

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 26/07/2017.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA**



Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia

**EFEITO DA CURCUMINA E CAROTENOIDES EM IOGURTE SOBRE
BIOMARCADORES FISIO-METABÓLICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO
EM MODELOS DE DIABETES MELLITUS TIPO 1 E DE
OBESIDADE/RESISTÊNCIA INSULÍNICA**

RENATA PIRES DE ASSIS

Araraquara
2016

RENATA PIRES DE ASSIS

**EFEITO DA CURCUMINA E CAROTENOIDES EM IOGURTE SOBRE
BIOMARCADORES FISIO-METABÓLICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO
EM MODELOS DE DIABETES MELLITUS TIPO 1 E DE
OBESIDADE/RESISTÊNCIA INSULÍNICA**

Tese de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Câmpus de Araraquara, como parte dos requisitos para o título de Doutor em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia.
Área de concentração: Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti
Co-orientadora: Profa. Dra. Amanda Martins Baviera

Araraquara/SP
2016

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Assis, Renata Pires de
A848e Efeito da curcumina e carotenóides em iogurte sobre biomarcadores
fisiometabólicos e de estresse oxidativo em modelos de diabetes mellitus
tipo 1 e de obesidade/resistência insulínica / Renata Pires de Assis. –
Araraquara, 2016
150 f. :

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita
Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação
em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia

Orientador: Iguatemy Lourenço Brunetti

Coorientador: Amanda Martins Baviera

1. Diabetes mellitus. 2. Obesidade. 3 Estresse oxidativo. 4. Curcumina.
5. Licopeno. 6. Bixina. I. Brunetti, Iguatemy Lourenço, orient. II. Baviera,
Amanda Martins, coorient. III. Título.

CAPES: 40300005

RENATA PIRES DE ASSIS

Efeito da curcumina e carotenoides no iogurte em biomarcadores físeo-metabólicos e de estresse oxidativo em modelos de diabetes mellitus tipo 1 e obesidade/resistência insulínica

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Campus de Araraquara como requisito para a obtenção do título de Doutora em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia

Araraquara, 26 de julho de 2016.

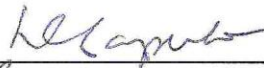
BANCA EXAMINADORA



IGUATEMY LOURENÇO BRUNETTI



MAURO-SOLA- PENNA



LUCIANA CHAGAS CAPERUTO



KATIA SIVIERI



ANA ANGÉLICA HENRIQUE FERNANDES

Tese de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicada à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de Araraquara como parte dos requisitos para o título de Doutor em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia. Área de concentração: Bioquímica.

Trabalho desenvolvido no laboratório de Bioquímica Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP/ Câmpus Araraquara e no “Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec”, da *Université Laval*.

Fomento: Bolsa CNPq – Doutorado e Bolsa PDSE/CAPES – Doutorado Sanduíche

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Osni e Ana Helena, pelo amor incondicional ao longo de toda esta jornada, o qual me sustenta e encoraja durante esses anos.

Às minhas irmãs, Fernanda e Rafaela, por participarem de uma maneira toda especial de cada momento da minha vida, sendo grandes parceiras, confidentes e amigas.

Ao Pedro, que constantemente me fortaleceu com amor, carinho e paciência.

Ao orientador, Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti, por toda dedicação, cuidado e apoio sempre presentes ao longo de todo o trabalho. Foi uma grande honra tê-lo como professor e também como modelo de pessoa e profissional extremamente competente, compreensivo, ético e otimista, pelo qual nutro respeito, admiração e carinho muito grande. Obrigada por seu voto de confiança, pelos ensinamentos e por me fazer acreditar que poderia chegar até aqui.

A Prof. Dra. Amanda Martins Baviera, a quem tive o grande privilégio de conhecer e receber valiosas orientações, que, em grande medida contribuíram para o desenvolvimento do presente trabalho, bem como para meu desenvolvimento acadêmico. Obrigada pela disponibilidade em sempre me ajudar e pela generosidade em compartilhar de seu conhecimento.

Ao Prof. Dr. André Marette, e às supervisoras Marie-Julie Dubois e Geneviève Pilon pela acolhida, receptividade e oportunidade de trabalhar no “Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec”, da Universidade de Laval.

Aos amigos Vânia e Carlos, com os quais vivi tantos momentos de desafios, superações e conquistas, agradeço grandemente pela inestimável ajuda em todo este trabalho... jamais me esquecerei do apoio e encorajamento que me transmitiram desde o início, ainda na fase de projeto, bem como pela união e amizade ao longo de todos esses anos, da qual me lembrarei com muito carinho e saudade, sempre.

As amigas Monalisa, Juliana, Daniela, Mariana e Thaís, pelo companheirismo e amigável convivência no laboratório. Sentirei saudades!

Aos amigos brasileiros e canadenses, os quais tive o prazer de conhecer durante minha estadia em Quebec: Laís, Lilian, Mayara, Pricila, Cíntia, Ingrid, Fernando, Renato, Laura, Marie-Pier, Geneviève Chevrier, Marie-Hélène e Valérie, obrigada pela convivência, pelas experiências compartilhadas e pelos momentos vividos, tanto na Universidade como nas viagens e turismo por Quebec.

Ao CNPq e CAPES/PDSE pelo incentivo e apoio financeiro.

RESUMO

As mudanças no estilo de vida e na estrutura dietética da população atual levam a uma ingestão calórica excessiva e ao comportamento sedentário, que em conjunto pode explicar a epidemia de obesidade e diabetes mellitus (DM). O diabetes mellitus é definido como um grupo de doenças metabólicas caracterizado por hiperglicemia, resultante da deficiência na produção e secreção de insulina pelas células beta pancreáticas e/ou resistência à ação da insulina em tecidos-alvo. A manutenção da hiperglicemia por longos períodos é um dos principais fatores envolvidos no estabelecimento do estresse oxidativo, condição esta que participa no desenvolvimento de vários prejuízos do DM, em especial as complicações micro e macrovasculares. Diversos trabalhos demonstram os efeitos de produtos naturais na melhoria da hiperglicemia, estresse oxidativo, status inflamatório e nas complicações do DM. Também tem sido explorado o uso de matrizes alimentares como veículos para ativos naturais, como por exemplo, o iogurte. Neste contexto, utilizamos dois modelos experimentais para avaliar os efeitos dos tratamentos com curcumina, bixina ou licopeno incorporados ao iogurte, isolados ou em associação: *i*) DM tipo 1 induzido com estreptozotocina (STZ); *ii*) obesidade/resistência insulínica induzida com dieta *high-fat* (HF). **Experimento I:** No modelo de DM induzido com STZ, foram utilizados ratos Wistar machos, normais (N) e diabéticos (D, 40 mg/kg STZ, i.v.), tratados durante 50 dias, distribuídos nos seguintes grupos: NIOG e DIOG, tratados com iogurte; DINS, tratados com insulina (4 U/dia); DC, tratados com 90 mg/kg de curcumina; DB, tratados com 5,5 mg/kg de bixina; DCB, tratados com 90 mg/kg de curcumina e 5,5 mg/kg de bixina; DL, tratados com 45 mg/kg de licopeno; DCL, tratados com 90 mg/kg de curcumina e 45 mg/kg de licopeno. Todos os ativos naturais foram administrados em iogurte. Foram analisados os seguintes parâmetros: *i*) fisiológicos: peso corporal, ingestão alimentar e hídrica, volume urinário, massas dos tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal e dos músculos esqueléticos *soleus* e *extensor digitorum longus* (EDL); *ii*) biomarcadores bioquímicos plasmáticos, urinários e teciduais: glicemia, colesterol total, colesterol-HDL, triacilgliceróis (TAG), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP), glicosúria, proteinúria e ureia urinária, conteúdo de glicogênio hepático; *iii*) biomarcadores plasmáticos e teciduais relacionados ao estresse oxidativo: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (malondialdeído, MDA), níveis de LDL-oxidada (LDL-ox), níveis de proteínas carboniladas (PCO), níveis de glutathione reduzida (GSH), atividades da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GSH-Px). Como esperado, os animais DIOG apresentaram piora em todos os biomarcadores analisados, durante todo o período experimental, enquanto que o tratamento com insulina (DINS) foi eficaz na melhoria de todos os biomarcadores alterados no diabetes. Os tratamentos de ratos diabéticos com iogurte enriquecido com curcumina, licopeno ou bixina, isoladamente, melhoraram vários parâmetros alterados: fisiológicos (peso corporal e pesos de músculos esqueléticos e tecidos adiposos); bioquímicos (níveis plasmáticos de glicose, TAG e colesterol total foram diminuídos); as atividades de enzimas antioxidantes (SOD e CAT) foram aumentadas; biomarcadores de estresse oxidativo (MDA, PCO, LDL-ox) foram reduzidos, quando comparados com o grupo DIOG. Os tratamentos com os carotenoides isolados (DL e DB) aumentaram os níveis de colesterol-HDL. Os tratamentos com as misturas de curcumina com os carotenoides (DCB ou DCL) preservaram todos os efeitos benéficos dos tratamentos isolados. Além disso, a co-administração curcumina e carotenoides promoveu um efeito combinado na redução dos níveis de LDL-ox, bem como preservou os efeitos dos carotenoides no aumento dos níveis de HDL. **Experimento II:** No

