

---

*Katiucha Karolina Honório Ribeiro Rocha*

*Efeitos da administração do resveratrol,  
antioxidante natural da uva, sobre perfil lipídico  
sérico, estresse oxidativo sérico e hepático de ratos  
normais e hiperlipidêmicos*

*Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Ciências Biológicas,  
área de concentração Farmacologia,  
do Instituto de Biociências  
UNESP, Botucatu para  
obtenção do Título de Mestre*

*Orientadora: Professora Titular Dra Ethel Lourenzi Barbosa  
Novelli*

*Botucatu – SP  
2008*

---

---

# *SUMÁRIO*

---

---

## CONSIDERAÇÕES INICIAIS

INTRODUÇÃO.....	2
-----------------	---

### CAPÍTULO I

#### *Efeitos do resveratrol sobre parâmetros nutricionais e morfométricos em ratos alimentados com dieta rica em colesterol e sacarose*

ABSTRACT.....	11
RESUMO.....	12
INTRODUÇÃO.....	13
MATERIAL E MÉTODOS.....	16
RESULTADOS.....	20
DISCUSSÃO.....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

### CAPÍTULO II

#### *Perfil lipídico e estresse oxidativo sérico: ação do resveratrol em animais submetidos a ingestão de dieta hipercalórica*

ABSTRACT.....	51
RESUMO.....	52
INTRODUÇÃO.....	53
MATERIAL E MÉTODOS.....	56
RESULTADOS.....	59
DISCUSSÃO.....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

### CAPÍTULO III

#### *Modulação do metabolismo e estresse oxidativo hepáticos, pelo resveratrol, em animais alimentados com dieta hipercalórica*

ABSTRACT.....	80
RESUMO.....	81
INTRODUÇÃO.....	82
MATERIAL E MÉTODOS.....	84
RESULTADOS.....	87
DISCUSSÃO.....	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95

CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	102
---------------------------	-----

---

*CONSIDERAÇÕES  
INICIAIS*

---

## INTRODUÇÃO

Obesidade vem aumentando nos últimos anos na maioria das populações como resultado da ingestão de dietas inadequadas e estilo de vida sedentário. A obesidade abdominal está diretamente associada com anormalidades metabólicas como intolerância a glicose, resistência à insulina, hiperinsulinemia, dislipidemia e hipertensão, sintomas estes referentes à síndrome metabólica ou síndrome X (CHAMPE et al., 2007).

Dietas contendo elevadas concentrações de carboidratos e ácidos graxos saturados resultam em expansão do tecido adiposo (SLIGTE et al., 2004). O acúmulo de lipídios está relacionado com estresse oxidativo sistêmico em humanos e em ratos e constitui um importante mecanismo patogênico da obesidade (FURUKAWA et al., 2004).

Dieta hipercalórica induz diferentes alterações no metabolismo da glicose, podendo vir a modificar a composição de apolipoproteínas e elevar a concentração de triacilgliceróis (STROBL et al., 1989). A ingestão deste tipo de dieta aumenta a produção de radicais livres e o estresse oxidativo (BECKMAN & AMES, 1998).

O uso de oxigênio e o metabolismo oxidativo de nutrientes resultam na produção de radicais livres. Elevada ingestão de calorias diminui a fluidez da membrana mitocondrial aumentando a produção de radicais livres (ESPOSITO et al., 1999).

Os radicais livres compreendem átomos ou moléculas que têm orbitais contendo um ou mais elétrons desemparelhados, os quais podem ser altamente instáveis (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

O dano produzido pelos radicais livres nas biomoléculas tem sido associado com o risco elevado para o desenvolvimento de doenças crônicas, como câncer e doenças cardiovasculares (DROGE, 2002).

O desequilíbrio entre produção de oxidantes e defesas antioxidantes é denominado estresse oxidativo. Importantes fontes de estresse oxidativo

---

são espécies reativas de oxigênio (ERO) formadas pela redução incompleta de oxigênio na cadeia respiratória e sistemas de defesa dos indivíduos (NOVELLI, 2005).

As principais ERO envolvidas no estresse oxidativo são radical hidroxila, radical superóxido, radical hidroperoxil, peróxido de hidrogênio e oxigênio singlet (FERRARI, 2003).

As ERO estão associadas principalmente com a peroxidação lipídica que ocorre pela ação de um radical livre retirando um átomo de hidrogênio do ácido graxo insaturado de membranas ou organelas celulares com conseqüente formação de um radical lipídico. Durante a propagação, um radical lipídico reage com uma molécula de oxigênio resultando na formação de radical peroxila que é capaz de retirar um átomo de hidrogênio de um ácido graxo adjacente, formando o radical hidroperóxido de lipídio e propagando a reação em cadeia da lipoperoxidação (NOVELLI, 2005).

ERO e peroxidação lipídica causam danos diretos aos hepatócitos por provocar rompimento de membranas, proteínas e DNA (de KNEGT, 2001; DAY, 2002).

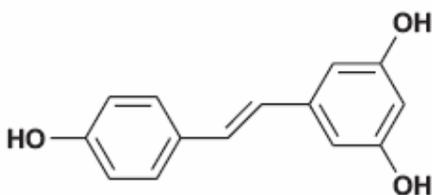
O organismo humano possui mecanismos de defesa endógenos contra a ação tóxica dos radicais livres, divididos basicamente em dois grupos: as enzimas de atividade antioxidante e os antioxidantes não-enzimáticos. Os primeiros correspondem principalmente às enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase. Os agentes antioxidantes não-enzimáticos compreendem as vitaminas C e E ( $\alpha$ -tocoferol) e peptídeos ativos representados por glutathione reduzida (GSH) (FERRARI et al., 1998).

Entretanto, as defesas endógenas podem não ser suficientes para impedir a ação deletéria de uma liberação elevada de radicais livres. Nessas condições, compostos da dieta, que podem atuar como antioxidantes, podem exercer efeitos benéficos, aumentando as defesas celulares contra o dano oxidativo (BENZIE et al., 2003). Portanto, há atualmente um grande

---

interesse na descoberta de substâncias naturais capazes de prevenir ou até reverter danos causados pelo estresse oxidativo.

O composto fenólico escolhido para o presente experimento foi o resveratrol (3,5,4' - trihidroxiestilbeno) (Esquema 1), fitoalexina natural, encontrado em 72 espécies de plantas (ACQUAVIVA et al., 2002). Resveratrol tem atraído interesse desde sua identificação em vinhos e sua relação com ingredientes ativos usados na medicina asiática tradicional *kojikon* para tratamento de hiperlipemia (ARICHI & KIMURA 1982).



**Esquema 1.** Estrutura da molécula de trans-resveratrol, utilizada na realização do presente trabalho (Soleas et al., 1997).

O resveratrol é sintetizado por diversos vegetais em resposta a condições adversas, como estresse, radiação UV e infecção por fungos (FLOREANI et al., 2003). Constitui um composto fenólico de *Vitis vinífera L* que possui diversos efeitos farmacológicos (OU et al., 2006), presente em uvas, amendoins e amoras (SOLEAS et al., 1997; WENZEL, 2005). Existe em duas formas isoméricas, cis e trans (STOJANOVIC, 2001). Devido à sensibilidade a luz, poucas são as informações sobre as propriedades do isômero cis-resveratrol (BASLY, 2000). O isômero trans é a forma mais estável do resveratrol e farmacologicamente ativa (MARRIER et al., 2002).

Resveratrol tem sido reportado como antioxidante (HUNG et al., 2000; LEONARD et al., 2003), inibidor de agregação plaquetária (KIMURA et al., 1985), cardioprotetor (MARRIER et al., 2002), inibidor químico da carcinogênese em roedores (IGNATOWICZ et al., 2001), além de agente

---

antiinflamatório (MARTIN et al., 2004). LANÇON e colaboradores (2004) reportaram também efeitos do resveratrol em hepatocarcinomas, além de aumentar a eliminação de esteróis e sais biliares nas fezes (MIURA et al., 2003).

Estudos referentes à toxicidade do trans-resveratrol demonstraram que animais submetidos a diversas concentrações deste composto passaram a apresentar reações adversas, ou seja, sinais de toxicidade a partir da administração de 3000mg por quilograma/dia, apresentando inflamação cardíaca e torácica (CROWELL et al., 2004). No presente experimento utilizou-se 6mg/L de trans - resveratrol, uma concentração não tóxica para os animais em estudo.

O objetivo da presente pesquisa foi determinar os efeitos do trans-resveratrol no perfil lipídico sérico e estresse oxidativo sérico e hepático em animais induzidos a dislipidemia experimental.

Para cumprir com os objetivos propostos no presente trabalho, o mesmo foi dividido em três capítulos, sendo:

- **Capítulo I.** Efeitos do resveratrol sobre parâmetros nutricionais e morfométricos em ratos alimentados com dieta rica em colesterol e sacarose.
- **Capítulo II.** Perfil lipídico e estresse oxidativo séricos: Ação do resveratrol em animais submetidos a ingestão de dieta hipercalórica.
- **Capítulo III.** Modulação do metabolismo e estresse oxidativo hepáticos, pelo resveratrol, em animais alimentados com dieta hipercalórica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

- Acquaviva R, Campisi AC, Sorrenti V, Giacomo C, Barcellona ML, Avitabile M, Vanella A. Antioxidant activity and protective effect on DNA cleavage of resveratrol. *Food Chem. and Toxicol.* 2002; 67 (1): 137-141.
- Arichi H, Kimura Y, Okuda H, Baba K, Kozawa M, Arichi S. Effects of stilbene of the roots of *Polygonum cuspidatum* Sieb et Zucc. On lipid metabolism. *Chem. Pharm.* 1982; 30: 1766-1770.
- Bailey JW, Walker E, Beauchene RE. Fatty acid composition of adipose tissue in aged rats: effects of dietary restriction and exercise. *Exp. Gerontology.* 1997; 28: 233-247.
- Basly JP, Marre-Fournier F, Le Bail JC, Habrioux G, Chulia AJ. Estrogenic/antiestrogenic and scavenging properties of (E)- and (Z)-resveratrol. *Life Sci.* 2000: 769-777.
- Beckman KD, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* 1998; 78: 574-581.
- Benzie IFF. Evolution of dietary antioxidants. *Comp. Biochem. Physiol.* 2003; 136: 113-26.
- Crowell JA, Korytko PJ, Morrissey RL, Booth TD, Levine BS. Resveratrol - associated renal toxicity. *Toxicol. Sci.* 2004; 82: 614-619.
- Day CP. Pathogenesis of steatohepatitis. Best practice and research. *Clin. Gastroenterol.* 2002; 16 (5): 663-678.
- De Knegt RJ. Non- alcoholic steatohepatitis: clinical significance and pathogenesis. *Scand J. Gastroenterol.* 2001; 234: 88-92.
- Diniz YS, Cicogna AC, Santana LS, Faine LA, Novelli ELB. Diets rich in saturated and polyunsaturated fatty acids: Metabolic shifting and cardiac health. *Nutrition.* 2004; 20: 230.
- Droge W. Free radicals on the physiological control of cell function. *Phys. Rev.* 2002; 82: 47-95.

---

\* International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted journal. *N. Engl. J. Med.* 1997; 336: 309-315.

- 
- Esposito LA, Melov S, Cottrell BA. Mitochondrial disease in mouse resulting increased oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999; 96: 4820-4825.
- Faine LA, Cicogna AC, Diniz YA, Almeida JA, Burneiko RC, Rodrigues HG, Novelli ELB. Dietary restriction : metabolic shifting for cardiac health. *J. Nutr. Envir. Med.* 2002; 13: 23-29.
- Ferrari R, Ceconi C, Curello S. Intracellular effects of myocardial ischaemic and reperfusion: role of calcium and oxygen. *Eur. Heart J.* 1998; 7: 3-12.
- Ferrari CKB, Torres EAFS. Biochemical pharmacology of functional foods and prevention of chronic diseases of aging. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2003; 57: 251-260.
- Ferreira ALA, Matsubara LS. *Rev. da Assoc. Med. Brasileira.* 1997; 43 (1): 61-68.
- Fredstrom S. Nitric oxid, oxidative stress, and dietary antioxidants. *Nutrition.* 2002; 18: 537-539.
- Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura L. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The J. of Clin. Investigation.* 2004; 114 (12): 1752-1761.
- Hung L, Chen J, Huang S, Lee R, Su M. Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovascular Research.* 2000; 549-555.
- Ignatowicz E, Baer-Dubowska W. Resveratrol, a natural chemopreventive agent against degenerative diseases. *J. of Pharmacology.* 2001; 53: 557-569.
- Kimura Y, Okuda H, Arichi S. Effects of stilbene on arachidonate metabolism in leukocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1985; 834: 275-278.
- Lançon A, Delmas D, Osman H, Thénot JP, Latruffe JN. Human hepatic cell uptake of resveratrol: involvement of both passive diffusion and carrier-mediated process. *Biochem. and Biophys. Res. Communications.* 2004; 316: 1132-1137.
- Leonard S S, Xia C, Jiang B, Stinefelt B, Klandorf H, Harris G K, Shi X. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-
-

- induced cellular responses. *Biochem. and Biophysical Res. Communication.* 2003; 309: 1017-1026.
- Lyra R. Importância dos triglicerídeos e do HDL na DCA em diabéticos. Pfizer. 2005.
- Marrier J, Vachon P, Gritsas A, Zhang J, Moureau J, Ducharme M.. Metabolism and disposition of resveratrol in rats: Extent of absorption, glucuronidation, and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model. *The J. of Pharmacol.* 2002; 302: 369-373.
- Martín AR, Villegas I, La Casa C, Lastra CA. Resveratrol, a polyphenol found in grapes, suppresses oxidative damage and stimulates apoptosis during early colonic inflammation in rats. *Biochem. Pharmacol.* 2004; 67: 1399-1410.
- Novelli E L B, Fernandes A A H, Campos K E, Diniz Y S, Almeida J A, Faine L A, Ribas B O. The adverse effect of a high energy dense diet on cardiac tissue. *J. of Nutr. & Env. Med.* 2002; 12 (4): 287-294.
- Novelli ELB. *Nutrição e vida saudável* 2005, Ribeirão Preto: Tecmed Editora, 288p.
- Ou H, Chou F, Sheen H, Lin T, Yang C, Sheu WH. Resveratrol, a polyphenolic compound in red wine, protects against oxidized LDL-induced cytotoxicity in endothelial cells. *Clin. Chem. Acta.* 2006; 364: 196-204.
- Rogers AE, Zeisel SH, Groopman J. Diet and carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 1993; 14: 2205-2217.
- Sligte K, Bourass I, Driessen A, Stockbrugger RW, Koek GH. Non-alcoholic steatohepatitis: review of a growing medical problem. *Eur. J. of Internal Medicine.* 2004; 15: 10-21.
- Smith B K, Kelly L A, Pina R, York D A, Bray G. Preferential fat intake increases adiposity but not body weight in Sprague-Dawley rats. *Appetite.* 1998; 31: 127-139.
- Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clin. Biochem.* 1997; 30: 91-112.

- 
- Stojanović S, Sprinz H, Brede O. Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. *Archives of Biochem. and Biophysic.* 2001; 391: 79-89.
- Strobl W, Gorder NL, Fienup GA, Lee Y, Gotto AM, Patsch W. Effect of sucrose diet on apolipoprotein biosynthesis in rat liver. *The J. of Biol. Chemistry.* 1989; 264 (2): 1190-1194.
- Weisburger JH. Mechanisms of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes and tea. *Food Chem. Toxicol.* 1999; 37:943-8.
- Wenzel E, Soldo T, Erbersdobler H, Somoza V. Bioactivity and metabolism of trans-resveratrol orally administered to Wistar rats. *Mol. Nutr. Food Res.* 2005; 49: 482-494.
-

---

# *CAPÍTULO I*

*Efeitos do resveratrol sobre parâmetros  
nutricionais e morfométricos em ratos  
alimentados com dieta rica em colesterol e  
sacarose*

---

## ABSTRACT

The aim this study was to determine the effects of resveratrol on nutrition and morphometrics parameters, as well on blood glucose triacilglycerol concentrations in rats receiving standard or hypercaloric diet. Twenty four Wistar rats were divided into 3 groups. C control group (n=6); R group (n=6) received standard diet as C group and resveratrol (6mg/L) in its drinking water; H (n=12), received hypercaloric diet and drinking water for 30 days, when was divided into 2 groups; H (n=6) continued receiving hypercaloric chow and water, and HR (n=6) receiving hypercaloric diet as H group and resveratrol in drinking water as R group for 15 days. After 30 days, glucose and triacilglycerol concentrations were determined in blood. After 45 days of the experimental period the animals were anaesthetized morphometrics determinations. No alterations were found on food consumption, food preference and palatability among the groups. The voluntary food intake was decreased in H animals, while lipid consumption, energy intake, body weight gain were enhanced in these animals. No observations changes were found in abdominal (AC) and thorax circumferences (TC), AC/TC ratio, body length and body mass index (BMI) between the groups. H rats had increased fasting serum blood glucose after 30 and 45 days of treatment, while triacilglycerol was unchanged in these animals. Resveratrol reduced fasting serum blood glucose after 30 days of treatment, but had no effects on body weight of the animals. In conclusion resveratrol had beneficial effects on blood glucose concentrations. This effect was associated with antioxidant proprieties.

## RESUMO

Os objetivos deste capítulo foram determinar os efeitos da dieta hipercalórica e da administração de resveratrol sobre parâmetros nutricionais, morfométricos e concentrações de glicose e triacilglicerol no sangue dos animais experimentais. Utilizou-se 24 ratos Wistar, divididos inicialmente em 3 grupos. Grupo C (n=6), controle, recebendo ração padrão e água destilada. Grupo R (n=6) recebendo ração padrão e resveratrol (6mg/L) na água de beber. Grupo H (n=12) que recebeu água destilada e dieta hipercalórica, o qual após 30 dias foi subdividido em 2 grupos, H (n=6) que continuou a receber água destilada e dieta hipercalórica e HR (n=6) que recebeu dieta hipercalórica como no grupo H e solução de resveratrol como no grupo R por 15 dias. Ao final de 30 dias foram determinadas as concentrações de glicose e triacilglicerol no sangue coletado pela veia caudal e ao término do experimento (45 dias) os animais foram anestesiados para determinação dos parâmetros morfométricos. Não foram observadas alterações no consumo de ração, ingestão de líquida, preferência alimentar e palatabilidade, já a taxa de ingestão voluntária apresentou-se reduzida nos animais do grupo H. Animais submetidos à dieta hipercalórica apresentaram elevação no consumo de lipídios, energia ingerida, ganho de peso. Não foram observadas alterações na circunferência abdominal (CA), circunferência torácica (CT), relação CT/CA, comprimento corporal e índice de massa corporal (IMC) entre os grupos. Houve elevação na glicemia nos animais do grupo H, durante 30 e 45 dias de tratamento, sem alteração na trigliceridemia. O resveratrol reduziu as concentrações de glicose sanguínea 30 e 45 dias após o tratamento, sem alterar o peso dos animais. Desde que a elevação na glicemia pode estar associada à intolerância a glicose e ao estresse oxidativo, os efeitos benéficos do resveratrol podem ser decorrentes de suas propriedades antioxidantes.

## INTRODUÇÃO

### 1. DIETA HIPERCALÓRICA E OBESIDADE

A escassez de alimento em determinadas épocas e o excesso do mesmo em outras constituiu fator limitante para que, através da seleção natural, houvesse a necessidade do organismo em armazenar quantidades excedentes de energia. Desta forma ocorreu à evolução de células denominadas adipócitos dispondo de tais calorias para o uso subsequente. Como consequência da elevada ingestão alimentar podem ocorrer mudanças crônicas no balanço das calorias, aumentando assim a prevalência de doenças relacionadas à obesidade (UNGER & ORCI, 2001).

Obesidade é uma doença crônica provinda do desequilíbrio calórico, cuja prevalência tem aumentado em vários países, contribuindo substancialmente com a morbidade e mortalidade associadas com resistência à insulina, diabetes, hiperlipidemia, hipertensão e doenças cardiovasculares (KIM et al., 2005).

A ingestão de dietas hipercalóricas, ricas em sacarose tem sido uma constante na maioria das populações podendo estar associada à elevada incidência de obesidade e diabetes mellitus.

O aumento no conteúdo de carboidratos na dieta pode induzir obesidade (McGARRY, 1998; DINIZ et al., 2006) e mudanças adversas nos lipídios do sangue (FRAYN & KINGMAN, 1995). O consumo de sacarose aumenta a síntese de ácidos graxos no tecido hepático (EBAID et al., 2005) promovendo dislipidemia (SORIA, 2002).

Dietas ricas em ácidos graxos insaturados têm sido frequentemente associadas à diminuição no colesterol plasmático, diminuição na hipertrigliceridemia e inibição na oxidação da LDL-colesterol. O efeito antiaterogênico de ácidos monos e poliinsaturados tem sido alvo de vários estudos (NOVELLI, 2005).

Dietas contendo colesterol e suplementada com lipídios e ou carboidratos alteram o metabolismo lipídico (CHANUTIN & LUDEWIG, 1933).

---

Suplementação dietética com colesterol produziu em coelhos, hipercolesterolemia e lesões vasculares ateroscleróticas causadas por aumento na concentração de oxisterois no plasma. Oxisterois são os primeiros representantes pro-aterogênicos de uma dieta rica em colesterol (MOHAMEDAIN, 2000). Hipercolesterolemia é um fator frequentemente observado em humanos com diabetes mellitus e certamente contribui com o aumento de aterosclerose e doenças cardiovasculares associadas com esta desordem metabólica (MAECHIER et al., 1992).

