

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA**



Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicada à Farmácia

**ATIVIDADE ANTIDIABÉTICA, EM MODELO *IN VIVO*, DA CURCUMINA
ADMINISTRADA EM SUSPENSÃO DE IOGURTE NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA
DE PIPERINA**

CARLOS ALBERTO ARCARO FILHO

PROF. DR. IGUATEMY LOURENÇO BRUNETTI

Araraquara, SP
Junho de 2014

CARLOS ALBERTO ARCARO FILHO

**ATIVIDADE ANTIDIABÉTICA, EM MODELO *IN VIVO*, DA CURCUMINA
ADMINISTRADA EM SUSPENSÃO DE IOGURTE NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA
DE PIPERINA**

Dissertação de Mestrado 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” campus de Araraquara como parte dos requisitos para o título de mestre em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia. Área de concentração: Bioquímica

ORIENTADOR: PROF. DR. IGUATEMY LOURENÇO BRUNETTI

Araraquara, SP
Junho de 2014

Ficha Catalográfica

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

- A668a Arcaro Filho, Carlos Alberto
Atividade antidiabética, em modelo in vivo, da curcumina administrada em suspensão de iogurte na ausência e na presença de piperina / Carlos Alberto Arcaro Filho. – Araraquara, 2014
129 f.
- Dissertação (Mestrado) – 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
1. Diabetes Mellitus. 2. Curcumina. 3. Piperina. 4. Iogurte. 5. Atividade antidiabética. 6. Estresse oxidativo. I. Brunetti, Iguatemy Lourenço, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

**ATIVIDADE ANTIDIABÉTICA, EM MODELO *IN VIVO*, DA CURCUMINA
ADMINISTRADA EM SUSPENSÃO DE IOGURTE NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA
DE PIPERINA**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti
Orientador e Presidente da Comissão Examinadora

Profa. Dra. Fernanda Mani
Membro Titular

Prof. Dr. Fábio Erminio Mingatto
Membro Titular

Dissertação de Mestrado 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 mestre 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.

Fomento: Bolsa Capes – Mestrado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pela vida, por estar sempre no meu caminho me abençoando, iluminando e guiando em tudo o que tenho feito.

Aos meus pais Carlos Alberto Arcaro e Geni Peres Torres, e aos meus pais postíços Claudio Torres (padrasto) e Katia Critina Tales de Oliveira Arcaro (madrasta) que foram à base de tudo pra mim, apoiando-me nos momentos difíceis com força, confiança, amor, ensinando-me a persistir nos meus objetivos e ajudando a alcançá-los e sempre orando por mim nos momentos que precisava.

Aos meus irmãos Hugo Arcaro Neto, Thais Tales de Oliveira Coutinho, Giovana Tales de Oliveira Coitinho e meu pequenininho Daniel Tales Arcaro pela companhia, carinho e momentos de descontração vividos a cada dia, que nos ajudaram a superar as diferenças e viver por todos estes anos.

Em especial agradeço ao meu Orientador Prof Dr Iguatemy Lourenço Brunetti, que foi um orientador extraordinário durante os dois anos e meio de convivência. Agradeço muitíssimo a paciência, a competência, os conselhos, as piadas, o apoio e o aprendizado.

Agradeço a Profa Dra Amanda Martins Baviera, pela “co-orientação”, por ter me ajudado desde os experimentos, nas padronizações de metodologias, na análise dos dados, na escrita do trabalho. Foram apenas um ano e meio de convivência, mais esteve sempre presente em todos os momentos e disposta a me ajudar e ensinar.

Agradeço as minhas companheiras de laboratório Vânia Ortega Gutierrez e Renata Pires de Assis, pelos momentos felizes, tristes, as brincadeiras, as risadas, mais principalmente pela amizade. Por terem me ajudado desde o dia que entrei pela primeira vez no Laboratório e principalmente me ajudaram nos momentos mais difíceis durante o mestrado.

Agradeço a Thais Fernanda Moreira por apoiar e ajudar com os experimentos e as alunas de iniciação científica (Bianca Varotto, Juliana Oriel de Oliveira, Viviane Bonifacio e Daniela Roxo), uma por mais tempo outras por menos tempo de convivência, mais foram bons momentos que passamos juntos.

Agradeço a todos aqueles que durante minha vida me ensinaram de uma maneira ou de outra como é bom viver ao lado de pessoas amadas.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIÇÕES

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1DIABETES MELLITUS	1
1.2FISIOPATOLOGIA DO DM TIPO 1	2
1.3DIABETES E ESTRESSE OXIDATIVO	5
1.4CURCUMINA E PIPERINA.....	8
2. OBJETIVOS	14
2.1 GERAL	14
2.2 ESPECÍFICOS.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 EQUIPAMENTOS	15
3.2 SAIS E REAGENTES	15
3.3 ANIMAIS	16
3.4 INDUÇÃO DO DIABETES MELLITUS EXPERIMENTAL	16
3.5 TRATAMENTO CRÔNICO DE ANIMAIS DIABÉTICOS COM CURCUMINA, PIPERINA E ASSOCIAÇÕES	16
3.6PRINCIPIOS METODOLÓGICOS DAS DOSAGENS BIOQUÍMICAS	18
3.6.1 Glicemia, método da glicose-oxidase.....	18
3.6.2 Colesterol total, método da colesterol oxidase	17
3.6.3 Triacilglicerol, método enzimático de reações acopladas	17
3.6.4 Colesterol-HDL, método indireto por inibição seletiva	18
3.6.5 Alanina aminotransferase (ALT), método cinético UV	18
3.6.6 Aspartato aminotransferase (AST), método cinético no UV.....	18
3.6.7 Fosfatase alcalina (ALP), método colorimétrico.....	19
3.6.8 Ureia urinária, método da urease.....	19
3.6.9 Proteinúria, método de Bradford modificado	20
3.6.10 Glicosúria, método da orto-toluidina.....	20

3.7 BIOMARCADORES RELACIONADOS AO ESTRESSE OXIDATIVO	21
3.7.1 Malondialdeído (MDA) no plasma e fígado:	21
3.7.2 Proteínas carboniladas (PCO).....	22
3.7.3 Glutathione reduzida (GSH).....	23
3.5.4 Atividade da catalase (CAT)	24
3.5.5 Atividade da Glutathione peroxidase (GPx).....	24
3.5.6 Atividade da superóxido dismutase (SOD)	25
3.5.7 Proteínas Totais.....	26
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
4. RESULTADOS	28
4.1. PARÂMETROS FISIOLÓGICOS DE RATOS DIABÉTICOS TRATADOS COM CURCUMINA, PIPERINA E ASSOCIAÇÕES	28
4.2. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE RATOS DIABÉTICOS TRATADOS COM CURCUMINA, PIPERINA E ASSOCIAÇÕES	36
4.3 PARÂMETROS RELACIONADOS AO ESTRESSE OXIDATIVO	55
5. DISCUSSÃO	62
6. CONCLUSÃO.....	71
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
ANEXO I – CARTA DE APROVAÇÃO PELO CEUA	92

CAPITULO 2

1.COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DE ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO ..	93
2.ARTIGO	94

RESUMO

Estudos anteriores demonstraram que o tratamento de ratos diabéticos com 90 mg de curcumina/kg de peso corporal (pc) incorporada ao iogurte, durante 31 dias, melhorou diversos parâmetros fisiológicos e bioquímicos alterados no diabetes, em relação aos animais diabéticos tratados somente com água ou iogurte. Contudo, a baixa biodisponibilidade da curcumina tem estimulado a investigação de alternativas para melhorar seu efeito farmacológico. Também tem sido demonstrado que a piperina promove aumento na biodisponibilidade de determinados fármacos, quando co-administrados por via oral, inclusive da própria curcumina. O objetivo deste estudo foi investigar as atividades antidiabética e antioxidante da curcumina (90 mg/kg pc) isoladamente ou em associações com piperina (20 ou 40 mg/kg pc) incorporada em iogurte, em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ). Ratos machos (10 animais/grupo) em modelo de diabetes estreptozotocínico foram tratados por via oral durante 45 dias com: iogurte (DIOG); com insulina (4U/dia, DINS, via subcutânea); 90 mg de curcumina/kg pc incorporada em iogurte (DC90), 20 ou 40 mg de piperina/kg pc (DP20 e DP40, respectivamente) e associações de 90 mg de curcumina/kg pc e 20 ou 40 mg de piperina/kg pc (DC90P20 e DC90P40, respectivamente). Os parâmetros fisiológicos: peso corporal, consumo de ração, ingestão hídrica e volume urinário e parâmetros bioquímicos: glicemia, glicosúria, ureia urinária e proteinúria foram analisados semanalmente, enquanto os parâmetros relacionados ao perfil lipídico (triacilgliceróis, colesterol total e colesterol-HDL) e de função hepática (ALT, AST e ALP) foram analisados quinzenalmente. Após a eutanásia, também foram removidos e pesados os músculos esqueléticos *soleus* e *extensor digitorum longus* (EDL); e os tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal e ainda o fígado foi retirado para determinação da atividade de enzimas antioxidantes e de marcadores de estresse oxidativo. O tratamento de ratos diabéticos com curcumina incorporada em iogurte promoveu melhora significativa de todos os parâmetros alterados no modelo experimental de diabetes, tais como parâmetros fisiológicos obtidos em gaiolas metabólicas, glicemia, dislipidemia, marcadores de disfunção hepática e renal. Também houve proteção contra o estresse oxidativo, com aumento na atividade das enzimas antioxidantes e diminuição na concentração de malondialdeído e proteínas carboniladas,

contudo todas estas melhorias promovidas pela curcumina não tiveram a mesma magnitude da resposta observada nos ratos diabéticos tratados com insulina. Surpreendentemente, a piperina, na menor dose, promoveu melhorias em alguns parâmetros fisiológicos, bioquímicos e de estresse oxidativo no diabetes. O tratamento de ratos diabéticos com iogurte suplementado com a associação de curcumina e 20mg de piperina/kg pc não apresentou efeitos similares em relação àqueles observados no grupo tratado apenas com curcumina; no entanto a associação de curcumina e 40 mg/kg piperina anulou todos os efeitos benéficos promovidos pela curcumina. Além disso, os níveis plasmáticos de ALT encontraram-se aumentados no grupo DC90P40, sendo até mesmo maiores em relação aos valores observados no grupo DIOG, tratado apenas com iogurte. O conjunto de dados permite-nos o registro de que no diabetes experimental, tanto a curcumina quanto a piperina, quando administradas isoladamente, apresentaram atividades antidiabética e antioxidante, contudo as associações de curcumina e piperina, nas doses estudadas, não mostraram nenhum benefício adicional àqueles observados no tratamneto com a curcumina isolada; e ainda que a associação de curcumina e a dose maior de piperina foi prejudicial ao diabetes, com toxicidade hepática e esses efeitos podem ser atribuídos à toxicidade da associação e/ou à falta de redução da hiperglicemia.

ABSTRACT

Previous studies showed that the treatment of diabetic rats with 90 mg of curcumin/kg body weight (bw) incorporated into yoghurt, for 31 days, improved several physiological and biochemical parameters altered in diabetes, compared to diabetic animals treated only with water or yoghurt. However, the low bioavailability of curcumin has stimulated the research of alternatives to improve its pharmacological effect. It has also been shown that piperine promotes an increase in the bioavailability of certain drugs when co-administered orally, including curcumin. The aim of this study was to investigate the antidiabetic and antioxidant activities of curcumin (90 mg/kg bw) alone or in combination with piperine (20 or 40 mg/kg bw) incorporated into yoghurt in diabetic rats induced by streptozotocin (STZ). Male rats (10 animals/group) under streptozotocin diabetes model were orally treated for 45 days with: yoghurt (DYOG); insulin (4U/day, DINS, subcutaneously); 90 mg/kg curcumin incorporated into yoghurt (DC90), 20 or 40 mg/kg piperine (DP20 and DP40, respectively) associations of 90 mg of curcumin/kg bw and 20 or 40 mg of piperine/kg bw (DC90P20 and DC90P40, respectively) and The physiological parameters: body weight, food and water intake and urinary volume, and the biochemical parameters: glycemia, glycosuria, proteinuria and urinary urea were analyzed weekly, while the parameters related to lipid profile (triglycerides, total cholesterol and HDL-cholesterol) and liver function (ALT, AST and ALP) were analyzed at every 15 days. After euthanasia, it were removed and weighed the skeletal muscles soleus and *extensor digitorum longus* (EDL) and the epididymal and retroperitoneal white adipose tissues; liver was also removed to determine the activity of antioxidant enzymes and the levels of oxidative stress biomarkers. The treatment of diabetic rats with curcumin incorporated into yoghurt improved all parameters related to this experimental model of diabetes, such as the physiological parameters obtained in metabolic cages, glycemia, dyslipidemia, and biomarkers of hepatic and renal dysfunction. There was also an improvement in the oxidative stress, with increase in the activity of antioxidant enzymes and decrease in the levels of malondialdehyde and protein carbonyls groups, however all these improvements did not reach the response observed in diabetic rats treated with insulin. Surprisingly, the treatment of diabetic rats with piperine, at the lowest dose, improved some physiological, biochemical and oxidative stress parameters altered in diabetes. The

