

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA  
CAMPUS ITAQUI  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS**

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NO EFEITO  
TIPO ANTIDEPRESSIVO CAUSADO PELA HESPERIDINA EM  
CAMUNDONGOS**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**Lucian Del Fabbro**

**Itaqui, RS, Brasil**

**2013**



LUCIAN DEL FABBRO

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NO EFEITO  
TIPO ANTIDEPRESSIVO CAUSADO PELA HESPERIDINA EM  
CAMUNDONGOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), como requisito parcial para obtenção do grau de **Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos.**

Orientador: Cristiano Ricardo Jesse

Itaqui, RS, Brasil  
2013



LUCIAN DEL FABBRO

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NO EFEITO TIPO  
ANTIDEPRESSIVO CAUSADO PELA HESPERIDINA EM  
CAMUNDONGOS**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Graduação em  
Ciência e Tecnologia de Alimentos da  
Universidade Federal do Pampa  
(UNIPAMPA), como requisito parcial para  
obtenção do grau de **Bacharel em  
Ciência e Tecnologia de Alimentos.**

Trabalho de conclusão de curso defendido e aprovado em: 13 Maio de 2013.

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse  
Orientador  
Curso de Nutrição - Unipampa

---

Prof. MSc. Fernanda Aline de Moura  
Nutrição - UNIPAMPA>

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Graciela Salete Centenaro  
Ciência e Tecnologia de Alimentos - UNIPAMPA



Dedico este trabalho primeiramente a Deus, mas também a minha família, mãe Marli Teresinha Del Fabbro e pai Almiro M. Del Fabbro. Mas um agradecimento todo especial a minha esposa, fiel companheira e amiga de todas as horas, Núbia Flores Amaro Del Fabbro.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por esta oportunidade, e por ter me dado forças para chegar até aqui.

De uma forma muito especial, à minha esposa Núbia Flores Amaro Del Fabbro, que quando a insegurança fez com que nem eu mesmo acreditasse que chegaria até aqui me deu o necessário incentivo e aconselhamento que até hoje e que serão guardados eternamente.

Aos meus pais, Marli Teresinha Del Fabbro e pai Almiro M. Del Fabbro e toda minha família e toda a família da minha esposa, que me deram todo apoio e incentivo fundamentais para a conclusão desta jornada.

Ao Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse pela orientação, pelo companheirismo, incentivo, por acreditar em meu potencial, e pela imensa compreensão, aliados a contínuos ensinamentos de cunho científico.

Ao colega de Curso e laboratório, Carlos Borges Filho pelo imenso companheirismo, amizade, cumplicidade e compartilhamento de conhecimentos que fizeram com que ambos chegássemos até aqui.

A todos os professores pelo aprendizado e confiança depositados em mim durante a graduação.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste sonho.

***IN MEMORIAN: Á CARMELINA URSULA M. DEL FABBRO, MINHA Vó QUERIDA.***

“Você estará sempre presente em mim, em minha vida em meu pensamento em meu coração”.

## RESUMO

### **AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NO EFEITO TIPO ANTIDEPRESSIVO CAUSADO PELA HESPERIDINA EM CAMUNDONGOS**

Autor: Lucian Del Fabbro

Orientador: Cristiano Ricardo Jesse

Local e data: Itaqui, 13 Maio de 2013

A depressão é uma condição neuropsiquiátrica bastante comum e altamente incapacitante. O elevado número de pacientes com depressão que são refratários aos medicamentos disponíveis atualmente torna importante à busca por novas drogas para o tratamento desta doença. Parâmetros como segurança da droga, efeitos colaterais e mecanismos de ação devem ser levados em consideração, pelo fato dessas variáveis afetarem a aderência e eficácia ao tratamento. Estes aspectos endossam a procura de novas moléculas com o objetivo de aumentar a eficácia e a segurança e/ou reduzir os efeitos adversos e a latência ao tratamento. Para esta finalidade, destaca-se a busca de novas terapias farmacológicas a partir de plantas e alimentos com propriedades medicinais e seus constituintes para doenças psiquiátricas. Os flavonoides compreendem o grupo mais comum de compostos fitoquímicos polifenólicos naturais da dieta humana. A hesperidina, um membro do grupo de flavanona dos flavonoides é encontrada em elevada concentração em frutas cítricas, exerce atividades ansiolítica, antialérgica, tipo antidepressiva e anti-inflamatória. Além disso, também é conhecida por proteger as células neuronais do estresse oxidativo. Desta forma, este estudo tem por objetivo estender as propriedades da hesperidina, investigando os mecanismos bioquímicos e farmacológicos pelo qual exerce os efeitos do tipo antidepressivo em camundongos. A via L-arginina-NO-GMPc está envolvida no efeito tipo antidepressivo causado pela hesperidina no TSC em camundongos. O envolvimento dos efeitos tipo antidepressivo da hesperidina e o envolvimento da via da L-argininina-óxido nítrico no efeito tipo antidepressivo da hesperidina nos testes de suspensão de cauda (TSC) em camundongos ficou mais evidente pela redução dos níveis de nitrato/nitritos. O efeito tipo antidepressivo causado pela hesperidina foi revertido pelo sildenafil e pela L-arginina (drogas que aumentam os níveis de GMPc e de NO, respectivamente) e aumentado por oxadiazol (ODQ) (inibidor sensível da GCs), AM (um inibidor direto de NOS e GCs), L-NNA (um inibidor de NOS) e 7-NI (um inibidor específico de NOS neuronal). Desta maneira, o estudo dos efeitos tipo antidepressivo e os mecanismos envolvidos em modelos animais poderá, auxiliar no desenvolvimento de um composto de baixo custo e fácil acesso pela população, o qual poderá auxiliar no tratamento convencional da depressão.

Palavras chave: alimentos funcionais, flavonoides, hesperidina, depressão, tratamento

## ABSTRACT

### EVALUATION OF THE MECHANISMS INVOLVED IN ANTIDEPRESSANT-LIKE EFFECT CAUSED HESPERIDIN IN MICE

Author: Lucian Del Fabbro

Advisor: Cristiano Ricardo Jesse

Data: Itaquí, MAY, 2013

Depression is a neuropsychiatric condition quite common and highly disabling. The high number of patients with depression who are immune to the drugs currently available makes it important to search for new drugs to treat this disease. Parameters such as drug safety, side effects and mechanisms of action should be considered, because these variables affect the efficacy and adherence to treatment. These aspects endorse the search for new molecules with the aim of increasing the effectiveness and safety and / or reduce the adverse effects and latency to treatment. For this purpose, there is the search for new pharmacological therapies from plants and foods with medicinal properties and their constituents to psychiatric illness. Flavonoids comprise the most common group of polyphenolic phytochemicals natural human diet. The hesperidin, a member of the group and flavanone flavonoids found in high concentration in citrus fruits, exerts anxiolytic activity, ant allergic, type antidepressant and anti-inflammatory. Furthermore, it is also known to protect neuronal cells from oxidative stress. Thus, this study aims to extend the properties of hesperidin, investigating the biochemical and pharmacological mechanisms by which exerts antidepressant-like effects in mice. The L-arginine–NO–GMPc pathway is involved in the antidepressant-like effect caused by hesperidin on the mouse TSC. The involvement of the antidepressant-like effects of hesperidin and involvement of route of L-argininina-nitric oxide in the antidepressant-like effect of hesperidin in the tail suspension test (TSC) in mice was more evident by the reduced levels of nitrate / nitrite. The antidepressant-like effect caused by hesperidin was prevented by sildenafil and L-arginine (drugs that enhance the levels of GMPc and NO, respectively) and potentiated by oxadiazole (ODQ) (a sensitive inhibitor of sGC), MB (a direct inhibitor of both NOS and sGC), L-NNA (an inhibitor of NOS) and 7-NI (a specific neuronal NOS inhibitor). Thus, the study of the antidepressant-like effects and the mechanisms involved in animal models could in the long term, aid the development of a composite of low cost and easily accessible by the public, which can assist in the conventional therapy of depression.

**Keywords:** functional foods, flavonoids, hesperidin, depression, treating.



## ABREVIATURAS

µg – microgramas

kg – kilogramas

g - gramas

ml – mililitros

mm - milímetros

cm - centímetros

°C – graus celsius

min - minutos

h – horas

p.o – por via oral

i.p. – intra peritoneal

i.c.v. – intracerebro ventricular

TSC – Teste de suspensão de cauda

TCA – Teste de campo aberto

DMSO - dimetilsulfóxido

AM - azul de metileno

SNAP - S-nitroso-N-acetil penicilamina

ODQ - (1H-[1,2,4] oxadiazol [4,3-a] quinoxalin-1-ona)

L-NNA - N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina

7-NI - 7-nitroindazole

VCl<sub>3</sub> - N-(1-naftil)-etileno-diamina

NO – óxido nítrico

NOS – óxido nítrico sintase

GMPc – monofosfato de guanosina cíclica

CG<sub>S</sub> - guanilato ciclase solúvel

Fig – figura

L-ORN - L-ornitina

L-CIT - L-citrulina

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura básica dos flavonoides .....	22
Figura 2. Estrutura química da hesperidina.....	25
Figura 3: Hidrólise enzimática da G-hesperidina a hesperetina .....	26
Figura 4. A via L-arginina-óxido nítrico e ações do NO em plaquetas.....	29
Figura 5. Esquema de pré-tratamento com L-arginina, Sildenafil e SNAP.....	31
Figura 6. Esquema do tratamento sinérgico de L-NNA, 7-NI e hesperidina em .....	32
doses sub-efetivas	
Figura 7. Esquema do tratamento sinérgico de AM, ODQ e hesperidina em .....	32
doses sub-efetivas	
Figura 8. Efeito da hesperidina (0,1, 0,3 e 1 mg / kg) no TSC em camundongos.....	36
Figura 9. Pré-tratamento com L-arginina (um precursor NO, 750 mg / kg, i.p.), .....	37
sildenafil, (inibidor específico da fosfodiesterase 5, 5 mg / kg, i.p.) ou com SNAP (25 µg / kg i.c.v., doador de NO), em doses que não produzem nenhum efeito no TSC	
Figura 10. Efeito do tipo antidepressivo de hesperidina (0,01 mg / kg) .....	38
quando administrada em combinação com N <sup>G</sup> -nitro-L-arginina (0,01 mg / kg) e 7-NI (25 mg / kg) em camundongos	
Figura 11. Efeito do tipo antidepressivo de hesperidina (0,01 mg / kg) .....	39
quando administrada em combinação com AM (10 mg / kg) e ODQ (30 pmol) em camundongos	
Figura 12. Efeitos do tratamento com hesperidina (0,1 0,3 e 1 mg / kg, i.p.).....	40
nos níveis de nitrato / nitrito no cérebro de camundongos	

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. As estruturas da principais classes de flavonoides.....	23
Tabela 2. Concentração de hesperidina nos sucos de laranja brasileiros.....	25

## SÚMARIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2. OBEJETIVOS.....	19
2.1 Objetivos específicos.....	19
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	20
3.1 Alimentos funcionais.....	20
3.2 Compostos Polifenolicos.....	21
3.3 Flavonoides.....	21
3.3.1 Flavononas.....	24
3.4 Hesperidina.....	24
3.5 Depressão.....	27
3.6 Óxido nítrico.....	28
3.7 Envolvimento da via L-Arginina Óxido nítrico na depressão.....	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1 Animais.....	30
4.2 Fármacos.....	30
4.3 Efeito antidepressivo de hesperidina no teste de suspensão da cauda .....	30
4.4 Mecanismos envolvidos no efeito antidepressivo da hesperidina.....	31
4.5 Esquema de medicação.....	33
4.6 Técnica de injeção intracerebroventricular.....	33
4.7 Teste de suspensão da cauda (TSC).....	34
4.8 Teste de campo aberto (TCA).....	34
4.9 Experimentos ex vivo.....	34
4.9.1 Determinação colorimétrica do teor de nitrato / nitrito.....	34
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
6 RESULTADOS.....	35
6.1 Efeito da administração da hesperidina nos testes de suspensão de cauda (TSC).... e teste de campo aberto (TCA) em camundongos	35
6.2 Análise do papel desempenhado pela via da L-arginina-no-GMPC no efeito .....	36
tipo antidepressivo da hesperidina sobre os camundongos no teste de suspensão de cauda (TSC)	
6.3 Pré tratamento com sildenafil no efeito tipo antidepressivo da hesperidina sobre.....	36
os camundongos no teste de suspensão de cauda (TSC)	
6.4 Pré tratamento com N-acetyl-penicillamina (SNAP) no efeito tipo .....	37
antidepressivo da hesperidina sobre os camundongos no teste de suspensão de cauda (TSC)	
6.5 Administração de N <sup>G</sup> -nitro-L-arginina em combinação com hesperidina.....	38
6.6 Administração de 7-NI em combinação com hesperidina.....	38
6.7 Administração de azul de metileno em combinação com a hesperidina.....	39
6.8 Administração de ODQ em combinação com a hesperidina.....	39
6.9 O efeito causado pela hesperidina sobre os níveis de nitrato / nitrito .....	40
em cérebros de camundongos	
7 DISCUSSÃO .....	41

8 CONCLUSÃO.....	43
9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

## 1. INTRODUÇÃO

Os alimentos não são mais vistos meramente como uma forma de saciar a fome, de prevenir doenças causadas pela dieta deficiente e para prover os nutrientes necessários à construção, manutenção e reparo de tecidos, como água, proteína, carboidratos, lipídios, vitaminas e minerais. Os alimentos têm se tornado primariamente o veículo para nos transportar no caminho para a saúde ótima e bem-estar. A dieta tem sido reconhecida como a primeira linha de defesa na diminuição do risco de diversas doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como câncer, doenças cardiovasculares, osteoporose, artrite e também a depressão. O papel da alimentação equilibrada na manutenção da saúde tem despertado interesse da comunidade científica, que tem produzido inúmeros estudos com o intuito de comprovar a atuação de certos alimentos na prevenção de doenças (BARBOSA, 2009).

A busca de novas terapias farmacológicas a partir de plantas e alimentos com propriedades medicinais para doenças psiquiátricas tem progredido significativamente na última década. Isto é refletido num grande número de preparações de plantas e alimentos para as quais o potencial psicoterapêutico tem sido avaliado em uma variedade de modelos animais (KUMAR & KHANUM, 2012).

A depressão é uma das condições neuropsiquiátricas mais comum e altamente incapacitante com uma prevalência de 10-30 % em mulheres e 7-15 % em homens (WASAN et al., 2011). Estima-se que na população geral, a prevalência da depressão na vida de um indivíduo se situa em torno de 15-17% (NEMEROFF, 2006) e pacientes que sofrem de depressão severa apresentam altas taxas de morbidade e mortalidade, com conseqüências econômicas e sociais profundas (NEMEROFF, 2006). A depressão é a segunda causa de incapacitação no mundo, sendo a primeira a doença cardíaca (HOLTZHEIMER, 2006).

A depressão resulta, pelo menos em parte, de uma deficiência na atividade monoaminérgica na fenda sináptica (ELHWUEGI, 2004). Além desse, vários outros sistemas de neurotransmissores e mecanismos de transdução de sinal estão envolvidos, como os receptores da via da L-arginina-óxido nítrico (sistema nitrérgico) (JESSE ET AL., 2008). Alguns fármacos disponíveis para o tratamento da depressão foram descobertos a mais de 50 anos, como os antidepressivos tricíclicos e

inibidores da enzima monoamina oxidase (KASTER ET AL., 2005). Estes fármacos ainda encontram-se no mercado farmacêutico, apesar de apresentarem muitos efeitos colaterais os quais limitam o seu uso. Além desses, outros medicamentos foram desenvolvidos e estão disponíveis no mercado para a utilização no tratamento da depressão, como os inibidores seletivos de recaptação de serotonina e/ou noradrenalina e dopamina, que são tão efetivos quanto os tricíclicos, mas são mais seletivos e produzem menos efeitos colaterais (NEMEROFF, 2006).

Entretanto, mesmo com a existência de múltiplas classes farmacológicas, menos de 50% dos pacientes apresentam remissão total após o tratamento inicial da depressão. A terapêutica efetiva leva algumas semanas para manifestar seus efeitos e estes são muitas vezes acompanhados por efeitos não desejados (WÖRZ, 2003). Estes aspectos endossam a procura de novas moléculas com o objetivo de aumentar a eficácia e a segurança e/ou reduzir os efeitos adversos e a latência para o efeito antidepressivo. Para esta finalidade destaca-se a pesquisa com produtos naturais que ainda guarda grande potencial para fornecer compostos ativos sobre o Sistema Nervoso Central. Atualmente, o uso de plantas medicinais na terapêutica tem ganhado crescente aceitação tanto por profissionais médicos, como por pacientes (KUMAR & KHANUM, 2012).

Os flavonoides compreendem o grupo mais comum de compostos fitoquímicos polifenólicos naturais da dieta humana. Os flavonoides são encontrados em quase todas as plantas e possuem várias propriedades farmacológicas e toxicológicas. Inúmeras pesquisas já constataram que eles possuem atividades múltiplas, como vasodilatadores, anticarcinogênicos, anti-inflamatórias, antibacterianas, antialérgicas, antivirais, antioxidantes e hipolipidêmicas (BARBOSA, 2009).

A hesperidina (3',5,7-tri-hidroxi-4'-metoxi-flavanona-7-ramnoglicosídeo), um membro do grupo de flavanona de flavonoides, é classificado como bioflavonóide cítrico por ser encontrado em grande quantidade em frutas cítricas. A hesperidina é uma flavonana glicosilada é abundantemente encontrada na laranja e no limão (KAUR et al., 2006). A hesperidina tem demonstrado várias atividades fisiológicas, como a redução da fragilidade capilar (GARG et al., 2001), propriedades antioxidantes (WILMSEN et al., 2005), efeitos anti-hipertensivo (GALATI et al., 1996) e hipocolesterolemiantes (BOK et al., 1999). Exerce atividades ansiolítica, atividades

antialérgica e anti-inflamatória (HWANG et al., 2012). Além disso, a hesperidina também é conhecida por proteger as células neuronais do estresse oxidativo, funcionando como um potente *scavenger* de radicais livres (CHO, 2006).

### **3 OBJETIVOS**

Este estudo teve por objetivo estender as propriedades da hesperidina, investigando os mecanismos pelo qual exerce os efeitos do tipo antidepressivo em camundongos no teste de suspensão de cauda (TSC).

#### **3.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Estender as propriedades da hesperidina;
- Desvendar os mecanismos pela qual a hesperidina exerce seus efeitos tipo antidepressivo;
- Investigar se há envolvimento da via L-arginina-NO-GMPc nos efeitos tipo antidepressivo da hesperidina.

### **3 REVISÃO DA LITERATURA**

#### **3.1 Alimentos funcionais**

O conceito de alimentos funcionais surgiu no Japão, na década a de 80, com a finalidade de prevenir doenças crônicas degenerativas e melhorar a qualidade de vida (SGARBIERE & PACHECO, 1999).

Os alimentos funcionais devem apresentar propriedades benéficas além das nutricionais básicas, sendo apresentados na forma de alimentos comuns. São consumidos em dietas convencionais, mas demonstram capacidade de regular funções corporais de forma a auxiliar na proteção contra doenças como hipertensão, diabetes, câncer, e do sistema nervoso central (SOUZA et al., 2003).

Alimentos funcionais são todos os alimentos ou bebidas que, consumidos na alimentação cotidiana, podem trazer benefícios fisiológicos específicos, graças à presença de ingredientes fisiologicamente saudáveis (CÂNDIDO & CAMPOS, 2005).

A sociedade moderna tem se tornado cada vez mais complexa, modificando os padrões de vida. As pessoas frequentemente mostram sintomas de cansaço, irritação, ou mais comumente uma forma de estresse (KWAK & JUKES, 2001). O uso de alimentos na redução de riscos de doenças crônicas não transmissíveis vem motivando o desenvolvimento de novas pesquisas que esclareçam os efeitos benéficos dos elementos fitoquímicos ou compostos bioativos das dietas (GAMARANO 2004).

Os alimentos e ingredientes funcionais podem ser classificados de dois modos: quanto à fonte, de origem vegetal ou animal, ou quanto aos benefícios que oferecem, atuando em seis áreas do organismo: no sistema gastrointestinal; no sistema cardiovascular; no metabolismo de substratos; no crescimento, no desenvolvimento e diferenciação celular; no comportamento das funções fisiológicas e como antioxidantes (SOUZA et al., 2003).

A definição de que o alimento funcional pode ser classificado como alimento é aceita nos EUA, Europa e também no Brasil. Nessa perspectiva, o alimento funcional deve apresentar primeiramente as funções nutricional e sensorial, sendo a funcionalidade a função terciária do alimento (KWAK & JUKES, 2001).

Atualmente a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) atesta a funcionalidade de aproximadamente 200 produtos, permitindo a variedade alimentar (GÓES, 2006).

### **3.2 Compostos fenólicos - polifenóis**

Os polifenóis, ou compostos fenólicos, têm sido largamente estudados em razão dos efeitos benéficos que propiciam à saúde, como uma potente atividade antioxidante na prevenção de reações oxidativas e de formação de radicais livres (WOLLGAST & ANKLAN, 2000). Outros efeitos positivos para a saúde são as propriedades anti-inflamatória, anticarcinogênica, antiaterogênica, antitrombótica, antimicrobiana, analgésica e vasodilatadora, comprovadas em estudos científicos (WOLLGAST e ANKLAN, 2000).

Por se tratar de um amplo grupo, contendo mais de oito mil compostos já identificados, os compostos fenólicos podem ser distribuídos, dependendo da sua estrutura básica, em classes como fenóis simples, ácidos fenólicos, acetofenonas, ácidos fenilacéticos, ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropenos, cumarinas, xantonas, antraquinonas, flavonoides, lignanas e ligninas, entre outras (BRAVO, 1998).

De maneira simplificada, podem ser agrupados de acordo com a massa molecular, sendo que a classe de baixa massa molecular compreende os ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinâmicos; a classe de massa molecular intermediária, os flavonoides é considerada a maior e mais importante (ESCARPA & GONZALEZ, 2001).

### **3.3 Flavonóides**

Flavonoides (Figura 1) são substâncias pertencentes a uma classe de produtos naturais que atualmente podem ser consideradas micronutrientes. Estão presentes na dieta humana rica em vegetais e frutas, que são as principais fontes dessas substâncias (BARREIROS et al., 2000).

O preparo dos alimentos para consumo pode, algumas vezes, resultar em perdas destes compostos, em maior ou menor grau, variando de acordo com o tipo de alimento e o tipo de preparo empregado. Todavia, os flavonóides são compostos

relativamente estáveis, pois resistem à oxidação, altas temperaturas e moderadas variações de acidez (PETERSON & DWYER, 1998).