## 2. ESTRESSE OXIDATIVO

Diversos estudos têm demonstrado que o aumento no consumo de calorias exerce efeitos deletérios na saúde induzindo danos oxidativos (NOVELLI et al, 2002; Diniz et al., 2005). O uso de oxigênio como combustível para o metabolismo oxidativo resulta na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (FEUERS, 1998). Em condições fisiológicas a célula pode tolerar o estresse oxidativo, pois frequentemente responde com o aumento na síntese de sistemas de defesa antioxidantes, na tentativa para restaurar o balanço entre oxidantes e antioxidantes (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1996). O aumento do consumo de calorias constitui um importante fator na redução da fluidez da membrana da mitocôndria induzindo o estresse oxidativo (BURNEIKO et al., 2005).

Importante fonte celular de estresse oxidativo é constituída pela incompleta redução de oxigênio na cadeia respiratória mitocondrial, produzindo radical superóxido (ABUJA & ALBERTINI, 2001).

Estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio entre sistemas oxidantes e antioxidantes (LAZAROVA et al., 2004). Durante o estresse oxidativo, as ERO tais como radical superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ), radical hidroperoxil ( $HO_2^{\bullet}$ ), hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio singlet ( $^1O_2$ ) podem produzir danos teciduais (SOHAL & WEINDURCH, 1996).

A fim de bloquear os efeitos das ERO, diversas substâncias têm sido testadas como possíveis agentes antioxidantes.

---

### 3. ANTIOXIDANTES E RESVERATROL

Antioxidantes são substâncias capazes de prevenir os efeitos deletérios da oxidação (JACKON, 1994), inibindo a iniciação da peroxidação lipídica, seqüestrando ou quelando íons metálicos (HSIEH, 1989).

Compostos da dieta com capacidade de ação química antioxidante são de grande benefício às defesas celulares e ajudam na proteção de componentes celulares contra danos oxidativos (ASTLEY, 2003).

Atualmente tem sido observado crescente interesse nos antioxidantes de origem vegetal, dado que os mecanismos endógenos de defesa do organismo podem tornar-se inadequados para uma completa prevenção do dano oxidativo (KAUR & KAPPOR, 2002).

Resveratrol (3,4,5' - trans-trihidroxiestilbeno), é um polifenol com forte atividade antioxidante (MIURA et al., 2003), descoberto na casca da uva (TOMERA, 1999), sendo relativamente abundante em vinho tinto. Tem sido o responsável pelos efeitos benéficos cardiovasculares associados ao consumo moderado de vinho (HUNG et al., 2000). Associado a baixa mortalidade por doenças cardiovasculares, observada em indivíduos com elevada ingestão de lipídios tem sido hipotetizado como um provável responsável pelo "paradoxo frances" (TOMERA, 1999; GAMBELLI & SANTARONI, 2004). WANG et al. (2005) demonstraram que compostos fitoquímicos presentes no vinho tinto e o resveratrol podem suprimir a aterosclerose, sem afetar as concentrações de lipídios sanguíneos.

Resveratrol é um fenilpropanoíde com atividade de fitoalexina produzida em resposta a condições adversas tais como radiação UV e ataque de patógenos (FLOREANI, 2003; MARTINEZ & MORENO, 2000).

As fitoalexinas constituem um grupo de metabólitos secundários quimicamente diversos, que se acumulam em torno do local de infecção e apresentam atividade antimicrobiana (TAIZ & ZEIGER, 2004). Os precursores do resveratrol são os ácidos cumárico e malônico na proporção de 1:3 (SOLEAS et al., 1997), provenientes das rotas do ácido chiquímico e ácido mevalônico.

---

Ao resveratrol têm sido atribuídos inúmeros efeitos biológicos, como redução na síntese de lipídios no fígado de ratos, prevenção da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (FRÉMONT, 1999), inibição da síntese de eicosanóides nos leucócitos de ratos, inibição da ativação e/ou agregação plaquetária, interferindo também com o metabolismo do ácido araquidônico (HUNG, 2000), possui ação anticâncer e antiinflamatória (MARTINEZ & MORENO, 2000), sendo um potente inibidor de monoamino oxidase no cérebro de ratos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. ANIMAIS

Foram utilizados um total de 24 ratos machos adultos *Wistar*, de peso médio 289,03 gramas. Os animais foram provenientes do Biotério Central da UNESP, "campus de Botucatu", e transferidos para o "Laboratório de Bioquímica na Experimentação Animal" do Departamento de Química e Bioquímica, Instituto de Biociências, UNESP/Botucatu, onde permaneceram durante todo o período experimental, à temperatura de  $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , período claro/escuro de 12 horas.

Os animais foram mantidos em gaiolas de plástico individuais, recebendo dieta basal (Biobase, SP, Brasil) e água destilada *ad libitum*. Para permitir a aclimação dos animais, os ratos permaneceram nas condições acima citadas por um período de 15 dias antes do início do experimento. Diariamente as gaiolas foram limpas.

### 2. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Inicialmente, os animais foram divididos em 3 grupos. O grupo C (n=6) foi considerado controle. O grupo R recebeu resveratrol dissolvido na água de beber (6 mg/L) e o grupo H (n=12) foi submetido a hiperlipidemia através da ingestão de dieta com elevada concentração de colesterol (COSTA et al, 1993) e sacarose.

Para o estudo dos efeitos da ingestão de resveratrol em animais hiperlipidêmicos, após 30 dias de consumo da dieta rica em colesterol e sacarose, os animais do grupo H foram divididos em 2 sub-grupos (n=6), recebendo diferentes tratamentos por mais 15 dias. O sub-grupo H continuou

---

recebendo dieta rica em colesterol e sacarose. O grupo HR recebeu a mesma dieta do grupo H e resveratrol como no grupo R.

### **3. DIETA HIPERCALÓRICA**

No preparo da ração contendo elevada concentração de ácidos graxos insaturados, sacarose, colesterol e ácido fólico, foram adicionados ao farelo da ração padrão; 847,71g de óleo de soja; 1310,11g de sacarose; 123,30g de colesterol cristalino e 12,33g de ácido fólico para cada 1 Kg de ração (REEVES, 1997; QUILES et al., 2003). A mistura foi homogeneizada com 2300mL de água quente (inferior a 60°C). A seguir, as rações foram colocadas em máquina específica para formação de "pellets". Estes foram secos em estufa com ar circulante por um período de 24h, em temperatura inferior a 70°C. Após secagem as rações foram deixadas à temperatura ambiente para esfriar durante 24h, e conservadas em câmara fria à 6°C. A validade da ração preparada era de 3 meses.

### **4. RESVERATROL**

A dose de resveratrol foi estimada para corresponder a sua ingestão diária contida em 1 litro e meio de suco de uva por dia (DONG, 2003) para humanos de 70 Kg, corrigida de acordo com a ingestão diária por Kg de peso para os animais (HABOLD et al., 2004).

O resveratrol foi dissolvido em água (6mg/L), usando-se etanol como carreador (25mg resveratrol/1mL etanol). Nesta dose, o etanol não possui efeito farmacológico ou sinérgico (BRADAMANTE et al., 2003).

O resveratrol é sensível à luz, portanto todos os bebedouros foram totalmente cobertos por folhas de papel alumínio durante o decorrer do experimento (BRADAMANTE et al., 2003).

A média do consumo de resveratrol foi de 0,22 ± 0,03 mg/dia para o grupo R e 0,20 ± 0,01 mg/dia para o grupo HR não apresentando diferença significativa entre os dois grupos (Tabela V).

## 5. PARAMETROS NUTRICIONAIS E MORFOMÉTRICOS

O consumo alimentar e a ingestão de líquido, foram controladas diariamente, no mesmo horário (9:00 as 11:00 horas). Diariamente foi ofertada 50g de ração e 60 mL de líquido por animal. O consumo alimentar diário foi obtido pela subtração da dieta ofertada e o peso da dieta restante, após o consumo *ad libitum* em 24 horas. A ingestão de líquidos foi obtida pela subtração da água ou solução ofertada e quantidade restante, após consumo *ad libitum* em 24 horas.

Os animais foram pesados antes do início do experimento e semanalmente durante todo o período experimental. Devemos salientar que durante o transcurso do experimento, os animais foram mantidos nas mesmas condições, tais como: temperatura ambiente, gaiolas individuais, rações basais. Foram determinados as circunferências abdominais, torácicas e o comprimento dos animais.

Tendo como base o consumo alimentar diário médio, a energia da ração, as porcentagens de proteínas, ácidos graxos e carboidratos e ganho de peso, foram calculados os parâmetros nutricionais (DINIZ et al., 2002; NOVELLI et al., 2002; EBAID et al., 2005):

- Consumo de proteínas (g/dia) = consumo diário médio de ração x porcentagem de proteínas da ração.
- Consumo de ácidos graxos (g/dia) = consumo diário médio de ração x porcentagem de ácidos graxos da ração.
- Ingestão de carboidratos (g/dia) = consumo diário médio de ração x porcentagem de carboidratos da ração.
- Energia Ingerida (Kcal/dia) = consumo diário médio de ração x energia metabolizável de ração em Kcal/g.
- Preferência Alimentar (%) = [ingestão alimentar/ 50g de dieta ofertada] x 100.
- Palatabilidade (%) = [ingestão de solução aquosa/ 60mL de solução aquosa ofertada] x 100.

- Eficiência Alimentar (%) =  $[\text{Ganho de peso} / \text{energia ingerida no período total}] \times 100$ .
- Taxa de Ingestão Voluntária (%) =  $[\text{quantidade de ingestão média} \times 100] / \text{ganho de peso}$ .

Após 30 dias os animais foram deixados em jejum de 12 horas para determinações de glicose e triacilglicerol no sangue coletado através da veia caudal dos animais. Ao final do período experimental (45 dias), após jejum de 12 horas, os animais foram anestesiados (pentobarbital sódico 3%, 0,1mL, i.p.) para determinação do comprimento corporal (cabeça ao ânus, exceto a cauda), circunferência abdominal e torácica. Em seguida sacrificados por fratura cervical e decapitação para retirada do sangue e fígado para determinações bioquímicas.

Como parâmetro morfométrico foi utilizado o índice de massa corporal (IMC). O IMC foi calculado dividindo - se o peso dos animais (g) pelo seu comprimento ao quadrado (cm<sup>2</sup>).

## 7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Na obtenção de valores significantes, o teste t foi utilizado para comparações entre dois grupos experimentais, através do software InStat 3.0. O nível de significância foi  $p < 0,05$  (CURI, 1997).

## RESULTADOS

A Tabela I apresenta a composição da ração padrão, ofertada aos grupos C e R, bem como da dieta hipercalórica oferecida aos animais dos grupos H e HR.

Como esperado, houve elevação no conteúdo de ácidos graxos totais e de carboidratos totais na dieta hipercalórica. Este fato foi associado à adição de óleo de soja e sacarose, elevando as concentrações de ácidos graxos insaturados e de sacarose na dieta hipercalórica. Desde que houve acréscimo de ácidos graxos insaturados e sacarose, a dieta hipercalórica apresentou

---

conteúdo calórico de 341,10 Kcal/100g, comparada à dieta padrão com 275,89 Kcal/100g.

A ingestão diária de ração durante as seis semanas do período experimental está apresentada na Tabela II. Pode-se observar que não houve alteração significativa no consumo de ração entre os grupos e entre as semanas, no decorrer do experimento (Tabela II).

Na Tabela III, esta apresentado o consumo diário médio de macronutrientes dietéticos durante todo período experimental. Pode-se observar que a presença de resveratrol na água de beber não alterou significativamente o consumo de macronutrientes, tanto nos grupos H e HR como nos grupos C e R. Não foram observadas diferenças significantes no consumo de proteína entre os grupos C e R, assim como nos grupos H e HR. O grupo H apresentou redução no consumo de proteína bem como o grupo HR (Tabela III, Figura 1).

A Figura 2 apresenta o consumo diário médio de ácidos graxos totais pelos animais experimentais. Pode-se evidenciar que animais dos grupos H e HR consumiram elevadas concentrações de ácidos graxos totais, quando comparados aos animais dos grupos C e R. Também pode-se verificar que a presença de resveratrol não alterou o consumo médio de ácidos graxos, quando comparados aos grupos C e H. A Figura 3 apresenta o consumo de ácidos graxos saturados entre os grupos, onde apenas os animais que receberam dieta hipercalórica demonstraram redução no consumo, quando comparados aos animais que receberam dieta padrão.

O consumo de amido não apresentou diferença significativa entre os grupos H e HR, assim como nos grupos C e R. Entretanto os grupos H e HR apresentaram consumo de amido reduzido quando comparados ao C (Tabela III, Figura 4).

Não foram observadas alterações significantes no consumo médio diário de líquidos, água ou solução aquosa de resveratrol entre os animais dos grupos

---

---

C e R, bem como entre os grupos H e HR. Houve redução significativa no consumo de água nos animais do grupo H, quando comparado ao C (Tabela IV).

A energia total ingerida apresentou-se elevada nos grupos H e HR, quando comparados aos grupos C e R em todo período experimental (Tabela VI, Figura 5). Não foram observados efeitos do resveratrol na energia ingerida, tanto nos animais com dieta padrão como na dieta hipercalórica. A preferência alimentar, palatabilidade e eficiência alimentar não apresentaram alterações significantes entre os grupos (Tabela VI).

A Tabela VI apresenta a taxa de ingestão voluntária durante todo período experimental. Os animais pertencentes aos grupos H e HR, não apresentaram diferença significativa entre si e com o grupo C. Os grupos C e R não apresentaram diferença significativa na taxa de ingestão voluntária (Tabela VI).

Houve elevação no ganho de peso corporal final nos animais dos grupos H e HR comparados aos grupos C e R. Ingestão de resveratrol não alterou ganho de peso dos animais mantidos com dieta padrão e dieta hipercalórica (Tabela VII, Figuras 6). Não foram observadas alterações significantes nos parâmetros morfométricos analisados, incluindo comprimento corporal, IMC, circunferência torácica e abdominal entre os grupos experimentais (Tabela VII).

Houve elevação na concentração de glicose sanguínea nos animais do grupo H em relação ao grupo C, após 30 e 45 dias de tratamento, a análise das médias entre as concentrações de glicose determinadas 30 e 45 dias do período experimental demonstrou elevação significativa na glicemia, nos animais do grupo H, comparado ao C. Administração de resveratrol durante 15 dias, reduziu significativamente a glicemia dos animais mantidos com dieta hipercalórica, grupo HR comparado a H. Também foi possível evidenciar que ingestão de resveratrol durante 30 dias induziu redução na glicemia nos animais mantidos com dieta padrão, grupo R comparado a C (Tabela VIII, Figuras 7 e 8).

---

Não foram observadas alterações na trigliceridemia entre os animais experimentais após 30 e 45 dias de tratamento (Tabela IX).

**Tabela I.** Composição das dietas

Componentes	Padrão		Hipercalórica	
	g/100g	Kcal/100g	g/100g	Kcal/100g
Proteína	19,80	79,20	15,25	61,00
Ácidos graxos				
totais	4,41	39,69	11,86	106,74
Ácidos graxos				
insaturados	-	-	8,47	76,23
Ácidos graxos				
saturados	4,41	39,69	3,39	30,51
Carboidrato				
total	39,25	157	43,34	173,36
Amido	39,25	157	30,24	120,96
Sacarose	-	-	13,10	52,40
Fibra	13,25	-	10,20	-
Colesterol	-	-	1,23	-
Ácido cólico	-	-	0,123	-
Outros (*)	23,29	-	17,94	-
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>275,89</b>	<b>100</b>	<b>341,10</b>

(\*) *Umidade, Vitaminas:* (A) 25,000 UI; (B<sub>1</sub>) 8,0 mg; (B<sub>2</sub>) 30,00 mg; (B<sub>6</sub>) 14,0 mg; (B<sub>12</sub>) 40,0 mcg; (D<sub>3</sub>) 5,000 UI; (E) 60,0 mg; (K) 6,0 mg; Biotina 80,0 mg; Niacina 80,0 mg; Ácido fólico 3,0 mg; Ácido pantotênico 50,0 mg, Colina 1200 mg, *Sais Minerais:* Zinco 70,0 mg; Cobre 10,0 mg; Iodo 2,0 mg; Manganês 70,0 mg; Cobalto 1,5 mg; Ferro 50,0 mg; Selênio 0,1 mg e L-Lisina 1,2% e Metionina 0,45%. Composição básica do produto: milho moído, farelo de soja, farelo de trigo, calcário calcítico, fosfato bicálcico, cloreto de sódio (sal comum). Composição das dietas determinada no Departamento de Tecnologia de Produtos Agropecuários da Faculdade de Ciências Agrônômicas e Departamento de Bromatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Unesp, Botucatu.

**Tabela II.** Ingestão semanal de ração, pelos animais do grupo controle, mantidos com ração padrão e água para beber (C), que receberam dieta padrão e resveratrol (6mg/L) na água de beber (R), animais que receberam dieta hipercalórica e água para beber (H) e animais mantidos com dieta hipercalórica e água para beber durante 30 dias, passando a receber resveratrol (6mg/L) na água de beber durante 15 dias (HR).

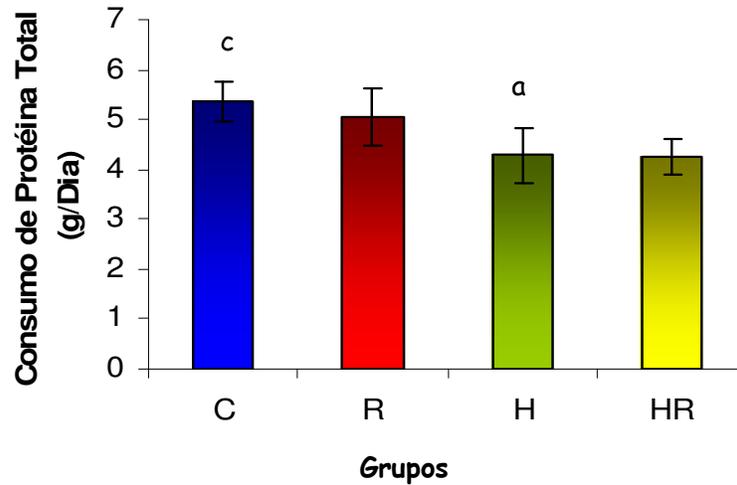
Ingestão Semanal de Ração (g/dia)	Grupos			
	<i>C</i>	<i>R</i>	<i>H</i>	<i>HR</i>
Primeira Semana	24,88 ± 4,29	23,82 ± 2,50	27,13 ± 5,87	-
Segunda Semana	25,64 ± 4,89	25,49 ± 4,30	27,15 ± 4,96	-
Terceira Semana	25,66 ± 6,37	26,66 ± 3,33	25,91 ± 4,78	-
Quarta Semana	26,12 ± 4,82	25,65 ± 3,18	26,94 ± 4,50	-
Quinta Semana	26,33 ± 5,92	26,89 ± 2,70	27,45 ± 6,25	30,14 ± 2,82
Sexta Semana	23,49 ± 5,10	24,62 ± 2,48	24,07 ± 5,73	26,43 ± 2,71
<b>Média do Experimento</b>	<b>25,35 ± 1,04</b>	<b>25,52 ± 1,17</b>	<b>26,44 ± 1,28</b>	<b>28,29 ± 2,62</b>

Valores expressos como média ± desvio padrão. <sup>a</sup> Diferença significativa em relação ao C, p<0,05. <sup>b</sup> Diferença significativa em relação ao R, p<0,05; <sup>c</sup> Diferença significativa em relação ao H, p<0,05; <sup>d</sup> Diferença significativa em relação ao HR, p<0,05.

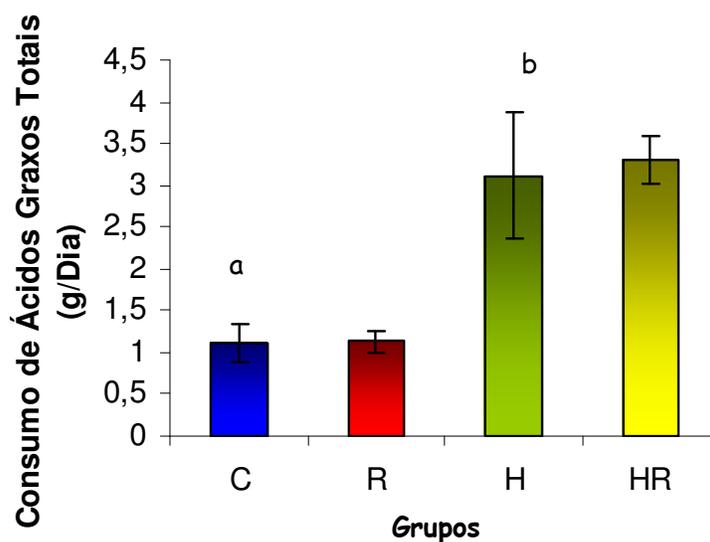
**Tabela III.** Consumo diário de proteína total, ácidos graxos totais, ácidos graxos insaturados, ácidos graxos saturados, carboidrato total, amido e sacarose, pelos animais do grupo controle, mantidos com ração padrão e água para beber (C), que receberam dieta padrão e resveratrol (6mg/L) na água de beber (R), animais que receberam dieta hipercalórica e água para beber (H) e animais mantidos com dieta hipercalórica e água para beber durante 30 dias, passando a receber resveratrol (6mg/L) na água de beber durante 15 dias (HR).