modelo de obesidade/resistência insulínica induzida com HF, foram utilizados camundongos machos (C57B1/6J), divididos aleatoriamente em 6 grupos, tratados durante 8 semanas: L, dieta *low-fat* e tratados com água; H, dieta *high-fat* e tratados com água; HIOG, dieta *high-fat* e tratados com iogurte; HC, dieta *high-fat* e tratados com 90 mg/kg de curcumina; HB, dieta *high-fat* e tratados com 5,5 mg/kg de bixina; HL, dieta *high-fat* e tratados com 45 mg/kg de licopeno. Todos os ativos naturais foram administrados em iogurte e em tratamentos isolados. Foram monitorados os parâmetros: *i*) fisiológicos: peso corporal, composição corporal via RMN (tecidos adiposos, massa magra e fluidos), massa de tecidos adiposos e musculares, ingestão alimentar, conteúdo energético das fezes; *ii*) biomarcadores plasmáticos: glicose [monitoramento da homeostase da glicose: teste de tolerância à insulina (ITT) e teste de tolerância a glicose oral (TTGO)]; glicemia de jejum (6 e 12 horas)], colesterol total, triacilglicerol (TAG), insulina (insulinemia de jejum e durante TTGO), níveis de MDA; *iii*) parâmetros bioquímicos teciduais: TAG, MDA, CAT, SOD, GSH-Px, e *iv*) biomarcadores inflamatórios teciduais: IL-6 e TNF- α hepáticos. Os animais do grupo H apresentaram piora nos parâmetros analisados, quando comparados aos animais dos grupos L, bem como com os demais grupos HIOG, HC, HB e HL, evidenciando assim a instalação do modelo de obesidade e resistência insulínica, acompanhado de estresse oxidativo e quadro inflamatório. Os camundongos tratados com iogurte enriquecido com curcumina (HC) ou licopeno (HL) apresentaram menor ganho de peso corporal e menor deposição de tecidos adiposos em relação ao grupo H, mostrando um importante papel destes ativos naturais na redução da adiposidade. Os animais dos grupos HIOG, HC, HL e HB também apresentaram menor acúmulo de TAG hepático. Os tratamentos com curcumina (HC), licopeno (HL) ou bixina (HB) também promoveram aumento nas atividades das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GSH-Px), e redução do biomarcador relacionado à lipoperoxidação (MDA). Os animais tratados com licopeno (HL) ou bixina (HB) apresentaram redução do biomarcador pró-inflamatório (TNF- α), quando comparados aos grupos HIOG e H. Além disso, o tratamento com licopeno (HL) também foi capaz de promover redução na resistência insulínica. A integração destes resultados nos permite concluir que os benefícios isolados ou combinados dos tratamentos com curcumina e carotenoides incorporados em iogurte substanciam as investigações e estimulam a necessidade em avançar nos estudos da utilização de misturas de ativos naturais, em especial aqueles que apresentam potencial antiaterogênico, anti-inflamatório e antioxidante, mitigando o risco cardiovascular.

Palavras-chave: diabetes mellitus, obesidade, estresse oxidativo, curcumina, licopeno, bixina.

ABSTRACT

The changes in lifestyle and in dietary structure of the current population lead to an excessive caloric intake and sedentary lifestyle, which can explain the epidemic proportions of obesity and diabetes mellitus (DM). DM is defined as a group of metabolic diseases characterized by hyperglycemia resulting from deficiency in the production and secretion of insulin by pancreatic beta cells and/or resistance to the insulin action in target tissues. The maintenance of hyperglycemia for long periods is a major factor in establishing the oxidative stress, which participates in the development of several impairments of diabetes, especially the microvascular and macrovascular complications. Many studies are demonstrating the effects of natural products on improving the hyperglycemia, oxidative stress, inflammatory status and the DM complications. Food matrices have been also explored as vehicle for natural actives, such as the yoghurt. In this context, we used two experimental models for assessing the effects of the treatments with curcumin, bixin or lycopene incorporated in yoghurt, isolated or in mixtures: *i*) type 1 DM induced by streptozotocin (STZ); *ii*) obesity/insulin resistance induced by high-fat (HF) diet. **Experiment I:** In DM model induced by STZ, male Wistar rats, normal (N) and diabetic (D, 40 mg/kg STZ, i.v.) animals, they were treated for 50 days, according to the following groups: NYOG and DYOG, treated with yoghurt; DINS, treated with insulin (4 U/day); DC, treated with 90 mg/kg curcumin; DB, treated with 5.5 mg/kg bixin; DCB, treated with 90 mg/kg curcumin and 5.5 mg/kg bixin; DL, treated with 45 mg/kg lycopene; DCL, treated with 90 mg/kg curcumin and 45 mg/kg lycopene. All natural compounds were administered with yoghurt. The following parameters were analyzed: *i*) physiological parameters: body weight, food and water intake, urinary volume, mass of epididymal and retroperitoneal white adipose tissues and *soleus* and *extensor digitorum longus* (EDL) skeletal muscles; *ii*) biochemical biomarkers in plasma, urine and tissues: glycemia, total cholesterol, HDL-cholesterol, triglycerides (TG), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), glycosuria, proteinuria and urinary urea, hepatic glycogen content; *iii*) plasma and tissue biomarkers of oxidative stress: thiobarbituric acid reactive substances (malondialdehyde, MDA), oxidized-LDL (ox-LDL), protein carbonyls (PCO), reduced glutathione (GSH) levels, and activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px). As expected, DYOG animals showed a worsening profile in all parameters studied during all the experimental period, while the treatment with insulin (DINS) was effective in improving all biomarkers changed by DM. The treatments of diabetic rats with curcumin, lycopene or bixin incorporated into yoghurt, alone, improved various parameters: physiological parameters (body weight and mass of adipose tissues and skeletal muscles), biochemical parameters (plasma levels of glucose, TG and total cholesterol were reduced); the activities of antioxidant enzymes (SOD and CAT) were increased; and oxidative stress biomarkers (MDA, PCO and oxLDL) were reduced, when compared with DYOG group. The treatments with isolated carotenoids (DL and DB) increased the HDL-cholesterol levels. The treatments with mixtures of curcumin and carotenoids (DCB or DCL) maintained all the beneficial effects of the individual treatments. In addition, the co-administration of curcumin and carotenoids promoted a combined effect in reducing the ox-LDL levels, and also maintained the carotenoids effects on the increase of HDL levels. **Experiment II:** In obesity/insulin resistance model, male mice (C57B1/6J) were divided randomly into 6 groups and they were treated for 8 weeks: L, low-fat diet and treated with water; H, high-fat diet and treated with water; HYOG, high-fat diet and treated with