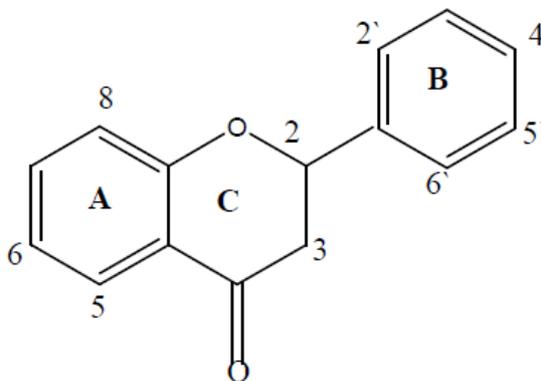


Figura 1. Estrutura básica dos flavonoides (Di Carlo et al., 1999).

Algumas dietas como a mediterrânea, rica em frutas frescas e vegetais, têm sido associadas com a baixa incidência de doenças, como as doenças cardiovasculares e o câncer, principalmente devido à elevada proporção de compostos bioativos como vitaminas, flavonoides e polifenóis (BENAVENTE-GARCÍA et al., 1999).

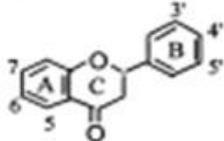
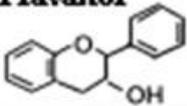
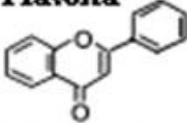
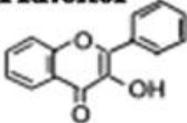
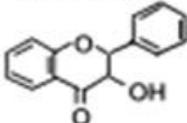
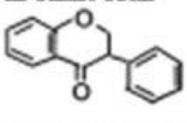
Tais compostos possuem uma série de propriedades farmacológicas que os fazem atuarem sobre os sistemas biológicos (LOPES et al., 2003).

Já foram descobertos mais de 6.000 flavonoides divididos em 6 principais classes (Tabela 1), BENAVENTE-GARCÍA et al., 1999). Os flavonoides compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural, cuja síntese não ocorre na espécie humana, por exemplo, os antioxidantes. Os flavonoides são derivados da reação de condensação do ácido cinâmico com grupos malonil-CoA e a sua classificação depende do nível de oxidação verificado em suas estruturas químicas (BLOOR, 2001).

A estrutura química dos flavonóides está baseada no núcleo flavilium, o qual consiste de três anéis fenólicos. O benzeno do primeiro anel é condensado com o sexto carbono do terceiro anel, que na posição 2 carrega um grupo fenila como substituinte. O terceiro anel pode ser um pirano heterocíclico, gerando as estruturas básicas das leucoantocianinas e das antocianidinas, denominado de núcleo flavana (AHERNE & O'BRIEN, 2002).

Atualmente mais de 6000 diferentes flavonóides foram descritos (MARCHAND, 2002), existem 14 tipos de flavonoides, sendo que a maioria dos compostos identificados pertence a apenas cinco tipos: flavonas, flavonóis, isoflavonas, antocianinas e flavanonas (PETERSON & DWYER, 1998).

Tabela 1: As estruturas das principais classes de flavonoides

Fórmula estrutural	Flavonóides	substituições				
		5	6	7	3'	4'
<p><b>Flavanona</b></p> 	<p><b>Eriodictiol</b> <b>Hesperitina</b> <b>Narigenina</b></p>	OH OH OH	H H H	OH OH OH	OH OH H	OH OMe OH
<p><b>Flavanol</b></p> 	<p><b>Catequina</b> <b>Gallocatequina</b></p>	OH OH	H H	OH OH	OH OH	OH OH
<p><b>Flavona</b></p> 	<p><b>Apigenina</b> <b>Crisina</b> <b>Luteolina</b></p>	OH H OH	H H H	OH OH OH	H H OH	OH H OH
<p><b>Flavonol</b></p> 	<p><b>Kamferol</b> <b>Miricetina</b> <b>Quercetina</b></p>	OH OH OH	H H H	OH OH OH	H OH OH	OH OH OH
<p><b>Flavononol</b></p> 	<p><b>Taxifolina</b></p>	OH	H	OH	OH	OH
<p><b>Isoflavona</b></p> 	<p><b>Daidazina</b> <b>Genistéina</b> <b>Glicitéina</b> <b>formononetina</b></p>	H OH OH H	H H OMe H	OH OH OH OH	H H H H	OH OH OH OMe

Fonte: Birt et al., 2001.

### 3.3.1 Flavanonas

As flavanonas são flavonoides encontrados principalmente em frutas cítricas como a laranja e o limão, entretanto elas são conhecidas por serem os principais agentes causadores do sabor amargo dos sucos cítricos industrializados. Além disso, os flavonoides descritos para o gênero Citrus (flavanonas) encontrados na natureza, podem exercer importante papel no organismo humano como agentes antioxidantes, destacando-se a hesperidina (Ribeiro & Ribeiro, 2008).

Estudos já demonstraram que as flavanonas cítricas retiradas da casca de tangerinas e laranjas contendo naringenina e hesperidina, apresentaram efeitos hipolepidêmicos (BOK, 2006).

A ingestão média de flavanonas é de aproximadamente 25 mg/dia em muitos países da Europa, com variações em função dos hábitos alimentares (ARABBI, 2004). A laranja e o suco de laranja são boas fontes destes flavonóides e contém cerca de 40mg/100g do alimento, mas perdas consideráveis ocorrem com a remoção da casca, antes do consumo ou no processo industrial (ALIMENTOS FUNCIONAIS, 2001).

Dentre os flavonoides das frutas cítricas (flavanona) destaca-se a hesperidina (3',5,7-tri-hidroxi-4'-metoxi-flavanona-7-ramnoglicosídeo), encontrada principalmente em sucos cítricos.

### 3.4 Hesperidina

A hesperidina é um produto natural encontrado em abundância no albedo (porção branca) dos limões e das laranjas verdes, além de sucos industrializados de laranja (Tabela 2) (PUPIN et al., 1998), sendo um membro do grupo flavanona dos flavonóides, cuja estrutura glicosídeo-flavonoídica está representada na Figura 5. A hesperidina é conhecida também como vitamina P ou citrina e possui uma ampla faixa de atividade fisiológica como anti-inflamatório, antitumoral, antibacteriana e inibidora da xantina oxidase (GARG et al., 2001). Tem sido demonstrado também que a hesperidina tem um potente efeito antioxidante. Além disso, possui atividade reguladora sobre a permeabilidade capilar, sendo normalmente empregada em

hemorragias e púrpuras vasculares. Esta molécula está presente em medicamentos venotônicos e vasculoprotetores (CHEN et al.; 2002).

**Tabela 2** - Concentração de hesperidina nos sucos de laranja brasileiros.

SUCO	HESPERIDINA (mg / L)
Suco de laranja espremido manualmente	104-537
Suco de laranja concentrado e congelado	531-690*
Suco de laranja concentrado e sem polpa	1089-1200

Fonte: PUPIN, et al., 19998

O flavonoide das frutas cítricas (hesperidina) é resistente ao suco gástrico do estômago sendo absorvido no trato gastrintestinal (KUROWSKA et al., 2000) após deglicosilação por enzimas de bactérias intestinais (HAVSTEEN, 1983). A baixa solubilidade da hesperidina em água dificulta sua absorção, que é menor que 0,01%, entretanto, um derivado da hesperidina, a glicosil hesperidina (G-Hesperidin) é marcadamente mais solúvel em água que a hesperidina (YAMADA et al., 2006).

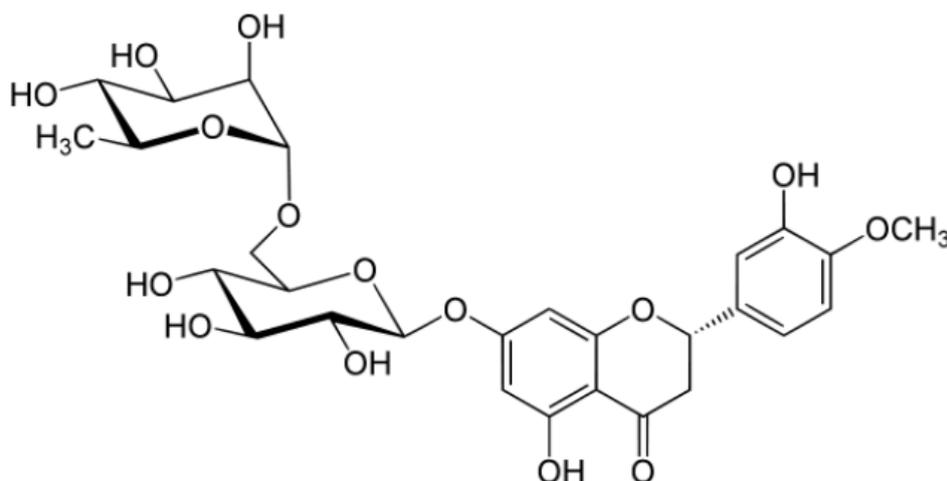


Figura 2. Estrutura química da hesperidina [3',5,7-trihidroxi-4'-metoxiflavanona-7-(6- $\alpha$ -L-ramnopiranosil)- $\beta$ -D-glucopiranosídeo] (GARG et al., 2001).

A hesperidina é metabolizada para hesperetina em presença de  $\beta$ -glicosidase (Fig. 6), antes de ser absorvida, a hesperetina é imediatamente metabolizada para metabólitos ligados a glicuronato e sulfato no epitélio intestinal e no fígado (YAMADA, 2006).

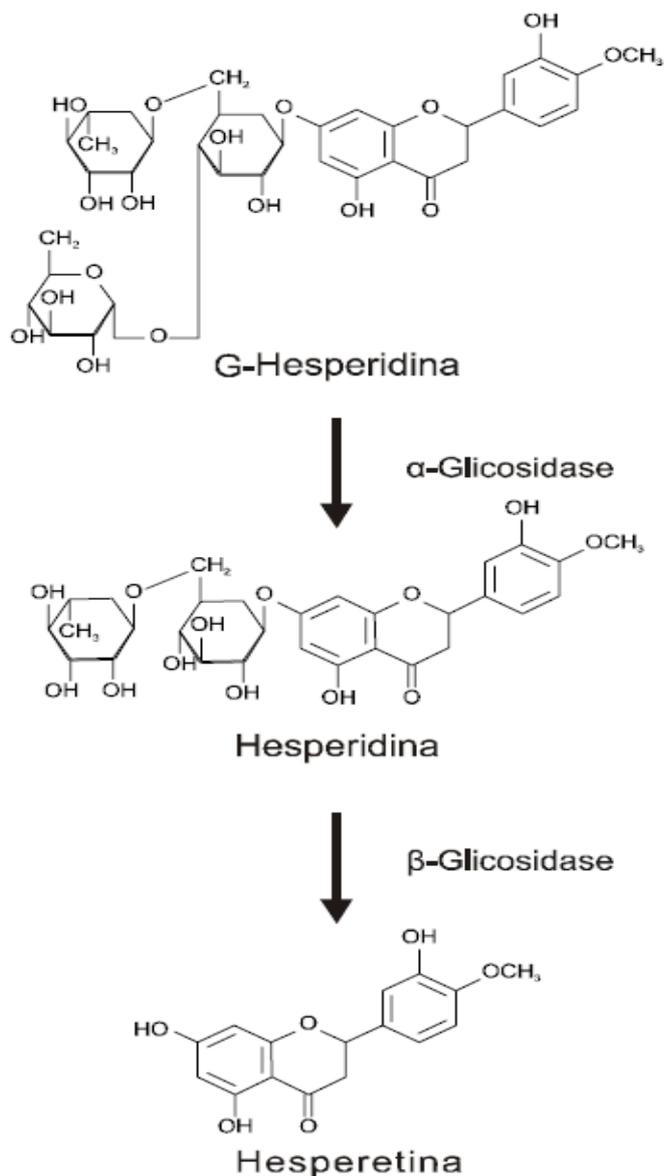


Figura 3. Hidrólise enzimática da G-hesperidina a hesperetina (NIELSEN et al. 2006).

