

Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rutina na concentração de colesterol-HDL

Nutritional supplementation with natural antioxidants: effect of rutin on HDL-cholesterol concentration

Hosana Gomes RODRIGUES¹

Yeda Sant'Ana DINIZ²

Luciane Aparecida FAINE³

Jeane Alves ALMEIDA⁴

Ana Angélica Henrique FERNANDES⁵

Ethel Lourenzi Barbosa NOVELLI⁶

RESUMO

O estresse oxidativo está frequentemente associado com alterações nas concentrações séricas de glicose e lipídios. O objetivo deste trabalho foi verificar se as alterações bioquímicas séricas, induzidas pela suplementação nutricional com o flavonóide rutina, estão associadas a propriedades antioxidantes. A administração de rutina (120mg/kg/semana), durante 15 dias, não induziu variação na glicemia de jejum e no teste de tolerância à glicose. Embora não tenham sido observadas mudanças significativas nas concentrações séricas de lipoperoxídios, triacilgliceróis, colesterol-LDL e proteínas totais, a suplementação nutricional com rutina demonstrou importante papel na prevenção da aterosclerose, pois induziu elevação significativa da lipoproteína de alta densidade (colesterol-HDL de $35,82 \pm 2,31$ mg/dL para $44,40 \pm 3,11$ mg/dL). Como não foram observadas alterações na glutathione peroxidase, enquanto as atividades da superóxido dismutase foram elevadas pela ingestão de rutina. Pode-se concluir que os efeitos antioxidantes deste flavonoide, aumentando a concentração de colesterol-HDL, estão relacionados à elevação nas atividades da superóxido dismutase. A ação antioxidante da rutina pode estar relacionada à destruição do radical superóxido (O_2^-).

Termos de indexação: rutina, colesterol-HDL, antioxidantes, suplementação nutricional.

¹ Graduanda de Nutrição, Instituto de Biociência, Universidade Estadual Paulista.

² Doutoranda em Fisiopatologia, Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista.

³ Mestranda em Fisiopatologia, Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista.

⁴ Doutoranda em Ciências Biológicas, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

⁵ Departamento de Química e Bioquímica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

⁶ Departamento de Química e Bioquímica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. 18618-000, Botucatu, SP, Brasil. Correspondência para/Correspondence to: E.L.B. NOVELLI. E-mail:drno@uol.com.br

ABSTRACT

The oxidative stress is frequently related to alterations in serum glucose and lipids concentrations. The aim of this study was to verify if antioxidant properties are associated with the serum biochemical alterations, induced by dietary supplementation with the flavonoid rutin (60 mg/kg/week) during 15 days. No changes were observed in fasting blood glucose and glucose tolerance test and in triacylglycerols, LDL cholesterol, total proteins and lipoperoxides concentrations, through dietary supplementation with rutin. However, rutin showed an important effect on atherosclerosis prevention, since it increased significantly the HDL cholesterol concentrations (from 44.40 ± 3.11 mg/dL to 35.82 ± 2.31 mg/dL). As no alterations were observed in glutathione peroxidase, while superoxide dismutase activities were significantly increased by rutin intake, it was concluded that the antioxidant effects of this flavonoid, increasing HDL cholesterol concentrations, are associated with an increased superoxide dismutase activity. The antioxidant properties of rutin may be associated with superoxide radical (O_2^-) destruction.

Index terms: rutin, HDL-cholesterol, antioxidant, nutritional supplementary.

INTRODUÇÃO

Evidências recentes têm demonstrado que dietas com elevado conteúdo de vegetais, frutas e grãos podem reduzir o risco de inúmeras doenças. Vários autores têm associado os efeitos benéficos desses alimentos à presença de substâncias antioxidantes. A importância do estudo de agentes antioxidantes está relacionada à freqüente associação entre danos teciduais e liberação de radicais livres¹.