	<b>Grupos</b>			
	<b>C</b>	<b>R</b>	<b>H</b>	<b>HR</b>
Proteína (g/dia)	5,35 ± 0,39 <sup>c</sup>	5,05 ± 0,57	4,28 ± 0,57 <sup>a</sup>	4,25 ± 0,35
Ácidos graxos totais (g/dia)	1,12 ± 0,23 <sup>c</sup>	1,13 ± 0,13	3,11 ± 0,76 <sup>a</sup>	3,30 ± 0,28
Acido graxos insaturados (g/dia)	-	-	2,37 ± 0,31	2,36 ± 0,20
Ácidos graxos saturados (g/dia)	1,19 ± 0,09 <sup>c</sup>	1,13 ± 0,13	0,95 ± 0,13 <sup>a</sup>	0,94 ± 0,08
Carboidrato total (g/dia)	10,60 ± 0,77	10,02 ± 1,14	12,15 ± 1,61	12,06 ± 1,01
Amido (g/dia)	10,60 ± 0,77 <sup>c</sup>	10,02 ± 1,14	7,93 ± 1,95 <sup>a</sup>	8,42 ± 0,70
Sacarose (g/dia)	-	-	3,67 ± 0,49	3,65 ± 0,30

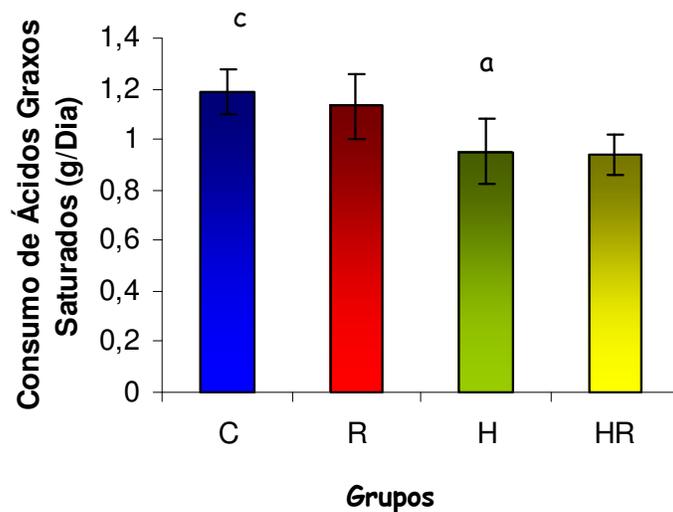
Valores expressos como média ± desvio padrão. <sup>a</sup> Diferença significativa em relação ao C, p<0,05. <sup>b</sup> Diferença significativa em relação ao R, p<0,05; <sup>c</sup> Diferença significativa em relação ao H, p<0,05; <sup>d</sup> Diferença significativa em relação ao HR, p<0,05.



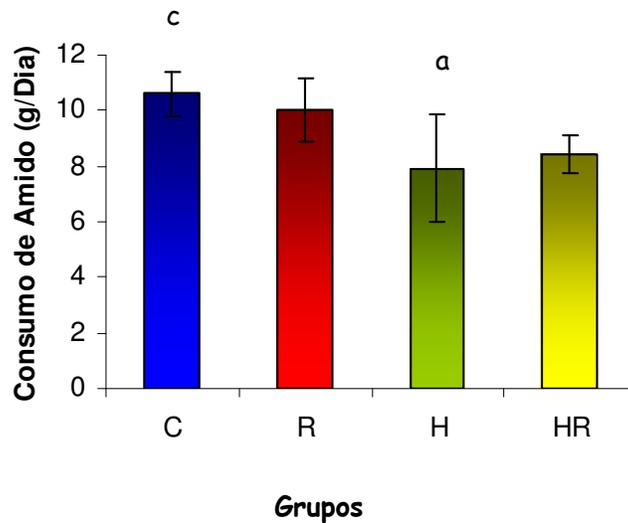
**Figura 1.** Consumo de proteína total (g/dia) pelos animais do grupo controle, mantidos com ração padrão e água para beber (C), que receberam dieta padrão e resveratrol (6mg/L) na água de beber (R), animais que receberam dieta hipercalórica e água para beber (H) e animais mantidos com dieta hipercalórica e água para beber durante 30 dias, passando a receber resveratrol (6mg/L) na água de beber durante 15 dias (HR). Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão. <sup>a</sup> Diferença significativa em relação ao C,  $p < 0,05$ . <sup>b</sup> Diferença significativa em relação ao R,  $p < 0,05$ ; <sup>c</sup> Diferença significativa em relação ao H,  $p < 0,05$ ; <sup>d</sup> Diferença significativa em relação ao HR,  $p < 0,05$ .



**Figura 2.** Consumo de ácido graxo total (g/dia) pelos animais do grupo controle, mantidos com ração padrão e água para beber (C), que receberam dieta padrão e resveratrol (6mg/L) na água de beber (R), animais que receberam dieta hipercalórica e água para beber (H) e animais mantidos com dieta hipercalórica e água para beber durante 30 dias, passando a receber resveratrol (6mg/L) na água de beber durante 15 dias (HR). Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão. <sup>a</sup> Diferença significativa em relação ao C,  $p < 0,05$ . <sup>b</sup> Diferença significativa em relação ao R,  $p < 0,05$ ; <sup>c</sup> Diferença significativa em relação ao H,  $p < 0,05$ ; <sup>d</sup> Diferença significativa em relação ao HR,  $p < 0,05$ .



**Figura 3.** Consumo de ácidos graxos saturados (g/dia) pelos animais do grupo controle, mantidos com ração padrão e água para beber (C), que receberam dieta padrão e resveratrol (6mg/L) na água de beber (R), animais que receberam dieta hipercalórica e água para beber (H) e animais mantidos com dieta hipercalórica e água para beber durante 30 dias, passando a receber resveratrol (6mg/L) na água de beber durante 15 dias (HR). Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão. <sup>a</sup> Diferença significativa em relação ao C,  $p < 0,05$ . <sup>b</sup> Diferença significativa em relação ao R,  $p < 0,05$ ; <sup>c</sup> Diferença significativa em relação ao H,  $p < 0,05$ ; <sup>d</sup> Diferença significativa em relação ao HR,  $p < 0,05$ .



**Figura 4.** Consumo de amido (g/dia) pelos animais do grupo controle, mantidos com ração padrão e água para beber (C), que receberam dieta padrão e resveratrol (6mg/L) na água de beber (R), animais que receberam dieta hipercalórica e água para beber (H) e animais mantidos com dieta hipercalórica e água para beber durante 30 dias, passando a receber resveratrol (6mg/L) na água de beber durante 15 dias (HR). Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão. <sup>a</sup> Diferença significativa em relação ao C,  $p < 0,05$ . <sup>b</sup> Diferença significativa em relação ao R,  $p < 0,05$ ; <sup>c</sup> Diferença significativa em relação ao H,  $p < 0,05$ ; <sup>d</sup> Diferença significativa em relação ao HR,  $p < 0,05$ .

**Tabela IV.** Ingestão semanal de líquido, pelos animais do grupo controle, mantidos com ração padrão e água para beber (C), que receberam dieta padrão e resveratrol (6mg/L) na água de beber (R), animais que receberam dieta hipercalórica e água para beber (H) e animais mantidos com dieta hipercalórica e água para beber durante 30 dias, passando a receber resveratrol (6mg/L) na água de beber durante 15 dias (HR).

	<b>Grupos</b>			
	<b>C</b>	<b>R</b>	<b>H</b>	<b>HR</b>
Primeira Semana	33,84 ± 5,50	29,63 ± 5,87	31,20 ± 7,43	-
Segunda Semana	43,39 ± 7,46	42,67 ± 5,58	37,81 ± 9,02	-
Terceira Semana	39,54 ± 10,08	38,05 ± 4,68	34,19 ± 6,96	-
Quarta Semana	38,31 ± 10,08	36,24 ± 5,31	34,18 ± 7,24	-
Quinta Semana	40,02 ± 9,47	35,89 ± 5,32	34,30 ± 6,58	36,38 ± 5,38
Sexta Semana	38,75 ± 9,6	33,26 ± 5,02	34,30 ± 6,58	33,31 ± 4,09
<b>Média do experimento</b>	<b>38,98 ± 3,09<sup>c</sup></b>	<b>35,96 ± 4,40</b>	<b>34,33 ± 2,10<sup>a</sup></b>	<b>34,85 ± 2,17</b>

Valores expressos como média ± desvio padrão. <sup>a</sup> Diferença significativa em relação ao C, p<0,05. <sup>b</sup> Diferença significativa em relação ao R, p<0,05; <sup>c</sup> Diferença significativa em relação ao H, p<0,05; <sup>d</sup> Diferença significativa em relação ao HR, p<0,05.

**Tabela V.** Consumo de resveratrol, pelos animais que receberam dieta padrão e resveratrol (6mg/L) na água de beber (R), e animais mantidos com dieta hipercalórica e água para beber durante 30 dias, passando a receber resveratrol (6mg/L) na água de beber durante 15 dias (HR).

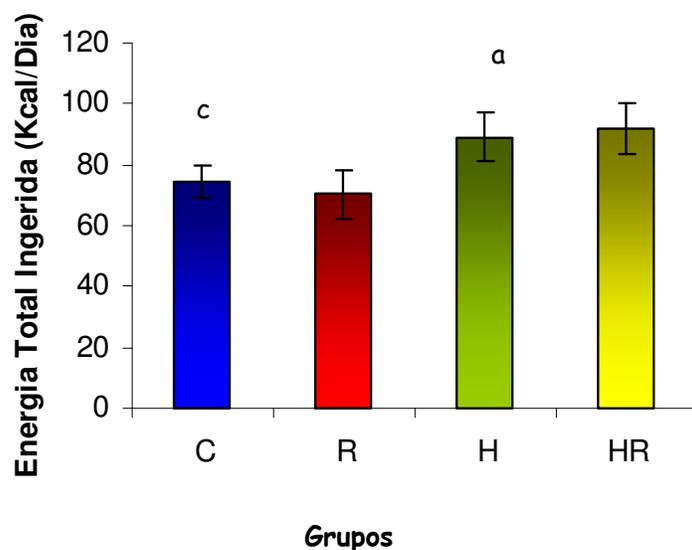
Ingestão Semanal de Resveratrol (mg/dia)	Grupos	
	R	HR
Primeira semana	0,18 ± 0,04 <sup>A</sup>	-
Segunda semana	0,26 ± 0,03 <sup>B</sup>	-
Terceira semana	0,23 ± 0,03 <sup>AB</sup>	-
Quarta semana	0,22 ± 0,03 <sup>AB</sup>	-
Quinta semana	0,22 ± 0,03 <sup>A</sup>	0,22 ± 0,03 <sup>A</sup>
Sexta semana	0,20 ± 0,03 <sup>AB</sup>	0,20 ± 0,03 <sup>A</sup>
<b>Média do experimento</b>	<b>0,22 ± 0,03</b>	<b>0,20 ± 0,01</b>

Valores expressos como média ± desvio padrão. <sup>a</sup> Diferença significativa em relação ao C, p<0,05. <sup>b</sup> Diferença significativa em relação ao R, p<0,05; <sup>c</sup> Diferença significativa em relação ao H, p<0,05; <sup>d</sup> Diferença significativa em relação ao HR, p<0,05. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as semanas, com p<0,05.

**Tabela VI.** Energia total ingerida, preferência alimentar, palatabilidade, eficiência alimentar e taxa de ingestão voluntária nos animais do grupo controle, mantidos com ração padrão e água para beber (C), que receberam dieta padrão e resveratrol (6mg/L) na água de beber (R), animais que receberam dieta hipercalórica e água para beber (H) e animais mantidos com dieta hipercalórica e água para beber durante 30 dias, passando a receber resveratrol (6mg/L) na água de beber durante 15 dias (HR).

Parâmetros Nutricionais	Grupos			
	C	R	H	HR
Energia Total Ingerida (Kcal/dia)	74,30 ± 5,38 <sup>c</sup>	70,46 ± 8,13	89,24 ± 8,22 <sup>a</sup>	92,02 ± 8,26
Preferência Alimentar (%)	54,02 ± 3,39	51,04 ± 5,79	56,08 ± 7,43	55,67 ± 4,64
Palatabilidade (%)	62,79 ± 15,08	59,95 ± 6,69	55,73 ± 13,79	58,69 ± 9,28
Eficiência Alimentar (%)	5,49 ± 1,15 <sup>b</sup>	5,01 ± 0,33 <sup>a</sup>	5,76 ± 1,27	5,20 ± 0,75
Taxa de Ingestão Voluntária (%)	15,50 ± 2,57	16,49 ± 0,92	12,33 ± 2,18	13,35 ± 2,04

Valores expressos como média ± desvio padrão. <sup>a</sup> Diferença significativa em relação ao C, p<0,05. <sup>b</sup> Diferença significativa em relação ao R, p<0,05; <sup>c</sup> Diferença significativa em relação ao H, p<0,05; <sup>d</sup> Diferença significativa em relação ao HR, p<0,05.

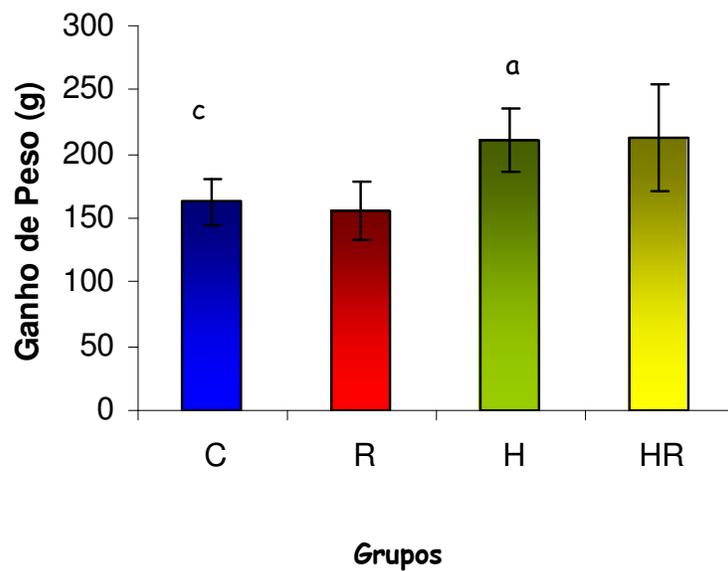


**Figura 5.** Energia total ingerida (Kcal/dia) pelos animais do grupo controle, mantidos com ração padrão e água para beber (C), que receberam dieta padrão e resveratrol (6mg/L) na água de beber (R), animais que receberam dieta hipercalórica e água para beber (H) e animais mantidos com dieta hipercalórica e água para beber durante 30 dias, passando a receber resveratrol (6mg/L) na água de beber durante 15 dias (HR). Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão. <sup>a</sup> Diferença significativa em relação ao C,  $p < 0,05$ . <sup>b</sup> Diferença significativa em relação ao R,  $p < 0,05$ ; <sup>c</sup> Diferença significativa em relação ao H,  $p < 0,05$ ; <sup>d</sup> Diferença significativa em relação ao HR,  $p < 0,05$ .

**Tabela VII.** Peso inicial (PI), peso final (PF), ganho de peso (GP), circunferência abdominal (CA), circunferência torácica (CT), circunferência abdominal/circunferência torácica (CA/CT), comprimento total e índice de massa corporal (IMC) nos animais do grupo controle, mantidos com ração padrão e água para beber (C), que receberam dieta padrão e resveratrol (6mg/L) na água de beber (R), animais que receberam dieta hipercalórica e água para beber (H) e animais mantidos com dieta hipercalórica e água para beber durante 30 dias, passando a receber resveratrol (6mg/L) na água de beber durante 15 dias (HR).

	<b>Grupos</b>			
	<b>C</b>	<b>R</b>	<b>H</b>	<b>HR</b>
PI (g)	284,90 ± 27,71	267,68 ± 33,39	305,90 ± 39,85	297,66 ± 23,39
PF (g)	379,53 ± 34,24	360,81 ± 41,96	431,27 ± 50,90	425,98 ± 37,01
GP (g)	162,98 ± 17,77 <sup>c</sup>	155,57 ± 23,43	210,99 ± 24,35 <sup>a</sup>	213,41 ± 41,67
CA (cm)	16,50 ± 1,38	17,17 ± 1,13	17,08 ± 1,80	18,33 ± 1,21
CT (cm)	14,25 ± 1,75	14,67 ± 0,82	14,50 ± 1,73	15,50 ± 0,71
CA/CT	1,12 ± 0,08	1,17 ± 0,04	1,17 ± 0,09	1,18 ± 0,05
Comprimento Total (cm)	23,08 ± 2,25	24,42 ± 1,36	24,17 ± 2,46	24,50 ± 1,05
IMC (g.cm <sup>-2</sup> )	0,64 ± 0,10	0,61 ± 0,12	0,66 ± 0,10	0,71 ± 0,02

Valores expressos como média ± desvio padrão. <sup>a</sup> Diferença significativa em relação ao C, p<0,05. <sup>b</sup> Diferença significativa em relação ao R, p<0,05; <sup>c</sup> Diferença significativa em relação ao H, p<0,05; <sup>d</sup> Diferença significativa em relação ao HR, p<0,05.

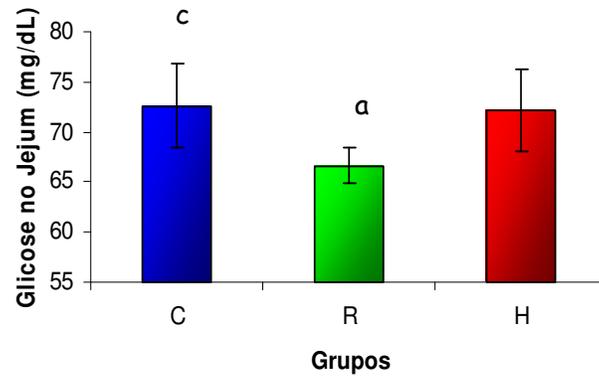


**Figura 7.** Ganho de peso (g) nos animais do grupo controle, mantidos com ração padrão e água para beber (C), que receberam dieta padrão e resveratrol (6mg/L) na água de beber (R), animais que receberam dieta hipercalórica e água para beber durante 30 dias, passando a receber resveratrol (6mg/L) na água de beber durante 15 dias (HR). Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão. <sup>a</sup> Diferença significativa em relação ao C,  $p < 0,05$ . <sup>b</sup> Diferença significativa em relação ao R,  $p < 0,05$ ; <sup>c</sup> Diferença significativa em relação ao H,  $p < 0,05$ ; <sup>d</sup> Diferença significativa em relação ao HR,  $p < 0,05$ .

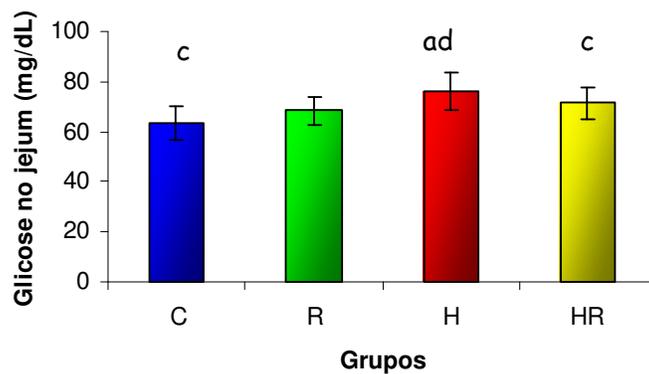
**Tabela VIII.** Concentração de glicose sanguínea nos animais do grupo controle, mantidos com ração padrão e água para beber (C), que receberam dieta padrão e resveratrol (6mg/L) na água de beber (R), animais que receberam dieta hipercalórica e água para beber (H) e animais mantidos com dieta hipercalórica e água para beber durante 30 dias (H\*), passando a receber resveratrol (6mg/L) na água de beber durante 15 dias (HR).

Determinações Bioquímicas	Grupos			
	C	R	H	HR
Glicose com 30 dias de experimento (mg/dL)	72,60 ± 4,20 <sup>bB</sup>	66,60 ± 1,80 <sup>a</sup>	70,74 ± 1,99 <sup>A</sup>	-
Glicose com 45 dias de experimento (mg/dL)	64,33 ± 6,62 <sup>cA</sup>	68,33 ± 5,35	81,11 ± 3,80 <sup>dB</sup>	72,56 ± 5,41 <sup>c</sup>
<b>Média</b>	<b>68,46 ± 5,85</b>	<b>67,47 ± 1,22</b>	<b>73,47 ± 3,86</b>	<b>72,56 ± 5,41</b>

Valores expressos como média ± desvio padrão. <sup>a</sup> Diferença significativa em relação ao C, p<0,05. <sup>b</sup> Diferença significativa em relação ao R, p<0,05; <sup>c</sup> Diferença significativa em relação ao H, p<0,05; <sup>d</sup> Diferença significativa em relação ao HR, p<0,05. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as semanas, com p<0,05.



**Figura 8.** Glicose (mg/dL) determinada através da veia caudal após 30 dias de experimento nos animais do grupo controle, mantidos com ração padrão e água para beber (C), animais que receberam dieta padrão e resveratrol (6mg/L) na água de beber (R), animais que receberam dieta hipercalórica e água para beber (H).



