102f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia em Clínica Médica), - Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

NEPA – NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO). 1ª ed. Campinas: NEPA – UNICAMP, 2004. 42 p.

NOEMAN, S. A.; HAMOODA, H. E.; BAALASH, A. A. Biochemical Study of Oxidative Stress Markers in the Liver, Kidney and Heart of High Fat Diet Induced Obesity in Rats. **Diabetology and Metabolic Syndrome**, v. 3, n. 17, p. 1-8, 2011.

NOWAK, D.; GOŚLIŃSKI, M.; WOJTOWICZ, E.; PRZYGOŃSKI, K. Antioxidant properties and phenolic compounds of vitamin C-rich juices. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 8, p. 2237-2246, 2018.

NURWANTI, E.; UDDIN, M.; CHANG, J.; HADI, H.; SYED-ABDUL, S.; CHIA-YU SU, E.; NURSETYO, A. A.; MASUD, J. H. B.; BAI, C. Roles of sedentary behaviors and unhealthy foods in increasing the obesity risk in adult men and women: a cross-sectional national study. **Nutrients**, v. 10, n. 6, p. 1-12, 2018.

OLIVE, P. L.; WLODEK, D.; DURAND, R. E.; BANÁTH, J. P. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. **Experimental Cell Research**, v. 198, n. 2, p. 259-267, 1992.

O'NEIL, C. E.; NICKLAS, T. A.; RAMPERSAUD, G. C.; FULGONI, V. L. 100% Orange juice consumption is associated with better diet quality, improved nutrient adequacy, decreased risk for obesity, and improved biomarkers of health in adults: National Health and Nutrition Examination Survey, 2003-2006. **Nutrition Journal**, v. 11, n. 107, p. 1-10, 2017.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, n. 5, p. 270-278, 2009.

PASTERNAK, T.; POTTERS, G.; CAUBERGS, R.; JANSEN, M., A. Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ, and cellular level. **Journal of Experimental Botany**, v. 418, n. 56, p. 1991-2001, 2005.

PAULI, J. R.; CINTRA, D. E.; DE SOUZA, C. T.; ROPELLE, R. New mechanisms by which physical exercise improves insulin resistance in the skeletal muscle. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 4, p. 399-408, 2009.

PEÑA-OYARZUN, D.; BRAVO-SAGUA, R.; DIAZ-VEGA, A.; ALEMAN, L.; CHIONG, M.; GARCIA, L.; BAMBS, C.; TRONCOSO, R.; CIFUENTES, M.; MORSELLI, E.; FERRECCIO, C.; QUEST, A. F. G.; CRIOLLO, A.; LAVANDERO, S. Autophagy and oxidative stress in non-communicable diseases: A matter of the inflammatory state?. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 124, p. 61-78, 2018.

PHANIENDRA, A.; JESTADI, D. B; PERIYASAMY, L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 30, n. 1, p. 11-26, 2015.

PIZZINO, G.; IRRERA, N.; CUCINOTTA, M.; PALLIO, G.; MANNINO, F.; ARCORACI, V.; SQUADRITO, F.; ALTAVILLA, D.; BITTO, A. Oxidative stress: harms and benefits for human health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1-13, 2017.

POPKIN, B. M. Nutrition Transition and the Global Diabetes Epidemic. **Current Diabetes Reports**, v. 9, n. 64, p. 1-14, 2015.

QATANANI, M.; LAZAR, M. A. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. **Genes & Development**, v. 21, p. 1443-1455, 2007.

RAGAB, S. M. .M.; ELGHAFAR, S. K. H. A.; EL-METWALLY, T. H.; BADR, G.; MAHMOUD, M. H.; OMAR, H. M. Effect of a high fat, high sucrose diet on the promotion of non-alcoholic fatty liver disease in male rats: the ameliorative role of three natural compounds. **Lipids in Health and Disease**, v. 14, n. 83, p. 1-11, 2015.

RATNAM, D. V.; ANKOLA, D. D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D. K.; RAVI KUMAR, M. N. V. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**, v. 113, n. 3, p. 189-207, 2006.

REEVES, P. G.; FORREST, H. N.; FAHEY JUNIOR, G. C. 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 -76A rodent diet. **The Journal of Nutrition**, v. 22, p. 1939-1951, 1993.

