

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA
(Associação Ampla entre a UEPG e a UNICENTRO)

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, CITOPROTEÇÃO E EFEITOS DOS FLAVONÓIDES
RUTINA E HESPERIDINA SOBRE A FUNCIONALIDADE DE CÉLULAS SECRETORAS
DE INSULINA BRIN-BD11

ELISE TATIANE FELIPE

Ponta Grossa

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA
(Associação Ampla entre a UEPG e a UNICENTRO)

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, CITOPROTEÇÃO E EFEITOS DOS FLAVONÓIDES
RUTINA E HESPERIDINA SOBRE A FUNCIONALIDADE DE CÉLULAS SECRETORAS
DE INSULINA BRIN-BD11

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade do Centro Oeste do Paraná, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva)

Ponta Grossa

2011

Ficha catalográfica Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG.

F315a Felipe, Elise Tatiane
Avaliação da citotoxicidade, citoproteção e efeitos dos flavonóides rutina e hesperidina sobre a funcionalidade de células secretoras de insulina BRIN-BD11 / Elise Tatiane Felipe. Ponta Grossa, 2011.
87 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – área de concentração Biologia Evolutiva), Universidade Estadual de Ponta Grossa e Universidade Estadual do Centro - Oeste.

Orientador: Profa. Dra. Henriette Rosa de Oliveira Emilio

Co-orientador : Profa. Dra. Carla Cristine Kanunfre

1. BRIN-BD11. 2. Estresse oxidativo. 3. Peróxido de hidrogênio. 4. Antioxidante. I. Emilio, Henriette Rosa de Oliveira. II. Kanunfre, Carla Cristine. III. T.

CDD: 575



Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva

Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética) e a Universidade Estadual do Centro Oeste (Departamento de Ciências Biológicas)



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 04/2011

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela candidata **ELISE TATIANE FELIPE**.

Aos vinte e oito do mês de abril de dois mil e onze, no Auditório do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa sob a presidência da Drª Henriette Rosa de Oliveira Emílio, em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **ELISE TATIANE FELIPE**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Drª Henriette Rosa de Oliveira Emílio (Orientadora), Dr. Angelo Rafael Carpinelli e Drª Sabrina Grassioli. Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao (a) candidato (a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir a candidata passou a defesa de sua dissertação intitulada: **Avaliação da Citotoxicidade, Citoproteção e efeitos dos Flavonóides Rutina e Hesperidina sobre a Funcionalidade de Células Secretoras de Insulina BRIN-BD11**. Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o (a) candidato (a) **APROVADA**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, com validade de sessenta dias; o não depósito da versão definitiva de Dissertação, bem como as cópias em CD(PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo (a) orientador (a) neste prazo anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim ☐ não ☒

Novo título: _____

Ponta Grossa, 28 de abril de dois mil e onze.

Profª Drª Henriette Rosa de Oliveira Emílio

Prof. Dr. Angelo Rafael Carpinelli

Profª Drª Sabrina Grassioli

Orientador

Prof.^a Dra. Henriette Rosa de Oliveira Emilio

Co-orientador

Prof.^a Dra. Carla Cristine Kanunfre

Dedico este trabalho aos que mais amo, meus pais, Rosi e Edson, e aos meus irmãos, pois estão sempre torcendo por mim. E ao meu marido, Luciano, que está sempre ao meu lado, por todo seu incentivo, dedicação, carinho, paciência e amor.

AGRADECIMENTOS

Primeiro agradeço a Deus, por me iluminar e me dar força em todos os meus caminhos.

À minha orientadora, Prof.^a Dra. Henriette Rosa de Oliveira Emilio, por quem tenho muito respeito e admiração. Por toda sua dedicação a este trabalho, incentivo, conselhos que me ajudaram a enfrentar as tempestades, também por seu carinho e paciência e por acreditar em mim, me dando a oportunidade que mudaria minha vida.

À minha co-orientadora Prof.^a Dra. Carla Cristine Kanunfre, um exemplo de dedicação e amor à ciência, por toda atenção e colaboração inestimáveis, todo carinho, palavras de incentivo, e também pela serenidade que nos ajuda a lidar com as dificuldades do dia-a-dia.

Ao Prof. Dr. Angelo Rafael Carpinelli pela gentil doação da linhagem celular utilizada neste estudo.

À Marlene Santos da Rocha pelo auxílio nos ensaios de determinação da secreção de insulina.

À Prof.^a Dra. Sabrina Grassioli pelos valiosos conselhos e também pela ajuda nos experimentos para determinação da secreção de insulina.

Às minhas colegas de laboratório Eliane May de Lima, Juliana Sousa Maestri, Lorena Becher, Patrícia Mathias Döll Boscardin e Simoní Marinéia Braatz pela companhia, conselhos, momentos de descontração e amizade.

À minha querida amiga Tatiana Cristina Machado, pelos conselhos, pelo carinho e por estar sempre presente em todos os momentos.

Ao meu amigo Jonathan Pena Castro, pela ajuda, conversas e amizade sincera.

A todos os professores do programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva pelos conhecimentos adquiridos.

À técnica de laboratório Marli Lang de Oliveira pelo auxílio na manutenção do laboratório.

À Zoli de Oliveira pelos esclarecimentos, auxílios e paciência.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

Resumo

O diabetes mellitus é hoje um dos grandes problemas de saúde pública, com números crescentes de incidência, e tem sido considerado uma epidemia. Vários estudos demonstram a relação do diabetes mellitus com o estresse oxidativo. Desse modo compostos bioativos com potencial para atuar impedindo ou amenizando as consequências deste processo despertam grande interesse. Nesta categoria estão os flavonóides, compostos com atividade antioxidante bem estabelecida, marcada pela sua capacidade de seqüestro de espécies reativas e desta forma com potencial para atuar no tratamento ou prevenção do diabetes. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* os efeitos citotóxicos, citoprotetores e na funcionalidade de células secretoras de insulina BRIN-BD11 dos flavonóides rutina e hesperidina. As metodologias utilizadas foram: método de redução do MTT (avaliação da viabilidade celular), radioimunoensaio (avaliação da secreção de insulina), e o método de cinética enzimática para a determinação da atividade máxima da enzima glutathione peroxidase (GSH-Px). No ensaio de avaliação da citotoxicidade não foi constatado efeito citotóxico dos flavonóides rutina e hesperidina em nenhuma das concentrações testadas (1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40 e 80 μM) após 24 horas de tratamento. Os flavonóides rutina e hesperidina nas concentrações de 2,5; 5 e 10 μM , não apresentaram efeitos citoprotetores em células BRIN-BD11 sob estresse oxidativo induzido pela exposição ao peróxido de hidrogênio (37,5 μM - sub-letal e 75 μM - letal). Neste ensaio os flavonóides e o peróxido de hidrogênio foram adicionados simultaneamente e permaneceram em contato com as células por 24 horas. Células BRIN-BD11 foram pré-tratadas (24 horas) com os flavonóides rutina e hesperidina (10 μM) e posteriormente submetidas a estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio (350 μM) por 2 horas. Neste ensaio também não foi verificado efeito citoprotetor dos flavonóides. Rutina e hesperidina (1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40 e 80 μM) não apresentaram efeitos insulínotropicos em células BRIN-BD11 após 24 horas de tratamento. Após o tratamento das células BRIN-BD11 por 24 horas na presença dos flavonóides rutina e hesperidina (10 μM), também não foi verificada alteração na atividade da enzima glutathione peroxidase (GSH-Px). Desse modo, conclui-se que os flavonóides rutina e hesperidina são seguros, não apresentando citotoxicidade sobre células BRIN-BD11, entretanto, não apresentaram efeitos citoprotetores e insulínotropicos nas condições testadas.

Abstract

Diabetes mellitus is now a major public health problems, with increasing numbers of incidence, and has been considered an epidemic. Several studies demonstrate the relationship between diabetes mellitus and oxidative stress. Thus bioactive compounds with potential to act by preventing or mitigating the consequences of this process are interesting. In this category are the flavonoids, compounds with antioxidant activity is well established, marked by its reactive species scavenger capacity and thereby have the potential to act in the treatment or prevention of diabetes. Therefore, the objective was to evaluate the *in vitro* effects in the cytotoxic, cytoprotective and functionality of insulin-secreting cells BRIN-BD11 of the flavonoids rutin and hesperidin. The methods were used: MTT reduction method (assessment of cell viability), radioimmunoassay (assessment of insulin secretion), and the enzymatic rate method for determining the maximum activity of glutathione peroxidase (GSH-Px). The experiment of cytotoxicity was not observed cytotoxic effect of the flavonoids rutin and hesperidin in all tested concentrations (1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 and 80 μM) after 24 hours of treatment. The flavonoids rutin and hesperidin concentrations of 2.5, 5 and 10 μM showed no cytoprotective effects on BRIN-BD11 cells under oxidative stress induced by exposure to hydrogen peroxide (37.5 μM -sub-lethal and lethal-75 μM). In this test the flavonoids and hydrogen peroxide were added simultaneously and remained in contact with the cells for 24 hours. BRIN-BD11 cells were pretreated (24 hours) with rutin and hesperidin (10 μM) and subsequently subject to oxidative stress induced by hydrogen peroxide (350 μM) for 2 hours. In this condition also was not observed cytoprotective effect of flavonoids. Rutin and hesperidin (1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 and 80 μM) had no insulinotropic BRIN-BD11 cells after 24 hours of treatment. After treatment BRIN-BD11 cells for 24 hours in the presence of the flavonoids rutin and hesperidin (10 μM) was not observed change in the activity of glutathione peroxidase (GSH-Px). Thus, it is concluded that the flavonoids rutin and hesperidin are safe, showing no cytotoxicity on BRIN-BD11 cells, but showed no cytoprotective effects and insulinotropic on the conditions tested.

Lista de figuras

Figura 1- Efeitos do peróxido de hidrogênio sobre a viabilidade de células secretoras de insulina.....	21
Figura 2 - Estrutura geral dos flavonóides	27
Figura 3 - Estrutura da hesperidina.....	33
Figura 4 - Estrutura da rutina.....	36
Figura 1a - Estrutura geral de flavonóides.....	50
Figura 2a - Avaliação da viabilidade celular na presença de diferentes concentrações dos flavonóides rutina e hesperidina.....	60
Figura 3a - Avaliação da viabilidade celular na presença de peróxido de hidrogênio – Ensaio agudo.....	61
Figura 4a - Avaliação da viabilidade celular na presença de peróxido de hidrogênio – Ensaio crônico.....	62
Figura 5a - Avaliação do efeito citoprotetor dos flavonóides rutina e hesperidina	64
Figura 6a - Avaliação do efeito citoprotetor do pré-tratamento com os flavonóides rutina e hesperidina.....	67
Figura 7a - Avaliação do efeito dos flavonóides rutina e hesperidina na secreção de insulina.....	70
Figura 8a - Avaliação da atividade da enzima glutathiona peroxidase (GSH-Px) na presença dos flavonóides rutina ou hesperidina.....	73

Lista de tabelas

Tabela 1. Espécies reativas radicalares (radicais livres) e não radicalares.....	19
---	-----------

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
1.1	DIABETES MELLITUS	13
1.2	DIABETES E ESTRESSE OXIDATIVO	18
1.3	ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS	23
1.4	ANTIOXIDANTES NÃO- ENZIMÁTICOS	25
1.5	EFEITO BIOLÓGICO DOS FLAVONÓIDES.....	29
1.6	FLAVONÓIDES DE ORIGEM CÍTRICA	32
1.7	HESPERIDINA	33
1.8	RUTINA	36
2	OBJETIVOS	38
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1	REAGENTES	39
3.2	CULTURA DE CÉLULAS.....	39
3.3	SOLUÇÕES DOS FLAVONÓIDES - RUTINA E HESPERIDINA	39
3.4	METODOLOGIAS	40
4	RESULTADOS.....	46
4.1	CAPÍTULO I	46
	CITOTOXICIDADE, CITOPROTEÇÃO E EFEITOS DOS FLAVONÓIDES RUTINA E HESPERIDINA SOBRE A FUNCIONALIDADE DE CÉLULAS SECRETORAS DE INSULINA.....	46
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	76
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

1 Introdução

No mundo todo o diabetes mellitus do tipo 2 é um importante problema de saúde pública, que tem tido um grande crescimento nas últimas décadas, chegando a ser considerado uma epidemia (PINENT et al., 2008). Conforme Zimmet, Alberti e Shaw (2001) é uma das principais ameaças à saúde humana do século 21.

A previsão é de que, até 2030, já sejam 366 milhões de portadores de diabetes do tipo 2 no mundo (WILD et al., 2004). Sendo esperados 64 milhões de pessoas com este tipo de diabetes nas Américas em 2025, com um aumento de incidência em todas as faixas etárias nos países em desenvolvimento, gerando um grande impacto nos sistemas públicos de saúde destes, ainda não preparados para atender a demanda (KING; AUBERT; HERMAN, 1998).

No Brasil, um estudo realizado em 1988 demonstrou que a prevalência do diabetes mellitus tipo 2 estava em 7,6% na população urbana de 30 anos e em 7,8% na população na faixa etária de 69 anos (MALERBI; FRANCO, 1992). O aumento da incidência de diabetes pode ser constatado pelo aumento de hospitalizações, geradas pela doença, que é comparativamente superior, às hospitalizações por todas as outras causas. Acredita-se também que o número de mortes causado por diabetes seja bem maior do que o número notificado, já que geralmente a causa da morte do diabético é atribuída às complicações que são consequência da doença. As populações das regiões de maior desenvolvimento econômico, sul e sudeste, são também as mais acometidas pela doença (SARTORELLI; FRANCO, 2003).

Contribuindo para este aumento de incidência estão mudanças no estilo de vida das pessoas, como a urbanização, aumento do consumo de dietas hipercalóricas e de baixa qualidade nutricional, aliadas à falta de exercícios físicos, e ainda as mudanças que

acompanharam a globalização, as quais levam à maior prevalência de obesidade e de diabetes (ZIMMET; ALBERTI; SHAW, 2001).

Existem teorias que assumem que o homem contemporâneo teria componentes genéticos apropriados para a dieta do homem do Paleolítico, período que vai desde o aparecimento do gênero *Homo*, mais de 2 milhões de anos, até 10 mil anos a.C, quando se inicia a prática agrícola (BASTOS; ROGERO; ARÊAS, 2009). Os estudos sobre a relação entre a dieta do Paleolítico e as doenças crônicas ganharam força a partir de descobertas feitas por paleontologistas norte-americanos, de que o genoma humano sofreu poucas alterações ao longo de milhares de anos de evolução, sendo assim, muito semelhante ao dos nossos antepassados. Desse modo o homem atual pode ser geneticamente comparado aos caçadores-coletores do Paleolítico (EATON; KONNER; SHOSTAK, 1988). A dieta do homem neste período era composta de carne animal proveniente da caça, e plantas, principalmente as raízes, frutos, e vegetais não-grãos em geral (BASTOS; ROGERO; ARÊAS, 2009).

Colaborando com esta teoria está o fato de que as poucas populações que conservam hábitos primitivos, com dieta e estilo de vida muito similar aos seus ancestrais da pré-história, como aborígenes da Austrália, esquimós do Alasca/Groenlândia e os Ameríndios, geralmente não sofrem com problemas coronarianos, de hipertensão, diabetes e alguns tipos de câncer (DÉCOURT, 1989; EATON; EATON III; KONNER, 1997; DOVAL, 2005).

Em países industrializados, algumas doenças crônicas são atribuídas ao envelhecimento devido ao aumento da expectativa de vida. Contudo esta pode não ser necessariamente a única causa do aumento destas enfermidades, pois observa-se que jovens desenvolvem assintomaticamente doenças crônicas que não ocorrem em jovens que conservam hábitos primitivos, e ainda que indivíduos destas culturas tecnologicamente

primitivas, que chegam aos 60 anos ou mais também não são acometidos por tais enfermidades.

Observa-se também que as mudanças em variáveis fisiológicas que ocorrem ao longo da vida nas populações industrializadas, como aumento da concentração sérica de colesterol, elevação da pressão arterial e do índice de massa corporal, não ocorrem nas populações com cultura tecnologicamente primitiva (DOVAL, 2005).

Os 10.000 anos que se seguiram desde o início do desenvolvimento agrícola, correspondem somente à cerca de 1% do tempo evolutivo do gênero *Homo*, desse modo, não teríamos tido tempo para que a seleção natural pudesse atuar de modo que favorecesse os indivíduos aptos para esta nova dieta, em tão curto intervalo de tempo, dessa forma a não “adaptação” fisiológica do nosso organismo aos novos hábitos alimentares, favorece o aparecimento de doenças como a aterosclerose, doenças cardiovasculares, resistência à insulina e diabetes mellitus tipo 2 (BASTOS; ROGERO; ARÊAS, 2009).

1.1 Diabetes mellitus

O diabetes mellitus é definido como uma desordem metabólica de etiologia múltipla, resultante de defeitos na secreção e/ou ação da insulina, o que conduz a distúrbios no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas e que tem como característica a hiperglicemia crônica. Os níveis de glicose no sangue são controlados através da ação dos hormônios, insulina e glucagon, secretados pelas células B e A das ilhotas de Langerhans, do pâncreas, respectivamente. A insulina é responsável por promover a captação e utilização da glicose pelos tecidos e é produzida em resposta a ingestão de carboidratos. Após a ingestão, estes, são hidrolisados pela ação de enzimas digestivas a monossacarídeos como a glicose,

frutose e galactose, sendo a glicose o principal secretagogo de insulina em células B (ROCHA et al., 2006). Além da glicose, ácidos graxos e aminoácidos também podem atuar no processo de secreção de insulina de forma a potencializar o estímulo gerado pela glicose (NEWGARD; McGARRY, 1995).

A glicose entra na célula B através da proteína transportadora GLUT2, passando então pelas vias da glicólise, ciclo do ácido cítrico e geração de ATP. O aumento da concentração de ATP leva ao fechamento dos canais de K^+ sensíveis ao ATP, com conseqüente despolarização da membrana celular, permitindo um aumento do influxo de Ca^{2+} , através dos canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem. Este aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} promove a exocitose das vesículas de insulina e o conseqüente aumento da concentração plasmática deste hormônio (ROCHA et al. 2006).

Outro mecanismo pelo qual a glicose pode atuar no processo de secreção de insulina é através da ativação da fosfolipase C (PLC), esta que é capaz de hidrolisar lipídios de membrana, o que leva a geração de inositol 1-4-5 trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). Ambos promovem o aumento do cálcio intracelular. No caso do IP3, por meio da ativação dos canais de Ca^{2+} da membrana do retículo endoplasmático e conseqüente liberação de Ca^{2+} da organela. Já o DAG, atua ativando canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem da membrana plasmática, levando a entrada de Ca^{2+} extracelular para o interior da célula. Além desta ação, o DAG também atua ativando a proteína quinase C (PKC) que juntamente com o Ca^{2+} promove a translocação dos grânulos secretórios de insulina para a membrana plasmática e posterior exocitose. A PKC também promove o aumento do AMPc (adenosina monofosfato cíclico), através da ativação da adenilato ciclase, o aumento deste segundo mensageiro, leva à ativação da PKA (proteína quinase A). Esta por sua vez, atua no processo relacionado à exocitose dos

grânulos secretórios de insulina e também promovendo o aumento do Ca^{2+} intracelular pela fosforilação de canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem (HABER et al., 2001).