### 3.5 Depressão

Atualmente a depressão tem sido considerada um dos transtornos psiquiátricos mais prevalentes no mundo, estima-se que aproximadamente 5% da população geral apresentam depressão (Associação de Psiquiatria Americana, APA, 2004).

A depressão é uma psicopatologia caracterizada por humor deprimido ou falta de motivação, perda de interesse ou prazer (anedonia) e cansaço ou fadiga. Além disso, alteração no peso corporal (ganho ou perda de peso significativo – 5%), prejuízo no sono (insônia ou hipersonia), agitação ou retardo psicomotor, sentimento de inutilidade ou culpa, baixa capacidade de concentração ou tomada de decisão e/ou ideação suicida são outros sintomas relevantes no diagnóstico da depressão (APA, 2004).

O desenvolvimento ou aparecimento dos sintomas que caracterizam a depressão, comumente, está associado à presença de um evento aversivo, como, por exemplo, situações de estresse, descontentamento na realização de atividades cotidianas (trabalho, casa, família) e perda de algo ou alguém significativo para o indivíduo (morte de um ente querido, fim de um relacionamento, perda do emprego, aposentadoria, saída dos filhos de casa) (DOUGHER & HACKBERT, 2003).

A depressão, e outras doenças associadas ao sistema nervoso central (SNC) contam hoje com tratamentos nutricionais com diferentes níveis de evidências de sua efetividade (LAKHAN & VIEIRA, 2008).

Os recentes avanços no conhecimento da neurofarmacologia, dos flavonoides sugerem que eles têm potencial para tratamento de diversas condições neurológicas e mentais. A ação de moléculas como, por exemplo, a hispidulina, que é capaz de atingir o receptor GABAA, tem demonstrado o importante papel na regulação da ansiedade e epilepsia, enquanto outros flavonoides são úteis em condições de neurodegeneração (JOHNSTON; BEART, 2004).

Diversos estudos sugerem que os flavonoides têm propriedades neuroativas podendo ser então uma excelente alternativa para o auxílio e/ou tratamento da depressão (DHAWAN et al.2004).

### **3.6 Óxido nítrico**

Já foi demonstrado que as células endoteliais estimuladas pela acetilcolina liberavam um vasodilatador, inicialmente denominado de fator de relaxamento derivado do endotélio (FURCHGOTT & ZAWADZKI). Posteriormente, essa molécula sintetizada pelo endotélio e com propriedades relaxadoras do músculo liso foi identificada como sendo NO (MONCADA et al., 1991).

O NO é um gás inorgânico com uma meia vida curta (menos de 30 segundos em sistemas biológicos), produzido por diferentes tipos de células, controlando ou influenciando importantes processos fisiológicos, incluindo neurotransmissão, vasodilatação, atividade citotóxica do sistema imune e adesão e agregação plaquetária (29).

### **3.7 Envolvimento da via L-Arginina Óxido nítrico na depressão**

A depressão está relacionada a alterações patológicas, incluindo ativação do sistema nervoso autônomo, distúrbios do ritmo cardíaco, inflamação sistêmica e localizada, ativação plaquetária e hiper-coagulabilidade, que influenciam negativamente o sistema cardiovascular (KATON et al., 2005). A ativação do eixo hipotalâmico-pituitário adreno cortical pode acelerar o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (GILLESPIE & NEMEROFF, 2005). A elevação da síntese de cortisol conduz ao desenvolvimento de aterosclerose e hipertensão, bem como, acelera a lesão de células endoteliais vasculares. A hiperatividade hipotalâmica-pituitária adreno cortical, por seu lado, aumenta a função simpática adrenal através de vias regulatórias centrais (RESSLER & NEMEROFF). O eixo hipotálamo-pituitária adrenal é hiperativo na depressão, provocando um aumento na síntese de cortisol (GILLESPIE & NEMEROFF, 2005).

A depressão ativa da agregação plaquetária, aumentando a ocorrência de eventos atero-trombóticos (MUSSELMAN et al., 2000). Um importante modulador da função plaquetária é o óxido nítrico (NO) que através da produção de monofosfato de guanosina cíclica (GMPc) inibe tanto a adesão como agregação de plaquetas. Nesta linha de raciocínio, pacientes com depressão apresentariam uma reduzida atividade da enzima NO-sintase (NOS), que converte L-arginina em NO e citrulina,

em plaquetas e menor concentração de nitritos e nitratos plasmáticos, metabólitos do NO (Fig. 4) (CHRAPKO et al., 2004).

A acumulação de GMPc intracelular desencadeará uma cascata de reações, cujo resultado final é a diminuição do cálcio livre intracelular, e conseqüentemente o relaxamento do músculo liso. A atividade do GMPc termina devido à hidrólise do próprio GMPc por efeito de enzimas da família das fosfodiesterases. No entanto, as exatas alterações nas diferentes etapas da via L-arginina-NO-GMPc afetando a função plaquetária na depressão precisam ainda ser melhor elucidadas.

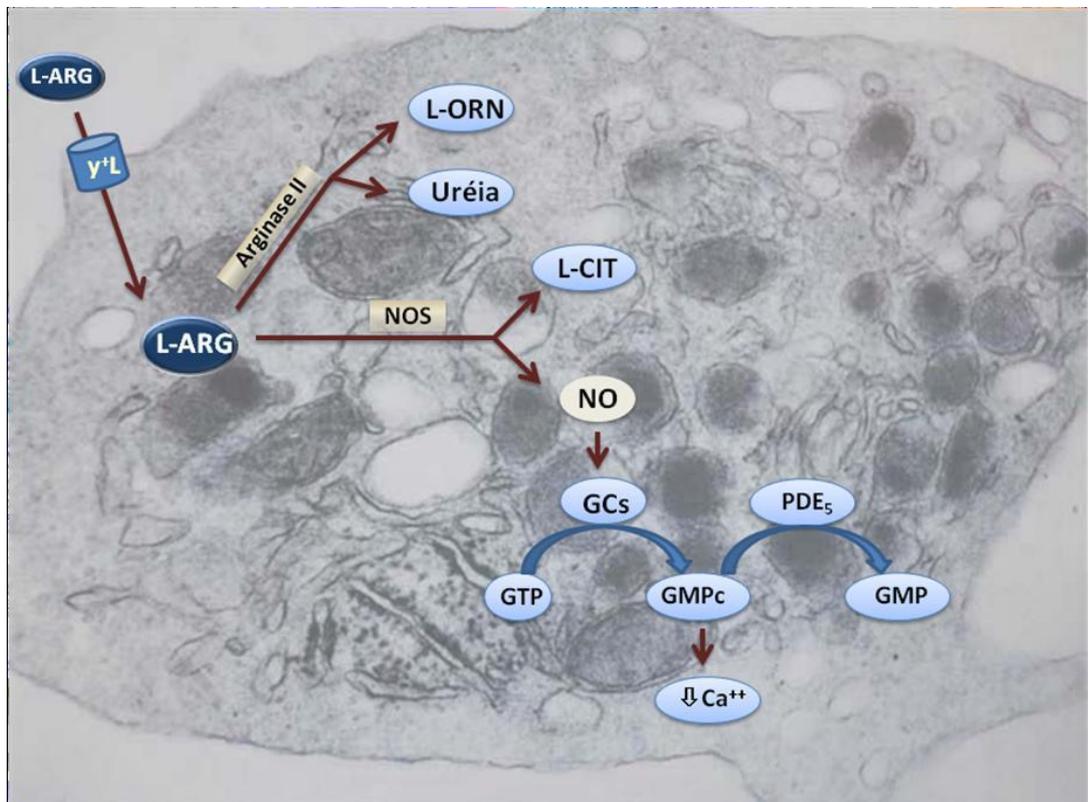


Figura 4. A via L-arginina-óxido nítrico e ações do NO em plaquetas

Fonte: CHRAPKO et al., 2004

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados, camundongos Swiss albinos (3 meses de idade, 25-35g) que foram mantidos sob condições ambientais controladas e adequadas de foto período, alimentação, água e temperatura. O estudo foi realizado nas instalações do campus de Itaqui (casa de passagem, salas e laboratórios) da Unipampa, e os procedimentos executados na fase clara de foto período, a fim de evitar alterações circadianas. O uso de animais neste experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso Animal da Unipampa (Protocolo CEUA nº 002/2013).

### 4.2 Fármacos

Foram utilizados os seguintes fármacos:

- Hesperidina;
- Azul de metileno (AM);
- S-nitroso-N-acetil penicilamina (SNAP);
- Sildenafil;
- (1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-ona) (ODQ);
- N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina (L-NNA);
- Sulfanilamida;
- L-arginina;
- 7-nitroindazol (7-NI);
- VCl<sub>3</sub>, N-(1-naftil)-etileno-diamina;
- Fluoxecetina;
- Impramida, sendo todos adquiridos da Sigma Chemical

EUA.

### 4.3 Efeito antidepressivo da hesperidina no teste de suspensão da cauda (TSC)

Os camundongos foram pré-tratados com a hesperidina (0,3 mg / kg, intraperitoneal, i.p.) ou com veículo (10 ml / kg, por oral, p.o.), 30 min antes do teste

de campo aberto (TSC). A fim de avaliar o efeito tipo antidepressivo de hesperidina, este composto foi injectado 30 minutos antes do teste de campo aberto (TCA) e TSC. Avaliando assim a atividade locomotora dos camundongos e imediatamente a seguir, os mesmos camundongos foram avaliados no TSC.

#### 4.4 Mecanismos envolvidos no efeito antidepressivo da hesperidina

O papel desempenhado pela via L-arginina - NO/GMPc no efeito tipo antidepressivo causado pela hesperidina sobre o TSC foi investigado em diferentes grupos de animais.

Para esta finalidade, os camundongos foram pré-tratados com L-arginina, um precursor de oxido nitrico (NO) (750 mg / kg, i.p., uma dose que não produz nenhum efeito sobre o TSC). O sildenafil, um tipo específico inibidor da fosfodiesterase 5 (5 mg / kg, i.p. numa dose que não produz nenhum efeito sobre o TSC) ou com o SNAP (N-acetyl-penicillamina ) (25 µg / kg, intracerebroventricular,, um doador de NO, em uma dose que não produz nenhum efeito sobre o TSC).

Trinta minutos depois da L-arginina, do sildenafil ou SNAP, a hesperidina (0,3 mg / kg, i.p., uma dose ativa no TSC) ou veículo foi administrado, e 30 minutos mais tarde, o teste de TSC ou o TCA foram realizados, (Fig. 5) (Jesse et al., 2008).