RISO, P.; VISIOLI, F.; GARDANA, C.; GRANDE, S.; BRUSAMOLINO, A.; GALVANO, F.; GALVANO, G.; PORRINI, M. Effects of blood orange juice intake on antioxidant bioavailability and on different markers related on oxidative stress. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 4, p. 941-947, 2005.

RÖDER, P. V.; WU, B.; LIU, Y.; HAN, W. Pancreatic regulation of glucose homeostasis. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 48, n. 3, p. 1-19, 2016.

ROSINI, T. C.; SILVA, A. S.; MORAES, C. D. Diet-induced obesity: rodent model for the study of obesity-related disorders. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 3, p. 383-387, 2012.

SAVINI, I.; CATANI, M. V.; EVANGELISTA, D.; GASPERI, V.; AVIGLIANO, L. Obesity-associated oxidative stress: Strategies finalized to improve redox state. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 5, p. 10497-10538, 2013.

SEN, S.; CHAKRABORTY, R.; SRIDHAR, C.; REDDY, Y. S. R.; DE, B. Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: Current status and future prospect. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 3, n. 1, p. 91-100, 2010.

SILVA, L. D. **Diabetes – Sinalização insulínica**: Bases moleculares do exercício física e as vias de sinalização da insulina. 2016, 37s.

SIMPSON, E. J.; MENDIS, B.; MACDONALD, I. A. Orange juice consumption and its effect on blood lipid profile and indices of the metabolic syndrome; a randomised, controlled trial in an at-risk population. **Food Function**, v. 7, n. 4, p. 1884-1891, 2016.

SUMIYOSHI, M.; SAKANAKA, M.; KIMURA, Y. Chronic intake of high-fat and high-sucrose diets differentially affects glucose intolerance in mice. **Journal of Nutrition**, v. 136, n. 3, p. 582-587, 2006.

STEMMER, K.; PEREZ-TILVE, D.; ANANTHAKRISHNAN, G.; BORT, A.; SEELEY, R. J.; TSCHÖP, M. H.; DIETRICH, D. R.; PFLUGER, P. T. High-fat-diet-induced obesity causes an inflammatory and tumor-promoting microenvironment in the rat kidney. **Disease Models and Mechanisms**, v. 5, p. 627-635, 2012.

TANGVARASITTICHAJ, S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. **World Journal of Diabetes**, v. 6, n. 3, p. 456-480, 2015.

TAZIMA, Z. H.; NEVES, C. S. V. J.; YADA, I. F. U.; LEITE JÚNIOR, R. P. Yield and fruit quality of 'Pêra' orange tree accessions in northern Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 1, 2010.

TIWARI, B. K.; PANDEY, K. B.; ABIDI, A. B.; RIZVI, S. I. Markers of oxidative stress during diabetes mellitus. **Journal of Biomarkers**, v. 2013, p. 1-8, 2013.

VARGAS-ROBLES, H.; RIOS, A.; ARELLANO-MENDOZA, M.; ESCALANTE, B. A.; SCHNOOR, M. Antioxidative diet supplementation reverses high-fat diet-induced increases of cardiovascular risk factors in mice. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, p. 1-10, 2015.

VINCENT, H. K.; TAYLOR, A. G. Biomarkers and potential mechanisms of obesity induced oxidant stress in humans. **International Journal of Obesity**, v. 30, p. 400-418, 2006.

XU, C.; FRASER, P. D.; WANG, W.; BRAMLEY, P. M. Differences in the carotenoid content of ordinary citrus and lycopene-accumulating mutants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, N. 15, p. 5474-5481, 2006.

WADA, T.; KENMOCHI, H.; MIYASHITA, Y.; SASAKI, M.; OJIMA, M.; SASAHARA, M.; KOYA, D.; TSUNEKI, H.; SASAOKA, T. Spironolactone improves glucose and lipid metabolism by ameliorating hepatic steatosis and inflammation and suppressing enhanced gluconeogenesis induced by high-fat and high-fructose diet. **Endocrinology**, v. 151, n. 5, p. 2040-2049, 2010.

WANG, M.; CHEN, L.; CLARK, G. O.; LEE, Y.; STEVENS, R. D.; ILKAYEVA, O. R.; WENNER, B. R.; BAIN, J. R.; CHARRON, M. J.; NEWGARD, C. B.; UNGER, R. H. Leptin therapy in insulin-deficient type I diabetes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 11, p. 4813-4819, 2010.