yoghurt; HC high-fat diet and treated with 90 mg/kg curcumin; HB high-fat diet and treated with 5.5 mg/kg bixin; HL, high-fat diet and treated with 45 mg/kg lycopene. All natural compounds were administered into yoghurt and in isolated treatments. The following parameters were monitored: *i*) physiological parameters: body weight, body composition via NMR (fat tissue, lean mass and fluids), mass of adipose tissues and skeletal muscles, food intake, energy content of feces; *ii*) plasma biomarkers: glucose [monitoring of glucose homeostasis: insulin tolerance test (ITT) and oral glucose tolerance test (OGTT); fasting glycemia (6-h and 12-h fasting)], total cholesterol, triglycerides (TG), insulin (fasting insulin and insulin during TTGO), MDA levels; *iii*) tissue biochemical parameters: TG, MDA, CAT, SOD, GSH-Px, and *iv*) inflammatory biomarkers: liver IL-6 and TNF- α . Animals of H group had a worsening profile in all the parameters analyzed, when compared with animals of L group, as well as with the other groups HYOG, HC, HB and HL, thus showing the installation of the obesity and insulin resistance. Mice treated with yoghurt enriched with curcumin (HC) or lycopene (HL) had low weight gain and minor deposition of adipose tissues, when compared with H group, showing an important role of these natural compounds in reducing the adiposity in HF-fed mice. In addition, HYOG, HC, HL and HB groups also had a minor TG accumulation in liver. The treatment with curcumin (HC), lycopene (HL) or bixin (HB) also promoted an increase in the activities of the antioxidant enzymes (SOD, CAT and GSH-Px), and a decrease in the lipoperoxidation biomarker (MDA). Animals treated with lycopene (HL) or bixin (HB) showed a decrease in the inflammatory biomarker (TNF- α), when compared with HYOG and H groups. In addition, the treatment with lycopene (HL) was also able to promote a decrease in the insulin resistance. The integration of these findings allow us to conclude that the isolated and the combined effects of the treatments of curcumin and carotenoids incorporated in yoghurt substantiate the investigations and stimulate the need to advance in the studies on the use of mixtures of natural compounds, mainly those having antiatherogenic, anti-inflammatory and antioxidant potentials, mitigating the cardiovascular risk.

Keywords: diabetes mellitus, obesity, oxidative stress, curcumin, lycopene, bixin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas moleculares da curcumina em equilíbrio ceto-enólico	23
Figura 2. Estrutura química do licopeno.....	28
Figura 3. Estrutura química da bixina.....	29
Figura 4. Peso corporal (g) de ratos normais e ratos diabéticos tratados por 50 dias com curcumina e/ou bixina, e/ou licopeno, em iogurte	45
Figura 5. Glicemia (mg/dL) de ratos normais e ratos diabéticos tratados por 50 dias com curcumina e/ou bixina, e/ou licopeno, em iogurte	51
Figura 6. Glicogênio hepático (mg/%) de ratos normais e ratos diabéticos jejuados tratados por 50 dias com curcumina e/ou bixina, e/ou licopeno, em iogurte	55
Figura 7. Colesterol total (mg/dL) de ratos normais e ratos diabéticos tratados por 50 dias com curcumina e/ou bixina, e/ou licopeno, em iogurte	56
Figura 8. Colesterol-HDL (mg/dL) de ratos normais e ratos diabéticos tratados por 50 dias com curcumina e/ou bixina, e/ou licopeno, em iogurte	57
Figura 9. Triacilglicerol plasmático (mg/dL) de ratos normais e ratos diabéticos tratados por 50 dias com curcumina e/ou bixina, e/ou licopeno, em iogurte	58
Figura 10. Concentração de MDA ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) no fígado de ratos normais e ratos diabéticos tratados por 50 dias com curcumina e/ou bixina, e/ou licopeno, em iogurte	64
Figura 11. Concentração de MDA (μmol) no plasma de ratos normais e ratos diabéticos tratados por 50 dias com curcumina e/ou bixina, e/ou licopeno, em iogurte	64
Figura 12. Concentração de PCO ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) no fígado de ratos normais e ratos diabéticos tratados por 50 dias com curcumina e/ou bixina, e/ou licopeno, em iogurte	65
Figura 13. Concentração de LDL oxidada (ng/mL) no plasma de ratos normais e ratos diabéticos tratados por 50 dias com curcumina e/ou bixina, e/ou licopeno, em iogurte	66
Figura 14. Atividade da SOD (U/mg de proteína) no fígado de ratos normais e ratos diabéticos tratados por 50 dias com curcumina e/ou bixina, e/ou licopeno, em iogurte	67
Figura 15. Atividade da CAT (mmol/min/mg de proteína) no fígado de ratos normais e ratos diabéticos tratados por 50 dias com curcumina e/ou bixina, e/ou licopeno, em iogurte	69

Figura 16. Atividade da GSH-Px (mmol/min/mg de proteína) no fígado de ratos normais e ratos diabéticos tratados por 50 dias com curcumina e/ou bixina, e/ou licopeno, em iogurte	69
Figura 17. Concentração de GSH ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) no fígado de ratos normais e ratos diabéticos tratados por 50 dias com curcumina e/ou bixina, e/ou licopeno, em iogurte	70
Figura 18. Peso corporal (A) e ganho de peso corporal total (B) de camundongos alimentados com as dietas LF ou HF e tratados com curcumina, bixina ou licopeno, em iogurte, durante 8 semanas	76
Figura 19. Efeitos na composição corporal em camundongos alimentados com dieta LF ou HF, tratados com curcumina, bixina e licopeno, em iogurte durante 8 semanas	77
Figura 20. Ingestão alimentar e ingestão energética de camundongos alimentados com as dietas LF ou HF e tratados com curcumina, bixina ou licopeno, em iogurte, durante 8 semanas	78
Figura 21. Peso dos tecidos adiposos marrom e brancos de animais alimentados com as dietas LF ou HF, tratados com curcumina, bixina ou licopeno, em iogurte, durante 8 semanas	79
Figura 22. Conteúdo energético fecal e excreção energética fecal de animais alimentados com as dietas LF ou HF, tratados com curcumina, bixina ou licopeno, em iogurte, durante 8 semanas	81
Figura 23. Tolerância à insulina de camundongos alimentados com as dietas LF ou HF e tratados com curcumina, bixina ou licopeno, em iogurte, durante 8 semanas	83
Figura 24. Tolerância oral à glicose de camundongos alimentados com as dietas LF ou HF e tratados com curcumina, bixina ou licopeno, em iogurte, durante 8 semanas	85
Figura 25. Insulinemia durante o TTGO de camundongos alimentados com as dietas LF ou HF e tratados com curcumina, bixina ou licopeno, em iogurte, durante 8 semanas	87
Figura 26. Colesterol total plasmático (mg/dL) de camundongos alimentados com as dietas LF ou HF e tratados com curcumina, bixina ou licopeno, em iogurte, durante 8 semanas.....	88
Figura 27. Triacilglicerol plasmático (mg/dL) de camundongos alimentados com as dietas LF ou HF e tratados com curcumina, bixina ou licopeno, em iogurte, durante 8 semanas.....	89
Figura 28. Triacilglicerol hepático (mg/dL /g de tecido) de camundongos alimentados com as dietas LF ou HF e tratados com curcumina, bixina ou licopeno, em iogurte, durante 8 semanas.....	90