O glucagon é o hormônio antagônico à insulina e atua durante o jejum, promovendo o aumento da glicemia. O principal estímulo para a secreção deste hormônio é a diminuição do nível de glicose no sangue. Um dos processos pelos quais o glucagon promove o aumento do nível de glicose no sangue é a glicogenólise, que consiste na degradação da reserva de glicose armazenada sob a forma de glicogênio no fígado. A glicogenólise estimulada pelo glucagon aumenta a glicemia dentro de poucos minutos. E mesmo depois de toda a reserva de glicogênio ter sido esgotada a glicemia continua aumentando através da influência do glucagon, isto ocorre pela capacidade deste hormônio em promover gliconeogênese pelo fígado, através do aumento da captação de aminoácidos nas células hepáticas e da posterior conversão destes em glicose (GUYTON; HALL, 1997; WATANABE et al., 1998).

Desse modo a insulina e o glucagon são importantes para o metabolismo adequado da glicose e a homeostase deste processo mantém a glicemia dentro de valores entre 4,5 e 5,5 mM (ROCHA et al., 2006). Quando ocorrem alterações no processo de regulação do metabolismo da glicose pela insulina, há um aumento do nível de glicose sanguínea, que cronicamente caracteriza o desenvolvimento do diabetes mellitus (TIWARI; RAO, 2002). As principais formas de diabetes são, o diabetes tipo 1 e o tipo 2.

No diabetes tipo 1 há ausência total do hormônio insulina, devido à destruição auto-imune das células B (secretores de insulina) causado por uma infiltração progressiva de células inflamatórias como linfócitos T auto-reativos. Essa patologia tem maior incidência em crianças e adolescentes e os sintomas manifestam-se geralmente quando já há um grande comprometimento das células B (ZIMMET; ALBERTI; SHAW, 2001; LIU;

EINSENBARTH, 2002). Contudo, os mecanismos envolvidos no início e progressão da doença ainda não estão completamente elucidados, sabe-se, porém que os fatores genéticos estão fortemente associados, e há ainda influência de fatores imunológicos e ambientais (FERNANDES et al., 2005).

O diabetes tipo 2, apresenta maior prevalência, representando 90% dos casos de diabetes no mundo. Este pode ocorrer por distúrbios na secreção de insulina ou por problemas no reconhecimento deste hormônio pelos tecidos alvos, denominado, resistência a insulina (ZIMMET; ALBERTI; SHAW, 2001). A resistência a insulina leva a hiperglicemia, pois diminui a utilização da glicose e aumenta a produção hepática desta, colaborando assim para o desenvolvimento do diabetes tipo 2 (McGARRY, 1994).

O diabetes tipo 2 ocorre também por pré-disposição genética, porém fatores ambientais exercem grande influência na sua patogênese, atingindo geralmente adultos, contudo está sendo observado um aumento do número de casos também em crianças e jovens, o que pode levar a uma inversão desta situação em no máximo duas décadas. Geralmente os indivíduos acometidos pelo diabetes tipo 2 não fazem uso da insulina exógena, mas esta pode ser necessária, se mesmo com dieta adequada, não houver restabelecimento do controle glicêmico (ZIMMET; ALBERTI; SHAW, 2001).

Um dos fatores ligados diretamente ao aumento do diabetes mellitus tipo 2 é o aumento do sobrepeso e da obesidade, sendo o aumento destes, diretamente proporcional ao aumento do diabetes, cerca de 80 a 90% dos indivíduos portadores do diabetes mellitus tipo 2, é obeso (SARTORELLI; FRANCO, 2003). Este aumento nas taxas de obesidade é atribuído ao consumo aumentado de alimentos com maior densidade energética, alimentos como carboidratos refinados, gorduras saturadas, ácidos graxos trans, *fast foods* e bebidas alcoólicas.

Estes fatores aliados à redução da atividade física, com consequente redução do gasto energético, têm gerado números crescentes de incidência da obesidade e consequente aumento de doenças crônicas associadas, tais como o diabetes (PEÑA; BACALLAO, 2001).

Vários estudos demonstram, que as células B precisam se adaptar a maior disponibilidade de glicose, presente durante a obesidade, e que este estado de hiperglicemia constante, pode levar à resistência a insulina e consequentemente ao diabetes tipo 2. Este, que em estágio mais avançado provoca perda de função das células B, pela sobrecarga gerada nessas células para atender a maior necessidade de insulina. Esta sobrecarga leva a célula B à exaustão, acarretando em perda de sua função, em indivíduos obesos (BAGUST; BEALE, 2003; MUOIO; NEWGARD, 2006).

É bem estabelecido que a hiperglicemia sustentada, que ocorre tanto no diabetes tipo 1 quanto no tipo 2, está diretamente relacionada com as complicações da doença, tais como nefropatia, neuropatia, retinopatia, entre outras. Esta condição crônica também gera um comprometimento progressivo das células B, agravando a resistência à insulina, no diabetes tipo 2, o que leva à um quadro denominado de glicotoxicidade (LOPES; OLIVEIRA; FORTUNATO, 2008). A glicotoxicidade pode afetar a célula B pela redução da expressão do gene da insulina, também pela diminuição do processamento da pró-insulina, e ainda pela deposição de material amilóide, levando ao aumento de morte celular (POITOUT; ROBERTSON, 2002).

A glicotoxicidade pode também contribuir para o aumento da resistência a insulina, na medida em que ocorre um aumento no processo de glicosilação, no qual a glicose reage não enzimaticamente com várias proteínas resultando em produtos iniciais da glicosilação, os chamados produtos de amadori. Este processo ocorre nos grânulos de insulina das células B,

gerando uma forma de insulina que possui reduzida atividade biológica, a insulina glicosilada (McKILLOP et al., 2002).

1.2 Diabetes e estresse oxidativo

A hiperglicemia é também uma importante causa do aumento das concentrações plasmáticas de espécies reativas e do comprometimento dos sistemas antioxidantes de proteção, levando o organismo a uma situação de estresse oxidativo (CERIELLO, 1997). Este é definido como um desequilíbrio entre a geração de espécies reativas radicalares e não radicalares (principalmente as espécies reativas de oxigênio), e as defesas antioxidantes do organismo (SIES; STAHL, 1995). Dessa forma o estresse oxidativo está associado à progressão e complicações tardias do diabetes.

Sabe-se que as células B são altamente susceptíveis ao estresse oxidativo devido à baixa expressão e atividade de enzimas antioxidantes, que promovem a defesa celular contra os agentes oxidantes (LENZEN; DRINKGERN; TIEDGE, 1996). Desse modo, o excesso de espécies reativas gera alterações funcionais nessas células, pois podem interagir com enzimas que atuam no metabolismo da glicose, causam também inibição da síntese de DNA e também sua fragmentação, e ainda outras alterações, levando esta célula à destruição (RADONS et al. 1994; NAKAZAKI et al., 1995).

As espécies reativas radicalares ou radicais livres são moléculas ou átomos que apresentam um ou mais elétrons não pareados, o que os torna altamente instáveis e quimicamente muito reativas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Existem também espécies reativas que não apresentam elétrons desemparelhados, sendo denominadas de espécies reativas não radicalares, como pode ser verificado na tabela abaixo:

Tabela 1 – Espécies reativas radicalares (radicais livres) e não radicalares

1. Espécies reativas	
a. Espécies reativas de oxigênio (EROS) radicalares/radicais livres	
O ₂ oxigênio molecular	OH [•] hidroxil
O ₂ ^{•-} superóxido	HO ₂ [•] peridroxil
b. Outros exemplos de espécies reativas radicalares	
RO [•] alcóxil	NO [•] óxido nítrico
RO ₂ [•] peróxil	
2. Espécies reativas de oxigênio (EROS) não-radicalares	
¹ O ₂ oxigênio singlete	O ₃ ozônio
ONOO ⁻ peroxinitrito	H ₂ O ₂ peróxido de hidrogênio ou água oxigenada

Fonte: OLIVEIRA (2003)

A produção celular de espécies reativas ocorre em diferentes locais e através de diversos processos. Entre eles, a redução parcial do oxigênio molecular durante o transporte de elétrons na cadeia respiratória (processo mitocondrial), sendo este um dos principais sítios de geração de espécies reativas. Além da produção mitocondrial, outras importantes fontes de espécies reativas são: a oxidação de catecolaminas, a ativação da cascata do ácido araquidônico; a ativação do sistema xantina-oxidase que ocorre após o processo de isquemia-reperfusão; a metabolização hepática de xenobióticos através do sistema do citocromo P-450; a ativação da enzima NADPH oxidase no endotélio vascular, em células fagocitárias e, mais recentemente, também evidenciada em células B pancreáticas (OLIVEIRA et al. , 2003).

As espécies reativas podem ser subdivididas nos seguintes grupos: espécies reativas de oxigênio (ROS), espécies reativas de nitrogênio (RNS), e espécies reativas de cloro (RCS), estas menos frequentes (LOPES; OLIVEIRA; FORTUNATO, 2008). Dentro do grupo das ROS, destacam-se o radical superóxido (O₂^{•-}), o radical hidroxil (OH[•]), e o radical peróxil

($\text{RO}_2^\bullet$), e entre as não-radicalares, o peróxido de hidrogênio é um dos mais importantes. Já no grupo das RNS, destacam-se o óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$) e o peróxido de nitrito (ONOO^-) (HALLIWELL, 1995a; RÖSEN et al., 2001; VALKO et al., 2007).

O ânion superóxido é pouco reativo em sistemas aquosos e é formado após a primeira redução do O_2 (FERREIRA; MATSUBARA, 1997), sendo eliminado pela ação da enzima superóxido dimutase. Este radical tem um papel chave na defesa do organismo, sendo gerado por fagócitos, para eliminar microorganismos patogênicos. Contudo, em processos inflamatórios crônicos ocorre uma produção excessiva deste composto, o que acarreta em lesões teciduais (LEITE; SARNI, 2003).

O radical hidroxil é considerado o mais deletério em sistemas biológicos, pois apresenta meia-vida muito curta, o que dificulta muito seu seqüestro *in vivo*. Desse modo, a presença do radical hidroxil pode ser controlada pela inibição de sua formação ou através do reparo aos danos gerados pelo composto. Este radical causa danos celulares pelo ataque ao DNA, RNA, proteínas, lipídios, membranas nucleares e mitocondriais (BARREIROS; DAVID, J. M; DAVID, J. P, 2006).

O peróxido de hidrogênio desempenha um papel importante no estresse oxidativo na medida em que atravessa com facilidade membranas biológicas. A toxicidade deste composto deve-se em grande parte ao fato de que, o peróxido de hidrogênio gera o radical hidroxil, através de reações com metais de transição, principalmente o ferro (Fe^{2+}), o que caracteriza a reação de Fenton (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). O H_2O_2 é formado *in vivo* pelo processo de dismutação do radical superóxido. Sabe-se que as mitocôndrias são importantes fontes geradoras de superóxido, o que pode causar sérios danos celulares. Para impedir que isto ocorra, a mitocôndria é rica na enzima SOD (superóxido dismutase) que catalisa o

processo de dismutação do superóxido que é então convertido em peróxido de hidrogênio (HALLIWELL, CLEMENT, LONG, 2000).

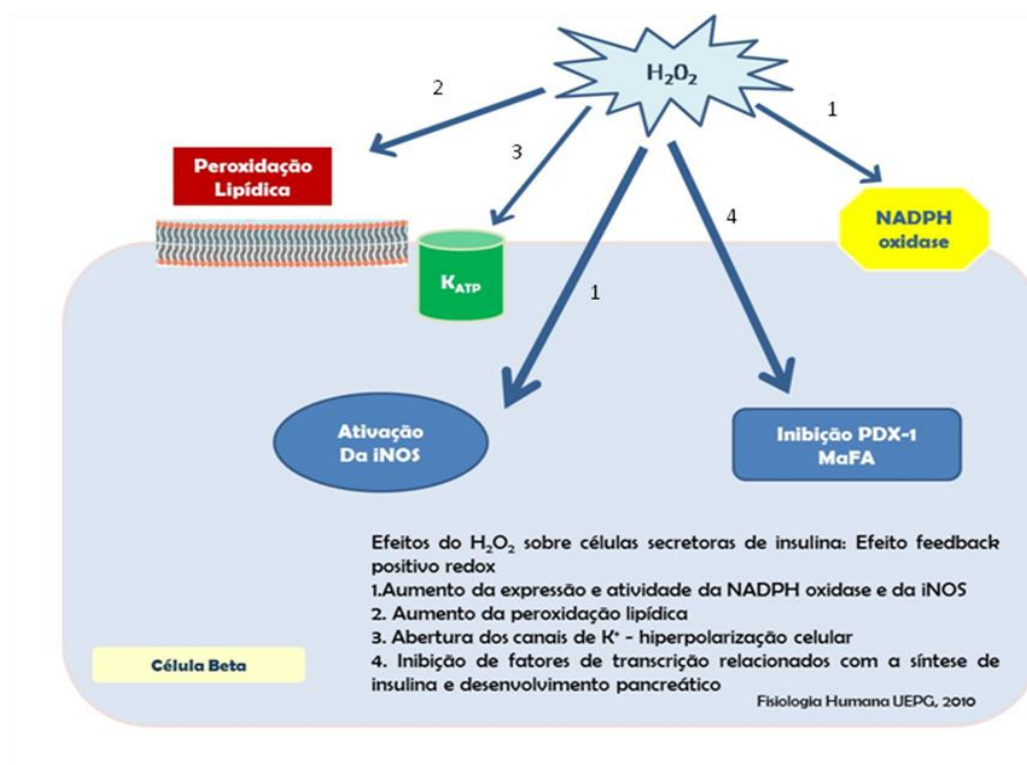


Figura 1. Efeitos do peróxido de hidrogênio sobre a viabilidade de células secretoras de insulina

Fonte: FISILOGIA HUMANA UEPG, 2010

As espécies reativas estão presentes em todos os sistemas biológicos, pois resultam de vários processos metabólicos, e desempenham papel fisiológico significativo em baixas concentrações, como por exemplo: sinalizadores intracelulares, mediadores de defesa celular e processos inflamatórios, detoxificação de substâncias e crescimento celular (CHIHUAILAF; CONTRERAS; WITTEWER, 2002; BARREIROS; DAVID, J. M; DAVID, J. P, 2006).

O efeito da insulina nos tecidos periféricos é um dos exemplos de processos fisiológicos dependentes de espécies reativas. Neste caso, o peróxido de hidrogênio em baixa concentração exerce papel fundamental na interação da insulina com seu receptor,

autofosforilação do receptor tirosina-quinase e conseqüente efeito biológico do hormônio (DRÖGE, 2005).

Apesar de críticas para o funcionamento adequado do metabolismo, as espécies reativas, quando presentes em altos níveis, devido à sua produção excessiva ou eliminação deficiente, podem causar danos celulares e teciduais, pois reagem facilmente com biomoléculas como proteínas, lipídios e DNA (HALLIWELL, 1994). Ao reagirem com o DNA, por exemplo, podem levar à quebra da cadeia, e ao surgimento de mutações, que acumuladas, conduzem a ativação de oncogênese; as reações com enzimas podem acarretar em alterações ou até mesmo perda da função enzimática; e reagindo com os lipídios da membrana celular, podem alterar sua permeabilidade ou rompê-la, levando a morte celular (BARREIROS; DAVID, J. M; DAVID, J. P, 2006).

Para evitar ou diminuir os danos causados pelas espécies reativas, existem agentes endógenos ou exógenos (obtidos geralmente através da dieta) responsáveis pela defesa contra estes agressores, são os chamados antioxidantes, que são definidos como: “qualquer substância que presente em baixas concentrações quando comparada ao substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação desse substrato de maneira eficaz” (SIES; STAHL, 1995).

Os antioxidantes, que geralmente estão localizados no meio intracelular, (FERREIRA; MATSUBARA, 1997), podem atuar de diferentes maneiras na proteção do organismo, como, por exemplo, evitando a formação de espécies reativas, impedindo principalmente as reações em cadeia do ferro e do cobre. Podem também interceptar as espécies reativas antes que elas causem lesões celulares, função esta, bem exercida pelas vitaminas C, E e A, e ainda por flavonóides e carotenóides. Além do efeito direto, algumas substâncias antioxidantes atuam

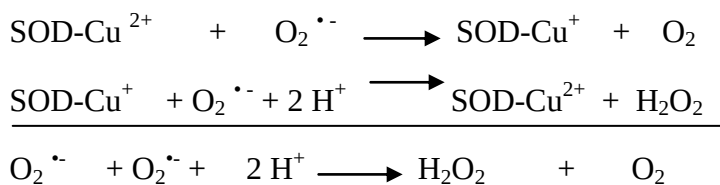
de forma indireta, induzindo o aumento de antioxidantes celulares tais como aumentando a expressão e/ou atividade de enzimas antioxidantes (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

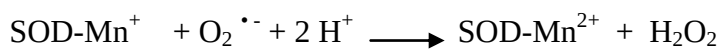
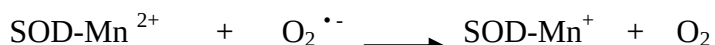
Geralmente os antioxidantes são divididos em duas categorias, os enzimáticos e os não enzimáticos. Os enzimáticos são principalmente representados pela superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GSH-Px). E entre os antioxidantes não enzimáticos destacam-se, a vitamina C e os catecóis, as vitaminas A e E (α -tocoferol) os carotenóides e os flavonóides, geralmente obtidos da dieta (OLIVEIRA, 2003; BONDAN, 2006; TREVISAN, 2008).

1.3 Antioxidantes enzimáticos

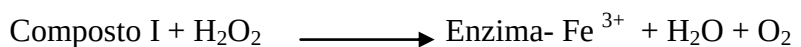
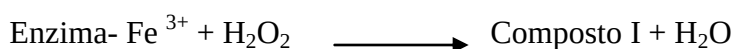
A SOD é a enzima responsável por catalisar a conversão do ânion superóxido, formando H_2O_2 e O_2 , esta reação também pode ocorrer espontaneamente, porém na ausência da enzima, torna-se muito lenta. Existem diferentes formas de SOD em células eucarióticas, uma delas está presente no citosol, e possui no centro de ativação cobre e zinco (CuZn-SOD), outra forma de SOD está presente na mitocôndria, mais precisamente na matriz mitocondrial, e em associação com o manganês (Mn-SOD) (DIAS, 2005; OLIVEIRA, 2003).

SOD citoplasmática

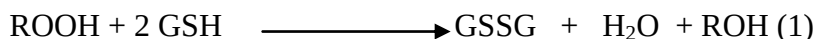


SOD mitocondrial

A CAT é uma enzima encontrada principalmente nos peroxissomos, também pode estar presente na mitocôndria (fígado) nos cloroplastos e no retículo endoplasmático, porém em pequenas quantidades (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999), e possui grupos heme em seu sítio ativo, exerce sua função catalisando a reação de redução do H_2O_2 a água e oxigênio, sendo uma das reguladoras dos níveis intracelulares deste composto (DIAS, 2005; VASCONCELOS et al., 2007).