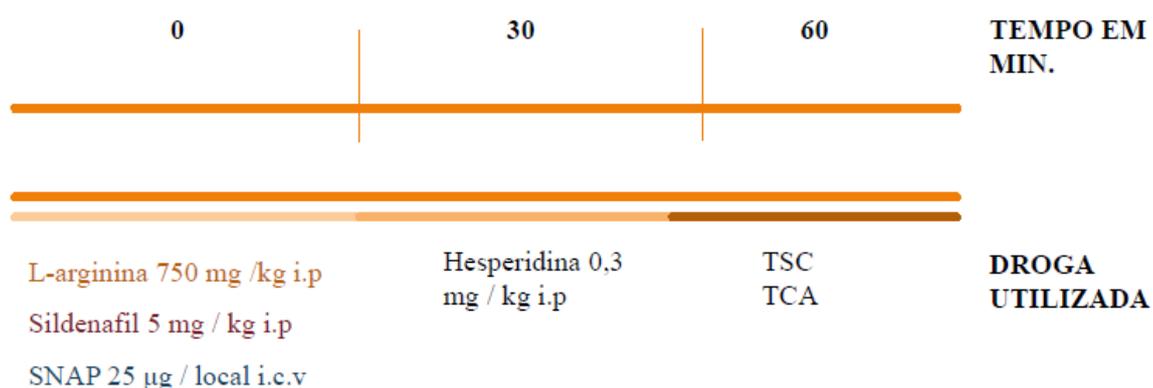


Figura 5. Esquema de pré-tratamento com L-arginina, Sildenafil e SNAP

Fonte. Elaborado pelo autor

Em outro conjunto de experiências, o efeito sinérgico de hesperidina (0,01 mg / kg, i.p., uma dose sub-efetiva) com uma dose sub-efetiva de NG-nitro-L-

arginina (inibidor da NOS) e nitroindazol (inibidor específico da NOS neuronal) foi investigado (Fig. 6).

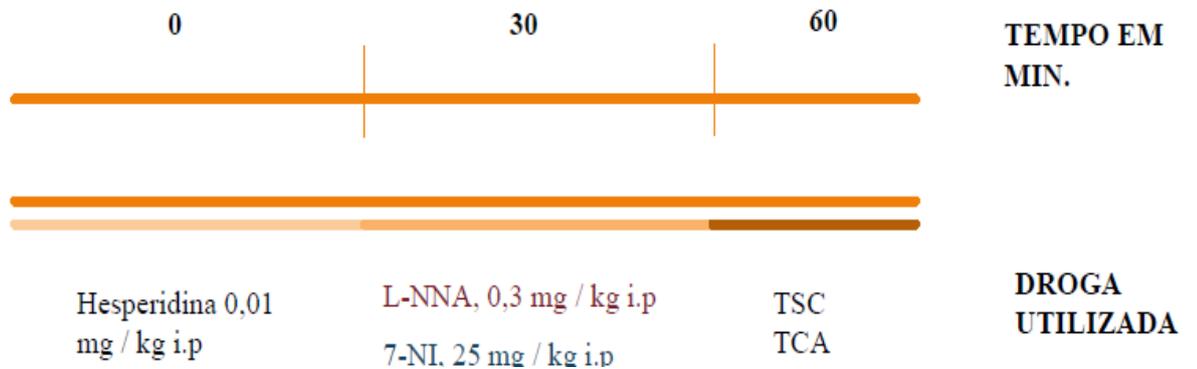


Figura 6. Esquema do tratamento sinérgico de L-NNA, 7-NI e hesperidina em doses sub-efetivas

Fonte. Elaborado pelo autor

Outro grupo de camundongos foi tratados a partir da administração de Azul de Metileno, 10 mg / kg i.p, (inibidor direto de NOS e sCG) e ODQ 30 pmol, intracerebroventricular (i.c.v.), (um inibidor direto da sCG) , 30 min. antes da administração da hesperidina, todos em uma dose sub-efetiva (Fig.7). (JESSE et al., 2008).

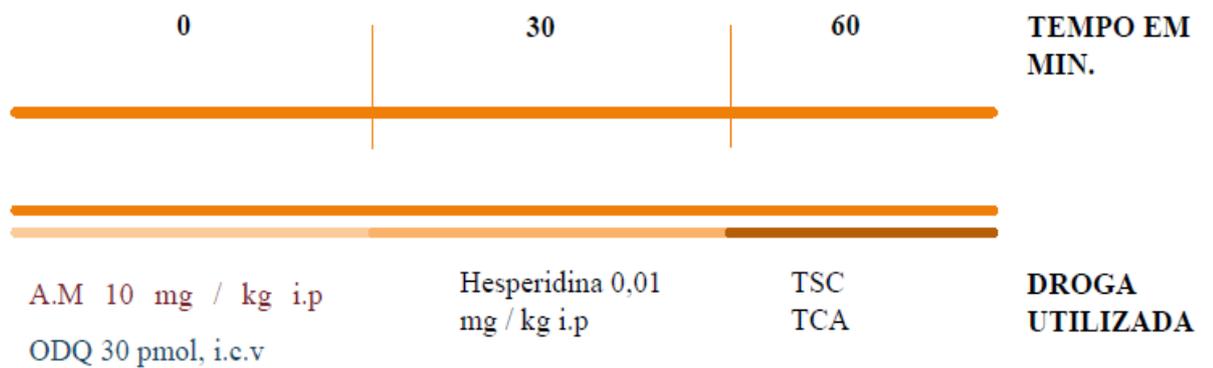


Figura 7. Esquema do tratamento sinérgico de AM, ODQ e hesperidina em doses sub-efetivas

Fonte. Elaborado pelo autor

#### **4.5 Esquema de tratamento**

A hesperidina foi dissolvida por meio da adição sequencial de dimetilsulfóxido (DMSO) até uma concentração final de 5%, uma solução de 0,25% de Tween 80 até uma concentração final de 20% e de solução salina para completar o volume até 100%. A escolha das doses de hesperidina foram baseadas em dados publicados e em experiências preliminares.

Outras drogas foram dissolvidas em solução salina (NaCl 0,9%), exceto ODQ e 7-NI, que foram dissolvidos em 15% de DMSO e foram feitas até o volume final por adição de NaCl 0,9%.

Os camundongos receberam todas as drogas em um volume constante de 10ml/kg de peso corporal, exceto SNAP e ODQ que foram injetados pela via i.c.v. (5µl/local). Os grupos tratados com veículo apropriado também foram avaliados simultaneamente. As doses de administração foram escolhidas com base em experiências realizadas anteriormente no nosso laboratório e em outros estudos (Jesse et al. 2008).

#### **4.6 Técnica de injeção intracerebroventricular (i.c.v.)**

Uma agulha hipodérmica de 0,4 milímetros de diâmetro externo ligado a uma cânula que estava ligada a uma seringa Hamilton de 25 µl, foi inserida na perpendicular através do crânio a não mais do que 2 milímetros no cérebro do camundongo. Um volume de 5 µl foi então administrado no ventrículo lateral esquerdo. A injeção foi administrada durante 30 s, e manteve-se a agulha no local durante mais 30 s, a fim de evitar o refluxo das substâncias injectados. O local de injeção foi de 1 mm para a direita ou para a esquerda a partir do ponto médio de uma linha traçada através da base anterior das orelhas (Kaster et al., 2005). Para assegurar que as drogas foram administradas exatamente no ventrículo cerebral, os cérebros foram dissecados e examinados macroscopicamente após o teste. Os animais controle receberam uma injeção de solução salina i.c.v. de uma maneira semelhante.

#### **4.7 Teste de suspensão da cauda (TSC)**

Os camundongos foram isolados de efeitos sonoros e visuais e suspensos a 50 centímetros acima do chão por uma fita adesiva colocada a cerca de 1 cm da extremidade da cauda. O tempo de imobilidade foi cronometrado durante um período de 6 min. (STERU et al., 1985).

#### **4.8 Teste de campo aberto (TCA)**

Para avaliar os possíveis efeitos da hesperidina sobre as atividades locomotoras e exploratórias, os camundongos foram avaliados no TCA. O TCA foi realizado com uma caixa de polietileno e cercada por paredes de 30 cm de altura. O piso do campo aberto com 45 cm de comprimento e 45 cm de largura, foi dividido por fitas, em 09 quadrados (3 fileiras de 3). Cada animal foi colocado individualmente no centro do aparelho e observado durante 6 minutos para cronometrar a atividade locomotora (número de segmentos atravessados com as quatro patas) (JESSE et al., 2008).

#### **4.9 Experimentos *ex vivo***

Os camundongos foram pré-tratados com a hesperidina (0,01-1 mg / kg, i.p.) ou veículo. Os animais foram eutanasiados após 30 minutos e o seu cérebro removido para a determinação dos níveis de nitrato / nitrito.

##### **4.9.1 Determinação colorimétrica da quantidade de nitrato / nitrito**

O cérebro foi dissecado e homogeneizado com ZnSO<sub>4</sub> (200 mM) e acetonitrilo (96%), centrifugado a 16.000 x g, a 4°C, durante 30 minutos, e o sobrenadante foi recolhido para analisar o nitrito além do teor de nitrato (Miranda et al., 2001). O sedimento resultante foi suspenso em NaOH (6 M) para determinação de proteínas.

O teor de NO foi estimado num meio contendo 300 ml de 2% VCl<sub>3</sub> (em 5% de HCl), 200 ml de 0,1% de N-(1-naftil)-etileno-diamina, 200 ml de 2% de

sulfanilamida (em 5% de HCl) . Após incubação a 37°C durante 60 minutos, os níveis de nitrato / nitrito foram determinadas por espectrofotometria a 540 nm, com base na redução de nitrato para nitrito. Os níveis de nitrito e nitrato de tecido foram expressas em nmol de nitrato / nitrito / mg de proteína.

## **5 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Todos os resultados experimentais são dados como a (s) média (s)  $\pm$  SEM. As comparações entre os grupos experimentais e controle foram realizadas por uma via (hesperidina) ou duas vias, seguido pelo teste de Newman-Keuls para comparação post hoc, quando apropriado. Um valor de  $P < 0,05$  foi considerado significativo.

## **6 RESULTADOS**

### **6.1 Efeito da administração da hesperidina nos testes de suspensão de cauda (TSC) e teste de campo aberto (TCA) em camundongos**

O tempo de imobilidade no TSC dos animais tratados com a hesperidina é mostrado na Figura 8. A análise de variância ANOVA revelou um efeito significativo de hesperidina nas doses de 0,1, 0,3 e 1 mg / kg (i.p.) no TSC ( $P < 0,05$ ). A hesperidina em todas as doses testadas não produziu qualquer alteração no número de cruzamentos dos camundongos no TCA (dados não mostrados).

