



**CAMPUS URUGUAIANA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**EFEITOS DA POLPA DE POMELO (*Citrus maxima*) SOBRE ALTERAÇÕES  
CAUSADAS PELA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA E  
OBESIDADE: ESTUDO TRANSLACIONAL EM RATOS E HUMANOS**

**TESE DE DOUTORADO**

**Vinícius Tejada Nunes**

**Uruguaiana, RS, Brasil**

**2023**

**VINÍCIUS TEJADA NUNES**

**EFEITOS DA POLPA DE POMELO (*Citrus maxima*) SOBRE ALTERAÇÕES  
CAUSADAS PELA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA E  
OBESIDADE: ESTUDO TRANSLACIONAL EM RATOS E HUMANOS**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação  
*Stricto Sensu* em Bioquímica da Universidade  
Federal do Pampa, como requisito parcial para  
obtenção do Título de Doutor em Bioquímica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiane Casagrande  
Denardin

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jacqueline da Costa  
Escobar Piccoli

**Uruguiana, RS, Brasil**

**2023**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos  
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do  
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

N972e Nunes, Vinicius Tejada  
EFEITOS DA POLPA DE POMELO (Citrus maxima) SOBRE ALTERAÇÕES  
CAUSADAS PELA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA E  
OBESIDADE: ESTUDO TRANSLACIONAL EM RATOS E HUMANOS. / Vinicius  
Tejada Nunes.  
63 p.  
  
Tese(Doutorado)-- Universidade Federal do Pampa, DOUTORADO  
EM BIOQUÍMICA, 2023.  
"Orientação: Cristiane Casagrande Denardin".  
  
1. pomelo. 2. doença hepática gordurosa não alcólica. 3.  
parâmetros bioquímicos. 4. obesidade . 5. estresse oxidativo.  
I. Título.

VINÍCIUS TEJADA NUNES

**EFEITOS DA POLPA DE POMELO (*Citrus maxima*) SOBRE ALTERAÇÕES  
CAUSADAS PELA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA E  
OBESIDADE: ESTUDO TRANSLACIONAL EM RATOS E HUMANOS**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação  
*Stricto Sensu* em Bioquímica da Universidade  
Federal do Pampa, como requisito parcial para  
obtenção do Título de Doutor em Bioquímica.

Área de concentração: Bioprospecção molecular

Tese apresentada em 20 de outubro de 2023.

Banca examinadora:

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiane Casagrande Denardin - UNIPAMPA**  
Orientadora

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Morgana Duarte da Silva - UFSC**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Liane da Silva de Vargas - UNIPAMPA**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marina Prigol - UNIPAMPA**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por me ouvir, me dar força e me orientar pelo caminho correto!

À minha esposa, Vanusa, por estar sempre do lado me apoiando, me dando força e me incentivando a buscar concluir esse tão sonhado Doutorado! Sonho que se sonha sozinho, é apenas um sonho, mas sonho que se sonha junto é realidade! Te amo muito! Muito obrigado!

Aos meus filhos, Bernardo e Rafael, que me tornam uma pessoa melhor a cada nova fase de suas vidas. Amo vocês! Eu amo vocês incondicionalmente! Muitas vezes foi com vocês que eu me “desligava” das tensões que esse caminho do Doutorado impunha!

Ao Professor Dr. Itamar Gonçalves pela disponibilidade, ajuda, compreensão e ensinamentos na realização de tarefas fundamentais! Muito obrigado! Admiração se conquista e eu sou um admirador do teu trabalho e da pessoa que tu és! Muito obrigado!

À Profa. Dra. Cristiane Denardin e a Profa. Dra. Jacqueline Piccoli por acreditarem no meu trabalho.

Ao GESTOX, principalmente às colegas Genifer, Elizandra, Laura, Camila e Milena, por me ajudarem em várias etapas do Doutorado!

À Secretaria de Saúde, principalmente à biomédica Dra. Sílvia Sarmiento, por auxiliar nas coletas no Laboratório Municipal.

Às Professoras Morgana Duarte, Liane Vargas e Marina Prigol por aceitarem o convite de comporem a banca examinadora! Também agradeço a Profa. Dra. Marisa Paraboni e o Prof. Dr. Elton Denardin.

Ao PPG Bioquímica e seus professores, por me propiciarem os ensinamentos dos quais eu necessitava.

Aos participantes da pesquisa, por acreditarem na Ciência!

**“Uma vida sem desafios não vale a pena ser vivida.”**

**Sócrates**

## RESUMO

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica  
Fundação Universidade Federal do Pampa

### **EFEITOS DA POLPA DE POMELO (*Citrus maxima*) SOBRE ALTERAÇÕES CAUSADAS PELA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA E OBESIDADE: ESTUDO TRANSLACIONAL EM RATOS E HUMANOS**

Autor: Vinícius Tejada Nunes

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Casagrande Denardin

Data e Local da Defesa: Uruguaiiana, 20 de outubro de 2023

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é a causa mais comum de dano hepático no mundo ocidental e considerada um problema de saúde pública. Dentre os fatores de risco mais frequentes para o desenvolvimento e progressão desta patologia estão a obesidade visceral, dislipidemia, resistência à insulina e o diabetes mellitus tipo 2. A fisiopatologia da DHGNA não está completamente elucidada, entretanto, sabe-se que há o envolvimento do estresse oxidativo, uma vez que, causa inflamação de baixo grau. Como não existe tratamento farmacológico para controle desta doença, o uso de plantas medicinais que possuem compostos bioativos pode ser uma alternativa promissora. Os frutos do pomelo (*Citrus maxima*) têm apresentado atividades benéficas para o organismo, sendo essas atividades atribuídas à presença de compostos fitoquímicos. Assim, este estudo teve como objetivo investigar o efeito do extrato da polpa do fruto do pomelo (*Citrus maxima*) sobre alterações bioquímicas, inflamatórias, antioxidantes e histológicas em ratos com DHGNA. Foram utilizados 40 ratos Wistar machos distribuídos em quatro grupos: (1) grupo controle; (2) frutose associada à dieta rica em gordura - FHD; (3): dieta normal + extrato de pomelo (50 mg/kg) e (4): FHD + extrato de pomelo. Uma melhora significativa no perfil lipídico, função hepática e renal, inflamatória, marcadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes foram identificadas no grupo 4 em relação ao grupo 2. Além disso, uma diminuição dos triglicerídeos e colesterol hepático e nas gotículas de gordura no tecido hepático foram observados no grupo 4 se comparado ao grupo 2. Esses resultados destacam que o extrato de da polpa do pomelo pode ser útil para evitar a progressão de DHGNA.

Palavras-chave: pomelo, doença hepática gordurosa não alcoólica, parâmetros bioquímicos, obesidade, estresse oxidativo.

## ABSTRACT

Doctoral thesis

Program of Post-Graduation in Biochemistry

Federal University of Pampa

### EFFECTS OF POMELO PULP (*Citrus maxima*) ON CHANGES CAUSED BY NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE AND OBESITY: TRANSLATIONAL STUDY IN RATS AND HUMANS

Author: Vinícius Tejada Nunes

Advisor: Cristiane Casagrande Denardin

Date and Place of Defense: Uruguaiana, October, 20, 2023.

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common cause of liver damage in the western world and is considered a public health problem. Among the most frequent risk factors for the development and progression of this pathology are visceral obesity, dyslipidemia, insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. Oxidative stress, as it, causes low-grade inflammation. As there is no pharmacological treatment to control this disease, the use of medicinal plants that have bioactive compounds can be a promising alternative. The pomelo fruits (*Citrus maxima*) have shown beneficial activities for the body, these activities being attributed to the presence of phytochemical compounds. Thus, this study aimed to investigate the effect of pomelo fruit pulp extract (*Citrus maxima*) on biochemical, inflammatory, antioxidant and histological changes in rats with NAFLD. Forty male Wistar rats divided into four groups were used: (1) control group; (2) fructose associated with high-fat diet - DHF; (3): normal diet + grapefruit extract (50 mg/kg) and (4): FHD + grapefruit extract. A significant improvement in lipid profile, liver and kidney function, inflammation, oxidative stress markers and antioxidant defenses was identified in group 4 compared to group 2. In addition, a decrease in hepatic triglycerides and cholesterol and in fat droplets in hepatic tissue were observed in group 4 compared to group 2. These results highlight that pomelo pulp extract may be useful to prevent the progression of NAFLD.

**Keywords:** pummelo, non-alcoholic fatty liver disease, biochemical parameters. Inflammatory markers, oxidative stress.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fruto maduro de *Citrus maxima* (pomelo).

### ARTIGO

Figure 1 - Representative HPLC profile of the pummelo fruit extract.

Figure 2 - Fig. 2. Mass increase in rats of the four experimental groups during the investigation.

Figure 3 - Effect of pummelo pulp extract on biochemical (A–J) and inflammatory parameters (K–P) in plasma samples obtained from the four experimental groups.

Figure 4 - Levels of MDA (A), carbonyl in plasma (B) and micronuclei (C) in leukocytes of whole blood samples obtained from the four experimental groups.

Figure 5 - Levels of SOD activity (A), CAT activity (B), GPx activity in whole blood (C), GSH levels (D), ascorbic acid content (E) and polyphenols content (F) in plasma samples obtained from the four experimental groups.

Figure 6 - Effect of pummelo extract on hepatic cholesterol (A) and hepatic triglycerides (B) levels in samples hepatic tissue obtained from the four experimental groups.

## **LISTA DE TABELAS**

### **ARTIGO**

Table 1 - Hematological measurements of the four experimental groups treated with 50 mg/kg of aqueous extract of pummelo.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AGL - Ácidos Graxos Livres

ALT - Alanina Aminotransferase

AST- Aspartato Aminotransferase

CAT - catalase

DHGNA- Doença Hepática Gordurosa não Alcoólica

DM2 - Diabetes mellitus tipo 2

DNA - Ácido desoxirribonucléico

EO - Estresse Oxidativo

ER - Espécies Reativas

ERO - Espécies Reativas de Oxigênio

ERN - Espécies Reativas de Nitrogênio

FAL - Fosfatase Alcalina

GPx - Glutathione peroxidase

GSH - Glutathione reduzida

GSSG - Glutathione oxidada

$\gamma$ -GT - Gamaglutamiltransferase

HDL- Lipoproteína de alta densidade

IL-6 - Interleucinas 6

IL-8 - Interleucina 8

IL-10 – Interleucina 10

LDL - Lipoproteína de baixa densidade

MN - Micronúcleo

RI - Resistência à Insulina

RL- Radical Livre

SM - Síndrome Metabólica

SOD - Superóxido dismutase

TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa

VLDL- Lipoproteína de muito baixa densidade

## SUMÁRIO

<b>PARTE I</b>	15
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	15
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b>	17
<b>2.1 Doença Hepática Gordurosa não Alcoólica (DHGNA) e fatores de risco</b>	17
2.1.1 Prevalência da DHGNA	18
2.1.2 Fisiopatologia da DHGNA	19
2.1.3 Manifestações Clínicas e Diagnóstico da DHGNA	21
2.1.4 Tratamento da DHGNA	21
2.2 Estresse Oxidativo	23
2.3 Defesas Antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas	23
2.4 <i>Citrus maxima</i> (pomelo)	26
2.4.1 Compostos bioativos	27
2.4.2 Atividades Biológicas já descritas	28
<b>3 OBJETIVOS</b>	31
3.1 Geral	31
3.1 Específicos	31
<b>PARTE II</b>	32
<b>4 ARTIGO PUBLICADO</b>	33
<b>PARTE III</b>	42
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	42
<b>7. PERSPECTIVAS</b>	43
<b>REFERÊNCIAS</b>	44
<b>8. ANEXOS</b>	58
8.1 Protocolo de aprovação do projeto pela CEUA-UNIPAMPA	58
8.2 Protocolo de aprovação do CEP-UNIPAMPA	59
8.3 Questionário aplicado aos participantes do estudo	63

## APRESENTAÇÃO

A presente tese foi dividida em três partes principais. Na **parte I** encontram-se a **INTRODUÇÃO**, o **REFERENCIAL TEÓRICO** e os **OBJETIVOS**. As seções **MATERIAL E MÉTODOS**, **RESULTADOS** e **DISCUSSÃO** e as respectivas **REFERÊNCIAS** estão apresentadas sob a forma de um artigo e um manuscrito, os quais compõem a **parte II** deste trabalho e representam a íntegra deste estudo. As seções **CONSIDERAÇÕES FINAIS**, **PERSPECTIVAS** e **REFERÊNCIAS** encontram-se na **parte III** desta tese, sendo que as referências referem-se somente às citações utilizadas na introdução e nos conceitos gerais e revisão da literatura da mesma.

## PARTE I

### 1. INTRODUÇÃO

Muitos estudos têm relacionado os malefícios que o consumo excessivo de dietas ricas em sódio, gordura e açúcar tem provocado na saúde da população mundial. Acompanhada pelo crescimento da prevalência da obesidade no mundo, as doenças associadas a ela também estão em crescimento (WHO, 2019), dentre elas, a Doença Hepática Gordurosa não Alcoólica (DHGNA), uma das causas mais comuns de doença hepática crônica nos países ocidentais. A DHGNA é um espectro de alterações hepáticas que inclui desde simples esteatose podendo evoluir para esteatohepatite não alcoólica, cirrose e carcinoma hepatocelular (CHALASANI et al., 2012; NOUREDDIN & RINELLA, 2015).

A esteatose hepática (EH), o primeiro estágio da DHGNA, origina-se de um descontrole entre a síntese, metabolização e remoção de lipídios, principalmente os triglicerídeos, resultando no acúmulo deles nos hepatócitos. Isoladamente, o acúmulo de lipídios nas células hepáticas é uma condição benigna, reversível e assintomática, no entanto, se os fatores responsáveis por essa desordem progredirem e as condições clínicas e genéticas do indivíduo forem favoráveis, poderá ocorrer evolução para estágios subsequentes como esteatohepatite e cirrose. A esteatohepatite, diferentemente da esteatose, apresenta alto risco de mortalidade relacionada à doença hepática, tais como as mortes por cirrose e carcinoma hepatocelular. A patogenia da doença não está completamente elucidada, mas há evidências que a obesidade associada à Síndrome Metabólica (SM) e o Estresse Oxidativo (EO) estão diretamente associados ao aparecimento e a progressão da doença (NOUREDDIN & RINELLA, 2015).

A presença de esteatose é observada, muitas vezes, em exames de rotina, como nas ultrassonografias. No entanto, para determinar a etiologia da doença hepática e o grau de progressão da mesma é necessário observar a presença de fatores preditivos (alcoolismo, SM, Resistência à Insulina (RI), obesidade, Diabetes mellitus 2 (DM2) e dislipidemias), as manifestações clínicas, os exames laboratoriais e realizar, quando necessário, biópsia hepática (COTRIM et al., 2016). A biópsia é padrão ouro para o diagnóstico definitivo das doenças hepáticas, possibilitando a diferenciação entre esteatose e esteatohepatite. No entanto, ela não é recomendada para todos os casos e apresenta desvantagens como riscos de complicações e custo elevado. Dessa forma, a suspeita clínica pode basear-se na presença de fatores

preditivos associados a exames de imagem sugestivos de infiltração gordurosa hepática e demais exames laboratoriais, como a determinação dos marcadores de lesão e função hepática (CHALASANI et al., 2012; QUIROGA et al., 2013).

Para o tratamento, recomenda-se o controle de fatores de risco, se necessário com fármacos específicos, e mudanças no estilo de vida. Dentre os medicamentos que promovem melhora na doença hepática estão os sensibilizadores de insulina, antilipêmicos, citoprotetores e antioxidantes. Deve-se salientar que nem todos os pacientes com DHGNA podem fazer uso dessas substâncias. Devido a isso, vários estudos têm sido realizados na busca por novas substâncias que possam ser utilizadas no tratamento dessa doença. Tendo em vista que esta patologia, assim como muitas outras, tem o estresse oxidativo envolvido na sua patogênese, a busca por substâncias antioxidantes presentes em plantas e frutos é um caminho promissor para o tratamento da DHGNA (SAKAGUCHI et al., 2011; PARK et al., 2015).

Neste contexto, algumas plantas frutíferas do gênero *Citrus*, família Rutaceae, além de serem amplamente distribuídas e consumidas no mundo todo, têm sido pesquisadas devido às suas propriedades terapêuticas relatadas pelo uso popular. O potencial terapêutico tem sido relacionado à presença de substâncias ativas, muitas delas com propriedades antioxidantes, oriundas do metabolismo secundário, como os compostos fenólicos (DI MAJO et al., 2005). A *Citrus maxima* (Burm) Merr, originada do Sudeste Asiático é cultivada em regiões tropicais e subtropicais, é uma das espécies de *Citrus* que tem mostrado potencial terapêutico, além do nutricional. Os frutos, conhecidos popularmente como pomelo, são os maiores frutos dentro o gênero e são utilizados pela população para tratar tosse, febre, epilepsia, distúrbios gastrointestinais e cardíacos (VIJAYLAKSHMI & RADHA, 2015). Suas folhas e frutos, usados popularmente para tratar epilepsia, convulsões, hemorragias e úlceras, apresentam compostos fitoquímicos, alguns com propriedades antioxidantes, que conferem propriedade anticancerígena, anti-inflamatória, antimicrobiana e hepatoprotetora (SINGH et al., 2010).

Trabalhos com os frutos do pomelo em modelo de DHGNA são escassos na literatura consultada e em pacientes com obesidade são inexistentes. Assim, baseado no exposto acima, este trabalho pretende avaliar os efeitos da suplementação do extrato aquoso da polpa do pomelo (*Citrus maxima*) em ratos wistar com DHGNA e a atividade antioxidante *in vitro* do extrato em células do sangue periférico de pacientes obesos.



## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Doença Hepática Gordurosa não Alcoólica (DHGNA) e fatores de risco**

A DHGNA engloba um amplo espectro de alterações danosas ao fígado, variando de uma esteatose hepática simples (acúmulo de lipídeos nos hepatócitos) a esteatohepatite, cirrose e carcinoma hepatocelular (ANGULO, 2002). De etiologia variada, excluindo o consumo excessivo de álcool, a DHGNA aumenta o risco de morte relacionado a doenças cardiovasculares e hepáticas (CHALASANI et al., 2012, JOSHI-BARVE et al., 2015).