Catalase

A glutathiona peroxidase (GSH-Px) é um importante componente do sistema de defesa enzimático, e é encontrada em muitos tecidos de origem animal, tem em seu sítio ativo o selênio, obtido da dieta (ROVER JÚNIOR et al., 2001; VASCONCELOS et al., 2007). A GSH-Px atua degradando peróxidos através da oxidação de seu substrato, a GSH (glutathiona reduzida), o que leva a geração da forma oxidada desta, glutathiona oxidada (GSSG). Este sistema é mantido pela ação da glutathiona redutase (GSRd) que tem a função de restaurar GSSG à sua forma reduzida (GSH), promovendo a manutenção deste ciclo, utilizando para tal NADPH como cofator (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

GSH-PxGSRd**1.4 Antioxidantes não- enzimáticos**

Os antioxidantes não-enzimáticos geralmente atuam de forma direta sobre os agentes oxidantes impedindo-os de causarem danos, entretanto alguns também podem agir indiretamente ocasionando o aumento de outras defesas intracelulares.

Apesar do sistema enzimático de defesa antioxidante ser eficiente na prevenção de danos oxidativos, os antioxidantes obtidos da dieta são necessários para garantir que a proteção seja mais completa, aumentando o potencial de defesa do organismo contra as espécies reativas e o estresse oxidativo. É bem estabelecido que o consumo de frutas e vegetais apresenta uma relação positiva na diminuição do risco de desenvolver doenças associadas com o acúmulo de espécies reativas (POMPELLA, 1997). Nesse sentido, tem sido crescente a busca por compostos bioativos com capacidade antioxidante, como os provenientes dos alimentos, principalmente de origem vegetal. Dentre os antioxidantes presentes em vegetais e frutos destacam-se as vitaminas C, E e A, carotenóides e os flavonóides (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

A vitamina E age protegendo as membranas biológicas dos danos oxidativos, como por exemplo, na inibição da peroxidação lipídica, em que atua doando H^+ para o radical peroxil, impedindo a propagação das reações em cadeia causadas pelas espécies reativas (BIANCHI; ANTUNES, 1999; BARREIROS; DAVID, J. M; DAVID, J. P, 2006).

A vitamina C ou ácido ascórbico é um bom agente redutor e, portanto pode agir sobre a maioria das espécies reativas tornando-as menos lesivas. Por ser hidrossolúvel atua principalmente nos compartimentos aquosos dos tecidos orgânicos (BARREIROS; DAVID, J. M; DAVID, J. P, 2006). Existem trabalhos *in vitro* que relatam uma atividade pró-oxidante da vitamina C na presença de metais de transição, como o ferro, gerando H_2O_2 e $OH^\bullet$, contudo devido à baixa concentração desses metais, *in vivo*, domina sua atividade antioxidante (ODIN, 1997). Adicionalmente à sua ação direta sobre as espécies reativas, a vitamina C age regenerando a vitamina E (α -tocoferol) (SIES; MURPHY, 1991; WEFERS; SIES, 1988).

O efeito positivo da interação das vitaminas C e E na inibição da peroxidação lipídica em membranas celulares e na proteção do DNA é com frequência citado em vários trabalhos, sendo demonstrada a força desta interação para evitar danos às células (GEY, 1998).

A vitamina A tem grande importância nos processos de crescimento e diferenciação celular, e tem como precursor o β -caroteno, bem estabelecido como antioxidante, cuja principal função é desativar o oxigênio singlete além de poder atuar também no seqüestro do radical peroxil reduzindo a oxidação dos lipídios e do DNA (BARREIROS; DAVID, J. M; DAVID, J. P, 2006).

Os flavonóides foram descobertos em 1930, quando a partir da laranja, foi isolada uma nova substância, a qual foi inicialmente classificada como uma vitamina, a vitamina P. Mais tarde, foi descoberto que esta nova substância não era uma vitamina, mas sim um flavonóide, a rutina. A partir disso, várias pesquisas foram realizadas, na tentativa de isolar os flavonóides e elucidar seus mecanismos de ação (NIJVELDT et al., 2001).

Nas plantas, os flavonóides são responsáveis, por exemplo, pela proteção contra fungos parasitas, herbívoros, e outros patógenos, além de proteger contra danos celulares oxidativos e serem muito importantes para a polinização, já que são responsáveis também pelas cores atrativas de flores, frutos e folhas (COOK; SAMMAN, 1996).

Já foram identificadas mais de 4000 estruturas diferentes de flavonóides (GROOT; RAUEN, 1998). A estrutura básica dos flavonóides é composta por três anéis fenólicos, o anel benzeno (A) que é condensado com o sexto membro do anel C, o qual é portador de um anel fenil benzeno na segunda posição, como um substituinte (AHERNE; O'BRIEN, 2002).

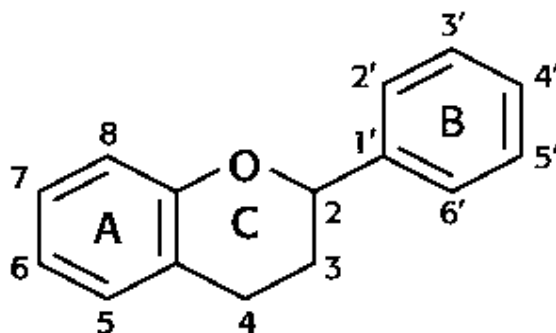


Figura 2. Estrutura geral dos flavonóides

Fonte: <http://www.scielo.sa.cr/img/fbpe/rcc/v8n1/3213i1.JPG>

Os flavonóides são ainda subdivididos em classes conforme estrutura e nível de oxidação do anel C, sendo os principais grupos: antocianidinas, flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas e flavanóis. Podem ainda ocorrer modificações adicionais na estrutura básica dos flavonóides como glicosilações, hidrogenações, hidroxilações, malonilações, metilações, sulfatações, e outras modificações que fazem com que o termo flavonóide inclua

uma gama de compostos com diferentes propriedades físicas, químicas e biológicas (PINENT et al., 2008).

Os flavonóides pertencem à classe dos compostos fenólicos, sendo sua atividade antioxidante atribuída à ação de seqüestro de espécies reativas (DECKER, 1997). Eles exercem sua atividade doando átomos de hidrogênio para as espécies reativas prevenindo a propagação das reações em cadeia e evitando danos. Essa atividade neutralizadora (*scavenger*) de espécies reativas (ação direta dos flavonóides), tanto como seqüestradores de espécies reativas, quanto como bloqueadores da formação destas, está relacionada ao número e posições de grupos hidroxila, sendo que alguns dos flavonóides que não possuem o grupo hidroxila não apresentam esta propriedade (VAN ACKER, et al. 1996). Os flavonóides agem tanto nos compartimentos hidrofílicos quanto lipofílicos (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Podem ser encontrados em frutas, vegetais, em chás, vinhos e também no chocolate (PINENT, et al. 2008). Contudo, o tipo de flavonóide obtido varia de acordo com o tipo de fonte alimentar (ERLUND, 2004). Além da atividade sequestradora considerada uma ação aguda e direta, os flavonóides também pode agir de forma a induzir aumento das defesas intracelulares (ação indireta). Um exemplo deste efeito foi demonstrado em estudos realizados por Xiong et al. (2006) em que foi observado um aumento da atividade das enzimas antioxidantes SOD e catalase em ilhotas de rato sob estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio (500 μ M) e pré-tratadas com o flavonóide puerarina, encontrado na erva chinesa *Pueraria lobata*.

Propriedades biológicas dos polifenóis, tais como os flavonóides, dependem da sua biodisponibilidade. Um indício de sua absorção através do trato intestinal é o aumento da capacidade antioxidante do plasma observada após o consumo de alimentos ricos em polifenóis (SCALBERT; WILLIAMSON, 2000). A disponibilidade dos flavonóides, por

exemplo, difere grandemente, não correspondendo necessariamente aqueles de maior abundância como sendo os mais biodisponíveis (D'ARCHIVIO et al., 2007). Os flavonóides podem ser encontrados no plasma em níveis farmacologicamente ativos após ingestão de alimentos ricos nesses compostos, porém eles não se acumulam no organismo (CAO, et al., 1998; HOLLMAN; KATAN, 1999). Os flavonóides, assim como demais polifenóis, podem ser absorvidos na sua forma original, entretanto muitos podem ser total ou parcialmente modificados antes da sua absorção intestinal, sendo esta questão ainda um assunto controverso. Alguns estudos apontam que a rutina foi totalmente hidrolisada para sua forma quercetina 3-glicosídica e para quercetina aglicona, por glicosidases produzidas por enterobactérias (MANACH et al., 1997). Por outro lado, Hollman et al. (1995) demonstraram melhor absorção intestinal da quercetina na forma glicosídica do que na forma aglicona.

O desempenho dos antioxidantes pode variar de acordo com a espécie reativa em questão, dependendo também do local em que estas espécies são geradas e como são geradas, por isso é importante analisar a ação dos antioxidantes no intuito de identificar possíveis danos causados por estes, bem como estabelecer doses ideais para garantir proteção, pois sabe-se que um antioxidante pode ter ação protetora em um determinado sistema, porém pode não ter efeito protetor em outro, como até mesmo potencializar danos (HALLIWELL et al., 1995b).

1.5 Efeito Biológico dos Flavonóides

Vários estudos *in vitro* demonstram que os flavonóides podem ter ação anti-inflamatória, antialérgica, antiviral e também propriedades anticarcinogênicas (MIDDLETON, 1998).

Alguns flavonóides podem agir diminuindo a resposta inflamatória, pela diminuição da adesão das células inflamatórias ao endotélio (FRIESENECKER; TSAI; INTAGLIETTA, 1995). A resposta inflamatória pode também ser atenuada pela inibição das enzimas ciclooxigenase (COX) e lipooxigenase, importantes mediadores inflamatórios, envolvidas na liberação do ácido araquidônico, composto chave para a resposta inflamatória. O flavonóide quercetina demonstrou atuar na inibição destas enzimas, embora o mecanismo exato pelo qual os flavonóides atuam neste processo ainda não esteja bem estabelecido (NIJVELDT et al., 2001).

A quercetina, um dos flavonóides mais estudados, atua reduzindo os efeitos prejudiciais causados pela isquemia-reperfusão, pois interfere na atividade da enzima óxido nítrico sintase induzível, reduzindo a formação de óxido nítrico pela enzima, e atenuando os danos causados pelo composto (SHOSKES, 1998). Outro flavonóide, a epigallocatequina galato (EGCG) atua reduzindo a apoptose causada por isquemia-reperfusão em ilhotas de ratos (HARA et al., 2006).

Uma via importante relacionada aos danos oxidativos no processo de isquemia-reperfusão é via da xantina-oxidase, esta reage, durante a reperfusão, com o oxigênio produzindo o ânion superóxido. Os flavonóides quercetina e silibina reagem com a enzima inibindo sua atividade, atenuando as lesões celulares oxidativas (NIJVELDT et al., 2001). Outro flavonóide, a luteolina, foi considerado o maior inibidor da xantina-oxidase (COS et al., 1998).

Alguns flavonóides têm a capacidade de agir como quelantes de ferro, impedindo que ocorra peroxidação lipídica, resultante da interação de espécies reativas com o metal, a quercetina é conhecida por apresentar esta capacidade (NIJVELDT et al., 2001).

Estudos têm mostrado a capacidade dos flavonóides em inibir a carcinogênese. Alguns podem atuar inibindo a proliferação celular, são exemplos de flavonóides com esta capacidade a fisetina, apigenina e luteolina (FOTSIS; PEPPER; AKTAS, 1997; STEFANI; BOFFETTA; DENEIO-PELLEGRINI, 1999). A quercetina e a apigenina apresentaram efeito inibitório sobre o crescimento de melanoma e ainda tiveram influência sobre o potencial invasivo e metastático em camundongos (CALTAGIRONE et al., 2000). Além disso, os flavonóides parecem ter efeito importante na inibição da angiogênese (FOTSIS; PEPPER; AKTAS, 1997; PAPER, 1998).

Os flavonóides podem inibir a proliferação celular interferindo na atividade de moléculas-chave na regulação do ciclo celular, as quinases dependentes de ciclina. São exemplos de flavonóides com esta capacidade a quercetina e a genisteína. Os flavonóides impedem a progressão das células pelo ciclo celular inibindo a transição de G0-G1, desse modo, inibindo o crescimento de células tumorais e levando-as a morte por apoptose (WOO; JEONG; HAVES, 2005).

Foram realizados também alguns estudos *in vitro* sobre a atividade antiviral dos flavonóides, e observou-se que alguns vírus como, herpes simplex vírus, vírus sincicial respiratório, parainfluenza vírus e adenovírus foram afetados pelos flavonóides. Os flavonóides podem atuar de maneiras distintas sobre os vírus, alguns agem sobre a replicação intracelular viral, e outros podem atuar inibindo as propriedades infecciosas virais. A quercetina é um exemplo de flavonóide que pode atuar de ambas as formas (KAUL; MIDDLETON; OGRA, 1985; BAE et al., 2000).

Estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado a atividade dos flavonóides em células secretoras de insulina. Alguns flavonóides como a genisteína e a pelargonidina apresentaram

efeitos sobre a secreção de insulina. A genisteína (isoflavona), por exemplo, apresentou capacidade de aumentar a secreção de insulina estimulada por glicose na linhagem celular secretora de insulina derivada de camundongo, MIN 6, e também em cultura de ilhotas de camundongos e ratos, em concentrações até 100 $\mu\text{mol/L}$. Contudo altas concentrações deste flavonóide inibiram a secreção de insulina. A pelargonidina, flavonóide do grupo das antocianidinas, também mostrou-se um eficiente secretagogo de insulina *in vitro* (JAYAPRASKASAM et al., 2005; PINENT, et al. 2008).

Os estudos *in vivo* mostraram que os níveis normais de glicose foram mantidos com uma menor secreção de insulina em ratos alimentados com proteína de soja, este efeito foi atribuído aos flavonóides genisteína e daidzeína (NORIEGA-LOPEZ et al., 2007).

Os flavonóides também apresentam efeitos sobre a apoptose em células secretoras de insulina. A puerarina, por exemplo, mostrou efeito significativo na supressão da apoptose induzida por peróxido de hidrogênio e ainda promoveu um aumento da atividade de enzimas antioxidantes em ilhotas de ratos pré-tratadas com 50 ou 100 $\mu\text{mol/L}$ (XIONG et al., 2006). A morte celular induzida por citocinas também foi prevenida pelo flavonóide silimarina, na linhagem celular RINm5F (MATSUDA et al., 2005).

1.6 Flavonóides de origem cítrica

As frutas do gênero *Citrus* (Rutaceae) estão muito presentes na dieta humana, sob a forma de suco, ou através do consumo da fruta fresca, este gênero tem grande aceitação na alimentação. As frutas cítricas destacam-se entre as demais por ser uma fonte rica em compostos antioxidantes, como, carotenóides, vitamina C, fenóis e polifenóis (GORINSTEIN et al., 2001).

Estudos recentes têm dado atenção aos flavonóides de origem cítrica, pelo seu potencial efeito benéfico sobre a saúde. Os flavonóides de frutas cítricas mostraram atividade biológica em experimentos *in vivo e in vitro*, sendo assim um dos compostos presente no gênero *Citrus* de maior importância (CHEN et al., 2010a). Entre os flavonóides de origem cítrica destacam-se a naringina, a neohesperidina, a narirutina, a diosmina, a eriocitrina, a neoeriocitrina, a rutina e a hesperidina, entre outras (LIU, 2004).

1.7 Hesperidina

As flavanonas são um dos flavonóides mais presentes em *Citrus*, além da importância fisiológica e ecológica despertam interesse comercial pelas várias aplicações tanto na indústria alimentícia quanto farmacêutica (CHEN et al., 2010a).

A hesperidina, uma flavanona glicosilada, composta por uma aglicona (hesperitina) e um dissacarídeo anexo a rutinose se apresenta no estado sólido possuindo baixa solubilidade em água (MAJUMDAR; SRIRANGAM, 2009).

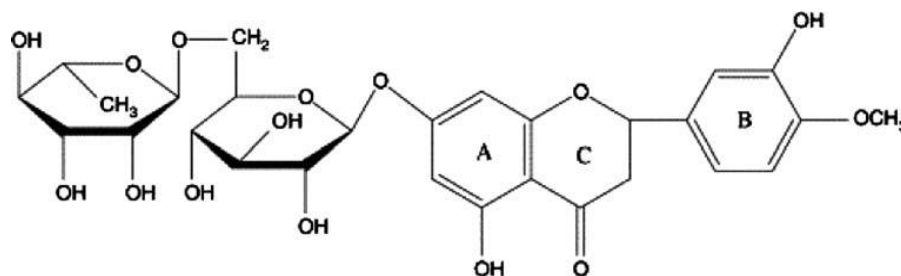


Figura 3. Estrutura da hesperidina

Fonte: KALPANA; SRINIVASAN; MENON (2009)

Este flavonóide é quase que exclusivamente encontrado em frutos cítricos, sendo que altas concentrações deste são encontradas na casca e nas partes membranosas dos frutos. São bem estabelecidas suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, hipolipidêmicas, vasoprotetoras e anticarcinogênicas (EMIN; OLIVEIRA; LAPA, 1994).

A atividade anti-inflamatória da hesperidina pode ser atribuída à sua capacidade moduladora da síntese de prostaglandinas e das vias de expressão do gene COX 2 (HIRATA et al., 2005). Já a atividade anticarcinogênica é atribuída a sua habilidade de suprimir a proliferação celular. Por suas propriedades a hesperidina parece atuar modulando diversas rotas relacionadas à retinopatia diabética e também ao edema macular diabético, entre outras doenças oculares (MAJUMDAR; SRIRANGAM, 2009).

A atividade de seqüestradora de espécies reativas e de inibidora da peroxidação lipídica da hesperidina tem despertado o interesse de vários pesquisadores, como uma alternativa para prevenir os danos oxidativos (PRADEEP; PARK; KO, 2008; KALPANA; SRINIVASAN; MENON, 2009).

Em estudo realizado por Chen et al. (2010a), foi demonstrado que a hesperidina diminuiu a morte celular induzida por peróxido de hidrogênio na linhagem celular hepática L02 de maneira dose-dependente e também apresentou atividade promotora de defesas endógenas antioxidantes, através da indução da expressão da enzima HO-1 (heme oxigenase-1), responsável pelo catabolismo de grupos heme, cujos efeitos citoprotetores estão relacionados aos produtos gerados por este processo, como aumento dos níveis de bilirrubina, monóxido de carbono e ferro livre. Este induz o aumento da síntese de ferritina, que por sua vez, pode reduzir a concentração de ferro livre (FERRIS et al., 1999).

Kalpana; Srinivasan e Menon (2009) avaliaram o potencial antioxidante da hesperidina e verificaram que este flavonóide apresenta eficiente capacidade seqüestradora de espécies reativas de oxigênio, como o radical hidroxil e superóxido. Além disso, este flavonóide apresenta efeito positivo também no sequestro de óxido nítrico e na inibição de danos induzidos por peróxido de hidrogênio, como a peroxidação lipídica em membrana celular RBC (eritrócitos).