WANG, J.; ZHU, H.; YANG, Z.; LIU, Z. Antioxidative effects of hesperetin against lead acetate-induced oxidative stress in rats. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 45, n. 4, p. 395-398, 2013.

WHO – World Health Organization. **Global status report on noncommunicable diseases 2017**. Geneva: World Health Organization, 2017.

WU, P.; JIANG, W.; LIU, Y.; CHEN, G.; JIANG, J.; LI, S.; FENG, L.; ZHOU, X. Effect of choline on antioxidant defenses and gene expressions of Nrf2 signaling molecule in the spleen and head kidney of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 38, n. 2, p. 374-382, 2014.

WYDRA, R. J.; OLIVER, C. E.; ANDERSON, K. W.; DZIUBLA, T. D.; HILT, J. Z. Accelerated generation of free radicals by iron oxide nanoparticles in the presence of an alternating magnetic field. **RSC Advances**, v. 5, n. 25, p. 18888-18893, 2015.

YANG, H. L.; CHEN, S. C.; SENTHIL KUMAR, K. J.; YU, K. N.; LEE CHAO, P. D.; TSAI, S. Y.; HOU, Y. C.; HSEU, Y. C. Anti-oxidant and anti-inflammatory potential of hesperetin metabolites obtained from hesperetin-administered rat serum: an ex vivo approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 522-532, 2012.

ZINÖCKER, M. K.; LINDSETH, I. A. The western diet–microbiome–host interaction and its role in metabolic disease. **Nutrients**, v. 10, n. 3, p. 1-15, 2018.

ANEXO 1. Aprovação do trabalho pela Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS
 Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

CEUA/FCF 66.2016-P529

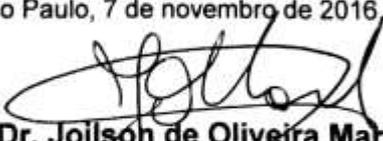
CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Efeito comparativo da ingestão de sucos de laranjas Moro e Pera sobre o estresse oxidativo de camundongos com resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica**, registrada com o nº 529, sob a responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Jéssica Ramos Rocha Pereira**, sob orientação do(a) **Profa. Dra. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto** – que envolve produção ou manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto Federal nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e das normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP), em reunião de **4 de novembro de 2016**.

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	04/11/2016 a 30/08/2018
Espécie/linhagem/raça	-.-
Número de animais	-.-
Peso/Idade	-.-
Sexo	-.-
Origem	Material biológico cedido do protocolo CEUA 525

Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento do projeto de pesquisa, o respectivo **relatório final**.

São Paulo, 7 de novembro de 2016,


Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
 Coordenador da CEUA/FCF/USP

ANEXO 2. Tabela de composição nutricional do mix de minerais, que fornece as concentrações recomendadas de vitaminas para a dieta controle.

Composição	g/kg mix
Elemento mineral essencial:	
Carbonato de cálcio	357,00
Fosfato de potássio monobásico	196,00
Citrato de potássio	70,78
Cloreto de sódio	74,00
Sulfato de potássio	46,60
Óxido de magnésio	24,00
Citrato de ferro	6,06
Carbonato de zinco	1,65
Carbonato de manganês	0,63
Carbonato de cobre	0,30
Iodato de potássio	0,01
Selenato de sódio	0,01
Molibdato de amônio	0,01
Elemento mineral potencialmente benéfico:	
Metassilicato de Sódio	1,45
Sulfato de cromo e potássio	0,28
Cloreto de lítio	0,02
Ácido bórico	0,08
Fluoreto de sódio	0,06
Carbonato de níquel	0,03
Vanadato de amônio	0,01
Sacarose em pó	221,03
Total	100,00

Fonte: Adaptado de REEVES et al. (1993).

ANEXO 3. Tabela de composição nutricional do mix de vitaminas, que fornece as concentrações recomendadas de vitaminas para a dieta controle.

Composição	g/kg mix
Ácido nicotínico	3,00
Pantotenato de cálcio	1,60
Piridoxina-HCl	0,70
Tiamina-HCl	0,60
Riboflavina	0,20
Ácido fólico	0,02
D-biotina	2,50
Cianocobalamina	15,00
Acetato de α -tocoferol (vit. E)	0,80
Palmitato de trans-retinil (vit.A)	0,25
Filoquinona (vit. K)	0,08
Sacarose em pó	974,655
Total	100,00

Fonte: Adaptado de REEVES et al. (1993).