Radicais livres são átomos ou moléculas com um ou mais elétrons não pareados em seu orbital mais externo, o que os torna extremamente reativos². Os organismos aeróbicos derivam o ATP (trifosfato de adenosina) da redução completa do O_2 por quatro elétrons, através do transporte mitocondrial de elétrons. Aproximadamente 98% de todo o oxigênio consumido pelas células entram nas mitocôndrias, onde são reduzidos pela citocromo oxidase. Entretanto, o oxigênio pode receber menos de quatro elétrons e formar espécies reativas de oxigênio (ERO), ou radicais livres. A produção de radicais livres pelos organismos representa, portanto, um processo fisiológico. Porém, em determinadas condições, pode ocorrer elevação na produção de ERO, levando ao estresse oxidativo, durante o qual algumas destas espécies reativas de oxigênio, tais

como radical superóxido (O_2^-), radical hidroxil (OH^*) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), podem produzir danos, como a lipoperoxidação de lipídios insaturados das membranas celulares.

Antioxidantes são substâncias capazes de prevenir os efeitos deletérios da oxidação, inibindo o início da lipoperoxidação, seqüestrando radicais livres e/ou quelando íons metálicos. Eles protegem organismos aeróbicos do estresse oxidativo, definido como elevação na formação de espécies reativas de oxigênio³. Entre os antioxidantes que têm recebido maior atenção, por sua possível ação benéfica na glicemia e prevenção da doença aterosclerótica, estão as vitaminas C (ácido ascórbico) e E (tocoferol), os carotenóides e os flavonóides.

Os flavonóides são antioxidantes polifenólicos encontrados nos alimentos, principalmente nas verduras e frutas. São derivados do grupo benzo- γ -pirano e possuem um esqueleto de 15 átomos de carbono. Por possuírem largo espectro de atividades biológica e farmacológica, têm recebido ampla atenção dos pesquisadores desde a década de 90⁴. Têm sido utilizados no tratamento de vários tipos de doenças, tais como *diabetes mellitus*, alergias e úlceras pépticas⁵. São denominados fitoquímicos, devido à origem vegetal, sendo considerados princípios ativos em muitas plantas⁶.

Os flavonóides podem ser sintéticos ou naturais. Estudos toxicológicos têm demonstrado que os antioxidantes sintéticos podem provocar efeitos indesejáveis nos organismos humano e animal⁷, indicando a necessidade de pesquisas sobre a utilização de antioxidantes naturais. Por outro lado, inúmeros antioxidantes naturais têm sido consumidos sem o devido conhecimento de suas propriedades benéficas, bem como de eventuais efeitos colaterais.

Neste trabalho foram estudados os efeitos do flavonóide rutina (quercetina-3-ramnosilglicosídeo) sobre parâmetros bioquímicos séricos e sobre lipoperóxidos e enzimas antioxidantes. Tendo em vista a importância da peroxidação e do estresse oxidativo, em alterações na glicemia e nas dislipidemias, foi verificado se a propriedade antioxidante da rutina está associada a seu efeito sobre parâmetros bioquímicos séricos.

MATERIAL E MÉTODOS

O delineamento experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal, do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Botucatu. Foram utilizados 12 ratos *Wistar*, machos, adultos, com peso inicial médio de 200g. Os animais foram provenientes do Biotério Central da UNESP, Campus de Botucatu, sendo transferidos para a Sala de Manutenção de Animais de Laboratório, do Departamento de Química e Bioquímica, UNESP, Botucatu, onde permaneceram durante todo o período experimental, à temperatura de 23°C, com período claro-escuro de 12 horas, recebendo dieta basal (Purina Labina, Campinas, Brasil) e água *ad libitum*. Os ratos foram distribuídos em gaiolas de plástico, seis animais por gaiola e marcados individualmente. Os animais foram pesados semanalmente e a ingestão alimentar foi determinada diariamente no mesmo horário (9 – 10h).

Os animais foram divididos em dois grupos. O grupo (A) foi considerado controle, enquanto

os ratos do grupo (B) foram tratados, duas vezes por semana, com solução aquosa de rutina (Sigma) (60mg/kg, 0,9mL/rato), durante 15 dias.