A atividade dos flavonóides hesperidina e naringina sobre os níveis de glicose sanguínea foi avaliada em estudos com camundongos realizados por Jung et al. (2004), no qual observou-se uma diminuição da glicemia de 20% após 5 semanas consumindo uma dieta suplementada com hesperidina ou naringina. Os autores constataram também um aumento nas reservas de glicogênio hepático nos camundongos C57BL/KsJ-db/dB, considerados bons modelos para estudo dos estágios iniciais do diabetes tipo 2, já que apresentam resistência periférica a insulina. Este aumento do glicogênio hepático constitui um forte indicativo do efeito positivo deste flavonóide na redução da resistência hepática a insulina (HUMMEL; DICKIE; COLEMAN, 1966). Estes efeitos apresentados pelos flavonóides foram atribuídos a alterações na atividade da enzima glicoquinase hepática, que promove um aumento na utilização (captação) da glicose e assim do estoque de glicogênio no fígado. Neste estudo observou-se um aumento da enzima glicoquinase hepática após o tratamento com hesperidina ou naringina. No mesmo estudo foi avaliada também a secreção de insulina nos animais com doze semanas de idade, onde foi verificado um aumento dos níveis de insulina plasmática após o tratamento com os flavonóides, indicando assim o efeito insulínico positivo dos flavonóides cítricos testados (JUNG et al., 2004).

Em outro estudo realizado por Jung et al. (2006), constatou-se além dos efeitos hipoglicêmicos e insulíntrópicos, também efeitos hipolipidêmicos tanto da hesperidina quanto da naringina. Estes demonstraram capacidade de diminuir os níveis plasmáticos de ácidos graxos livres e triglicerídeos hepáticos em camundongos C57BL/KsJ-db/dB.

1.8 Rutina

A rutina (quercetina-3-O-rutinosídeo), descoberta no século 19, é um flavonóide pertencente ao grupo dos flavonóis, apresenta baixo peso molecular e ampla distribuição em vegetais e frutas (YANG; GUO; YUAN, 2008). Sendo especialmente encontrado em frutas cítricas como a laranja, uva, limão e lima (MAULUDIN; MÜLLER; KECK, 2009).

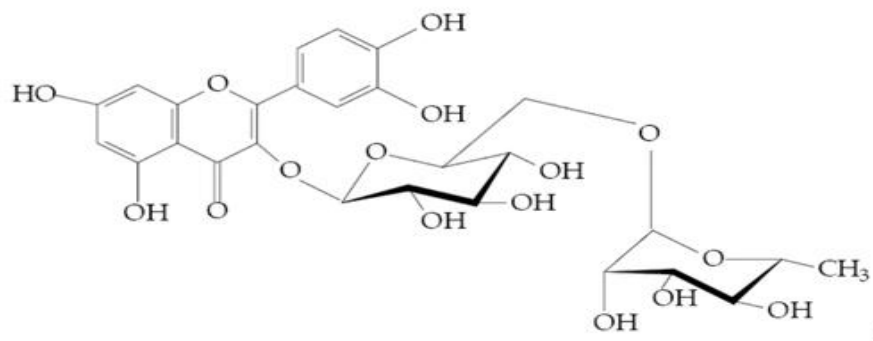


Figura 4. Estrutura da rutina

Fonte: PEDRIALI (2005)

A rutina destaca-se pela sua capacidade de seqüestro de espécies reativas como os radicais hidroxil, superóxido e peróxido (CALABRÓ et al., 2005). A capacidade de seqüestro de espécies reativas da rutina pode estar ligada à sua capacidade de inibir a enzima xantina-oxidase (NIJVELDT et al., 2001). Outras propriedades importantes da rutina incluem efeitos

anti-inflamatórios, antialérgicos, vasoativos, antitumor, antibacterianos, antivirais, antiprotozoários (CALABRÓ et al., 2005). A rutina apresenta ainda propriedades hipolipidêmicas, citoprotetoras, antiespasmódicas e anticarcinogênicas (MAULUDIN; MÜLLER; KECK, 2009).

A capacidade antioxidante de um composto pode ser determinada pelo potencial redutor deste, assim, em estudos realizados por Yang, Guo e Yuan (2008), foi demonstrado que a rutina possui um significativo potencial redutor, estabilizando espécies reativas pela doação de elétrons e interrompendo assim as reações em cadeia provocadas pelas espécies oxidantes. Este estudo evidencia a forte capacidade antioxidante da rutina em vários sistemas *in vitro*, sendo esta capacidade dose-dependente.

Em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina (STZ), o tratamento com rutina apresentou uma diminuição significativa do nível de glicose no plasma, aumentada durante o diabetes, normalizando assim a glicemia, reduziu também os danos teciduais que ocorrem no diabetes, tendo também efeito protetor contra a hepatotoxicidade e cardiotoxicidade geradas pela indução do diabetes por STZ (FERNANDES et al., 2010).

Srinivasan, Kaul e Ramarao (2005), utilizando também o modelo de diabetes induzido por estreptozotocina, em camundongos machos Swiss, observaram uma redução na prevalência de diabetes após a administração crônica de rutina. Além disso, a rutina também atuou reduzindo o nível de glicose plasmática nos mesmos modelos. Muitos desses efeitos podem ser atribuídos a uma atividade protetora indireta, uma vez que Prince e Kamalakkannan (2006) constataram aumento da atividade das enzimas antioxidantes catalase, SOD, e glutathiona peroxidase, além de aumento na concentração de GSH, em ratos Wistar, com diabetes induzido por estreptozotocina e tratados com rutina.

2 Objetivos

Objetivo geral

Avaliar *in vitro* a citotoxicidade, citoproteção e efeitos dos flavonóides rutina e hesperidina sobre a funcionalidade de células secretoras de insulina BRIN-BD11.

Objetivos específicos

- a. Avaliar a citotoxicidade de diferentes concentrações dos flavonóides rutina e hesperidina através da avaliação da funcionalidade mitocondrial.
- b. Avaliar a capacidade citoprotetora dos flavonóides rutina e hesperidina em células BRIN-BD11 sob estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio através da avaliação da funcionalidade mitocondrial.
- c. Analisar o efeito dos flavonóides rutina e hesperidina sobre a secreção de insulina.
- d. Determinar o efeito dos flavonóides rutina e hesperidina sobre a atividade da enzima glutathiona peroxidase (GSH-Px).

3 Material e Métodos

3.1 Reagentes

Foram utilizados reagentes com grau de pureza analítico (P.A). Os flavonóides rutina e hesperidina, o MTT, e os reagentes utilizados nos ensaios de atividade da glutathione peroxidase foram obtidos da Sigma-Aldrich. O meio de cultura RPMI 1640, penicilina/estreptomicina e soro fetal bovino da Vitrocell; e o dimetil sulfoxido (DMSO) da Biotec.

3.2 Cultura de células

Para o desenvolvimento deste trabalho foi utilizada a linhagem celular secretora de insulina BRIN-BD11 (gentilmente doada pelo Prof. Dr. Angelo Rafael Carpinelli, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo), produzida por eletrofusão da linhagem RINm5F com ilhotas pancreáticas de ratos NEDH (New England Deaconess Hospital). Esta linhagem celular apresenta estabilidade em cultura de tecidos por mais de 50 passagens, e ainda uma resposta positiva à D- glicose.

A linhagem celular utilizada foi cultivada em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de antibiótico (10000 UI de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina) em garrafas de cultivo de 75 cm² e mantidas em estufa a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂.

3.3 Soluções dos flavonóides - Rutina e Hesperidina

Para preparo da solução estoque, os flavonóides isolados rutina e hesperidina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) foram pesados e solubilizados em DMSO, sendo a concentração final desta solução 250 mM, em seguida foram alíquotados em eppendorfs e congelados.

Para preparo da solução uso, a solução estoque de flavonóides foi diluída 1000x em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino. Todas as concentrações testadas tinham a mesma concentração final de DMSO, equivalente à concentração máxima testada (0,032%).

3.4 Metodologias

Curva de sobrevivência celular para determinação do tempo de dobramento das células BRIN-BD11 pelo método do azul de Tripan

O azul de Tripan, um corante vital, penetra em membranas celulares não íntegras, corando-as de azul. Neste ensaio 10 garrafas para cultivo celular contendo inicialmente 1×10^5 células cada, foram incubadas em estufa umidificada a 37°C, na presença de 5% de CO₂ em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico penicilina e estreptomicina. A cada 24h duas garrafas eram retiradas da estufa e as células viáveis e não viáveis foram contadas em câmara de Neubauer, sendo retirada uma alíquota de 50µL da amostra de células, e esta em seguida era diluída 1:1 em azul de Tripan 0,4%, em microscópio óptico. A partir das contagens foi possível determinar o tempo de dobramento da linhagem celular BRIN-BD11, dado pela seguinte relação:

$$PDT = 1/R \quad R = 3,32 (\log N_i - \log N_0) / t_2 - t_1$$

- PDT = *population doubling time*
- R = taxa de multiplicação celular
- N₀ = número inicial de células no início da fase exponencial
- N_i = número total de células no tempo 2 (t₂)
- t₁ = tempo zero
- t₂ = tempo determinado
- 3,32 = constante

Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade das células BRIN-BD11 na ausência ou presença de diferentes concentrações dos flavonóides rutina e hesperidina e do peróxido de hidrogênio foi avaliada pelo método de redução do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]). Este método descrito por Mosmann em 1983, baseia-se na capacidade da enzima succinato desidrogenase mitocondrial em reduzir o MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) a cristais de formazan, e é utilizado como indicativo da atividade metabólica, por meio da avaliação da integridade mitocondrial. Para avaliação do formazan formado foi utilizado espectrofotômetro a 546nm (leitor de microplaca µQuant – Biotek). A absorbância (*Abs*) obtida para o grupo controle (ausência de flavonóides e/ou peróxido de hidrogênio) foi definida como 100% de viabilidade celular.

A porcentagem de viabilidade celular foi definida através da seguinte relação:

$$\%viabilidade = \frac{Abs_{Amostra}}{Abs_{MédiaControle}} \times 100$$

Determinação da viabilidade celular na presença de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio – ensaio agudo (2h)

Foram cultivadas, em meio RPMI 1640, 3×10^5 células/poço em placas de 24 poços por um período de adesão de aproximadamente 24 horas. Após este período as células foram tratadas com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (100, 200, 400, 500 e 600 µM) preparadas em meio de cultura RPMI 1640 e na presença de 0,032% de DMSO, por um período de 2 horas em estufa umidificada a 37°C e 5% CO₂. Após o tratamento a viabilidade

celular foi determinada pelo método de redução do MTT, descrito anteriormente. Este ensaio foi realizado para determinação do IC50 (concentração de peróxido de hidrogênio que inibe 50% da viabilidade celular).

Determinação da viabilidade celular na presença de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio – ensaio crônico (24h)

Este teste foi realizado para determinação do IC50 (concentração de peróxido de hidrogênio que inibe 50% de viabilidade celular). As células ($1,5 \times 10^5$ células/poço) foram incubadas por 18h para adesão em placas de 24 poços, em meio de cultura RPMI 1640 e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após a adesão, as células foram tratadas com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (6,25; 12,5; 25; 50; 75; 100; 125; 150; 200; 250 e 300 µM). Este ensaio foi realizado na ausência ou presença de DMSO, sendo este equivalente ao que está presente na máxima concentração de flavonóide testada (0,032%) com o intuito de mimetizar a mesma condição de futuros ensaios na presença de peróxido de hidrogênio e flavonóide, e preparadas em meio de cultura RPMI 1640. Posteriormente à adição do tratamento, as células foram incubadas por 24h, em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂. Após o tratamento, seguiu-se o protocolo de redução do MTT, conforme descrito anteriormente.

Avaliação da citotoxicidade de diferentes concentrações dos flavonóides rutina e hesperidina

Em placas de 24 poços, foram cultivadas $1,5 \times 10^5$ células/poço e por um período de 18h de adesão em meio de cultura RPMI 1640, mantidas em estufa umidificada a 37°C/ 5% CO₂. Após a adesão as células foram tratadas na presença de diferentes concentrações de rutina ou

hesperidina (1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40 e 80 μ M) preparadas em meio de cultura RPMI 1640 e em todas as soluções estava presente 0,032% de DMSO. Após adicionar o tratamento com os flavonóides as células foram novamente incubadas por 24h (estufa umidificada a 37°C/ 5% CO₂). A citotoxicidade dos flavonóides testados foi avaliada a partir do ensaio de determinação da viabilidade celular por redução do MTT (descrito anteriormente).

Avaliação da citoproteção dos flavonóides rutina e hesperidina

Para este ensaio, 1,5x10⁵ células/ poço, foram cultivadas por 18 horas (período de adesão) em placas de 24 poços, e mantidas em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂ em meio de cultura RPMI 1640. Posteriormente as células foram tratadas com diferentes concentrações dos flavonóides rutina ou hesperidina (2,5; 5; 10 μ M), na presença simultânea de duas concentrações de peróxido de hidrogênio (37,5 e 75 μ M) por 24h, a 37°C e 5% de CO₂. Todas as soluções foram preparadas em meio RPMI 1640 e continham 0,032% de DMSO. Depois do tratamento seguiu-se o protocolo de redução do MTT, e a leitura das absorbâncias foi realizada em 546nm.

Avaliação do efeito citoprotetor do pré-tratamento com os flavonóides rutina e hesperidina

Neste ensaio 1,5x10⁵ células/poço foram cultivadas, em meio RPMI 1640, em placas de 24 poços por um período de 24h para a adesão celular, em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂. Após este período, as células foram tratadas com uma solução na concentração de 10 μ M dos flavonóides rutina ou hesperidina, preparada em meio RPMI 1640 e incubadas por um período de 24 horas. Após este período, o meio de cultura contendo os flavonóides foi removido, e as células foram submetidas a estresse oxidativo pela exposição a 350 μ M de

peróxido de hidrogênio (solução preparada em meio RPMI 1640) por um período de 2 horas, onde permaneceram em estufa umidificada contendo 5% de CO₂ a 37°C. Em seguida, a viabilidade celular foi avaliada pelo método de redução do MTT, conforme descrito anteriormente. Todas as soluções preparadas apresentavam 0,032% de DMSO.

Determinação da secreção de insulina na presença de diferentes concentrações dos flavonóides isolados

Para este ensaio as células foram incubadas ($1,5 \times 10^5$ células/poço) em placas de 24 poços, em meio RPMI 1640, por um período de 18 horas para adesão. Após a adesão as células foram tratadas com os flavonóides rutina ou hesperidina (1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40 e 80 μ M) preparadas em meio de cultura RPMI 1640 e contendo 0,032% de DMSO. As células permaneceram na presença dos tratamentos por 24 horas. Após este período o sobrenadante celular foi coletado, centrifugado por 5 min a 1200 rpm (para remoção de resíduos celulares) e posteriormente utilizado para a determinação da secreção de insulina por radioimunoensaio, de acordo com método descrito por Morgan e Lazarow (1963) e Pupo e Marriero (1970) modificado. Este baseia-se na competição entre a insulina (humana) marcada com o radioisótopo I¹²⁵ e a insulina não marcada (insulina secretada pelas células BRIN-BD11) pelo anticorpo anti-insulina (1:200) derivado de cobaia *guinea pig*. O complexo antígeno-anticorpo foi precipitado pela adsorção do hormônio ao polietilenoglicol (PM 6000). Uma curva padrão foi preparada utilizando-se concentrações conhecidas de insulina não marcada. A partir desses resultados foi possível determinar a concentração de insulina presente nas amostras.

Determinação da atividade da enzima glutathiona peroxidase (GSH-Px)

Para este ensaio foram cultivadas 5×10^5 células por poço, em placas de 6 poços por um período de 24 horas (adesão) em meio de cultura RPMI 1640 e mantidas em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂. Após a adesão, o meio de cultura foi removido, e foram adicionadas aos poços as soluções dos flavonóides rutina e hesperidina, na concentração de 10 µM, preparadas em meio de cultura RPMI 1640 e contendo 0,032% de DMSO. As células permaneceram na presença dos tratamentos por 24 horas.

Depois do período de tratamento, a atividade da GSH-Px foi determinada pelo método de Wendel (1978). Este método baseia-se na determinação indireta da atividade da GSH-Px a partir do decréscimo da concentração de NADPH, que é consumido no processo de regeneração da GSH (glutathiona reduzida). A cinética enzimática ocorreu durante 10 minutos em temperatura ambiente a 340 nm. Para calcular a atividade máxima da GSH-Px baseia-se no coeficiente de extinção molar do NADPH ($0,00622 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

$$\text{Atividade da GSH-Px} = \frac{\Delta \text{ Absorbância da amostra} \times \text{diluição}}{\text{Coeficiente de extinção molar do NADPH}}$$

Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. A análise estatística dos dados foi realizada por ANOVA (one-way analysis of variance), seguido por teste de comparação de Tukey, utilizando o software GraphPad PRISM versão 5.01. O nível de significância mínimo definido foi de $p < 0,05$.

4 Resultados

Os resultados estão organizados em um capítulo correspondente ao artigo científico:

4.1 Capítulo I

Citotoxicidade, Citoproteção e Efeitos dos Flavonóides Rutina e Hesperidina sobre a Funcionalidade de Células Secretoras de Insulina.

Citotoxicidade, Citoproteção e Efeitos dos Flavonóides Rutina e Hesperidina sobre a Funcionalidade de Células Secretoras de Insulina

Elise Tatiane Felipe¹, Juliana Sousa Maestri¹, Simoní Marinéia Braatz¹, Angelo Rafael Carpinelli², Carla Cristine Kanunfre¹, Henriette Rosa de Oliveira Emilio¹

¹Universidade Estadual de Ponta Grossa - Departamento de Biologia Geral, Ponta Grossa- Pr, Brasil

² Universidade de São Paulo – Instituto de Ciências Biomédicas - ICB1, São Paulo – SP, Brasil

e-mail: elisefelipe@hotmail.com

Resumo

Flavonóides são compostos bioativos amplamente consumidos na dieta e que apresentam importante atividade antioxidante. Esta atividade é principalmente atribuída à capacidade destes compostos em seqüestrar espécies reativas, especialmente as espécies reativas de oxigênio, como o radical hidroxil, superóxido, peróxido de hidrogênio, entre outras. Desse modo, apresentam potenciais efeitos benéficos no tratamento de doenças crônicas envolvendo estresse oxidativo, como o diabetes mellitus. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a citotoxicidade, citoproteção e efeitos dos flavonóides rutina e hesperidina sobre a funcionalidade de células secretoras de insulina BRIN-BD11. A avaliação dos efeitos citotóxicos e citoprotetores dos flavonóides testados foi realizada por meio do ensaio de redução de MTT. Os flavonóides rutina e hesperidina não apresentaram efeitos citotóxicos após 24 horas em nenhuma das concentrações testadas (1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40 e 80 μ M). Contudo também não foram observados efeitos citoprotetores dos flavonóides rutina e hesperidina (2,5; 5; 10 μ M) sobre as células BRIN-BD11 em exposição simultânea ao peróxido de hidrogênio (37,5 – dose sub-letal e 75 μ M- dose letal) por 24 horas. A exposição das células BRIN-BD11 ao pré-tratamento por 24 horas com os flavonóides rutina ou hesperidina (10 μ M) e posterior exposição a 350 μ M de peróxido de hidrogênio (2 horas) do mesmo modo não apresentou efeitos citoprotetores. Também não foram observados efeitos insulíntrópicos do tratamento com os flavonóides rutina e hesperidina (1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40 e 80 μ M) por 24 horas na linhagem celular utilizada avaliado pelo método de radioimunoensaio. A atividade da enzima antioxidante glutathione peroxidase (GSH-Px) foi avaliada na presença de 10 μ M dos flavonóides rutina e hesperidina (24 horas) e não foram observados efeitos sobre a atividade da enzima em questão, quando comparada ao grupo controle. Desse modo conclui-se que nas concentrações testadas os flavonóides não apresentaram citotoxicidade, sendo, portanto bem tolerados e seguros, entretanto não apresentaram efeitos citoprotetores. Além disso, nas condições e concentrações testadas, tanto a rutina como a hesperidina não apresentaram efeito significativo sobre a secreção de insulina e a atividade da enzima antioxidante GSH-Px. Dessa forma são necessários futuros experimentos, variando as condições experimentais, *in vitro* e principalmente *in vivo*, para melhor avaliação dos possíveis efeitos destes flavonóides em células secretoras de insulina.