treatment of diabetic rats with the association of curcumin and 20mg/kg piperine did not provide any additional benefit when compared to those observed in the treatment with curcumin alone; however, the association of curcumin with 40mg/kg piperine abrogated all the beneficial effects promoted by curcumin alone. Furthermore, the plasma ALT levels were increased in DC90P40group, reaching values even increased in comparison those observed in DYOG group, treated only with yoghurt. Thus, it can be observed that, in the experimental diabetes, curcumin and piperine, when administered alone, had antidiabetic and antioxidant activities. However, the association of curcumin with the minor dose of piperine showed no additional benefit to that observed with curcumin alone; furthermore, the association of curcumin with the highest dose of piperine had detrimental consequences to diabetes, with increased levels of biomarkers of liver toxicity, which can be attributed to the direct toxicity of this association and/or to the lack of hyperglycemia correction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas moleculares da curcumina	9
Figura 2: Esquema proposto dos processos de metabolização de fase I e fase II da curcumina quando administrada por via oral em ratos.....	11
Figura 3: Estrutura molecular da piperina.....	12
Figura 4: Fluxograma experimental do tratamento crônico de ratos diabéticos com curcumina, piperina e associações.....	19
Figura 5: Curva analítica de glicose.....	20
Figura 6: Reação entre o ácido 2-tiobarbitúrico e o malondialdeído.....	21
Figura 7: Curvas analíticas de 1,1'3,3'-tetrametoxipropano no espectofotometro (A) e Fluorímetro (B).....	22
Figura 8: Reação dos grupos carbonila com 2,4-dinitrofenilhidrazina	23
Figura 9: Reação de glupamentos sulfidrilas com DTNB.....	23
Figura 10: Curva analítica de GSH	24
Figura 11: Ciclo da glutatona.....	25
Figura 12: Mecanismo de inibição da redução do NBT pela SOD.....	26
Figura 13: Curva analítica de albumina bovina.....	27
Figura 14: Peso corporal (g) de ratos diabéticos tratados por 45 dias com curcumina, piperina e associações curcumina + piperina, em iogurte..	29
Figura 15: Consumo de ração (g/24h) de ratos diabéticos tratados por 45 dias com curcumina, piperina e associações curcumina + piperina, em iogurte.	32
Figura 16: Ingestão hídrica (mL/24h) de ratos diabéticos tratados por 45 dias com curcumina, piperina e associações curcumina + piperina, em iogurte	33
Figura 17: Volume urinário (mL/24h) de ratos diabéticos tratados por 45 dias com curcumina, piperina e associações curcumina + piperina, em iogurte	34
Figura 18: Glicemia (mg/dL) de ratos diabéticos tratados por 45 dias com curcumina, piperina e associações curcumina + piperina, em iogurte.	39
Figura 19: Glicosúria (mg/24h) de ratos diabéticos tratados por 45 dias com curcumina, piperina e associações curcumina + piperina, em iogurte.	40
Figura 20: Triacilglicerol (mg/dL) de ratos diabéticos tratados por 45 dias com curcumina, piperina e associações curcumina + piperina, em iogurte.	41
Figura 21: Colesterol Total (mg/dL) de ratos diabéticos tratados por 45 dias com curcumina, piperina e associações curcumina + piperina, em iogurte.	43

Figura 22: Colesterol-HDL (mg/dL) de ratos diabéticos tratados por 45 dias com curcumina, piperina e associações curcumina + piperina, em iogurte.	44
Figura 23: Atividade da ALT (U/L) de ratos diabéticos tratados por 45 dias com curcumina, piperina e associações curcumina + piperina, em iogurte.	47
Figura 24: Atividade da AST (U/L) de ratos diabéticos tratados por 45 dias com curcumina, piperina e associações curcumina + piperina, em iogurte.	48
Figura 25: Atividade da ALP (U/L) de ratos diabéticos tratados por 45 dias com curcumina, piperina e associações curcumina + piperina, em iogurte.	50
Figura 26: Ureia urinária (mg/24h) de ratos diabéticos tratados por 45 dias com curcumina, piperina e associações curcumina + piperina, em iogurte.	52
Figura 27: Proteinúria (mg/24h) de ratos diabéticos tratados por 45 dias com curcumina, piperina e associações curcumina + piperina, em iogurte.	54
Figura 28: Concentração de MDA ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) no fígado de ratos diabéticos tratados por 45 dias com curcumina, piperina e associação curcumina + piperina, em iogurte.....	56
Figura 29: Concentração de MDA (μmol) plasmático de ratos diabéticos tratados por 45 dias com curcumina, piperina e associação curcumina + piperina, em iogurte.....	56
Figura 30: Efeito Concentração de PCO ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) no fígado de ratos diabéticos tratados por 45 dias com curcumina, piperina e associação curcumina + piperina, em iogurte.....	57
Figura 31 Concentração de GSH ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) no fígado de ratos diabéticos tratados por 45 dias com curcumina, piperina e associação curcumina + piperina, em iogurte.....	58
Figura 32: Atividade da SOD (U/mg de proteína) no fígado de ratos diabéticos tratados por 45 dias com curcumina, piperina e associação curcumina + piperina, em iogurte. .	59
Figura 33: Atividade da CAT (mmol/min/mg de proteína) no fígado de ratos diabéticos tratados por 45 dias com curcumina, piperina e associação curcumina + piperina, em iogurte.....	60
Figura 34 Atividade da GPx (mmol/min/mg de proteína) no fígado de ratos diabéticos tratados por 45 dias com curcumina, piperina e associação curcumina + piperina, em iogurte.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Peso dos músculos esqueléticos e tecidos adiposos brancos de animais diabéticos não tratados e tratados com curcumina, piperina e associações durante 45 dias.....	36
---	----

LISTA DE ABREVIACÕES

$^1\text{O}_2$	-	Oxigênio singlete
$\bullet\text{OH}$	-	Radical hidroxila
ADA	-	<i>American Diabetes Association</i>
AGE	-	Produtos de glicação não-enzimática
AGL	-	Ácidos graxos livres
ALP	-	Fosfatase alcalina
ALT	-	Alanina aminotransferase
AMPK	-	Proteína quinase dependente de AMP
AST	-	Aspartato aminotransferase
ATP	-	Adenosina trifosfato
AUC	-	Área sob a curva
CAT	-	Catalase
CEUA	-	Comitê de Ética no Uso de Animais
DAG	-	Diacylglicerol
DHC	-	Dihidrocurcumina
DM	-	Diabetes mellitus
EDL	-	<i>Extensor digitorum longus</i>
ERRO	-	Espécies reativas de oxigênio
F1,6Pase	-	Frutose 1,6-bifosfatase
G6Pase	-	Glicose-6-fosfatase
GAD65	-	Anticorpo contra a isoforma de 65 KDa de descarboxilase do ácido glutâmico
GLUT2	-	Transportador de glicose do tipo 2
GLUT4	-	Transportador de glicose do tipo 4
GPx	-	Glutathione peroxidase
GR	-	Glutathione reductase
GSH	-	Glutathione na forma reduzida
GSSG	-	Glutathione na forma oxidada
H_2O_2	-	Peróxido de hidrogênio
HDL-colesterol	-	<i>High-density lipoprotein</i>
HHC	-	Hexahidrocurcumina

IAA	-	Anticorpo anti-insulina
ICA	-	Anticorpo anti-ilhota pancreática
IDF	-	<i>International Diabetes Federation</i>
LDH	-	Lactato desidrogenase
LDL	-	<i>Low-density lipoprotein</i>
LHS	-	Lipase hormônio sensível
LpL	-	Lipase lipoproteica
LPO	-	Peroxidação lipídica
MDA	-	Malondialdeído
NADH	-	Nicotinamida adenina dinucleotidio na forma reduzida
NADPH	-	Nicotinamida adenina dinucleotidio fosfato na forma reduzida
NBT	-	<i>Nitroblue tetrazolium</i>
NOO•	-	Peróxido nitrito
O ₂ ^{•-}	-	Ânion superóxido
OHC	-	Octahidrocurcumina
Pc	-	Peso corporal
PCO	-	Proteínas carboniladas
PEPCK	-	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PKC	-	Proteína quinase C
SOD	-	Superóxido dismutase
TAG	-	Triacilglicerol
THC	-	Tetrahidrocurcumina
VLDL	-	<i>Very low-density lipoprotein</i>

1. INTRODUÇÃO

1.1 DIABETES MELLITUS

O diabetes mellitus (DM) é uma doença crônica caracterizada por distúrbios no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas devido à deficiência na produção de insulina pelo pâncreas e/ou ao aumento na resistência à insulina em tecidos periféricos, principalmente no fígado, músculo esquelético e tecido adiposo, causando prejuízos na captação de glicose e aumento dos níveis hepáticos de glicose (OLOFSSON; MARLUND; BEHNDIG, 2009). Segundo a *American Diabetes Association* (ADA), o DM é classificado em dois tipos principais: o DM tipo 1 e o DM tipo 2 (ADA, 2010; SIDDIQUI et al., 2013).

O DM tipo 1 é caracterizado pela deficiência na produção e secreção de insulina nas células beta do pâncreas e seu diagnóstico é frequentemente acompanhado por sintomas agudos de desidratação e cetoacidose. A hiperglicemia causa a maioria dos prejuízos metabólicos observados no DM tipo 1, que ocorrem como resultados de um complexo processo que envolvem também fatores genéticos e ambientais concomitante a uma resposta auto-imune que leva à destruição das células beta pancreáticas (DAVIES et al., 1994; MAŁECKI; SKUPIEŃ, 2008; KEENAN et al., 2010; FORBES; COOPER, 2013; SIDDIQUI et al., 2013).

O DM tipo 2 desenvolve-se como resultado da combinação entre fatores genéticos e ambientais, especialmente relacionados ao estilo de vida caracterizado pela ingestão de dietas hipercalóricas e pelo sedentarismo (MAŁECKI; SKUPIEŃ, 2008; ARSA, 2009; FORBES; COOPER, 2013; SIDDIQUI et al., 2013). Nesta forma da doença, a resistência tissular periférica à insulina e a hipersecreção compensatória precedem o declínio da função secretória das ilhotas pancreáticas, também conhecida como disfunção pancreática. Os tecidos que desenvolvem resistência periférica à insulina incluem, principalmente, músculo esquelético, fígado e tecido adiposo, o que resulta em hiperglicemia, produto da falta de captação de glicose pelo músculo e tecido adiposo, processo estimulado pela insulina, e do aumento da produção de glicose via a glicogenólise (quebra do glicogênio hepático) e gliconeogênese (produção hepática de glicose), ambos inibidos pela insulina. Além disso, a resistência periférica à insulina

promove também diversos outros prejuízos ao metabolismo lipídico e proteico nestes tecidos (ADA, 2010; SIDDIQUI et al., 2013).

Segundo a *International Diabetes Federation* (IDF), a prevalência do DM no mundo, para o ano de 2013 e prevista para 2035, mostra valores alarmantes: sendo em 2013 mais de 382 milhões de pessoas já foram diagnosticadas com DM e a projeção para 2035 é que este número aumente para 592 milhões (IDF, 2014). Inúmeros países, nos últimos anos, reconhecem o DM como um problema de saúde pública, pois além dos diversos danos à saúde dos pacientes, o crescente número de indivíduos acometidos pela doença leva a graves repercussões sócio-econômicas, tais como mortes prematuras, incapacidade para o trabalho, altos custos relacionados ao seu controle e ao tratamento de suas complicações. Embora verifique-se sua alta prevalência, a maioria dos indivíduos acometidos pelo DM não está em tratamento adequado e, portanto exposta ao risco de suas complicações crônicas (BATISTA; MONTEIRO, 2006).

1.2. FISIOPATOLOGIA DO DM TIPO 1

O DM tipo 1 em geral é causado por processo auto-imune que leva à destruição das células beta pancreáticas. A maioria dos indivíduos com DM tipo 1 desenvolve anticorpos anti-ilhota pancreática (ICA), anti-insulina (IAA), anticorpo contra a isoforma de 65 KDa da descarboxilase do ácido glutâmico (GAD65) e antígenos associados ao insulinoma 1A-2A (TANNUS et al. 2007; LEU; ZONSZEIN, 2010).

A insulina é um hormônio anabólico que participa da regulação do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. No metabolismo de carboidratos, o hormônio é responsável por: i) aumentar a translocação de vesículas contendo transportadores de glicose do tipo 4 (GLUT4), do citoplasma para a membrana plasmática de adipócitos e miócitos, promovendo aumento da captação de glicose tissular; ii) aumentar a fosforilação da glicose, pela glicoquinase/hexoquinase, produzindo glicose-6-fosfato, que poderá ser oxidada para produzir adenosina trifosfato (ATP); iii) estimular da glicogênese, ativando a glicogênio sintase e a formação dos estoques de glicogênio; iv) inibir a transcrição de genes de enzimas que participam da gliconeogênese, tais como a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), frutose 1,6 bifosfatase (F1,6Pase) e glicose-6-fosfatase (G6Pase) (KAHN; SALTIEL, 2005). Esses mecanismos promovem

tanto aumento na captação e utilização da glicose bem como redução na produção hepática de glicose, e conseqüentemente participam na manutenção da glicemia.