ANEXO 4. Ficha do aluno gerada pelo sistema administrativo da pós-graduação.

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
 Faculdade de Ciências Farmacêuticas
 Documento sem validade oficial
 FICHA DO ALUNO

9131 - 10098433/1 - Jéssica Ramos Rocha Pereira

Email: jramos@usp.br
 Data de Nascimento: 22/04/1994
 Cédula de Identidade: RG - 36.523.841-7 - SP
 Local de Nascimento: Estado de São Paulo
 Nacionalidade: Brasileira
 Graduação: Bacharel em Nutrição - Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas - São Paulo - Brasil - 2015

Curso: Mestrado
 Programa: Ciência dos Alimentos
 Área: Bromatologia
 Data de Matrícula: 17/08/2016
 Início da Contagem de Prazo: 17/08/2016
 Data Limite para o Depósito: 18/02/2019
 Orientador: Prof(a). Dr(a). Neuza Mariko Aymoto Hassimotto - 17/08/2016 até o presente. Email: aymoto@usp.br
 Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 17/08/2016
 Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 03/10/2017
 Data do Depósito do Trabalho:
 Título do Trabalho:
 Data Máxima para Aprovação da Banca:
 Data de Aprovação da Banca:
 Data Máxima para Defesa:
 Data da Defesa:
 Resultado da Defesa:
 Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 17/08/2016

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 16/07/2018

Impresso em: 18/01/2019 20:16:28

Janus

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9131 - 10098433/1 - Jéssica Ramos Rocha Pereira

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
BMB5804-3/3	O Órgão Adiposo como Centro Regulador do Metabolismo (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	08/09/2016	21/10/2016	60	4	94	A	N	Concluída
FBA5754-1/3	Atualização em Ciências Farmacêuticas	26/09/2016	02/10/2016	30	2	100	A	N	Concluída
FBA5753-1/2	Nutrigenômica e Programação das Doenças Crônicas Não-Transmissíveis	26/09/2016	02/10/2016	30	2	100	A	N	Concluída
FBA5874-6/2	Química e Análise dos Alimentos Lipídicos	01/11/2016	12/12/2016	60	4	100	A	N	Concluída
FBA5905-1/1	Planejamento Experimental e Análise Multivariada	13/02/2017	26/02/2017	60	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
FBA5899-3/1	Biodisponibilidade de Nutrientes e de Substâncias Bioativas em Alimentos e Dietas	01/03/2017	11/04/2017	90	6	100	A	N	Concluída
FBT5788-1/2	Aplicação de Alimentos Probióticos na Modulação de Imunidade de Mucosas	06/03/2017	26/03/2017	60	4	100	A	N	Concluída
ICB5711-3/1	Redação de Trabalhos Científicos (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	07/03/2017	10/04/2017	45	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
FBA5728-4/4	Aprimoramento Pedagógico	30/05/2017	26/06/2017	60	4	87	A	N	Concluída
FBA5896-7/2	Tópicos em Ciência dos Alimentos e Nutrição II	17/11/2017	25/01/2018	30	2	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	28
Estágios:			
Total:	0	25	28

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
 Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 16/07/2018

Impresso em: 18/01/2019 20:16:28

ANEXO 5. Currículo do Sistema de Currículos Lattes.



Jéssica Ramos Rocha Pereira

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/0324291796083392>
Última atualização do currículo em 18/01/2019

Possui graduação em Nutrição pelo Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas (FMU). Tem experiência na área de Nutrição Clínica, com ênfase em Oncologia, Cirurgia Bariátrica e Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT). Atualmente é aluna de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, pela Universidade de São Paulo (USP). **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Jéssica Ramos Rocha Pereira
Nome em citações bibliográficas	PEREIRA, J. R. R.;PEREIRA, JESSICA RAMOS ROCHA;PEREIRA, J.R.R.;PEREIRA, JÉSSICA

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Avenida Professor Lineu Prestes Butantã 05508000 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30913007 Ramal: 3647
------------------------------	--

Formação acadêmica/titulação

2016	Mestrado em andamento em Ciências dos Alimentos (Conceito CAPES 7). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Efeito da ingestão de sucos de laranja, variedades Moro e Pera, sobre o estresse oxidativo de camundongos saudáveis e com resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica e hiperglicídica, Orientador: 🇧🇷 Neusa Mariko Aymoto Hassimoto. Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil. Grande área: Ciências da Saúde
2012 - 2015	Graduação em Nutrição. Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas, FMU, Brasil. Título: Uso da Farinha da Casca do Maracujá-Amarelo (<i>Passiflora edulis f. flavicarpa</i> Deg.) e Impactos à Saúde: Do Potencial Terapêutico aos Efeitos Colaterais. Orientador: Prof. Ms. Fernanda Galante.