**Figura 9.** Glicose (mg/dL) determinada através da veia caudal após o término do experimento (45 dias) nos animais do grupo controle, mantidos com ração padrão e água para beber (C), animais que receberam dieta padrão e resveratrol (6mg/L) na água de beber (R), animais que receberam dieta hipercalórica e água para beber (H) e animais mantidos com dieta hipercalórica e água para beber durante 30 dias, passando a receber resveratrol (6mg/L) na água de beber durante 15 dias (HR).

**Tabela IX.** Concentração de triacilglicerol sanguíneo nos animais do grupo controle, mantidos com ração padrão e água para beber (C), que receberam dieta padrão e resveratrol (6mg/L) na água de beber (R), animais que receberam dieta hipercalórica e água para beber (H) e animais mantidos com dieta hipercalórica e água para beber durante 30 dias, passando a receber resveratrol (6mg/L) na água de beber durante 15 dias (HR).

Determinações bioquímicas	Grupos			
	<i>C</i>	<i>R</i>	<i>H</i>	<i>HR</i>
Triacilglicerol com 30 dias de experimento (mg/dL)	154,17 ± 27,30	158,00 ± 25,00	156,36 ± 24,79	-
Triacilglicerol com 45 dias de experimento (mg/dL)	143,50 ± 22,95	156,50 ± 29,19	145,33 ± 20,40	134,83 ± 24,24
<b>Média</b>	<b>148,83 ± 7,54</b>	<b>157,25±1,06</b>	<b>156,36 ± 7,80</b>	<b>134,83 ± 24,24</b>

Valores expressos como média ± desvio padrão. <sup>a</sup> Diferença significativa em relação ao C, p<0,05. <sup>b</sup> Diferença significativa em relação ao R, p<0,05; <sup>c</sup> Diferença significativa em relação ao H, p<0,05; <sup>d</sup> Diferença significativa em relação ao HR, p<0,05.

## DISCUSSÃO

Dietas hipercalóricas incluem geralmente aumento nas concentrações de carboidratos e lipídios (ACHENSON, 2004), o acréscimo destes macronutrientes na dieta freqüentemente eleva seu conteúdo calórico (BURNEIKO et al., 2006).

Como esperado a adição de óleo de soja e sacarose induziu elevação no conteúdo calórico da ração. Deste modo, animais do grupo H e HR ingerem maior quantidade de energia, comparado aos grupos C e R (Tabela I). A análise da porcentagem energética dos macronutrientes demonstrou que a dieta hipercalórica apresentava grande parte da energia proveniente de ácidos graxos insaturados, decorrente do uso de óleo de soja, utilizado na sua elaboração. Este fato pode estar associado ao elevado consumo de ácidos graxos totais pelos animais dos grupos H e HR, comparados C e R (Tabelas I, II, III, IV).

A ingestão da dieta hipercalórica não alterou os parâmetros nutricionais, palatabilidade, preferência alimentar e eficiência alimentar, tanto na dieta padrão como na dieta hipercalórica (Tabela VI). A manutenção dos parâmetros nutricionais descritos foi decorrente ao consumo alimentar (Tabela II) e ingestão líquida (Tabela III), os quais não demonstraram alterações significantes entre os grupos experimentais.

Tem sido demonstrado que a sacarose pode elevar o peso corporal quando administrada em solução, ou como suplemento (LAWTON & BLUNDELL, 1992), já que sua metabolização resulta em glicose e frutose, sendo ambas geralmente armazenadas no tecido adiposo. Lipídios da dieta são facilmente depositados no tecido adiposo (KIM et al., 2005). Desde que a dieta hipercalórica utilizada apresentou elevação no conteúdo de sacarose e lipídios, o ganho de peso dos animais pertencentes aos grupos H e HR (Tabela VII), foi associado ao conteúdo calórico da dieta hipercalórica ofertada a estes grupos (Tabela III). A energia total consumida foi elevada nos animais que receberam dieta hipercalórica (Tabela VI, Figura 5), indicando que o consumo de energia

---

que excedeu o gasto energético. O resveratrol não afetou o ganho de peso dos animais aos quais foi administrado (MIURA et al., 2003) e nem a energia ingerida pelos mesmos.

A ingestão de energia é um fator importante na regulação do peso corporal (CHICCO et al., 1999). A massa corporal é rapidamente aumentada na proporção em que aumenta a ingestão de calorias. No entanto, animais que receberam dieta hipercalórica não apresentaram elevação no peso final, circunferência abdominal (CA), circunferência torácica (CT), bem como na relação CA/CT quando comparados aos grupos que receberam dieta padrão (Tabela VII). Este fato indica um não acúmulo de lipídio na região abdominal e, portanto não aparecimento da obesidade nos animais dos grupos H e HR como foi observado através do índice de massa corporal (Tabela VII) que não apresentou diferença significativa entre os grupos experimentais. O resveratrol não afetou o ganho de peso dos animais aos quais foi administrado (MIURA et al., 2003).

Dieta suplementada com frutose e sacarose induz alterações metabólicas em animais, semelhantes às observadas em indivíduos diabéticos (POULSOM, 1986). O consumo de sacarose por períodos longos podem ser o responsável pelo desenvolvimento de resistência a insulina (FRAYN & KINGMAN, 1995).

A resistência à insulina, pode vir a explicar também o não aparecimento de obesidade nos animais que receberam a dieta hipercalórica e, portanto, elevação da glicose sanguínea do grupo H aos 30 dias do período experimental (Tabela VIII, Figura 7). A elevada ingestão de carboidratos, geralmente é responsável pela elevação no índice glicêmico (BRAND-MILLER et al., 2002) e pessoas que consomem alimentos com alto índice glicêmico, e que apresentam hiperglicemia, possivelmente podem estar contribuindo com exaustão de células  $\beta$  e provavelmente podendo desenvolver diabetes tipo 2 (SALMERON et al., 1997), devido ao aumento na demanda pela secreção de insulina (FOSTER-POWELL & BRAND-MILLER, 1995; HOLT et al., 1997) na tentativa

---

---

de conter a hiperglicemia. Elevações na glicemia podem induzir ao estresse oxidativo (BAYNES et al., 1991).

A glicose pode reagir não enzimaticamente com amino grupos terminais de proteínas, ou de lisina por meio de uma reação denominada glicosilação (ISLAN et al., 1995), impedindo a captação de glicose em vários tecidos.

No processo de glicosilação ocorre a condensação da glicose com um grupamento  $\alpha$ -amino, com N-terminal ou grupamento  $\epsilon$ -amino de resíduos de lisina via base de Schiff seguida pela formação de cetoamino (SAKURAI & TSUCHIYA, 1988). Estas condições têm sido apontadas como responsáveis pela geração de ERO em elevada concentração de glicose (OOKAWARA et al., 1992).

O excedente de glicose presente na corrente sanguínea pode estar sendo deslocada para a hemoglobina e oxidada através da via das pentoses (NICOLIELO et al., 2006). A hemácia é uma célula particular porque transporta oxigênio sem consumi-lo, no entanto, em casos envolvendo hiperglicemia, pode ocorrer a formação da hemoglobina glicosilada designada HbA1c, onde a hemácia combina-se a grupos amino do NH<sub>2</sub>-terminal da cadeia  $\beta$  da hemoglobina, e glicose. O grupo aldeído da glicose forma uma base Schiff com grupo amino do NH<sub>2</sub>-terminal, por reação espontânea (não enzimática) conhecida como arranjo de Amadori. A concentração de HbA1c é dependente da concentração de glicose no sangue apresentando-se em grandes concentrações em indivíduos com *diabetes mellitus*, sendo uma das principais complicações envolvendo esta patologia (DEVLIN, 1998).

O excedente de glicose apresentado pelos animais pertencentes ao grupo H pode seguir para o tecido hepático, transformado em ácidos graxos e armazenado na forma de triacilglicerol (CHAMPE et al., 2007).

Animais do grupo HR não apresentaram diferença significativa em parâmetros nutricionais, já que segundo JUAN et al (2001), tanto o consumo alimentar, quanto a ingestão líquida e a eficiência alimentar não são afetados pelo consumo de resveratrol. WANG et al. (2005) estudando o efeito do

---

---

resveratrol em coelhos mantidos com dieta hipercolesterolêmica reportaram que o resveratrol foi bem tolerado pelos animais experimentais, o consumo de resveratrol pode ser observado na Tabela V. Resveratrol (trans- 3, 5, 4' trihidroxiestilbeno), é o principal polifenol presente em uvas. É reportado como agente antioxidante, antiinflamatório, anti plaquetário, capaz de inibir a aterosclerose (PERVAIZ, 2003). A casca da uva constitui excelente fonte de resveratrol que pode ser consumido na fruta fresca ou em seus subprodutos como vinhos e sucos (TOMERA, 1999).

Ao término do período experimental, 45 dias, o grupo HR apresentou redução na glicemia de jejum quando comparado ao grupo H, evidenciando uma possível ação hipoglicemiante do resveratrol em condições de elevada ingestão calórica (Tabela VIII, Figura 8). A ação hipoglicemiante do resveratrol pode estar associada à monofosfato de adenosina ativador de proteína quinase (AMPQ) que aumenta a captação de glicose pelo músculo esquelético (PARK et al., 2007).

AMPQ constitui um sensor que regula o metabolismo de glicose e lipídios. Quando ativado pela ligação alosterica ao AMP (monofosfato de adenosina) ou fosforilação de sua unidade catalítica Thr 172, o AMPQ acelera vias catabólicas incluindo a oxidação de glicose e ácidos graxos, gerando ATP (trifosfato de adenosina) (MAKINDE et al., 1997, ZONG et al., 2002).

Durante os trinta primeiros dias de experimento, os animais do grupo R (resveratrol) os quais ingeriram dieta padrão e receberam resveratrol na água de beber (6mg/L), apresentaram glicemia de jejum reduzida quando comparado ao grupo C (controle) indicando uma possível ação hipoglicemiante do resveratrol neste grupo (Tabela VIII) talvez devido ao mesmo mecanismo de ação via ativação de AMPQ. Aos 45 dias os animais do grupo R não apresentaram redução na glicemia de jejum quando comparado ao grupo C, fato que pode estar associado a possível desenvolvimento de intoxicações pela administração contínua de resveratrol aos animais pertencentes a este grupo.

---

---

A insulina estimula a atividade da lipoproteína lípase inibindo a lipólise (NIEMEIJER-KANTERS et al., 2001), no entanto, em condições de resistência a insulina, a deficiência da lipoproteína lípase, leva a hipertrigliceridemia em jejum e pós-prandial. Entretanto, animais dos grupos H e HR não apresentaram hipertrigliceridemia no jejum como observado na Tabela IX, mesmo com elevada ingestão de ácidos graxos totais (Tabela III, Figura 2). A manutenção na trigliceridemia pode estar associada á combinação de sacarose e ácidos graxos os quais fazem parte da dieta hipercalórica. Estudos recentes têm demonstrado o papel de ácidos graxos insaturados na redução da trigliceridemia (DINIZ et al., 2005), fato associado a menor deposição destes ácidos graxos no tecido adiposo, pois a presença de duplas ligações em ácidos graxos insaturados produz dobras em sua cadeia e dificulta a aproximação dos ácidos graxos (NOVELLI, 2005) e, portanto sua deposição no tecido adiposo (DINIZ et al., 2005).

Os resultados deste capítulo permitiram concluir que a dieta hipercalórica induziu elevação no ganho de peso dos animais e elevou a glicemia, embora não tenha induzido alteração na concentração de triacilglicerol sérico. Administração de resveratrol reduziu a glicemia no jejum independente da dieta ingerida.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

- Asensi M, Medina I, Ortega A, Carretero J, Banô MC, Obrador E, Estrela J. Inhibition of câncer growth by resveratrol is related to its low bioavailability. *Free Rad. Biol. & Med.* 2002; 33: 387-398.
- Abuja P M, Albertini R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin. Chim. Acta.* 2001; 306: 1-17.
- Achenson KJ. Carbohydrate and weight control: where do we stand? *Current Opinion in Clinical Nutr. and Metab. Care.* 2004; 7: 485-492.
- Arai K, Maguchi S, Fuji S, Ishibashi H, Oikawat K, Taniguchi N. Glycation and inactivation of human Cu-Zn-superoxide dismutase. *The J. of Biol. Chemistry.* 1987; 262: 16969-16972.
- Astley S.B. Dietary antioxidants - past, present and future? *Trends Food Sci. Technol.* 2003; 14:93-98.
- Bradamante S, Barengi L, Piccinini F, Bertelli AAE, Jonge R, Beemster P, Jong JW. Resveratrol provides late-phase cardioprotection by means of a nitric-oxide adenosine-mediated mechanism. *Eur. J. Pharmacol.* 2003; 465:115- 123.
- Burneiko RCM, Diniz YS, Galhardi CM, Rodrigues HG, Ebaid GMX, Faine LA, Padovani CR, Cicogna AC, Novelli ELB. Interaction of hypercaloric diet and physical exercise on lipid profile, oxidative stress and antioxidant defenses. *Food and Chem. Toxicol.* 2006; 44: 1167-1172.

---

\* International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted journal. *N. Engl. J. Med.* 1997; 336: 309-315.

- 
- Chanutin A, Ludwig S. The effect of cholesterol ingestion on tissue lipids of rats. *The J. of Biol. Chem.* 1933; 57-65.
- Chicco A, Bernal C, Giangrosso BS, Lombardo Y. Dietary effects of partial or total substitution of sucrose for starch on glucose and lipid metabolism in dyslipidemic rats. *Nutr. Research.* 1999; 19: 281-293.
- Costa NMB, Walker AF, Low AG. The effect of graded inclusion of baked beans (*Phaseolus vulgaris*) on plasma and liver lipids in hypercholesterolaemic pigs given a Western - type diet. *Br. J. Nutr.* 1993; 70: 515 - 524.
- Curi PR. *Metodologia e análise da pesquisa em ciências biológicas* 1997; Botucatu: Tipomic Editora, p. 263.
- Devlin TM. *Manual de Bioquímica*, 1998, Philadelphia, quarta edição, editora: Edgard Blucher Ltda, p. 1007.
- Diniz YS, Faine LA, Galhardi CM, Rodrigues HG, Ebaid GMX, Burneiko RC, Cicogna AC, Novelli ELB. Monosodium glutamate in standard and high-fiber diets: metabolic syndrome and oxidative stress in rats. *Nutr.* 2005; 21: 749-755.
- Diniz YS, Faine LA, Almeida JA, Silva MDP, Ribas BO, Novelli ELB. Toxicity of dietary restriction of fat enriched diets on cardiac tissue. *Food and Chem. Toxicol.* 2002; 40: 1893-1899.
- Dong Z. Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol. *Mutation Research.* 2003; 523-524: 145-150.
- Ebaid GMX, Faine LA, Diniz YS, Rodrigues HG, Galhardi CM, Ribas BO, Fernandes AAH, Novelli ELB. Effects of digitonin on
-



- Kim JH, Hahm DH, Yang DC, Kim JH, Lee HJ, Shim I. Effect of crude saponin of Korean red ginseng on high - fat diet-induced obesity in the rat. *J. Pharmacol. Sci.* 2005; 97: 124-131.
- Lawton CL, Blundell JE. The effect of d-fenfluramine on intake of carbohydrate supplements is influenced by the hydration of the test diets. *Behavioural Pharmacology.* 1992; 3: 517-523.
- Lazárová M, Stejskal D, Lacnák B, Václavík J, Ochmanová R, Hanák V, Skácelová M. The antioxidant acetylcysteine reduces oxidative by decreasing level of AOPPS. *Biomed. Papers.* 2004; 148: 131-133.
- Maecher P, Wollheim CB, Bentzen CL, Niesor E. Role of the intestinal acyl-CoA: cholesterol acyltransferase activity in the hyperreponse of diabetic rats to dietary cholesterol. *J. of Lipid Research.* 1992; 33: 1475-1483.
- Martinez J, Moreno J. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochemical Pharmacology.* 2000; 59: 865-870.
- Miura D, Miura Y, Yagasaki K. Hypolipidemic action of dietary resveratrol, a phytoalexin in grapes and red wine, in hepatoma-bearing rats. *Life Sci.* 2003; 73: 1393-1400.
- Mahfouz MM, Kummerow FA. Cholesterol-rich diets have different effects on lipid peroxidation, cholesterol oxides, and antioxidant enzymes in rats and rabbits. *J. Nutr. Biochem.* 2000; 11: 293-302.
- Moura RA. *Técnicas de laboratorio* 1982, São Paulo: Atheneu Editora, 822p.
- Novelli ELB, Fernandes AAH, Campos KE, Diniz YS, Almeida JA, Faine LA, Ribas BO. The adverse effect of a high energy dense diet on cardiac tissue. *J. of Nutr. & Environ. Med.* 2002; 12 (4): 287-294.
- Novelli ELB. *Nutrição e vida saudável: estresse oxidativo e metabolismo energético*, 2005, Ribeirão Preto, editora: Tecmedd, p. 288.

- 
- Ookawara T, Kawamura N, Kitagawa Y, Taniguchi N. Site-specific and random fragmentation of Cu, Zn-Superoxide dismutase by glycation reaction. *The J. of Biol. Chem.* 1992; 267: 18505-18510.
- Quiles JL, Ochoa JJ, Huertas JR, Mataix J. Coenzyme Q supplementation protects from age-related DNA double-strand breaks and increases lifespan in rats fed on a PUFA-rich diet. *Exp. Gerontology.* 2004; 39: 189-194.
- Reeves PG. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J. of Nutr.* 1997; 127: 838S-841S.
- Sakurai T, Tsuchiya S. Superoxide production from nonenzymatically glycosylated protein. *FEBS.* 1988; 236: 406-410.
- Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction and aging. *Sci.* 1996; 273: 59-63.
- Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clin. Biochem.* 1997; 30: 91-112.
- Soria A, D' Alessandro ME, Lombardo YB. Duration of feeding on a sucrose-rich diet determines metabolic and morphological changes in rat adipocytes. *J. Appl. Physiol.* 2001; 91: 2109-2116.
- Taiz L, Zeiger E. *Fisiologia vegetal*, 2004, Porto Alegre, editora: Artmed, terceira edição, p.719.
- Tomera JF. Current knowledge of the health benefits and disadvantages of wine consumption. *Food Science & technology.* 1999; 10: 129-138.
- Unger RH, Orci L. Diseases of liporegulation: new perspective on obesity and related disorders. *FASEB J.* 2001; 15: 312-321.
- Wang Z, Zou J, Cao K, Hsieh T, Huang Y, Wu J. Dealkoholized red wine containing known amounts of resveratrol suppresses atherosclerosis
-

---

in hypercholesterolemic rabbits without affecting plasma lipid levels. *Int. J. of Molecular Méd.* 2005;16: 533-540.

---

# *CAPÍTULO II*

*Perfil lipídico e estresse oxidativo séricos:*

*Ação do resveratrol em animais*

*submetidos a ingestão de dieta*

*hipercalórica*

---

## ABSTRACT

This study were undertaken to analyze the effects of resveratrol on lipid profile and oxidative stress in rats submitted the hypercaloric diet. Twenty four Wistar rats were divided into 3 groups. C group (control, n=6); R group (resveratrol, n=6) received standard diet as C group and treated with resveratrol (6mg/L) in drinking water; H group (hypercaloric, n=12), received hypercaloric diet and drinking water for 30 days, when were divided into 2 groups; H (n=6) and HR (n=6) received hypercaloric diet as H group and resveratrol in drinking water as R group for 15 days. After 45 days of treatment, the blood and liver were colleted for biochemistry determinations. H rats had higher serum glucose, total cholesterol, LDL-cholesterol (LDL), total antioxidant substances (TAS) and lactate dehydrogenase, as well as LDL/Triacilglycerol (TG) and TAS/lipid hydroperoxide (HP) than C group. Rats fed hypercaloric diet had lower HDL-cholesterol and HDL/TG, HDL/LDL ratios than C. Resveratrol administration in hypercaloric diet fed rats decreased LDL oxidation and increased HDL/TG ratio was related to reduced LDL and HDL interaction and/or due apolipoprotein B copper chelating activity. The increased LDH activity was attributed to resveratrol toxicity. In conclusion, resveratrol had beneficial effects on lipid profile and oxidative stress decreasing ox-LDL, and enhancing HDL-cholesterol and HDL/TG ratio.

## RESUMO

Neste capítulo foram analisados os efeitos do resveratrol sobre o perfil lipídico e estresse oxidativo séricos em ratos submetidos à dieta hipercalórica. Utilizou-se 24 ratos Wistar, divididos em 3 grupos: C (controle, n=6), que recebeu dieta padrão e água, R (n=6), que recebeu dieta padrão e resveratrol (6mg/L) na água de beber; e grupo H (n=12) que recebeu dieta hipercalórica e água de beber até o 30º dia de experimento, quando foi dividido em 2 subgrupos: H (n=6), e HR (n=6) que recebeu dieta como no grupo H, e resveratrol (6mg/L) na água de beber durante 15 dias. Após 45 dias de experimento o sangue e o fígado foram coletados para as determinações bioquímicas. A ingestão de dieta hipercalórica elevou as concentrações de glicose, colesterol total, LDL-colesterol, e a relação LDL-colesterol/triacilglicerol (TG), reduzindo a concentração de HDL-colesterol, bem como as relações HDL/TG e HDL/LDL, fatores relacionados à síndrome metabólica. H e HR apresentaram elevação nas concentrações de substâncias antioxidantes totais (SAT) e a relação SAT/hidroperóxido de lipídio (HP), aumentando a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH). Os resultados demonstraram que a dieta hipercalórica foi responsável pela elevação na concentração de LDL-colesterol nos animais dos grupos H e HR, elevando também as concentrações de LDL-oxidada (LDL-ox) no grupo H. A administração de resveratrol em animais que receberam dieta hipercalórica, impediu oxidação da LDL, e elevou as concentrações de HDL-colesterol, bem como a relação HDL/TG, provavelmente impedindo a interação da LDL com HDL e/ou quelando o cobre presente em sua apolipoproteína B. O resveratrol elevou a atividade da LDH em animais tratados, indicando um possível efeito tóxico do polifenol quando utilizado por períodos longos. Conclui-se, que o tratamento com resveratrol impediu elevação na concentração de LDL-ox e redução na concentração de HDL, elevando a relação HDL/TG no soro dos animais aos quais foi administrado, atuando como agente antioxidante.