Dentre os fatores de risco mais frequentes para o desenvolvimento e progressão desta patologia estão a obesidade visceral, dislipidemia, resistência à insulina (RI) e o diabetes mellitus tipo 2. Por estar tão frequentemente ligada aos componentes da síndrome metabólica, a DHGNA tem sido considerada sua manifestação hepática (KIM et al., 2016). No Brasil, segundo levantamento realizado em 2019 pelo Ministério da Saúde, estima-se que 55,7% da população está acima do peso e que 20% já apresenta algum grau de obesidade. Ainda, o estudo revela que o excesso de peso está presente em 57,8% dos homens e em 54% das mulheres, sendo que, no sexo feminino a obesidade apresentou maiores taxas (20,7% contra 18,7% no sexo masculino). Outros fatores de risco associado a DHGNA são o uso de medicação esteatogênica, esteróides anabolizantes, toxinas ambientais, o hipotireoidismo, a síndrome da apneia do sono, a síndrome dos ovários policísticos e a cirurgia para o tratamento de obesidade mórbida (Bypass Jejun-Ileal) (ARMSTRONG et al., 2014).

A EH, o primeiro estágio da doença, caracteriza-se histologicamente pelo acúmulo de gordura no fígado, principalmente triglicerídeos, em quantidade que excede 5% do peso do órgão. A deposição desses lipídeos nos hepatócitos pode ser microvesicular, com pequenos e numerosos vacúolos mantendo-se o núcleo no centro da célula, ou macrovesicular, caracterizada pela presença de um único e volumoso vacúolo de gordura com deslocamento do núcleo para a periferia da célula. A esteatose microvesicular geralmente é uma condição aguda e não está restrita somente ao tecido hepático, podendo estar presente em outros órgãos, o que a torna mais importante clinicamente. A presença de esteatose macrovesicular geralmente é mais comum na DHGNA e, se acompanhada de demais alterações hepáticas, pode levar ao desenvolvimento de formas mais graves da doença como a esteatohepatite (TANDRA et al., 2011).

O termo esteatohepatite não alcoólica foi introduzido por Ludwig e colaboradores (1980) para definir alterações histológicas muito semelhantes às observadas na hepatite alcoólica, porém em pacientes que não consumiam álcool. A esteatohepatite é definida histologicamente pela presença de esteatose hepática, inflamação e lesão celular com ou sem fibrose e, diferentemente da esteatose, apresenta maior potencial evolutivo para quadros mais graves da doença como fibrose hepática, cirrose e carcinoma hepatocelular (FARREL et al., 2012).

### **2.1.1 Prevalência da DHGNA**

A DHGNA é considerada uma das causas mais comuns de doença hepática crônica, no mundo ocidental, sendo reconhecida como causa importante para o crescimento da morbidade e mortalidade relacionada à alteração metabólica (SANYAL, 2002). A verdadeira prevalência mundial de DHGNA é ainda desconhecida, embora alguns estudos apresentem valores entre 2,8% a 46%, sofrendo variações conforme as casuísticas e metodologia utilizada para o diagnóstico (CLARK, 2006; WILLIAMS et al., 2011). Em populações de risco, como obesos e diabéticos, variam de 57,5 a 74,5% e 21 a 78%, respectivamente, (VERNON et al., 2011).

No Brasil, um estudo multicêntrico realizado pela Sociedade Brasileira de Hepatologia (2019) com 1480 pacientes de diversas regiões do país mostrou que o sobrepeso (44,4%), a obesidade (49,7%), dislipidemia (60,8%), SM (43,3%) e diabetes mellitus (21,8%) foram os fatores de risco mais frequentes para o aparecimento de gordura no fígado. Observou-se que a maioria dos pacientes com DHGNA eram assintomáticos e que os homens eram os mais atingidos. No grupo de pacientes que sofreram biópsia hepática (437) verificou-se que 42% deles apresentavam esteatose e 58% esteatohepatite. Dos pacientes com esteatohepatite, 27% apresentavam fibrose, 15,4% cirrose e 0,7% carcinoma hepatocelular.

Embora a maioria dos estudos epidemiológicos apresentem limitações, observam-se fatos semelhantes: a esteatose hepática e esteatohepatite ocorrem em todas as etnias, faixas etárias e afetam indivíduos não obesos e obesos, sendo que a prevalência aumenta com o aumento da idade, do peso corporal, com a presença de fatores de risco e afetam mais algumas etnias do que outras (KALIA & GAGLIO, 2016).

### 2.1.2 Fisiopatologia da DHGNA

A patogenia da doença não está completamente elucidada e para tentar explicá-la vários modelos foram propostos sendo que o mais aceito atualmente é o modelo dos *múltiplos hits* (BUZZETTI, PINZANI, TSOCHATZIS, 2016). Inicialmente, o modelo proposto por Day e James (1998) chamado de *two hits* foi o mais aceito para explicar a patogenia. Nesse modelo, que sugere a resistência à insulina como condição inicial para o desenvolvimento da doença, o primeiro passo (*first hit*) é o desenvolvimento da esteatose, onde a síndrome metabólica exerce um importante papel devido a RI, que desenvolve-se em decorrência do bloqueio do receptor de insulina nas células, prejudicando a entrada de glicose para o interior delas. Devido a isso, gera-se um estado de hiperinsulinemia compensatória e, visando obtenção de energia para as células, ocorre aumento da lipólise periférica e lipogênese hepática resultando em maior liberação de Ácidos Graxos Livres (AGL) para o fígado. A redução da oxidação dos AGL e da secreção de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL-Very Low Density Lipoprotein) também contribuem para infiltração gordurosa no tecido hepático, assim como o consumo de dietas hipercalóricas ricas em gordura saturada e carboidratos (frutose), (KOPPE, 2014).

Na evolução para esteatohepatite, o segundo passo (*second hit*), a concentração aumentada de AGL nos hepatócitos associado à disfunção na cadeia respiratória, devido a alterações estruturais nas mitocôndrias, aumenta a produção das Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) (DAY & JAMES, 1998; LOMONACO et al., 2013). Essas ERO em excesso promovem elevação da peroxidação lipídica das membranas, alteração na produção de citocina pró-inflamatórias e anti-inflamatórias e o consumo de enzimas e vitaminas antioxidantes do fígado, contribuindo para o estabelecimento do quadro inflamatório e de estresse oxidativo (BUECHLER et al., 2011).

Após alguns anos, a hipótese levantada por Day e James (1998) foi revista e com base nisso foi desenvolvido o modelo dos múltiplos hits, onde a RI passa a ser o foco central no desenvolvimento da DHGNA (TILG & MOSCHEN, 2010; BUZZETTI, PINZANI, TSOCHATZIS, 2016). Nesse modelo, a RI torna as células hepáticas vulneráveis a outros fatores patogênicos, além daqueles citados pelo modelo *two hits*, tais como: a ação inflamatória de endotoxinas provenientes do desequilíbrio da microbiota intestinal, ativação de células estreladas hepáticas e disfunção mitocondrial (CARR et al., 2016).

Outros fatores relevantes na patogênese da doença e na sua progressão são as adipocinas (leptina, resistina e adiponectina) e as citocinas (Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), Interleucinas 6 (IL-6), Interleucina 8 (IL-8)) secretadas pelos adipócitos e/ou pelas células inflamatórias presentes no tecido adiposo. Além de participarem da cascata inflamatória, algumas dessas moléculas desempenham demais funções importantes na regulação da homeostase energética e na sensibilização dos tecidos a ação da insulina (STOJSAVLJEVIĆ et al., 2014). Embora muitos desses mediadores moleculares desempenhem um papel ativo no aparecimento e progressão da doença hepática, eles também podem auxiliar na regeneração do tecido hepático (SILVA, COLOMBO, SCHIAVON, 2014).

A adiponectina é um das adipocinas que tem demonstrado efeitos significativos na proteção hepática e sua deficiência tem sido relatada como um fator de risco importante para o desenvolvimento de esteatose, esteatohepatite e outras formas de insultos hepáticas (WANG et al., 2009; SILVA, COLOMBO, SCHIAVON, 2014). Esse hormônio proteico é sintetizado exclusivamente pelo tecido adiposo, sendo sua expressão maior no tecido adiposo subcutâneo do que no visceral. Dentre os papéis importantes desempenhados por ela estão a regulação glicídica e lipídica do organismo. Além disso, estudos têm demonstrado a ação anti-inflamatória, antiaterogênica e antifibrogênica da adiponectina. A ação anti-inflamatória atribuída a ela deve-se ao estímulo à secreção de Interleucina 10 (IL-10), que age bloqueando a ação de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- $\alpha$ . (LIHN et al., 2005, FINELLI & TARANTINO, 2013). Além disso, ela aumenta a oxidação de ácidos graxos no fígado e inibe a síntese de lipídios e de glicose hepática, podendo assim aumentar a sensibilidade à insulina e reduzir os níveis séricos de AGL. Já sua ação antifibrótica é atribuída à diminuição na ativação e proliferação das células estreladas hepáticas (TSOCHATZIS, PAPTAEODORIDIS, ARCHIMANDRITIS, 2006; PARK et al., 2015). Níveis reduzidos de adiponectina são observados em indivíduos obesos com ou sem RI associada, no DM2, na SM e na DHGNA (WANG et al, 2009; JUNG & CHOI, 2014).

Embora os fatores patogênicos já citados possam contribuir para o aparecimento e progressão da doença, os fatores genéticos (polimorfismos de genes) e ambientais são importantes e, muitas vezes, determinantes na DHGNA (MOHANTY et al., 2009).

### **2.1.3 Manifestações Clínicas e Diagnóstico da DHGNA**

A maioria dos pacientes é assintomática, embora alguns relatem fadiga, desconforto ou dor na região do hipocôndrio direito. Mais de 50% dos pacientes apresentam hepatomegalia e níveis séricos das enzimas hepáticas normais. Quando alteradas, as enzimas aminotransaminases (Alanina Aminotransferase (ALT) e Aspartato Aminotransferase (AST)) encontram-se geralmente com níveis séricos de um a quatro vezes o limite da normalidade. Do mesmo modo, podem-se observar níveis elevados de Fosfatase Alcalina (FAL) e de Gamaglutamiltransferase ( $\gamma$ -GT). Diferentemente das AST e ALT, níveis elevados de  $\gamma$ -GT têm sido associados a quadros mais graves da doença (MCCULLOUGH, 2006; COTRIM et al., 2016).

Embora não estejam entre os exames laboratoriais indicados, a avaliação dos marcadores inflamatórios pode ser útil para melhor avaliação do paciente. Estudo epidemiológico com diferentes grupos étnicos verificou que níveis reduzidos de adiponectina são um fator de risco independente para a DHGNA e demais disfunções do fígado (PAGANO et al., 2005, WANG et al., 2009, SAVVIDOU et al., 2016). Além disso, entre os pacientes com esteatohepatite, níveis menores desse hormônio estão relacionados a graus maiores de inflamação (WANG et al., 2009).

O diagnóstico frequentemente é presuntivo e baseia-se na presença de esteatose hepática em exames de imagem (ultrassonografia, ressonância magnética) ou na elevação de enzimas hepáticas em pacientes com sobrepeso, obesos e/ou que apresentem fatores metabólicos de risco para o desenvolvimento da patologia. A biópsia hepática é padrão ouro para o diagnóstico definitivo da doença e sua diferenciação entre esteatose e esteatohepatite, no entanto por ser uma técnica invasiva e com riscos de complicações, não é recomendada em todos os casos. Além disso, na maioria dos casos, a biópsia não modifica a estratégia terapêutica, logo o diagnóstico pode basear-se na avaliação clínica, laboratorial e de imagem do paciente (CHALASANI et al., 2012).

### **2.1.4 Tratamento da DHGNA**

Por ser uma doença multifatorial e geralmente associada à obesidade, dislipidemia, SM e DM, o seu tratamento engloba mudanças no estilo de vida associado ou não à terapia medicamentosa. Dentre as recomendações não medicamentosas para o controle dessa

patologia estão a prática de atividades físicas regulares e o consumo de uma dieta equilibrada e saudável com baixo teor de carboidratos, principalmente em pacientes com sobrepeso ou com diferentes graus de obesidade (COTRIM et al., 2016).

Como não existe nenhum tratamento medicamentoso aprovado para a DHGNA baseado em evidências científicas, o tratamento farmacológico disponível visa controlar os fatores de risco metabólicos associados à doença hepática e a progressão da mesma (MALHOTRA & BEATON, 2015; WGO, 2012). Entre fármacos utilizados na DHGNA estão os sensibilizadores de insulina (metformina, glitazonas), antilipêmicos (estatinas), citoprotetores (ácido ursodesoxicólico) e antioxidantes (vitamina E) (EASL, EASD, EASO, 2016). De acordo com o Consenso da Sociedade Brasileira de Hepatologia sobre DHGNA, o uso de metformina não é indicado como fármaco específico para o tratamento da doença, pois em estudos controlados não houve melhora histológica. Contudo, ela pode melhorar a resistência à insulina, os níveis de enzimas hepáticas e contribuir com o controle do peso dos pacientes. O cloridrato de pioglitazona é outro sensibilizador de insulina que pode ser utilizado nos casos de esteatohepatite comprovada por biópsia, assim como a vitamina E (800 UI/dia). Quanto à estatina, ela pode ser usada no tratamento da dislipidemia em pacientes com esteatose e esteatohepatite. A utilização de medicamentos hepatoprotetores (silimarina, metionina) e de prebióticos e probióticos ainda não são recomendados por não apresentarem dados científicos conclusivos. A cirurgia bariátrica, mesmo não sendo um tratamento específico para a DHGNA, pode ser indicada para pacientes obesos graves (COTRIM et al., 2016).

Como os principais alvos da terapia são a RI e o estresse oxidativo (WGO, 2012), substâncias capazes de modular esses alvos são fortes candidatos para novos fármacos. Um alvo estudado é o hormônio adiponectina que se encontra reduzido na DHGNA e tem papel importante na sensibilização da insulina. Estudos com adiponectina recombinante em modelos de ratos obesos mostraram a redução da glicemia e melhora na RI nesses animais (YAMAUCHI et al., 2001). Em outro estudo, usando ratos alimentados com dieta com alto teor de gordura associada ao consumo de etanol e ratos obesos com esteatohepatite, observaram-se, em ambos os grupos, melhora da hepatomegalia, esteatose e nos níveis de ALT (XU et al., 2003). Logo, substâncias que aumentem a expressão gênica desse hormônio, assim como o seu conteúdo circulante, podem ser úteis no tratamento da doença hepática. Da

mesma forma, compostos com comprovada atividade antioxidante também devem ser avaliados como uma opção terapêutica para essa patologia (FEDERICO et al., 2014).

## 2.2 Estresse oxidativo

As reações bioquímicas que ocorrem no metabolismo das células, principalmente as de oxirredução, geram radicais livres (RL) que desempenham funções biológicas importantes. O desequilíbrio entre a produção desses RL e as defesas antioxidantes leva ao dano oxidativo, que pode lesar biomoléculas como lípidos, proteínas e o ácido desoxirribonucleico (DNA) (VASCONCELOS et al., 2007). Isso ocorre devido à reatividade e a instabilidade química dos RL, que, na busca por equilíbrio, acabam interagindo com as estruturas celulares causando danos a elas, podendo resultar no desenvolvimento e/ou progressão de diversas doenças, como a DHGNA (SUMIDA et al., 2013).

Quimicamente, os RL são átomos ou moléculas com um ou mais elétrons desemparelhados na sua órbita mais externa, tornando-os instáveis e reativos. Existem diversos tipos de radicais livres, sendo os derivados do metabolismo de oxigênio (Espécies Reativa de Oxigênio - ERO) e do nitrogênio (Espécie Reativa de Nitrogênio - ERN) os mais envolvidos em processos patológicos. Esses RL/ER apresentam características próprias, como diferentes tempos de meia-vida e reatividade das biomoléculas. Como a maioria das reações do organismo necessita de oxigênio, a formação de ERO é maior, sendo a espécie radicalar hidroxila ( $\text{HO}\cdot$ ) a mais danosa para as células, pois pode reagir e modificar qualquer estrutura celular, afetando enzimas, membranas ou ácidos nucleicos. Por causa de sua meia-vida muito curta e pelo fato do organismo não dispor de um sistema enzimático de defesa contra o radical hidroxila, sua inativação *in vivo* é muito difícil (HALLIWELL, 1991; HALLIWELL, 2006).

As fontes de geração dessas moléculas podem ser endógenas e exógenas. Dentre as fontes endógenas destacam-se as mitocôndrias, peroxissomos, lipoxigenase, fosfato dinucleotídeo adenina nicotinamida (NADPH) - oxidase, xantina-oxidase, citocromo P450 e citocinas inflamatórias. Já as fontes exógenas são raios ultravioletas, radiação ionizante, quimioterápicos e xenobióticos (VASCONCELOS et al., 2007).

A geração das ER pode ocorrer de diferentes formas. Na formação das principais ERO, sucessivas reações ocorrem, a partir da redução incompleta da molécula de oxigênio, culminando com a formação de água. Nesse processo, moléculas intermediárias são formadas

como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), altamente reativo, e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), catalisado pela enzima superóxido dismutase (SOD). O radical hidroxila ( $\bullet OH$ ) pode ser formado a partir do peróxido de hidrogênio, na reação de Haber-Weiss, ou a partir do radical superóxido e na presença de metais de transição ( $Cu^+$  ou  $Fe^{2+}$ ), via reação de Fenton. Pelo fato do ferro ser o metal em maior quantidade no organismo, ele está mais apto a catalisar as reações de oxidação das biomoléculas (HALLIWELL, 1991; HALLIWELL, 2006).

O oxigênio singlete ( $^1O_2^*$ ) é outra ERO altamente reativa e é gerada a partir do oxigênio molecular por ganho de energia. Essa espécie reage com várias moléculas biológicas, incluindo lipídeos da membrana, iniciando processos de peroxidação lipídica e produzindo os radicais Peroxila ( $RO_2\bullet$ ) e Alcoxila ( $RO\bullet$ ). Aminoácidos e peptídeos também são alvos do oxigênio singlete (VASCONCELOS et al., 2007).