Formação Complementar

2016 - 2016	Escrita Científica: Produção de Artigos de Alto Impacto. (Carga horária: 6h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2016 - 2016	Bioestatística. (Carga horária: 16h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2011 - 2011	Inglês Intermediário. Escola Profissionalizante Nossa Senhora de Fátima, EPNSF, Brasil.

Atuação Profissional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional
2016 - Atual

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Mestranda, Carga horária: 40

Grupo NotreDame Intermédica, GNDI, Brasil.

Vínculo institucional
2016 - 2016
Outras informações

Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Nutricionista, Carga horária: 30
Fornecimento de orientações nutricionais individuais e em grupo à pacientes portadores de patologias crônicas, com o auxílio de equipe multidisciplinar, composta por médicos, psicólogos, nutricionistas e enfermeiros; Monitoramento de pacientes em tratamento de pré e pós operatório de cirurgia bariátrica, seguindo os critérios estabelecidos pela Agência Nacional de Saúde Suplementar; Realização de Perfil Saúde em empresas conveniadas ao Grupo NotreDame Intermédica, a fim de fornecer atendimento e orientação individualizados a cada colaborador.

Intermédica, GNDI, Brasil.

Vínculo institucional
2014 - 2015
Outras informações

Vínculo: Estagiário, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 30
Estágio extracurricular na área de Nutrição Clínica e Saúde Coletiva.

Clube Hebraica, CLUBE HEBRAICA, Brasil.

Vínculo institucional
2015 - 2015
Outras informações

Vínculo: Estagiário, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 30
Estágio curricular na área de Saúde Coletiva.

Hospital Bandeirantes, HB, Brasil.

Vínculo institucional
2015 - 2015
Outras informações

Vínculo: Estagiário, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 30
Estágio curricular na área de Nutrição Clínica.

MWM International, MWM, Brasil.

Vínculo institucional
2015 - 2015
Outras informações

Vínculo: Estagiário, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 30
Estágio curricular na área de Nutrição Coletiva.

Hotel Caesar Park - Faria Lima, CAESAR PARK, Brasil.

Vínculo institucional
2013 - 2014
Outras informações

Vínculo: Estagiário, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 30
Estágio extracurricular na área de Alimentação Coletiva e Controle de Qualidade.

Áreas de atuação

1. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Nutrição.
2. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Nutrição / Subárea: Bioquímica da Nutrição.
3. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Nutrição / Subárea: Dietética.

Idiomas

Inglês Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica

1. COQUEIRO, AUDREY ; RAIZEL, RAQUEL ; BONVINI, ANDREA ; HYPÓLITO, THAÍS ; GODOES, ALLAN ; **PEREIRA, JÉSSICA** ; GARCIA, AMANDA ; LARA, RAFAEL ; ROGERO, MARCELO ; TIRAPEGUI, JULIO . Effects of Glutamine and Alanine Supplementation on Central Fatigue Markers in Rats Submitted to Resistance Training. *Nutrients* **10**, v. 10, p. 119, 2018.
2. COQUEIRO, AUDREY YULE ; RAIZEL, RAQUEL ; BONVINI, ANDREA ; GODOES, ALLAN DA MATA ; HYPÓLITO, THAÍS MENEZES ; **PEREIRA, JESSICA RAMOS ROCHA** ; ROGERO, MARCELO MACEDO ; TIRAPEGUI, JULIO . Effects of Glutamine and Alanine Supplementation on Adiposity, Plasma Lipid Profile, and Adipokines of Rats Submitted to Resistance Training. *JOURNAL OF DIETARY SUPPLEMENTS*, v. 15, p. 1-13, 2018.
3. COQUEIRO, A.Y. ; **PEREIRA, J.R.R.** ; GALANTE, F. . Farinha da casca do fruto de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg (maracujá-amarelo): do potencial terapêutico aos efeitos adversos. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 18, p. 563-569, 2016.
4. COQUEIRO, A.Y. ; ARRUDAS, C. N. ; **PEREIRA, J. R. R.** ; SILVA, M. T. ; SILVA, V. G. ; ALVARENGA, M. L. . Insatisfação corporal em atletas de Voleibol feminino. *Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício*, v. 10, p. 748-758, 2016.