Figura 29. Níveis de fator de necrose tumoral- α (pg/mL) no fígado de camundongos alimentados com as dietas LF ou HF e tratados com curcumina, bixina ou licopeno, em iogurte, durante 8 semanas	91
Figura 30. Níveis de interleucina-6 (pg/mL) no fígado de camundongos alimentados com as dietas LF ou HF e tratados com curcumina, bixina ou licopeno, em iogurte, durante 8 semanas	91
Figura 31. Níveis de MDA (μ mol/g de tecido) no fígado de camundongos alimentados com as dietas LF ou HF e tratados com curcumina, bixina ou licopeno, em iogurte, durante 8 semanas	92
Figura 32. Níveis de MDA (μ mol) plasmático de camundongos alimentados com as dietas LF ou HF e tratados com curcumina, bixina ou licopeno, em iogurte, durante 8 semanas	93
Figura 33. Atividade da SOD (U/mg de proteína) no fígado de camundongos alimentados com as dietas LF ou HF e tratados com curcumina, bixina ou licopeno, em iogurte, durante 8 semanas	94
Figura 34. Atividade da CAT (mmol/min/mg de proteína) no fígado de camundongos alimentados com as dietas LF ou HF e tratados com curcumina, bixina ou licopeno, em iogurte, durante 8 semanas	95
Figura 35. Atividade da GSH-Px (mmol/min/mg de proteína) no fígado de camundongos alimentados com as dietas LF ou HF e tratados com curcumina, bixina ou licopeno, em iogurte, durante 8 semanas	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das dietas controle/normocalórica (LF) e hiperlipídica/ hipercalórica (HF)	40
Tabela 2. Parâmetros fisiológicos: consumo de ração (g/12h), ingestão hídrica (mL/24h), volume urinário (mL/24h) de animais normais, diabéticos não tratados e tratados com curcumina e/ou bixina, e/ou licopeno, incorporados em iogurte, durante 50 dias	48
Tabela 3. Peso dos músculos esqueléticos e tecidos adiposos brancos de animais normais, diabéticos não tratados e tratados com curcumina e/ou bixina, e/ou licopeno, incorporados em iogurte, durante 50 dias	49
Tabela 4: Glicosúria (mg/24h) e uréia urinária (mg/24h) de animais normais, diabéticos tratados e tratados com curcumina e/ou bixina, e/ou licopeno, incorporados em iogurte, durante 50 dias	52
Tabela 5. Atividades das enzimas ALT, AST e ALP (U/L) em plasma de animais normais, diabéticos não tratados e tratados com curcumina e/ou bixina, e/ou licopeno, incorporados em iogurte, durante 50 dias	62
Tabela 6. Peso (g) de músculos esqueléticos e tecidos de animais alimentados com as dietas LF ou HF e tratados com curcumina, bixina ou licopeno, em iogurte, durante 8 semanas	80

LISTA DE ABREVIATURAS

AGE	<i>Advanced Glycation End Products</i>
AGL	Ácidos Graxos Livres
ALP	Fosfatase Alcalina
ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
AUC	Área sob a curva
CAT	Catalase
CETP	Enzima Transferidora de Ésteres de Colesterol
DM	Diabetes Mellitus
DNPH	2,4-Dinitrofenilhidrazina
DTNB	5,5-Ditio-2-Nitrobenzoico
EDL	<i>Extensor Digitorum Longus</i>
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EPM	Erro Padrão da Média
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
GLUT4	Transportador de Glicose do Tipo 4
GR	Glutationa Redutase
GSH	Glutationa Reduzida
GSH-Px	Glutationa Peroxidase
GSSH	Glutationa Oxidada
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HF	<i>High-fat</i>
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IL-6	Interleucina-6
ITT	Teste de Tolerância à Insulina
LCAT	Lecitina Colesterol Acil Transferase
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LF	<i>Low-fat</i>
LHS	Lipase Hormônio Sensível

LPL	Lipase Lipoproteica
MDA	Malondialdeído
NADPH	Adenina Dinucleotídeo Fosfato na Forma Reduzida
NBT	<i>Nitroblue Tetrazolium</i>
PCO	Proteínas Carboniladas
PON1	Paraoxonase 1
PPAR- γ	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SOD	Superóxido Dismutase
STZ	Estreptozotocina
TAG	Triacilgliceróis
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- α
TTGO	Teste de Tolerância à Glicose Oral
TZD	Tiazolidinedionas
VLDL	Lipoproteína de Densidade Muito Baixa
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

Capítulo 1.....	16
1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Justificativa.....	17
1.2 Revisão de literatura.....	19
1.2.1 Diabetes mellitus.....	19
1.2.2 Estresse oxidativo e diabetes mellitus.....	22
1.2.3 Curcumina e diabetes mellitus.....	23
1.2.4 Carotenoides e diabetes mellitus.....	26
1.2.4.1 Licopeno.....	27
1.2.4.2 Bixina.....	28
2. OBJETIVOS.....	30
2.1 Objetivo geral.....	30
2.2 Objetivos específicos.....	30
2.2.1 Modelo experimental de diabetes mellitus tipo 1 (DM1).....	30
2.2.2 Modelo experimental de obesidade/resistência insulínica.....	31
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Experimento 1: Avaliação das alterações fisiológicas e bioquímicas de ratos normais e diabéticos tratados com curcumina e carotenoides, isolados e em misturas, incorporados ao iogurte.....	31
3.1.1 Animais.....	31
3.1.2 Indução do DM experimental.....	32
3.1.3 Tratamento de animais diabéticos com iogurte enriquecido com curcumina, bixina ou licopeno, isolados e em misturas.....	32
3.1.4 Determinações analíticas.....	35
3.1.4.1 Biomarcadores do metabolismo de carboidratos, lipídeos e função hepática e renal.....	35
3.1.4.2 Biomarcadores relacionados ao estresse oxidativo	36
3.1.4.2.1 Preparo das amostras.....	36
3.1.4.3 Biomarcadores relacionados à atividade antioxidante.....	37
3.1.4.3.1 Preparo das amostras.....	37
3.1.5 Análise Estatística.....	38

3.2 Experimento 2: Avaliação das alterações fisiológicas e bioquímicas de camundongos submetidos ao modelo de obesidade/resistência insulínica, tratados com curcumina, licopeno e bixina isolados, incorporados ao iogurte.....	38
3.2.1 Homeostase da glicose.....	41
3.2.2 Determinações analíticas.....	42
3.2.2.1 Biomarcadores do metabolismo lipídico.....	42
3.2.2.2 Biomarcadores relacionados à avaliação da defesa antioxidante endógena e biomarcadores inflamatórios.....	42
3.2.3 Análise Estatística.....	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.1 Experimento 1 : Avaliação das alterações fisiológicas e bioquímicas de ratos normais e diabéticos tratados com curcumina e carotenoides, isolados e em misturas, incorporados ao iogurte.....	43
4.1.1 Parâmetros fisiológicos de ratos diabéticos tratados com curcumina e/ou bixina e/ou licopeno.....	44
4.1.2 Parâmetros bioquímicos de ratos diabéticos tratados com curcumina e/ou bixina e/ou licopeno.....	49
4.1.3 Biomarcadores relacionados ao estresse oxidativo e atividade antioxidante de ratos diabéticos tratados com curcumina e/ou bixina e/ou licopeno	63
4.2 Experimento 2: Avaliação das alterações fisiológicas e bioquímicas de camundongos submetidos ao modelo de obesidade/resistência insulínica, tratados com curcumina, licopeno e bixina isolados, incorporados ao iogurte.....	74
4.2.1 Parâmetros fisiológicos de camundongos submetidos às dietas LF ou HF e tratados com curcumina, bixina ou licopeno, em iogurte, durante 8 semanas.....	75
4.2.2 Parâmetros bioquímicos de camundongos submetidos às dietas LF e HF, e tratados com curcumina, bixina ou licopeno, em iogurte, durante 8 semanas.....	81
4.2.3 Parâmetros relacionados ao estado inflamatório, estresse oxidativo e atividade antioxidante de camundongos submetidos à dieta LF e HF, e tratados com curcumina, bixina e licopeno, em iogurte, durante 8 semanas.....	90
5. CONCLUSÃO.....	96
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
Capítulo 2.....	111
Artigo: Combined effects of curcumin and lycopene or bixin in yoghurt on inhibition of the LDL oxidation and the increase in HDL levels in streptozotocin-diabetic rats.	113

ANEXOS

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

1.1 Justificativa

O diabetes mellitus (DM) é uma das doenças crônicas mais comuns na maioria dos países, tornando-se um dos principais problemas de saúde pública. Os dados da Federação Internacional de Diabetes (IDF, *International Diabetes Federation*) mostraram que, em 2015, esta síndrome afetou mais de 415 milhões de indivíduos no mundo e a estimativa para 2040 é que o DM acometa mais de 642 milhões de indivíduos (IDF DIABETES ATLAS, 2015). A Organização Mundial de Saúde (WHO, *World Health Organization*) relatou que, em 2002, o DM já se encontrava entre as dez principais causas de mortalidade no Brasil (WHO, 2006; SHAW; SICREE; ZIMMET, 2010).