Após duas semanas de tratamento e após 12 horas de jejum, foi realizado o teste de tolerância à glicose, com administração (gavage) de solução aquosa de glicose (20%). A glicemia foi determinada através do sangue coletado pela veia da cauda após 15, 30, 60 e 120 minutos da administração de glicose. A seguir os animais foram sacrificados por fratura cervical e decapitação. O sangue foi coletado em tubos de centrifuga, com auxílio de funil. O soro foi separado por centrifugação a 3000rpm e utilizado para as determinações de proteínas totais, glicose, colesterol, colesterol-HDL, triacilgliceróis^{8,9}. As concentrações de colesterol-LDL foram obtidas a partir das determinações de colesterol total, colesterol-HDL e triacilgliceróis, segundo Friedewald *et al.* (1972)¹⁰

As atividades da superóxido dismutase (SOD – E.C.1.15.1.1) foram determinadas pela técnica de Crouch *et al.* (1981)¹¹, tendo como base a capacidade de a enzima inibir a redução do NBT (Nitroblue-tetrazólio – Sigma) por radicais superóxido, que foram gerados pela hidroxilamina, em meio alcalino. A glutathione peroxidase (GSHPx-E.C. 1.11.1.9.) foi determinada em presença de cumene hidroperóxido (Sigma)¹². A concentração de lipoperóxido foi determinada pela técnica do ácido tiobarbitúrico (TBA)¹³. Como padrão foi utilizado o malondialdeído (1,1,3,3-tetraepoxipropano - Sigma).

Os resultados foram expressos como média \pm desvio-padrão. Foram calculados a estatística "F" e o teste "t", para contrastes entre pares de médias, considerando-se $\alpha = 0,05$ ¹⁴.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho vem contribuir para o estudo de antioxidantes naturais. Não há dúvidas de que a alimentação exerce papel fundamental no equilíbrio metabólico e na manutenção da saúde

e que dietas contendo compostos antioxidantes podem inibir o aparecimento de inúmeras doenças.

Nesta pesquisa, animais tratados com rotina apresentaram ganho de peso ($113,28 \pm 3,12$ g/dia) e ingestão alimentar ($26,41 \pm 1,41$ g/dia) semelhantes aos observados no grupo controle ($115,16 \pm 5,22$ e $25,99 \pm 1,31$ g/dia, respectivamente para ganho de peso e ingestão alimentar), indicando que os efeitos do flavonóide sobre os parâmetros bioquímicos séricos não estão relacionados a mudanças na eficiência alimentar (ganho de peso/consumo alimentar). Não foram observadas alterações significativas na glicemia de jejum e no teste de tolerância à glicose, pela administração de rotina durante 15 dias (Tabela 1). Conforme constataram Shimizu *et al.* (1997)¹⁵, entre as propriedades benéficas da rotina estava a diminuição da glicemia. Por outro lado, segundo demonstraram Brown *et al.* (1998)¹⁶, alguns efeitos da rotina eram

dependentes de sua interação com o íon cobre. Neste trabalho, os animais não receberam suplementação nutricional com cobre, o que poderia explicar a manutenção na glicemia e no teste de tolerância à glicose (Tabela 1).

Não houve variações significativas nas concentrações séricas de proteínas totais, colesterol, triacilgliceróis, na lipoproteína do colesterol-LDL e no lipoperóxido. A administração de rotina apresentou importante efeito na diminuição dos fatores de risco para doenças cardiovasculares (DCV), pois induziu elevação significativa da lipoproteína do colesterol-HDL sérico (Tabela 2).

As DCV representam uma relevante causa de mortalidade nas populações. As alterações causadoras de DCV ocorrem lentamente nos organismos e o estudo de compostos que diminuem o aparecimento de fatores de risco clássicos são de grande interesse. Os indicadores de risco para as DCV mais importantes são a

Tabela 1. Glicemia e tolerância à glicose em ratos controle (A) e tratados com rotina (B).

Glicemia (mg/dL)	Grupos	
	A	B
Jejum	$58,17 \pm 4,07$	$58,50 \pm 5,47$
15 minutos após ingestão de glicose	$110,50 \pm 14,32$	$111,83 \pm 15,09$
30 minutos após ingestão de glicose	$115,00 \pm 10,49$	$115,00 \pm 10,75$
60 minutos após ingestão de glicose	$76,83 \pm 15,02$	$77,17 \pm 19,40$
120 minutos após ingestão de glicose	$54,17 \pm 15,85$	$55,83 \pm 6,49$

Tabela 2. Parâmetros bioquímicos séricos em ratos controle (A) e tratados com rotina (B).