## INTRODUÇÃO

### 1. DIETA HIPERCALÓRICA E ESTRESSE OXIDATIVO

Alterações na composição de dietas modificam a forma com que a energia proveniente destas dietas é utilizada levando ao aumento nos depósitos de gordura (SMITH et al., 1998). Carboidratos e proteínas, quando obtidas em excesso em relação às necessidades desses compostos, podem ser convertidos em ácidos graxos, que são armazenados como triacilgliceróis (CHAMPE et al., 2007).

Dietas hipercalóricas ricas em sacarose e lipídios têm sido associadas à elevada incidência de obesidade, dislipidemia e aterosclerose.

Embora muito tenha sido estudado sobre os efeitos adversos do consumo de dietas hipercalóricas, os efeitos da ingestão de dietas contendo combinação de colesterol e sacarose, sobre os marcadores de estresse oxidativo no soro e no tecido hepático ainda não foram estabelecidos.

A ingestão elevada de calorias estaria relacionada à diminuição na capacidade metabólica de nutrientes no organismo e aumento na taxa metabólica (STEVENSON et al., 1964). A utilização de oxigênio no metabolismo de nutrientes é necessária a sobrevivência de organismos aeróbicos. No entanto, o oxigênio pode ter efeitos tóxicos e ser prejudicial a longo prazo (SOHAL & WEINDRUCH, 1996). Estudos demonstram que pode ocorrer cerca de 1 a 2% de erro na transferência de elétrons para o oxigênio durante a respiração celular, resultando na formação de radicais livres (FEUERS, 1998).

Segundo BECKMAN & AMES (1998), a dieta hipercalórica aumenta a produção de radicais livres, induzindo estresse oxidativo que é definido como o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e as defesas celulares (NISHIYAMA et al., 1998). Diversos estudos têm demonstrado que o aumento no consumo de calorias exerce efeitos deletérios na saúde ao induzir danos oxidativos (NOVELLI et al., 2002; DINIZ et al.,

---

2004) e alterações patológicas como aumento das modificações degenerativas observadas no envelhecimento (DROGE, 2002).

Durante o estresse oxidativo, ERO, tais como o radical superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxil ( $OH^-$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) podem produzir danos, como a peroxidação de lipídios insaturados das membranas celulares. A peroxidação lipídica de membranas celulares pode levar a perda da função das mesmas através da inativação de receptores de enzima ligados à membrana, podendo aumentar sua permeabilidade não específica, levando a lise celular (GUTTERIDGE & HALIWELL, 1990).

A noção que estresse oxidativo contribui para alterações cardiovasculares foi originalmente fornecida pela observação que a modificação oxidativa da LDL, particularmente das LDL menores e mais compactas, formando LDL-oxidada (BRADAMANTE et al., 1992), constitui importante fator de risco podendo induzir a formação de células espumosas iniciando o processo de aterosclerose (HUIX et al., 2002).

Em vários órgãos o dano celular provocado pelo estresse oxidativo é seguido pela liberação de enzimas citoplasmáticas para o sangue, permitindo o diagnóstico de doenças relacionadas a órgãos como fígado e coração (SUNDBERG et al., 1994). As correlações entre características metabólicas de alguns tecidos e a atividade de enzimas no soro têm sido amplamente estudadas e constituem a base do diagnóstico clínico.

Estudos experimentais têm reportado que alterações metabólicas induzidas por dietas hipercalóricas são inibidas pela terapia antioxidante, sugerindo que o estresse oxidativo tem importante papel nas alterações metabólicas da obesidade (LEE et al., 1999).

## **2. PAPEL DOS POLIFENÓIS PRESENTES NA DIETA**

Recentemente tem aumentado o interesse na descoberta de substâncias naturais capazes de atuar como antioxidantes, podendo conter ou mesmo reverter danos causados pelo estresse oxidativo.

---

---

Estudos epidemiológicos têm demonstrado consistentemente a associação positiva entre o consumo de frutas e vegetais, com alto conteúdo de polifenóis, com redução nas taxas de mortalidade por doenças cardiovasculares, câncer e outras patologias degenerativas (DILLARD & GERMAM, 2000).

Os polifenóis são compostos que incluem flavonóides e ácidos fenólicos entre outros metabólitos (MANACH et al., 1997).

Flavonóides e ácidos fenólicos (polifenóis encontrados em abundância em plantas) têm sido investigados *in vitro* devido a possíveis atividades antioxidantes destes compostos (WHITEHEAD et al., 1995). O consumo de dieta rica em polifenóis contribui com os benefícios cardiovasculares através de suas propriedades antioxidantes e antiinflamatórias (OU et al., 2006).

Resveratrol (3,5,4', - trihidroxiestilbeno) tem sido identificado em 72 espécies de plantas distribuídas em 31 gêneros e 12 famílias (ACQUAVIVA et al., 2002), muitas incluídas na dieta humana como amoras, amendoins e uvas (SOLEAS et al., 1997). O resveratrol em sua forma *trans* presente principalmente em vinhos tintos, é reportado como protetor de células endoteliais contra apoptose e acúmulo de cálcio (OU et al., 2006).

Resveratrol tem sido citado por sua capacidade em eliminar ERO e outros radicais livres, além de inibir a peroxidação lipídica de membranas celulares, bem como inibir danos ao DNA (ácido desoxirribonucléico) causados por radicais hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ) (LEONARD et al., 2003).

O papel do resveratrol no perfil lipídico sérico vem sendo alvo de discussão entre vários pesquisadores. Segundo SOLEAS et al. (1997), o resveratrol foi responsável pela redução intracelular na taxa de secreção de ésteres de colesterol, bem como da taxa de secreção de triacilglicerol em culturas de células hepáticas. O resveratrol foi capaz de inibir a peroxidação lipídica de membranas (FAUCONNEAU et al., 1997) e reduzir a concentração de lipoproteínas de baixa e de muito baixa densidade (FRANKEL et al., 1993) através da modulação do metabolismo de lipoproteínas (MENG et al., 2005),

---

---

condições que ajudam na prevenção de doenças cardiovasculares. ARICHI et al. (1980), reportaram benefícios do resveratrol no perfil lipídico de ratos alimentados com óleo de milho e colesterol, com redução nas concentrações de triacilglicerol e colesterol total no fígado destes animais.

No entanto, alguns pesquisadores reportaram que a administração de resveratrol não é capaz de alterar o perfil lipídico sérico de animais. WILSON et al. (1996), por exemplo, não observaram alteração no perfil de lipoproteínas entre os grupos controle e tratados com resveratrol, bem como ZERN et al. (2003) que reportaram que a administração de polifenóis presentes na uva não provocou alterações nas concentrações de colesterol no plasma e tecido hepático de suínos. Segundo WANG et al. (2005), resveratrol não alterou o perfil lipídico sérico de ratos que ingeriram dieta rica em colesterol.

Tendo em vista estas controvérsias, o presente capítulo objetivou analisar os efeitos da administração do polifenol resveratrol sobre o perfil lipídico sérico de ratos submetidos à dieta hipercalórica.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. ANIMAIS

Foram utilizados um total de 24 ratos machos adultos *Wistar*, de peso médio  $289,03 \pm 16,65$  gramas. Os animais foram provenientes do Biotério Central da UNESP, "campus de Botucatu", e transferidos para o "Laboratório de Bioquímica na Experimentação Animal" do Departamento de Química e Bioquímica, Instituto de Biociências, UNESP/Botucatu, onde permaneceram durante todo o período experimental, à temperatura de  $22 \pm 3^\circ\text{C}$ , período claro/escuro de 12 horas.

Os animais foram mantidos em gaiolas de plástico individuais, recebendo dieta basal (Biobase, SP, Brasil) e água destilada *ad libitum*. Para permitir a aclimação dos animais, os ratos permaneceram nas condições

---

---

acima citadas por um período de 15 dias antes do início do experimento. Diariamente as gaiolas foram limpas.

Inicialmente, os animais foram divididos em 3 grupos. O grupo C (n=6) foi considerado controle. O grupo R recebeu resveratrol dissolvido na água de beber (6mg/L) e o grupo H (n=12) foi submetido a hiperlipidemia através da ingestão de dieta com elevada concentração de colesterol (COSTA et al, 1993) e sacarose.

Para o estudo dos efeitos da ingestão de resveratrol em animais hiperlipidêmicos, após 30 dias de consumo da dieta rica em colesterol e sacarose, os animais do grupo H foram divididos em 2 sub-grupos (n=6), recebendo diferentes tratamentos por mais 15 dias. O sub-grupo H continuou recebendo dieta rica em colesterol e sacarose. O grupo HR recebeu a mesma dieta do grupo H e resveratrol como no grupo R.

O consumo alimentar e a ingestão de líquido foram controlados diariamente, no mesmo horário (9:00 as 11:00 horas). Diariamente foi ofertada 50g de ração e 60 mL de líquido por animal. O consumo alimentar diário foi obtido pela subtração da dieta ofertada e o peso da dieta restante, após o consumo *ad libitum* em 24 horas. A ingestão de líquidos foi obtida pela subtração da água ou solução ofertada e quantidade restante, após consumo *ad libitum* em 24 horas.

Os animais foram pesados antes do início do experimento e semanalmente durante todo o período experimental. Foram determinados as circunferências abdominais, torácicas e o comprimento dos animais ao final do experimento.

Foram calculados os parâmetros nutricionais (DINIZ et al., 2002; NOVELLI et al., 2002; EBAID et al., 2005), consumo de proteínas (g/dia), consumo de ácidos graxos (g/dia), ingestão de carboidratos (g/dia), energia ingerida (Kcal/dia), preferência alimentar (%), palatabilidade (%), eficiência alimentar (%) e taxa de ingestão voluntária (%).

---

---

Como parâmetro morfométrico foi utilizado o índice de massa corporal (IMC). O IMC foi calculado dividindo - se o peso dos animais (g) pelo seu comprimento ao quadrado (cm<sup>2</sup>).

A dose de resveratrol foi estimada para corresponder a sua ingestão diária contida em 1 litro e meio de suco de uva por dia (DONG, 2003) para humanos de 70 Kg, corrigida de acordo com a ingestão diária por Kg de peso para os animais (HABOLD et al., 2004). O resveratrol foi dissolvido em água (6mg/L), usando-se etanol como carreador (25mg resveratrol/1mL etanol). Nesta dose, o etanol não possui efeito farmacológico ou sinérgico (TURNER et al., 1999). O resveratrol é sensível à luz, portanto todos os bebedouros foram totalmente cobertos por folhas de papel alumínio durante o decorrer do experimento (BRADAMANTE et al., 2003).

## **2. OBTENÇÃO DE AMOSTRAS**

Ao término do experimento (45 dias), após jejum de 12 horas os animais foram anestesiados (pentobarbital sódico 3%, 0,1mL, i.p.), e sacrificados por fratura cervical e decapitação. O sangue foi coletado em tubos de ensaio, com auxílio de funil. O soro foi separado por centrifugação a 3.000 rpm e utilizado para a determinação de proteínas totais, lipídios, glicose, hidropéroxido de lipídio, substâncias antioxidantes totais (SAT), LDL-oxidada e das atividades da enzima lactato desidrogenase.

## **3. DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS**

A análise do estresse oxidativo foi realizada através da concentração de substâncias antioxidantes totais (SAT) (MILLER, et al., 1993), assim como análise de marcadores da lipoperoxidação como hidropéroxido de lipídio (HP) (JIANG et al., 1991) e a concentração da LDL-oxidada no soro (SCOCCIA et al., 2001).

Triacilgliceróis foram determinados enzimaticamente na presença de lipase lipoproteica, glicerolquinase, glicerol fosfato oxidase, ATP e peróxido de hidrogênio (MOURA, 1982). A LDL-colesterol foi obtida

---

segundo cálculo de FRIEDEWALD et al. (1972). O colesterol foi determinado enzimaticamente pela colestrol oxidase (MOURA, 1982) com hidrólise enzimática prévia dos ésteres, mediante uma lipase. As lipoproteínas de baixa e muito baixa densidade (LDL e VLDL) foram precipitadas seletivamente pelo ácido fosfotungstico. No sobrenadante ficam as HDL determinadas pelo colesterol ligado a elas (LOPES VIRELLA et al., 1977). As determinações de proteínas totais foram realizadas segundo MOURA (1982).

A atividade da LDH foi determinada pela oxidação do NADH a 340nm, tendo o piruvato como substrato (BASS et al., 1969).

#### 4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Na obtenção de valores significantes, o teste t foi utilizado para comparações entre dois grupos, através do software InStat 3.0. O nível de significância foi  $p < 0,05$  (CURI, 1997).

Comparações entre parâmetros nutricionais e metabólicos séricos foram analisados através da correlação linear de Pearson. O nível de significância foi estimado com  $p < 0,05$  (SMITH et al., 1998).

### RESULTADOS

Na Tabela I pode-se observar elevação na concentração de glicose no soro dos animais pertencentes aos grupos H e HR quando comparados ao C. O resveratrol não apresentou efeitos na concentração de glicose sérica nos animais pertencentes aos grupos R e HR em relação aos grupos C e H respectivamente.

A administração de dieta hipercalórica foi responsável pela elevação nas concentrações de colesterol total e LDL-colesterol nos animais dos grupos H e HR quando comparados ao C (Tabela I). A Tabela I demonstra que os animais que ingeriram a dieta rica em colesterol e sacarose (H e HR) apresentaram redução na relação HDL/LDL e elevação na relação LDL/TG

---

comparados aos demais grupos experimentais. Animais do grupo H apresentaram redução na concentração de HDL-colesterol e na relação HDL/TG quando comparados ao C (Tabela I).

Resveratrol reduziu a concentração de LDL-oxidada no grupo R em relação ao C e no grupo HR em relação a H (Tabela I). A relação HDL/TG expressa na Tabela I apresentou-se elevada em HR quando comparada a H. No entanto o grupo R apresentou a relação HDL/TG reduzida em relação ao C.

As concentrações de proteína total, triacilglicerol, VLDL-colesterol e apolipoproteína B não apresentaram diferença significativa entre os grupos (Tabela I).

Na Tabela II observar-se que animais pertencentes aos grupos H e HR apresentaram elevação nas concentrações de substâncias antioxidantes totais (SAT), na relação SAT/HP e na atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) em relação ao grupo C. As concentrações de hidroperóxido de lipídio não apresentaram diferença significativa entre os grupos.

Houve elevação na relação SAT/HP e na atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) nos grupos R, H e HR quando comparados ao C (Tabela II).

Observando-se a correlação entre a variável nutricional (Tabela III, Capítulo I), e a variável sérica (Tabela I), observamos valores significativamente positivos entre consumo de lipídios e LDL-colesterol (Figura 1).

---

**Tabela I.** Concentrações de proteína total, glicose, triacilglicerol (TG), colesterol total (CT), lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteína de elevada densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL), LDL-oxidada (LDL-ox), apolipoproteína B (Apo B) e relações HDL/LDL, HDL/TG e LDL/TG no soro dos grupos controle, mantidos com ração padrão e água de beber (C), que receberam dieta padrão e resveratrol (6mg/L) na água de beber (R), animais que receberam dieta hipercalórica e água de beber (H) e animais mantidos com dieta hipercalórica e água de beber durante 30 dias, passando a receber resveratrol (6mg/L) na água de beber durante 15 dias (HR).

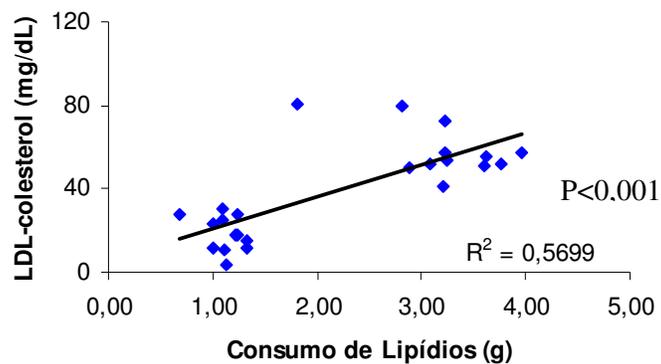
	<i>Grupos</i>			
	<i>C</i>	<i>R</i>	<i>H</i>	<i>HR</i>
Proteína Total (g/dL)	7,77 ± 0,43	7,72 ± 0,30	7,75 ± 0,41	7,47 ± 0,27
Glicose (mg/dL)	135,13 ± 11,38 <sup>c</sup>	145,08 ± 11,86	178,53 ± 18,62 <sup>a</sup>	166,96 ± 19,03
Triacilglicerol (mg/dL)	138,90 ± 18,71	154,50 ± 12,01	145,30 ± 20,40	134,80 ± 24,24
Colesterol Total (mg/dL)	55,17 ± 10,67 <sup>c</sup>	65,51 ± 15,95	96,77 ± 17,40 <sup>a</sup>	92,46 ± 10,32
VLDL-Colesterol (mg/dL)	27,78 ± 3,74	30,90 ± 2,40	29,07 ± 4,08	26,97 ± 4,84
LDL-colesterol (mg/dL)	17,17 ± 9,37 <sup>c</sup>	20,06 ± 7,70	60,34 ± 10,11 <sup>a</sup>	56,85 ± 8,03
HDL-colesterol (mg/dL)	10,22 ± 1,25 <sup>c</sup>	9,09 ± 0,70	7,20 ± 1,50 <sup>a</sup>	8,64 ± 1,30
LDL-ox (μmol/mmol)	5,40 ± 0,88 <sup>bc</sup>	1,04 ± 0,51 <sup>a</sup>	3,17 ± 0,66 <sup>ad</sup>	1,79 ± 0,86 <sup>c</sup>
Apo B (g/dL)	0,18 ± 0,02	0,17 ± 0,02	0,19 ± 0,04	0,18 ± 0,01
HDL/LDL	0,785 ± 0,152 <sup>bc</sup>	0,512 ± 0,124 <sup>a</sup>	0,125 ± 0,039 <sup>a</sup>	0,155 ± 0,034
HDL/TG	0,071 ± 0,009 <sup>c</sup>	0,059 ± 0,004	0,050 ± 0,008 <sup>ad</sup>	0,067 ± 0,01 <sup>c</sup>
LDL/TG	0,125 ± 0,072 <sup>c</sup>	0,132 ± 0,059	0,416 ± 0,092 <sup>a</sup>	0,428 ± 0,063

Valores expressos como média ± desvio padrão.<sup>a</sup> Diferença significativa em relação ao C, p<0,05. <sup>b</sup> Diferença significativa em relação ao R, p<0,05; <sup>c</sup> Diferença significativa em relação ao H, p<0,05; <sup>d</sup> Diferença significativa em relação ao HR, p<0,05.

**Tabela II.** Concentrações de hidroperóxido de lipídio (HP), substâncias antioxidantes totais (SAT), relação SAT/HP e atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) no soro dos grupos controle, mantidos com ração padrão e água de beber (C), que receberam dieta padrão e resveratrol (6mg/L) na água de beber (R), animais que receberam dieta hipercalórica e água de beber (H) e animais mantidos com dieta hipercalórica e água de beber durante 30 dias, passando a receber resveratrol (6mg/L) na água de beber durante 15 dias (HR).

Determinações Bioquímicas	<i>Grupos</i>			
	<i>C</i>	<i>R</i>	<i>H</i>	<i>HR</i>
Hidroperóxido de Lipídio (nmol/mL)	4,52 ± 0,38	4,27 ± 0,15	4,18 ± 0,44	4,09 ± 0,17
SAT (%)	71,12 ± 5,90 <sup>c</sup>	75,01 ± 2,74	81,69 ± 6,01 <sup>ad</sup>	78,23 ± 3,39 <sup>c</sup>
SAT/HP	15,26 ± 1,89 <sup>b</sup>	17,60 ± 1,30 <sup>a</sup>	19,88 ± 1,93 <sup>a</sup>	19,15 ± 1,67
LDH (nmol/dL)	84,15 ± 9,23 <sup>b</sup>	259,67 ± 12,68 <sup>a</sup>	279,44 ± 26,17 <sup>a</sup>	287,60 ± 29,60

Valores expressos como média ± desvio padrão.<sup>a</sup> Diferença significativa em relação ao C, p<0,05. <sup>b</sup> Diferença significativa em relação ao R, p<0,05; <sup>c</sup> Diferença significativa em relação ao H, p<0,05; <sup>d</sup> Diferença significativa em relação ao HR, p<0,05.



**Figura 1.** Correlação entre consumo de lipídio (g) e concentração de LDL-colesterol (mg/dL) nos animais do grupo controle, mantidos com ração padrão e água para beber (C), que receberam dieta padrão e resveratrol (6mg/L) na água de beber (R), animais que receberam dieta hipercalórica e água para beber (H) e animais mantidos com dieta hipercalórica e água para beber durante 30 dias, passando a receber resveratrol (6mg/L) na água de beber durante 15 dias (HR). Valores de "r" e "p" obtidos através da Correlação de Pearson, diferenças consideradas significantes com  $p < 0,05$ .