Dentre as ERN, o óxido nítrico ( $NO\bullet$ ) reage facilmente com o oxigênio, superóxido e com metais de transição. A síntese dessa molécula é realizada a partir da transformação do aminoácido semi-essencial L-arginina em L-citrulina e  $NO\bullet$ , por intermédio da enzima óxido nítrico sintetase (NOS) e de cofatores (oxigênio e NADPH), sendo produzida pelas células nervosas, epiteliais, endoteliais e inflamatórias. Dentre as funções biológicas desempenhadas por esse radical está a regulação da vasodilatação e do tônus muscular, atividade citotóxica e modulação de reações inflamatórias e anti-inflamatórias. A reação do óxido nítrico com superóxido gera o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), um composto altamente oxidante e com tempo de meia-vida curto, podendo lesar lipídeos, proteínas e o DNA. A decomposição do peroxinitrito pode produzir radicais hidroxila, mesmo sem a presença de metais de transição (VASCONCELOS et al., 2007; PISOSCHI & POP, 2015).

### **2.3 Defesas Antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas**

As células encontram-se protegidas contra os danos provocados pelo RL/ER através das defesas antioxidantes, que podem ser endógenas (compostos biológicos e enzimas) ou exógenas (ácido ascórbico, carotenoides, compostos fenólicos, dentre outros), além dos mecanismos de reparo celular. Os antioxidantes possuem diferentes mecanismos de ação, sendo os mais comuns: inibição da geração de RL/ER, habilidade redutora, capacidade de quelar metais, atividade de enzima antioxidante, capacidade de inibir enzimas oxidantes e aumento da geração de antioxidantes endógenos (RAHMAN, 2007; ASLANI & GHOBADI, 2016).



O primeiro sistema a agir é o enzimático que inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx). A SOD é uma das principais enzimas intracelulares, pois catalisa a dismutação do radical superóxido ( $O_2^-$ ), o mais deletério e abundante, a peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular. Essa metaloenzima possui três isoformas presentes no organismo (superóxido extracelular dismutase (EC-SOD), superóxido cobre-zinco-dismutase (CuZn-SOD) e superóxido manganês dismutase (Mn-SOD), variando quanto à localização nas células, o tipo e número de subunidades de aminoácidos, a natureza do metal ligado a ela e dos cofatores (ASLANI & GHOBADI, 2016).

A enzima CAT é formada por quatro subunidades de proteína, cada uma contendo um grupo heme ( $Fe^{+2}$  Protoporfirina) e uma molécula de NADPH e está presente em todos os tecidos, sendo sua atividade maior no tecido hepático e nos eritrócitos. Nas células, essa enzima está localizada principalmente nos peroxissomas e nas mitocôndrias e reage com peróxido de hidrogênio, na presença de ferro, convertendo-o em oxigênio e água (VASCONCELOS et al., 2007).

A GPx também age reduzindo peróxido de hidrogênio e outros peróxidos a água ou a álcoois correspondentes, por meio da oxidação da glutaciona reduzida (GSH) à dissulfeto de glutaciona (GSSG), sendo que a atividade dessa enzima depende da disponibilidade constante de GSH. Para tal, a enzima glutaciona redutase (GR) promove a redução da GSSG em GSH. Essa enzima, assim como a glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD), que regenera o NADPH, não age diretamente na defesa aos RL/ER, mas atuam como apoio para os outros antioxidantes endógenos (VALKO et al., 2016).

A GPx encontra-se distribuída em todos os tecidos, sendo que nas células ela encontra-se no citosol e nas mitocôndrias. Tanto a GPx quanto a CAT atuam evitando o acúmulo de superóxido e de peróxido de hidrogênio e, conseqüentemente, evitando a produção do radical hidroxila (YOUNG & WOODSIDE, 2001).

O tripéptido glutaciona (GSH) é uma antioxidante não enzimático hidrofílico localizado no interior das células (citosol, núcleo e mitocôndrias). Sua forma oxidada (GSSG) acumula-se no interior das células e a razão GSH/GSSG no organismo é uma boa medida do estresse oxidativo. A síntese de GSH ocorre a partir dos glutamato, cisteína e glicina, sendo catalisada pelas enzimas gama-glutamilcisteína sintetase e GSH sintetase. O fígado é o principal local de síntese de GSH e dentre as funções dessa enzima, além de auxiliar na defesa

antioxidante, está a regeneração das vitaminas E e C a suas formas ativas e regulação de eventos celulares (síntese de DNA e proteínas, proliferação celular e produção de citocinas) (WU et al., 2004; RAHMAN, 2007).

Os antioxidantes não enzimáticos incluem compostos endógenos (GSH, melatonina, coenzima Q10, ácido úrico, bilirrubina e proteínas quelantes de metais) e outros exógenos, ingeridos através da alimentação, como ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -caroteno (precursor de vitamina A), minerais (zinco e selênio), flavonóides e demais compostos derivados de fontes vegetais (plantas e frutos) (RAHMAN, 2007; ASLANI & GHOBADI, 2016).

#### **2.4 *Citrus maxima***

As plantas frutíferas do gênero *Citrus* são amplamente cultivadas no mundo todo, principalmente em áreas tropicais e subtropicais. Pertencentes à família Rutaceae, elas são originárias do sudoeste Asiático e foram introduzidas no Brasil pelos colonizadores (MAZZIN & PIO, 2010). Dentre esse amplo gênero de plantas destacam-se as espécies *Citrus sinensis* (laranja), *Citrus limon* (limão), *Citrus bergamia* (bergamota) e *Citrus maxima* (Burm) Merr. (Pomelo e Toranja), que além do potencial nutricional que os seus frutos oferecem, apresentam compostos fitoquímicos capazes de prevenir e tratar certas doenças. Esses compostos não ficam restritos somente ao fruto, podendo ser encontrado em outras partes da planta como folhas e flores (ZOU et al., 2016).

A *Citrus maxima* (Burm) Merr (sinônimo *Citrus grandis* (L) Osbeck e *C. decumana* L), conhecida popularmente como pomelo (*pummelo*), toranja (*shaddock*) ou cimboa, produz o maior fruto dentre os cítricos. Planta nativa de países do Sudeste Asiático como Índia, China e Bangladesh, sua árvore é de porte médio (5-10 metros), arredondada e perene. As folhas são grandes, de forma ovada-oblonga ou elíptica, com ápice acuminado e com odor característico. As flores são brancas e perfumadas. Os frutos maduros são grandes (mais 20 cm de comprimento e largura, peso de 1-3 kg), globosos ou piriforme e apresentam casca espessa de coloração amarelada rica em pectina (Figura 1). A polpa do fruto varia do amarelado ao rosa e possui bolsas de sucos em forma de fuso. (MEHTA et al., 2011; VIJAYLAKSHMI & RADHA, 2015).



**Figura 1** - Fruto maduro de *Citrus maxima*.

Fonte: autor

#### **2.4.1. Compostos Bioativos**

O gênero *Citrus* é conhecido por seus valores nutricionais e de promoção da saúde. Isso se deve a presença de compostos fitoquímicos, muitos com funções biológicas, presentes nas folhas, frutos e em outras partes da planta. Dentre os compostos presentes, destacam-se as vitaminas (A, C e E), minerais, flavonóides (flavonas, flavonóis e flavanonas), limonóides, cumarinas, carotenóides, pectinas e fibras dietéticas. Muitas dessas substâncias, isoladas ou

associadas, apresentam atividades biológicas, incluindo anti-inflamatória, antidiabética antioxidante, antimicrobiana, antimutagênica, anticarcinogênica, antiviral e antihepatotóxica (KAMAL et al., 2011; JAVED et al., 2014; ZOU et al., 2016).

A espécie *Citrus maxima*, embora pouco cultivada e consumida no Brasil, apresenta, tanto em suas folhas como em seus frutos, compostos fitoquímicos semelhantes aos observados em outras espécies do gênero *Citrus* (ZOU et al., 2016). Na triagem fitoquímica preliminar do extrato metanólico das folhas, os constituintes presentes foram alcalóides, saponinas e carboidratos (MEHTA et al., 2011). Da mesma forma, no extrato etanólico foram identificados alcalóides, carboidratos, flavonóides, glicosídeos, saponinas e taninos (DINESH & HEGDE, 2016). Além disso, no óleo essencial da folha, foi descrita a presença dos compostos DL-limoneno, E-citral, 1-hexeno-4-metilo e Z-citral (SINGH et al., 2010; VIJAYLAKSHMI & RADHA, 2015).

#### **2.4.2 Atividades Biológicas já descritas**

Em 2011, Kundusen e colaboradores avaliaram, em ratos diabéticos, induzidos por estreptozotocina, as propriedades hipoglicemiante e antioxidante da folha e constataram que o extrato metanólico normalizou significativamente, de uma maneira dose dependente, os níveis de glicose. Também, foi dose dependente, o aumento nos níveis de glutathiona (GSH) e a redução da peroxidação lipídica no fígado, rins e pâncreas desses animais. No mesmo ano, Kundusen et al. (2011) também utilizaram extrato metanólico da folha para tratar camundongos albino suíços, previamente inoculados com células de carcinoma de ascite Ehrlich's, e comprovaram a atividade antitumoral do extrato, por meio da diminuição dos parâmetros tumorais (volume do tumor e contagem de células tumorais viáveis), melhora nos parâmetros hematológicos, aumento do peso corporal e do tempo de vida dos animais tratados em relação ao animais controle.

O extrato aquoso, etanólico e acetônico das folhas, da casca do caule e da casca dos frutos foram utilizados para avaliação da atividade analgésica e anti-inflamatória em ratos Wistar e camundongos albinos. Nesse estudo, para a avaliação da atividade analgésica utilizou-se ácido acético e placa quente em camundongos e o teste de retirada da cauda para os ratos. A avaliação da atividade anti-inflamatória (aguda e crônica) foi realizada por edema de pata dos ratos induzido por formalina. Em todos os testes, os extratos mostraram efeitos analgésicos e antiinflamatórios (SHIVANANDA, MURALIDHARA, JAYAVEERA, 2013).

Também em 2013, Abirami e colaboradores avaliaram a atividade antibacteriana *in vitro* dos extratos metanólicos das folhas, cascas e da polpa do fruto (polpa vermelha e branca) nas estirpes bacterianas *Staphylococcus aureus* (MTCC 3160), *Klebsiella pneumoniae* (MTCC 3384), *Pseudomonas aeruginosa*, (MTCC 424), *Salmonella typhi* (MTCC 3215) e *Escherichia coli* (MTCC 40). Para tanto, utilizou-se a gentamicina, ciprofloxacina, amicacina, tetraciclina e estreptomicina (10mg/disco) como controles positivos e, como controle negativo, disco de papel tratado com dimetilsulfóxido. A concentração inibitória mínima (CIM) variou entre 12,5mg/mL e 200mg/mL, dependendo do microrganismo e do extrato. Os extratos de *Citrus maxima* mostraram maior CIM contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* seguido de *Salmonella typhi*, e a menor CIM foi contra *Escherichia coli* seguido por *Klebsiella pneumoniae*, confirmando a atividade antimicrobiana dos extratos. Das e colaboradores, também em 2013, avaliaram e comprovaram a atividade antibacteriana do extrato etanólico da folha em isolados patológicos de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. O método de preparo do extrato foi realizado por percolação e a avaliação antibacteriana por teste de disco difusão e de macrodiluição de caldo.

A fim de avaliar os efeitos do extrato etanólico da folha no sistema nervoso central, Sheik e colaboradores (2014) trataram com o extrato modelos animais (ratos Wistar e camundongos albinos suíços) de distúrbios psiquiátricos e neurológicos. Além disso, também realizaram ensaios de toxicidade aguda. Nesse estudo, o extrato mostrou ação antidepressiva, ansiolítica, anticonvulsivante, hipnótica e relaxante muscular, além de não ser tóxico até a concentração 2000 mg/Kg.

Abirami e colaboradores (2015) analisaram a propriedade hepatoprotetora do extrato metanólico das folhas em ratos Wistar com dano hepático por toxicidade por paracetamol. O extrato (200 mg/kg) foi administrado nos animais durante o período de sete dias, sendo a toxicidade induzida no quinto dia. A atividade hepatoprotetora do extrato foi comprovada através da reversão da arquitetura hepática e da restauração, para níveis normais, dos marcadores de função hepática (AST, ALT, FAL) e dos antioxidantes hepáticos (SOD, CAT, GSH e GPx).

Em 2016, Dinesh e Hegde avaliaram os efeitos antiobesidade do extrato etanólico das folhas, nas doses de 200mg/kg e 400mg/kg, por 28 dias, em ratos Wistar obesos induzidos por dieta de cafeteria e pelo medicamento olanzapina. Nesse estudo, além do extrato, em ambas as doses, diminuir o peso dos animais, aumentou os níveis de HDL-c e reduziu os níveis de

glicose, colesterol total, triglicédeos, LDL-c, VLDL-c, AST e ALT quando comparado aos grupos controle obesos.

Trabalho de Feksa e colaboradores (2018) suplementou ratos wistar machos com extrato aquoso das folhas do pomelo após a indução da esteatose hepática e verificaram que o extrato apresentou atividades antioxidante, antiinflamatória e hepatoprotetora.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da suplementação da polpa liofilizada dos frutos do pomelo (*Citrus maxima*) em ratos wistar com DHGNA e a atividade antioxidante *in vitro* do extrato em células do sangue periférico de pacientes obesos.

#### 3.2 Objetivos específicos

Análise Fitoquímica e Antioxidante *in vitro*

- Determinar o perfil fitoquímico e obter o perfil antioxidante do extrato aquoso da polpa dos frutos do pomelo e
- Obter a atividade antioxidante *in vitro* do extrato em células do sangue periférico de pacientes obesos.

Experimentação Animal

- Avaliar a indução da esteatose hepática através da administração de dieta hiperlipídica e de frutose na água de beber nos ratos wistar machos;
- Verificar os efeitos da suplementação com extrato aquoso da polpa dos frutos do pomelo nos ratos com esteatose hepática;
- Verificar se os parâmetros hematológicos nos grupos experimentais são modificados com a suplementação do extrato da polpa do pomelo;
- Avaliar se parâmetros bioquímicos e de estresse oxidativo nos animais podem ser alterados com a indução da esteatose hepática e posterior tratamento com o pomelo.
- Obter o perfil inflamatório dos animais e verificar o efeito da suplementação do extrato aquoso da polpa do pomelo e
- Avaliar a histologia do fígado dos animais e o efeito do extrato aquoso da polpa do pomelo sobre o parênquima hepático.

Avaliação em sere humanos

- Obter o perfil sócio-demográfico e de estilo de vida dos pacientes obesos e
- Determinar a oxidação de biomoléculas e níveis de vitamina C antes e após a incubação com extrato aquoso da polpa do pomelo em sangue de pacientes obesos e comparar com controles.

## PARTE II

**Artigo publicado na revista Food and Chemical Toxicology (A1 - CBII)**

NUNES, VT, GONÇALVES, IL, OLVEIRA, PM. et al. Aqueous extract of pummelo pulp (*Citrus maxima*) improves the biochemical profile and reduces the inflammation process in Wistar rats with non-alcoholic fatty liver disease. **Food and Chemical Toxicology**, v. 178, p.1-9, 2023.





Contents lists available at ScienceDirect

Food and Chemical Toxicology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodchemtox](http://www.elsevier.com/locate/foodchemtox)

## Aqueous extract of pummelo pulp (*Citrus maxima*) improves the biochemical profile and reduces the inflammation process in Wistar rats with non-alcoholic fatty liver disease

Vinicius Tejada Nunes<sup>a,\*</sup>, Itamar Luís Gonçalves<sup>b</sup>, Patricia Martinez Oliveira<sup>a</sup>, Denise Lima Feksa<sup>a</sup>, Sílvia Muller de Moura Sarmiento<sup>c</sup>, Genifer Ermindia Schreiner<sup>a</sup>, Clóvis Klock<sup>d</sup>, Charline Casanova Petry<sup>d</sup>, Jacqueline da Costa Escobar Piccoli<sup>a</sup>, Vanusa Manfredini<sup>a</sup>, Cristiane Casagrande Denardin<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>b</sup> Faculdade de Medicina, Universidade Regional Integrada Alto Uruguai e Missões, Sete de Setembro Avenue, 1621, Erechim, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>c</sup> Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>d</sup> Grupo Infância e Medicina Diagnóstica, Erechim, Rio Grande do Sul, Brazil

### ARTICLE INFO

Handling Editor: Dr. Bryan Delaney

#### Keywords:

Pummelo

Non-alcoholic fatty liver disease

Oxidative stress

Inflammatory markers

Biochemical parameters

### ABSTRACT

This study investigated the effect of pummelo extract (*Citrus maxima*) on biochemical, inflammatory, antioxidant and histological changes in NAFLD rats. Forty male Wistar rats divided into four groups were used: (1) control group; (2) fructose associated with high-fat diet - DHF; (3) normal diet + pummelo extract (50 mg/kg); and (4) FHD + pummelo extract. This was administered at dose of 50 mg/kg of the animal's weight, by gavage, for 45 days. Significant improvement in lipid profile, liver and kidney function, inflammation, oxidative stress markers was identified in group 4 compared to group 2. Regarding TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , group 2 showed higher values (respectively 142.5  $\pm$  0.7 and 560.5  $\pm$  2.7 pg/mg protein) compared to group 4 (respectively 91.4  $\pm$  0.9 and 402.14  $\pm$  0.9 pg/mg protein),  $p < 0.05$ . Significant increases were found in SOD and CAT activities, respectively 0.10  $\pm$  0.06 and 8.62  $\pm$  1.67 U/mg protein for group 2 and respectively 0.28  $\pm$  0.08 and 21.52  $\pm$  2.28 U/mg of protein for group 4. Decreases in triglycerides, hepatic cholesterol and fat droplets in hepatic tissue were observed in group 4 compared to group 2. Results highlight that pummelo extract may be useful for prevent the development of NAFLD.