No metabolismo lipídico, a insulina é responsável por: i) estimular a síntese e ativação da lipase lipoproteica (LpL) no endotélio vascular dos tecidos adiposos e musculares, e assim promove a hidrólise dos triacilgliceróis (TAG) das lipoproteínas circulantes e aumenta a captação de ácidos graxos; ii) inibir a lipase hormônio sensível (LHS), presente no tecido adiposo, e responsável pela hidrólise de TAG, disponibilizando ácidos graxos livres (AGL) (KAHN; SALTIEL, 2005).

No metabolismo de proteínas, a insulina é responsável por: i) inibir a degradação de proteínas, liberando menos aminoácidos pelos tecidos; ii) aumentar a captação de aminoácidos pelos tecidos, iii) aumentar a velocidade da síntese proteica (STAMP; NAIR, 2005).

A falta de insulina, como ocorre no DM tipo 1, promove varias alterações metabólicas, tanto em modelos experimentais quanto em pacientes diabéticos, como por exemplo: hiperglicemia, dislipidemia caracterizada principalmente por aumento nas concentrações de TAG e redução nas concentrações do colesterol da *high-density lipoprotein* (colesterol-HDL), aumento nas concentrações urinárias de glicose e ureia, perda de peso apesar do aumento do consumo de alimentos (hiperfagia), aumento do volume urinário (poliúria) e da ingestão hídrica (polidipsia), (FELIG; BERGMAN, 1995).

No DM tipo 1, devido à redução nas concentrações de insulina, a hiperglicemia ocorre principalmente como consequência da falta de captação de glicose pelos tecidos periféricos, como por exemplo tecido adiposo e músculo esquelético. Contudo, o aumento na produção hepática de glicose via glicogenólise e gliconeogênese também contribui para a elevação na glicemia (FELIG; BERGMAN, 1995). Quando a glicemia atinge valores acima de 180 mg/dL, que representa o limiar de reabsorção renal, a glicose excedente é eliminada pela urina, configurando a glicosúria (FELIG; BERGMAN, 1995; GANNONG, 2006).

A poliúria comumente observada no DM tipo 1 é proveniente do aumento na excreção de glicose, ureia, amônia, e entre outros solutos pela urina, com excreção conjunta de água, que pode levar a um quadro de desidratação (FELIG; BERGMAN, 1995). No DM é observada uma alta ingestão de líquidos (polidipsia) como consequência da poliúria, bem como do aumento na osmolaridade plasmática devido à

hiperglicemia e elevação da concentração plasmática de outros anabolitos e catabolitos. Este aumento da osmolaridade promove desidratação celular, pois a água migra do meio intracelular para o extracelular a fim de manter a homeostase. A alteração na pressão osmótica age via osmorreceptores, localizados no hipotálamo, e estimula a sede intensa nestes indivíduos (FELIG; BERGMAN, 1995; GUYTON & HALL, 1996).

A perda de peso observada em pacientes com DM tipo 1 pode ter como fator desencadeante a falta das ações anabólicas da insulina, pois a falta do hormônio é responsável por: i) ativação da LHS por fosforilação, levando à lipólise, com diminuição na massa de tecido adiposo; ii) inibição na captação de glicose pelo tecido adiposo, além de inibição da síntese e exposição de LpL no endotélio vascular, com prejuízo na formação de estoques de TAG neste tecido; iii) ativação da proteólise muscular, com perda de massa muscular; iv) inibição da captação de aminoácidos pelo tecido muscular, bem como queda na velocidade de síntese proteica, culminando com redução da massa muscular esquelética (FELIG; BERGMAN, 1995; STUMP; NAIR, 2005).

O aumento do consumo de alimentos que ocorre no DM tipo 1 é atribuído a distúrbios nos processos de regulação da fome no centro da saciedade, localizado no núcleo hipotalâmico ventro-medial, que é regulado pela ação da insulina em seus receptores específicos (FELIG; BERGMAN, 1995; JACOBSON, 1996; FIGLEWICZ; SIPOLS, 2010).

O aumento da ureia urinária no DM tipo 1 é explicado pela alteração no metabolismo de proteínas, a qual se manifesta por consequência do: i) aumento na velocidade de proteólise, ii) redução na velocidade de síntese proteica, iii) redução na captação de aminoácidos pelos tecidos. Aumento na concentração de aminoácidos livres leva a maior oferta de substratos para a gliconeogênese hepática, que utiliza a cadeia carbônica dos aminoácidos para a síntese de glicose; já o grupo amino, se não for reaproveitado para a síntese de outros compostos orgânicos aminados, deve ser excretado na forma de ureia, produzida principalmente pelo fígado e excretada através da urina (SACKS, 2006).

No DM tipo 1, o metabolismo das lipoproteínas também encontra-se alterado. Devido à deficiência de insulina, a LHS encontra-se fosforilada e ativa, promovendo hidrólise dos TAG armazenados nos adipócitos, com a elevação dos AGL para serem utilizados como fonte de energia; todavia, o aumento na oferta de AGL no fígado

culmina em aumento na produção de acetil-CoA, que não consegue ingressar no ciclo de Krebs para serem oxidados devido à demanda aumentada de oxalacetato para a gliconeogênese hepática (BARONE, et al., 2007); assim, este excesso de acetil-CoA nos hepatócitos é utilizado na cetogênese, processo que está estimulado devido à falta de inibição exercida pela insulina; os corpos cetônicos serão liberados para a corrente sanguínea, contribuindo para o estabelecimento do quadro de acidose metabólica, uma das complicações agudas mais importantes do DM tipo 1 (BARONE et al., 2007).

A ausência de insulina também promove diminuição na síntese, exposição para o endotélio e ativação da LpL, prejudicando a captação dos TAG transportados pelas lipoproteínas (principalmente quilomicra e *very low-density lipoprotein*, VLDL), e o aumento das lipoproteínas circulantes e aumento do risco das doenças cardiovasculares nos indivíduos com DM (RIFAI & WARNICK, 2006).

1.3 DIABETES E ESTRESSE OXIDATIVO

Inúmeras evidências demonstram ser a hiperglicemia no DM, responsável por distúrbios no equilíbrio de processos metabólicos pró-oxidantes/antioxidantes, com diversos efeitos deletérios ao indivíduo, uma condição denominada estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010; ABDOLLAHI et al., 2004; ACHESON, 2010; BANDEIRA et al., 2013).

Os agentes pró-oxidantes mais importantes são as espécies reativas de oxigênio (ERO), de nitrogênio (ERN) e de enxofre (ERS): estas espécies podem ser tóxicas a homeostase celular. Dentre as principais ERO temos o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila ($\bullet OH$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete ($^1O_2$) e o ácido hipocloroso ($HOCl/OCl^{\bullet}$), enquanto que a importante ERN é o peroxidonitrito ($NOO^{\bullet}$) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010).

Os níveis de ERO estão em equilíbrio com o sistema de defesa antioxidante, o qual inclui como principais defesas: i) antioxidantes endógenos de baixo peso molecular como os carotenóides, flavonóides, bilirrubina, ácido úrico e tióis como a glutatona (GSH), ou exógenos obtidos da dieta como o ácido ascórbico e o α -tocoferol, carotenóides e flavonoides capazes de capturar diversas ERO; ii) proteínas ligantes de metais tais como a transferrina e a haptoglobina, que diminuem a disponibilidade de

metais com ação catalítica em reações produtoras de ERO; iii) sistemas multienzimáticos responsáveis pela remoção/desativação das ERO (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010).

Dentre os componentes enzimáticos do sistema de defesa antioxidante em especial encontram-se as enzimas SOD, catalase, GPx e o sistema que utiliza a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida (NADPH) como um cofator importante da enzima glutathione redutase (GR) e promove a regeneração de moléculas de glutathione oxidada (GSSG) para a forma reduzida (GSH) (EBERHARDT, 2001).

Os principais mecanismos bioquímicos propostos para explicar a relação entre a hiperglicemia crônica e a produção exacerbada de espécies reativas estão associados ao: i) aumento da oferta de substratos para glicólise e ciclo de Krebs e assim aumento da produção de NADH e FADH₂ para a cadeia transportadora de elétrons, ii) aumento do fluxo da glicose pela via dos polióis, iii) grau de ativação da proteína quinase C (PKC), e iv) aumento da formação de produtos de glicação não-enzimática (AGE) a partir da auto-oxidação da glicose (JAY; HITOMI; GRIENDLING, 2006; GIACCO; BROWNLEE, 2010; MADONNA; CATERINA, 2011).

No DM, diversas células captam glicose de maneira independente de insulina, em especial hepatócitos, células beta-pancreáticas, da mucosa intestinal, rins e cérebro. Assim, estes tecidos apresentam concentrações intracelulares elevadas de glicose em paralelo à hiperglicemia. Essas concentrações intracelulares de glicose elevadas favorecem o aumento do fluxo na via dos polióis, o que contribui para a redução na concentração de NADPH com concomitante elevação na concentração de nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida (NADH); com a redução na concentração de NADPH, a regeneração de moléculas de GSH fica prejudicada, o que, favorece a elevação das ERO por diminuir a quantidade de GSH nos tecidos. Todavia, o aumento na concentração de NADH aumenta a geração de diacilglicerol (DAG), principal ativador da PKC, uma quinase capaz de aumentar a atividade das NADPH-oxidases, em especial, no endotélio vascular, aumentando assim a produção do O₂^{•-} (BROWNLEE, 2005; EL-BENNA et al., 2005).

O excesso de glicose circulante também aumenta a velocidade de respiração celular com concomitante aumento da produção de O₂^{•-} nas mitocôndrias. Além disso, a maior formação de AGE e de seus receptores é relatada comcomitante a hiperglicemia

crônica, pois há favorecimento da auto-oxidação da glicose, este açúcar oxidado reage com componentes lipoproteicos (receptores da membrana), estimulando a formação de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 (DU et al., 2001; WAJCHENBERG, 2002; GIACCO; BROWNLEE, 2010; DIKALOV et al., 2011).

As ERO são conhecidas por sua capacidade de reagir e oxidar componentes celulares tais, como lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos ou ainda carboidratos (Orrenius et al., 2007). A oxidação dos lipídeos, conhecida como lipoperoxidação, está relacionada à diminuição da fluidez da membrana, alteração da sua função como barreira semipermeável e, ainda, à formação de produtos citotóxicos podendo culminar com a morte celular (CECARINI et al., 2006; ORRENIUS et al., 2007).

Em proteínas, as ERO podem causar: i) alteração nos resíduos de aminoácidos específicos (arginina, tirosina e triptofano), levando à alterações conformacionais, bem como fragmentação ou polimerização; ii) desnaturação e aumento da susceptibilidade à hidrólise. Proteínas com muitos grupos sulfidrilas são mais susceptíveis ao ataque de ERO. A interação de ERO e proteínas podem resultar em alterações estruturais com conseqüente diminuição ou perda de sua funcionalidade (Cecarini et al., 2006).

No DM, as complicações causadas pelo aumento das ERO podem ser agrupadas em alterações micro e macrovasculares (FORBES; COOPER, 2013). As principais complicações microvasculares do DM incluem retinopatias, com potencial perda de visão; neuropatias periféricas, com risco de úlceras e amputação de membros, e neuropatias autônomicas, causando sintomas gastrintestinais e geniturinários. Entre as complicações macrovasculares encontram-se as doenças cardio e cérebro-vasculares (ROLO; PALMEIRA, 2006; ARSA, 2009; ADA, 2010; BANDEIRA et al., 2013; FORBES; COOPER, 2013).

O aumento da atividade de enzimas hepáticas no plasma, tais como a alanina e a aspartato aminotransferase (ALT e AST, respectivamente) e a fosfatase alcalina (ALP) está descrito no DM tipo 1 (MORI et al., 2003; GUTIERRES, et al., 2012). Há também correlação entre o aumento da atividade destas enzimas no sangue e o dano no tecido hepático causado pela hiperglicemia (MORI et al., 2003) ou por elevação nas ERO (KORUK et al., 2004).

O aparecimento de proteinúria é um dos primeiros sinais de lesão renal no DM, uma vez que somente moléculas de baixo peso molecular aparecem comumente na

urina. A nefropatia diabética é consequência da falta de regulação do metabolismo da glicose, sendo a hiperglicemia responsável pelo aumento na glicação de proteínas, promovendo assim alterações hemodinâmicas no tecido renal (BABU; SRINIVASAN, 1999; GNUDI, 2008).

1.4 CURCUMINA E PIPERINA

O crescente aparecimento de doenças crônicas na população mundial tais como obesidade, hipertensão, aterosclerose, DM e câncer, tem preocupado os órgãos públicos de saúde, à medida que reduzem a expectativa de vida e/ou aumentam os gastos públicos com internações ou outras ações curativas (MORAES; COLLA, 2006). Assim, está surgindo uma nova consciência, especialmente entre os consumidores, para melhorar a qualidade de vida e reduzir tanto os danos à saúde quanto os gastos com tratamentos. Isso tem contribuído para o desenvolvimento e aumento do uso dos nutracêuticos (ANJO, 2004).