Resumos publicados em anais de congressos

1. **PEREIRA, J. R. R.** ; GALANTE, F. . Papel da aromatase na produção de estrógenos e a ação de fitoterápicos nesta via. In: 13º Congresso Nacional de Iniciação Científica (CONIC), 2013, Campinas. *Anais do Conic-Semesp*, 2013. v. 2.

Apresentações de Trabalho

1. **PEREIRA, J.R.R.** ; SIQUEIRA, M. S. B. ; LAJOLO, F. M. ; HASSIMOTTO, N. M. A. . Orange juices intake, cv. Moro and Pera: Effects on oxidative stress of healthy and insulin resistant mice induced by high-fat and high carbohydrate diet. 2017. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
2. **PEREIRA, J.R.R.** ; GALANTE, F. . Plantas medicinais com ação sobre a aromatase e controle da síntese de estradiol. 2014. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
3. **PEREIRA, J.R.R.** ; GALANTE, F. . Papel da aromatase na produção de estrógenos e a ação de fitoterápicos nesta via. 2013. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
4. **PEREIRA, J.R.R.** ; GALANTE, F. . Papel da aromatase na produção de estrógenos e a ação de fitoterápicos nesta via. 2013. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. CD Lopes.Perfil Saúde (Equipe Multidisciplinar). 2018. (Oficina).
2. Hospital de Olhos.Perfil Saúde (Equipe Multidisciplinar). 2018. (Oficina).
3. 1 International Symposium on Citrus Bioactive Compounds and Health Benefits - Citrus and Health Scientific Advances, Perspectives and Challenges., 2018. (Simpósio).
4. 2nd FORC International Symposium Advances in Food Science and Nutrition.Orange juices intake, cv. Moro and Pera: Effects on oxidative stress of healthy and insulin resistant mice induced by high-fat and high carbohydrate diet. 2017. (Simpósio).
5. Cromatografia: Aspectos práticos de seleção de colunas de HPLC, GC e preparo de amostra. 2017. (Seminário).
6. ILSI Brasil - XVI Event of the International Workshops Series on Foods with Claims of Functional and / or Health Properties Functional Foods and Bioactive Compounds: Scientific Advances, Perspectives and Challenges. 2017. (Congresso).
7. 51ª Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica. Simpósio de Alimento, Nutrição e Doenças Crônicas. 2016. (Simpósio).
8. Corglass Matriz.Perfil Saúde (Equipe Multidisciplinar). 2016. (Oficina).
9. Danone.Metabolismo do Cálcio e Vitamina D na Obesidade e Cirurgia Bariátrica. 2016. (Encontro).
10. Grupo NotreDame Intermética.Atualização científica de protocolos utilizados no tratamento de obesidade mórbida. 2016. (Encontro).
11. II Metabolic Programming Workshop. 2016. (Congresso).
12. ILSI Brasil - 15º Workshop "Microbioma, Probióticos e Saúde". 2016. (Congresso).
13. Molecular mechanisms of target organ damage related to hypertension. 2016. (Seminário).
14. Sindicato Dos Trabalhadores Nas Indústrias Metalúrgicas.Perfil Saúde (Equipe Multidisciplinar). 2016. (Oficina).
15. 11ª Feira de Alimentação Saudável, Suplementos, Produtos Naturais e Saúde - Natural Tech. 2015. (Feira).
16. 11ª Feira Internacional de Produtos Orgânicos e Agroecologia - Bio Brazil Fair e Bio Fach América Latina. 2015. (Feira).
17. II Simpósio de Iniciação Científica do Complexo Educacional (FMU).Plantas medicinais com ação sobre a aromatase e controle da síntese de estradiol. 2014. (Simpósio).
18. 13º Congresso Nacional de Iniciação Científica (CONIC). Papel da aromatase na produção de estrógenos e a ação de fitoterápicos nesta via. 2013. (Congresso).
19. 1 Simpósio de Iniciação Científica do Complexo Educacional (FMU).Papel da aromatase na produção de estrógenos e a ação de fitoterápicos nesta via. 2013. (Simpósio).