### 1. Introduction

A diversity of research has made the relationship between the harmful effects that the consumption of diets rich in sodium, fat and sugar have provoked in the world health population. Alongside a growth in obesity, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is highlighted as the most common cause of hepatic disease in western countries, and is considered a public health problem. Among the main risk factors for the development of this disease (excluding hereditary disease or alcoholism) are obesity, type 2 diabetes mellitus, resistance to insulin and dyslipidaemia. NAFLD comprises a broad spectrum of the hepatic disease, which varies from its mildest form as a simple hepatic steatosis (HS), becoming non-alcoholic steatohepatitis (NASH) until finally the terminal hepatic disease, with cirrhosis and its accompanying complications,

including hepatocellular carcinoma. In the last few decades, an alarming increase has been observed in cases of obesity and metabolic syndrome, with type 2 diabetes mellitus being highlighted, which have contributed substantially to a world prevalence of 25% of NAFLD (Luci et al., 2020).

The HS, the first stage of the disease, originates from a loss of control between the synthesis, metabolization and removal of lipids from hepatic tissue, resulting in an accumulation of these in hepatocytes. On the other hand, NASH comprises a more advanced stage of HS, comprising an inflammatory process in the liver due to the imbalance between the metabolism and fat deposits, with component necro-inflammatory process, with or without fibrosis, with the possibility of developing later cirrhosis and hepatocellular carcinoma (Rios et al., 2021). The pathophysiology of NAFLD is not entirely clear, but there is a suggestion that there is an involvement of multiple factors for the appearance and

\* Corresponding author. Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana, BR 472, Km 592, Uruguaiana, Rio Grande do Sul, CEP: 97500-970, Brazil. E-mail address: [viniciusnunes@unipampa.edu.br](mailto:viniciusnunes@unipampa.edu.br) (V. Tejada Nunes).

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.113933>

Received 23 February 2023; Received in revised form 27 June 2023; Accepted 4 July 2023

Available online 5 July 2023

0278-6915/© 2023 Elsevier Ltd. All rights reserved.

progression of this pathology: resistance to insulin, oxidative stress, hormones of adipose tissue, nutritional factors, genetic factors and alterations in the intestinal microbiota (Buzzetti et al., 2016).

Recently, a group of specialists from twenty-two countries met to propose a new nomenclature for non-alcoholic fatty liver disease: metabolic-dysfunction-associated fatty liver disease (MAFLD). The reason for this new definition came from the necessity of establishing positive diagnostic criteria, thereby avoiding that such a prevalent disease should have its diagnosis based on exclusion criteria. This was also an attempt to avoid the stigma attached to the term "non-alcoholic", thereby allowing for diagnosis in line with other hepatic pathologies and bringing the nomenclature closer to the physiology of the disease, besides proposing alternative therapy (Eslam et al., 2020; Fouad et al., 2020; Shiba and Mousa, 2021).

Recent studies have therefore demonstrated that certain alimentations, besides their basic nutritional functions, present physiological benefits which have the capacity of preventing and treating certain diseases. Among these types of functional food, the fruit of the *Citrus maxima* (Burns) Merr (*Citrus* genus of the *Rutaceae* family), popularly known as pummelo, have proven beneficial activities for the organism, with these activities being attributed to the presence of fibres, vitamins, minerals and bioactive compounds (flavonoids, phenolic acids, coumarins, acridone alkaloids and others) with proven therapeutic activities (Dadwai et al., 2022; Deng et al., 2022; Sapkota et al., 2022; Zareiyan and Khajehsharif, 2022). Several studies have already demonstrated its potential antioxidant, anti-inflammatory, antidiabetic, antioxidant, antimicrobial, antimutagenic, anticarcinogenic and antihepatotoxic (Barreca et al., 2017; Peksa et al., 2018; Javed et al., 2014; Somanathan Karthiga et al., 2023; Zou et al., 2016).

A study by (Ding et al., 2013) demonstrated that pummelo (*Citrus grandis* 'liangpinyou', 'beibeiyou', 'duanshiyou' and 'wubuyou') peel extract had several beneficial effects in mice fed a high-fat diet, resulting in prevention of the development of obesity, attenuation of dyslipidemia and hyperglycemia, improvement of glucose tolerance and insulin resistance. In another study (Wen et al., 2022), a drink based on tea and *Citrus maxima* was tested in mice with NAFLD and the results showed that it reduced dyslipidemia and liver damage caused by lipid accumulation in the liver, as it promoted fat oxidation and inhibited their synthesis. Furthermore, it regulated the expression of inflammatory factors to reduce the inflammation caused by NAFLD.

In previous study by our group, pummelo leaf aqueous extract showed hepatoprotective, hypolipidemic, anti-inflammatory and antioxidant activities (Feksa et al., 2018), however, there are few researches that use the fruit. Thus, the aim of this study has been to obtain phytochemical analysis and the *in vitro* antioxidant potential of the aqueous extract besides the evaluate the effect of freeze-dried pulp of the pummelo in Wistar rats submitted to the induction of non-alcoholic fatty liver disease.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

All chemicals used in this investigation were of analytical grade. The analytical standards used in this investigation, such as catechin, epicatechin, rutin and isoquercetin were obtained from Sigma Chemical Corporation (St. Louis, MO, USA). Gallic acid and caffeic acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

### 2.2. Plant material

Ripe fruits of pummelo were collected in a rural region in Uruguaiana, Brazil. The botanical identity of the pummelo fruits was performed by Prof. Dr. Renato Aquino Záchia, and the proof of the sample used in this investigation is available in the SMDB (Santa Maria Departamento de Biologia) Herbarium of the Universidade Federal de

Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil (register number 16,569).

### 2.2.1. Obtaining of the lyophilized fruit

The mesocarp and fruit pulp were used, without the seeds. Ten grams (10g) were ground in a blender with distilled water (100 mL). After 48 h of freezing, the material was lyophilized, yielding a powder which was stored in an amber bottle at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The solubility of the lyophilized powder in water was tested, being completely soluble, without any filtration step. The powder was reconstituted in distilled water before its use in the experiments.

### 2.2.2. Phytochemical analysis

The majority compounds present in the extract were quantified by HPLC-PDA with detection ranging from 200 to 400 nm. The separation was provided in a C18 column (5  $\mu\text{m}$ ; 4.6  $\times$  250 mm) using as mobile phase a linear gradient of formic acid 1% in water and acetonitrile 0.7 mL/min from 10 to 55 min, starting with 5% of acetonitrile and reaching 98% at the end of separation. Detection was performed at 254 nm for gallic acid; 327 nm for caffeic acid; 280 nm for catechin and epicatechin and 366 nm for rutin and isoquercetin (Bolígon et al., 2009).

### 2.2.3. Determination of the total content of the polyphenols

The concentration of total content polyphenols was quantified spectrophotometrically using Folin-Ciocalteu method (Singleton et al., 1999) with modifications. Lyophilized extract (0.5 g) was diluted in 1 mL of deionized water. To this solution was added 250  $\mu\text{L}$  of Folin-Ciocalteu solution (1 M), and this mixture was allowed to stand for 10 min prior to the addition of 1 mL of  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (7%). The solution was left to stand for 90 min and the absorbance was read at 760 nm (spectrophotometer UV-1800 Shimadzu, Japan).

The standard curve of gallic acid and of the sample ranged from 0.025 to 0.5 mg/mL. The total polyphenols were calculated in milligrams of gallic acid equivalent/millilitre (mg of GAE/mL). The linear regression yielded  $y = 0.076x + 0.1161$  as the equation for the standard curve of gallic acid, with good adjustment ( $r^2 = 0.9931$ ). The value of total polyphenols was expressed as mg of gallic acid by gram of extract.

### 2.2.4. Evaluation of antioxidant potential

ABTS and DPPH assays were performed aiming to the determination of *in vitro* antioxidant activity. Six concentrations of pummelo lyophilizate ranging from 0.025 to 0.5 mg/mL were used.

The antioxidant capacity of the pummelo lyophilizate in inhibiting the ABTS (2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical was determined, as previously described (Re et al., 1999), with modifications. Six different concentrations of the lyophilizate extract and ascorbic acid as positive control were prepared. After diluted ABTS solution (42.77  $\mu\text{M}$ , 1000  $\mu\text{L}$ ) was added to the tubes. The samples were left to stand at room temperature for 6 min before absorbance reading at 734 nm in a UV-1800 spectrophotometer (Shimadzu, Japan). The antioxidant activity of the fruit pulp was expressed as percentage of ABTS radical inhibition.

The elimination activity of DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical was performed using protocols reported in the literature (Sharma and Bhat, 2009). The DPPH elimination capacity of the compound was calculated according to the equation: DPPH radical scavenging activity =  $100 \cdot [(\text{Abs}_{\text{Sample}} - \text{Abs}_{\text{Blank}}) / \text{Abs}_{\text{Control}}] \times 100$ .

### 2.3. Animals

The forty (40) male Wistar rats used were available from the Federal University of the Pampa (UNIPAMPA), RS, Brazil. The rats were acclimatized at the BIOPAMPA for 30 days, and kept under controlled climatic conditions and light-dark cycle of 12h. The animals received water *ad libitum* and commercial feed.

All the experiments were performed in accordance with biomedical research guidelines defined by the Brazilian Societies of Experimental

Biology and approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the UNIPAMPA, Uruguaiana, RS, Brazil (Protocol 023/2021).

#### 2.3.1. Diet for induction of hepatic steatosis

The rats received a diet enriched with high-fat and fructose. The hyperlipidic diet was prepared by adding 50% of thermolyzed pig (Sadia®) lard to 50% of ration (Puro Trato®), after this mixture were melted under microwave radiation in a domestic oven. Fructose (Laderquímica®) was added in the drinking water of the animals until reach 45% (Almeida, 2011). Both the ration and fructose solution were prepared every day before the administration. The rats received the diet for 45 days and the *Citrus maxima* extract administered by gavage for the same period, once a day, in the morning.

#### 2.4. Experimental design

The animals were divided into four groups ( $n = 10$ ): Group 1: normal diet (ND) + saline solution (1 mL), Group 2: fructose-associated hyperlipidic diet (FHD) + saline solution (1 mL), Group 3: ND + lyophilized pummelo fruit pulp at a concentration (50 mg/kg) and Group 4: FHD + lyophilized pummelo fruit pulp (50 mg/kg). This value of dose by mass corporal is suitable with the soluble amount ingested by daily consumption of pummelo, and was defined according to previous investigations performed by the group (Feksa et al., 2018). For 45 days, the animals were feed with their corresponding treatments. The animals' body weight was monitored each week. The animals were fasted for 8 h before euthanasia. After the animals were anesthetized with xylazine/ketamine and whole blood by cardiac puncture and liver were collected for analysis.

#### 2.5. Parameters analysed

##### 2.5.1. Biochemical, hematological and inflammatory markers analysis

Total protein, glucose, and hepatic/renal markers were investigated using automated protocols (ChemWell® T, Palm, Florida, USA). Hematological parameters were quantified using a commercial kit (Roche®) using a system KX-21N (Sysmex® Corporation, Kobe, Japan).

Inflammatory markers, C-reactive protein (CRP), adiponectin and leptin were quantified using, respectively, CRP kit (Bioclin®, Belo Horizonte, MG, Brazil), Elisa AdipoQ kit (Abnova®, Walnut, CA, USA) and Elisa SimpleStep® (Waltham, MA 02453, USA). And finally, cytokines (interleukin IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ ) in serum were determined by the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay method using commercial kits obtained from Sigma Aldrich® (St. Louis, MO, USA).

##### 2.5.2. Evaluation of oxidative stress parameters

To evaluate the antioxidant defenses, the levels of polyphenols (Re et al., 1999), ascorbic acid (Jacques-Silva et al., 2001) and GSH (Akerboom and Sies, 1981), together with the activity of SOD (kit RANSOD - RANDOX Brasil LTDA), CAT (Aebi, 1984) and GPx (kit RANSEL - RANDOX Brasil LTDA) enzymes were analysed.

Oxidative damage in biomolecules were measured as lipid peroxidation (Ohkawa et al., 1979), protein carbonylation (Levine et al., 1990) and micronucleus frequency (Schmid, 1975).

##### 2.5.3. Analysis of lipid profile and oxidative damage in hepatic tissue

The total liver fat was extracted and quantified, as described by Bligh and Dyer (1959), with modifications (Feksa et al., 2018). The residue obtained from the extraction procedure was resuspended in isopropanol (1 mL) and aliquots were collected for analysis. The levels of total cholesterol and triglycerides were performed by spectrophotometer using commercial Bioclin® kits (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brazil). Analyses of lipid peroxidation (Ohkawa et al., 1979) and protein carbonylation (Levine et al., 1990) were performed on the supernatant obtained from the hepatic tissue homogenate. The total content of protein in hepatic tissue was realized by spectrophotometry with a

commercial kit (Bioclin® Belo Horizonte, MG, Brazil).

#### 2.6. Histological assessment

The livers of the rats were dissected and fixed by immersion in a formalin solution (10%) during 48 h at room temperature. After, the samples were packed in glass bottles with alcoholic solutions (Tolosa et al., 2003). Liver tissue samples were blocked in paraffin. Histological sections were obtained by a microtome and positioned in a digital histological bath to shape the cut on the slide. The samples were after stained with hematoxylin and eosin, visualized, and photographed under an optical microscope (LEICA®, DMS500) coupled to a digital camera (10 megapixels). The analysis of fat droplets in hepatic cells was used for hepatic steatosis detection, and the NAFLD activity score was also used to identify histopathological changes (Kleiner et al., 2005).

#### 2.7. Data analysis

The results were calculated as mean  $\pm$  standard deviation. Comparisons among the groups were realized through of one-way ANOVA, followed by Bonferroni's test. Were considered statistically significant  $p$  values lower than 0.05. The statistical analysis was performed using GraphPad Prism software version 9.2 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

### 3. Results

#### 3.1. Phytochemical analysis

Analysing the spectral profiles of the main peaks in the chromatogram, the presence of gallic acid (peak 1), catechin (peak 2), caffeic acid (peak 3), epicatechin (peak 4), rutin (peak 5) and isoquercetin (peak 6) were observed. Catechin (3.65 mg/g of lyophilized extract) and caffeic acid (3.71 mg/g of lyophilized extract) were the major compounds present in the fruit pulp sample (Fig. 1).

#### 3.2. In vitro assessment of antioxidant activity

The total phenolics in the fruit pulp ranged from 13.14 to 42.88 mg of GAE/g. In the ABTS and DPPH assays, the fruit pulp (0.025–0.5 mg/mL) yielded a percentage of inhibition of, respectively, 22.3%–35.1% and 36.6%–76.0%, respectively.

#### 3.3. Effect of pummelo pulp on body weight gain

All the groups demonstrated a gain in body weight at the end of the monitoring. In the first three weeks, a significant lower weight gain

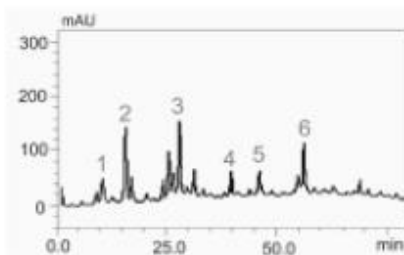


Fig. 1. Representative HPLC profile of the pummelo fruit extract. C18 column (5  $\mu$ m; 4.6  $\times$  250 mm), linear gradient formic acid 1%; acetonitrile 0.7 mL/min with ultraviolet detection from 200 to 400 nm. Peak (1) gallic acid; peak (2) catechin; peak (3) caffeic acid; peak (4) epicatechin, peak (5) rutin; and peak (6) isoquercetin were observed.

occurred ( $p < 0.05$ ) in the animals of the 2 and 3 groups in comparison with the groups which received a normal diet (group 1). In the following weeks, there was no modification in weight increase between the groups (Fig. 2).

### 3.4. Effect of pummelo pulp on biochemical and inflammatory parameters

The pummelo extract fruit had a promising effect on biochemical and inflammatory measurements of the rats treated with FHD diet. This aspect may be observed through the decrease in total cholesterol (Fig. 3B), triglycerides (Fig. 3C), LDL cholesterol (Fig. 3E), creatinine (Fig. 3F), urea (Fig. 3G), ALT (Fig. 3H), AST (Fig. 3I), ALP (Fig. 3J), C-reactive protein (Fig. 3L), leptin (Fig. 3M), TNF- $\alpha$  (Fig. 3N), IL-1 $\beta$  (Fig. 3O) and IL-6 (Fig. 3P) levels in the group 4 compared to the group 2 ( $p < 0.05$ ). Furthermore, were identified an increase in the HDL cholesterol (Fig. 3D) and adiponectin (Fig. 3K) in group 4 compared to the group 2 ( $p < 0.05$ ). Was found the absence of difference in glucose values between the group that received the fruit pulp and the group 2, as may be observed in Fig. 3A. This analysis showed that the use of pummelo extract fruit together with a hyperlipidic improved the lipidic profile, renal function, hepatic function and inflammatory markers of the rats.

### 3.5. Effect of pummelo pulp on haematological parameters

A significant decrease in the number of leukocytes in the group 4, treated with the pummelo pulp was observed in relation to the FHD diet (group 2) and normal diet (group 1). There was also a significant alteration in the percentage of lymphocytes and neutrophils between the group 1 and the other groups ( $p < 0.05$ ). As for the other parameters evaluated, there were no significant changes between the groups (Table 1).

### 3.6. Effect of pummelo pulp on oxidative stress parameters and antioxidant defenses

In the evaluation of oxidative damage to the biomolecules, lower levels of MDA were observed in the group that received the FHD diet + fruit pulp (group 4) compared to the group that did not receive the extract with the same diet (group 2), with  $p < 0.05$ , as reported in Fig. 4A. In the other parameters, protein oxidation and micronucleus frequency, there was no significant difference between the 2 and 4 groups (Fig. 4B-C).

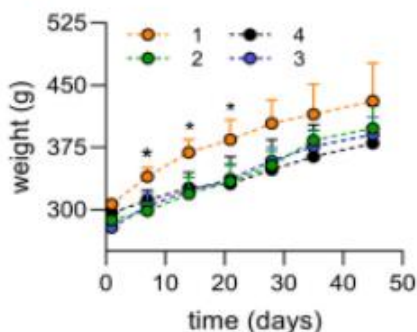


Fig. 2. Mass increase in rats of the four experimental groups during the investigation. Control group (1); fructose-associated with high-fat feeding diet - FHD (2); normal diet + pummelo extract 50 mg/kg (3) and FHD + pummelo extract (4). The data were presented as mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 10$  rats each group). \*  $p$  value lower than 0.05 if compared with groups 2 and 3.