Nutracêuticos tem sido definido como, “alimentos ou parte dos alimentos que apresentam benefícios a saúde incluindo a prevenção ou tratamento de doenças. Podem abranger desde os nutrientes isolados, suplementos dietéticos até produtos projetados, produtos fitoterápicos e alimentos processados” (MORAES; COLLA, 2008).

A curcumina (Figura 1) é um pigmento amarelo natural obtido das raízes de *Curcuma longa* L, proveniente da Índia e utilizado como condimento alimentar. Nas últimas décadas, a curcumina tem sido extensivamente estudada devido as suas propriedades farmacológicas multifuncionais, tais como atividade antitumoral, antioxidante, antiartrite e anti-inflamatória (ANAND et al., 2008), antiparasitária (PEREZ-ARRIAGA et al., 2006), antibacteriana (NAZ et al., 2010), antimalárica (NANDAKUMAR et al., 2006), antiaterogênica (OLSZANECKI et al., 2005), antiespasmódica (ITTHIPANICHPONG et al., 2003). Diversos estudos também têm demonstrado que a curcumina promove benefícios em diversas condições, tais como mal de Alzheimer (RINGMAN et al., 2005), mal de Parkinson (ZBARSKY et al., 2005) e modelos experimentais de dislipidemias (BABU; SRINIVASAN, 1999) e do DM (SRIVIVASAN et al., 2003; GUTIERRES et al., 2012). Devido a todas essas propriedades farmacológicas, a curcumina já tem sido descrita como um nutracêutico

(CLIFFORD; IYER; COLIN, 2007; RASTONHUANG; YU; QIAOMEIRU, 2010; AGGARWAL, 2010)

Figura 1: Estruturas moleculares da curcumina (adaptado de ZHANG et al., 2013).



Gutierrez et al. (2012) demonstraram que o tratamento de ratos diabéticos (indução por estreptozotocina) com curcumina incorporada ao iogurte, na dose de 90mg/kg pc durante 31 dias, melhorou diversos parâmetros fisiológicos e bioquímicos classicamente alterados neste modelo experimental de diabetes, em relação aos ratos diabéticos tratados somente com água ou iogurte. Embora o efeito benéfico da curcumina sobre o diabetes tenha sido dose-dependente, a maior dose ainda não apresentou a mesma eficiência que o tratamento insulínico.

Outros estudos utilizando modelos de DM experimental têm demonstrado que o tratamento com curcumina promove a redução da glicemia (ARUN; NALINI, 2002; AGGARWAL, 2010). Além disso, o tratamento com curcumina também é capaz de aumentar a insulinemia de insulina plasmática, promovendo assim ativação de enzimas associadas à glicólise, bem como inibição de enzimas-chave da gliconeogênese hepática (PARI; MURUGAN, 2007a, 2007b; SEO et al., 2008).

Alguns estudos também demonstraram que a curcumina atenua a neuropatia diabética (SHARMA; STEWARD; GESCHER, 2007), retinopatia diabética (SURYANARAYANA et al., 2007), nefropatia (SHARMA; KULKARNI; CHOPRA, 2006), e cardiomiopatia (FARHANGKHOEE et al., 2006; FENG et al., 2008).

Lao et al. (2006) demonstraram que a curcumina pode ser utilizada por via oral em humanos, com doses máximas de 12 g ao dia, sem causar efeitos tóxicos. Entretanto, a baixa biodisponibilidade da curcumina por via oral tem sido uma das dificuldades encontradas nos estudos farmacodinâmicos, sendo relacionada a diversos fatores, tais como baixa absorção, rápido metabolismo e rápida eliminação sistêmica (MAITI et al., 2007; ANAND et al., 2007).

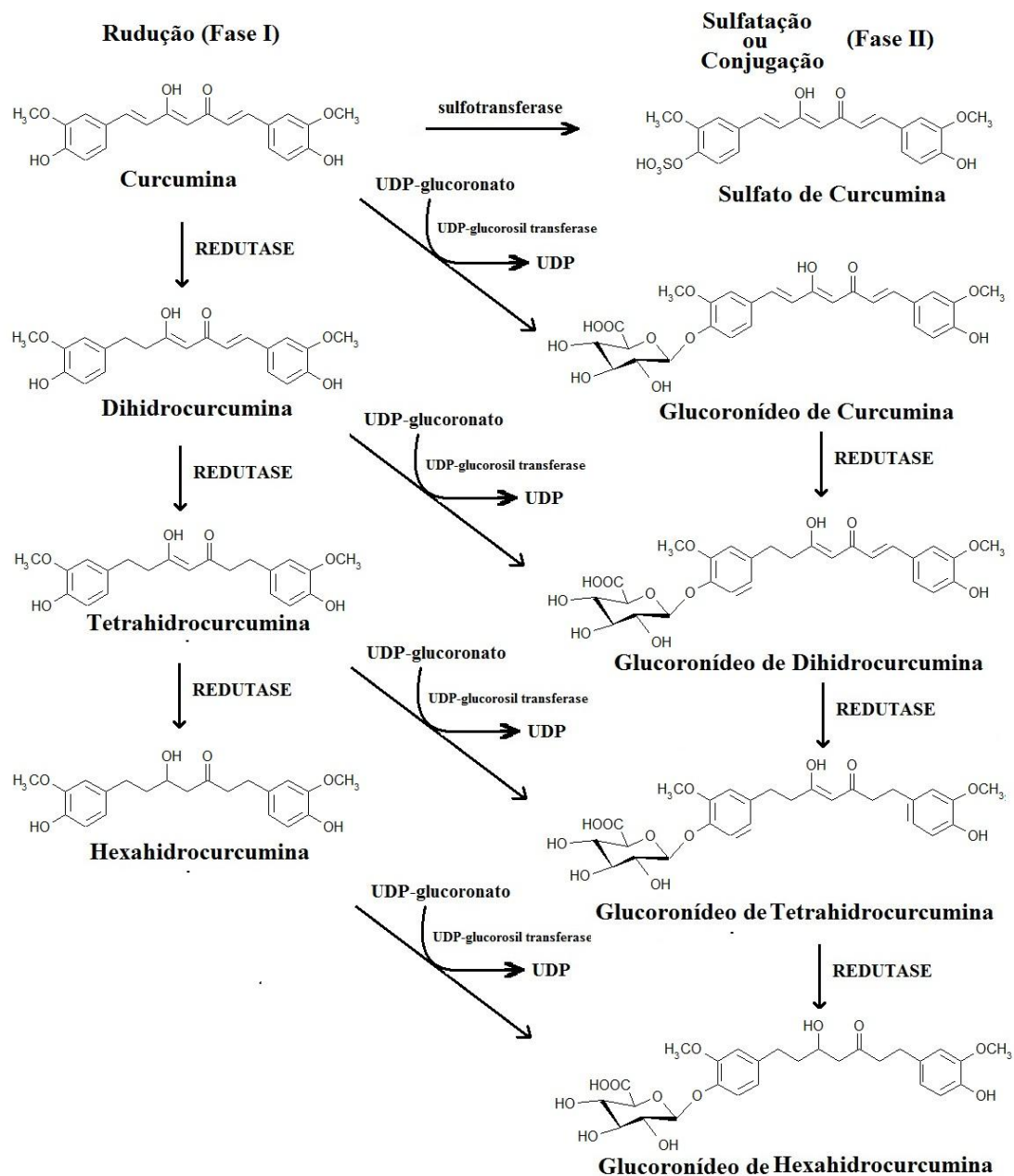
O metabolismo da curcumina (Figura 2), tanto de fase I quanto de fase II, tem sido principalmente estudado em modelos *in vivo* e *in vitro* (WAHLSTROM;

BLENNOW, 1978; HOLDER; PLUMMER; RYAN, 1978; RAVINDRANATH; CHANDRASEKHARA, 1982; ASAI; MIYAZAWA, 2000; IRESO et al., 2001; IRESO et al., 2002). O metabolismo de fase I da curcumina tem sido descrito como um processo de redução sucessiva das três ligações duplas do sistema heptadieno-3,5-diona, e as enzimas responsáveis pelo processo de redução estão presentes no citoplasma de células hepáticas e intestinais. Alguns estudos têm demonstrado que estes processos de redução são dependentes da enzima álcool desidrogenase ou podem ocorrer através da NADPH-citocromo P450 redutase (IRESO et al., 2002; ZENG et al., 2007; METZLER et al., 2012; LI et al., 2012). Contudo, ainda não existem estudos publicados até o momento que demonstre exatamente as enzimas envolvidas no metabolismo de fase I da curcumina (METZLER et al., 2012).

A curcumina e os seus metabólitos reduzidos parecem ser facilmente conjugados, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. As reações de conjugação de fase II já identificadas para a curcumina e para seus metabólitos reduzidos ocorrem, principalmente, com o ácido glicurônico, contudo são relatados também alguns metabólitos conjugados com sulfatos (ZENG et al., 2007; MARCAYLO; STEWARD; GESCHER, 2009). Os produtos das reações de conjugação promovem aumento no peso molecular e na solubilidade da molécula, facilitando o processo de excreção desta através da urina ou pela bile (WANG; QIU, 2013).

WAHLSTROM; BLENNOW (1978) relataram, ao analisar a absorção, distribuição, e excreção da curcumina em ratos Sprague-Dawley, quantidades insignificantes de curcumina no plasma após administração oral de 1 g de curcumina/kg pc. Em ensaios com ratos para a avaliação da biodisponibilidade da curcumina, após administração por gavagem de extrato etanólico de curcumina, a biodisponibilidade plasmática de curcumina encontrada foi em torno de 1% (YANG et al., 2007).

Figura 2: Esquema proposto dos processos de metabolização de fase I e fase II da curcumina quando administrada por via oral em ratos (adaptado de WANG; QIU, 2013).

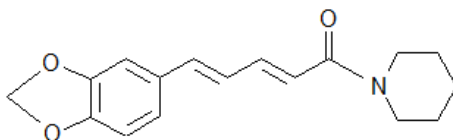


Devido às dificuldades no avanço dos estudos com curcumina e sua biodisponibilidade após administração oral, tem-se explorado várias alternativas para melhorar sua biodisponibilidade, dentre elas, o utilização de nanopartículas sintéticas (YALLAPU et al., 2010) ou naturais (KIM et al., 2011), lipossomas, complexos com

fosfolípidos, bem como adição de adjuvantes naturais como a piperina (SHOBA et al., 1998; MAITI et al., 2007; CHEN et al., 2009).

A piperina (1-piperoil piperidina, Figura 3) é um alcaloide extraído das sementes da pimenta do reino (*Piper nigrum* L) e responsável por seu intenso aroma (CHONPATHOMPIKUNLERT; WATTANATHORN; MUCHIMAPURA, 2010). Este alcaloide possui diversas atividades biológicas, tais como ação inseticida (DAS et al., 1996), antipirética, analgésica, anti-inflamatória (STÖHR et al., 2001). Tem sido atribuída piperina a capacidade de aumentar a biodisponibilidade de certos fármacos, especialmente através de inibição da biotransformação em nível hepático (ATAL et al., 1981; BANO et al., 1991; SHOBA et al., 1998).

Figura 3: Estrutura molecular da piperina (adaptado de MEGHWAL; GOSWAMI, 2013).



Este efeito de aumento na biodisponibilidade de fármacos é observado quando a piperina é co-administrada por via oral, ao promover uma maior concentração plasmática dos mesmos. O aumento na biodisponibilidade de fármacos promovido pela piperina permite a administração de doses menores e alcance do mesmo efeito farmacodinâmico (RIBEIRO, 2004). Estes efeitos já foram constatados em estudos com vasicina e esparteína (ATAL et al., 1981), propanolol, teofilina, fenitoína (BANO et al., 1991) e também com curcumina (SHOBA et al., 1998). A maioria dos trabalhos relata um aumento de até 100% na concentração de tais fármacos na corrente sanguínea, quando co-administrados com piperina.

Estudo de Shoba et al. (1998) avaliou a biodisponibilidade da curcumina, em ratos e em humanos, quando administrada sozinha e em associação com piperina em suspensão aquosa. Em ratos, a dose 2 g/kg de curcumina apresentou concentrações séricas máximas após 4 horas da administração, entretanto quando co-administrada com 20 mg/kg de piperina, as concentrações plasmáticas máximas de curcumina atingiram o

pico em 1 hora após administração, e com a biodisponibilidade aumentada em 154%. Em seres humanos, as concentrações séricas de curcumina quando co-administradas com piperina, nas mesmas concentrações, tiveram sua biodisponibilidade aumentada em 2000%, após 1 hora da administração.