Palavras-chave: BRIN-BD11; peróxido de hidrogênio; estresse oxidativo; diabetes mellitus; antioxidante.

Abstract

Flavonoids are bioactive compounds widely consumed in the diet that have antioxidant activity. This activity is mainly attributed to the ability of these compounds to scavenge reactive species, especially reactive oxygen species such as hydroxyl radical, superoxide, hydrogen peroxide, among other. Thus, present potential beneficial effects in treating chronic diseases involving oxidative stress such as diabetes mellitus. Therefore, the purpose of this study was to evaluate the cytotoxicity and cytoprotective effects of flavonoids rutin and hesperidin on the functionality of insulin-secreting cells BRIN-BD11. The assessment of cytotoxic and cytoprotective flavonoid tested was performed using the MTT reduction assay. The flavonoids rutin and hesperidin did not show cytotoxic effects after 24 hours in any of the tested concentrations (1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 and 80 μ M). Cytoprotective effects of flavonoids rutin and hesperidin (2.5, 5, 10 μ M) on BRIN-BD11 cells were not observed in simultaneous exposure to hydrogen peroxide (37.5 μ M- sub-lethal dose and 75 μ M- lethal dose) for 24 hours. Exposure of BRIN-BD11 cells to pre-treatment for 24 hours with the flavonoids rutin and hesperidin (10 μ M) and subsequent exposure to 350 μ M hydrogen peroxide (2 hours) similarly showed no cytoprotective effects. Insulinotropic effects were not observed from treatment with the flavonoids hesperidin and rutin (1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 and 80 μ M) for 24 hours in the cell line evaluated by radioimmunoassay. The antioxidant enzyme glutathione peroxidase (GSH-Px) was measured in the presence of 10 μ M of flavonoids rutin and hesperidin (24 hours) and no effects were observed on the enzyme activity in compared to the control group. Thus it is concluded that the concentrations of the flavonoids tested showed no cytotoxicity and is therefore well tolerated and safe, but had no cytoprotective effects. Moreover, under conditions and concentrations tested, both rutin and hesperidin had no significant effect on the secretion of insulin and antioxidant enzyme GSH-Px. Thus future experiments are needed, varying the experimental conditions *in vitro* and mainly *in vivo* to better evaluate the possible mechanisms of action of these flavonoids in insulin-secreting cells.

Keywords: BRIN-BD11; hydrogen peroxide; oxidative stress, diabetes mellitus; antioxidant.

Introdução

Os flavonóides são considerados os antioxidantes mais ativos encontrados nos vegetais (BIANCHI; ANTUNES, 1999). São amplamente consumidos na dieta humana, e podem ser encontrados em várias partes das plantas, como por exemplo, nos frutos. A estrutura básica dos flavonóides consiste de um anel benzeno (A) condensado com o sexto membro do anel (C) que possui na segunda posição um anel fenil benzeno (B) como substituinte (AHERNE; O'BRIEN, 2002). Esta estrutura básica pode apresentar uma série de modificações, o que confere aos flavonóides suas características particulares com diferentes propriedades físicas, químicas e biológicas (PINENT et al., 2008).

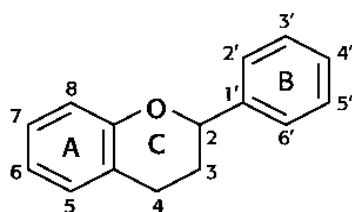


Figura1a – Estrutura geral de flavonóides

Fonte: <http://www.scielo.sa.cr/img/fbpe/rcc/v8n1/3213i1.JPG>

Pertencendo ao grupo dos flavonóis, a rutina é um bioflavonóide glicídico amplamente encontrado em diversos vegetais e frutas (YANG; GUO; YUAN, 2008), além de bebidas como chás e vinhos (BECHO; MACHADO; GUERRA, 2009). A rutina é classificada como um bioflavonóide cítrico, também chamado de vitamina P, encontrada em frutas tais como a laranja, limão, lima e uva (MAULUDIN; MÜLLER; KECK, 2009). Dentre os vários flavonóides estudados, a rutina se destaca por sua ampla atividade farmacológica. Este bioflavonóide apresenta propriedades antialérgicas, anti-inflamatórias, vasoativas,

antitumorais, antibacterianas, antivirais, antiparasitárias (CALABRÓ et al., 2005), além de antioxidante. Segundo Afanas`ev et al. (1989), através de estudos avaliando a atividade antioxidante da rutina e da quercetina, demonstraram que estes flavonóides têm uma ação terapêutica significativa em patologias que envolvam espécies reativas além de apresentarem baixa toxicidade, principalmente a rutina.

A hesperidina (hesperitina- 7-0- rutinosídeo) é um bioflavonóide que pertence à classe das flavanonas. Estas são principalmente encontradas em frutas cítricas, diferente de outras classes que podem ser encontradas em uma grande variedade de alimentos (MANACH et al., 2003). É o principal bioflavonóide encontrado na laranja e no limão, sendo constantemente associado à vitamina C (GARG et al., 2001). Destaca-se por apresentar baixa toxicidade ao ser humano, além de diversas propriedades farmacológicas, entre as quais, efeitos antioxidante, anti-inflamatório, hipolipidêmico, vasoprotetor, anticarcinogênico e hipoglicêmico (EMIN; OLIVEIRA; LAPA, 1994). A ação hipoglicemiante deste bioflavonóide cítrico é atribuída, principalmente, ao efeito sobre a atividade das enzimas envolvidas no metabolismo hepático da glicose, relacionadas principalmente aos processos de glicólise e gliconeogênese (JUNG et al., 2006).

Muitos dos efeitos benéficos dos flavonóides sobre a saúde são atribuídos a sua capacidade antioxidante, esta que advém da capacidade destes compostos em seqüestrar espécies reativas (DECKER, 1997). As espécies reativas quando presentes em altos níveis levam o organismo a uma situação denominada de estresse oxidativo. Esta é uma condição em que há um desequilíbrio entre a geração de espécies reativas e as defesas antioxidantes endógenas levando a danos celulares oxidativos (SIES; STAHL, 1995). Dentre os vários

efeitos nocivos do aumento de espécies reativas estão a peroxidação de membranas lipídicas, danos aos ácidos nucléicos, carboidratos e grupos sulfidrilas de proteínas (SIES, 1991).

O estresse oxidativo tem sido relacionado com a patogênese de várias doenças tais como: cardiopatias, enfisemas, disfunções cerebrais, arteriosclerose e o diabetes mellitus (BIANCCHI; ANTUNES, 1999).

O diabetes mellitus é caracterizado por desordens no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, relacionadas à absoluta ou relativa deficiência na secreção e/ou ação da insulina, apresentando como uma das principais conseqüências a hiperglicemia (PRINCE; KAMALAKKANNAN, 2006).

É bem estabelecido que a hiperglicemia contribui intensamente para o aumento das concentrações plasmáticas de espécies reativas e também para o comprometimento dos sistemas antioxidantes endógenos (CERIELLO, 1997). Este aumento de espécies reativas é extremamente danoso às células B pancreáticas, uma vez que é bem instituído que estas células apresentam baixa atividade e expressão de enzimas antioxidantes sendo assim, altamente sensíveis aos danos causados pelas espécies reativas (LENZEN; DRINKGERN; TIEDGE, 1996). Desse modo a busca por compostos com capacidade de atenuar ou impedir os danos gerados pelas espécies reativas tem despertado grande interesse, e com este propósito flavonóides que apresentam potencial para tal ação tem se tornado objeto de inúmeros estudos.

Os flavonóides foram identificados como compostos com significativo potencial antidiabético em uma grande variedade de formulações usadas na medicina popular. Apesar do crescente aumento dos estudos da ação destes compostos em animais diabéticos, o mecanismo através do qual essas substâncias exercem seus efeitos hipoglicêmicos, hipolipidêmicos e insulinoatrópicos ainda é pouco investigado. Entre os recentes estudos,

destacam-se os efeitos benéficos dos bioflavonóides cítricos rutina e hesperidina. Jung et al. (2004) evidenciaram efeitos hipoglicemiantes da hesperidina em camundongos C57BL/KsJ-db/db, modelo de estudos para estágios iniciais do diabetes mellitus tipo 2. Já a rutina, em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina, também apresentou atividade hipoglicemiante e ainda ação protetora contra a hepatotoxicidade e cardiotoxicidade presentes neste modelo de diabetes (FERNANDES et al., 2005). Apesar do potencial destes flavonóides, demonstrado por estes estudos, ainda são raros resultados relacionados ao efeito direto dos mesmos sobre a funcionalidade do pâncreas endócrino.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a citotoxicidade, citoproteção e os efeitos dos flavonóides rutina e hesperidina sobre a funcionalidade de células secretoras de insulina BRIN-BD11.

Material e métodos

Cultura de células

Células BRIN-BD11(gentilmente doados pelo Prof. Dr. Angelo Rafael Carpinelli, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo) foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (10000 UI de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina) e em garrafas de cultivo de 75 cm². As células foram mantidas em estufa a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂.

Soluções de flavonóides - Rutina e Hesperidina

Para o preparo da solução estoque, os flavonóides rutina e hesperidina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) foram pesados e solubilizados em DMSO (concentração final = 250 mM). Essa solução foi alíquotada em eppendorfs e congelada a -20°C.

Para preparo da solução de uso, a solução estoque de flavonóides foi diluída 1000 vezes em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino. Todas as concentrações de flavonóides testadas tinham a mesma concentração final de DMSO (0,032%), equivalente à quantidade de DMSO presente na concentração máxima de flavonóide testada.

Avaliação da Viabilidade Celular – Redução do MTT

A viabilidade das células BRIN-BD11 na ausência ou presença de diferentes concentrações dos flavonóides rutina e hesperidina e do peróxido de hidrogênio foi avaliada pelo método de redução do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]). Este método descrito por Mosmann em 1983, baseia-se na capacidade da enzima succinato desidrogenase mitocondrial em reduzir o MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) a cristais de formazan, e é utilizado como indicativo da atividade metabólica, através da avaliação da integridade mitocondrial. A quantificação do formazan foi realizada por espectrofotometria a 546nm (leitor de microplaca µQuant – Biotek). A absorbância (Abs) obtida para o grupo controle (ausência de flavonóides e/ou peróxido de hidrogênio) foi definida como 100% de viabilidade celular.

A porcentagem de viabilidade celular foi definida através da seguinte relação:

$$\% \text{ Viabilidade Celular} = \frac{\text{Absorbância da Amostra}}{\text{Absorbância Média do Controle}} \times 100$$

Citotoxicidade dos flavonóides Rutina e Hesperidina

As células ($1,5 \times 10^5$ células/poço) foram cultivadas em placas de 24 poços e mantidas em estufa umidificada a 37°C / 5% CO_2 por 18h em meio de cultura RPMI 1640 (período de adesão celular). Após adesão, as células foram tratadas com rutina ou hesperidina nas concentrações de 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40 e 80 μM preparadas em meio de cultura RPMI 1640. Após adição dos flavonóides, as células foram novamente incubadas por 24h (estufa umidificada a 37°C / 5% CO_2). A citotoxicidade dos flavonóides testados foi avaliada a partir do ensaio de determinação da viabilidade celular por redução de MTT (conforme descrito anteriormente).

Citotoxicidade do peróxido de hidrogênio – ensaio agudo (2h)

Foram cultivadas 3×10^5 células/poço, em meio RPMI 1640, em placas de 24 poços por um período de adesão de aproximadamente 24 horas. Após este período as células foram tratadas com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (100, 200, 400, 500 e 600 μM) preparadas em meio RPMI 1640 e na presença de 0,032% de DMSO (solvente utilizado para a solubilização dos flavonóides), por um período de 2 horas em estufa umidificada a 37°C e 5% CO_2 . Após o tratamento a viabilidade celular foi determinada pelo método de redução do MTT, descrito anteriormente. Este ensaio foi realizado para determinação do IC_{50} (concentração de peróxido de hidrogênio que inibe 50% da viabilidade celular).

Citotoxicidade do peróxido de Hidrogênio – ensaio crônico (24h)

Este teste foi realizado para determinação do IC_{50} (concentração de peróxido de hidrogênio que inibe 50% da viabilidade celular). As células ($1,5 \times 10^5$ células/poço) foram

cultivadas em placas de 24 poços e mantidas em estufa umidificada a 37°C/ 5% CO₂ por 18h em meio de cultura RPMI 1640 (período de adesão celular). Após adesão, as células foram tratadas com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (6,25; 12,5; 25; 50; 75; 100; 125; 150; 200; 250 e 300µM). As concentrações testadas foram preparadas em meio de cultura RPMI 1640 na ausência ou presença de DMSO (solvente utilizado na solubilização dos flavonóides) equivalente ao que estaria presente na máxima concentração de flavonóide testada (0,032%), visando mimetizar as mesmas condições de futuros ensaios na presença de peróxido de hidrogênio e flavonóide. Posteriormente à adição do tratamento, as células foram incubadas por 24h, em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após o tratamento, seguiu-se o protocolo de redução do MTT, e a leitura das absorbâncias foi realizada a 546nm. A partir dos resultados obtidos foi construída uma curva e obtida equação a partir da qual foi calculada a concentração de peróxido de hidrogênio em que foi verificada morte de 50% das células (IC₅₀).

Efeito citoprotetor dos flavonóides rutina e hesperidina

Para este ensaio, $1,5 \times 10^5$ células/poço, foram cultivadas em placas de 24 poços contendo meio de cultura RPMI 1640 e foram mantidas por 18 horas em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂ (período de adesão). Após adesão, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos flavonóides rutina ou hesperidina (2,5; 5; 10µM), na presença simultânea de duas concentrações de peróxido de hidrogênio, 37,5 µM (concentração sub-letal) e 75µM (concentração letal), por 24h, a 37°C e 5% de CO₂. Todas as soluções foram preparadas em meio RPMI 1640 e continham 0,032% de DMSO. Depois do tratamento seguiu-se o protocolo de redução do MTT, e a leitura das absorbâncias foi realizada em 546nm.

Efeito citoprotetor do pré-tratamento com os flavonóides rutina e hesperidina

Neste ensaio $1,5 \times 10^5$ células/poço foram cultivadas, em meio RPMI 1640, em placas de 24 poços por um período de 24h para a adesão celular, em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂. Após este período, as células foram tratadas com uma solução na concentração de 10µM dos flavonóides rutina ou hesperidina, preparada em meio RPMI 1640 e incubadas por um período de 24 horas. Após este período, o meio de cultura contendo os flavonóides foi removido, e as células foram submetidas a estresse oxidativo pela exposição a 350 µM de peróxido de hidrogênio (solução preparada em meio RPMI 1640) por um período de 2 horas, onde permaneceram em estufa umidificada contendo 5% de CO₂ a 37°C. Em seguida, a viabilidade celular foi avaliada pelo método de redução do MTT, conforme descrito anteriormente. Todas as soluções continham 0,032% de DMSO.

Determinação da secreção de insulina

Para este ensaio as células foram incubadas (1×10^5 células/poço) em placas de 24 poços, em meio RPMI 1640, por um período de 18 horas para adesão. Após a adesão as células foram tratadas com os flavonóides rutina ou hesperidina (1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40 e 80µM) sendo as soluções preparadas em meio de cultura RPMI 1640 contendo 0,032% de DMSO. As células permaneceram na presença dos tratamentos por 24 horas. Após este período o sobrenadante celular foi coletado, centrifugado por 5 minutos a 1200 rpm (para remoção de resíduos celulares) e posteriormente utilizado para a determinação da secreção de insulina por radioimunoensaio, de acordo com método descrito por Morgan e Lazarow (1963) e Pupo e Marriero (1970) modificado. Este baseia-se na competição entre a insulina (humana) marcada com o radioisótopo I¹²⁵ e a insulina não marcada (insulina secretada pelas células

BRIN-BD11) pelo anticorpo anti-insulina (1:200) derivado de cobaia (guinea pig). Uma curva padrão foi preparada utilizando-se concentrações conhecidas de insulina não marcada. A partir de regressão linear e equação da reta foi possível determinar a concentração de insulina presente nas amostras.

Atividade da enzima glutathiona peroxidase (GSH-Px)

Para este ensaio 5×10^5 células/poço foram cultivadas em placas de 6 poços em meio RPMI 1640 a 37°C e 5% CO₂ por um período de 24 horas para adesão. Após o período de adesão, as células foram tratadas com solução 10 µM dos flavonóides rutina ou hesperidina preparadas em meio de cultura RPMI 1640, sendo que todas as soluções continham 0,032% de DMSO. As células permaneceram na presença dos tratamentos por 24 horas. Depois do período de tratamento, a atividade da GSH-Px foi determinada pelo método de Wendel (1978). Este método baseia-se na determinação indireta da atividade da GSH-Px a partir do decréscimo da concentração de NADPH, que é consumido no processo de regeneração da GSH (glutathiona reduzida). A cinética enzimática ocorreu durante 10 minutos em temperatura ambiente a 340 nm. O cálculo da atividade máxima da GSH-Px baseia-se no coeficiente de extinção molar do NADPH ($0,00622 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

$$\text{Atividade da GSPHx} = \frac{\Delta \text{absorbância da amostra} \times \text{diluição}}{\text{Coeficiente de extinção molar do NADPH}}$$

Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. A análise estatística dos dados foi realizada por ANOVA (*one-way analysis of variance*), seguido por

teste de comparação de Tukey, utilizando o software GraphPad PRISM versão 5.01. O nível de significância mínimo definido foi de $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

Avaliação da citotoxicidade de diferentes concentrações dos flavonóides rutina e hesperidina

Os resultados deste estudo demonstraram que os flavonóides rutina e hesperidina não foram citotóxicos em nenhuma das concentrações testadas após 24 horas de tratamento (figura 2a), pois não houve diferença estatística em relação ao grupo controle (ausência do flavonóide). Resultado semelhante foi encontrado por Chen et al. (2010a), em que foram testadas diferentes concentrações de hesperidina por 24h na linhagem celular hepática humana, L02, e não foram verificados efeitos negativos sobre a viabilidade celular. Marcarini et al. (2010), utilizando a linhagem celular hepática HTC, também não observaram efeito citotóxico da rutina em 24 horas de tratamento com diferentes concentrações do flavonóide. Além disso, estudos *in vivo* também demonstram a baixa toxicidade da rutina quando administrada a ratos normais (PRINCE; KAMALAKKANNAN, 2006). Estes resultados evidenciam que os flavonóides utilizados são bem tolerados tanto em sistemas *in vivo* quanto *in vitro* não interferindo na viabilidade celular. Contudo, sabe-se que alguns fatores são críticos para determinar a ação celular destes compostos, sendo um dos principais fatores a ser considerado a concentração utilizada, além de ser levado em consideração também o tempo de exposição. Estes fatores são determinantes para que um mesmo flavonóide possa agir como antioxidante, por exemplo, em uma determinada condição ou pro-oxidante em outra.