The fatty diet produced a decrease in antioxidant defense systems, as may be observed by comparison of the levels of the SOD (Fig. 5A), CAT (Fig. 5B), GPx (Fig. 5C), GSH (Fig. 5D) and ascorbic acid (Fig. 5E) between the groups 1 and 2 ( $p < 0.05$ ). The positive effect of pummelo fruit extract on the model investigates may be confirmed by the comparison of the antioxidant levels in the groups 2 and 4. Both the groups that received pummelo fruit extract presented higher levels of superoxide dismutase (Fig. 5A), catalase (Fig. 5B), glutathione peroxidase (Fig. 5C) and reduced glutathione (Fig. 5D) than the group 2. Regarding to the ascorbic acid levels, no difference was found between the groups 2 and 4 (Fig. 5E) and the total phenolic compounds (Fig. 5F) were not affected by the experimental treatments.

### 3.7. Activity of pummelo pulp on histology of hepatic tissue and lipid profile

Fig. 6A and B shows the hepatic lipid profile for the four experimental groups. In the groups (3 and 4), which received the pummelo pulp extract, there was a lower level of total cholesterol and triglycerides than in 2 group ( $p < 0.05$ ). Fig. 6 also shows the histopathological features of the liver and highlighted that the groups that ingested the FHD diet + saline (Fig. 6D) had higher number of fat droplets and increased NAFLD activity scores indicating hepatic steatosis (NAFLD activity mean score: 2) compared to the group that received FHD diet + fruit extract (NAFLD activity mean score: 0) (Fig. 6F), highlighting the potential of the extract in avoiding the fatty accumulation on hepatic tissue. The absence of structural changes in the hepatic parenchyma in the group that received the pummelo extract together normal diet (Fig. 6E) is an important evidence of toxicity absence of toxicity of the extract.

## 4. Discussion

NAFLD is considered a world public health problem, caused by bad eating habits and physical inactivity, and is regarded as a hepatic manifestation of metabolic syndrome, which is also related to a resistance to insulin, inflammation and oxidative stress. Several bioactive compounds, which are found in plants, such as flavonoids and phenolic compounds, are widely investigated for their health benefits. The presence of these bioactive compounds is observed in the pulp and peel of the pummelo fruit, besides attributing a significant *in vitro* antioxidant activity for this fruit (Barreca et al., 2017; Buachan et al., 2014; Vijayalakshmi and Radha, 2016). Although studies had already shown hepatoprotective activity from the extract of leaves of the pummelo (Feksa et al., 2018), this study demonstrates for the first time the hepatoprotective capacity of freeze-dried extract from the fruits of the pummelo in a NAFLD model in Wistar rats. Regarding to the pummelo action mechanism against NAFLD on molecular level, a recent investigation reported the role of a functional food containing pummelo peel and camelia teas on AMPK pathway (Wen et al., 2022).

In this study, several aqueous extract compounds of the pulp of the pummelo were identified and quantified, and which were demonstrated to be rich in phenolic acids, with caffeic acid and catechin being the majority of the encountered compounds. A study performed by Anmol and collaborators (Anmol et al., 2021), also using an aqueous extract of the pummelo, detected various phenolic acids, such as chlorogenic acid, ferulic acid, caffeic acid, gallic acid, *p*-coumaric acid and syringic acid. Of these, gallic acid was the most found in the peel of several pummelo cultivars. Besides this, a study evaluating the phenolic compounds present in the ethanolic extract of *C. grandis* in the powdered peel, observed a presence of caffeic acid and epicatechin (concentration of 240.78 and 242.19 mg/100 g of dry weight, respectively), which presented potent antioxidant activity (Chowdhury et al., 2015). These authors also observed the presence of other phenolic compounds, such as syringic acid, gallic acid, vanilla acid and rutin hydrate, corroborating with the data of this present study.

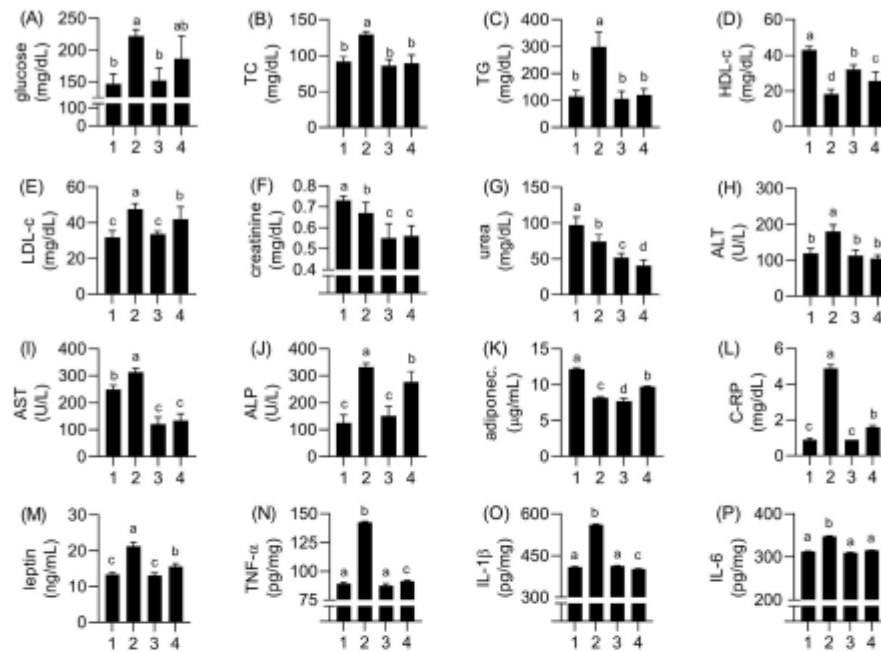


Fig. 3. Effect of pummelo pulp extract on biochemical (A–J) and inflammatory parameters (K–P) in plasma samples obtained from the four experimental groups. Control group (1); fructose-associated with high-fat feeding diet - FHD (2); normal diet + pummelo extract 50 mg/kg (3) and FHD + pummelo extract (4). The data were presented as mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 10$  rats each group). Different letters indicate differences between treatments ( $p < 0.05$ ) according to ANOVA followed by Bonferroni's test.

With regard to weight gain, all the groups had demonstrated an increase in body weight by the end of the experiment. In the first three weeks, there was a lower weight gain ( $p < 0.05$ ) of the animals which received the extract without experimental diet (group 3) and which received the hyperlipidic diet associated with fructose (groups 2 and 4) in relation to the group 1. At the end of experiment was not observed difference among all the groups, in agreement a previous study by our group, where the same diet model and experimental design was used (Feksa et al., 2018). A study which tested ethanolic extract of *Citrus unshiu*, a species of Asian pummelo, demonstrated that the rats which received this extract also presented weight reduction when compared to the control group (Park et al., 2013).

Hepatic steatosis is related to a resistance to insulin and type 2 diabetes mellitus, being one of the factors to be treated to control NAFLD (Dunn, 2017). In this study, it was observed that the animals in group 4 presented lower values of glycemia in relation to group 2, demonstrating an improvement in the glycemic profile of the animals which received the pummelo extract. The study by Park and collaborators (Park et al., 2013), also observed an improvement in the glucose levels of the rats which received ethanolic extract of *Citrus unshiu*, possibly because of the decrease of hepatic glycogen, which reflected a decrease of glycogen through the decrease in the activity of the enzyme, phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), thereby reducing the glycemia of the animals.

In this study, the results of the lipidic profile showed that the rats which utilized the pummelo extract had a reduction in their levels of LDL, total cholesterol and triglycerides and an increase in the levels of HDL cholesterol. A study which induced hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia in rats through a hypercholesterolemic diet and

were treated with pummelo juice, showed a reduction in LDL, total cholesterol and triglycerides levels and an increase in HDL levels, possibly because of the fact that the flavonoids inhibited the secretion of apolipoprotein B, responsible for the transport of cholesterol (Obloh et al., 2014).

Another important factor of NAFLD is the inflammatory profile which individuals present, with an increase in acute stage inflammatory cytokines, for example. C-reactive protein (CRP) is an important biomarker in the acute phase of individuals with NAFLD. Among all the inflammatory markers, CRP appears to be the only one which, alone, presents the greatest capacity for predicting risk of the emergence of tissue inflammation and oxidative stress, mainly in the endoplasmic reticulum and the peroxisomes (Johnson et al., 2012).

Making a relationship with the inflammatory process and the immunological reaction of NAFLD, an investigation showed that the inflammatory response triggered by obesity involves many components from the classic inflammatory response and includes a systemic increase of inflammatory cytokines and proteins in the acute phase, as for example, the CRP and recruitment of leukocytes for the inflamed tissue, the activation of these and the provocation of remedial responses of tissue, as with fibrosis, for example (Camargo, 2014). This study therefore suggests that the use of pummelo extract reduces the CRP levels and leukocyte counting, showing an improvement in these parameters and a reduction in the inflammatory process triggered by the diet and possibly reducing the hepatic damage to the rats.

In this study, the animals from group 4 presented greater levels of adiponectin than the animals in group 2, possibly because of the administration of a hyperlipidic diet and the pummelo aqueous extract. In animal models, the expression of adiponectin predicts a hepatic lipid

**Table 1**  
Hematological measurements of the four experimental groups treated with 50 mg/kg of aqueous extract of pummelo.

Parameters	Groups			
	Group 1 (ND + saline)	Group 2 (FHD + saline)	Group 3 (ND + fruit pulp)	Group 4 (FHD + fruit pulp)
Hemoglobin (g/dL)	14.2 ± 0.4 <sup>a</sup>	13.8 ± 0.5 <sup>a</sup>	15.0 ± 0.6 <sup>a</sup>	13.68 ± 1.2 <sup>a</sup>
Hematocrit (%)	43.8 ± 1.8 <sup>a</sup>	43.6 ± 1.5 <sup>a</sup>	45.9 ± 3.6 <sup>a</sup>	41.75 ± 4.9 <sup>a</sup>
Mean Corpuscular Volume (fL)	55.0 ± 1.0 <sup>a</sup>	54.5 ± 1.2 <sup>a</sup>	55.1 ± 1.2 <sup>a</sup>	54.8 ± 1.8 <sup>a</sup>
Mean Corpuscular Hemoglobin (pg)	18.0 ± 0.4 <sup>a</sup>	17.1 ± 0.5 <sup>a</sup>	17.8 ± 0.5 <sup>a</sup>	17.5 ± 0.6 <sup>a</sup>
Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (%)	32.7 ± 0.3 <sup>a</sup>	31.6 ± 0.3 <sup>a</sup>	32.4 ± 1.1 <sup>a</sup>	31.9 ± 0.8 <sup>a</sup>
Red Cell Distribution Width	13.6 ± 0.5 <sup>a</sup>	13.6 ± 0.6 <sup>a</sup>	14.7 ± 1.5 <sup>a</sup>	15.0 ± 1.1 <sup>a</sup>
Erythrocytes (10 <sup>9</sup> /mm <sup>3</sup> )	7.9 ± 0.2 <sup>a</sup>	8.0 ± 0.2 <sup>a</sup>	8.3 ± 0.5 <sup>a</sup>	7.5 ± 0.7 <sup>a</sup>
Leukocytes (10 <sup>9</sup> /mm <sup>3</sup> )	12.5 ± 3.9 <sup>b</sup>	18.5 ± 2.4 <sup>a</sup>	11.7 ± 2.9 <sup>bc</sup>	8.9 ± 2.0 <sup>c</sup>
Lymphocytes (%)	72.0 ± 4.5 <sup>b</sup>	79.8 ± 2.8 <sup>a</sup>	80.1 ± 3.2 <sup>a</sup>	80.5 ± 4.5 <sup>a</sup>
Neutrophils (%)	30.6 ± 6.9 <sup>a</sup>	19.8 ± 4.5 <sup>b</sup>	18.5 ± 3.1 <sup>b</sup>	19.0 ± 7.2 <sup>b</sup>
Monocytes (%)	1.5 ± 1.1 <sup>a</sup>	1.0 ± 0.8 <sup>a</sup>	1.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.3 ± 0.7 <sup>a</sup>
Eosinophils (%)	1.3 ± 0.5 <sup>a</sup>	1.5 ± 0.5 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.3 <sup>a</sup>	1.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
Basophil (%)	0 ± 0 <sup>a</sup>	0 ± 0 <sup>a</sup>	0 ± 0 <sup>a</sup>	0 ± 0 <sup>a</sup>
Platelets (10 <sup>7</sup> /mm <sup>3</sup> )	670.8 ± 144.9 <sup>a</sup>	528.5 ± 103.0 <sup>a</sup>	699.7 ± 157 <sup>a</sup>	694.8 ± 88.5 <sup>a</sup>

Results represented as mean ± standard deviation, and analysed using ANOVA followed by Bonferroni's test. Values with different letters are different ( $p < 0.05$ ).

accumulation, resulting in an increase of the adiponectin; this fact improves the sensibility of the tissues to insulin in such a way that the ectopic lipid interferes with the insulin signaling and causes inflammation and apoptosis. Obviously, this process has significant implications for the functions of the liver, pancreatic  $\beta$  cells and the kidneys. Adiponectin also increases the beta-oxidation of fatty acids and reduces lipogenesis in the liver and skeletal muscle via phosphorylation of the acetyl-CoA carboxylase 1, besides assisting in preventing the progression of HS for NASH in model animals. It is for this reason that, despite having a lipid diet, the adiponectin levels increased (Barreca et al., 2017). It should be noted that adiponectin is a potent insulin synthesizer, which increases the capacity of glucose use in the adipocytes, reducing the cell signaling cascade (Lima and Vieira, 2018).

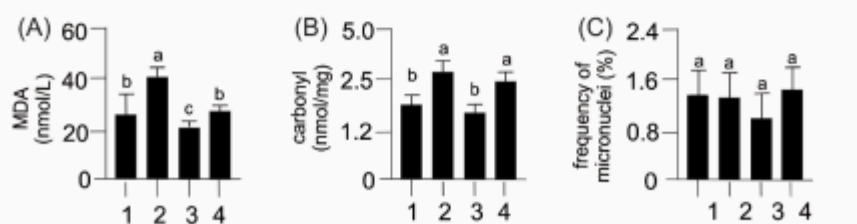
Concerning the leptin, a reduction in its levels was observed in the animals in group 4 in comparison with group 2, possibly due to the use of pummelo aqueous extract. This finding is in agreement with the data

already established, as with the study by other investigation (Petta et al., 2016), indicating its critical role in the regulation of body weight. Leptin can also negatively affect the cardiovascular system, performing atherogenic, thrombotic and angiogenic activities. Moreover, leptin can perform anti-inflammatory activities. In response to the increase of oxidative stress and an increase in endothelin expression, leptin can promote a reduction in vascular relaxation related to nitric oxide, thereby improving the effect of angiotensin II, which itself then increases the synthesis of the actual leptin and of some pro-inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$  and IL-6 (Petta et al., 2016). These characteristics could explain the reason for hyperleptinemia being observed in NAFLD. In a systematic review carried out by Polyzos and collaborators (Polyzos et al., 2016), the authors reported that the levels of circulating leptin are greater in patients with NAFLD than in the controls, demonstrating the evidence of inflammation mediated damage related to leptin and its respective potential involvement in the pathogenesis of NAFLD. In another investigation was related that a diet rich in fat induced the secretion of leptin and this acted as a signal of the body fat levels for the hypothalamus, which control the ingestion of food and energy consumption (Penrose et al., 2017).

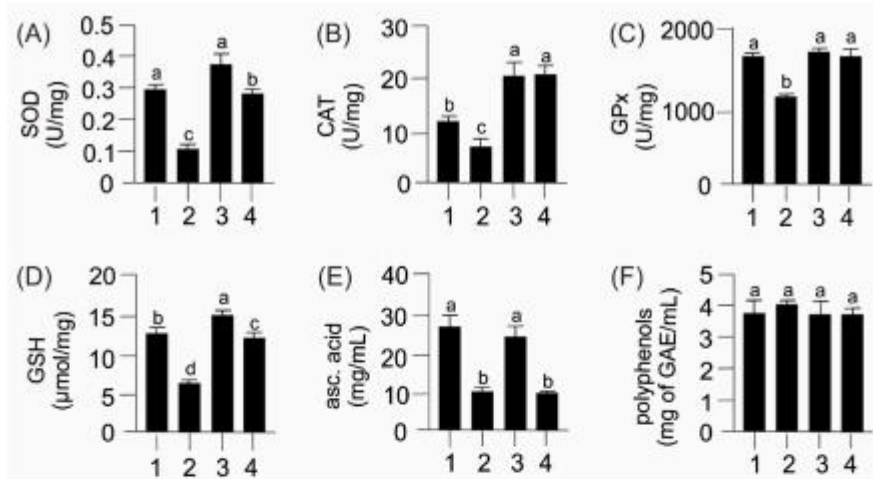
A study by Jianping et al. (2019), which used flavonoids from *Citrus changshan-huyou*, a type of Chinese pomelo, also rich in flavonoids, such as *Citrus maxima*, suppressed systemic and intrahepatic inflammation in rats with NAFLD by inhibiting IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and CRP, corroborating the data from our study and revealing improvement in the inflammatory process, both systemic and hepatic (Jianping et al., 2019).

The hepatoprotective effect of pummelo extract was evaluated in a murine carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) hepatic damage model (Chowdhury et al., 2015). It showed that the group in which pummelo was used neutralized the alterations in all the indexes of hepatotoxicity in comparison with the control group. Besides this, the treatment of the animals with pummelo for two weeks did not present any significant alteration in the hepatic enzymes in comparison with the control group. This study also showed a reduction in the hepatic enzyme levels ALT, AST and ALP in the treated group in relation to the non-treated group, demonstrating that the use of pummelo aqueous extract can be an auxiliary treatment in cases of NAFLD for reducing hepatic damage.