Segundo a maioria dos autores, o aumento da biodisponibilidade promovido pela piperina é atribuído a três principais mecanismos: i) aumento no tamanho das microvilosidades das células intestinais, através da estimulação da transcrição de fatores que participam da produção dos constituintes do citoesqueleto; ii) alteração da fluidez da membrana intestinal e das características de permeabilidade promovida pela piperina ao interagir com os lipídeos e proteínas de membrana (JOHRI et al., 1992; KHAJURIA; THUSU; ZUTSHI, 2002); iii) inibição das enzimas responsáveis pelo processo de biotransformação de fase I (citocromo P450) ou das enzimas de conjugação do processo de fase II (UDP-glucosil transferase) (ATAL et al., 1981; KOUL et al., 2000; AHMAD et al., 2012; ACHARYA; MOMIN; GAJJAR, 2012).

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar as atividades antidiabética e antioxidante da curcumina incorporada em iogurte, na ausência e na presença de piperina.

2.2 ESPECÍFICOS

Avaliar, durante o período experimental de 45 dias, os efeitos da administração oral da curcumina em suspensão no iogurte, na ausência e na presença de piperina em ratos diabéticos, monitorando:

- i) parâmetros fisiológicos: peso corporal, ingestão hídrica e alimentar, volume urinário e massas dos tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal e dos músculos esqueléticos *soleus* e *extensor digitorum longus* (EDL);
- ii) parâmetros bioquímicos sanguíneos: glicemia, triacilgliceróis (TAG), colesterol total, colesterol-HDL, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP), e urinários: glicosúria, ureia urinária, proteinúria.
- iii) parâmetros bioquímicos hepáticos relacionados ao estresse oxidativo: malondialdeído (MDA), proteínas carboniladas (PCO), glutathiona reduzida (GSH) e atividade das enzimas antioxidantes glutathiona peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 EQUIPAMENTOS

Foi utilizado para as dosagens bioquímicas um autoanalisador LabMax 240, para a determinação da glicosúria foi utilizado espectrofotômetro Femto 600S, para a determinação das concentrações de MDA no fígado, GSH e atividade de enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) foi utilizado leitor de placas da BioTek® PowerWave XS2, As concentrações de PCO foram medidas no espectrofotometro Jasco V-630 e o MDA no plasma foi quantificado em espectrofotômetro de placas BioTek® Synergy H1.

3.2 SAIS E REAGENTES

Para realização dos experimentos foram utilizados: curcumina, piperina, ácido tricloroacético, dodecilsulfato de sódio, sal de trizma, ácido 5,5 ditiobis-2-nitrobenzóico, GSH, GR, NADPH, 1,1'3,3'-tetrametoxipropano, albumina bovina, reagente de Follin-Ciocalteau, 2,4 dinitrofenilhidrazina, estreptozotocina, fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio bibásico, *Nitro blue tetrazolium*, Xantina oxidase, Ácido etilenodiamino tetraacético dissódico e tolueno (Sigma-Aldrich®). Para dosagem da glicemia, uréia urinária, proteinúria, colesterol total, colesterol-HDL, triacilgliceróis, AST, ALT e ALP foram utilizados Kits da Labtest Diagnóstica S.A. Iogurte natural (Nestlé®) para a incorporação da curcumina e/ou piperina. Orto-toluidina, ácido tiobarbitúrico, hidróxido de sódio, peróxido de hidrogênio e tiouréia (Merck®), heparina sódica (Hemofol Cristália®); insulina (NPH 100 U/mL, Lilly®), Ácido Cítrico Monoidratado, Citrato Trissódico Diidratado, sulfato de cobre, carbonato de sódio, etanol, acetato de etila, Cloreto de sódio, ácido perclórico e álcool N-butílico (Synth®).

3.3 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos com peso de 150 ± 10 g provenientes do Biotério Central do Câmpus de Botucatu, UNESP. Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP, com ciclo claro/escuro de 12 horas e condições controladas de temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e de umidade relativa de $55 \pm 5\%$.

Todos os procedimentos de manejo e manipulação animais do presente trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP, (CEUA nº 08/2013, ANEXO I).

3.4 INDUÇÃO DO DIABETES MELLITUS EXPERIMENTAL

Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais, recebendo água e alimentação “*ad libitum*”, onde permaneceram durante 3 dias para adaptação, antes de qualquer manipulação relacionada ao procedimento experimental. Após este período, os animais foram submetidos ao jejum de 14 horas para posterior administração de 40 mg de estreptozotocina (STZ)/kg pc, solubilizada em tampão citrato (10 mM, pH 4,5) na veia jugular, acessada após anestesia dos ratos com anestésico volátil isoflurano (PEPATO et al., 2002).

3.5 TRATAMENTO CRÔNICO DE ANIMAIS DIABÉTICOS COM CURCUMINA, PIPERINA E ASSOCIAÇÕES

No quarto dia após a indução do diabetes, os animais foram divididos em sete diferentes grupos, pareados a partir de valores médios semelhantes de glicemia e peso corporal. O pareamento é importante uma vez que permite a comparação temporal inter e intra-grupos do(s) efeito(s) dos compostos avaliados. Os grupos experimentais (n=10) foram os seguintes:

- Grupo diabético tratado com iogurte (DIOG);
- Grupo diabético tratado com 4 U de insulina (DINS);

- Grupo diabético tratado com 90 mg de curcumina/kg pc (DC90) incorporada em iogurte;
- Grupo diabético tratado com 20 mg de piperina/kg pc (DP20) incorporada em iogurte;
- Grupo diabético tratado com 90 mg de curcumina/kg pc e 20 mg de piperina/kg pc (DC90P20) incorporadas em iogurte;
- Grupo diabético tratado com 40 mg de piperina/kg pc (DP40) incorporada em iogurte e
- Grupo diabético tratado com 90 mg de curcumina/kg pc e 40 mg de piperina/kg pc (DC90P40) incorporadas em iogurte.

A incorporação da curcumina e/ou piperina ao iogurte ocorreu em ambiente termostatisado a 25°C, durante 90 segundos, sob rotação de 27000 rpm em homogeneizador modelo Metabo[®]. Foi utilizada curcumina (Sigma[®], com pureza maior que 65%) na concentração de 90 mg/kg pc, administrada em duas doses de 45 mg de curcumina/kg pc, e piperina (Sigma[®], com pureza maior que 97%) nas concentrações de 20 e 40 mg/kg pc, administradas em duas doses de 10 e 20 mg de piperina/kg pc, respectivamente, incorporados em iogurte natural Nestle[®]. A administração das suspensões aos animais foi através de gavagem, duas vezes ao dia, no período matutino (8:00 h) e vespertino (17:00 h), em volume de 0,5 mL de iogurte/animal/administração, durante período de 45 dias. O ajuste das massas de curcumina e piperina incorporadas ao iogurte foi realizado semanalmente, de acordo com a média do peso dos animais por grupo.

A insulina (4U/mL, Humolin[®]) foi preparada em solução de NaCl 0,85% e administrada por via subcutânea, em duas doses diárias de 2U/mL cada, nos períodos matutino (8:00 h) e vespertino (17:00 h), durante todo período experimental.

Semanalmente foram determinados diversos parâmetros fisiológicos e bioquímicos dos animais submetidos aos diversos tratamentos. Dentre os parâmetros fisiológicos foram determinados: peso corporal, ingestões alimentar e hídrica e volume urinário de 24 horas. A urina foi coletada em frasco limpo contendo tolueno (300µL); uma alíquota desta urina foi separada para determinação dos parâmetros bioquímicos de glicosúria, proteinúria e ureia urinária.

A amostra de plasma foi obtida através do sangue coletado pela cauda, após indução de vasodilatação periférica, em *ependorfs* heparinizados (Hemofol[®]). O sangue coletado foi centrifugado durante 10 minutos a 2500 rpm e o plasma obtido foi separado para as determinações bioquímicas. No plasma aliquoteado, foram

determinados as concentrações de glicose, colesterol total, colesterol-HDL e TAG, bem como as atividades das enzimas AST, ALT e ALP.

Os parâmetros fisiológicos (peso corporal, ingestão hídrica e alimentar e volume urinário), bioquímicos plasmáticos (glicemia) e urinários (glicosúria, proteinúria e ureia) foram determinados semanalmente durante todo o experimento. As atividades das enzimas AST, ALT e ALP e as concentrações plasmáticas de colesterol total, colesterol-HDL e TAG foram determinados a cada 15 dias, de maneira alternada durante o período experimental (Figura 4).

Após 45 dias de tratamento, o sangue foi coletado através da cauda dos animais para a determinação das enzimas AST, ALT e ALP e após a coleta os animais foram decapitados e o sangue coletado foi utilizado para a determinação dos demais parâmetros bioquímicos supracitados. Além da determinação dos parâmetros fisiológicos, também foram determinados os pesos dos tecidos adiposos brancos epididimal e retroperitoneal e dos músculos esqueléticos *soleus* e EDL. O fígado foi removido e congelado a -80°C para posterior determinação de parâmetros relacionados ao estresse oxidativo.

3.6 PRINCIPIOS METODOLÓGICOS DAS DOSAGENS BIOQUÍMICAS

As dosagens bioquímicas de glicose, colesterol total, TAG, Colesterol-HDL, ALT, AST, ALP, ureia urinária e proteinúria foram realizadas com *kits* comerciais da Labtest Diagnostica SA.

3.6.1 Glicemia, método da glicose-oxidase (TRINDER, 1969):

A glicose oxidase catalisa a oxidação da glicose à ácido glucônico e H₂O₂. O H₂O₂ formado reage com 4-aminoantipirina, sob ação catalisadora da peroxidase formando uma antipirilquinonimina (vermelha), que absorve em 505 nm e cuja intensidade de absorção é proporcional à concentração da glicose na amostra.

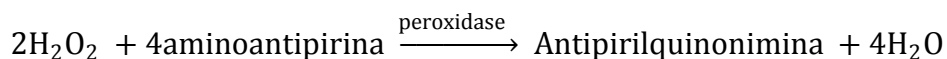
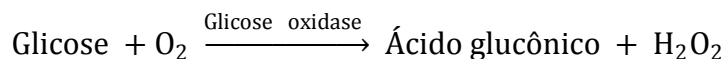
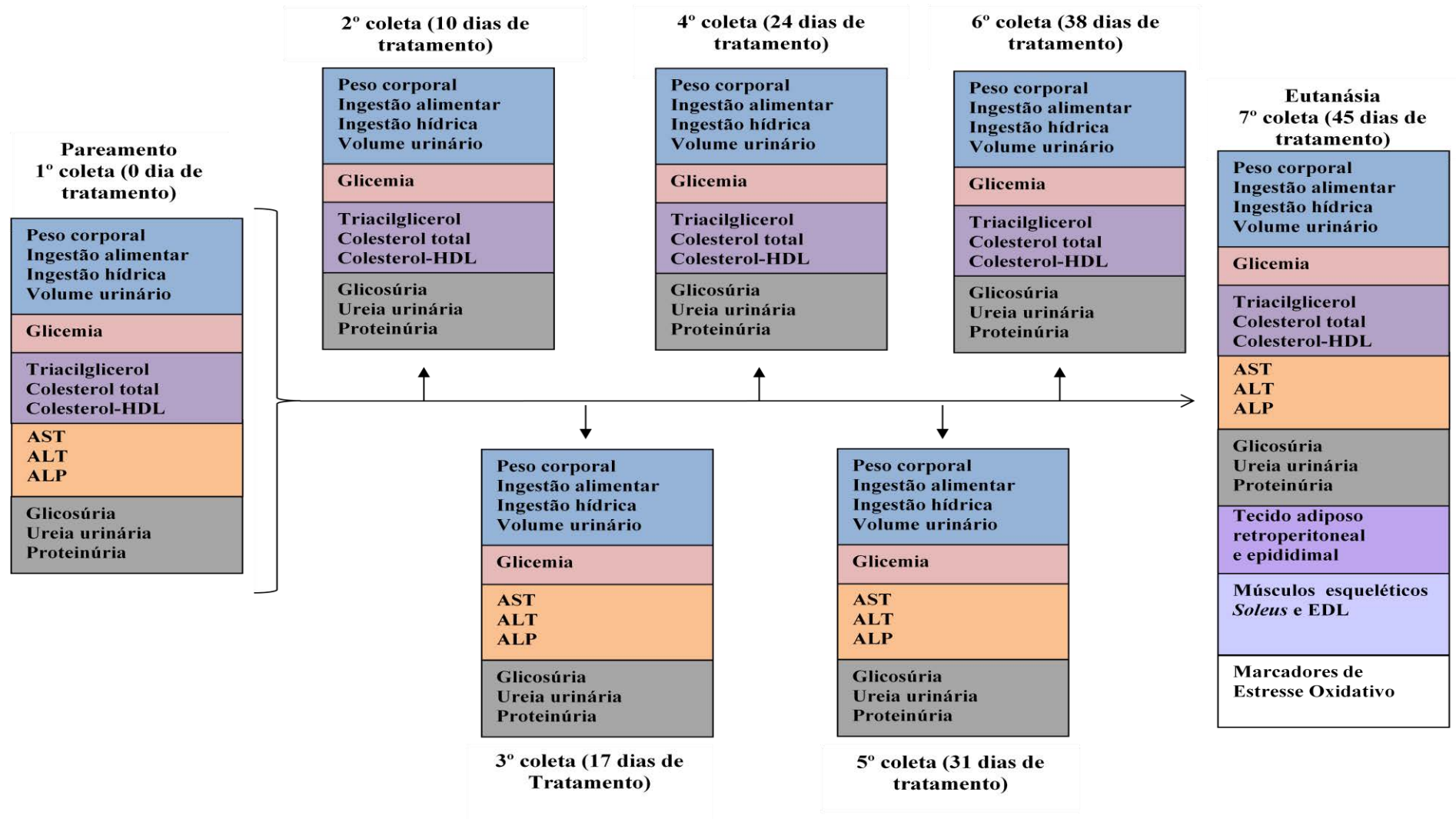
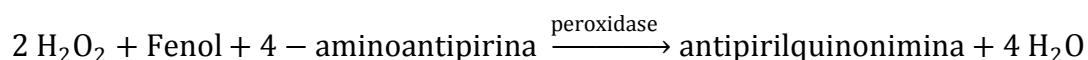
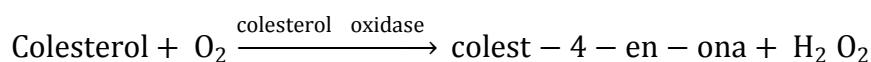
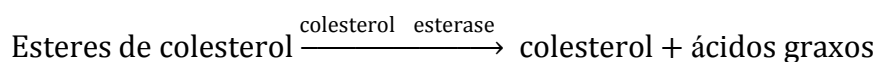


Figura 4: Fluxograma experimental do tratamento crônico de ratos diabéticos com curcumina, piperina e associações.