O DM é definido como um grupo de doenças metabólicas caracterizado principalmente por hiperglicemia resultante de prejuízos na produção e secreção de insulina pelas células beta pancreáticas e/ou resistência às ações da insulina em tecidos alvo (BROWNLEE, 2001; PICKUP; WILLIAMS, 2003; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015).

Diversas alterações metabólicas evidentes no DM, em especial a hiperglicemia, acarretam em aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), bem como em diminuição nas defesas antioxidantes endógenas (JAY; HITOMI; GRIENGLING, 2006). Prejuízos associados à hiperglicemia crônica e ao estresse oxidativo têm relação direta com o desenvolvimento das diversas complicações micro e macrovasculares relacionadas ao DM (MADONNA; DE CATERINA, 2011; FORBES; COOPER, 2013).

A presença de compostos biologicamente ativos nos fitoterápicos e alimentos funcionais explicam o seu potencial na prevenção, redução de riscos e/ou tratamento de doenças. Esteroides vegetais, fibras, alcaloides, carotenoides e polifenóis são exemplos de ativos naturais que possuem um amplo espectro de atividades biológicas importantes no combate a doenças (PERERA; LI, 2012; PAZ et al., 2015). Vários estudos têm sido realizados com extratos, frações e/ou compostos derivados de alimentos ou plantas medicinais com o objetivo de esclarecer seu potencial anti-hiperglicêmico, permitindo que seu uso possa ter importância como terapia adjuvante no DM (KARTHIKESAN; PARI; MENON, 2010; GUTIERRES et al., 2012).

Cresce a cada dia o consumo de matrizes alimentares enriquecidas com ativos naturais derivados de alimentos funcionais e/ou plantas medicinais, com o intuito de promover a saúde; dentre as matrizes alimentares utilizadas para este fim, destacam-se o leite e seus derivados (em especial o iogurte), produtos de panificação, óleos e margarinas, barras de cereais ou de chocolate, bebidas com baixo teor de gordura, entre outros (GAHRUIE et al., 2015). Impulsionados por este crescente consumo, diversos estudos têm se dedicado na comprovação da eficácia biológica de alimentos enriquecidos com bioativos na promoção à saúde, especialmente na prevenção e tratamento de doenças (GUTIERRES et al., 2012; LESINSKI et al., 2015; BRÜLL et al., 2016), bem como na compreensão das propriedades físico-químicas destas preparações (GONZÁLEZ-FERRERO; SÁIZ-ABAJO, 2015) e na determinação da biodisponibilidade destes bioativos em alimentos enriquecidos/fortificados (REIN et al., 2013). A ingestão de alimentos enriquecidos com compostos bioativos e seus possíveis riscos (toxicidade/reações adversas à saúde devido ao elevado consumo, perda da função devido à geração de isômeros não ativos após o processamento do alimento) também têm sido considerados (DWYER et al., 2015).

O iogurte é um dos alimentos lácteos mais consumidos em todo o mundo, é uma excelente fonte de proteína, cálcio, fósforo, zinco, riboflavina, tiamina, vitamina B12, folato e niacina. Seu consumo tem aumentado por motivos que vão além de suas propriedades organolépticas e valor nutricional; diminuição na absorção intestinal e nos níveis circulantes de colesterol (ANDERSON; GILLILAND, 1999), redução da obesidade e outros fatores de risco cardiovascular (ASTRUP, 2014) e melhoria no sistema imune (ASHRAF; SHAH, 2014) são alguns dos benefícios atribuídos ao consumo diário de iogurte, que pode ser considerado um alimento funcional. Também crescem as evidências epidemiológicas que relacionam a ingestão diária de iogurte com a redução na incidência do DM tipo 2 (STRUIJK et al., 2013; CHEN et al., 2014; WISE, 2014).

Além disso, devemos considerar uma das definições de *nutracêuticos*, descrita por Stephen DeFelice, como “*alimento, ou partes de alimentos, que fornecem benefícios médicos ou de saúde, incluindo a prevenção e tratamento da doença*”, (BROWER, 1998; MORAES e COLLA (2006), também descreveram alimentos funcionais como “*alimentos enriquecidos com compostos (ativos), naturais ou não, com propriedades potencialmente funcionais, além das nutricionais*”. De acordo com a Resolução nº18, de 30 de abril de 1999 (ANVISA), considera-se alegação de propriedade funcional “*aquela relativa ao papel metabólico ou*

fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano; o alimento ou ingrediente que alegar propriedades funcionais ou de saúde pode, além de funções nutricionais básicas, quando se tratar de nutriente, produzir efeitos metabólicos e ou fisiológicos e ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica”.

Além de todos estes benefícios acima descritos, e considerando ser o produto lácteo fermentado mais consumido mundialmente, o enriquecimento/fortificação do iogurte tem sido considerado uma opção prática como veículo de compostos bioativos de outros alimentos funcionais, plantas medicinais ou antioxidantes (GAHRUIE et al., 2015).

Neste contexto torna-se importante investigar a suplementação do iogurte com pigmentos naturais como a curcumina, licopeno e bixina, em administrações isoladas ou em misturas no tratamento de modelos experimentais do diabetes e da obesidade/resistência insulínica.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 Diabetes mellitus

O DM é uma doença crônica caracterizada por distúrbios no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas devido à deficiência relativa ou absoluta na produção e secreção de insulina pelas células beta pancreáticas e/ou ao aumento na resistência à insulina em tecidos alvo, especialmente músculo esquelético, tecido adiposo e fígado (DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009; BROWNLEE, 2001).

A hiperglicemia crônica é uma das principais causas das inúmeras complicações microvasculares relacionadas ao DM, como por exemplo, retinopatias, nefropatias e neuropatias, e também das complicações macrovasculares, em especial as formações ateroscleróticas (SHARMA; KULKARNI; CHOPRA, 2006; ELIZA; DAISY; IGNACIMUTHU, 2009; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015). Além da hiperglicemia, outros sintomas relacionados ao DM são: poliúria, polidipsia, polifagia, cetonúria, poliastenia, proteinúria, elevação da ureia urinária, dislipidemia e aumento na atividade sérica de determinadas enzimas hepáticas (BALLAS; ALVES; DUARTE, 2006).

De forma geral, o DM pode ser classificado em 4 tipos: DM tipo 1, DM tipo 2, DM gestacional, e outros tipos de DM tais como: diabetes monogênica (p.ex. diabetes neonatal e

MODY (*maturity-onset diabetes of the young*), doenças de pâncreas exócrino (p.ex. fibrose cística), e diabetes induzido por drogas ou produtos químicos (p.ex. tratamento de HIV/AIDS ou após transplante de órgãos) (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015).

Descrito em cerca de 5-10% dos casos, o DM tipo 1 é resultado da destruição das células beta pancreáticas mediada na grande maioria das vezes por processos de autoimunidade, levando conseqüentemente à deficiência na produção e secreção de insulina (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015). A maioria dos indivíduos que possuem DM tipo 1 apresenta determinada susceptibilidade gênica para a expressão de auto-anticorpos contra células beta pancreáticas (BELL; HORITA; KARAM, 1984; MCPHERSON et al., 2011), como por exemplo anticorpos anti-insulina, anticorpos contra a isoforma de 65 KDa da descarboxilase do ácido glutâmico (GAD65) e antígenos associados ao insulinoma 1A-2A (KELLY; RAYNER; BARNETT, 2003; MEHERS; GILLESPIE, 2008). Em alguns indivíduos com DM tipo 1, não é observada auto-imunidade destrutiva das células pancreáticas, apesar da deficiência de insulina ser observada, sendo estes indivíduos então classificados como DM tipo 1 idiopático (TANNUS et al., 2007; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015). Acredita-se que o principal fator de risco para o desenvolvimento do DM tipo 1 seja a susceptibilidade genética (MEHERS; GILLESPIE, 2018), no entanto esta patologia também pode apresentar-se associada a infecções virais prévias e deficiência de vitamina D (KELLY; RAYNER; BARNETT, 2003; BUSTA; ALFONSO; PORETSKY, 2011). Estudos recentes demonstraram que bactérias são capazes de se deslocarem do intestino e chegar até o linfonodo pancreático; subseqüentemente esse fato desencadeia uma resposta pró-inflamatória com ativação da proteína NOD2 (*nucleotide-binding oligomerization domain containing 2*), a qual vai contribuir com a destruição das células beta pancreáticas (COSTA et al., 2016).