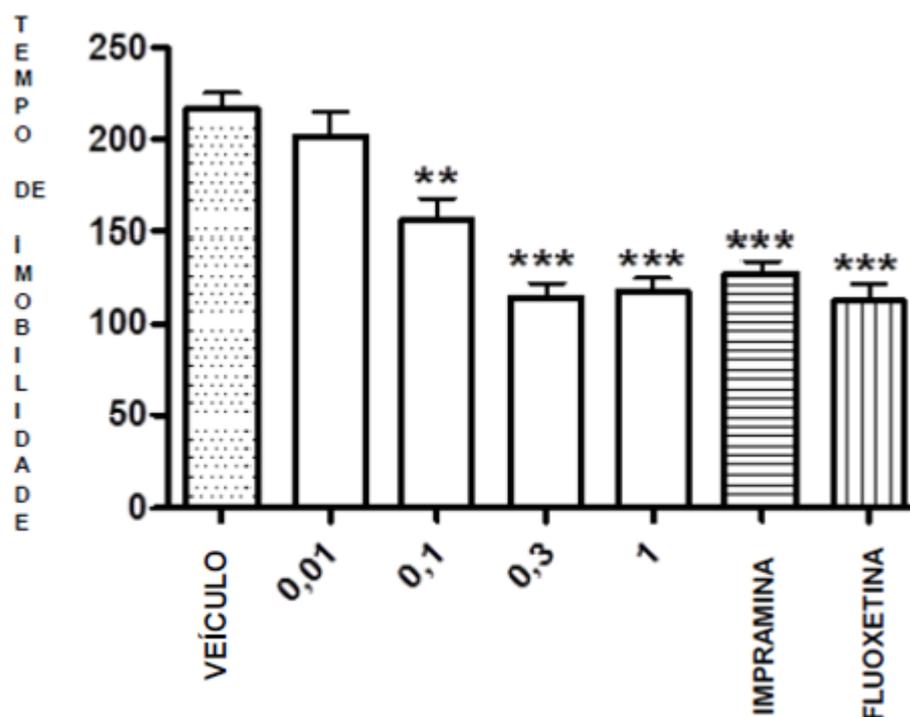


Figura 8: Efeito da hesperidina (0,1, 0,3 e 1 mg / kg) no TSC em camundongos.

\*\*\*  $p < 0,0001$

\*\*  $p < 0,001$

## 6.2 Análise do papel desempenhado pela via da L-arginina-NO- GMP<sub>c</sub> no efeito tipo antidepressivo da hesperidina sobre os camundongos no TSC

Os resultados apresentados na Figura 9A mostram que o pré-tratamento de camundongos com a L-arginina (750 mg / kg, i.p., precursor de NO) reverteu a redução do tempo de imobilidade induzida por hesperidina (0,3 mg / kg, i.p.) no TSC ( $P < 0,05$ ). Não foram observados efeitos significativos no número de cruzamentos no TCA em camundongos tratados com L-arginina e hesperidina (dados não mostrados).

## 6.3 Pré tratamento com sildenafil no efeito tipo antidepressivo da hesperidina sobre os camundongos no TSC

Os resultados apresentados na Figura. 9B mostra que o pré-tratamento com sildenafil (5 mg / kg, ip, inibidor da fosfodiesterase 5) reverteu o efeito antidepressivo de hesperidina (0,3 mg / kg, i.p.) sobre o TSC ( $P < 0,05$ ). O número de cruzamento

no TCA foi inalterada pela administração de sildenafil e de hesperidina (dados não mostrados).

#### 6.4 Pré tratamento com N-acetyl-penicillamina (SNAP) no efeito tipo antidepressivo da hesperidina sobre os camundongos no teste de suspensão de cauda (TSC)

A Figura 9C. demonstra mostra que o pré-tratamento dos camundongos com SNAP (25 µg / kg, i.c.v., doador de NO), diminuiu o efeito antidepressivo de hesperidina (0,3 mg / kg, i.p.) sobre o TSC (P <0,05). A administração de hesperidina com SNAP não alterou o número de cruzamentos dos camundongos no TCA (dados não mostrados).

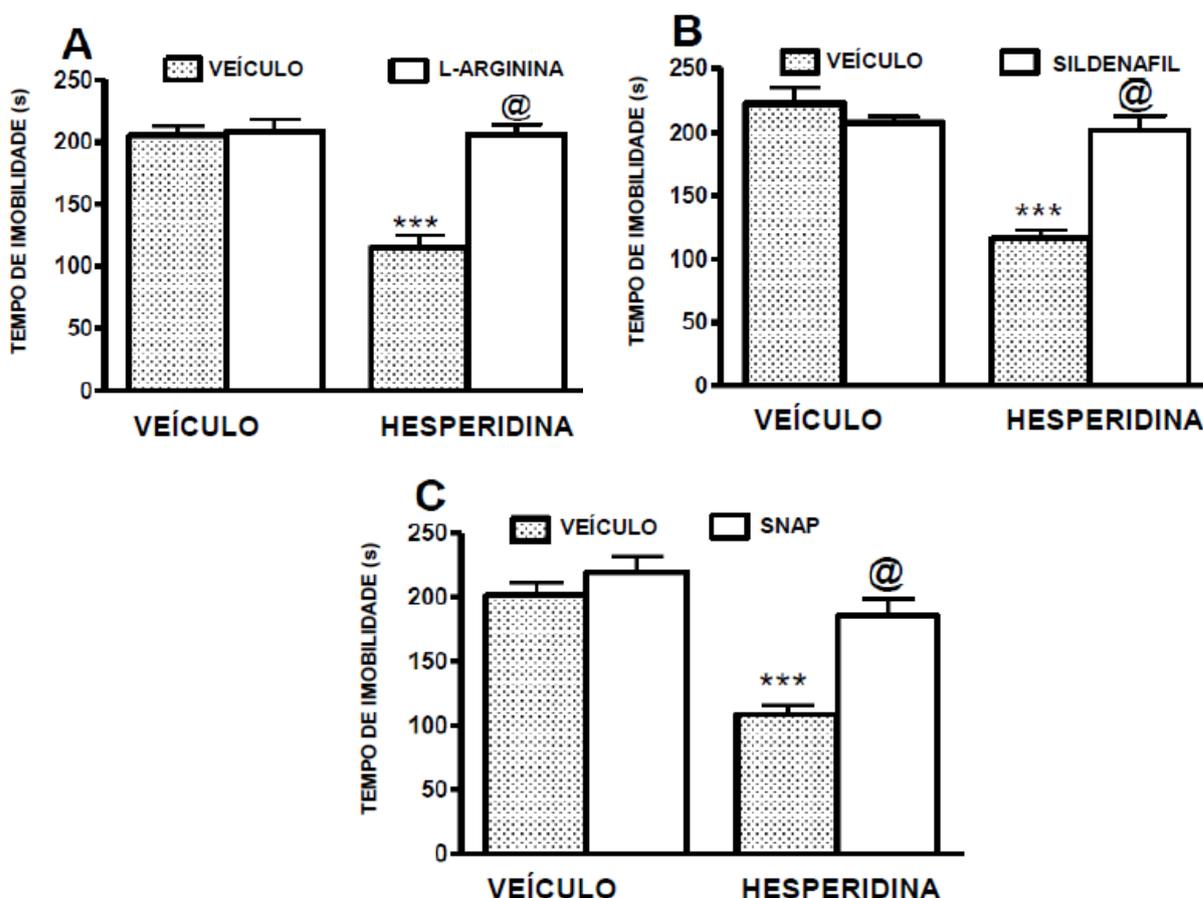


Figura 9. Pré-tratamento com L-arginina (um precursor NO, 750 mg / kg, i.p.), sildenafil, (inibidor específico da fosfodiesterase 5, 5 mg / kg, i.p.) ou com SNAP (25 µg / kg, i.c.v., doador de NO), em doses que não produzem nenhum efeito no TSC.

\*\*\* p < 0,0001

@ redução dos efeitos significativos, devido o pré-tratamento com L-arginina, sildenafil ou SNAP

## 6.5 Administração de N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina em combinação com hesperidina

Os resultados ilustrados na figura 10A mostram que a administração de N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina (0,3 mg / kg i.p., dose sub-efetiva, para inibir á NOS), em combinação com a hesperidina (0,01 mg / kg, i.p., dose sub-efetiva) produziu um efeito tipo antidepressivo, em comparação com a administração de qualquer fármaco isolados (P <0,05) . Não foram encontrados efeitos significativos no número de cruzamentos no TCA em camundongos tratados com a NG-nitro-L-arginina e a hesperidina (dados não mostrados).

## 6.6 Administração de 7-NI em combinação com hesperidina

A figura 10B mostra que a administração de 7-NI (25 mg / kg i.p., inibidor específico da NOS neuronal) em combinação com a hesperidina (0,01 mg / kg, i.p., dose sub-efetiva) produziu um efeito tipo antidepressivo, em comparação com a administração de qualquer droga isolada (P <0,05). A administração de 7-NI isolada ou em combinação com a hesperidina de não afetou a atividade locomotora de camundongos no TCA (dados não mostrados).

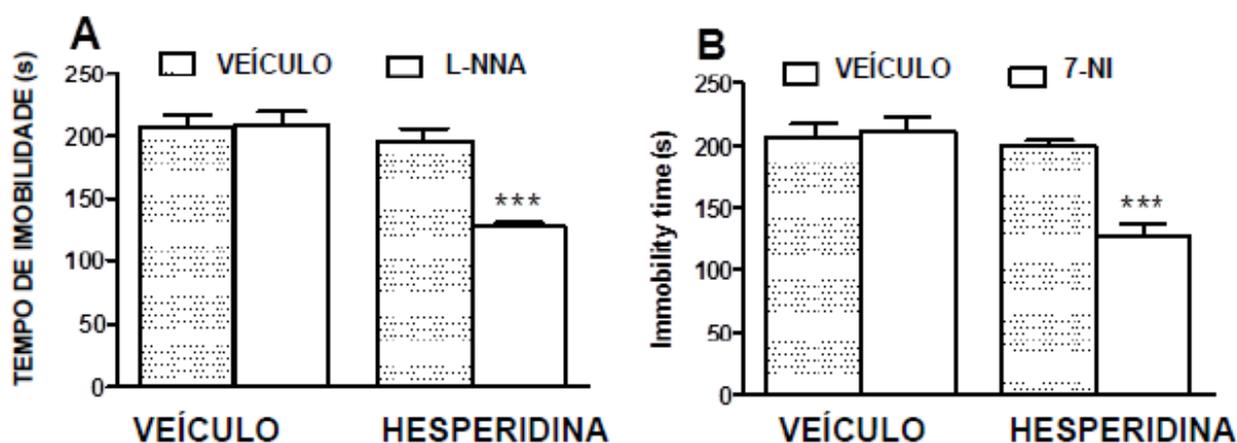


Figura 10. Efeito do tipo antidepressivo de hesperidina (0,01 mg / kg) quando administrada em combinação com N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina (0,01 mg / kg) e 7-NI (25 mg / kg) em camundongos

\*\*\* p < 0,0001

## 6.7 Administração de azul de metileno em combinação com a hesperidina

A figura 11A mostra AM, 10 mg / kg i.p., dose sub-efetiva, um inibidor direto de NOS e CGs) em combinação com a hesperidina (0,01 mg / kg, i.p., uma dose sub-efetiva) também produziu um efeito anti-imobilidade no TCA, quando comparado com a administração de qualquer fármaco sozinho ( $P < 0,05$ ). A administração de azul de metileno (10 mg / kg, i.p.), isoladamente ou em combinação com a hesperidina não afetou a a locomoção dos camundongos no TCA (dados não mostrados).

## 6.8 Administração de ODQ em combinação com a hesperidina

A figura 11B mostra que ODQ (30 pmol, i.c.v., uma dose sub-efetiva, um inibidor direto da CGs), em combinação com a hesperidina (0,01 mg / kg, i.p., uma dose sub-efetiva) produziu um efeito anti-imobilidade no TSC, em comparação com a administração de qualquer droga sozinho ( $P < 0,05$ ). A administração de ODQ (30 pmol, icv) sozinho ou em combinação com a hesperidina não afetou o número de cruzamentos dos camundongos no TCA (dados não mostrados).