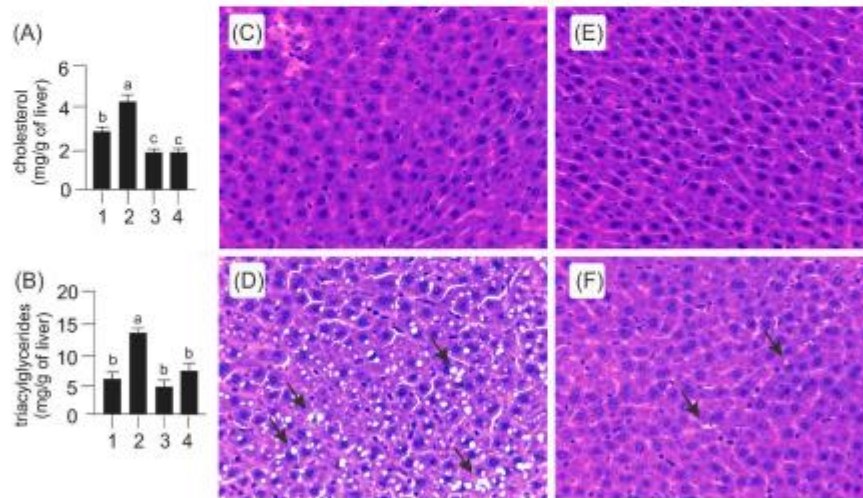
Oxidative stress contributes to the development of various pathologies, such as hepatic steatosis, and can also damage DNA. One of the most used methods to analyze DNA damage is through the frequency of micronuclei, which are masses of chromatin originating from chromosomal fragments or entire chromosomes, which form a small nucleus with a nuclear membrane surrounded by a cytoplasm. The probability of micronucleus frequency provides an estimate of the presence of chromosomal alterations (Birben et al., 2012; Franca et al., 2017; Halliwell and Whiteman, 2004; Milić et al., 2015). Our findings show that there were no differences among the groups, demonstrating that no genotoxic effect of pummelo aqueous extract exists between the treated and non-treated groups.



**Fig. 4.** Levels of MDA (A), carbonyl in plasma (B) and micronuclei (C) in leukocytes of whole blood samples obtained from the four experimental groups. Control group (1); fructose-associated with high-fat feeding diet - FHD (2); normal diet + pummelo extract 50 mg/kg (3) and FHD + pummelo extract (4). The data were presented as mean ± standard deviation ( $n = 10$  rats each group). Different letters indicate differences between treatments ( $p < 0.05$ ) according to ANOVA followed by Bonferroni's test.



**Fig. 5.** Levels of SOD activity (A), CAT activity (B), GPx activity in whole blood (C), GSH levels (D), ascorbic acid content (E) and polyphenols content (F) in plasma samples obtained from the four experimental groups. Control group (1); fructose-associated with high-fat feeding diet - FHD (2); normal diet + pummelo extract 50 mg/kg (3) and FHD + pummelo extract (4). The data were presented as mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 10$  rats each group). Different letters indicate differences between treatments ( $p < 0.05$ ) according to ANOVA followed by Bonferroni's test.



**Fig. 6.** Effect of pummelo extract on hepatic cholesterol (A) and hepatic triglycerides (B) levels in samples hepatic tissue obtained from the four experimental groups. Control group (1); fructose-associated with high-fat feeding diet - FHD (2); normal diet + pummelo extract 50 mg/kg (3) and FHD + pummelo extract (4). The data were presented as mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 10$  rats each group). Different letters indicate differences between treatments ( $p < 0.05$ ) according to ANOVA followed by Bonferroni's test. In figures C-F are depicted the hepatic tissue of the rats who received the saline + ND (C); FHD diet + saline (D); ND + fruit extract (E); and FHD + fruit extract (F). Images were obtained at 400X magnification and the arrows are highlighting the fat droplets.

Malondialdehyde (MDA) is one of the main by-products of lipoperoxidation (Halliwell and Chirico, 1993; Sharma et al., 2012). In the evaluation of oxidative damage to the biomolecules, the present study demonstrated that treatment with pummelo extract (group 4) reduced the MDA levels in relation to the control group. In a similar way to what

was observed in the present study, other investigation (Chowdhury et al., 2015) demonstrated that treatment with pummelo (0.5% of the food in powder form) significantly reduced the level of lipid peroxides in comparison with the group exposed to tetrachloride. The effect, therefore, of the reduction of MDA observed in this study of the rats which

received the pummelo aqueous extract demonstrates its effect in reducing oxidative damage in the liver, reinforcing the hepatoprotective activity of the pummelo.

Excess free radicals in the body are counteracted by antioxidant defense mechanisms that are produced *in vivo* or absorbed from the diet (Halliwell, 2008; Sen et al., 2010). Among the most important enzymatic antioxidants are SOD, CAT and GPx; non-enzymatic antioxidants include GSH (Sharma et al., 2012). This present study demonstrates that the activity of the enzymes SOD, CAT, GPx and GSH increased in the animals treated with pummelo extract (group 4) in comparison with the non-treated animals (group 2), demonstrating that pummelo aqueous extract can modulate the activities of these antioxidant enzymes. In a similar way as was observed in this study, other investigation (Kumar et al., 2019), analysed the physicochemical and antioxidant potential of sixteen varieties of citric fruit and they observed that the pummelo and the grapefruit presented great antioxidant potential, which could be explored in terms of nutrients and health supplements.

Other studies which evaluated methanolic extract of the leaves and powder of the peel of the *C. maxima* citric fruit in liver toxicity models induced by paracetamol and carbon tetrachloride also demonstrated the hepatoprotective and antioxidant activity of this plant, and an improvement was observed in the architecture and hepatic enzymes and the antioxidant defenses, plus a reduction in the oxidative damage markers (Abirami et al., 2015; Chowdhury et al., 2015). Likewise, in this study, lyophilized extract of the pummelo fruit presented antioxidant activity, observed by the reduction in the oxidative damage markers (hepatic and systemic) and an improvement in the antioxidant defense markers of the group which received the extract (group 4) when compared to the control group 2. Furthermore, other investigation also observed antioxidant activity of the methanolic extract of the leaves of *C. maxima* in streptozotocin induced diabetic rats, with a rise in the GSH levels and a reduction in the lipid peroxidation levels (Kandusen et al., 2011).

Regarding the histological data, a significant improvement can be observed in the hepatic architecture of the animals treated with pummelo extract in relation to the group with steatosis (group 2), which was defined through the reduction of the quantity of macrovesicular steatosis. A previous study carried out by Feska and collaborators (Feska et al., 2018), which also analysed animals with hepatic steatosis, albeit treated with ethanolic extract from pummelo leaves, also observed a similar effect to that reported in this work, demonstrating how both the leaf extract and the pummelo aqueous fruit extract can equally provide benefits in the lipid profile and the architecture of the liver in the animals studied. Histopathological observation of the study by others authors (Jianping et al., 2019), showed that flavonoids found in *Citrus changshan-huyou* attenuated liver lesions with significant decrease in NAFLD activity scores, clearly demonstrating the hepatoprotective effects of pomelo and its species.

## 5. Conclusion

Animals with HS treated with pummelo aqueous fruit extract presented significant improvement in the biochemical and inflammatory profiles, besides modulating the antioxidant defenses and the oxidative damage. In addition, a significant improvement was observed in the hepatic architecture of the animals treated with the extract in comparison with other groups. To sum up, the results presented first time here demonstrate the beneficial effects of the pummelo pulp fruit in the treatment of NAFLD and a general improvement of life quality of these patients, either as treatment support or for holding back the progression of the disease.

## Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence

the work reported in this paper.

## Data availability

Data will be made available on request.

## Acknowledgements

This work was supported by grants from UNIPAMPA (Universidade Federal do Pampa), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), and FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul).

## References

- Abirami, A., Nagarani, G., Siddharaja, P., 2015. Hepatoprotective effect of leaf extracts from *Citrus hystrix* and *C. maxima* against paracetamol induced liver injury in rats. *Food Sci. Hum. Wellness* 4, 35–41.
- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–127.
- Akerboom, T.P.M., Sies, H., 1981. Assay of glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.* 77, 373–382.
- Almeida, R.B., 2011. Ações do óleo de peixe e triglicerídios de cadeia média na esteatose hepática e estresse oxidativo induzidos pela dieta hiperlipídica em ratos. *Biotricina Pretn.* p. 121.
- Annol, R.J., Mariani, S., Hiew, F.T., Han, W.C., Kwan, L.K., Wong, A.K.Y., Ihan, F., Sarker, M.M.R., Chan, S.Y., Kibbi, N., Ming, L.C., 2021. Phytochemical and therapeutic potential of *Citrus grandis* (L.) Osbeck: a review. *Journal of Evidence-Based Integrative Medicine* 26, 1–20.
- Barnica, D., Gattuso, G., Bellocchi, E., Calderazzo, A., Trombetta, D., Smorogko, A., Lagana, G., Doglia, M., Meneghini, S., Naloni, S.M., 2017. Flavonoid-rich phytochemical with health-promoting properties. *Biofactors* 43, 495–506.
- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackonen, C., Erzurum, S., Kalayci, O., 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal* 5, 9–19.
- Boligon, A.A., Feltrin, A.C., Machado, M.M., Junovik, V., Athayde, M.L., 2009. HPLC analysis and phytoconstituents isolated from ethyl acetate fraction of *Scutellaria barbata* Ruiz. *Revista Brasileira de Farmacologia e Terapêutica* 28, 121–124.
- Buechler, P., Chaturvedi, L., Wattanapitayakul, S., 2014. Selected activities of *Citrus maxima* mor. Fruits on human endothelial cells: enhancing cell migration and delaying cellular aging. *Nutrients* 6, 1618–1634.
- Buzzoni, E., Pinzani, M., Tsochatzias, E.A., 2016. The multiple-hit pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metab. Clin. Exp.* 65, 1038–1048.
- Carrasco, K.F., 2014. Estado da inflamação e da autoimunidade na doença hepática gordurosa não alcoólica. *Botucatu*, p. 109.
- Chowdhury, M.I.H., Sagar, M.A.T., Tabassum, N., Potal, M.A., Hossain, H., Akter, M.A., 2015. Supplementation of *Citrus maxima* peel powder prevented oxidative stress, fibrosis, and hepatic damage in carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) treated rats. *Evid. base Compl. Alternative Med.* 2015, 1–10.
- Dadwal, V., Anli, R., Gupta, M., 2022. A comparative metabolomic investigation in fruit sections of *Citrus medica* L. and *Citrus maxima* L. detecting potential bioactive metabolites using UHPLC-QTOF-MS. *Food Res. Int.* 157, 111486–111496.
- Dong, M., Dong, L., Jia, X., Huang, F., Chi, J., Muhammad, Z., Ma, Q., Zhan, D., Zhang, M., Zhang, H., 2022. The flavonoid profiles in the pulp of different pomelo (*Citrus grandis* L. Osbeck) and grapefruit (*Citrus paradisi* Mill.) cultivars and their *in vitro* bioactivity. *Food Chem. X* 15, 100368–100368.
- Ding, X., Guo, L., Zhang, Y., Fan, S., Gu, M., Lu, Y., Jiang, D., Li, Y., Huang, C., Zhou, Z., 2013. Extracts of pomelo peels prevent high-fat diet-induced metabolic disorders in *c57bl/6* mice through activating the PPAR $\alpha$  and GLUT4 pathway. *PLoS One* 8, e77915.
- Dunn, W., 2017. Therapies for non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Research* 1, 214–220.
- Edam, M., Newsome, P.N., Sorin, S.R., Anjos, Q.M., Targher, G., Romero-Gomez, M., Zolber-Sagi, S., Wai-Sun Wong, V., Dufour, J.F., Schattenberg, J.M., Kawaguchi, T., Azeiteiro, M., Vilmont, L., Saha, G., Tirlidze, C., Vek-Meretska, H., Fan, J.G., Gorenflo, H., Vilas, V., Corluz-Fruto, H., Oliveira, C.P., Bellomo, P., Adams, L.A., Zheng, M.H., Forns, V., Chan, W.K., Mendez-Sanchez, N., Ahn, S.H., Castora, L., Bugianchi, E., Ratziu, V., George, J., 2020. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: an international expert consensus statement. *J. Hepatol.* 73, 202–209.
- Feska, D.L., Cavalli, R.P., Apontado da Costa Guller, A., Dal Forno, E.S., da Costa Escobar Piccoli, J., Manfredini, V., 2018. Extract of *Citrus maxima* (pummelo) leaves improve hepatoprotective activity in Wistar rats submitted to the induction of non-alcoholic hepatic steatosis. *Braz. J. Bioméd. Pharmacother.* 98, 338–346.
- Forns, V., Wakui, I., Bellomo, S., Geoman, A., Ajlouni, Y., Auta, D., 2020. What's in a name? Renaming 'NAFLD' to 'MAFLD'. *Liver Int.* 40, 1254–1261.
- Francis, M.B., Lima, E.C., Elvethier, E.C.A., 2017. Oxidative stress and amyloid toxicity: insights from yeast. *J. Cell. Biochem.* 118, 1442–1452.
- Halliwell, B., 2008. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and *in vivo* studies? *Arch. Biochem. Biophys.* 476, 107–112.
- Halliwell, B., Chirico, S., 1992. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* 57, 715S–725S.



- Halliwel, B., Whiteman, M., 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.* 142, 231–255.
- Jacques-Silva, M.C., Nogueira, C.W., Broch, C.L., Flores, E.M., Rocha, J.B., 2001. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. *Pharmacol. Toxicol.* 88, 119–125.
- Javed, S., Javed, A., Nawaz, S., Saeed, M., Mahmood, Z., Siddiqui, S.Z., Ahmad, R., 2014. Phytochemistry, GC-MS analysis, antioxidant and antimicrobial potential of essential oil from five citrus species. *J. Agric. Sci.* 6.
- Jiangping, J.D., Yan, L., Shi, Z., Wang, L., Shan, L., Efferth, T., 2019. Hepatoprotective and anti-inflammatory effects of total flavonoids of Qiu Zhi Ke (peel of *Citrus chungshang-luyun*) on non-alcoholic fatty liver disease in rats via modulation of NF- $\kappa$ B and MAPKs. *Phytomedicine* 64, 153082.
- Johnson, A.R., Justin Milner, J., Makowski, L., 2012. The inflammation highway: metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity. *Immunol. Rev.* 249, 218–238.
- Klein, D.E., Brust, E.M., Van Natta, M., Behling, C., Costas, M.J., Cummings, G.W., Ferrill, L.D., Liu, Y.-C., Torbenson, M.S., Unalp-Arida, A., Yeh, M., McCullough, A.J., Sanyal, A.J., Network, N.S.C.R., 2005. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Am. J. Surg.* 190, 1713–1721.
- Kumar, D., Ladaniya, M.S., Gurjar, M., 2019. Underutilized *Citrus* sp. Pomelo (*Citrus grandis*) and Kachal lemon (*Citrus jambhiri*) exerts phytochemicals and antioxidant potential. *J. Food Sci. Technol.* 56, 217–223.
- Kundusen, S., Gupta, M., Mazumder, U.K., Haldar, P.K., Saha, P., Bhattacharya, S., Kar, B., Bala, A., 2011. Antihyperglycemic effect and antioxidant property of *Citrus maxima* leaf in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes. Croat.* 40, 113–120.
- Levine, R.L., Gaziano, D., Oliver, C.N., Amici, A., Clement, I., Lenz, A.-G., Ahn, B.-W., Shalizi, S., Stadman, E.R., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 164, 478.
- Lima, W.P., Vieira, A.L.R., 2018. Non-alcoholic fatty liver disease, hormones and exercise: a physiological approach. *Revista Brasileira de Fisiologia do Exercício* 16, 304–318.
- Luci, C., Bourinot, M., LeClow, P.S., Anty, R., Gual, P., 2020. Chronic inflammation in non-alcoholic steatohepatitis: molecular mechanisms and therapeutic strategies. *Front. Endocrinol.* 11.
- Milic, M., Rozgaj, R., Kautuba, V., Jazbec, A.M., Starčević, B., Lyžički, B., Ravagnani, G., Zanesini, C., Muzi, M., Hrvilic, P., Angelini, S., 2015. Polymorphisms in DNA repair genes: link with biomarkers of the CEB1N cytosine assay in hospital workers chronically exposed to low doses of ionizing radiation. *Arch. Hig. Rad. Toksikol.* 66, 109–120.
- Oboh, G., Bello, F.O., Ademosun, A.O., 2014. Hypocholesterolemic properties of grapefruit (*Citrus paradisi*) and shaddock (*Citrus maxims*) juices and inhibition of angiotensin-1-converting enzyme activity. *J. Food Drug Anal.* 22, 477–484.
- Okawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351–358.
- Park, H.-J., Jung, U.J., Cho, S.-J., Jung, H.-K., Shim, S., Choi, M.-S., 2013. Citrus umbilic peel extract ameliorates hyperglycemia and hepatic steatosis by altering inflammation and hepatic glucose- and lipid-regulating enzymes in db/db mice. *J. Nutr. Biochem.* 24, 419–427.
- Petross, H.M., Heller, S., Cable, C., Nakhoul, H., Boddou, M., Flemington, E., Crawford, S.E., Savkovic, S.D., 2017. High-fat diet induced leptin and Wnt expression: RNA-sequencing and pathway analysis of mouse colonic tissue and tumors. *Carcinogenesis* 38, 302–311.
- Petta, S., Gastaldello, A., Rebelo, E., Bugianesi, E., Motta, P., Mileo, L., Sveglioni-Baroni, G., Valenti, L., Bonino, F., 2016. Pathophysiology of non alcoholic fatty liver disease. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 2082–2082.
- Polyzos, S.A., Antonis, K.N., Kountouras, J., Raptis, D.D., Vasiloglou, M.F., Moutzouris, C. S., 2016. Circulating leptin in non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Diabetologia* 59, 30–43.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 1231–1237.
- Rios, R.S., Zheng, K., Zheng, M.H., 2021. Non-alcoholic steatohepatitis and risk of hepatocellular carcinoma. *Chinese Med J* 134, 2911–2921.
- Sapkota, B., Devkota, H.P., Poudel, P., 2022. Citrus maxims (Brum.) Merr. (Rutaceae): bioactive chemical constituents and pharmacological activities. *Evid. base Compl. Alternative Med.* 2022, 8741669–8741669.
- Schmid, W., 1975. The micronucleus test. *Mutat. Res. Environ. Mutagen Relat. Subj.* 31, 9–15.
- Sen, S., Chakraborty, R., Srithar, C., Reddy, Y.S.R., De, B., 2010. Free radicals, antioxidants, diseases and phytochemicals: current status and future prospect. *Int. J. Pharmacoz.* 3, 91–100.
- Sharma, O.P., Bhat, T.K., 2009. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chem.* 113, 1202–1205.
- Sharma, P., Jha, A.R., Dubey, R.S., Pansarekhi, M., 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J. Bot.* 2012, 1–26.
- Shiba, G., Motma, N., 2021. Non-alcoholic steatohepatitis or metabolic-associated fatty liver: time to change. *Hepatobiliary Surg. Nutr.* 10, 123–125.
- Singletos, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 152–178.
- Somanathan Karthiga, R., Sukhdeo, S.V., Madhugiri Lakshminarayana, S., Mysuru Nanjarajuru, S., 2021. Efficacy of Citrus maxims fruit segment supplemented parathin in STZ induced diabetic rats. *J. Food Sci.* 86, 2091–2102.
- Tolosa, E.M.C., Rodrigues, C.J., Behmer, O.A., De Freitas Neto, A.G., 2003. Manual de técnicas histológicas normal e patológicas, 2<sup>a</sup> ed. Manole, São Paulo.
- Vijayalakshmi, P., Redha, R., 2016. In vitro anti-Alzheimer and anti oxidant activity of the peels of Citrus maxims fruits. *Braz. J. Pharmacol. Pharmacodyn.* 8, 17–17.
- Wen, S., An, R., Li, Z.-G., Lai, Z.-X., Li, D.-L., Cao, J.-X., Chen, R.-H., Zhang, W.-J., Li, Q.-H., Lai, X.-F., Sun, S.-L., Sun, L.-L., 2022. Citrus maxims and sea regulate AMPK signaling pathway to retard the progress of nonalcoholic fatty liver disease. *Food Nutr. Res.* 66.
- Zariwyan, F., Khajehsharif, H., 2022. Bioactive compounds analysis in ethanolic extracts of Citrus maxims and Citrus sinensis exocarp and mesocarp. *Nat. Prod. Res.* 36, 4505–4508.
- Zou, Z., Xi, W., Hu, Y., Niu, C., Zhou, Z., 2016. Antioxidant activity of Citrus fruits. *Food Chem.* 196, 885–896.