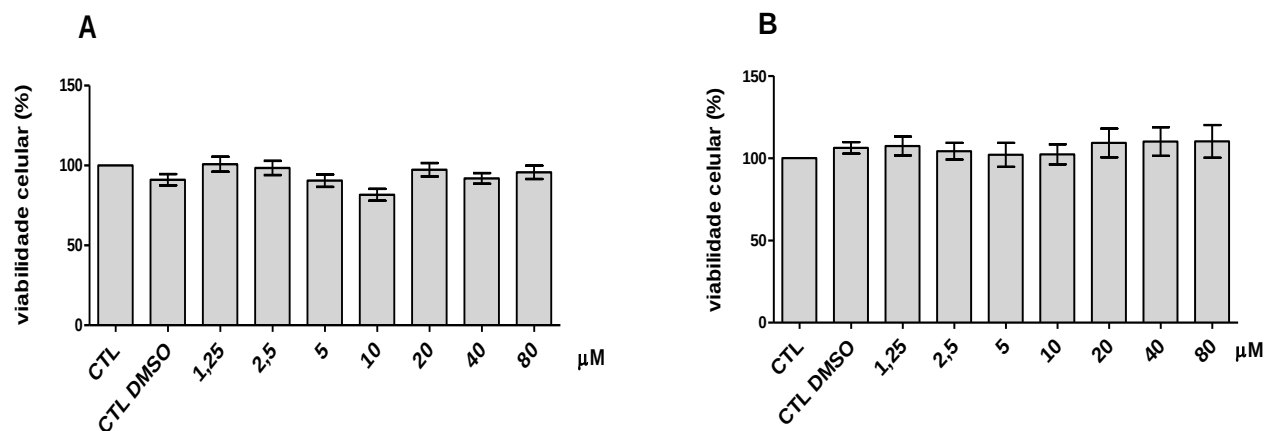


Figura 2a – Avaliação da viabilidade celular na presença de diferentes concentrações dos flavonóides rutina (**A**) e hesperidina (**B**). Células BRIN-BD11 ($1,5 \times 10^5$ células/poço) foram cultivadas por 24 horas / 37°C / 5% CO₂. Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média e analisados por análise de variância ANOVA ($p < 0,05$). Os dados do flavonóide rutina (A) são representativos de 5 experimentos independentes com $n \geq 8$. Os dados do flavonóide hesperidina (B) são representativos de 4 experimentos independentes com $n \geq 7$. CTL= controle (ausência de DMSO); CTL DMSO = controle DMSO (0,032% de DMSO).

Viabilidade celular na presença de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio – Ensaio Agudo e Crônico

A toxicidade do peróxido de hidrogênio em células BRIN-BD11 foi confirmada através dos ensaios de viabilidade na presença de diferentes concentrações do composto. A viabilidade celular foi avaliada após 2 horas de exposição (Figura 3a), ensaio agudo, e após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (ensaio crônico). Sendo este realizado de duas maneiras, apenas na presença de peróxido de hidrogênio (Figura 4aB), e simultaneamente na presença de 0,032% de DMSO (Figura 4aA), concentração esta equivalente a máxima testada dos flavonóides rutina e hesperidina. É importante ressaltar a relevância da adição simultânea do solvente. Essa foi definida após estudos prévios no laboratório em que foi constatado que o DMSO potencializa o efeito deletério do peróxido de

hidrogênio (Figuras 4aA e 4aB). Sendo o DMSO o solvente utilizado para obtenção da solução de flavonóides, fez-se necessário a adição do mesmo de forma a minimizar a interferência deste nos ensaios de avaliação da capacidade citoprotetora dos flavonóides testados.

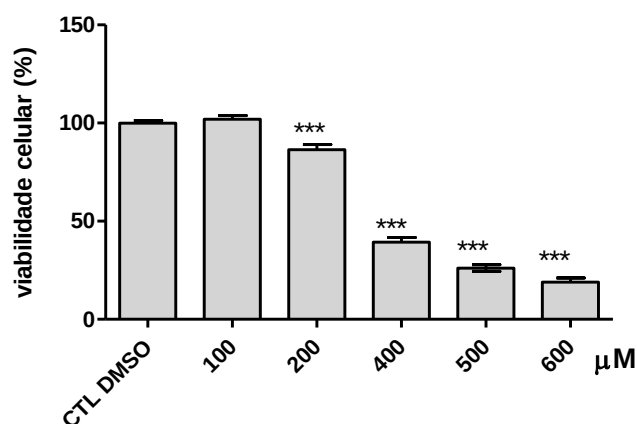


Figura 3a- Avaliação da viabilidade celular na presença de peróxido de hidrogênio – Ensaio agudo. Células BRIN-BD11 (3×10^5 células/poço) permaneceram por 2 horas / 37°C / 5% CO_2 na presença de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio e de 0,032% de DMSO. Os dados são representativos de 4 experimentos independentes com $n = 16$. *** $p < 0,001$ diferença estatisticamente significativa em relação ao controle DMSO = CTL DMSO (ausência de peróxido de hidrogênio e presença de 0,032% de DMSO). Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média e analisados por análise de variância ANOVA ($p < 0,05$).

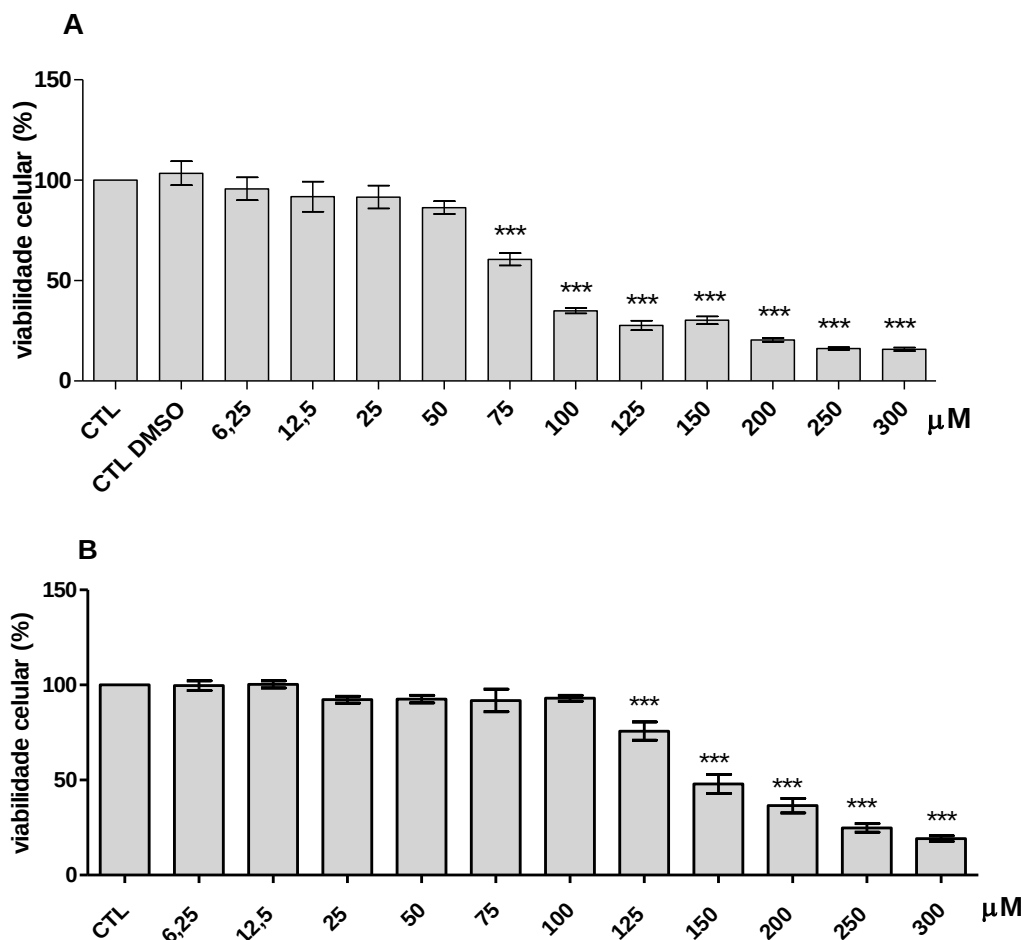


Figura 4a – Avaliação da viabilidade celular na presença de peróxido de hidrogênio – Ensaio crônico. **(A)** Células BRIN-BD11($1,5 \times 10^5$ células/poço) permaneceram por 24 horas / 37°C / 5% CO₂ na presença de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio e de 0,032% de DMSO. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes com $n = 12$. *** $p < 0,001$ diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (CTL). **(B)** Células BRIN-BD11($1,5 \times 10^5$ células/poço) foram cultivadas por 24 horas / 37°C / 5% CO₂ na presença de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (ausência de DMSO). Os dados são representativos de 5 experimentos independentes com $n \geq 6$. *** $p < 0,001$ diferença estatisticamente significativa em relação ao controle. Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média e analisados por análise de variância ANOVA ($p < 0,05$). CTL = controle (ausência de DMSO); CTL DMSO = controle DMSO (presença de 0,032% de DMSO).

A partir da curva de regressão linear, o IC₅₀ obtido para o peróxido de hidrogênio em células BRIN-BD11 foi de aproximadamente 350 μ M em duas horas (ensaio agudo) e 75 μ M para o ensaio em 24 horas (crônico). Este resultado não corroborou com o obtido por Michalska

et al. (2010), que afirmaram ser a dose de 88 μM de peróxido de hidrogênio sub-letal para as células BRIN-BD11 após 24 horas de exposição. Entretanto os autores não apresentaram uma curva de viabilidade na presença de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio, além de não mencionarem a adição do solvente utilizado para solubilização das drogas testadas nos ensaios de citoproteção, diferindo desta forma do nosso protocolo.

A adição do DMSO parece ser o principal fator que desencadeou a maior sensibilização das células BRIN-BD11 ao peróxido de hidrogênio, sendo que ao testarmos o efeito do peróxido de hidrogênio na ausência do DMSO (Figura 4aB) também verificamos que dose igual ou até superior a 88 μM ainda eram sub-letais após 24 horas de exposição, sendo verificado morte celular apenas a partir de 125 μM de peróxido. Kimoto et al. (2003), também verificaram uma significativa redução na viabilidade de células secretoras de insulina (linhagem MIN6 – derivada de camundongo), após 6 horas de exposição a 150 μM de peróxido de hidrogênio, sendo a viabilidade celular reduzida para 29,3%. Esses resultados comprovam a citotoxicidade do peróxido de hidrogênio, uma das principais espécies reativas de oxigênio geradas em situações de hiperglicemia e hiperlipidemia, sobre células secretoras de insulina, podendo ser a utilização deste *in vitro* um bom modelo de indução de estresse oxidativo, e assim ser empregado como ferramenta para avaliação da capacidade antioxidante e citoprotetora de diferentes compostos.

Avaliação do efeito citoprotetor dos flavonóides rutina e hesperidina

Vários estudos demonstram o efeito citoprotetor de diferentes flavonóides sobre células secretoras de insulina. Xiong et al. (2006), verificaram efeito citoprotetor do pré-tratamento por 48 horas com diferentes concentrações do flavonóide puerarina (10, 50 e 100

μM) em ilhotas pancreáticas expostas posteriormente ao peróxido de hidrogênio ($500 \mu\text{M}$) por duas horas, sendo observados efeitos positivos (protetor) do flavonóide através da redução da morte celular (taxa de apoptose). Entretanto, como é possível evidenciar na figura 5a os flavonóides rutina (Figura 5aA) e hesperidina (Figura 5aB) não demonstraram efeitos citoprotetores em células BRIN-BD11 nas concentrações testadas frente ao estresse simultâneo causado pelo peróxido de hidrogênio (CTL H_2O_2 $75 \mu\text{M}$).

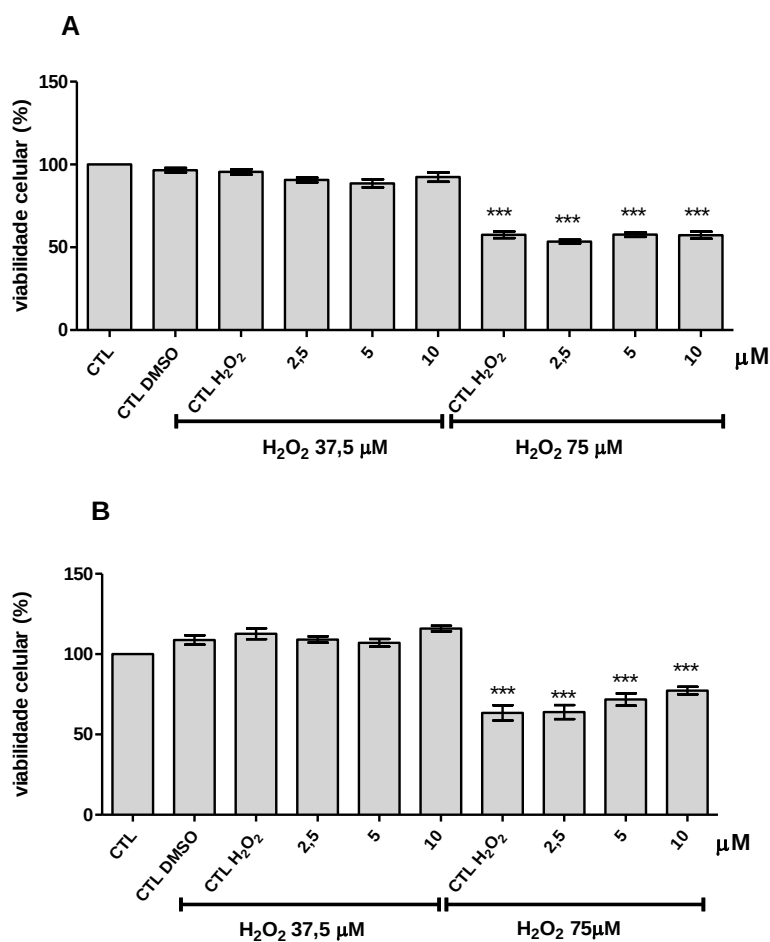


Figura 5a – Avaliação do efeito citoprotetor dos flavonóides Rutina e Hesperidina. Células BRIN-BD11 ($1,5 \times 10^5$ células/poço) foram cultivadas por 24 horas/ $37^\circ\text{C}/5\%$ CO_2 na ausência ou presença de duas concentrações de peróxido de hidrogênio - sub-letal ($37,5 \mu\text{M}$) e letal ($75 \mu\text{M}$) - e dos flavonóides rutina (A) e hesperidina (B) nas seguintes concentrações: 2,5; 5; 10 μM . Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média e analisados por análise de variância ANOVA ($p < 0,05$). Os dados são representativos de 2 experimentos independentes com $n \geq 7$. *** $p < 0,001$ diferença estatisticamente significativa em relação ao controle. CTL= controle (ausência de DMSO); CTL DMSO = controle DMSO (0,032% de DMSO).

Estudos recentes demonstram efeito citoprotetor dos flavonóides sobre células submetidas a estresse oxidativo (CHEN et al., 2010b; ECHEVERRY et al., 2010). Entretanto, na grande maioria deles foi realizado o pré-tratamento com os flavonóides, antes da submissão das células a situação de estresse, demonstrando desta forma uma eficiência preventiva dos flavonóides. Desse modo, uma provável explicação para a ausência de citoproteção demonstrada pelos flavonóides rutina e hesperidina sobre células BRIN-BD11, pode advir do fato dos flavonóides terem sido adicionados simultaneamente ao peróxido de hidrogênio, e talvez esse seja um ponto crucial para a ação dos mesmos. Nessa situação simultânea, os flavonóides rutina e hesperidina podem estar sendo rapidamente comprometidos na neutralização direta das moléculas de peróxido de hidrogênio. A partir dos nossos resultados, foi possível verificar que este efeito parece ser insuficiente na proteção, além de possivelmente diminuir a disponibilidade dos mesmos para estimulação de defesas celulares, como por exemplo, aumento da expressão e ou atividade de enzimas antioxidantes. Uma segunda hipótese que pode contribuir para o ocorrido é a concentração de flavonóide utilizada no ensaio. As células pancreáticas são caracterizadas pela baixa atividade e expressão de enzimas antioxidantes (LENZEN; DRINKGERN; TIEDGE, 1996), sendo assim é provável que as concentrações utilizadas dos flavonóides para os ensaios não tenham sido suficientes para promover significativa neutralização do agente oxidante, portanto, uma ação *scavenger* limitada pela concentração. Em suma, é possível que os flavonóides tenham agido para neutralizar o peróxido de hidrogênio, contudo a quantidade utilizada pode não ter sido suficiente para que todo o peróxido fosse impedido de causar danos celulares. Além disso, sendo todo, ou grande parte, do suprimento de flavonóide recrutado para esta neutralização

não houve a possibilidade deste agir sobre as células de modo a estimular as defesas antioxidantes, prevalecendo os danos causados pelo peróxido de hidrogênio, observados pela redução da viabilidade celular.

Sendo assim, possivelmente uma exposição prévia das células ao flavonóide antes de submetê-las ao estresse oxidativo possa apresentar uma ação mais efetiva, reforçando assim um caráter preventivo dos flavonóides como agentes citoprotetores, devendo ser consumido de forma a garantir uma melhora da capacidade protetora celular frente a eventuais situações que conduzam ao estresse oxidativo. Assim o consumo destes flavonóides, tais como a rutina e a hesperidina, quando as células já se encontram sob estresse oxidativo parece não ser eficiente. Além disso, destaca-se a importância da dose utilizada destes compostos, sendo provável que células já expostas ao estresse oxidativo necessitem de doses maiores para que se possa obter um efeito citoprotetor significativo.