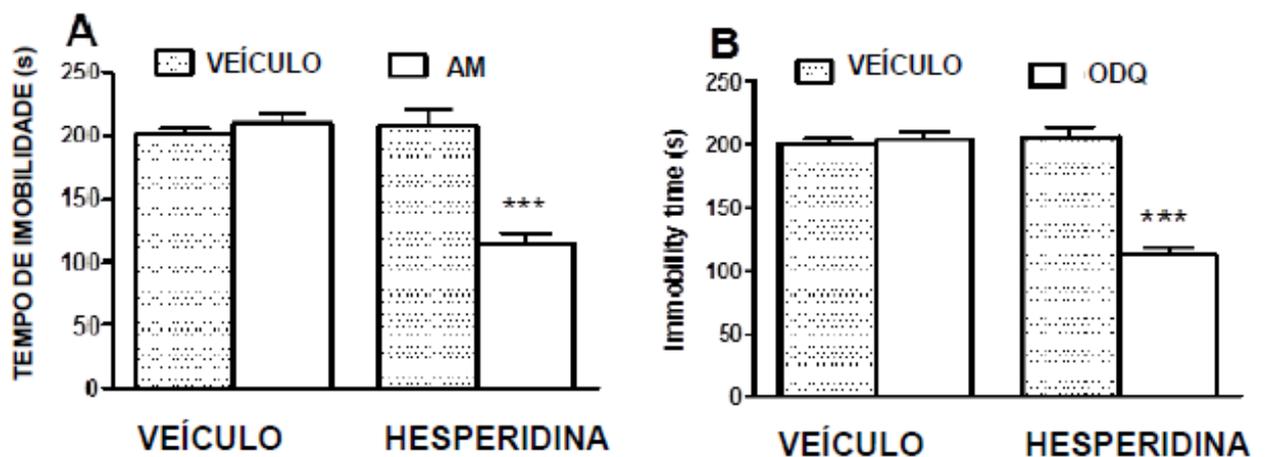


Figura 11. Efeito do tipo antidepressivo de hesperidina (0,01 mg / kg) quando administrada em combinação com AM (10 mg / kg) e ODQ (30 pmol) em camundongos

\*\*\*  $p < 0,0001$

### 6.9 O efeito causado pela hesperidina sobre os níveis de nitrato / nitrito em cérebros de camundongos

Como mostrado na figura 12, o tratamento com a hesperidina (0,3 e 1 mg / kg, i.p.) causou uma redução significativa dos níveis de nitrato / nitrito no cérebro de camundongos em comparação com a do grupo do veículo ( $P < 0,05$ ). Os níveis de nitratos / nitritos nos cérebros de camundongos tratados com uma hesperidina (0,01 e 0,1 mg / kg, i.p.) foram semelhantes aos do grupo do veículo.

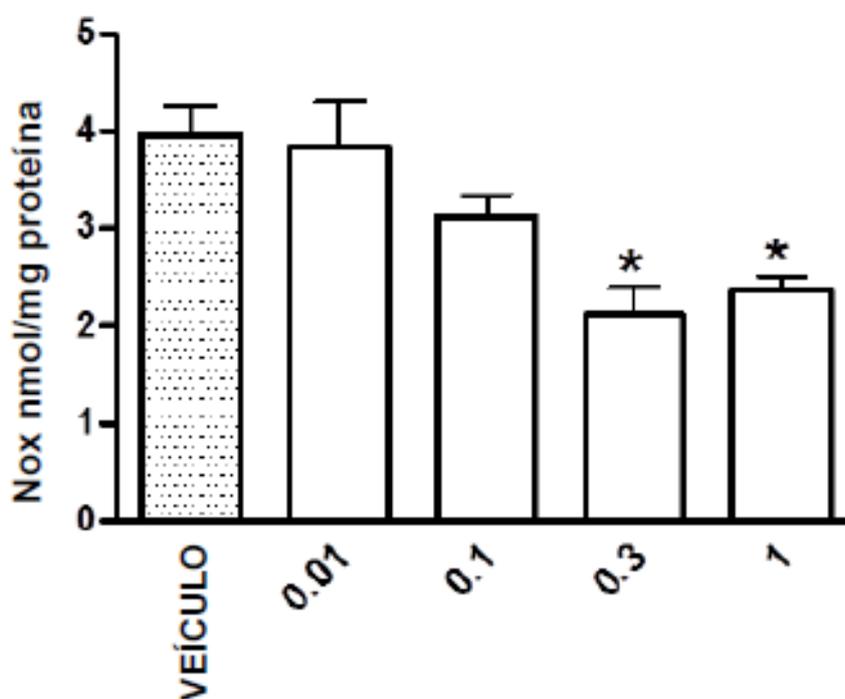


Figura 12. Efeitos do tratamento com hesperidina (0,1 0,3 e 1 mg / kg, i.p.) nos níveis de nitrato / nitrito no cérebro de camundongos

\* $p < 0,05$

## 7 DISCUSSÃO

Neste estudo, foi demonstrado que a hesperidina produziu um efeito tipo antidepressivo no TSC em camundongos. Além disso, foi possível demonstrar que o efeito tipo antidepressivo da hesperidina sobre o TSC em camundongos é provavelmente modulado pela via L-arginina-NO-GMPc.

A diminuição dos níveis cerebrais de nitrato / nitrito em camundongos tratados com a hesperidina em doses efetivas no TSC, complementa o envolvimento da via L-arginina-NO-GMPc no efeito hesperidina.

Este estudo, mostrou que o pré-tratamento de camundongos com a L-arginina (um substrato para a oxido nítrico sintase, NOS) ou com SNAP (um doador de NO) em doses que não produzem qualquer efeito sobre o TSC, inibiu significativamente o efeito anti-imobilidade causada pela hesperidina. Além disso, a reversão do efeito tipo antidepressivo da hesperidina sobre o TSC pelo pré-tratamento dos camundongos com o sildenafil (um tipo de inibidor seletivo da fosfodiesterase 5) reforça a noção de que a administração de hesperidina produziu uma redução dos níveis de GMPc, e que esta constatação pode ser importante para o seu efeito em testes antidepressivos. O sildenafil aumenta os níveis de GMPc no tecido alvo (Beavo, 1995) e foi previamente relatado para reverter o efeito anti-imobilidade do ODQ no TSC (KASTER et al., 2005).

Além disso, um efeito sinérgico, antidepressivo foi observado quando foi administrado a hesperidina e o N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina, um inibidor de NOS. Assim, alguns estudos relatam que, pelo menos em algumas condições experimentais, a administração de inibidores da NOS, dependendo de suas doses, produz efeito antidepressivo no TSC (JESSE et al., 2010). Já foi relatado que a N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina (0,3 - 10mg/kg, i.p.), um inibidor de NOS, reduziu significativamente a duração da imobilidade no TSC (DA SILVA et al. 2000). Assim, estes resultados indicam que a inibição da NOS pode ser a base da redução do tempo de imobilidade no TSC induzida pela hesperidina. Um efeito tipo antidepressivo foi produzido quando hesperidina foi administrado com 7-NI, um inibidor da NOS neuronal seletiva, ou azul de metileno, um inibidor de NOS e CGs.

O efeito sinérgico da hesperidina e AM, um inibidor da NOS e CGs, reforça a ideia de que o efeito da hesperidina no TSC pode ser devida a uma inibição da

síntese de NO e também sugere que podem ser mediados por via da redução de GMPc . Embora o AM seja um composto com efeitos não específicos, a hipótese de que este composto esteja envolvido via na redução do tempo de imobilidade induzida por hesperidina no TSC na via NO-GMPc. O efeito do ODQ (10 e 20 mg / kg) foi avaliado para a produção de um efeito antidepressivo no TSC em camundongos, este efeito foi revertido pelo precursor da L-arginina (HEIBERG et al., 2002).

Outra evidência de que a hesperidina em combinação com o ODQ, exerce o seu efeito sobre a TSC, diminuindo os níveis de GMPc, é dada pelo resultado mostrado no pré-tratamento de sildenafil em camundongos impedido o efeito de antiimobilidade da hesperidina no TSC. Assim, como os efeitos antidepressivo de adenosina (KASTER et al., 2005), memantina (ALMEIDA et al., 2006), venlafaxina (DHIR E KULKARNI, 2007), berberina (DHIR E KULKARNI, 2007) e bis seleneto (JESSE et al., 2010) foram também potencializada pelo pré-tratamento com ODQ e / ou L-NNA, e impedido os efeitos do sildenafil e da L-arginina, sugerindo que a via da L-arginina-NO-GMPc tem um papel importante na mediação dos seus efeitos comportamentais.

Em concordância com os dados obtidos no TSC que sugerem que o tratamento com a hesperidina (0,3 e 1 mg / kg), diminui os níveis de nitrato / nitrito cerebrais em camundongos. Este resultado pode sugerir mais um papel para o efeito tipo antidepressivo da hesperidina no TSC.

O NO desempenha um papel neuromodulador significativo no sistema nervoso central (SNC). Qualquer manipulação farmacológica da via L-arginina-NO-GMPc pode ser considerado como uma nova abordagem terapêutica para o tratamento de distúrbios do SNC, mais ainda para a depressão mental (HEIBERG et al., 2002). Alguns estudos demonstraram que a inibição da NOS produz efeito antidepressivo em uma variedade de testes em animais, incluindo o TSC em camundongos (ALMEIDA et al., 2006). Além disso, vários estudos *in vivo* mostraram um papel modulador da NO nos níveis extracelulares do mecanismo de recaptação de serotonina no sistema nervoso central (HARKIN et al., 2004).

## 7 CONCLUSÃO

Desta forma, pode ser sugerido que os inibidores da L-arginina-NO-GMPc administrados em combinação com a hesperidina podem ser um alvo para um possível novo tratamento para depressão.

A via da L-arginina-NO-GMPc está envolvida no efeito tipo antidepressivo causado pela hesperidina no TSC em camundongos.

O efeito tipo antidepressivo causado pela hesperidina foi revertido pelo sildenafil e pela L-arginina (drogas que aumentam os níveis de GMPc e de NO, respectivamente) e aumentado pelo ODQ (inibidor sensível da CGs), AM (um inibidor direto da NOS), L-NNA (um inibidor da NOS) e 7-NI (um inibidor neural específico de NOS).

Assim, com base nas considerações acima, os resultados sugerem claramente que a administração aguda de hesperidina produziu um efeito tipo antidepressivo no TSC em camundongos por um mecanismo que modulada a inibição da via L-arginina-NO-GMPc.

## 8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*. New York, v. 18, n. 1, p. 75-81, 2002.

ALMEIDA, R.C. et al. Evidence for the involvement of L-arginine–nitric oxide–cyclic guanosina monophosphate pathway in the antidepressant-like effect of memantine in mice. *Behav Brain. Res.* v. 22, n. 22, p. 168-318, 2006.

ALIMENTOS FUNCIONAIS. O maravilhoso mundo dos nutracêuticos. Aditivos e Ingredientes. v. 17, p.38-56, 2001

AMEER, B. et al. Flavone absorption after naringin, hesperidin, and citrus administration. *Clin. Pharmacol.* v. 60, p.34-40, 1996

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (2004). Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais – DSMIV- TR. (Dayse Batista Trans.). Porto Alegre: Artmed. (Publicado originalmente em 2000).

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

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 2 de 07 de janeiro de 2002. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e/ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. Disponível em: <[www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/novos\\_alimentos.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/novos_alimentos.htm)>. Acessado em Abril de 2013.

BARBOSA, C.A. Avaliação do efeito de compostos naturais curcumina e hesperidina na hiperlipidemia induzida em coelhos. VISÇOSA: Tese (Doutorado em Bioquímica), Programa de Pós - Graduação em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa. 2009, 115 p.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Estresse Oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e a defesa do organismo. *Química nova.* v. 29, p. 113-123, 2006.