Determinações bioquímicas	Grupos	
	A	B
Proteína total (g/dL)	$4,26 \pm 0,22$	$4,35 \pm 0,23$
Colesterol total (mg/dL)	$93,73 \pm 4,12$	$99,30 \pm 4,50$
Colesterol HDL (mg/dL)	$35,82 \pm 2,31$	$44,40 \pm 3,11^*$
Colesterol LDL (mg/dL)	$32,73 \pm 6,30$	$30,32 \pm 7,18$
Triacilglicerol (mg/dL)	$50,70 \pm 8,70$	$58,63 \pm 8,14$
Colesterol-LDL/colesterol total	$0,39 \pm 0,003$	$0,30 \pm 0,001^*$
Lipoperóxido (nmol/mL)	$5,24 \pm 0,04$	$5,19 \pm 0,30$
SOD (U/mg PT)	$17,11 \pm 0,84$	$19,48 \pm 0,23^*$
GSH-Px (U/mL)	$4,20 \pm 0,57$	$5,66 \pm 1,24$

* As médias encontradas diferem significativamente, pelo teste F, por ANOVA, $p < 0,05$.

elevação de colesterol-LDL e a diminuição de colesterol-HDL¹⁷. De acordo com diversas pesquisas, a oxidação da LDL desempenha um papel essencial na patogênese da aterosclerose. Neste trabalho, não foram observadas alterações no colesterol-LDL e na concentração de lipoperoxídidos na presença de rutina. A lipoperoxidação está aumentada na presença de aterosclerose e a lipoproteína HDL é intensamente degradada devido a processos oxidativos¹⁸. Além disso, o índice aterogênico, obtido pela relação colesterol-LDL/colesterol total¹⁹, foi diminuído e o colesterol-HDL foi significativamente mais elevado nos animais tratados com rutina (Tabela 2).

Haenen *et al.* (1997)⁵ verificaram que os flavonóides inibiam a ação do peróxido de nitrito. Segundo esses autores, estas atividades antioxidantes eram responsáveis pelos efeitos benéficos sobre o dano cardíaco coronariano. O peróxido de nitrito causa oxidação das lipoproteínas de baixa densidade, o que tem sido considerado a chave do processo na etiologia da aterosclerose. Radicais livres podem iniciar danos celulares através da lipoperoxidação, a qual é uma reação em cascata, pois propaga-se continuamente. A inibição da lipoperoxidação depende da presença de antioxidantes e das atividades de enzimas, como a SOD e a GSH-Px.

Embora não tenham sido observadas alterações nas atividades da glutathione peroxidase (GSH-Px), na presença de rutina foi evidenciada elevação significativa na atividade da superóxido dismutase (SOD) (Tabela 2). A SOD catalisa a destruição do radical superóxido pela formação de H₂O₂. A GSH-Px catalisa a conversão de H₂O₂ em água²⁰. Não foram constatadas alterações na GSH-Px, enquanto as atividades da SOD foram elevadas pelo tratamento com rutina, podendo-se afirmar que as atividades antioxidantes da rutina estão associadas à elevação nas atividades da SOD.

A rutina tem sido considerada um antilipoperoxidante, pois pode neutralizar radicais hidroxil e superóxido⁴. Segundo relataram Cotelle *et al.* (1992)²¹, comparando o efeito do α -tocoferol, do ácido ascórbico e da rutina no

processo de peroxidação, a rutina era o mais potente inibidor de radicais livres.

Neste estudo, foi possível demonstrar que os efeitos benéficos da rutina, com elevação do colesterol-HDL e diminuição dos fatores de risco para a aterosclerose e DCV, estão associados à elevação na atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase. É evidente a atuação da rutina como ativadora desta importante enzima antioxidante.

O efeito antioxidante da rutina e o aumento da concentração de colesterol-HDL sérico foram relacionados à elevação nas atividades da SOD. Foi possível concluir que a atividade antioxidante da rutina está relacionada à destruição do radical superóxido.