---

## DISCUSSÃO

Dietas hipercalóricas podem induzir alterações metabólicas como hipertensão, diabetes, dislipidemia, obesidade e estresse oxidativo. Em estudos realizados com animais tem sido observado que a taxa de oxidação de carboidratos e lipídios presentes na dieta pode influenciar na composição corporal (ROSADO & MONTEIRO, 2001) e que carboidratos têm prioridade na oxidação (BLUNDELL & GREEN, 1996) em relação aos lipídios (DAHER et al., 1997).

Os alimentos têm assumido o status de "alimentos funcionais", os quais podem promover efeitos fisiológicos maléficos quando ingeridos de forma desequilibrada e benéficos ao prevenir o aparecimento de doenças crônico-degenerativas (KAUR & KAPOOR, 2001).

No presente trabalho a ingestão de dieta hipercalórica proporcionou um aporte de energia que excedeu os gastos energéticos do organismo, fator que resultou na elevação do ganho de peso (Capítulo I, Tabela VII) e na elevação da concentração glicose sérica no soro dos animais que receberam dieta hipercalórica (Tabela I). As elevações nas concentrações de glicose sérica e glicose tecidual conduzem a deteriorização estrutural e funcional dos tecidos (HAYOZ et al., 1998).

O excedente de energia proporciona elevação nas concentrações de acetil -Coenzima A, ATP e NADPH os quais inibem a enzima piruvato-desidrogenase, ativando a enzima malonil-Coenzima A que é responsável pela síntese de ácidos graxos no tecido adiposo na forma de triacilglicerol, ocorrendo a expansão do tecido adiposo e ganho de peso. O acúmulo de lipídios constitui um fator importante no desenvolvimento de resistência a insulina (CHAMPE et al., 2007). O

---

---

desenvolvimento de resistência a insulina poderia impedir a biossíntese de ácidos graxos, e assim aumentar concentração de glicose no sangue, como ocorreu com animais que receberam dieta hipercalórica (Tabela I). O consumo de colesterol presente na dieta desenvolve aumento na concentração plasmática de colesterol (Tabela I), mantendo normal a concentração de triacilglicerol (MENGHERI et al., 1985).

Após período absorptivo, os nutrientes são transportados através de lipoproteínas para serem distribuídos aos tecidos. Os lipídios endógenos são transportados pela lipoproteína VLDL que é produzida pelo fígado e secretada no plasma e conduz os lipídios do fígado para tecidos periféricos.

A via exógena utiliza produtos da digestão e absorção de lipídios da dieta para produzir quilomicrons, enquanto a via endógena produz VLDL a partir de precursores endógenos. Os quilomicrons, lipoproteínas formadas nas células da mucosa intestinal são responsáveis pelo transporte de triacilgliceróis, colesterol da dieta, vitaminas e ésteres de colesterol, atingem o plasma onde sofrem ação da lipase lipoprotéica que degrada os triacilgliceróis liberando ácidos graxos para tecido adiposo e glicerol para o fígado. O metabolismo de remanescentes envolve o catabolismo de lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) e remanescentes de quilomicrons.

Ligada à membrana basal de células, particularmente dos tecidos adiposo e musculares (esquelético e cardíaco), encontra-se a lipase lipoprotéica (LPL, E.C.1.1.3.4.). A ativação da LPL inicia o processo de hidrólise de VLDL, permitindo a liberação de ácidos graxos a partir de triacilgliceróis para os tecidos, produzindo IDL. Após transferência de grande parte de seu conteúdo de triacilgliceróis, as IDL originam as LDL.

A via exógena corresponde ao transporte de lipídios disponíveis para absorção no trato intestinal, os quais derivam da dieta. Os quilomicrons atingem a circulação sistêmica onde passam por um processo de intensa

---

---

catabolização pela LPL resultando em remanescentes de quilomicrons. Quando a dieta contém elevada concentração de triacilgliceróis derivada da ingestão de sacarose e colesterol provenientes da dieta, estes chegam ao fígado através dos remanescentes de quilomicrons. O triacilglicerol hepático é exportado para a corrente sanguínea através de VLDL pela via endógena (BLOOMGARDEN et al., 2002). ROBERTS et al. (2002), reportaram que ingestão prolongada de dieta rica em sacarose pode resultar em alterações na LPL e no receptor de VLDL, presentes no tecido adiposo e músculo esquelético favorecendo o desenvolvimento de obesidade e hiperlipidemia.

LDL são partículas heterogêneas derivadas de VLDL. O metabolismo de remanescentes converte remanescentes de quilomicrons e VLDL muito ricas em triacilgliceróis, em tipos especiais de LDL, partículas discóides, pequenas e compactas, que transportam colesterol e triacilgliceróis. Estas partículas apresentam interação anormal com HDL e contribuem consideravelmente para a redução do HDL-colesterol, bem como das relações HDL/LDL e HDL/TG observadas na Tabela I nos animais pertencentes ao grupo H. A elevação nas concentrações de colesterol total, LDL-colesterol (Tabela I) e redução na concentração de HDL-colesterol (Tabela I) podem estar relacionadas à presença de sacarose na dieta hipercalórica (WERNER et al., 1984) que também é responsável por mudanças no perfil das lipoproteínas que pode causar efeitos deletérios no tecido cardíaco (FRAYN & KINGMAN, 1995). Segundo SÓRIA et al., 2001, a ingestão de sacarose por um período de 3 a 4 semanas reduz a sensibilidade a insulina e eleva a concentração de ácidos graxos livres nos adipócitos de ratos Wistar.

A concentração de VLDL também influencia o tamanho e a densidade da LDL e o conteúdo de triacilglicerol da LDL pode ser elevado devido a trocas da VLDL para LDL circulantes. No entanto, no presente capítulo a troca mais efetiva ocorreu entre quilomicras e LDL com significativa elevação nas concentrações de LDL-colesterol e na taxa LDL/TG no soro dos animais que receberam dieta hipercalórica (Tabela I), uma vez que as concentrações

---

---

de VLDL-colesterol e triacilgliceróis (Tabela I) não apresentaram alteração entre os grupos experimentais. BRIZZI et al. (2003) reportaram que a densidade e conseqüentemente a oxidação da LDL estão relacionadas particularmente com o conteúdo de triacilglicerol presente na LDL. A relação entre LDL/TG (Tabela I) pode ser o melhor parâmetro para definir a densidade e oxidação da LDL, cuja oxidação depende também da relação entre LDL/HDL (Tabela I) que esteve reduzida nos animais que receberam dieta hipercalórica.

LDL ricas em triacilgliceróis têm menor tamanho e são mais susceptíveis à oxidação (Novelli, 2005). A oxidação da lipoproteína LDL induz modificações na apolipoproteína B, a LDL-ox passa então a ser reconhecida por macrófagos formando células espumosas, iniciando o processo aterogênico (CHEN et al., 2003). A aterosclerose é um processo dinâmico, evolutivo, ocasionado por múltiplos fatores de agressão endotelial (XAVIER, 2004), constitui fator de risco cardiovascular relacionado à ingestão de dietas ricas em energia. Animais que ingeriram dieta rica em colesterol e sacarose apresentaram elevação nas concentrações de LDL-ox, quando comparados ao controle, no entanto, animais que receberam a dieta e resveratrol na água de beber apresentaram redução na concentração LDL-ox quando comparada ao grupo H (Tabela I).

A elevação no ganho de peso corporal, bem como na concentração de LDL-ox e redução na concentração de HDL-colesterol indicam a presença de síndrome metabólica nos animais que receberam dieta rica em energia.

A ação do resveratrol sobre a LDL pode ser associada a sua interação com lipídios presentes nesta lipoproteína, sendo bem incorporado no interior de suas membranas celulares impedindo sua oxidação bem como as trocas entre LDL e HDL, evitando a redução da HDL-colesterol. O resveratrol pode estar envolvido também na remoção de cobre ligado a apolipoproteína B (BELGUENDOZ et al., 1998). O resveratrol pode ainda atuar como antioxidante. O efeito antioxidante do trans-resveratrol indica que sua

---

---

atividade como eliminadora de radicais livres depende da posição do grupo hidroxila. O grupo *para*-hidroxila do trans-resveratrol é mais reativo na eliminação de radicais que o grupo *meta*-hidroxila (STOJANOVIĆ et al., 2001).

O interesse sobre compostos fenólicos tem crescido nos últimos anos devido a seu poder antioxidante que pode se manifestar através de propriedades quelantes e/ou neutralização de radicais livres (METODIEVA et al., 1997). Diferentes tipos de polifenóis possuem habilidades antioxidantes distintas, dependendo de sua estrutura e capacidade de interagir e penetrar nas bicamadas lipídicas das membranas biológicas inibindo a lipoperoxidação (BROWN et al., 1998). O consumo de alimentos ricos em polifenóis contribuem com suas propriedades antioxidantes e antiinflamatória (OU et al., 2006).

Resveratrol tem despertado interesse desde sua identificação em vinhos e sua estrutura química relacionada com ingredientes ativos da tradicional medicina asiática Kojo-Kon usada para tratamento de hiperlipemia, aterosclerose e doenças alérgicas e inflamatórias (ARICHI et al., 1982).

Os efeitos do resveratrol, bem como dos demais polifenóis depende de sua concentração no plasma, em baixa concentração tanto no estado puro como na forma de metabólitos no sangue (JUAN et al., 2002).

Resveratrol possui duas formas isoméricas, cis e trans (SOLEAS et al., 1997), no presente trabalho, utilizou-se o isômero trans devido a sua maior estabilidade e atividade farmacológica (MARIER et al., 2002).

A administração de trans-resveratrol ao grupo que recebeu dieta hipercalórica normalizou a concentração de HDL-colesterol, bem como a relação entre HDL/TG no soro destes animais. A elevação da concentração de HDL tem sido considerada um fator de proteção contra aterosclerose (BARTER et al., 1996). LIN et al. (2002) reportaram que a apolipoproteína da HDL pode reduzir o influxo de colesterol para macrófagos, impedindo assim a

---

---

formação de células espumosas. Não foram observadas alterações significantes nas concentrações de proteína total e apolipoproteína B entre os grupos experimentais (Tabela I), uma vez que a concentração de proteínas não foi modificada nas dietas padrão e hipercalórica.

Organismos aeróbicos utilizam o oxigênio para oxidar alimentos ricos em carboidratos e hidrogênio para obter energia química essencial para a vida destes organismos. No entanto ao oxidar moléculas com oxigênio, este composto é reduzido formando intermediários como o peróxido de hidrogênio que reage com lipídios de membrana (GUTTERIDGE, 1995) desencadeando a lipoperoxidação, formando hidroperóxido de lipídio que é usado como marcador de estresse oxidativo. No entanto os animais que receberam dieta hipercalórica não apresentaram diferença significativa nas concentrações de hidroperóxido de lipídio (HP) quando comparados aos animais que ingeriram dieta padrão (Tabela II). Esse fato poderia indicar que o excesso de ácidos graxos provenientes da dieta hipercalórica pode ter se acumulado no tecido hepático destes animais podendo vir a induzir esteatose hepática.

Animais pertencentes aos grupos H e HR apresentaram elevação nas concentrações de substâncias antioxidantes totais (Tabela II), bem como na relação SAT/HP (Tabela II), esse fato pode estar relacionado com elevação nas concentrações de radicais livres os quais depletam as concentrações de glutathione intracelular induzindo a expressão da GGT no fígado e subseqüentemente elevação da GGT no soro destes animais (SAKUTA et al., 2005). A GGT tem papel importante no sistema antioxidante, mantendo as concentrações de glutathione intracelulares (LEE et al., 2003). A modificação de defesas antioxidantes teciduais para o soro, poderia explicar a elevação na

---

---

concentração de SAT nos animais dos grupos H e HR. Estas observações estariam também associadas a manutenção da concentração sérica de hidroperóxido de lipídio nos animais do grupo H comparados aos do grupo C.

Os grupos R, H e HR apresentaram elevação na atividade sérica da lactato desidrogenase (LDH), quando comparados ao controle (Tabela II).

A LDH evidencia a glicólise anaeróbica a qual permite a produção contínua de ATP em tecidos que não apresentam mitocôndria ou em células em que o oxigênio esteja em quantidade insuficiente (CHAMPE et al., 2007). Esta enzima é utilizada como marcadora para diagnóstico de alterações teciduais como na isquemia do miocárdio, enfarte do miocárdio, em certas miocardiopatias e nas insuficiências coronarianas (COHEN et al., 1966). A elevação na atividade da LDH no soro dos animais dos grupos R, H e HR pode estar relacionada a alterações teciduais.

A suplementação nutricional com resveratrol não foi capaz de alterar as concentrações de SAT e na relação SAT/HP, bem como impedir a elevação na atividade da LDH em animais alimentados com dieta hipercalórica. Animais que receberam dieta padrão e resveratrol na água de beber apresentaram elevação na atividade da LDH bem como os animais que receberam dieta hipercalórica, este fato pode estar relacionado com uma possível toxicidade do resveratrol após um período prolongado de ingestão (45 dias) quando comparado ao grupo HR (15 dias) (Tabela II). Segundo WILSON et al. (1996), o resveratrol promoveu elevação na atividade da LDH no tecido hepático de animais que receberam este polifenol. A elevação nas atividades

---

---

séricas da LDH, parece sugerir que administração de resveratrol nos animais dos grupos R e HR induziu também alterações no tecido cardíaco. Estudos recentes em nosso laboratório indicaram que compostos antioxidantes em elevadas concentrações podem resultar em indesejáveis efeitos pró-oxidantes em alguns tecidos (FAINE et al., 2006).

Com base na análise dos resultados demonstrados neste segundo capítulo podemos concluir que a dieta hipercalórica foi responsável pela elevação nas concentrações de glicose, colesterol total, LDL-colesterol, LDL-oxidada, bem como aumento na relação LDL/TG. A indução de dislipidemia experimental pela administração de dieta hipercalórica reduziu a concentração de HDL-colesterol e as relações HDL/TG e HDL/LDL. O consumo da dieta rica em sacarose e colesterol também elevou a concentração de SAT e atividade da LDH nos grupos aos quais foi ofertada. O tratamento com resveratrol preveniu a oxidação da LDL e aumentou a relação HDL/TG nos animais que receberam dieta hipercalórica atuando como um agente antioxidante, embora tenha elevado a atividade da LDH no grupo R.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

- Acquaviva R, Campisi AC, Sorrenti V, Giacomo C, Barcellona ML, Avitabile M, Vanella A. Antioxidant activity and protective effect on DNA cleavage of resveratrol. *Food Chem. and Toxicol.* 2002; 67 (1): 137-141.
- Arichi H, Kimura Y, Okuda H, Baba K, Kozawa M, Arichi S. Effects of stilbene of the roots of *Polygonum cuspidatum* Sieb et Zucc. on lipid metabolism. *Chem. Pharm.* 1982; 30: 1766-1770.
- Barter PJ, Rye KA. High density lipoproteins and coronary heart disease. *Atherosclerosis.* 1996; 121(1): 1-12.
- Bass A, Brdiczka D, Eyer P, Hofer S, Pette, D. Metabolic differentiation of distinct muscle at the level of enzymatic organization. *Eur. J. Biochem.* 1969; 10: 198-206.
- Bays H, Mandarino L, DeFronzo R. Role of the adipocyte free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach. *The J. Of Clin. Endocrinol. & Metabolism.* 2006; 89 (2): 463-478.
- Beckman KD, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* 1998; 78: 574-581.
- Belguendouz L, Frémont L, Gozzelino M. Interaction of transresveratrol with plasma lipoproteins. *Biochem. Pharmacol.* 1998; 55: 811-816.
- Bertelli AAE, Giovannini L, Giannessi D, Migliori M, Bernini W, Fregoni M, Bertelli A. Antiplatelet activity of synthetic and natural resveratrol in red wine. *Int. J. Tissue React.* 1995; 17: 1-3.
- Bloomgarden ZT. Obesity, hypertension, and insulin resistance. *Diabetes Care.* 2002; 25: 2088-2097.

---

\* International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted journal. *N. Engl. J. Med.* 1997; 336: 309-315.

- Blundell JE, Green SM. Effects of sucrose and sweeteners on appetite and energy intake. *Inter. J. of Obesity*. 1996; 20: 12-17.
- Bradamante S, Barenghi L, Piccinini F, Bertelli AAE, Jonge R, Beemster P, Jong JW. Resveratrol provides late-phase cardioprotection by means of a nitric-oxide adenosine-mediated mechanism. *Eur. J. Pharmacol.* 2003; 465:115- 123.
- Brizzi P, Tonolo G, Carsillo F, Malaguarnera M, Maioli M, Musumeci S. Plasma lipid composition and LDL oxidation. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2003; 41(1): 56-60.
- Brown JE, Khdr H, Hider RC, Rice-Evans AC. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu<sup>2+</sup> ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem. J.* 1998; 330: 1173-8.
- Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR. *Bioquímica Ilustrada 2007*; Porto Alegre: Editora Artmed, p.533.
- Chen HW, Tsai CH, Yang JJ, Liu CT, Kuo WW, Lii CK. The combined effects of garlic oil and fish oil on the hepatic antioxidant and drug-metabolizing enzymes of rats. *Br. J. of Nutr.* 2003; 89: 189-200.
- Cohen L, Djordjevich J, Jacibsen S. The contribution of isozymes of serum lactate dehydrogenase (LDH) to diagnosis of specific organ injury. *Med. Clin. Amer.* 1966; 50: 193-209.
- Costa NMB, Walker AF. Low AG The effect of graded inclusion of baked beans (*Phaseolus vulgaris*) on plasma and liver lipids in hypercholesterolaemic pigs given a Western - type diet. *Br. J. Nutr.* 1993; 70: 515 - 524.
- Curi PR. *Metodologia e análise da pesquisa em ciências biológicas 1997*; Botucatu: Tipomic Editora, p. 263.
- Daher GC, Cooper DA, Zorich NL, King D, Riccardi KA, Peters JC. Olestra ingestion and dietary fat absorption in human. *J. of Nutr.* 1997; 127: 1694-1698.

- 
- Dillard C G, German J B. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *J. of the Sci. of Food and Agr.* 2000; 80: 1744-1756.
- Diniz YS, Faine LA, Almeida JÁ, Silva MDP, Ribas BO, Novelli ELB. Toxicity of dietary restriction of fat enriched diets on cardiac tissue. *Food and Chem. Toxicol.* 2002; 40: 1893-1899.
- Diniz YS, Cicogna AC, Santana LS, Faine LA, Novelli ELB. Diets rich in saturated and polyunsaturated fatty acids: Metabolic shifting and cardiac health. *Nutrition.* 2004; 20: 230.
- Dong Z. Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol. *Mut. Res.* 2003; 524: 145-150.
- Droge W. Free radicals on the physiological control of cell function. *Phys. Rev.* 2002; 82: 47-95.
- Ebaid GMX, Faine LA, Diniz YS, Rodrigues HG, Galhardi CM, Ribas BO, Fernandes AAH, Novelli ELB. Effects of digitonin on hyperglycaemia and dyslipidemia induced by high-sucrose intake. *Food and Chem. Toxicol.* 2005; 30: 1-7.
- Faine LA, Cicogna AC, Diniz YA, Almeida JA, Burneiko RC, Rodrigues HG, Novelli ELB. Dietary restriction : metabolic shifting for cardiac health. *J. Nutr. Envir. Med.* 2003; 13: 23-29.
- Faine LA, Rodrigues HG, Galhardi CM, Diniz YS, Fernandes AAH, Novelli ELB. Butyl hydroxytoluene (BHT)-induced oxidative stress: Effects on serum lipids and cardiac metabolism in rats. *Exp. and Toxicol. Pathol.* 2006; 57: 221-226.
- Fauconneau B, Waffo-Teguo P, Huguet F, Barrier L, Decendit A, Merillon JM. Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compound from *Vitis vinifera* cell cultures using in vitro tests. *Life Sci.* 1997; 61: 2103-2110.
-

- 
- Feuers RJ. The effects of dietary restriction on mitochondrial dysfunction in aging. *Acad. of Sci.* 1998; 63: 192-201.
- Frankel EN, Waterhouse AL, Kinsella JE. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet.* 1993; 341: 1103-1104.
- Frayn KN, Kingman SM. Dietary sugar and lipid metabolism in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 1995; 62: 250-263.
- Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* 1972; 18: 499-502.
- Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem.* 1995; 41 (12): 1819-1828.
- Gutteridge JMC, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Tr. in Biol. Sci.* 1990; 15: 129-135.
- Habold C, Chevallier C, Dunel-Erb S, Jourdainne C, Maho YL, Lignot JH. Effects of fasting and refeeding on jejunal morphology and cellular activity in rats in relation to depletion of body stores. *Scand. J. Gastroenterol.* 2004; 39: 531-9.
- Hayoz D, Ziegler T, Brunner HR, Ruiz J. Diabetes and vascular lesions. *Metabolism.* 1998; 47: 16-25.
- Huix PC, Pamiás RF. Miocardiopatía diabética. *Anal. Med. Intern.* 2002; 19: 319-325.
- Jiang ZY, Woollard AC, Wolf S. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of  $Fe^{+2}$  in the presence of xylene orange. Comparison with TBA assay and on iodometric method. *Lipids.* 1991; 26: 853-856.
- Juan ME, Buenafuente J, Casals I, Planas JM. Plasmatic levels of trans-resveratrol in rats. *Food Res. Inter.* 2002; 35: 195-199.
- Kaur C, Kapoor HC. antioxidants in fruits and vegetables - the millennium's health. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2001; 36: 703-725.
-