O DM tipo 2 acomete cerca de 350 milhões de indivíduos no mundo, sendo caracterizado por uma menor responsividade dos tecidos à insulina (resistência tecidual à insulina), a qual acarretará em secreção compensatória de insulina (hiperinsulinemia compensatória), até o momento em que ocorre disfunção das células beta pancreáticas; a combinação entre resistência insulínica e disfunção pancreática configura-se no DM tipo 2 (PICKUP; WILLIAMNS, 2003). Obesidade e sobrepeso são importantes fatores de risco para o desenvolvimento de diversas doenças crônicas, incluindo o DM tipo 2 (HENRY; CHILTON; GARVEY, 2013). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a prevalência

da obesidade dobrou entre 1980 e 2014, quando quase 2 bilhões de adultos apresentavam sobrepeso e mais de 600 milhões destes já tinham obesidade (WHO, 2015).

A obesidade é definida como um desequilíbrio entre a ingestão de energia proveniente da dieta e o gasto energético, o qual gera um acúmulo excessivo de gordura nos tecidos adiposos e pode ser prejudicial à saúde. As principais causas de obesidade são o consumo excessivo de produtos com alta densidade energética e alto teor de açúcares e gorduras saturadas, além de estilo de vida com falta de atividade física (WHO, 2015; SAMPLE et al., 2015). A ingestão excessiva de alimentos participa no aumento de liberação de insulina, que exerce estímulo tanto à lipogênese quanto ao armazenamento de lipídeos trazidos por lipoproteínas, conseqüentemente ocorre o acúmulo de gorduras nos tecidos adiposos, o qual é responsável pelo aumento na liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6). O aumento no armazenamento de gorduras nos tecidos adiposos brancos, em especial os estoques intra-abdominais, também está relacionado ao aumento na liberação de ácidos graxos livres (AGL) na circulação, que participam via lipotoxicidade no estabelecimento de resistência à insulina em tecidos como musculatura esquelética e fígado (PAULI, 2011; PRADA; SAAD, 2011).

Dentre outras alterações metabólicas presentes no DM, podemos citar o comprometimento do perfil lipídico. Os elevados níveis circulantes de colesterol podem ser explicados por alguns eventos, tais como: aumento na produção da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), culminando em aumento nos níveis da lipoproteína de baixa densidade (LDL), rica em colesterol; diminuição da atividade dos receptores de LDL, em decorrência da queda dos níveis de insulina (RIFAI; WARNICK, 2006). É comum também no diabetes a ocorrência de aumento nos níveis séricos de triacilgliceróis (TAG), que pode também ser explicado, além dos motivos acima descritos, pela queda na atividade da lipase lipoproteica (LPL), enzima responsável pela retirada dos TAG de quilomícron e VLDL, uma vez que a atividade desta enzima é estimulada pela insulina; assim, a hipertrigliceridemia é um quadro comum em indivíduos diabéticos. Portanto, o metabolismo das lipoproteínas em indivíduos diabéticos encontra-se alterado, pois a insulina exerce efeitos importantes sobre a atividade das lipases. Em paralelo à deficiência de insulina e queda na atividade da LPL, a lipase hormônio sensível (LHS) estará ativada, uma vez que esta é inibida pela insulina, ocasionando a hidrólise dos TAG nos adipócitos, contribuindo para a diminuição de peso

corporal e aumento nos níveis circulantes de AGL, um dos principais substratos que leva ao aumento na cetonemia no diabetes (RIFAI; WARNICK, 2006).

A queda nos níveis séricos da lipoproteína de alta densidade (HDL) também é observada em situação de deficiência insulínica, e ocorre como consequência da menor velocidade de síntese desta lipoproteína e do aumento na atividade da lipase hepática, com isso há uma metabolização aumentada de HDL (LUDKE; LÓPEZ, 1999).

Dentro deste contexto, é importante ressaltar que o DM está associado à aterosclerose precoce e acelerada; assim, os indivíduos diabéticos apresentam uma maior predisposição aos eventos cardiovasculares, com um risco 2 a 4 vezes maior para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares em relação aos indivíduos não diabéticos (KAPLAN; AVIRAM; HAYEK, 2012). A hiperglicemia tem sido citada como responsável por acelerar a aterosclerose pela indução da disfunção endotelial, aumento da inflamação, aumento na geração de produtos finais de glicação avançados (AGE, *advanced glycation end products*), maior produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), que por sua vez levam à extensa oxidação lipídica e proteica da LDL. O aumento na geração de LDL-oxidada é acompanhado pelo aumento na formação de células espumosas, evento inicial do processo aterosclerótico (MAZZONE; CHAIT; PLUTZKY, 2008).

1.2.2 Estresse oxidativo e diabetes mellitus

A geração excessiva de ERO em decorrência à hiperglicemia está associada ao desenvolvimento das complicações crônicas do DM, devido ao desequilíbrio pró-oxidante/antioxidante, em um estado denominado estresse oxidativo (BANDEIRA et al., 2013).

O estresse oxidativo descrito no DM pode ser desencadeado por vários mecanismos, a destacar: *i*) excesso de oxidação da glicose, e assim aumento no fluxo de substratos pela cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, por tecidos que captam este monossacarídeo da corrente sanguínea por mecanismo independente de insulina, como por exemplo rins, endotélio vascular, retina, fígado; *ii*) formação de AGE e *iii*) aumento no fluxo de substrato pela via dos polióis, culminando no aumento excessivo da geração de ERO e perda da proteção antioxidante, como por exemplo glutatona reduzida (GSH). Assim, o estresse oxidativo em condições hiperglicêmicas está postulado como uma das principais causas das

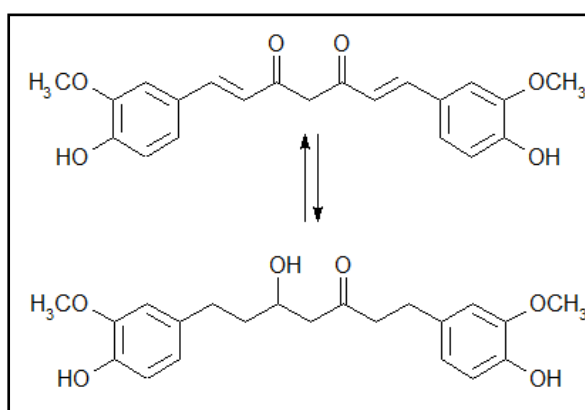
complicações crônicas associadas ao DM e a obesidade, resultando em aumento da morbidade e mortalidade dos indivíduos diabéticos (NEWSHOLME et al., 2007; MADONNA; DE CATERINA, 2011; BANDEIRA et al., 2013; FORBES; COOPER, 2013).

O efeito das ERO é equilibrado pela ação de sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, os quais têm como função a remoção destas espécies, podendo assim proteger o organismo. Tem sido relacionado ao estabelecimento do estresse oxidativo no DM, a atividade diminuída de enzimas antioxidantes, tais como: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GSH-Px), bem como redução nos níveis de GSH (SINDHU et al., 2004).