Efeito citoprotetor do pré-tratamento com os flavonóides rutina e hesperidina

Diversos estudos têm demonstrado efeitos positivos do pré-tratamento com flavonóides em diferentes tipos celulares. Como por exemplo, os estudos conduzidos por Gong et al. (2010) em que foi realizado o pré-tratamento por 2 horas de células endoteliais humanas (isoladas do cordão umbilical) com rutina (20, 50 e 100 μM) e em seguida expostas a 200 μM de peróxido de hidrogênio (12 horas), sendo que a rutina promoveu um aumento significativo da viabilidade celular nas concentrações de 50 e 100 μM . Kim et al. (2007) também obteve citoproteção de um modo dose-dependente em células secretoras de insulina (RINm5f) através do pré-tratamento por 3 horas com o flavonóide genisteína (5, 10, 20 e 40 μM), sendo estas células submetidas a citocinas por adicionais 48 horas. Nos trabalhos realizados por

Xiong et al. (2006) também são relatados efeitos benéficos, como por exemplo, a diminuição da apoptose e aumento da atividade de enzimas antioxidantes no pré-tratamento por 48 horas com o flavonóide puerarina (10, 50 e 100 μM), em ilhotas pancreáticas de ratos Wistar submetidas ao estresse oxidativo induzido pela exposição a 500 μM de peróxido de hidrogênio (concentração que inibe aproximadamente 50% da viabilidade celular) por 2 horas.

Contudo, como é possível notar na figura 6a, não encontramos efeitos citoprotetores no pré-tratamento por 24 horas com os flavonóides rutina e hesperidina (10 μM) em células secretoras de insulina (BRIN-BD11) expostas por adicionais 2 horas a 350 μM de peróxido de hidrogênio (concentração que inibe aproximadamente 50% da viabilidade celular).

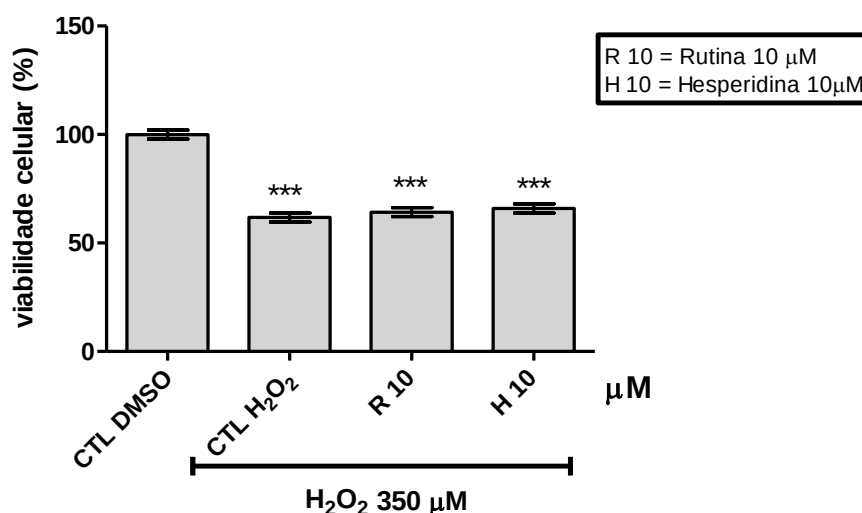


Figura 6a- Avaliação do efeito citoprotetor do pré-tratamento com os flavonóides Rutina e Hesperidina. Células BRIN-BD11 ($1,5 \times 10^5$ células/poço) foram cultivadas por 24 horas/ 37°C/ 5%CO₂ na ausência ou presença de 10 μM dos flavonóides rutina ou hesperidina. Após o tratamento com os flavonóides as células foram submetidas a estresse oxidativo por 2 horas de exposição ao peróxido de hidrogênio (350 μM). Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média e analisados por análise de variância ANOVA ($p < 0,05$). Os dados são representativos de 2 experimentos independentes com $n \geq 7$. *** $p < 0,001$ diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle DMSO = CTL DMSO (presença de 0,032% de DMSO)

É possível que a concentração utilizada em nossos ensaios não tenha sido suficiente para impedir a ação tóxica do peróxido de hidrogênio, sendo provável que aumentando a

concentração se potencialize o efeito antioxidante dos flavonóides. Desse modo, o efeito citoprotetor em nossos ensaios de pré-tratamento, mais uma vez, pode ter sido limitado pela concentração não havendo uma quantidade suficiente de flavonóide para uma ação efetiva, por exemplo, sobre enzimas antioxidantes, melhorando a capacidade das células BRIN-BD11 de reagir contra os danos causados pelo peróxido de hidrogênio. Como citado anteriormente estas células são caracterizadas por apresentarem baixos níveis de expressão e atividade de enzimas antioxidantes (LENZEN; DRINKGERN; TIEDGE, 1996). É possível que os flavonóides rutina e hesperidina no pré-tratamento tenham atuado sobre as enzimas antioxidantes, entretanto a concentração não foi suficiente não apresentando efeito significativo. Em síntese, são necessários novos experimentos em concentrações mais elevadas dos flavonóides rutina e hesperidina, respeitando-se os limites de citotoxicidade, para que se possa otimizar os efeitos citoprotetores dos mesmos, além de estabelecer a dose ideal para uma ação efetiva.

Determinação da secreção de insulina na presença dos flavonóides rutina e hesperidina

O hormônio insulina é o principal regulador da homeostase da glicose em condições fisiológicas, promovendo a captação, armazenamento e rápida utilização deste açúcar por praticamente todos os tecidos, principalmente os músculos, tecido adiposo e fígado (OLIVEIRA, 2003). Desse modo compostos que atuem de forma positiva sobre a secreção de insulina podem ser úteis na manutenção da normoglicemia e possivelmente na prevenção e/ou tratamento do diabetes mellitus.

Alguns flavonóides sabidamente apresentam ação insulínica. Um dos principais exemplos é a genisteína, flavonóide derivado da soja, que apresenta ação dose-dependente

sobre a secreção de insulina induzida por glicose. Essa ação foi verificada tanto sobre linhagens celulares (INS-1 e MIN6) quanto sob ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos. Esse efeito insulínico da genisteína é atribuído ao aumento da concentração intracelular de AMPc e conseqüente ativação da PKA (proteína quinase A) (LIU et al., 2006).

A avaliação da secreção de insulina nas células BRIN-BD11 foi determinada por radioimunoensaio, após exposição das células por 24 horas a diferentes concentrações dos flavonóides isolados rutina e hesperidina em meio de cultura contendo 11,1 mM de glicose. Neste ensaio observou-se que não ocorreu alteração na secreção de insulina, já que não houve diferença estatística entre a secreção verificada nas células controle (CTL) e os grupos expostos aos flavonóides (Figura 7aA e 7aB).

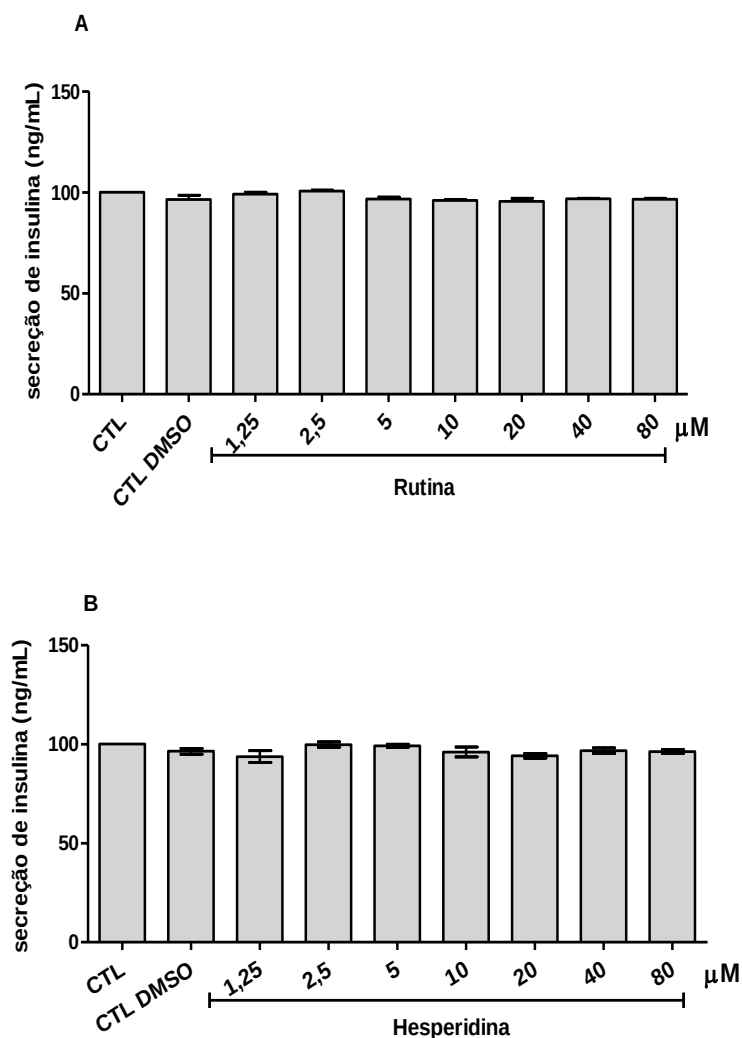


Figura 7a – Avaliação do efeito dos flavonóides Rutina e Hesperidina na secreção de insulina. Células BRIN-BD11 ($1,5 \times 10^5$ células/poço) foram cultivadas por 24 horas/ 37°C/ 5% CO₂ na ausência ou presença de diferentes concentrações (1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40; 80 µM) de rutina (**A**) e hesperidina (**B**). Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média e analisados por análise de variância ANOVA ($P < 0,05$). Os dados são representativos de 1 (rutina) ou 2 (hesperidina) experimentos independentes com $n = 8$. CTL = controle (ausência de DMSO); CTL DMSO = controle DMSO (presença de 0,032% de DMSO).

Entretanto, ao contrário do que foi verificado em nossos ensaios *in vitro*, Akiyama et al. (2010) observaram um aumento dos níveis de insulina no soro de ratos Wistar com diabetes induzido por estreptozotocina após o tratamento com hesperidina (10 g/Kg) por 4 semanas, sendo a secreção de insulina superior a do grupo controle (não-diabético). Este resultado evidenciou não apenas um efeito citoprotetor, impedindo a queda da secreção de insulina

induzida pela estreptozotocina, quanto um efeito insulínico, potencializando a secreção basal de insulina. Além da hesperidina, a rutina (100 mg/Kg) também aumentou o nível de insulina no plasma de ratos com diabetes induzido por estreptozotocina em relação aos animais diabéticos sem tratamento com rutina. Contudo, ratos normais tratados com a mesma dose de rutina não apresentaram efeitos nos níveis de insulina no plasma (PRINCE; KAMALAKKANNAN, 2006). Este resultado evidencia o efeito citoprotetor da rutina, evitando a queda da secreção de insulina nos ratos tratados com estreptozotocina, entretanto, assim como verificado em nosso estudo, a rutina não apresentou efeito insulínico sobre células pancreáticas normais (ratos controle).

Como os flavonóides testados em nosso trabalho são glicosídicos, uma provável causa que pode explicar a diferença dos nossos resultados em comparação com estudos *in vivo*, vem do fato de que alguns trabalhos defendem a teoria de que estes flavonóides necessitam de modificações estruturais para tornarem-se mais ativos. No intestino, os flavonóides glicosídicos podem ser modificados para as formas aglicanas através de enzimas intestinais ou pela microflora e dessa forma são então absorvidos (WILLIAMSON et al., 2000; CRESPIY et al., 2003; MANACH et. al., 2005)

Muito pouco da rutina, por exemplo, é absorvida na sua forma intacta, sendo metabolizada pela microflora intestinal para compostos que são facilmente absorvidos (WINTER et al., 1989). Há indícios de que para a sua absorção a hesperidina deva ser convertida por beta-glicosidases secretadas pela microflora intestinal, para a forma de hesperitina (MANACH et al., 2003). Desse modo é possível que os flavonóides rutina e hesperidina na sua forma original não atuem eficientemente sobre a secreção de insulina em células BRIN-BD11 sendo necessárias modificações em sua estrutura que facilitarão sua

absorção e que os tornariam mais eficientes para atuarem sobre a secreção de insulina, assim como em outros processos celulares.

Contudo, é importante ressaltar que a questão da absorção intestinal de flavonóides glicosídicos ainda é um assunto muito controverso. Há estudos em humanos que demonstram que flavonóides nesta forma também podem ser eficientemente absorvidos. Hollman et al. (1995), por exemplo, apresentaram que a quercetina em sua forma glicosídica foi melhor absorvida (52%) do que em sua forma aglicana (24%). Neste estudo foi demonstrada também uma significativa absorção (17%) da quercetina rutinosídica (rutina).

Atividade da enzima glutathione peroxidase na presença dos flavonóides rutina e hesperidina

Para evitar o ataque de espécies reativas os organismos desenvolveram um sistema endógeno de defesa antioxidante. Um dos importantes componentes deste sistema é a enzima glutathione peroxidase (GSH-Px), uma das mais importantes defesas contra o ataque mediado por peróxidos orgânicos e peróxido de hidrogênio (VASCONCELOS et al., 2007).

É bem caracterizada a capacidade de flavonóides como sequestradores de espécies reativas e antioxidantes. Além disso, há evidências de que os flavonóides podem atuar aumentando o potencial de defesas antioxidantes endógenas, induzindo principalmente o aumento da atividade e/ou expressão de várias enzimas antioxidantes (MASELLA et al., 2005).

Em nosso estudo, avaliamos o efeito dos flavonóides rutina e hesperidina na atividade da enzima glutathione peroxidase em células BRIN-BD11, uma vez que um aumento na atividade desta enzima seria um indicativo da eficiência deste flavonóide na elevação da

capacidade antioxidante e de proteção das células secretoras de insulina. A partir da análise da figura 8a, é possível verificar que ambos os flavonóides não tiveram efeito sobre a atividade da GSH-Px, comparado ao grupo controle (ausência de flavonóide). Em ensaios realizados *in vivo*, Prince e Kamalakkannan (2006) observaram um aumento no pâncreas de ratos com diabetes mellitus induzido por estreptozotocina da atividade das enzimas antioxidantes SOD, catalase e GSH-Px após o tratamento dos animais com rutina (100 mg/Kg). A rutina, nessas condições, impediu a redução da atividade destas enzimas antioxidantes verificada nos animais diabéticos, entretanto não teve efeito sobre a atividade enzimática dos ratos normais.

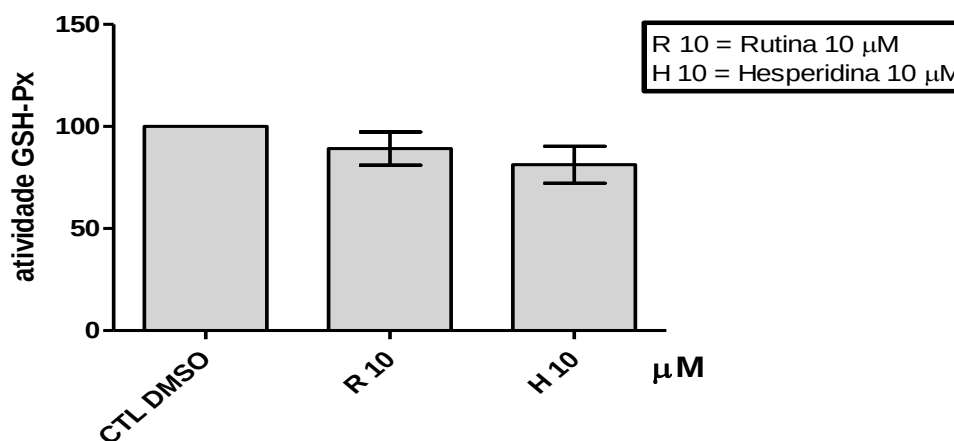


Figura 8a – Avaliação da atividade da enzima glutathiona peroxidase (GSH-Px) na presença dos flavonóides rutina (R) ou hesperidina (H) (10 μ M). Células BRIN-BD11 (5×10^5 células/poço) foram cultivadas em placas de 6 poços por 24 horas a 37°C / 5% CO₂. Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média e analisados por análise de variância ANOVA ($p < 0,05$). Os dados são representativos de 2 experimentos independentes com $n = 3$. CTL DMSO = controle DMSO

Assim como a rutina, a hesperidina também parece ter um efeito significativo na atividade de enzimas antioxidantes *in vivo*. Em um estudo realizado por Ibrahim (2008), a indução do diabetes mellitus por estreptozotocina, que sabidamente é acompanhada de estresse oxidativo, promoveu uma supressão da atividade das enzimas antioxidantes no cérebro dos ratos tratados com a droga. Já o tratamento dos ratos diabéticos com hesperidina (200

mg/Kg) restaurou a atividade das enzimas antioxidantes (glutathione peroxidase e superóxido dismutase).

Apesar de não ter sido verificado em nosso estudo, aumento da atividade da GSH-Px sobre células secretoras de insulina normais (BRIN-BD11), esse resultado não descarta a possibilidade dos flavonóides rutina e hesperidina terem efeito protetor em uma condição diferente, como por exemplo, em uma situação de estresse oxidativo induzido. Como mencionado anteriormente, alguns estudos evidenciaram efeito tanto da rutina como da hesperidina sobre a atividade da GSH-Px, entretanto nesses estudos, realizados *in vivo*, os animais e consequentemente suas células B foram submetidas a estresse oxidativo induzido por droga com o intuito de desenvolver diabetes. Sendo assim uma hipótese para explicar este efeito citoprotetor apresentado pelos flavonóides em condição de estresse oxidativo seria a de que estes podem atuar indiretamente sobre as defesas antioxidantes endógenas. Estes atuariam prevenindo, mesmo que parcialmente, as espécies reativas de causarem danos oxidativos nas células pela neutralização destes agentes oxidantes e desta forma prevenindo o comprometimento das biomoléculas, entre elas as próprias enzimas antioxidantes pré-formadas. Sendo assim, os flavonóides rutina e hesperidina, assim como verificado em nosso estudo, não teriam um efeito preventivo, ou seja, agindo de forma a potencializar a capacidade antioxidante celular a partir do aumento da atividade e/ou expressão das enzimas antioxidantes, mas parecem ter um efeito direto de neutralização de agentes oxidantes (espécies reativas) e desta forma prevenindo danos, entre eles a redução das defesas enzimáticas em geral verificada quando a célula é exposta a condições de estresse oxidativo.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES.

Referências Bibliográficas

As referências citadas neste capítulo estão listadas ao final da dissertação em um único tópico com todas as demais referências.

5 Considerações finais

Apesar de apresentarem baixa toxicidade, os flavonóides rutina e hesperidina nas condições testadas não apresentaram significativo efeito na citoproteção das células secretoras de insulina em condições normais ou quando submetidas a estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio. Além disso, apesar de vários indícios de efeitos insulínotropicos de flavonóides, a rutina e a hesperidina também não tiveram efeito sobre a secreção de insulina em células BRIN-BD11. Entretanto, em muitos estudos verifica-se efeito citoprotetor e insulínotropico de flavonóides apenas em condições de exposição das células ou organismos a situação de estresse oxidativo. Desse modo, futuros experimentos são necessários para elucidar os possíveis efeitos dos flavonóides rutina e hesperidina em condições de estresse, assim como para determinar o provável mecanismo de ação destes compostos, além de avaliar sua eficiência como possíveis agentes antidiabéticos.