- 
- Kimura Y, Okuda H, Arichi S. Effects of stilbene on arachidonate metabolism in leukocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1985; 834: 275-278.
- Lee J, Yu B P, Herlihy J T. Modulation of cardiac mitochondrial membrane fluidity by age and calorie intake. *Free Rad. Biol. Med.* 1999; 26: 260-5.
- Lee D, Jacobs DR JR, Gross M, Kiefe CI, Roseman J, Lewis CE, Steffes M.  $\gamma$ - Glutamyltransferase is a predictor of incident diabetes and hypertension: The coronary artery risk development in young adults (CARDIA) Study. *Clin. Chem.* 2003; 49: 1358-1366.
- Leonard S S, Xia C, Jiang B, Stinefelt B, Klandorf H, Harris G K, Shi X. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochem. and Bioph. Res. Communication.* 2003; 309: 1017-1026.
- Lin K, Chen Y, Shih C, Pan J, Chan W, Chiang A. Contribution of HDL-apolipoproteins to the inhibition of low density lipoprotein oxidation and lipid accumulation in macrophages. *J. Of Cell. Biochem.* 2002; 86 (2): 258-267.
- Lopes-virella M. F, Stone P, Ellis S, Colwell J A. Cholesterol determination in high-density lipoprotein separated by three different methods. *Clin. Chem.* 1977; 23: 882-884.
- Manach C, Morand C, Demigné C, Texier O, Régéat F, Rémésy C. Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *Fed. of Eur. Biochem. Soc.* 1997; 409: 12-16.
- Marrier J, Vachon P, Gritsas A, Zhang J, Moureau J, Ducharme M.. Metabolism and disposition of resveratrol in rats: Extent of absorption, glucuronidation, and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model. *The J. of Pharmacol.* 2002; 302: 369-373.
- Meng Y, Ma Q, Kou X, Xu J. Effect of resveratrol on activation of nuclear factor kappa-B and inflammatory factors in rat model of acute pancreatitis. *World J. Gastroenterol.* 2005; 11 (4): 525-528.
-

- 
- Mengheri E, Scarino ML, Vignolini F, Spadoni MA. Modifications in plasma cholesterol and apolipoproteins of hypercholesterolaemic rats induced by ethanol-soluble factors of *Vicia faba*. *Brit. J. of Nutr.* 1985; 53: 223-232.
- Metodiewa D, Kochman A, Karolczak S. Evidence for antiradical and antioxidant properties of four biologically active N, N-Diethylaminoethyl-ethers of flavanone oximes: a comparison with natural polyphenolic flavonoid (Rutin) action. *Biochem. and Mol. Biol. Intern.* 1997; 41(5): 1067-1075.
- Miller O. *Laboratório para o clínico* 1993, São Paulo: Atheneu Editora, 581p.
- Moura RA. *Técnicas de laboratório* 1982, São Paulo: Atheneu Editora, 822p.
- Nishiyama Y, Ikeda H, Haramaki N, Yoshida N, Imaizumi T. Oxidative stress is related to exercise intolerance in patients with heart failure. *Am. Heart J.* 1998; 135: 115-120.
- Novelli E L B, Fernandes A A H, Campos K E, Diniz Y S, Almeida J A, Faine L A, Ribas B O. The adverse effect of a high energy dense diet on cardiac tissue. *J. of Nutr. & Envir. Med.* 2002; 12 (4): 287-294.
- Novelli ELB. *Nutrição e vida saudável* 2005, Ribeirão Preto: Tecmed Editora, 288p.
- Ou H, Chou F, Sheen H, Lin T, Yang C, Sheu WH. Resveratrol, a polyphenolic compound in red wine, protects against oxidized LDL-induced cytotoxicity in endothelial cells. *Clin. Chem. Acta.* 2006; 364: 196-204.
- Roberts CK, Barnard RJ, Ling KH, Vaziri ND. Effect of diet on adipose tissue and skeletal muscle VLDL receptor and LPL: implications for obesity and hyperlipidemia. *Atherosclerosis.* 2002; 161: 133-141.
- Rosado EL, Monteiro JBR. Obesity and diet macronutrients substitution. *Rev. Nutr. Campinas.* 2001; 14: 145-152.
- Sakuta H, Suzuki T, Yasuda H, Ito T.  $\gamma$ -Glutamyl transferase and metabolic risks factors for cardiovascular disease. *Inter. Med.* 2005; 44: 538-541.
-

- 
- Scoccia A E, Molinuevo M S, Mccarthy A D, Cortizo A M. A simple method to assess the oxidative susceptibility of low density lipoproteins. *BMC Clin. Pathol.* 2001; 1 (1), 2001.
- Smith B K, Kelly L A, Pina R, York D A, Bray G. Preferential fat intake increases adiposity but not body weight in Sprague-Dawley rats. *Appetite.* 1998; 31: 127-139.
- Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Sci.* 1996; 273: 59-63.
- Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clin. Biochem.* 1997; 30: 91-112.
- Soria A, D' Alessandro ME, Lombardo YB. Duration of feeding on a sucrose-rich diet determines metabolic and morphological changes in rat adipocytes. *J. Appl. Physiol.* 2001; 91: 2109-2116.
- Stevenson JA, Feleki F, Szlavko A, Beaton JR. Food restriction and lipogenesis in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1964; 116: 178-182.
- Stojanović S, Sprinz H, Brede O. Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. *Archives of Biochem. and Biophysic.* 2001; 391: 79-89.
- Sundberg A, Appelkvist E, Dallner G, Nilsson R. Glutathione transferases in the urine: sensitive methods for detection of kidney damage induced by nephrotoxic agents in humans. *Environ. Health Perspect.* 1994; 120 (3): 293-296.
- Turner RT, Evans GL, Zhang M, Maran A, Sibonga JA. Is resveratrol an estrogen agonist in growing rats? *Endocrinology.* 1999; 140 (1): 50-54.
- Wang Z, Zou J, Cao K, Hsieh T, Huang Y, Wu J. Dealcoholized red wine containing known amounts of resveratrol suppresses atherosclerosis
-



in hypercholesterolemic rabbits without affecting plasma lipid levels. *Inter. J. of Molecular Med.* 2005; 16: 533-540.

Werner D, Emmett PM, Heaton KW. Effects of dietary sucrose on factors influencing cholesterol gall stone formation . *Gut.* 1984; 25: 269-274.

Wilson T, Knight TJ, Beitz D, Lewis DS, Engen RL. Resveratrol promotes atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Life Sci.* 1996; 59: 15-21.

Whitehead TP, Robinson D, Allaway S, Syms J, Hale A. Effect of red wine ingestion on the antioxidante capacity of serum. *Clin. Chem.* 1995; 41: 32-35.

Xavier HT. *Manual de dislipidemias e cardiometabolismo 2004*, São Paulo, BBS Editora, 215p.

Zern TL, West KL, Fernandes ML. Grape polyphenols decrease plasma triglycerides and cholesterol accumulation in the aorta of ovariectomized guinea pigs. *J. Nutr.* 2003; 133: 2268-2272.



---

# *CAPÍTULO III*

*Modulação do metabolismo e estresse oxidativo hepáticos, pelo resveratrol, em animais alimentados com dieta hipercalórica*

---

## **ABSTRACT**

The present study was undertaken to determine the effects of resveratrol on oxidative stress and antioxidant defenses in hepatic tissue of

---

---

rats fed standard chow and in rats fed hypercaloric diet. Twenty four *Wistar* rats were divided into 3 groups. C control group (n=6); R (n=6) received standard diet as C group and resveratrol (6mg/L) in its drinking water; H (n=12) received hypercaloric diet and drinking water for 30 days, when were divided into 2 groups; H (n=6) continued receiving hypercaloric diet and water, and HR (n=6) receiving hypercaloric diet as H group and resveratrol in drinking water as R group for 15 days. After 45 days of the treatments the animals were submitted to euthanasia and the hepatic tissue was collected for biochemical determinations. R and HR rats had reduced lipid hydroperoxide and higher total antioxidant substances concentrations than C group. In conclusion, resveratrol administration induced beneficial effects in the oxidative stress in hepatic tissue, independent of the diet ingested.

## RESUMO

No presente capítulo foram estudados os efeitos da administração de resveratrol sobre o estresse oxidativo e defesas antioxidantes no tecido hepático de ratos mantidos com dieta padrão, ou hipercalórica, rica em sacarose e colesterol. Foram utilizados 24 ratos machos *Wistar*, divididos inicialmente em 3 grupos: C (controle, n=6) mantido com dieta padrão e água; R, mantido com ração padrão e resveratrol (6mg/L) na água de beber; H

---

(n=12) que recebeu dieta hipercalórica e água de beber. Após 30 dias de tratamento os animais do grupo H foram divididos em 2 subgrupos: grupo H, mantido com ração hipercalórica e água; HR, mantido com ração hipercalórica e resveratrol (6mg/L) na água de beber. O período experimental total foi de 45 dias. Após este período os animais foram submetidos a eutanásia, sendo coletadas amostras do tecido hepático. Houve redução nas concentrações de hidroperóxido de lipídio e elevação nas substâncias antioxidantes totais nos animais dos grupos R e HR comparados ao C e H respectivamente. Concluiu-se que administração de resveratrol induziu efeitos benéficos no estresse oxidativo hepático independente da dieta utilizada.

## INTRODUÇÃO

### 1. DIETA HIPERCALÓRICA E CONSEQÜÊNCIAS PARA O TECIDO HEPÁTICO

O fígado é o órgão responsável pela regulação e manutenção da homeostasia corporal (DINIZ et al., 2004). Possui diversas funções importantes como controle da glicemia, armazenamento de vitaminas e ferro, formação de proteínas e aminoácidos via transaminação, além de sua capacidade de detoxificar ou excretar diversos fármacos (GUYTON & HALL, 2002). Portanto, mudanças na dieta ou na ingestão de energia podem afetar diretamente o metabolismo deste órgão.

---

O consumo de dieta hipercalórica pode ter efeitos negativos para o organismo, podendo estar associada ao aparecimento de alguns tipos de câncer (ROGERS et al., 1993), doenças cardiovasculares (FAINE et al., 2002; NOVELLI et al., 2002) e hepáticas. O excedente de energia proveniente da ingestão de dieta hipercalórica induz a síntese de ácidos graxos no fígado elevando sua concentração no tecido hepático (NOVELLI, 2005).

Os ácidos graxos (AG) são esterificados a triacilgliceróis nos hepatócitos, posteriormente excretados na circulação através da VLDL (SLIGTE et al., 2003). Aumento nas concentrações de triacilglicerol leva ao acúmulo do mesmo no tecido hepático (BROWNING et al., 2004), podendo também induzir aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO) nos hepatócitos de animais e humanos (NOMURA et al., 1988; LIBER, 2004) e levar o tecido hepático ao desenvolvimento de diversas patologias, dentre elas, esteatose hepática (DELZENNE et al., 1997).

ERO causam danos diretos aos hepatócitos, (DE KNEGT, 2001), provocando o desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, fator que afeta a estrutura e a função das células hepáticas (POLI, 2000). A inflamação crônica provocada pelas ERO pode promover fibrose hepática (SLIGTE et al., 2003) através de acúmulo progressivo de tecido conjuntivo no fígado (POLI, 2000).

Considerando-se que a dieta hipercalórica induz diferentes alterações no metabolismo da glicose, reduzindo defesas antioxidantes e que tais alterações estão associadas ao estresse oxidativo no tecido hepático (DINIZ et al., 2003), é de grande interesse a descoberta de fontes naturais de antioxidantes a fim de prevenir ou reverter danos decorrentes da ingestão de dieta inadequada.

## **2. ATUAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS COMO ANTIOXIDANTES**

O tecido hepático tem papel fundamental na biodisponibilidade de polifenóis na dieta (LANÇON et al., 2004). Compostos fenólicos naturais

---

---

estão presentes em alguns vegetais, chás e frutas principalmente em uvas e seus derivados (KAWADA et al., 1998).

Resveratrol (3,4,5- trans-trihidroxiestilbeno) é um composto fenólico natural presente em *Vitis vinifera L*, com diversos efeitos farmacológicos (OU et al., 2005). Uvas constituem a principal fonte natural de resveratrol, e as cascas da uva fresca contêm aproximadamente 50 a 100 $\mu$ g de resveratrol por grama (FOROOZESH et al., 1997). A bioatividade natural do resveratrol e seu acesso aos tecidos são afetados pela absorção e eventos metabólicos no intestino delgado (KUHNLE et al., 2000). Em modelos isolados de intestinos delgados de ratos, sugerem que o resveratrol é absorvido na forma conjugada de glicuronídeo e desta forma atinge a circulação sanguínea (WENZEL, 2005), sendo detectado no plasma, fígado e rins (JUAN et al., 1999).

Resveratrol apresenta também efeitos protetores, modulando a síntese de apolipoproteínas e lipídios no tecido hepático (FRANKEL et al., 1993). As atividades antiinflamatórias e antioxidantes do resveratrol têm sido bem documentadas (MARTÍN et al., 2004).

Asensi et al. (2002) reportaram que resveratrol é rapidamente metabolizado pelo parênquima hepático. A eliminação do resveratrol pode ocorrer em duas etapas. A primeira etapa envolve a conjugação do resveratrol com ácido glicurônico, catalisada pela enzima UDP-glicosil-transferase. A segunda etapa ocorre somente quando a concentração de resveratrol excede a capacidade do organismo em metabolizá-lo via glicuronidação, e então, resveratrol será metabolizado pela reação de sulfatação via sulfotransferases (WENZEL, 2005).

O presente capítulo tem como objetivo analisar os efeitos do polifenol resveratrol sobre estresse oxidativo hepático, em ratos normais e submetidos à dislipidemia experimental.

---

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados um total de 24 ratos machos adultos *Wistar*, de peso médio  $289,03 \pm 16,65$  gramas. Os animais foram provenientes do Biotério Central da UNESP, "campus de Botucatu", e transferidos para o "Laboratório de Bioquímica na Experimentação Animal" do Departamento de Química e Bioquímica, Instituto de Biociências, UNESP/Botucatu, onde permaneceram durante todo o período experimental, à temperatura de  $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , período claro/escuro de 12 horas.

Os animais foram mantidos em gaiolas de plástico individuais, recebendo dieta basal (Biobase, SP, Brasil) e água destilada *ad libitum*. Para permitir a aclimatação dos animais, os ratos permaneceram nas condições acima citadas por um período de 15 dias antes do início do experimento. Diariamente as gaiolas foram limpas.

Inicialmente, os animais foram divididos em 3 grupos. O grupo C (n=6) foi considerado controle. O grupo R recebeu resveratrol dissolvido na água de beber (6 mg/L) e o grupo H (n=12) foi submetido a hiperlipidemia através da ingestão de dieta com elevada concentração de colesterol e sacarose (COSTA et al, 1993).

Para o estudo dos efeitos da ingestão de resveratrol em animais hiperlipidêmicos, após 30 dias de consumo da dieta rica em colesterol e sacarose, os animais do grupo H foram divididos em 2 subgrupos (n=6), recebendo diferentes tratamentos por mais 15 dias. O subgrupo H continuou recebendo dieta rica em colesterol e sacarose. O grupo HR recebeu a mesma dieta do grupo H e resveratrol como no grupo R.

A dose de resveratrol foi estimada para corresponder a sua ingestão diária contida em 1 litro e meio de suco de uva por dia (DONG, 2003) para humanos de 70 Kg, corrigida de acordo com a ingestão diária por Kg de peso para os animais (HABOLD et al., 2004). O resveratrol foi dissolvido em água

---

(6mg/L), usando-se etanol como carreador (25mg resveratrol/1mL etanol). Nesta dose, o etanol não possui efeito farmacológico ou sinérgico. O resveratrol é sensível à luz, portanto todos os bebedouros foram totalmente cobertos por folhas de papel alumínio durante o decorrer do experimento (BRADAMANTE et al., 2003).

## 2. OBTENÇÃO DE AMOSTRAS

Ao término do período experimental, 45 dias, os animais foram anestesiados (pentobarbital sódico 3%, 0,1mL, i.p.), e sacrificados por fratura cervical e o fígado retirado e lavado em solução salina gelada (NaCl 0.9%). Amostras de 200 mg de tecido hepático foram homogeneizadas em *Potter Elvehjem*, com pistilo de teflon, com 5 mL de tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,0. Os homogeneizados foram centrifugados a 10000 rpm por 15 minutos, em centrífuga refrigerada a -4°C. O sobrenadante foi utilizado para determinações do estresse oxidativo hepático.

## 3. DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS

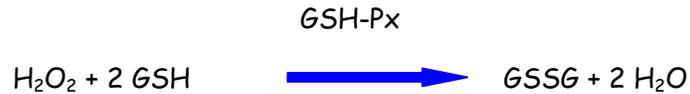
A análise do estresse oxidativo foi realizada através da concentração de substâncias antioxidantes totais (SAT) (MILLER, et al., 1993), assim como análise de marcadores da lipoperoxidação como hidroperóxido de lipídio (HP) (JIANG et al., 1991) no tecido hepático dos animais (SCOCCIA et al., 2001).

A concentração de glutatona oxidada total foi determinada através de método cinético, monitorando a redução do 5,5' - ditiobis- (2-nitrobenzeno) (DTNB) pela GSH na presença de nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato (NADPH), formando 2-nitro-5-ácido tiobenzóico. A leitura espectrofotométrica foi realizada a 412 nm (TIETZE, 1969). A concentração de glutatona reduzida (grupos SH-não protéicos) foi determinada em tampão tris-HCl pH 8,9 e DTNB, após prévia precipitação com TCA 50%. Como padrão foi utilizada glutatona reduzida (GSH) 1mM (SEDLAK & LINDSAY, 1968). A concentração de glutatona oxidada (GSSG) foi

---

estimada através da diferença entre GSH total e GSH reduzida, segundo a proporção estequiométrica (2GSH: GSSG) (OKAMOTO et al., 2001).

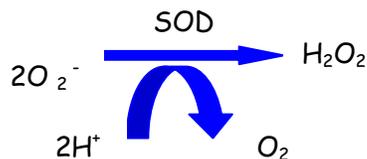
A atividade da glutathiona peroxidase (GSH-Px, E.C.1.11.1.9.) foi determinada através oxidação da glutathiona em presença de peróxido de hidrogênio e cumene hidroperóxido (NAKAMURA et al., 1974).



A atividade da glutathiona redutase (GSH-Rd, E.C.1.6.4.2.) foi determinada através da oxidação do NADPH a 340 nm (MILLER & BLAKELY, 1992).



As atividades da superóxido dismutase total (SOD) forma determinadas através da alteração na redução do nitroblue-tetrazólio (NBT) por radicais superóxido gerados pela mistura NADH e fenazina metassulfato em pH fisiológico. Leituras espectrofotométricas foram realizadas em leitor de microplaca a 560nm. (EWING & JANERO, 1995).



As atividades da catalase (E.C.1.11.1.6.) foram determinadas em tampão fosfato pH 7,0, utilizando-se 0,5mL de amostra e peróxido de hidrogênio (30%).



As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 240nm (AEBI et al., 1974). As determinações de proteínas totais foram realizadas segundo MOURA (1982). Como padrão foi utilizado uma solução de albumina bovina.

#### 4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Para comparação entre as médias foi utilizado teste "t" de Student para comparações entre dois grupos, através do software InStat 3.0. O nível de significância foi  $p < 0,05$  (CURI, 1997).

#### RESULTADOS

Pode-se observar na Tabela I que animais do grupo HR alimentados com dieta hipercalórica e resveratrol apresentaram redução na concentração de proteínas totais no tecido hepático, quando comparados aos demais grupos em estudo. A ingestão de dieta hipercalórica pelos animais do grupo H não foi capaz de alterar a concentração de proteínas totais presentes no tecido hepático quando comparado aos animais que receberam ração padrão.

Dieta hipercalórica foi responsável pela redução na concentração de hidroperóxido de lipídio, bem como elevação na concentração de SAT nos animais do grupo H em relação ao C. A administração de resveratrol nos grupos R e HR reduziu a concentração de HP e elevou a concentração de SAT quando comparados aos grupos C e H respectivamente (Tabela I).

A atividade da enzima SOD não apresentou diferença significativa entre os grupos experimentais, já à atividade da catalase apresentou aumento significativo nos grupos R e H, quando comparados a C e HR (Tabela I).

A razão HP/SAT que expressa a relação entre o dano provocado pelo estresse oxidativo e a capacidade de defesa do organismo, apresentou-se reduzida nos grupos que receberam dieta hipercalórica, quando comparados

ao controle. Os animais do grupo R também apresentaram redução na razão HP/SAT (Tabela I).

Na Tabela II pode-se observar que animais tratados com resveratrol apresentaram elevação nas concentrações de glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG), em relação aos demais grupos.

A ingestão de dieta hipercalórica proporcionou elevação na concentração de GSH no grupo H, quando comparado ao controle, bem como redução na concentração de GSSG nos grupos aos quais foi ofertado (H e HR). O resveratrol, no entanto, elevou a concentração de GSSG no grupo R, quando comparado ao C.

O poder redutor (Tabela II) expresso pela razão entre GSH/GSSG mostrou-se elevado no grupo que recebeu dieta hipercalórica e resveratrol em relação ao grupo que recebeu apenas a dieta hipercalórica. A razão GSH/GSSG não apresentou diferença significativa entre os grupos C, R e H.