## **PARTE III**

### **6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Animais com esteatose hepática tratados com extrato aquoso da polpa do pomelo apresentaram melhora significativa nos perfis bioquímico e inflamatório, além de modular as defesas antioxidantes e o dano oxidativo. Além disso, foi observada melhora significativa na arquitetura hepática nos animais tratados com o extrato aquoso do pomelo em comparação com o grupo não tratado. Os resultados aqui apresentados, pela primeira vez, demonstram os efeitos benéficos da polpa de pomelo no tratamento da DHGNA, sendo uma possibilidade de melhoria geral da qualidade de vida desses indivíduos, seja como suporte ao tratamento ou para retardar a progressão da doença.

## **7 PERSPECTIVAS**

- Avaliar os efeitos da suplementação de lipossomas carregados com extrato aquoso das folhas e dos frutos do pomelo em ratos wistar com doença hepática gordurosa não alcoólica.
- Verificar se a suplementação dos lipossomas potencializam efeitos bioquímicos do extrato.
- Comparar os diferentes tratamentos (lipossomas e extrato livre) e correlacionar com parâmetros bioquímicos, inflamatórios, de estresse oxidativo e expressão gênica;
- Comparar os efeitos dos lipossomas entre ratos machos e fêmeas com DHGNA.

## REFERÊNCIAS

ABIRAMI, A.; NAGARANI, G.; SIDDHURAJU, P. Antimicrobial activity of crude extract of *Citrus hystrix* and *Citrus maxima*. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 4, p.296-300, 2013.

ABIRAMI A.; NAGARANI G., SIDDHURAJU, P. *In vitro* antioxidant, anti-diabetic, cholinesterase and tyrosinase inhibitory potential of fresh juice from *Citrus hystrix* and *C. maxima* fruits. **Food Science and Human Wellness**, v.3, p.16-25, 2014.

ABIRAMI, A.; NAGARANI, G.; SIDDHURAJU, P. Hepatoprotective effect of leaf extracts from *Citrus hystrix* and *C. maxima* against paracetamol induced liver injury in rats. **Food Science and Human Wellness**, v.4, p.35-41, 2015.

ABDUL-MUNEER, M.T.; SHENOY, A.; HEGDE, K.; et al. Evaluation of the anti-diabetic activity of ethanolic extract of *Citrus maxima* stem bark. **International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences**, v.3, p.642-650, 2014.

ADEMOSUN, A.O.; OBOH, A.G.; PASSAMONTI, S.; et al. Modulation of HMG-CoA reductase and glutathione-linked enzymes and protection against pro-oxidant induced oxidative damage in colon (Caco-2) cells and rat colon homogenates by phenolic extracts from Shaddock (*Citrus maxima*) peels. **Journal of Applied Biomedicine**, v.15, ed.1, p.1-8, 2017.

ANGULO P. Nonalcoholic fatty liver disease. **The New England Journal of Medicine**, v.346, p.1221-1231, 2002.

ARMSTRONG, M. J.; ADAMS, L. A.; CANBAY, A.; SYN, WK. Extrahepatic complications of nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v.59, p.1174-1197, 2014.

ASLANI, B.A; GHOBADI, S. Studies on oxidants and antioxidants with a brief glance at their relevance to the immune system. **Life Sciences**, v.146, p.163-173, 2016.

BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v.23, p.629-643, 2010.

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

BASARANOGLU, M.; BASARANOGLU, G.; SENTÜRK, H. From fatty liver to fibrosis: A tale of “*second hit*”. **World Journal of Gastroenterology**, v.19, p.1158-1165, 2013.

BRUNT, E.M.; JANNEY, C.G.; DI BISCEGLIE, A.M.; et al. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. **The American Journal of Gastroenterology**, v.94, p.2467-2474, 1999.

BUACHAN, P.; CHULAROJMONTRI, L.; WATTANAPITAYAKUL, S.K. Selected activities of Citrus Maxima Merr. fruits on human endothelial cells: Enhancing cell migration and delaying cellular aging. **Nutrients**, v.6, p.1618-1634, 2014.

BUECHLER, C.; WANNINGER, J.; NEUMEIER, M. Adiponectin, a key adipokine in obesity related liver diseases. **World Journal Gastroenterology**, v.17, p.2801-2811, 2011.

BUZZETTI, E.; PINZANI, M.; TSOCHATZIS, E. A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Metabolism Clinical and Experimental**, v.65, p.1038-1048, 2016.

BYRNE, C. D. Non-alcoholic fatty liver disease, insulin resistance and ectopic fat: a new problem in diabetes management. **Diabetic Medicine**, v.29, p.1098-1107, 2012.

BYRNE, C. D.; TARGHER, D. NAFLD: A multisystem disease. **Journal of Hepatology**, v.62, p.S47-S64, 2015.

CARR, R. M., ORANU, A.; KHUNGAR, V. Nonalcoholic fatty liver disease pathophysiology and management. **Gastroenterology Clinics of North America**, v.45, p.639-652, 2016.

CHALASANI, N.; YOUNOSSI, Z.; LAVINE, J.E.; et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. **Hepatology**, v.55, p.2005-2023, 2012.

CHEN, Z.T.; CHU, H.L.; CHYAU, C.C.; et al. Protective effects of sweet orange (*Citrus sinensis*) peel and their bioactive compounds on oxidative stress. **Food Chemistry**, v.135, p.2119-2127, 2012.

CHOWDHURY, M.R.H.; SAGOR, A.T.; TABASSUM, N.; POTOL, A.; HOSSAIN, H.; ALAM, A. Supplementation of *Citrus maxima* peel powder prevented oxidative stress, fibrosis, and hepatic damage in carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) treated rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2015, p.1-10, 2015.

CLARK, J.M. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v.40, p.5-10, 2006.

COHEN, J. H., KRISTAL, A. R.; STANFORD, J. L. Fruit and vegetable intakes and prostate cancer risk. **Journal of the National Cancer Institute**, v.92, p.61-68, 2000.

COTRIM, H. P.; PARISE, E.R; OLIVEIRA, C.P.M.S.;et al. Nonalcoholic fatty liver disease in Brazil. Clinical and histological profile. **Annals of Hepatology**, v.10, p.33-37, 2011.

COTRIM, H. P.; PARISE, E.R; FIGUEIREDO-MENDES, C.; et al. Nonalcoholic fatty liver disease Brazilian Society of Hepatology Consensus. **Arquivos de Gastroenterologia**, v.53, p.118-122, 2016.

DAS, S.; BORAH, M.; AHMED, S. Antibacterial activity of the ethanolic extract of leaves of *Citrus maxima* (burm.) merr. on *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v.6, p.136-139, 2013.

DAY, C.P.; JAMES. O.F. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? **Gastroenterology**, v.114, p.842-845, 1998.

DI MAJO, D., GIAMMANCO, M.; LA GUARDIA, M., et al. Flavanones in citrus fruit: structure-antioxidant activity relationships. **Food Research International**, v. 38, p.1161-1166, 2005.

DINESH, S.S.; HEGDE, K. Antiobesity activity of ethanolic extract of *Citrus maxima* leaves on cafeteria diet induced and drug induced obese rats. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v.9, p.907-912, 2016.

EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER (EASL), EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF DIABETES (EASD) AND EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF OBESITY (EASO). EASL–EASD–EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. **Journal of Hepatology**, v.64, p.1388-1402, 2016.

FARRELL, G.C.; ROOYEN, D.V.; GAN, L.; et al. NASH is an inflammatory Disorder: Pathogenic, Prognostic and Therapeutic Implications. **Gut and Liver**, v.6, p.149-171, 2012.

FEDERICO, A.; ZULLI, C.; DE SIO, I.; et al. Focus on emerging drugs for the treatment of patients with non-alcoholic fatty liver disease. **World Journal Gastroenterology**, v.20, p.16841-16857, 2014.

FEKSA, D. L., COELHO, R. P., GULLICH, A. A. C. et al. Extract of *Citrus maxima* (pummelo) leaves improve hepatoprotective activity in Wistar rats submitted to the induction of non-alcoholic hepatic steatosis. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v.98, p.338-346, 2018.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista Associação Médica Brasileira**, v.43, p.61-68, 1997.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of aging. **Nature**, v.408, p.239-247, 2000.

FINELLI, C; TARANTINO, G. What is the role of adiponectin in the obesity related non-alcoholic fatty liver disease? **World Journal Gastroenterology**, v.19, p.802-812, 2013.

FORSTERMANN, U.; SESSA W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European Heart Journal**, v.33, p.829-837, 2012.

FROMENTY, B.; BERSON, A.; PESSAYRE, D. Microvesicular steatosis and steatohepatitis: role of mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation. **Journal of Hepatology**, v.26, p.13-22, 1997.

GUTURU, P.; DUCHINI, A. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: role of obesity, insulin resistance and mechanisms of hepatotoxicity. **International Journal of Hepatology**, v.20, p.1-8, 2012.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. **The American Journal of Medicine**, v.91, p.14-22, 1991.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, v.141, p.312-322, 2006.

JADHAV, A.; MORE, S.; SATHE, S.; et al. Microscopical, physicochemical and phytochemical screening of *Citrus maxima* peel. **Indo American Journal of Pharm Research**, v.3, p.6430-6435, 2013.

JAMES, O.F.W. & DAY, C. P. Non-alcoholic steatohepatitis (NASH): a disease of emerging identity and importance. **Journal of Hepatology**, v.29, p.495-501, 1998.

JAVED, S.; JAVAID, A.; NAWAZ, S.; et al. Phytochemistry, GC-MS analysis, antioxidant and antimicrobial potential of essential oil from five Citrus species. **Journal of Agricultural Science**, v.6, p.201-208, 2014.

JOSHI-BARVE, S.; KIRPICH, I.; CAVE, M.; et al. Alcoholic, nonalcoholic, and toxicant-associated steatohepatitis: mechanistic similarities and differences. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, v. 1, p. 1-4, 2015.



JUNG, U.J & CHOI, M.S. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v.15, p.6184-6223, 2014.

KALIA, H.S.; GAGLIO, P.J. The prevalence and pathobiology of nonalcoholic fatty liver disease in patients of different races or ethnicities. **Clinical Liver Disease**, v.20, p.215-224, 2016.

KAMAL, G. M.; ANWAR, F.; HUSSAIN, A. I.; et al. Yield and chemical composition of Citrus essential oils as affected by drying pretreatment of peels. **International Food Research Journal**, v.18, p.1275-1282, 2011.

KHANAM, Z.; CHING, C.H.; ZAKARIA, N.H.B.M.; et al. Phytochemical analyses and DNA cleavage activity of *Citrus maxima* fruit. **International Conference on Chemistry and Environmental Sciences Research**, v.1, p1-9, 2014.

KHARJUL, A.; KHARJUL, M.; VILEGAVE, K.; et al. Pharmacognostic investigation on leaves of *Citrus maxima* (Burm.) Merr. (Rutaceae). **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v.3, p.1000-1005, 2012.

KHARJUL, M.; GALI, V.; KHARJUL, A. Antidiabetic potential of ethanolic extracts of *Citrus maxima* Fruit peel and *Anvillea garcinii*. **International Journal of Pharmaceutical Innovations**, v.4, p.8-18, 2014.

KIECHELE, F.L.; MALINSKI, T. Nitric oxide: biochemistry, pathophysiology, and detection. **American Journal of Clinical Pathology**, v.100, p.567-575, 1993.

KIM, J. Y.; LEE, C.; OHA, M.; et al. Relationship between non-alcoholic fatty liver disease, metabolic syndrome and insulin resistance in Korean adults: A cross-sectional study. **Clinica Chimica Acta**, v.458, p.12-17, 2016.

KOPPE, S. W. P. Obesity and the liver: nonalcoholic fatty liver disease. **Translational Research**, v.164, p. 1-4, 2014.

KUNDUSEN, S.; GUPTA, M.; MAZUMDER, U.K.; et al. Antihyperglycemic effect and antioxidant property of *Citrus maxima* leaf in streptozotocin-induced diabetic rats. **Diabetologia Croatica**, v.40, p.113-120, 2011.

KUNDUSEN, S.; GUPTA, M.; MAZUMDER, U.K.; et al. A. Antitumor activity of *Citrus maxima* (Burm.) Merr. leaves in Ehrlich's ascites carcinoma cell-treated mice. **International Scholarly Research Notices Pharmacology**, v. 31, p.1-4, 2011.

LANDIS, G.N.; TOWER, J. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.126, p.365-379, 2005.

LIHN, A.S.; PEDERSEN, S.B; RICHELSEN, B. Adiponectin: action, regulation and association to insulin sensitivity. **Obesity Reviews**, v.6, p.13-21, 2005.

LOMONACO, R.; SUNN, N.E.; BRIL, F.; CUSI, K. Nonalcoholic fatty liver disease: current issues and novel treatment approaches. **Drugs**, v.73, p.1-14, 2013.

LOOMBA, R.; SANYAL, A. J. The global NAFLD epidemic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v.10, p.686-690, 2013.

LORIA, P.; ADINOLFI, L.E; BELLENTANI, S.; et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease. A decalogue from the Italian Association for the Study of the Liver (AISF) Expert Committee. **Digestive and Liver Disease**, v.42, p.272-282, 2010.

LUDWIG, J.; VIGGIANO, T.R.; MCGILL, D.B.; OH, B.J. Nonalcoholic steatohepatitis: mayo clinic experiences with a hitherto unnamed disease. **Mayo Clinic Proceedings**, v.55, p.434-438, 1980.

MALHOTRA, N.; BEATON, M.D. Management of non-alcoholic fatty liver disease in 2015. **World Journal Hepatology**, v.7, p.2962-2915, 2015.

MARGARITI, A., M. DEUTSCH, S. MANOLAKOPOULOS, D. et al. The severity of histologic liver lesions is independent of body mass index in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v.47, p. 280-286, 2013.

MARRA, F.; BERTOLANI, C. Adipokines in liver diseases. **Hepatology**, v.50, p.957-969, 2009.

MCCULLOUGH, A.J. Pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v.40, p.S17-S29, 2006.

MEHTA, S.; VAGHELA, R.; VASAVA, B.; et al. Pharmacognostic and phytochemical characterization of leaves of *Citrus maxima*. **International Journal of Innovative Pharmaceutical Research**, v.2, p.175-178, 2011.

MOHANTY, S. R.; TROY, T.N.; HUO, D.; et al. Influence of ethnicity on histological differences in non-alcoholic fatty liver disease. **Journal of Hepatology**, v.50, p.797-804, 2009.

MURIEL, P. Role of free radicals in liver diseases. **Hepatology International**, v.3, p.526-536, 2009.

MUTCHLER, S.M.; STRAUB, A.C. Compartmentalized nitric oxide signaling in the resistance vasculature. **Nitric Oxide**, v.49, p.8-15, 2015.

NAVARRA, N.; URSINO, M.R.; FERLAZZO, N.; et al. Effect of *Citrus bergamia* juice on human neuroblastoma cells in vitro and in metastatic xenograft models. **Fitoterapia**, v.95, p.83-92, 2014.

NEGRÃO; A.B; LICINIO, J. Leptina: o Diálogo entre adipócitos e neurônios. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.44, p.205-214, 2000.

NOUREDDIN, M.; RINELLA, M.E. Nonalcoholic fatty liver disease, diabetes, obesity, and hepatocellular carcinoma. **Clinical Liver Disease**, v.19, p.361-379, 2015.

NUNES, VT, GONÇALVES, IL, OLVEIRA, PM. et al. Aqueous extract of pummelo pulp (*Citrus maxima*) improves the biochemical profile and reduces the inflammation process in Wistar rats with non-alcoholic fatty liver disease. **Food and Chemical Toxicology**, v. 178, p.1-9, 2023.