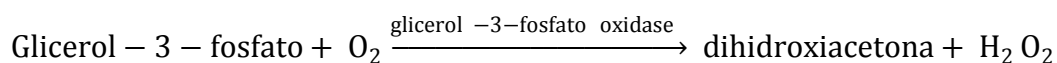
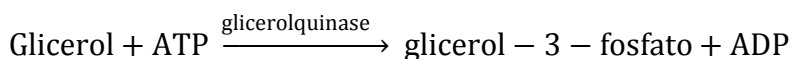
3.6.2 Colesterol total, método da colesterol oxidase (MROZ, 2003):

A concentração de colesterol total foram determinados utilizando reações enzimáticas acopladas, com colesterol esterase, colesterol oxidase e peroxidase. O produto final formado é a antipirilquinonimina (vermelha), que absorve em 500 nm e cuja intensidade de absorção é proporcional à concentração de colesterol na amostra.



3.6.3 Triacilglicerol, método enzimático de reações acopladas (RIFAI; WARNICK, 2006):

A concentração de triacilgliceróis foi determinada através de reações enzimáticas acopladas, onde os triacilgliceróis são hidrolisados pela lipase, produzindo glicerol e AGL. O glicerol é fosforilado pela gliceroquinase, produzindo glicerol-3-fosfato, o qual é oxidado à dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio sob ação da glicerol-3-fosfato oxidase. O H_2O_2 , quando no meio reacional, participa da oxidação de 4-aminoantipirina, pela ação catalizadora da peroxidase, gerando quinoneimina. A intensidade de absorção da quinoneimina (vermelha) formada e medida a 505 nm é diretamente proporcional à concentração dos triacilgliceróis na amostra.

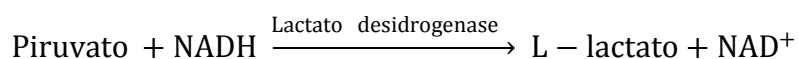
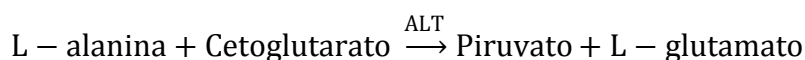


3.6.4 Colesterol-HDL, método indireto por inibição seletiva (RIFAI; WARNICK, 2006):

O poliânion composto por fosfotungstato de sódio e íons de magnésio forma complexos estáveis com a superfície das VLDL, *low-density lipoprotein* (LDL) e quilomicra. Os complexos formados com as partículas do colesterol-HDL presentes no soro não se estabilizam, ficando sujeitos à ação detergente do polioxietileno lauril éter, solubilizando-se e, sob ação de colesterol esterase, colesterol oxidase e peroxidase, resultam na formação de um pigmento que é diretamente proporcional à concentração de colesterol presente no colesterol-HDL da amostra.

3.6.5 Alanina aminotransferase (ALT), método cinético UV (WRÓBLENSKI; LADUE, 1956);

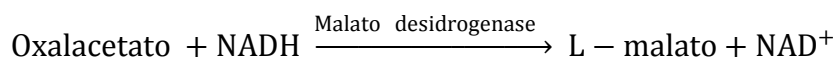
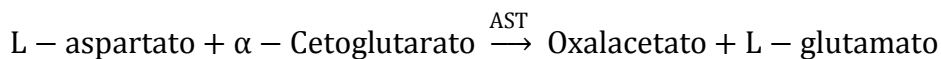
ALT catalisa a transferência do grupo amino da alanina para o alfa-cetoglutarato com a formação de glutamato e piruvato. O piruvato é reduzido à lactato sob ação catalisadora da lactato desidrogenase (LDH), enquanto que a coenzima NADH é oxidada a NAD^+ . A diminuição da absorvância em 340 nm, em função do tempo, devido à oxidação da NADH, é diretamente proporcional à atividade da ALT na amostra.



3.6.6 Aspartato aminotransferase (AST), método cinético no UV (BERGMEYER, 1977):

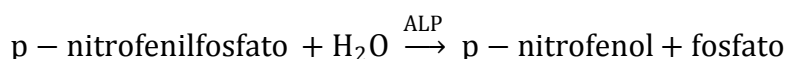
A AST catalisa a transferência do grupo amino do aspartato para o alfa-cetoglutarato com formação de glutamato e oxalacetato. O oxaloacetato é reduzido à

malato sob ação catalisadora da malato desidrogenase (MDH), enquanto que a coenzima NADH é oxidada à NAD^+ . A diminuição da absorvância em 340 nm, em função do tempo, devido à oxidação da NADH, é diretamente proporcional à atividade da AST na amostra.



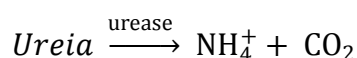
3.6.7 Fosfatase alcalina (ALP), método colorimétrico (SCANDINAVIAN, 1974):

A fosfatase alcalina do soro, em meio alcalino, hidrolisa o p-nitrofenilfosfato, liberando p-nitrofenol e fosfato inorgânico. A quantidade de p-nitrofenol produzida é monitorada em 405 nm e é diretamente proporcional à atividade da fosfatase alcalina na amostra;



3.6.8 Ureia urinária, método da urease (BOLLETER; BUSHMAN; TIDWELL, 1961; BERGMEYER, 1985);

A hidrólise da ureia catalisada pela urease produz íons amônio e CO_2 . Os íons amônio reagem com salicilato e hipoclorito de sódio em meio alcalino na presença do catalisador nitroprussiato de sódio, formando o azul de indofenol, o qual é monitorado espectrofotometricamente em 600 nm.



3.6.9 Proteinúria, método de Bradford modificado (WATANABE et al., 1986):

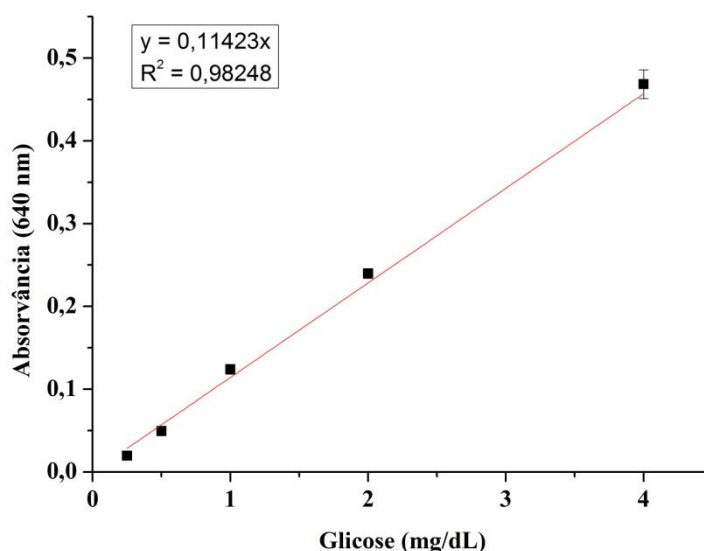
O vermelho de pirogalol reage com o molibdato de sódio formando um complexo que, ao combinar-se com proteínas em meio ácido, desenvolve um cromóforo azul, com o máximo de absorção em 600 nm. A absorvância resultante é diretamente proporcional à concentração de proteína na amostra.

3.6.10 Glicosúria, método da orto-toluidina (DUBOWSKI, 1962):

Este método é baseado na reação entre uma amina aromática, a o-toluidina, e o grupamento aldeído da glicose, em banho fervente (96°C) e em meio fortemente ácido, onde há formação de glicosamina. Esta estará em equilíbrio com seu derivado de desidratação (uma base de Schiff), que é monitorada espectrofotometricamente em 640 nm. Foi realizada uma curva analítica com concentrações de glicose para posterior determinação da concentração de glicose na amostra (Figura 5).



Figura 5: Curva analítica de glicose.



3.7 BIOMARCADORES RELACIONADOS AO ESTRESSE OXIDATIVO

3.7.1 Malondialdeído (MDA) no plasma e fígado:

O plasma e o sobrenadante do homogenato com fígado foram submetidos a um processo de desproteinização descrito segundo Pilz et al. (2000). O MDA foi determinado (Figura 6) segundo a metodologia descrita por Kohn; Liversedge (1944). O MDA no fígado foi determinada espectrofotometricamente em 535 nm e a concentração de MDA no plasma foi determinada fluorimetricamente em comprimentos de onda de excitação e emissão de 510 e 553 nm, respectivamente. Foi realizada uma curva analítica com o padrão 1,1',3,3'-tetrametoxipropano (Figura 7) para a quantificação de MDA nas amostras. Os resultados foram expressos em μmol de MDA/L (plasma) ou μmol de MDA/g de tecido (fígado).

Figura 6: Reação entre o ácido 2-tiobarbitúrico e o malondialdeído, formando o composto colorido, medindo espectrofotometricamente a 535 nm (OSAWA *et al.*; 2005).

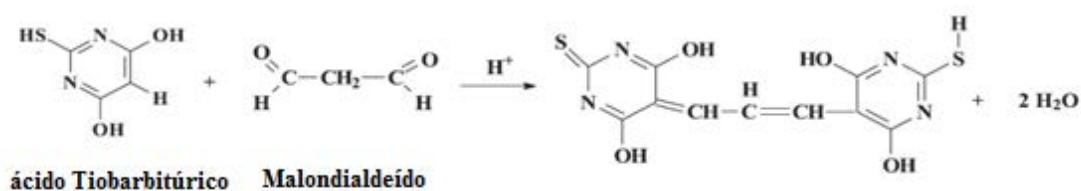
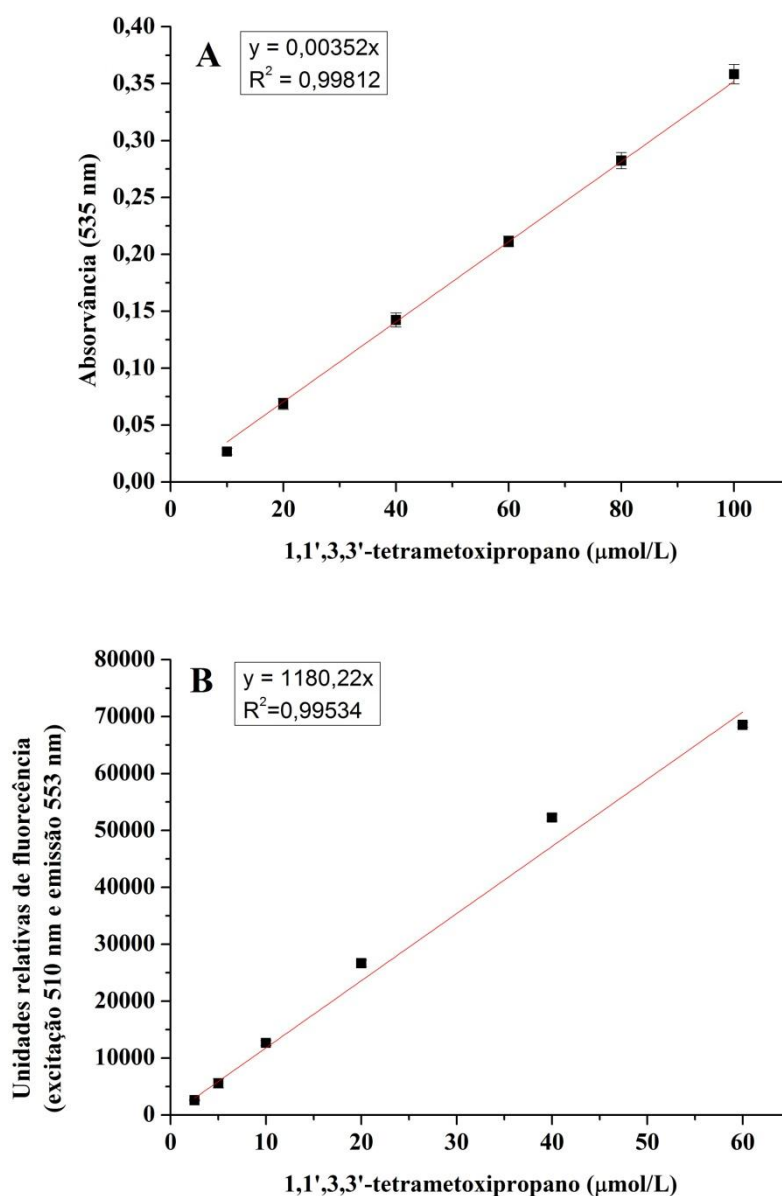


Figura 7: Curvas analíticas de 1,1',3,3'-tetrametoxipropano no espectrofotometro (A) e Fluorímetro (B).