1.2.3 Curcumina e diabetes mellitus

Dentre os ingredientes funcionais que possuem efeitos benéficos à saúde, pode-se citar a curcumina (diferuloilmetano, Figura 1), um pigmento amarelo isolado dos rizomas da *Curcuma longa* L. (*turmeric*), amplamente cultivada na Índia e no Sudeste Asiático (PANDEY; GRUPTA; SRIVASTAVA, 2011; GUPTA; KISMALI; AGGARWAL, 2013); também é utilizada em vários alimentos, principalmente aqueles condimentados com açafrão-da-terra e *curry* (GOEL; KUNNUMAKKARA; AGGARWAL, 2008). Em países asiáticos, a cúrcuma (açafrão) é amplamente utilizada na dieta como especiaria. Além disso, a medicina tradicional indiana e chinesa tem usado a cúrcuma para o tratamento de diversas doenças (GUPTA; KISMALI; AGGARWAL, 2013). A curcumina tem sido citada como o principal fitoquímico responsável pelos efeitos benéficos à saúde da cúrcuma.

Figura 1: Estruturas moleculares da curcumina em equilíbrio ceto-enólico (adaptado de ZHANG et al., 2013)



A curcumina tem sido amplamente investigada, e alguns estudos têm demonstrado seus efeitos benéficos e pleiotrópicos, ou seja, sobre várias doenças crônicas, tais como DM, doenças biliares, problemas hepáticos, reumatismo, sinusite, câncer e doença de Alzheimer (PARI; MURUGAN, 2007; PANDEY; GRUPTA; SRIVASTAVA, 2011; GUTIERRES et al., 2012). Possui também ação anti-inflamatória (BALASUBRAMANYAM et al., 2003) e ação antioxidante, impedindo a peroxidação lipídica, protegendo assim biomoléculas de danos oxidativos (FUJISAWA et al., 2004; AK; GULÇIN, 2008).

Alguns estudos indicaram que, mesmo em doses altas, o tratamento com curcumina não levou à toxicidade, tanto em animais (100 mg/kg/dia) (QURESHI et al., 1992) quanto em humanos (12 g/dia) (LAO et al., 2006). Portanto, a segurança e eficácia farmacológicas tornam a curcumina um composto promissor para o tratamento de várias doenças.

Em relação ao DM, desde os primeiros estudos que demonstraram ser a curcumina capaz de diminuir a glicemia em indivíduos diabéticos (SRINIVASAN; BERENSON; RADHAKRISHNAMURTHY, 1970). A literatura relata diversas investigações mostrando evidências das ações benéficas do pigmento no tratamento do DM e outras doenças metabólicas. A atividade antidiabética da curcumina tem sido observada em diferentes modelos de DM em animais (KURODA et al., 2005; SEO et al., 2008; GUTIERRES et al., 2012) e seu efeito anti-hiperglicêmico tem sido atribuído a diversos mecanismos: estimulação da captação de glicose pela musculatura esquelética (KIM et al., 2010), inibição da produção hepática de glicose pela gliconeogênese (FUJIWARA et al., 2008), aumento na secreção de insulina (ABDEL AZIZ et al., 2010), melhoria na intolerância a glicose e sensibilidade a insulina, as quais foram associadas com o aumento dos níveis de fosforilação de AKT e translocação de GLUT4 em músculo esquelético *gastrocnemius* (GUTIERRES et al., 2015). Recentemente, tem sido demonstrado que alguns dos benefícios da curcumina contra os sintomas do DM estão relacionados ao seu potencial antioxidante (YU et al., 2012; MENG et al., 2013; ARCARO et al., 2014).

Embora existam várias atividades biológicas atribuídas a curcumina, sua baixa biodisponibilidade quando administrada oralmente em animais (PAN; HUANG; LIN, 1999) e humanos (VAREED; KAKARALA; RUFFIN, 2008) é um fator limitante para a aprovação de seu uso clínico. A baixa biodisponibilidade da curcumina pode ser explicada pela sua baixa absorção devido à sua baixa solubilidade em água, distribuição tecidual limitada, e rápida velocidade de biotransformação no fígado e intestino, seguida de rápida excreção. Portanto, a

baixa biodisponibilidade da curcumina é um dos principais obstáculos (postulado como atingir níveis circulantes adequados às ações farmacodinâmicas, e conseqüentemente atingir sua eficácia terapêutica). Em função disso, vários veículos têm sido testados, como nanopartículas (SHAIK et al., 2009), lipossomas (CHEN et al., 2009), micelas (LETCHEFORD; LIGGINS; BURT, 2007), complexos de fosfolípidos (MAITI et al., 2007); associação com adjuvantes que tenham atividade de *bioenhancers* tal como a piperina (SHOBA et al., 1998; ARCARO et al., 2014).

Associando o potencial antidiabético da curcumina e a possibilidade do uso do iogurte como veículo para a administração de fitoterápicos, Gutierrez et al. (2012) investigou as alterações fisiológicas e bioquímicas de ratos diabéticos (induzidos por estreptozotocina) tratados com iogurte enriquecido com curcumina, em diversas doses (30, 60 e 90 mg/kg de peso corporal), durante 31 dias. O tratamento de ratos diabéticos com 90 mg/kg de curcumina foi capaz de melhorar diversos parâmetros clássicos relacionados ao DM, em especial redução significativa dos níveis de glicose, triacilgliceróis (TAG), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), glicosúria, uréia urinária, proteinúria e um aumento do conteúdo de glicogênio hepático.

Mais recentemente, Gutierrez et al. (2015) também observou que a atividade antidiabética da curcumina está relacionada, pelo menos em parte, ao aumento na captação de glicose, uma vez que ratos diabéticos tratados com 90 mg/kg de curcumina incorporada em iogurte e submetidos à sobrecarga oral de glicose apresentaram maior eficiência na redução da hiperglicemia e aumento na translocação dos transportadores de glicose do tipo 4 (GLUT4) na musculatura esquelética, associado ao aumento observado na ativação de AKT (fosforilação em serina-473), um intermediário da sinalização da insulina.

Com o objetivo de aumentar as ações benéficas da curcumina no DM, Arcaro et al. (2014) investigou as atividades antidiabética e antioxidante *in vivo* da curcumina (90 mg/kg) co-administrada com piperina (20 e 40 mg/kg), um *bioenhancer* que aumenta a biodisponibilidade de vários fármacos (incluindo a curcumina) via inibição de processos de biotransformação no fígado e intestino. O tratamento de ratos diabéticos com iogurte enriquecido com curcumina + 20 mg/kg de piperina não mudou as atividades antidiabética e antioxidante da curcumina. Surpreendentemente, os efeitos benéficos da curcumina co-administrada com 40 mg/kg de piperina a ratos diabéticos foram anulados; esta co-administração mostrou-se inclusive tóxica, considerando que ratos diabéticos tratados com 90

mg/kg de curcumina + 40 mg/kg de piperina apresentaram níveis plasmáticos de ALT maiores em relação aos animais diabéticos tratados com veículo. Estas evidências de que a co-administração de curcumina e piperina não trouxeram vantagens aos efeitos biológicos da curcumina, pelo menos em relação às atividades antidiabética e antioxidante, indicam que devem estar relacionadas a um ou mais metabólitos da curcumina. Tal evidência foi recentemente reiterada pelo perfil farmacocinético da curcumina em ratos diabéticos, confirmando que sua biodisponibilidade é extremamente baixa após administração oral (GUTIERRES et al., 2015).

1.2.4 Carotenoides e diabetes mellitus

Os carotenoides são considerados os pigmentos mais comuns na natureza, com cerca de 600 diferentes compostos nesta classe, com destaque para o beta-caroteno (OLSON; KRINSKY, 1995). Os carotenoides são responsáveis pela coloração vermelha, laranja e amarela de diversas partes de plantas (folhas, frutos e flores) e algas, bem como pela coloração de pássaros, insetos, crustáceos e peixes que se alimentam de plantas ou microorganismos sintetizadores destes pigmentos. Somente plantas, bactérias, fungos e algas podem sintetizar os carotenoides, no entanto aos animais podem incorporar esses pigmentos via alimentação.

Nas plantas, a presença dos carotenoides é essencial como um mecanismo de proteção contra processos foto-oxidativos. Todavia, os carotenoides também atuam como antioxidantes em animais, e por este motivo diversos estudos epidemiológicos têm investigado correlação existente entre o aumento no consumo de dietas ricas em carotenoides e a redução do risco de desenvolvimento de diversas doenças, tais como câncer, doenças cardiovasculares e distúrbios metabólicos. Os efeitos benéficos à saúde promovidos pelos carotenoides têm sido atribuídos a sua capacidade antioxidante, protegendo células e tecidos contra os danos oxidativos (SIES; STAHL, 1995).