OBOH, G.; ADEMOSUN, A.O. Shaddock peels (*Citrus maxima*) phenolic extracts inhibit  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and angiotensin I-converting enzyme activities: A nutraceutical approach to diabetes management. **Diabetes e Metabolic Syndrome: Clinical Research e Reviews**, v.5, p.148-152, 2011.

OBOH, G.; BELLO, F.O.; ADEMOSUN, A.O. Hypocholesterolemic properties of grapefruit (*Citrus paradisi*) and shaddock (*Citrus maxima*) juices and inhibition of angiotensin-1-converting enzyme activity. **Journal of Food and Drug Analysis**, v.22, p.477-478, 2014.

OYEDEPOT, A.; BABARINDE, S.O. Effects of shaddock (*Citrus maxima*) fruit juice on glucose tolerance and lipid profile in type-II diabetic rats. **Chemical Science Transactions**, v.2, p.19-24, 2013.

PAGANO, C.; SOARDO, G.; ESPOSITO, W.; et al. Plasma adiponectin is decreased in nonalcoholic fatty liver disease. **European Journal of Endocrinology**, v. 152, p.113-118, 2005.

PARK, P.H; SANZ-GARCIA, C., NAGY, L.E. Adiponectin as an anti-fibrotic and anti-inflammatory adipokine in the liver. **Current Pathobiology Reports**, v.3, p.243-252, 2015.

PARK, Y.; VIKROVÁ, M.; MARTINCOVÁ, O.; et al. *In vitro* antioxidative and binding properties of phenolics in traditional, citrus and exotic fruits. **Food Research International**, v.74, p.37- 47, 2015.

PISOSCHI, A.M; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.97, p.55-74, 2015.

POLYZO, S.A.; KOUNTOURAS, J.; ZAVOS, C. Adiponectin as a potential therapeutic agent for nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology Research**, v.40, p.446-447, 2010.

QUIROGA, C.; DIB, C. J.; ARÉVALO, L.; et al. Elevación de aminotransferasas y su relación con esteatosis hepática en pacientes obesos. **Revista GEN**, v.67, p.87-90, 2013.

RAHMAN, K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. **Clinical Interventions in Aging**, v.2, p.219-236, 2007.

RATZIU, V. Management of Nonalcoholic Steatohepatitis: Pharmacotherapy. **Clinical Liver Disease**, v. 1, p 10-14, 2012.

RATZIU, V.; GOODMAN, Z.; SANYAL, A. Current efforts and trends in the treatment of NASH. **Journal of Hepatology**, v.61, p.S65-S75, 2015.

SANYAL, A. J. AGA technical review on nonalcoholic fatty liver disease. **Gastroenterology**, v.123, n.5, p.1705-1725, 2002.

SAKAGUCHI, S.; TAKAHASHI, S.; SASAKI, T.; et al. Progression of alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis: common metabolic aspects of innate immune system and oxidative stress. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v.26, p.30-46, 2011.

SAVVIDOU, S.; KARATZIDOU, K.; TSAKIRI, K.; et al. Circulating adiponectin levels in type 2 diabetes mellitus patients with or without non-alcoholic fatty liver disease: results of a small, open-label, randomized controlled intervention trial in a subgroup receiving short-term exenatide. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.113, p.125-134, 2016.

SERVIDDIO, G.; BELLANTI, F.; VENDEMIALE, G. Free radical biology for medicine: learning from nonalcoholic fatty liver disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v.65, p.952-968, 2013.

SHEIK, H.S.; VEDHAIYAN, N.; SINGARAVEL, S. Evaluation of central nervous system activities of *Citrus maxima* leaf extract on rodents. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v.4, p.077-082, 2014.

SHIVANANDA, A.; MURALIDHARA, R. D.; JAYAVEERA, K. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Citrus Maxima* (J.Burm) Merr. in animal models. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v.4, p.1800-1810, 2013.

SILVA, T.E.; COLOMBO, G.; SCHIAVON, L.L. Adiponectin: A multitasking player in the field of liver diseases. **Diabetes & Metabolism**, v.40, p. 95-107, 2014.

SINGH, P.; SHUKLA, R.; PRAKASH, B.; et al. Chemical profile, antifungal, antiaflatoxic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, dl-limonene. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, p.1734-1740, 2010.

STOJSAVLJEVIĆ, S.; GOMERČIĆ, P. M.; VIROVIĆ, J. L., et al. Adipokines and proinflammatory cytokines, the key mediators in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. **World Journal Gastroenterology**, n.20, p.18070-18091, 2014.

SUMIDA, Y.; NAKAJIMA, A.; ITOH, Y. Limitations of liver biopsy and non-invasive diagnostic tests for the diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. **World Journal Gastroenterology**, v.20, p.475-485, 2014.

SUMIDA, Y.; NIKI, E.; NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T. Involvement of free radicals and oxidative stress in NAFLD/NASH. **Free Radical Research**, v.47, p.869-880, 2013.

TANDRA, S.; YEH, M.M; BRUNT, E.M.;et al. Presence and significance of microvesicular steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. **Journal of Hepatology**, v.55, p.654-659, 2011.

TESSARI, P.; CORACINA, A.; COSMA, A.; TIENGO. Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v.9, p. 291-302, 2009.

TILG, H.; MOSCHEN, A.R. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. **Hepatology**, v.52, p.1836-1846, 2010.

TSOCHATZIS, E.; PAPTAEODORIDIS, G.V.; ARCHIMANDRITIS, A.J. The evolving role of leptin and adiponectin in chronic liver diseases. **The American Journal of Gastroenterology**, v.101, p.2629-2640, 2006.

VADIVUKARASI, G; AGNES JENITHA, X. *In vitro* studies on phytochemical analysis and antioxidant activity of *Citrus maxima*. **International Journal of Research in Pharmacology e Pharmacotherapeutics**, v.4, p.245-251, 2015.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v.30, p.1323-1338, 2007.

VERNON, G.; BARANOVA, A.; YOUNOSSI, Z.M. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.34, p.274 -285, 2011.

VIJAYLAKSHMI, P.; RADHA, R. An overview: *Citrus maxima*. **The Journal of Phytopharmacology**, v.4, p.263-267, 2015.

VIJAYALAKSHMI, P.; RADHA, R. *In vitro* anti-Alzheimer and antioxidant activity of the peels of *Citrus maxima* fruits. **Research Journal of Pharmacology and Pharmacodynamics**, v.8, p.17-22, 2016.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, U.R. Total antioxidant capacity of fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, p.705-701, 1996.

WANG, J.; LECLERCQ, I.; BRYMORA, J.M.; et al. Kupffer cells mediate leptin-induced liver fibrosis. **Gastroenterology**, v.137, p.713-723, 2009.

WANG, Y.; ZHOU, M.; LAM, K.S.L; et al. A. Protective roles of adiponectin in obesity-related fatty liver diseases: mechanisms and therapeutic implications. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.53, p.202-212, 2009.

WILLIAMS, C.D.; STENGEL, J.; ASIKE, M.I.; et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. **Gastroenterology**, v.140, p.124-131, 2011.

**WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANISATION (WGO)**. Global Guideline Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis, 2012.

**WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO)**. Obesity and Overweight, 2019. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. Acesso em: 1 setembro 2023.

WU, G., FANG, Y.Z.; YANG, S., LUPTON, J.R.; TURNER, N.D. Glutathione metabolism and its implications for health. **Journal of Nutrition**, v.134, p.489-492, 2004.

XU, A.; WANG, Y.; KESHAW, H.; XU, L.Y.; LAM, K.S.; COOPER, G.J. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v.112, p.91-100, 2003.

YAMAUCHI, T.; KAMON, J.; WAKI, H.; et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. **Nature Medicine**, v.7, p.941-946, 2001.

YOUNG, I.S.; WOODSIDE, J.V. Antioxidants in health and disease. **Journal of Clinical Pathology**, v.54, p.176-186, 2001.

YOUNOSSI, Z.M.; STEPANOVA, M.; AFENDY, M.; et al. Changes in the prevalence of the most common causes of chronic liver diseases in the United States from 1988 to 2008. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v.9, p.524-530, 2011.

ZIECH, D.; FRANCO, R. GEORGAKILAS, A.G.; et al. The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development. **Chemico-Biological Interactions**, v.188, p.334-339, 2010.



ZOU, Z.; XI, W.; HU, Y.; et al. Antioxidant activity of Citrus fruits. **Food Chemistry**, v.196, p.885-896, 2016.

## ANEXOS

### ANEXO 1 PROTOCOLO DE APROVAÇÃO CEUA - UNIPAMPA



**CERTIDÃO**

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA**

Número de protocolo da CEUA: 023/2021

Título: Avaliação dos efeitos da suplementação do extrato aquoso dos frutos de Citrus máxima (Pomelo) em ratos Wistar submetidos à indução de esteatose hepática não alcoólica por dieta rica em frutose

Data da aprovação: 16/07/2021

Período de vigência do projeto: 01/2023

Pesquisadores(a): Vanusa Manfredini

Campus: Uruguiana

Telefone: (55) 9 9407-5737

E-mail: [vanusamanfredini@unipampa.edu.br](mailto:vanusamanfredini@unipampa.edu.br)

Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa
Espécie / Linhagem / Raça	Ratos Wistar
Nº de animais	40
Peso / Idade	100-120g / 40 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério da UFPel

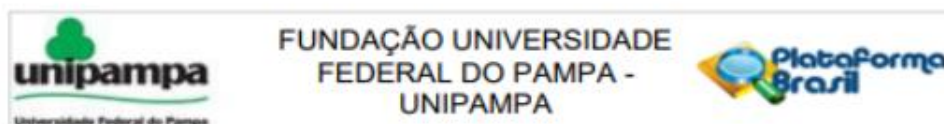
---



Assinado eletronicamente por CATIA ALINE VEIVERBERG, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR, em 19/07/2021, às 17:52, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.

## ANEXO 2

### PROTOCOLO DE APROVAÇÃO CEP-UNIPAMPA



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação dos efeitos in vitro do extrato aquoso dos frutos do pomelo sobre parâmetros de estresse oxidativo em pacientes com Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica

**Pesquisador:** VANUSA MANFREDINI

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 53218221.6.0000.5323

**Instituição Proponente:** Fundação Universidade Federal do Pampa UNIPAMPA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 5.308.525

##### Apresentação do Projeto:

As afirmações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivos da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1838081, de 10/03/2022).

A Doença Hepática Gordurosa não Alcoólica (DHGNA) é um problema de saúde pública mundial, sendo a obesidade, diabetes mellitus, hipertensão e dislipidemias os fatores de risco. A esteatose hepática (EH) é o primeiro estágio da doença e origina-se de um descontrole no metabolismo de lipídios, resultando no acúmulo em hepatócitos. Na maioria dos casos, a esteatose hepática não causa nenhum sintoma, mas para alguns pacientes, a presença a longo prazo de gordura no fígado leva à inflamação, resultando na esteato-hepatite, que é uma forma mais avançada da doença hepática gordurosa não alcoólica e sua incidência e prevalência está aumentando no mundo todo. Inflamação de longo prazo leva à formação de fibrose, e pode resultar em progressão para a cirrose. Pesquisas apontam que a inflamação e estresse oxidativo podem acelerar a progressão da EH e, nesse contexto, o pomelo, apresenta atividades antioxidantes e antiinflamatórias, mas pouco se conhece sobre seus efeitos citotóxicos. Assim, o objetivo desse estudo será avaliar os efeitos do extrato da polpa dos frutos do pomelo in vitro sobre o dano oxidativo em lipídeos, proteínas e DNA em sangue total de pacientes com DHGNA. Com isso, espera-se conhecer melhor os efeitos da polpa do pomelo in vitro, avaliando

**Endereço:** BR 472 - Km 585 - Campus Uruguaiana

**Bairro:** Prédio Administrativo - Sala 23 - Caixa **CEP:** 97.501-970

**UF:** RS **Município:** URUGUAIANA

**Telefone:** (55)3911-0202

**E-mail:** cep@unipampa.edu.br



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO PAMPA -  
UNIPAMPA



Continuação do Parecer: 5.308.525

assim sua utilização como adjuvante no tratamento da DHGNA.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Objetivo Geral

Avaliar os efeitos *in vitro* do extrato aquoso dos frutos do pomelo sobre parâmetros de estresse oxidativo em pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica, nos estágios de esteatose hepática e esteato-hepatite.

Objetivo Secundário:

Objetivos Específicos- Obter o extrato liofilizado dos frutos do pomelo;- Realizar a caracterização fitoquímica do extrato;- Verificar a atividade antioxidante *in vitro* do extrato do pomelo em diferentes concentrações;- Selecionar os pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica (esteatose hepática e esteato-hepatite), bem como os indivíduos controle;- Conhecer o perfil sócio-demográfico e de saúde dos participantes do estudo;- Obter o sangue venoso dos participantes da pesquisa;- Realizar os ensaios de estresse oxidativo *in vitro* com o extrato dos frutos do pomelo na concentração que apresentou melhor atividade antioxidante;- Verificar a atividade das enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GPx);- Quantificar os compostos antioxidantes (GSH, vitamina C e polifenóis);- Determinar o status antioxidante total (TAS);- Obter o dano oxidativo em biomoléculas (lipídeos, proteínas e DNA).

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

O participante poderá sentir uma pequena dor e desconforto por causa da punção venosa e poderá haver a formação de um hematoma no local, que desaparecerá ao longo de algumas horas. Será orientado para o participante que não realize movimentos bruscos e que não carregue objetos pesados durante um dia com o braço em que foi coletado o sangue.

Benefícios:

Com a presente pesquisa pretende-se analisar os efeitos *in vitro* do extrato aquoso dos frutos do pomelo em sangue de pacientes com DHGNA, elucidar vias que são ativadas de estresse oxidativo e verificar se o extrato do pomelo é capaz de minimizar o dano oxidativo em biomoléculas. Espera-se que os frutos do pomelo, fruta rica em antioxidantes, seja capaz atuar como adjuvante no tratamento da DHGNA.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Estudo nacional e unicêntrico. De financiamento próprio. Trata-se de um ensaio clínico

Endereço: BR 472 - Km 585 - Campus Uruguaiana

Bairro: Prédio Administrativo - Sala 23 - Caixa CEP: 97.501-970

UF: RS Município: URUGUAIANA

Telefone: (55)3911-0202

E-mail: cep@unipampa.edu.br

Página 02 de 04



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO PAMPA -  
UNIPAMPA



Continuação do Parecer: 5.308.525

randomizado. Previsão de início do estudo: 01/07/2022 e encerramento: 01/07/2023.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

**Recomendações:**

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Trata-se de análise de resposta ao parecer pendente n° 5.279.958 emitido pelo CEP em 08/03/2022.

Pendências atendidas.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Ressalta-se que cabe a pesquisadora responsável encaminhar os relatórios parciais e final da pesquisa, por meio da Plataforma Brasil, via notificação do tipo "relatório" para que sejam devidamente apreciadas no CEP, conforme Norma Operacional CNS n° 001/13, item XI.2.d.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1838081.pdf	10/03/2022 16:38:30		Aceito
Outros	carta_resposta_a_pendencias_atual_Vanusa_Manfredini10032022.doc	10/03/2022 16:37:53	VANUSA MANFREDINI	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_10032022.pdf	10/03/2022 16:35:40	VANUSA MANFREDINI	Aceito
Outros	TERMO_DE_CONFIDENCIALIDADE.pdf	04/11/2021 16:54:39	VANUSA MANFREDINI	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_PLATAFORMA_BRASIL.pdf	07/10/2021 14:14:29	VANUSA MANFREDINI	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO_ASSINADA.pdf	07/10/2021 14:07:29	VANUSA MANFREDINI	Aceito

**Endereço:** BR 472 - Km 585 - Campus Uruguaiana

**Bairro:** Prédio Administrativo - Sala 23 - Caixa **CEP:** 97.501-970

**UF:** RS **Município:** URUGUAIANA

**Telefone:** (55)3911-0202

**E-mail:** cep@unipampa.edu.br



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO PAMPA -  
UNIPAMPA



Continuação do Parecer: 5.308.525

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

URUGUAIANA, 23 de Março de 2022

---

**Assinado por:**  
**Rafael Lucyk Maurer**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** BR 472 - Km 585 - Campus Uruguaiana

**Bairro:** Prédio Administrativo - Sala 23 - Caixa **CEP:** 97.501-970

**UF:** RS **Município:** URUGUAIANA

**Telefone:** (55)3911-0202

**E-mail:** cep@unipampa.edu.br

## ANEXO 3

### Questionário aplicado aos participantes do estudo

QUESTIONÁRIO ESTUDO POMELO *in vitro*

Nome: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Data de nascimento: \_\_\_\_\_

Etnia: \_\_\_\_\_ Estado civil: \_\_\_\_\_

Profissão: \_\_\_\_\_

Grau de escolaridade: \_\_\_\_\_ Renda: \_\_\_\_\_

Peso: \_\_\_\_\_ altura: \_\_\_\_\_

IMC: \_\_\_\_\_ Pressão arterial: \_\_\_\_\_

Circunferência abdominal: \_\_\_\_\_

Doenças pré-existent:

( ) diabetes tipo 2 ( ) HAS ( ) fígado gorduroso ( ) obesidade ( ) câncer

( ) OUTRA: \_\_\_\_\_

Usa medicamentos continuamente? ( ) sim ( ) não Quais? \_\_\_\_\_

Pratica atividade física? ( ) sim ( ) não Se sim, qual frequência? \_\_\_\_\_

Toma alguma vitamina? ( ) sim ( ) não Se sim, qual? \_\_\_\_\_

Quantas refeições faz por dia? \_\_\_\_\_

Nas refeições você prefere: ( ) arroz, massa e pão ( ) ovos, carne e queijo ( ) balas, pudim, pipoca

Bebe água? ( ) sim ( ) não Se não, qual bebida ingere? \_\_\_\_\_

Ingere bebida alcoólica? ( ) sim ( ) não Se sim, qual frequência? \_\_\_\_\_

É fumante? ( ) sim ( ) não