3.7.2 Proteínas carboniladas (PCO)

As proteínas carboniladas foram determinadas segundo método descrito por Levine et al. (1994). Os grupos carbonilas presentes nas proteínas reagem com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) em meio ácido, formando 2,4-dinitrofenilhidrazona (Figura 8) que absorve luz em 370 nm; A concentração de PCO na amostra foi obtida

utilizando o coeficiente de extinção molar do DNPH ($22000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e expressa em μmol de PCO/mg de proteína.

Figura 8: Reação dos grupos carbonila com 2,4-dinitrofenilhidrazina (Adaptado de ALLEN, 1943).



3.7.3 Glutathiona reduzida (GSH)

As concentrações de GSH foram determinadas de acordo com a metodologia descrita por Sedlak; Lindsay (1968), em função da redução do ácido 5,5-ditio-2-nitrobenzoico (DTNB, Figura 9) e medido espectrofotometricamente em 412 nm. Os resultados foram calculados através de uma curva analítica com GSH e foram expressos em mmol de GSH/g tecido (fígado).

Figura 9: Reação de glupamentos sulfidrilas com DTNB (Adaptado de ELLMAN, 1959).

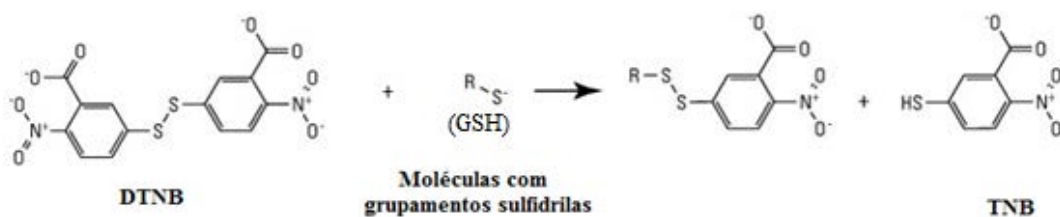
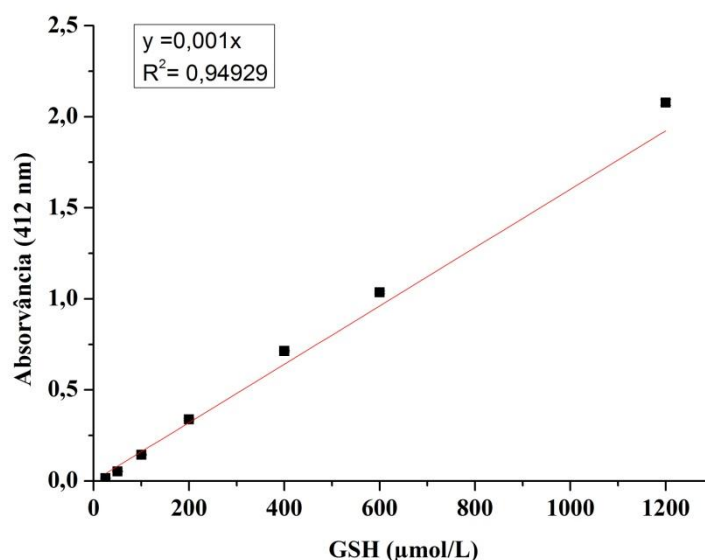
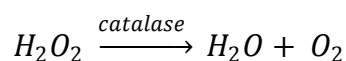


Figura 10: Curva analítica de GSH

3.5.4 Atividade da catalase (CAT)

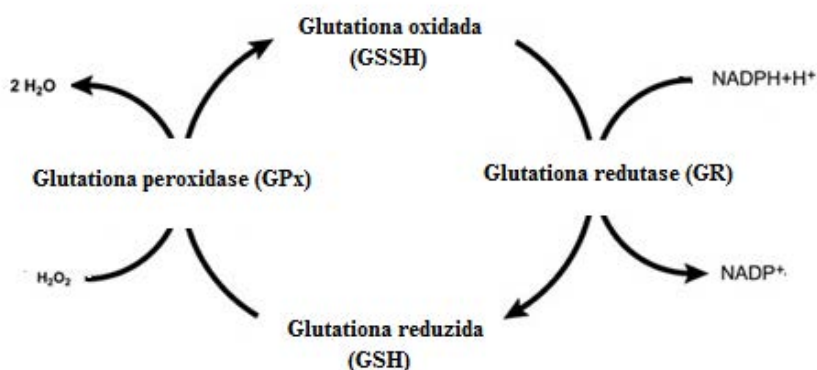
A atividade da CAT foi determinada de acordo com o método descrito por Beers; Sizer (1952), através do monitoramento do desaparecimento do H_2O_2 em 230 nm; os resultados foram expressos em mmol de H_2O_2 consumido/min/mg proteína.



3.5.5 Atividade da Glutathiona peroxidase (GPx)

A atividade da GPx foi determinada de acordo com o método de Rush; Sandiford (2003). A GPx cataliza a oxidação de GSH na presença de H_2O_2 . Na presença de GR, a GSSH é reduzida à GSH com oxidação concomitante do $NADP+H^+$ à $NADP^+$ (Figura 10). A oxidação do NADPH é monitorada pela diminuição da absorvância em 340 nm; os resultados foram expressos em mmol de NADPH consumido/min/mg proteína.

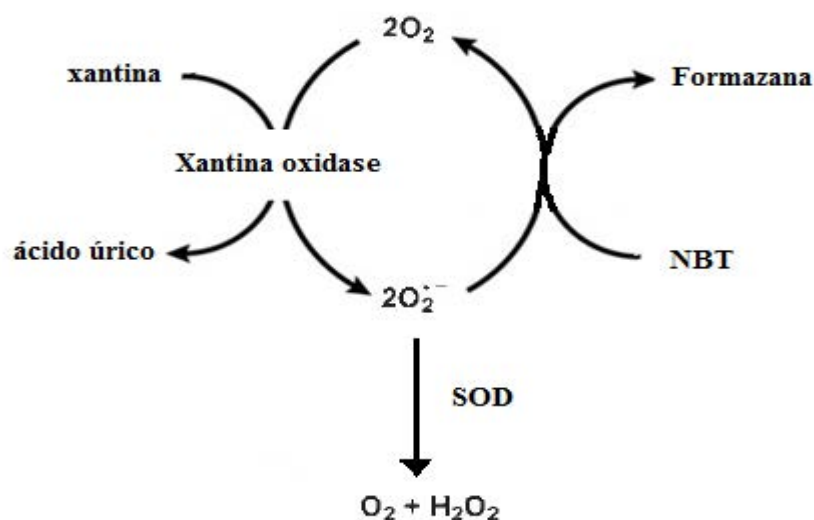
Figura 11: Ciclo da glutathiona (Adaptado de JUNIOR et al., 2001).



3.5.6 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD em sobrenadante de homogenato de fígado foi determinada de acordo com Beauchamp; Fridovich (1971), onde a xantina gera o $O_2^{\bullet-}$ através da ação da xantina oxidase que reduz o *nitroblue tetrazolium* (NBT) a uma formazana. O ensaio é baseado na inibição da redução do NBT na presença de SOD na amostra (Figura 11), que é monitorada em 550 nm; os resultados foram expressos em U de SOD/mg de proteína. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a redução do NBT em 50%.

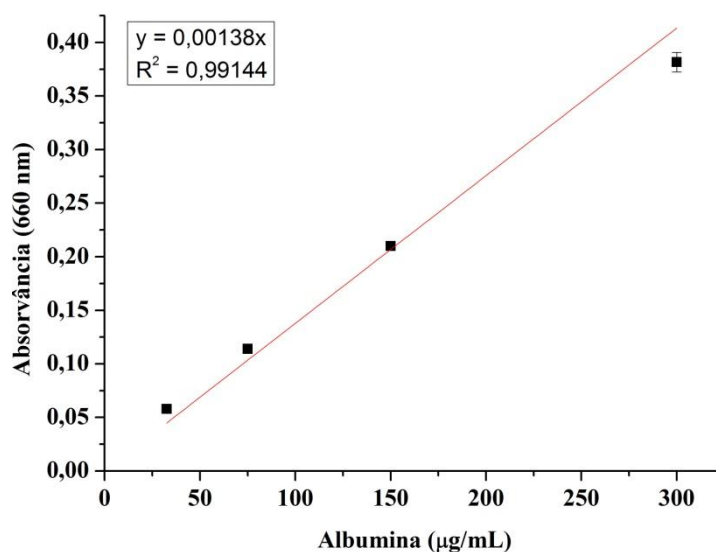
Figura 12: Mecanismo de inibição da redução do NBT pela SOD (Adaptado de LEE; NISHIKAWA; TANIGUCHI, 1990).



3.5.7 Proteínas Totais

As concentrações de proteínas nos sobrenadantes de homogenato de fígado foram determinados de acordo com o método de Lowry et al. (1951). O princípio do método baseia-se em uma mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico (reagente Folin-Ciocalteu), que sofre redução quando reage com proteínas, na presença do catalisador cobre (II), e produz um composto azul escuro. As concentrações de proteínas foram determinadas espectrofotometricamente em 660 nm; os resultados foram expressos utilizando uma curva analítica com albumina bovina (Figura 12).

Figura 13: Curva analítica de albumina bovina.



3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). A análise de variância One-way ANOVA seguida do teste Student-Newman-Keuls foi utilizada para comparação inter-grupos dos resultados temporais de parâmetros fisiológicos, bioquímicos, resultados de parâmetros relacionados ao estresse oxidativo e análise de área sob a curva (AUC). O test t Student pareado foi utilizado para as comparações intra-grupos dos resultados temporais de parâmetros fisiológicos e bioquímicos em relação ao dia 0. As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$. As análises foram realizadas utilizando o programa Graphpad Instat[®] 3.05 (GraphPad Software, USA).

4. RESULTADOS

4.1. PARÂMETROS FISIOLÓGICOS DE RATOS DIABÉTICOS TRATADOS COM CURCUMINA, PIPERINA E ASSOCIAÇÕES

Na Figura 14 encontra-se a evolução do peso corporal de ratos diabéticos não tratados e tratados durante 45 dias. O grupo DIOG, referente ao grupo de animais diabéticos não tratados, ou seja, sem receber curcumina e/ou piperina e que receberam somente o veículo, apresentou o menor ganho de peso corporal em relação a todos os grupos de ratos diabéticos submetidos aos diferentes tratamentos, durante todo o período experimental. Pode-se observar que o grupo DINS apresentou o maior ganho de peso corporal em relação aos animais dos seguintes grupos: controle (DIOG) e grupos tratados com curcumina (DC90), piperina (DP20 e DP40) e associações curcumina e piperina (DC90P20 e DC90P40), como observado no 17º dia de tratamento. O grupo DC90 apresentou ganho de peso corporal significativamente maior como observado no 24º dia de tratamento em relação aos grupos DIOG, DP20, DP40, DC90P20 e DC90P40. O tratamento de ratos diabéticos com curcumina e associações, nas duas concentrações com piperina não promoveu benefícios em relação ao ganho de peso corporal quando comparados ao grupo DIOG, e ao contrário, os benefícios anteriormente promovidos pelo tratamento somente com curcumina foram prejudicados. De fato, a associação entre curcumina e piperina mostrou-se prejudicial em relação ao ganho de peso corporal, considerando que o grupo DC90P40 apresentou, especialmente nas três últimas determinações, valores de peso corporal menores em relação ao grupo DIOG (Figura 13B). Na Figura 14C, pode-se confirmar que os grupos DINS e DC90 apresentaram maior ganho de massa corporal em relação aos demais grupos, sendo que o grupo DC90P40 apresentou prejuízo no ganho de peso corporal quando comparado ao DC90, mantendo valores de peso corporal semelhantes ao grupo DIOG. Já os grupos DP20, DP40 e DC90P20 não apresentaram ganho de peso corporal significativo em relação ao grupo DIOG.