Todos os carotenóides são caracterizados por uma estrutura poli-isoprenóide, que corresponde a uma longa cadeia carbônica de duplas ligações conjugadas e certa simetria bilateral ao redor de uma dupla ligação central (BRITTON, 1995). O que diferencia quimicamente os carotenoides são basicamente modificações na estrutura básica como resultado de ciclização dos grupos terminais e introdução do oxigênio, que atribuem a estes

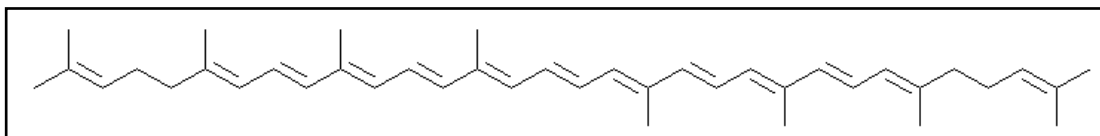
compostos suas características relacionadas à cor e suas propriedades antioxidantes (STAHL; SIES, 2003). Devido à presença de duplas ligações conjugadas, os carotenoides podem sofrer isomerização *cis/trans*. Embora isômeros *trans* sejam mais comumente encontrados nos alimentos e sejam mais estáveis, pouco se sabe sobre o significado biológico da isomerização de carotenoides para a saúde humana. Os carotenoides são compostos lipofílicos que tendem a se acumular em ambientes de natureza lipídica, tais como bicamadas lipídicas em membranas biológicas, lipoproteínas e tecidos adiposos. A lipofilicidade destes pigmentos influencia sua absorção, transporte e excreção do organismo (STAHL; SCHWARZ; SIES, 1993).

Considerando a importância do estresse oxidativo no desenvolvimento das complicações do DM, é crescente o interesse pela exploração de opções terapêuticas para doenças que promovam benefícios nos distúrbios observados no metabolismo de carboidratos e lipídeos, bem como também opções que sejam efetivas no tratamento efetivo contra o estresse oxidativo. Existem evidências de que a concentração de carotenoides no soro de pacientes com DM tipo 2 é inversamente proporcional ao prejuízo observado do metabolismo de carboidratos (COYNE et al., 2005). Recentemente, Sluijs e colaboradores (2016) relataram os efeitos de carotenoides em misturas (luteína com zeaxantina) ou carotenoides combinados com outros antioxidantes naturais (licopeno com ácido ascórbico e/ou α -tocoferol) na prevenção de complicações relacionadas com distúrbios metabólicos. Neste sentido, ganha importância a compreensão dos benefícios que carotenoides podem trazer à saúde de indivíduos diabéticos.

1.2.4.1 Licopeno

O licopeno é um pigmento natural sintetizado por algumas plantas e microrganismos, está presente principalmente em tomate e em produtos processados a partir do tomate, bem como em outras frutas como melancia, mamão, goiaba e toranja. Após sua absorção, os carotenoides se acumulam nos tecidos e moléculas são encontradas em líquidos humanos, como por exemplo, lipoproteínas do plasma (RAO; AGARWAL, 2000; PALOZZA et al., 2012). Quimicamente, o licopeno é um carotenoide isômero acíclico do β -caroteno, altamente insaturado (Figura 2).

Figura 2: Estrutura química do licopeno (adaptado de PALOZZA et al., 2012).



Dada à importância do envolvimento das ERO na patogênese de várias doenças crônicas, é válido ressaltar que o licopeno é um potente antioxidante (SIES; STAHL, 1995), agindo na prevenção da carcinogênese e aterogênese, uma vez que é capaz de proteger biomoléculas, tais como lipídeos, proteínas e DNA das ações destas espécies (AGARWAL; RAO, 1998; RAO, 2002); também tem sido empregado para o tratamento de outras doenças crônicas, tais como osteoporose e DM. Dentre outras propriedades do licopeno, destacam-se seus potenciais: neuroprotetor, antiproliferativo, anti-inflamatório e hipocolesterolêmico (KUHAD; SHARMA; CHOPRA, 2008).

Em estudo recente realizado por Bayramoglu; Bayramoglu; Senturk (2013), investigou-se o efeito do licopeno suspenso em azeite de oliva, administrado por via oral (sonda intragástrica) durante 7 dias, na dose de 2,5 mg de licopeno/kg de peso corporal, em ratos diabéticos e não diabéticos; foi observado que este carotenoide promoveu diversos benefícios no diabetes, tais como diminuição nos níveis de glicose e aumento nos níveis séricos de insulina, e também diminuição nos níveis de colesterol total, TAG e nas atividades séricas de ALT e AST.

Zhu; Wang; Xu (2011) relataram que o tratamento de ratos diabéticos com licopeno em óleo de milho (10, 30 e 60 mg/kg/dia) durante 30 dias, foi capaz de atenuar a disfunção endotelial e o estresse oxidativo, uma vez que ocorreu diminuição dos níveis de LDL-oxidada, aumento na atividade da SOD e nos níveis de óxido nítrico (NO).

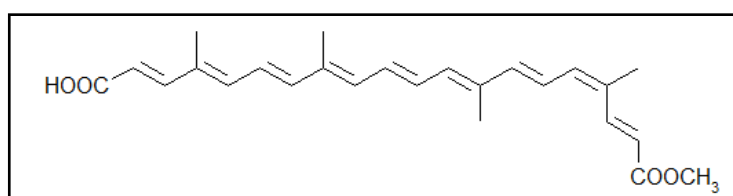
1.2.4.2 Bixina

O urucum (*Bixa orellana* L.) pertence à família Bixacea, uma árvore tropical, nativa da América Central e do Sul; é usado na medicina popular para tratar várias doenças, tais como doenças parasitárias, inflamatórias e hemorragias (PAUMGARTTEN; DE-CARVALHO; ARAÚJO, 2002; FERREIRA et al., 2013). O Brasil é um dos maiores produtores e

exportadores das sementes e extratos de urucum. As sementes do urucum têm importância comercial, pois é no pericarpo que estão os pigmentos, os quais possuem ampla aplicação industrial como corantes de alimentos, fármacos e cosméticos (CHISTÉ, 2011).

A bixina (metil-hidrogênio 9'-*cis*-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato, Figura 3) é o principal pigmento presente nas sementes do urucum, correspondendo a 80% dos carotenoides no urucum, sendo o responsável pela coloração laranja-avermelhada das sementes e extratos. A bixina é usada como corante em cosméticos e alimentos (manteiga, queijo, produtos de panificação, óleo, sorvete, cereal, salsicha).

Figura 3: Estrutura química da bixina (adaptado de TOCCHINI e MERCADANTE, 2001).



Estudos têm demonstrado o efeito benéfico da bixina com redução da hiperlipidemia em coelhos; dentre outros carotenoides e flavonoides, a bixina foi a mais eficiente na redução do colesterol e manutenção de níveis colesterol-HDL mais elevados (LIMA et al., 2001).

Ferreira et al. (2013) investigaram o efeito do extrato aquoso de sementes de *Bixa orellana* em tratamento agudo de camundongos com hiperlipidemia induzida por Triton WR-1339, e os autores observaram redução nos níveis séricos de triglicerídeos e colesterol total, até mesmo reversão da hipertrigliceridemia, demonstrando assim o efeito hipolipidêmico do extrato. Contudo, existem poucos estudos sobre a investigação dos benefícios deste carotenoide em DM, especialmente sobre seu efeito sobre o metabolismo de carboidratos e no combate ao estresse oxidativo.

Estudos recentes realizados por Gutierrez et al. (2012) e Arcaro et al. (2014) demonstraram a importância dos benefícios trazidos pelo tratamento de animais diabéticos com pigmentos incorporados ao iogurte. Assim, torna-se importante avançar em estudos utilizando o iogurte como veículo para administração de produtos naturais e/ou fitoterápicos isolados ou associados, para tratamento do DM, em especial realizando associações de