A G R A D E C I M E N T O S

Este trabalho foi desenvolvido com o apoio técnico dos senhores Fábio Fava, Guerino S. Bianchi Filho e Júlio G. Catarino, do Departamento de Química e Bioquímica, UNESP, Botucatu. Auxílio financeiro: FAPESP, Processo 01/04277-0 e CNPq, Processo 30104292-6.

REFERÊNCIAS

1. Costa RP, Menendez G, Bricarello LP, Elias MC, Ito M. Óleo de peixe, fitosteróis, soja e antioxidantes: impactos nos lipídios e aterosclerose. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo* 2000; 10:819-32.
2. Criswell D, Powers S, Dodd S, Lawler J, Edwards W, Renshler K, *et al.* High intensity training-induced changes in skeletal muscle antioxidant enzyme activity. *Med Sci Sports Exp* 1993; 11:1135-40.
3. Therond PT, Roussetot DB, Spraul AD, Conti M, Legrand A. Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2000; 3:373-84.
4. Metodiewa D, Kochman A, Karolczak S. Evidence for antiradical and antioxidant properties of four biologically active N, N-Diethylaminoethyl-ethers

- of flavanone oximes: a comparison with natural polyphenolic flavonoid (Rutin) action. *Biochem Mol Biol Int* 1997; 41:1067-75.
5. Haenen GRMM, Paquay JBG, Korthouwer REM. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 236:591-3.
 6. Repetto MG, Llesuy SF. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Braz J Med Biol Res* 2002; 35:523-34.
 7. Sant'Ana LS. Mecanismos da proteção oxidativa na utilização de antioxidantes *in vivo* em músculos animais. *Cad Nutr* 1995; 10:48-63.
 8. Lowry OH, Rosebrough NL, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin – phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-75.
 9. Moura RA. Técnicas de laboratório. 2.ed. São Paulo: Atheneu; 1982.
 10. Friedewald WT, Levy RL, Fredckson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18(6):499-503.
 11. Crouch RK, Gandy SE, Kimsey G. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. *Diabetes* 1981; 35:235-41.
 12. Nakamura W, Hosoda S, Hayashi K. Purification and properties of rat liver glutathione peroxidase. *Biochem Biophys Acta* 1974; 358:251-61.
 13. Satoh K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin Chim Acta* 1978; 90:37-43.
 14. Zar JH. Multiple Comparisons. *In: Elroy WO, Swanson CD, editors. Biostatistical analysis.* New York: Prentice Hall; 1974. p.184-98.
 15. Shimizu K, Ozeki M, Tanaka K, Itoh K, Nakajyo S, Urakawa N, *et al.* Suppression of Glucose absorption by extracts from the leaves of *Gymnema inodorum*. *J Vet Med Sci* 1997; 59:753-7.
 16. Brown JE, Khodr H, Hider RC, Rice-Evans CA. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications or their antioxidant properties. *Biochem J* 1998; 330:1173-8.
 17. Amaganijan D, Batlouni M. Impacto dos fatores de risco tradicionais. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo* 2000; 10:686-93.
 18. Bradamante S, Barengi L, Giudici GA, Vergani C. Free radicals promote modifications in plasma high-density lipoprotein. *Free Rad Biol Med* 1992; 12:193-202.
 19. De La Cruz J, Quintero L, Villalobos A, Cuesta F. Lipid peroxidation, glutathione system in hyperlipidemic rabbits: influence of olive oil. *Biochem Biophys Acta* 2000; 1485:36-44.
 20. Novelli ELB, Diniz YS, Almeida JÁ, Machado T, Proença V, Tibiriça T, *et al.* Toxic mechanism of nickel exposure on cardiac tissue. *Toxicol Subst Mech* 2000; 19:177-87.
 21. Cotellet N, Bernier JL, Henichart JP, Cateau J, Gaydou E, Wallet JC. Scavenger and antioxidant properties of ten synthetic flavones. *Free Rad Biol Med* 1992; 13:211-9.
- Recebido para publicação em 1 de abril e aceito em 23 de outubro de 2002.