6 Referências Bibliográficas

- AFANAS'EV, J. B. et al. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. **Biochemical Pharmacology**, v.38, p.1763 - 1769, 1989.
- AHERNE, S.; O'BRIEN, N. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. **Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 75-81, 2002.
- AKIYAMA, S. et al. Dietary hesperidin exerts hypoglycemic and hypolipidemic effects in streptozotocin-induced marginal type 1 diabetic rats. **J. Clin. Biochem. Nutr.**, v. 46, p. 87-92, 2010.
- BAE, E. A. et al. In vitro inhibitory effect of some flavonoids on rotavirus infectivity. **Biol Pharm Bull**, v. 23, p. 1122-4, 2000.
- BAGUST, A.; BEALE, S. Deteriorating beta-cell function in type 2 diabetes: a long-term model. **QJM**, v. 96, n. 4, p. 281-8, 2003.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- 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. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v. 53, n. 5, p. 646-656, 2009.
- BECHO, J. R. M.; MACHADO, H.; GUERRA, M. O. Rutina – estrutura, metabolismo e potencial farmacológico. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 1, n. 1, p. 21-25, 2009.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.
- BONDAN, C. **Perfil oxidativo de eritrócitos de bovinos intoxicados por *Senecio sp.*** 2006, 65f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.
- CALABRÓ, M. L. et al. The rutin/-cyclodextrin interactions in fully aqueous solution: spectroscopic studies and biological assays. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, p. 1019-1027, 2005.
- CALTAGIRONE, S. et al. Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. **Int J Cancer**, v. 87, p. 595-600, 2000.

CAO, G. et al. Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruits and vegetables. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, p. 1081-1087, 1998.

CERIELLO, A. Acute hyperglycaemia and oxidative stress generation. **Diabet Med.**, v. 14, p. 45-49, 1997.

CHEN, M. et al. Hesperidin upregulates heme oxygenase-1 to attenuate hydrogen peroxide-induced cell damage in hepatic L02 Cells. **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, p. 3330-3335, 2010a.

CHEN, M. et al. Protective effects of hesperidin against oxidative stress of tert-butyl hydroperoxide in human hepatocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 2980-2987, 2010b.

CHIHUAULAF, R. H.; CONTRERAS, P. A.; WITTEWER, F. G. Pathogenesis of oxidative stress: consequences and evaluation in animal health. **Vet. Méx.**, v. 33, n. 3, p. 265-283, 2002.

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

COS, P. et al. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. **J Nat Prod**, v. 61, p. 71-6, 1998.

CRESPY, V. et al. The splanchnic metabolism of flavonoids highly differed according to the nature of the compound. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 284, n. 6, p. G980-8, 2003.

D'ARCHIVIO, M. et al. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Ann Ist Super Sanita**, v. 43, n. 4, p. 348-361, 2007.

DECKER, E. A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? **Nutrition Reviews**, v. 55, n. 11, p. 396-407, 1997.

DÉCOURT, L. V. Padrão genético do homem do paleolítico e condições atuais: uma discordância nociva. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 52, n. 6, p. 297-300, 1989.

DIAS, A. S. **O antioxidante quercetina diminui o estresse oxidativo hepático em ratos diabéticos**. 2005, 111f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Fisiologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

Disponível em: <http://www.scielo.sa.cr/img/fbpe/rcc/v8n1/3213i1.jpg>. Acesso em 01/12/2010.

DOVAL, H. C. La selección genética programo nuestra alimentación ¿Deberíamos volver a comida del hombre del Paleolítico? **Rev.Argentina Cardiol.**, v. 73, n. 3, p. 244-248, 2005.

DRÖGE, W. Oxidative enhancement of insulin receptor signaling: Experimental findings and clinical implications. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 7, n. 7 e 8, p. 1071-1077, 2005.

EATON, S. B.; EATON III, S. B.; KONNER, M. J. Review Paleolithic nutrition revisited: A twelve year retrospective on its nature and implications. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 51, n. 4, p. 207-216, 1997.

EATON, S. B.; KONNER, M.; SHOSTAK, M. Stone agers in the fast lane: chronic degenerative diseases in evolutionary perspective. **Am. J. Med.**, v. 84, n. 4, p. 739-749, 1988.

ECHEVERRY, C. et al. Pretreatment with natural flavones and neuronal cell survival after oxidative stress: a structure-activity relationship study. **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, n. 4, p. 2111-5, 2010.

EMIN, J. A.; OLIVEIRA, A. B.; LAPA, A. J. Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids dauricin and clausquinone in rats and mice. **J. Pharm Pharmacol.**, v. 46, p. 118-122, 1994.

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

FERNANDES, A. A. et al. Influence of rutin treatment on biochemical alterations in experimental diabetes. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 64, p. 214-219, 2010.

FERNANDES, A. P. M. et al. Fatores imunogenéticos associados ao diabetes mellitus do tipo 1. **Rev Latino-am Enfermagem**, v. 13, n. 5, p. 743-9, 2005.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil**, v. 43, n. 1, p. 61-8, 1997.

FERRIS, C. D. et al. Haem oxygenase-1 prevents cell death by regulating cellular iron. **Nat. Cell Biol.**, v. 1, p. 152-257, 1999.

FOTSIS, T.; PEPPER, M. S.; AKTAS, E. Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. **Cancer Res.**, v. 57, p. 2916-21, 1997.

FRIESENECKER, B.; TSAI, A. G.; INTAGLIETTA, M. Cellular basis of inflammation, edema and the activity of daflon 500 mg. **Int J Microcirc Clin Exp**, v. 5 (supp1), p.17-21, 1995.

GARG, A. et al. Chemistry and Pharmacology of the Citrus Bioflavonoid Hesperidin. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 655-669, 2001.

GEY, K. F. Vitamins E plus C and interacting conutrients required for optimal health. **Biofactors**, v. 7, n. 1/2, p. 113-174, 1998.

GONG, G. Rutin inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis through regulating reactive oxygen species mediated mitochondrial dysfunction pathway in human umbilical vein endothelial cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 628, p. 27-35, 2010.

GORINSTEIN, S. et al. Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. **Food Chemistry**, v. 74, p. 309-15, 2001.

GROOT, H.; RAUEN, U. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 12, p. 249–55, 1998.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 9 edição. Rio de Janeiro: Guanabara & Koogan, 1997. 1014p.

HABER, E. et al. Secreção de insulina: Efeito autócrino da insulina e modulação por ácidos graxos. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 45, n. 3, p. 219-227, 2001.

HALLIWELL, B. Antioxidant characterization; methodology and mechanism. **Biochem Pharmacol**, v. 49, n. 10, p. 1341-8, 1995a.

HALLIWELL, B. et al. The characterization on antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 7, p. 601-617, 1995b.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants and human disease: Curiosity, cause or consequence. **Lancet**, v. 344, p. 721-724, 1994.

HALLIWELL, B.; CLEMENT, M. V.; LONG, L. H. Hydrogen peroxide in the human body. **FEBS Lett**, v. 486, p. 10-13, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4 edition, Oxford University Press, 2007. 704p.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3 edition. Oxford: Clarendon Press, 1999.

HARA, Y. et al. The reduction of hypoxia-induced and reoxygenation induced apoptosis in rat islets by epigallocatechin gallate. **Transplant Proc**, v. 38, n. 8, p. 2722–5, 2006.

HIRATA, Y. et al. Kinetics of radical-scavenging activity of hesperetin and hesperidin and their inhibitory activity on COX-2 expression. **Anticancer Res**, v. 25, p. 3367–3374, 2005.

HOLLMAN, P. C. H. et al. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 62, p. 1276-82, 1995.

HOLLMAN, P.C.; KATAN, M.B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 937-942, 1999.

HUMMEL, K. P.; DICKIE, M. W.; COLEMAN, D. L. Diabetes, new mutation in the mouse. **Science**, v. 153, p. 1127-1128, 1966.

IBRAHIM, S. S. Protective effect of hesperidin, a Citrus bioflavonoid, on diabetes-induced brain damage in rats. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 4, n. 1, p. 84-95, 2008.

JAYAPRAKASAM, B. et al. Insulin secretion by bioactive anthocyanins and anthocyanidins present in fruits. **J Agric Food Chem**, v. 53, n. 1, p. 28–31, 2005.

JUNG, U. J. et al. Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type-2 diabetic mice. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 38, p. 1134-1145, 2006.

JUNG, U. J. et al. The hypoglycemic effects of hesperidin and naringin are partly mediated by hepatic glucose-regulating enzymes in C57BL/KsJ-db/db mice. **The Journal of Nutrition**, v. 134, p. 2499-2503, 2004.

KALPANA, K. B.; SRINIVASAN, M.; MENON, V. P. et al. Investigation of the radioprotective efficacy of hesperidin against gamma-radiation-induced cellular damage in cultured human peripheral blood lymphocytes. **Mutat. Res**, v. 676, p. 54–61, 2009.

KAUL, T. N.; MIDDLETON JUNIOR, E.; OGRA, P. L. Antiviral effect of flavonoids on human viruses. **J Med Virol**, v. 15, p. 71-9, 1985.

KIM, E. et al. Genistein protects pancreatic β cells against cytokine-mediated toxicity. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 278, p. 18-28, 2007.

KIMOTO, K. et al. Gliclazide protects pancreatic b-cells from damage by hydrogen peroxide. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 303, p. 112–119, 2003.

KING, H.; AUBERT, R. E.; HERMAN, W. H. Global burden of diabetes, 1995-2025. **Diabetes Care**, v. 21, p. 1414- 1431, 1998.

LEITE, H. P.; SARNI, R. S. Resumo Radicais livres, anti-oxidantes e nutrição. **Rev Bras Nutr Clin**, v. 18, n. 2, p. 87-94, 2003.

LENZEN, S.; DRINKGERN, J.; TIEDGE, M. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. **Free Radic Biol Med**, v. 3, p. 463-466, 1996.

LIU, D. et al. Genistein acutely stimulates insulin secretion in pancreatic B-cells through a cAMP-dependent protein kinase pathway. **Diabetes**, v. 55, p. 1043-1050, 2006.

LIU, E.; EISENBARTH, G. S. Type 1 A diabetes mellitus-associated autoimmunity. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 31, p. 391-410, 2002.

LIU, R. H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism action. **J Nutr.**, v. 134, p. 3479S-3485S, 2004.

LOPES, J. P.; OLIVEIRA, S. M.; FORTUNATO, J. S. Stress oxidativo e seus efeitos na insulino-resistência e disfunção das células β -pancreáticas. **Acta Med Port.**, v. 21, n. 3, p. 293-302, 2008.

MAJUMDAR, S.; SRIRANGAM, R. Solubility, stability, physicochemical characteristics and in vitro ocular tissue permeability of hesperidin: a natural bioflavonoid. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 5, p. 1217-1225, 2009.

MALERBI, D. A.; FRANCO, L. J. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 Yr. **Diabetes Care**, v. 15, p. 1509-1516, 1992.

MANACH, C. et al. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. **Am J Clin Nutr**, v. 81 (Suppl1), p. 230S-42S, 2005.

MANACH, C. et al. Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 57, p. 235-242, 2003.

MANACH, C. et al. Bioavailability of rutin and quercetin in rats. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 409, p. 12-16, 1997.

MARCARINI, J. C. et al. Investigation of cytotoxic, apoptosis-inducing, genotoxic and protective effects of the flavonoid rutin in HTC hepatic cells. **Experimental and Toxicologic Pathology**, article in press., 2010.

MASELLA, R. et. al. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, p. 577-586, 2005.

MATSUDA, T. et. al. Silymarin protects pancreatic beta-cells against cytokine-mediated toxicity: implication of c-Jun NH2-terminal kinase and janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathways. **Endocrinology**, v. 146, n. 1, p. 175-85, 2005.

MAULUDIN, R.; MÜLLER, R. H.; KECK, C. M. Kinetic solubility and dissolution velocity of rutin nanocrystals. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 36, p. 502-510, 2009.

McGARRY, J. D. Disordered metabolism in diabetes: Have we underemphasized the fat component? **Journal of cellular biochemistry**, v. 55, p. 29-38, 1994.

McKILLOP, A. M. et al. Secretion of glycated insulin from pancreatic beta-cells in diabetes represents a novel aspect of beta-cell dysfunction and glucose toxicity. **Diabetes Metab**, v. 28, n. 3, p. S61-69, 2002.

MICHALSKA, M. et al. The effects of pharmacologic inhibition of NADPH oxidase or iNOS on proinflammatory cytokine, palmitic acid or H₂O₂-induced mouse islet or clonal pancreatic beta cell dysfunction. **Biosci. Rep.**, v. 30, p. 445-53, 2010.

MIDDLETON, E. J. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. **Adv Exp Med Biol**, v. 439, p. 175-82, 1998.

MORGAN, C. R.; LAZAROW, A. Immunoassay of insulin: two antibodies system: plasma insulin levels of normal, subdiabetic and diabetic rats. **Diabetes**, v. 12, p. 115-121, 1963.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunology**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MUOIO, D. M.; NEWGARD, C. B. Obesity-related derangements in metabolic regulation. **Annu Rev Biochem**, v. 75, p. 367-40, 2006.

NAKAZAKI, M. et al. Involvement of ATP sensitive K^+ channels in free radical mediated inhibition of insulin secretion in rat pancreatic β - cell. **Diabetes**, v. 44, p. 878-883, 1995.

NEWGARD, C. B.; MCGARRY, J. D. Metabolic coupling factors in pancreatic B-cell signal transduction. **Annu Rev Biochem**, v. 45, p. 689-719, 1995.

NIJVELDT, R. J. et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **Am J Clin Nutr**, v. 74, p. 418-25, 2001.

NORIEGA-LOPEZ, L. et al. Pancreatic insulin secretion in rats fed a soy protein high fat diet depends on the interaction between the amino acid pattern and isoflavones. **J Biol Chem**, v. 282, n. 28, p. 20657-66, 2007.

ODIN, A. P. Vitamins as antimutagens: advantages and some possible mechanisms of antimutagenic action. **Mutation Research**, v. 386, n. 1, p. 39-67, 1997.

OLIVEIRA, H. R. et. al. Pancreatic beta-cells express phagocyte-like NAD(P)H oxidase. **Diabetes**, v. 52, n. 6, p. 1457-63, 2003.

OLIVEIRA, H. R. **Produção de espécies reativas de oxigênio e expressão da enzima NAD(P)H oxidase em ilhotas**. 2003, 153f. Tese (Doutorado em Ciências: Fisiologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

PAPER, D. H. Natural products as angiogenesis inhibitors. **Planta Med.**, v. 64, p. 686-95, 1998.

PEDRIALI, C. A. **Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes**. 2005, 127f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

PEÑA, M.; BACALLAO, J. La obesidad y sus tendencias en la región. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 10, p. 75-78, 2001.

PINENT, M. et al. Bioactivity of flavonoids on insulin-secreting cells. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 7, p. 299-308, 2008.

POITOUT, V.; ROBERTSON, R. P. Minireview: secondary beta-cell failure in type 2 diabetes: a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. **Endocrinology**, v. 143, p. 339-42, 2002.

POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. **International Journal of Vitamin and Nutrition Research**, v. 67, n. 5, p. 289-297, 1997.

PRADEEP, K.; PARK, S. H.; KO, K. C. Hesperidin a flavanoglycone protects against γ -irradiation induced hepatocellular damage and oxidative stress in Sprague-Dawley rats. **Eur. J. Pharmacol.** v. 587, p. 273-280, 2008.

PRINCE, P. S. M.; KAMALAKKANNAN, N. Rutin improves glucose homeostasis in streptozotocin and gluconeogenic enzymes. **J Biochem Molecular Toxicology**, v. 20, n. 2, 2006.

PUPO, A. A.; MARREIRO, D. Dosage of insulin levels using radioimmunoassay with doubleantibodies. **AMB Rev Assoc Med Bras**, v. 16, p. 153-156, 1970.

RADONS, J. et al. Nitric oxide toxicity in islets cells involves poly ADP- ribose polymerase activation an concomitant NAD^+ depletion. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v. 199, p. 1270-1277, 1994.

ROCHA, F. D. et al. Diabetes mellitus e estresse oxidativo: produtos naturais como alvo de novos modelos terapêuticos. **Rev. Bras. Farm.**, v. 87, n. 2, p. 49-54, 2006.

RÖSEN, P. et al. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 17, p. 189-212, 2001.

ROVER JÚNIOR, L. et al. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathione associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quim. Nova**, v. 24, n.1, p.112-119, 2001.

SARTORELLI, D. S.; FRANCO, L. J. Tendências do diabetes mellitus no Brasil: o papel da transição nutricional. **Cad. Saúde Pública**, v.19 (Sup.1), p. S29-S36, 2003.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **The Journal of Nutrition**, p. 2072S-2085S, 2000.

SHOSKES, D. A. Effect of bioflavonoids quercetin and curcumin on ischemic renal injury: a new class of renoprotective agents. **Transplantation**, v. 66, p. 147-52, 1998.

SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **Am J Med**, v. 91, p. 31S-81S, 1991.

SIES, H.; MURPHY, M. E. The role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage. **Photochemistry and Photobiology**, n. 8, p. 211–224, 1991.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, b-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 62, p. 1315-1321, 1995.

SRINIVASAN, K.; KAUL, C. L.; RAMARAO, P. Partial protective effect of rutin on multiple low dose streptozotocin-induced diabetes in mice. **Indian J Pharmacol**, v. 37, n. 5, 2005.

STEFANI, E. D.; BOFFETTA, P.; DENEIO-PELLEGRINI, H. Dietary antioxidants and lung cancer risk: a case-control study in Uruguay. **Nutr. Cancer**, v. 34, p. 100–10, 1999.

TIWARI, A. K.; RAO, J. M. Diabetes mellitus and multiple therapeutic approaches of phytochemicals: present status and future prospects. **Current Science**, v. 83, n. 1, p. 30-38, 2002.

TREVISAN, R. **Marcadores de estresse oxidativo e outros parâmetros biológicos em peixes e bivalves como ferramentas de monitoramento ambiental: análise de dois ecossistemas catarinenses**. 2008, 70f. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VAN ACKER et al. A quantum chemical explanation of the antioxidant activity of flavonoids. **Chemical Research in Toxicology**, v. 9, p. 1305-1312, 1996.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim. Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

WATANABE, M. et al. Histologic distribution of insulin and glucagon receptors. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, p. 243-256, 1998.

WEFERS, H.; SIES, H. The protection by ascorbate and glutathione against microsomal lipid peroxidation is dependent on vitamin E. **European Journal of Biochemistry**, n. 174, p. 353–357, 1988.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v. 3, p. 325-339, 1978.

WILD, S. et al. Global prevalence of diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, n. 5, p. 1047-1053, 2004.

WILLIAMSON, G. et al. Human metabolic pathways of dietary flavonoids and cinnamates. **Biochem Soc Trans**, v. 28, n. 2, p. 16–22, 2000.

WINTER, J. et al. C-Ring cleavage of flavonoids by human intestinal bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 1203–1208, 1989.

WOO, K.; JEONG, R. B.; HAWES, C. M. Flavonoids: from cell cycle regulation to biotechnology. **R Biotech Lett**, v. 27, p. 365–74, 2005.

XIONG, F. et al. Puerarin protects rat pancreatic islets from damage by hydrogen peroxide. **Eur J Pharmacol**, v. 529, p. 1–7, 2006.

YANG, J.; GUO, J.; YUAN, J. In vitro antioxidant properties of rutin. **LWT**, v. 41, p. 1060-1066, 2008.

ZIMMET, P.; ALBERTI, K. G. M. M.; SHAW, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature**, v. 414, p. 782-787, 2001.