As atividades da glutathiona redutase (GSH-Red) e glutathiona peroxidase (GSH-Px) não apresentaram diferença significativa entre os grupos (Tabela II).

A relação entre HP/GSH-Px apresentou-se elevada no grupo HR quando comparado ao H (Tabela II), não sendo observadas alterações significantes entre os grupos C, R e H.

**Tabela I.** Proteína total, hidropéroxido de lipídio (HP), substâncias antioxidantes totais (SAT), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), bem como a relação HP/SAT no tecido hepático de animais do grupo controle, mantidos com ração padrão e água de beber (C), que receberam dieta padrão e resveratrol (6mg/L) na água de beber (R), animais que receberam dieta hipercalórica e água de beber (H) e animais mantidos com dieta hipercalórica e água de beber durante 30 dias, passando a receber resveratrol (6mg/L) na água de beber durante 15 dias (HR).

Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão. <sup>a</sup> Diferença significativa em relação ao C,  $p < 0,05$ . <sup>b</sup> Diferença significativa em relação ao R,  $p < 0,05$ ; <sup>c</sup> Diferença significativa em relação ao H,  $p < 0,05$ ; <sup>d</sup> Diferença significativa em relação ao HR,  $p < 0,05$ .

Determinações Bioquímicas	Grupos			
	<i>E</i>	<i>R</i>	<i>H</i>	<i>HR</i>
GSH (nmol/mg de proteína) (g 100g de tecido)	20,20 $\pm$ 0,97 <sup>b</sup>	22,32 $\pm$ 0,89 <sup>a</sup>	21,37 $\pm$ 2,20 <sup>d</sup>	23,96 $\pm$ 1,12 <sup>c</sup>
HP (nmol/g de tecido)	361,00 $\pm$ 19,50 <sup>bc</sup>	297,12 $\pm$ 15,92 <sup>a</sup>	276,41 $\pm$ 21,37 <sup>ad</sup>	229,17 $\pm$ 16,67 <sup>c</sup>
SAT %	16,18 $\pm$ 1,70 <sup>bc</sup>	19,42 $\pm$ 2,11 <sup>a</sup>	19,45 $\pm$ 1,45 <sup>ad</sup>	21,65 $\pm$ 1,14 <sup>c</sup>
SOD (nmol/mg de proteína)	14,03 $\pm$ 0,91	15,38 $\pm$ 2,72	15,52 $\pm$ 2,75	18,08 $\pm$ 1,22
CAT ( $\mu$ mol/g de proteína)	4,56 $\pm$ 1,06 <sup>bc</sup>	6,05 $\pm$ 0,47 <sup>a</sup>	5,70 $\pm$ 0,45 <sup>ad</sup>	3,39 $\pm$ 0,97 <sup>c</sup>
HP/SAT	23,75 $\pm$ 1,82 <sup>b</sup>	15,42 $\pm$ 1,59 <sup>a</sup>	13,87 $\pm$ 1,50 <sup>ad</sup>	10,62 $\pm$ 1,12 <sup>c</sup>

GSSG (nmol/mg de proteína)	0,33 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,46 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,30 ± 0,04	0,34 ± 0,09
GSH/GSSH	65,28 ± 12,75	50,11 ± 10,82	73,19 ± 15,72 <sup>d</sup>	78,38 ± 14,61 <sup>c</sup>
GSH-Redutase (nmol/mg de proteína)	1,93 ± 0,27	2,43 ± 0,57	1,63 ± 0,38	1,96 ± 0,40
GSH-Px (nmo/g de proteína)	27,29 ± 4,13	25,29 ± 4,05	21,41 ± 6,79	20,64 ± 4,95
HP/GSH-Px	13,51 ± 2,39	12,05 ± 2,46	15,07 ± 2,21 <sup>d</sup>	10,76 ± 1,73 <sup>c</sup>

**Tabela II.** Glutathiona reduzida (GSH), glutathiona oxidada (GSSG), poder redutor (GSSG/GSH), atividade da glutathiona redutase (GSH-Rd), glutathiona peroxidase (GSH-Px) e a relação HP/GSH-Px no tecido hepático de animais pertencentes ao grupo controle, mantidos com ração padrão e água de beber (C), que receberam dieta padrão e resveratrol (6mg/L) na água de beber (R), animais que receberam dieta hipercalórica e água de beber (H) e animais mantidos com dieta hipercalórica e água de beber durante 30 dias, passando a receber resveratrol (6mg/L) na água de beber durante 15 dias (HR).

Valores expressos como média ± desvio padrão. <sup>a</sup> Diferença significativa em relação ao C, p<0,05. <sup>b</sup> Diferença significativa em relação ao R, p<0,05; <sup>c</sup> Diferença significativa em relação ao H, p<0,05; <sup>d</sup> Diferença significativa em relação ao HR, p<0,05.

## DISCUSSÃO

Durante o período absorptivo, o fígado recebe carboidratos, lipídios e aminoácidos. Estes nutrientes são metabolizados, armazenados ou encaminhados para outros tecidos (CHAMPE et al., 2007).

---

Tem sido observado que a lipogênese hepática é elevada pela ingestão de sacarose e frutose (KOTEISH & DIHEL, 2001) e que carboidratos têm prioridade na oxidação (BLUNDELL & GREEN, 1996) em relação a lipídios (DAHER et al., 1997).

Após ingestão de elevada concentração de carboidratos, a glicose é convertida a acetil-coenzima A (Acetil-CoA), em processo estimulado pela insulina. Assim, a acetil-CoA é utilizada para síntese de ácidos graxos, ou para fornecer ATP (adenosina trifosfato) de seu catabolismo. O aumento no consumo de frutose eleva a atividade da frutose-fosfato aldolase resultando no aumento do glicerol fosfato e acetil-CoA, produzindo assim precursores de triacilglicerol (HALLFRISH, 1990). O triacilglicerol é liberado na corrente sanguínea, através das lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), as quais podem através da lipase lipoproteica liberar o triacilglicerol para o tecido adiposo.

A despeito da intensa atividade metabólica e da síntese de ácidos graxos no tecido hepático, em condições de elevada ingestão de sacarose (CHAMPE et al., 2007) animais do grupo H apresentaram redução nas concentrações de hidroperóxido de lipídio, importante marcador do estresse oxidativo (Tabela I). Espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidas através de fatores ativadores de leucócitos (YUE et al., 1999), via óxido nítrico (FERRARI et al., 1998) ou através de metais de transição como o ferro. Porém, a maior fonte de ERO no meio celular são as mitocôndrias, uma vez que durante a fosforilação oxidativa, acoplada a cadeia de transporte de elétrons, são formadas ERO,  $O_2^-$  (radical superóxido) e  $H_2O_2$  (peróxido de hidrogênio) como subproduto normal do metabolismo aeróbico celular (CHANCE et al., 1979). Embora na obesidade e na ingestão de dietas ricas em colesterol e sacarose tenha sido observada elevação na lipoproxidação em tecidos extra hepáticos, particularmente no tecido cardíaco (FAINE et al., 2002; NOVELLI et al., 2005; FAINE et al., 2006), o mesmo não ocorre no fígado (Tabela I).

---

---

A redução no HP hepático foi associada a elevação nas defesas antioxidantes. Os organismos aeróbicos possuem mecanismos de defesa endógena contra a ação tóxica de ERO, incluindo as enzimas antioxidantes e os antioxidantes não-enzimáticos. Os primeiros correspondem às enzimas superóxido dismutase, responsável pela dismutação do  $O_2^-$  em  $H_2O_2$ , que é convertido a  $H_2O$  pela catalase, ou pela glutathiona peroxidase. Os agentes antioxidantes não-enzimáticos compreendem as substâncias antioxidantes totais (SAT), incluindo íons como selênio, tocoferóis e peptídeos ativos como a glutathiona reduzida (GSH) (DROGE, 2002). De fato, na Tabelas I e II pode-se observar que houve elevação nas concentrações de SAT, bem como redução na relação HP/SAT nos animais do grupo H comparado ao C. Embora tenha havido manutenção no sistema glutathiona, representado pela GSH, GSSG relação GSH/GSSG e nas atividades da GSH-Px e GSH-redutase, bem como nas atividades da SOD hepática, a elevação na atividade da catalase, o que contribuiu significativamente para a redução no HP, no fígado dos animais do grupo H.

Vários mecanismos podem estar associados à elevação nas concentrações de SAT no tecido hepático de animais mantidos com dieta rica em sacarose e colesterol, como a mobilização de antioxidantes não enzimáticos de outros tecidos; a modulação de antioxidantes através de repetidos episódios de condições potencialmente adversas, caracterizando a condição denominada "hormesis" (JI et al., 2002), ou ainda, a menor utilização das defesas antioxidantes hepáticas.

Em condições de elevação na lipogênese hepática, decorrente do consumo de sacarose, o intermediário da síntese de ácidos graxos, malonil coenzima A, inibe a carnitina acil transferase, e conseqüentemente a oxidação de ácidos graxos. Nestas condições a glicose constitui o principal substrato energético. É notório o fato que a oxidação de glicose requer menor consumo de oxigênio, desde que carboidratos apresentam maior quantidade de oxigênio por molécula ( $C_6H_{12}O_6$ ), em comparação a ácidos

---

---

graxos. Deste modo, a oxidação de ácidos graxos ( $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ ), implica em maior susceptibilidade dos tecidos ao estresse oxidativo.

Como evidenciado nas Tabelas I e II administração de resveratrol induziu redução no HP, na relação HP/SAT, bem como elevou as concentrações hepáticas de SAT, tanto em animais com dieta controle, como naqueles com dieta hipercalórica. Houve, entretanto diferenças nos mecanismos associados as defesas antioxidantes celulares.

Em animais mantidos com dieta hipercalórica, os efeitos benéficos do resveratrol resultaram em maior disponibilidade das defesas antioxidantes associadas ao sistema glutathiona. Desde que houve redução significativa nas atividades da catalase, comparando-se animais do grupo HR com o H, a elevação na concentração de GSH e na relação GSH/GSSG, indicou menor necessidade de oxidação do GSH para reduzir as concentrações de HP. Pode-se notar que a relação HP/GSH-Px foi significativamente reduzida no grupo HR, em relação ao H.

Nos animais mantidos com dieta padrão, a redução na concentração do HP hepático foi acompanhada de elevação na SAT, redução na relação HP/SAT e nas atividades da catalase. Independente da elevação nas concentrações de GSSG e GSH, o poder redutor, representado pela relação GSH/GSSG e as atividades de enzimas do sistema glutathiona não foram significativamente alteradas, comparando-se animais do grupo R ao C (Tabelas I e II).

Desde que catalase e glutathiona peroxidase atuam como antioxidantes através da conversão de peróxido de hidrogênio em água, o resveratrol atuou como modulador das defesas antioxidantes associadas a conversão de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$ , nas diferentes condições dietéticas.

Concluiu-se que administração de resveratrol induziu efeitos benéficos no estresse oxidativo hepático, tanto na ingestão de dieta padrão como na presença de dieta hipercalórica rica em sacarose e colesterol.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

- Asensi M, Medina I, Ortega A, Carretero J, Banô MC, Obrador E, Estrela J. Inhibition of câncer growth by resveratrol is related to its low bioavailability. *Free Rad. Biol. & Med.* 2002; 33: 387-398.
- Aebi H. *Methods of enzymatic analysis*. 2<sup>o</sup> ed. (New York): Bergmeyer H. V. Editor Verloy Chemia Weinheim, 1974. v. 1, 2, 3 e 4.
- Blundell JE, Green SM. Effects of sucrose and sweeteners on appetite and energy intake. *Inter. J. of Obesity*. 1996; 20: 12-17.
- Bradamante S, Barengi L, Piccinini F, Bertelli AAE, Jonge R, Beemster P, Jong JW. Resveratrol provides late-phase cardioprotection by means of a nitric-oxide adenosine-mediated mechanism. *Eur. J. Pharmacol.* 2003;465:115- 123.
- Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *The J. of Clin. Investigation*. 2004; 114 (2): 147-152.
- Chance B, Sies R, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Res.* 1979; 59: 527-540.
- Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR. *Bioquímica Ilustrada 2007*; Porto Alegre: Editora Artmed, p.533.
- Costa NMB, Walker AF. Low AG The effect of graded inclusion of baked beans (*Phaseolus vulgaris*) on plasma and liver lipids in hypercholesterolaemic pigs given a Western - type diet. *Br. J. Nutr.* 1993; 70: 515 - 524.
- Curi PR. *Metodologia e análise da pesquisa em ciências biológicas 1997*; Botucatu: Tipomic Editora, p. 263.
- Daher GC, Cooper DA, Zorich NL, King D, Riccardi KA, Peters JC. Olestra ingestion and dietary fat absorption in human. *J. of Nutr.* 1997; 127: 1694-1698.

---

\* International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted journal. *N. Engl. J. Med.* 1997; 336: 309-315.

- 
- De Knecht RJ. Non- alcoholic steatohepatitis: clinical significance and pathogenesis. *Scand. J. Gastroenterol.* 2001; 234: 88-92.
- Delzenne NM, Hernaux NA, Taper HS. A new model of acute liver steatosis in rats by fasting followed by refeeding a high carbohydrate-fat free diet. Biochemical and morphological analysis. *J. of hepatology.* 1997; 26: 880-885.
- Diniz YS, Cicogna AC, Padoovani CR, Silva MPD, Faine LA, Galhardi CM, Rodrigues HG, Novelli ELB. Dietary restriction and fibre supplementation: oxidative stress and metabolic shifting for cardiac health. *Can Physiol. Pharmacol.* 2003; 81: 1-7.
- Diniz YS, Fernandes AAH, Campos KE, Ribas BO, Novelli ELB. Toxicity of hypercaloric diet and monosodium glutamate: oxidative stress and metabolic shifting in hepatic tissue. *Food and Chem. Toxicol.* 2004; 42: 313-319.
- Dong Z. Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol. *Mutation Res.* 2003; 524: 145-150.
- Droge W. Free radicals on the physiological control of cell function. *Phys. Rev.* 2002; 82: 47-95.
- Ewing JF, Janero DR. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generation. *Analytical Chemistry.* 1995; 232: 243-248.
- Faine LA, Cicogna AC, Diniz YA, Almeida JA, Burneiko RC, Rodrigues HG, Novelli ELB. Dietary restriction : metabolic shifting for cardiac health. *J. Nutr. Envir. Med.* 2002; 13: 23-29.
- Faine LA, Rodrigues HG, Galhardi CM, Diniz YS, Fernandes AAH, Novelli ELB. Butyl hydroxytoluene (BHT)-induced oxidative stress: Effects on serum lipids and cardiac metabolism in rats. *Exp. and Toxicol. Pathol.* 2006; 57: 221-226.
-

- Foroozesh M, Primrose G, Guo Z, Bell LC, Alworth WL, Guengerich FP. *Chem. Res. Toxicol.* 1997; 10: 91-102.
- Frankel EN, Waterhouse AL, Kinsella JE. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet.* 1993; 341: 1103-1104.
- Ferrari R, Ceconi C, Curello S. Intracellular effects of myocardial ischaemic and reperfusion: role of calcium and oxygen. *Eur. Heart J.* 1998; 7: 3-12.
- Guyton AC, Hall JE. *Tratado de Fisiologia Médica.* 2002, 10 Edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1014p.
- Fridovich I. Superoxide dismutase. *Resv. Biochem.* 1975; 44: 147-159.
- Habold C, Chevallier C, Dunel-Erb S, Jourdainne C, Maho YL, Lignot JH. Effects of fasting and refeeding on jejunal morphology and cellular activity in rats in relation to depletion of body stores. *Scand. J. Gastroenterol.* 2004; 39: 531-9.
- Hallfrish J. Metabolic effects of dietary fructose. *FASEB.* 1990; 4: 2652-2660.
- Ji LL. Exercise-induced modulation of antioxidant defense. *Ann. NY Acad. Sci.* 2002; 959: 82-92.
- Jiang ZY, Woollard AC, Wolf S. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of  $Fe^{+2}$  in the presence of xylenol orange. Comparison with TBA assay and on iodometric method. *Lipids.* 1991; 26: 853-856.
- Juan ME, Raventos RML, DE LÁ Torre-Boronat MC, Planas JM. Determination of trans-resveratrol in plasma by HPLC. *Analytical Chemistry.* 1999; 71: 747-750.
- Kawada N, Seiki S, Inoue M, Kuroki T. Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin and N-acetylcysteine, on the functions of culture rat hepatic stellate cells and Kupffer cells. *Hepatology.* 1998; 27: 1265-1274.

- 
- Koteish A, Diehl AM. Animal models of steatosis. *Semin. in Liver Dis.* 2001; 21(1): 89-104.
- Kuhnle G, Spencer JPE, Chowrimootoo G, Schroeter H, Debnam ES, Srail KS, Rice-Evans C, Hahn U. Resveratrol is absorbed in the small intestine as resveratrol glucuronide. *Biochemical and Biophysical Res. Comm.* 2000; 272: 212-217.
- Lançon A, Delmas D, Osman H, Thénot JP, Latruffe JN. Human hepatic cell uptake of resveratrol: involvement of both passive diffusion and carrier-mediated process. *Biochem. and Biophys. Res. Communications.* 2004; 316: 1132-1137.
- Liber CS. CYP E1: from ASH to NASH. *Hepatol Res.* 2004; 28: 1-11.
- Martín AR, Villegas I, La Casa C, Lastra CA. Resveratrol, a polyphenol found in grapes, suppresses oxidative damage and stimulates apoptosis during early colonic inflammation in rats. *Biochem. Pharmacol.* 2004; 67: 1399-1410.
- Miller A, Blakely WF. Inhibition of glutathione reductase activity by a carbamylating nitrosurea: effect on cellular radiosensitivity. *Free Rad. Biol. Med.* 1992; 12: 53-62.
- Miller O. *Laboratório para o clínico* 1993, São Paulo: Atheneu Editora, 581p.
- Moura RA. *Técnicas de laboratório* 1982, São Paulo: Atheneu Editora, 822p.
- Nakamura W, Hojoda S, Hayashi K. Purification and properties of rat liver glutathione peroxidase. *Biochem. Biophys. Acta.* 1974; 358: 251-261.
- Nomura H et al. Prevalence of fatty liver in a general population in Okinawa, Japan. *Jpn. J. Med.* 1988; 27: 142-149.
- Novelli E L B, Fernandes A A H, Campos K E, Diniz Y S, Almeida J A, Faine L A, Ribas B O. The adverse effect of a high energy dense diet on cardiac tissue. *J. of Nutr. & Environmental Med.* 2002; 12 (4): 287-294.
-

- Novelli ELB. *Nutrição e vida saudável* 2005, Ribeirão Preto: Tecmed Editora, 288p.
- Okamoto OK, Pinto E, Latorre LR, Bechara EJ, Colepicolo P. Antioxidant modulation in response to metal-induced oxidative stress in algal chloroplasts. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2001; 40:18-24.
- Ou H, Chou F, Sheen H, Lin T, Yang C, Sheu WH. Resveratrol, a polyphenolic compound in red wine, protects against oxidized LDL-induced cytotoxicity in endothelial cells. *Clin. Chem. Acta.* 2006; 364: 196-204.
- Poli G. Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Mol. Aspects of Med.* 2000; 21: 49-98.
- Rice-Evans C, Miller, N. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods Enzymol.* 1994; 234:279-93.
- Rogers AE, Zeisel SH, Groopman J. Diet and carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 1993; 14: 2205-2217.
- Scoccia A E, Molinuevo M S, McCarthy A D, Cortizo A M. A simple method to assess the oxidative susceptibility of low density lipoproteins. *BMC Clin. Pathology.* 2001; 1 (1).
- Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and non-protein sulphhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochem.* 1968; 25:192-205.
- Sligte K, Bourass I, Driessen A, Stockbrugger RW, Koek GH. Non-alcoholic steatohepatitis: review of a growing medical problem. *Eur. J. of Inter. Medicine.* 2004; 15: 10-21.
- Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* 1969; 27:502-22.
- Yue TL, Ruffolo RR, Feuerstein G. Antioxidant action of carvedilol: a potential role in treatment of heart failure. *Heart Failure Rev.* 1999; 4 (1): 39-51.

---

Wenzel E, Soldo T, Erbersdobler H, Somoza V. Bioactivity and metabolism of trans-resveratrol orally administered to Wistar rats. *Mol. Nutr. Food Res.* 2005; 49: 482-494.

---

# *CONSIDERAÇÕES FINAIS*

---

Com base nos resultados apresentados nos três capítulos pode-se concluir:

*DIETA HIPERCALÓRICA*

---

- Elevou glicemia em jejum e ganho de peso;
- Elevou as concentrações séricas de glicose, colesterol total, LDL-colesterol e a relação LDL/TG;
- Reduziu as concentrações de HDL-colesterol e as relações HDL/TG e HDL/LDL no soro dos animais submetidos a esta dieta;
- Elevou as concentração de SAT e atividade da LDH no soro dos animais que ingeriram a dieta hipercalórica.

### CONSUMO DE RESVERATROL

- Reduziu a glicemia em animais submetidos a dieta hipercalórica;
- Preveniu a oxidação da LDL, aumentou a relação HDL/TG no soro dos animais que ingeriram dieta hipercalórica;
- Aumentou a atividade da enzima LDH sérica no grupo que recebeu dieta padrão;
- Reduziu as concentrações de HP e elevou as concentrações de SAT, independente da dieta ingerida no tecido hepático dos animais aos quais foi administrado.