BEAVO, J.A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol. Rev.* v. 25, p. 675-725.

BENAVENTE-GARCIA, O. et al. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry.* v.68, p. 457-462, 1999.

BIRT, D. F.; HENDRICH, S.; WANG, W. Dietary agents in cancer prevention: flavonóides and isoflavonoids. *Pharmacology. Therapeutics.* v. 90, p. 157-177, 2001.

BLOOR, S. J. Overview of methods for analysis an identification of flavonoids. *Methods in Enzimology, Oxford.* v. 335, p. 3-14, 2001.

BOK, S.H. et al. Plasma and hepatic cholesterol and 6 hepatic activities of 3-hidoxy-3methyl-glutaryl-CoA reductase and acyl CoA: cholesterol transferase are lower in rats fed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoids. *Am. Soc. Nutr. Sci.* v.129, p.1182-1185, 1999.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews, New York,* v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BROUILLARD, R. Chemical structure of anthocyanins. In: *Anthocyanins as Food Colors.* New York, Academic Press. p.1-39, 1982.

CANDIDO, L. M. B.; CAMPOS, A. M. Alimentos funcionais. Uma revisão. *Boletim da SBCTA.* v. 29, n. 2, p. 193- 203, 2005.

CASSIDY, A.; HANLEY, B.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Isoflavones, lignans and stilbenes: origins, metabolism and potential importance to human health. *J. Sci. Food Agric.,* v. 80, p. 1044-1062, 2000.

CHRAPKO, W.E. et al. Decreased platelet nitric oxide synthase activity and plasma nitric oxide metabolites in major depressive disorder. *Biol. Psychiatry.* vol 2, 129-134, 2004.

CHEN, G. et al. Determination of hesperidin and synephrine in *Pericarpium Citri Reticulatae* by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Bioanal. Chem.,* v. 373, p. 169–173, 2002.

CHO, J. Antioxidant and neuroprotective effects of hesperidin and its aglycone hesperedin. *Arc Pharm.* v. 29, p. 699-706, 2006.

CROUSE, J. R. et al. Randomized trial comparing the effects of casein with that of soy protein containing varying amounts of isoflavones on plasma concentration of lipids and lipoproteins. *Arch. Intern. Med.*, v. 159, p. 2070-2076, 1999.

DA SILVA, G.D. et al. Evidence for dual effects of nitric oxide in the forced swimming test and in the tail suspension test in mice. *Neuroreport.* v. 11, p.639-702, 2000.

DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. Passiflora: a review update. *J Ethnopharmacol.*, v. 94, n. 1, p. 1-23, 2004.

Di CARLO, G. et al. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci.* v. 4, p. 53-337, 1999.

DHIR, A.; KULKARNI, S.K. Involvement of L-arginine–nitric oxide–cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effect of venlafaxine in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* v. 5, p. 31-121, 2007.

DOUGHER, M. J.; HACKBERT, J. A. Uma explicação analítico-comportamental da depressão e o relato de um caso utilizando procedimentos baseados na aceitação. *Revista Brasileira de Terapia Comportamental e Cognitiva.* v. 5, p. 167-184, 2003.

ELHWUEGI, A.S. Central monoamines and their role in major depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* v. 28, p. 435-451, 2004.

ESCARPA, A.; GONZALEZ, M. C. An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, London. v. 31, n. 2, p. 57-139, 2001.

HAGIWARA, A. et al. Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-16-phenylimidazol (4,5-b) pyridine (PhIP)- associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2- dimethylhydrazine. *Cancer Letters.* v. 171, p. 17-25, 2011.

HARKIN, AJ. et al. Nitric oxide synthase inhibitors augment the effects of serotonin reuptake inhibitors in the forced swimming test. *Eur Neuropsychopharmacol.* v. 274, p. 14-81, 2004.

HEIBERG, I.L.; WEGENER, G.; ROSENBERG, R. Reduction of GMPc and nitric oxide has antidepressant-like effects in the forced swimming test in rats. *Behav Brain. Res.* v. 84, p. 134-479, 2002.

FALCÃO, L.D.; BARROS, D.M.; GAUCHE, C.; Copigmentação intra e intremolecular de antocianinas: uma revisão. *CEPPA.* v. 21, p. 351-366, 2003.

FERNÁNDEZ, S.P. et al. Synergistic interaction between hesperidin, a natural flavonoid, and diazepam. *Eur. J. Pharmacol.* v. 512, p. 98-189, 2005.

FILHO, C.B. et al. Kappa-opioid receptors mediate the antidepressant-like activity of hesperidin in the mouse forced swimming test. *Eur. J. Pharmacol.* v. 698, p. 286-291, 2013.

FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* vol. 27, p.373-406, 1980.

GALATI, E.M. et al. Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid, antihypertensive and diuretic activity in rat. *Il Farmaco.* v.51, p.219-21, 1996.

GARG, A. et al. Chemistry and pharmacology of citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytother Res.*, v.15, p.655-669, 2001.

GILLESPIE, C.F., NEMEROFF, C.B. Hypercortisolemia and depression. *Psychosom Med.* vol. 1, p. 26-28, 2005.

GÓES, A. Alimentos Funcionais. Disponível em <<http://oglobo.globo.com/especiais/vivermelhor/mat/189641004.asp>>. Acessado em abril de 2013.

GAMARANO, L.; FRAIGE, FILHO, F. Alimentos Funcionais no tratamento do Diabetes Mellitus. *Qualidade em Alimentação: Nutrição.* São Paulo: n. 19, p. 20-21, jun./set. 2004.

HAVSTEEN, B. Flavonoids, class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol.*, v. 32, p. 1141- 1148, 1983.

HOLTZHEIMER, P.E.; NEMEROFF, C.B. Advances in the treatment of depression. *NeuroRx.* v. 3, p. 42-56, 2006.

HWANG, S.L.; SHIH, P.H.; YEN, G.C. Neuroprotective effects of citrus flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* vol. 60, p. 877-887, 2012.

JESSE, C.R. et al. Involvement of L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effect of tramadol in the rat forced swimming test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* v. 12, p. 1043-1838, 2008.

JESSE, C.R. et al. Involvement of L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine Monophosphate pathway in the antidepressant-like effect of bis selenide in the mouse tail suspension test. *Eur. J. Pharmacol.* v. 635, p. 41-1335, 2010.

JOHNSTON, G. A. R.; BEART, P. M. Flavonoids: some of the wisdom of sage? *Brit J Nutr.* v. 142, n. 5, p. 809-810, 2004.

KASTER, M.P. et al. Involvement of nitric oxide–GMPc pathway in the antidepressant-like effects of adenosine in the forced swimming test. *Int J Neuropsychopharmacol.* v. 601, p. 0-8, 2005.

KATON, W. et al. Impact of antidepressant drug adherence on comorbid medication use and resource utilization. *Arch. Intern. Med.* vol. 21 p. 2497-2503, 2005.

KUMAR, G.P.; KHANUM, F. Neuroprotective potential of phytochemicals. *Pharmacogn.* v. 6, p. 81-90, 2012.

KAUR, G.; TIRKEY, N.; CHOPRA, K. Beneficial effect of hesperidin on lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity. *Toxicology.* v.226, p.152- 160, 2006.

KUROWSKA, E.M. et al. HDL-cholesterol<sup>63</sup> raising effect of orange juice in subjects with hypercholesterolemia. *Am. J. Clin. Nutr.* v.72, p.1095-1100, 2000.

LAKHAN, S. E.; VIEIRA, K. F. Nutritional therapies for mental disorders. *Nutr J.* v. 7, n. 2, 2008.

LOPES, R. M., et al. Flavonóides. *Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento.* p. 18-22, 2003.

MARCHAND, L. L. Cancer preventive effects of flavonóides – a review. *Biomed Pharmacother.* v. 56, p. 296-301, 2002.

MARKAKIS, P. Stability of Anthocyanins in foods. Anthocyanins in color foods. New York, Academic Press. p. 163-180, 1982.

MAZZA, G.; MINIATI, L. Anthocyanins in fruits, vegetables and grains. Boca Raton, CRC Press. p. 362, 1992.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol. vol.43, p.109-142, 1991.

MUSSELMAN, D.L. et al. Platelet reactivity in depressed patients treated with paroxetine: preliminary findings. Arch. Gen. Psychiatry. vol.9, p. 875-82, 2000.

NEMEROFF, C.B. The burden of severe depression: a review of diagnostic challenges and treatment alternatives. J. Psychiatr. Res. v. 41, p. 189-206, 2006.

NIELSEN, I.L.F. et al. Bioavailability is improved by enzymatic modification of citrus flavonoid hesperidin in humans: a randomized, double-blind, crossover trial. The Journal of Nutrition. p.404-408, 2006.

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. Nutrition Research, New York, v. 18, n. 12, p. 1995-2018, 1998.

PORSOLT, R.D.; JALFRE, M. Behavioural despair in mice: a primary screening test for antidepressants. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. vol. 22, 1977.

PUPIN, A.M.; DENNIS, M.J.; TOLEDO, M.C.F. Flavanone glycosides in Brazilian orange juice. Food Chem. v. 61, p. 275-280, 1998.

RESSLER, K.J.; NEMEROFF, C.B. Role of serotonergic and noradrenergic systems in the pathophysiology of depression and anxiety disorders. Depress Anxiety. vol. 12 p.2-19, 2000.

RIBEIRO, I.; RIBEIRO, M. H. L. Naringin and naringenin determination and control in grapefruit juice by a validated HPLC method. Food Control . v.19, n.4, p.432 - 438, 2008.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids. Free Radical Biology and Medicine. v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

SGARBIERI, V.C.; PACHECO, M.T. Alimentos Funcionais Fisiológicos. Brazilian Journal of food technology. v. 2 p. 7-19, 1999.

SHELTON, R.C. The molecular neurobiology of depression. Psychiatr Clin. North. Am. vol. 30, p. 1-11, 2007.

SOUZA, P. H. M.; SOUZA NETO, M. H.; MAIA, G. A. Componentes funcionais nos alimentos. Boletim da SBCTA. v. 37, n. 2, p. 127-135, 2003.

STERU, L. et al. The tail suspension test: new method for screening antidepressants in mice. Psychopharmacology. v. 85, p. 367-370, 1985.

WANG, H.; MURPHY, P. A. Isoflavone composition of American and Japanese soybean in Iowa: effects of variety, crop year, and location. J. Agric. Chem. v. 42, p. 1674-1677, 1994.

WASAN, A.D.; ANDERSON, N.K.; GIDDON, D.B. Differences in pain, psychological symptoms, and gender distribution among patients with left- vs right-sided chronic spinal pain. Pain Med. v. 11, p. 1373-1380, 2011.

WILMSEN, P.K.; SPADA, D.S.; SALVADOR, M. Antioxidant activity of the flavonoid hesperidin in chemical and biological systems. J. Agric. Food Chem. v.53, p.47-61, 2005.

WOLLGAST, J.; ANKLAM, E. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. Food Research International, Essex. v. 33, n. 6, p. 423-447, 2000.

WÖRZ, R. Pain in depression-depression in pain. Pain clinical updates. v. 11, p.1-4, 2003.

YAMADA, M. et al. Bioavailability of glucosyl hesperidin in rats. Biosci. Biotechnol. Biochem. v. 70, n. 6, p.1386-1394, 2006.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6 ed. rev. ampl. PortoAlegre: UFRGS, Florianópolis: UFSC, 2007. Cap. 23, p. 577-614.