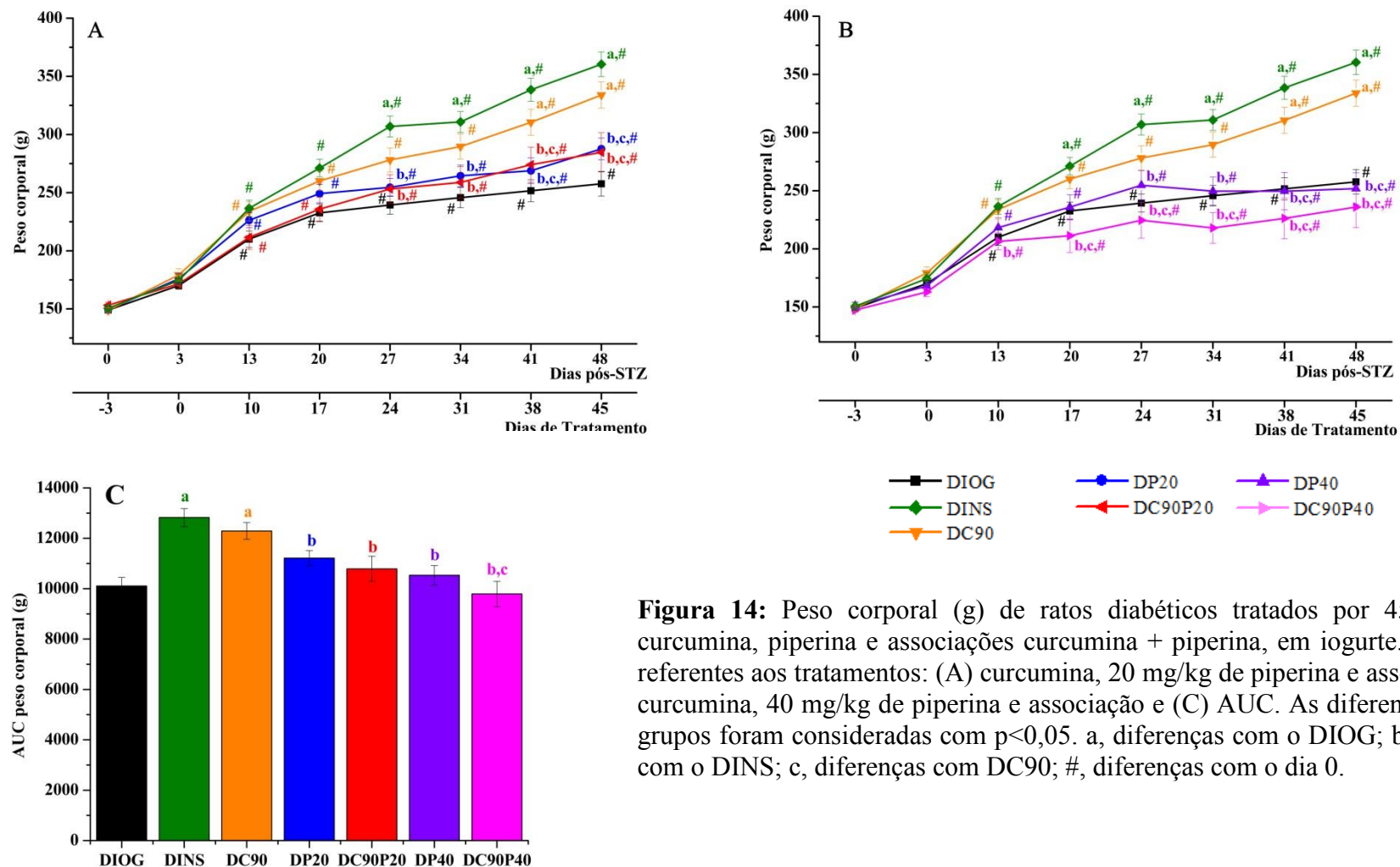


Figura 14: Peso corporal (g) de ratos diabéticos tratados por 45 dias com curcumina, piperina e associações curcumina + piperina, em iogurte. Resultados referentes aos tratamentos: (A) curcumina, 20 mg/kg de piperina e associação, (B) curcumina, 40 mg/kg de piperina e associação e (C) AUC. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com o DIOG; b, diferenças com o DINS; c, diferenças com DC90; #, diferenças com o dia 0.

Na Figura 15 estão apresentados os valores de consumo de ração dos animais diabéticos não tratados e tratados durante 45 dias. Animais do grupo DIOG apresentaram valores progressivamente maiores de consumo de ração, desde o início até o final do experimento, demonstrando o quadro de polifagia típico de ratos em modelo de diabetes mellitus estreptozotocínico. Alguns tratamentos promoveram benefícios no consumo de ração dos ratos diabéticos: animais dos grupos DINS, DC90, DP20 e DC90P20 (Figura 15A) apresentaram redução na consumo de ração de 35%, 28%, 22% e 26%, respectivamente, em relação aos animais do grupo DIOG. Já os tratamentos com 40mg de piperina/kg pc, sozinha (DP40) ou em associação com curcumina (DC90P40) não promoveram melhorias na consumo de ração dos ratos diabéticos, quando comparados ao grupo sem tratamento, DIOG (Figura 15B). Na Figura 15C, podemos observar que os tratamentos com curcumina (DC90), 20 mg de piperina/kg pc (DP20) e sua associação (DC90P20) promoveram redução na consumo de ração dos animais diabéticos, aproximando-se aos valores observados no grupo DINS, enquanto que os tratamentos com 40 mg de piperina/kg pc (DP40) e associação (DC90P40) não promoveram benefícios neste parâmetro, quando comparado aos demais grupos.

Os resultados relacionados aos valores de ingestão hídrica de animais diabéticos não tratados e tratados estão apresentados na Figura 16. Animais do grupo DIOG apresentaram um aumento progressivo na ingestão hídrica desde o início até o término do período experimental, representando a polidipsia característica do estado diabético em animais que não receberam tratamento. O tratamento com insulina promoveu redução na ingestão hídrica de ratos diabéticos, como observado no 10º dia de tratamento, em comparação aos demais grupos estudados. Já o tratamento com curcumina (DC90) foi capaz de promover redução significativa na ingestão hídrica de ratos diabéticos, como observado no 24º dia de tratamento, em relação aos valores observados nos grupos DIOG, DP40 e DC90P40, com redução de 53% em relação ao grupo DIOG após 45 dias de tratamento. O tratamento com curcumina associada a 20 mg de piperina/kg pc promoveu redução de 34% na ingestão hídrica, após 45 dias de tratamento, em comparação ao grupo DIOG, demonstrando que a associação não foi capaz de promover benefícios adicionais aos já encontrados no grupo tratado somente com curcumina (DC90). Animais pertencentes aos grupos tratados com piperina (DP20 e DP40) e com a associação curcumina e 40 mg de piperina/kg pc (DC90P40) não apresentaram redução na ingestão hídrica em relação ao grupo DIOG. Na Figura 16C,

pode-se observar que o grupo DINS apresenta a maior redução na ingestão hídrica. Os grupos DC90 e DC90P20 também apresentaram redução na ingestão hídrica, contudo não com a mesma eficiência com àquela como o grupo DINS. Os demais tratamentos (DP20, DP40 e DC90P40) não promoveram redução na ingestão hídrica de animais diabéticos, comportando-se semelhantemente ao grupo diabético não tratado (DIOG).

Os valores relacionados ao volume urinário de ratos diabéticos não tratados e tratados durante os 45 dias encontram-se na Figura 17. Acompanhando o mesmo perfil observado com a ingestão hídrica, o grupo DIOG apresentou aumento progressivo no volume urinário, durante todo o experimento, mostrando a poliúria típica de ratos submetidos ao modelo de diabetes estreptozotocínico. O tratamento de ratos diabéticos com insulina promoveu a maior redução no volume urinário, como observado no 10º dia de tratamento, comparado aos demais grupos. O volume urinário de animais diabéticos tratados com curcumina (DC90) mostrou-se reduzido em relação aos valores observados nos grupos DIOG, DP40 e DC90P40 (Figura 16B), como observado no 10º dia de tratamento, com redução de 58% em relação ao grupo DIOG após 45 dias de tratamento. Os grupos DP20 e DC90P20 (Figura 17A) apresentaram redução no volume urinário de 26 e 35%, respectivamente, quando comparados ao grupo DIOG ao término do tratamento. Os tratamentos com 40 mg de pipeina/kg pc (DP40) e sua associação com curcumina (DC90P40) não apresentaram nenhum benefício neste parâmetro, em comparação aos animais diabéticos sem tratamento. Na Figura 16C, assim como observado na consumo de ração, podemos observar que o grupo DINS apresentou a maior redução no volume urinário, e dentre os demais tratamentos, os grupos DC90 e DC90P20 apresentaram redução no volume urinário significativa em relação ao grupo DIOG. Os grupos DP20, DP40 e DC90P40 apresentaram valores de volume urinário semelhantes aos observados no grupo DIOG.

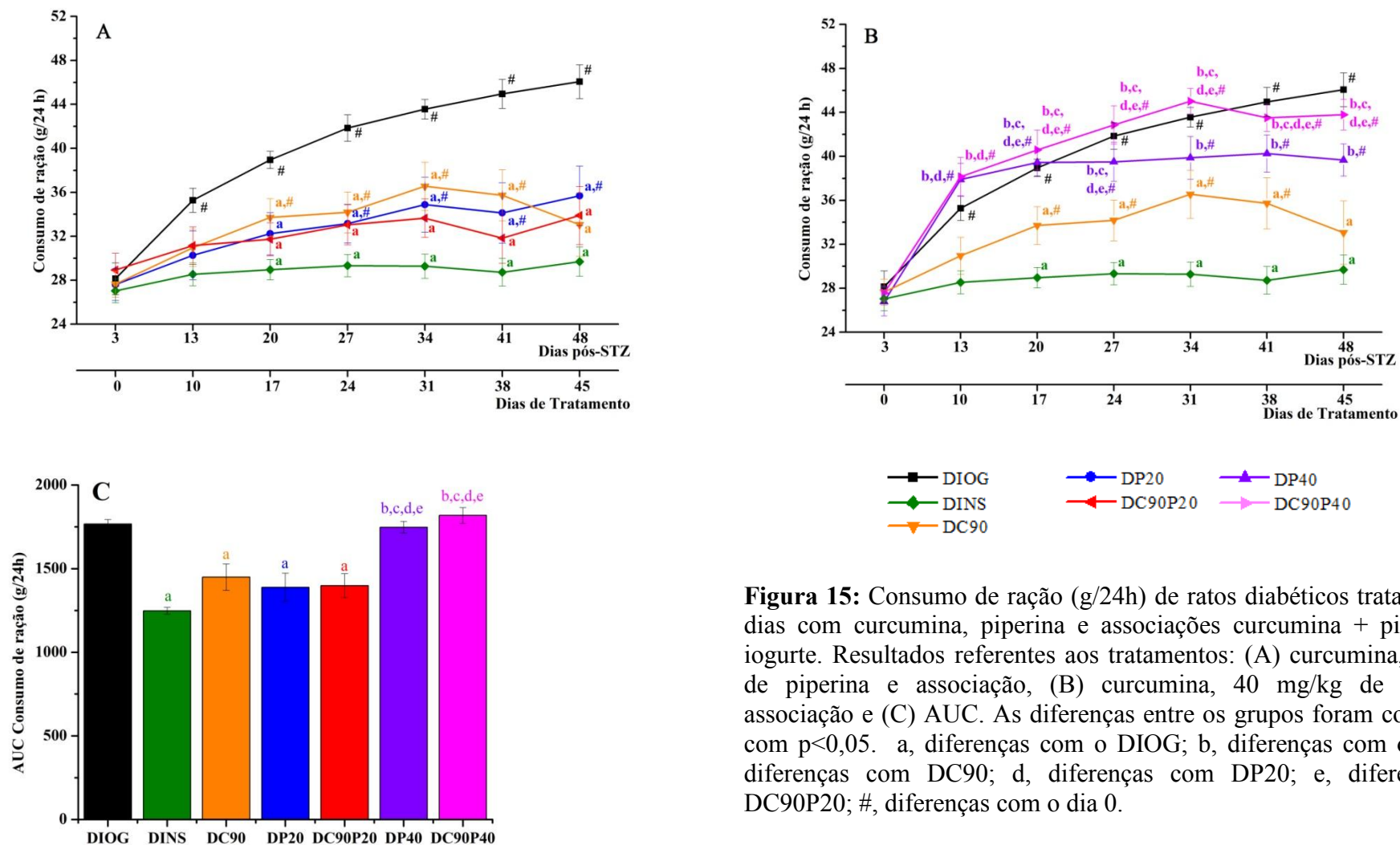


Figura 15: Consumo de ração (g/24h) de ratos diabéticos tratados por 45 dias com curcumina, piperina e associações curcumina + piperina, em iogurte. Resultados referentes aos tratamentos: (A) curcumina, 20 mg/kg de piperina e associação, (B) curcumina, 40 mg/kg de piperina e associação e (C) AUC. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com o DIOG; b, diferenças com o DINS; c, diferenças com DC90; d, diferenças com DP20; e, diferenças com DC90P20; #, diferenças com o dia 0.

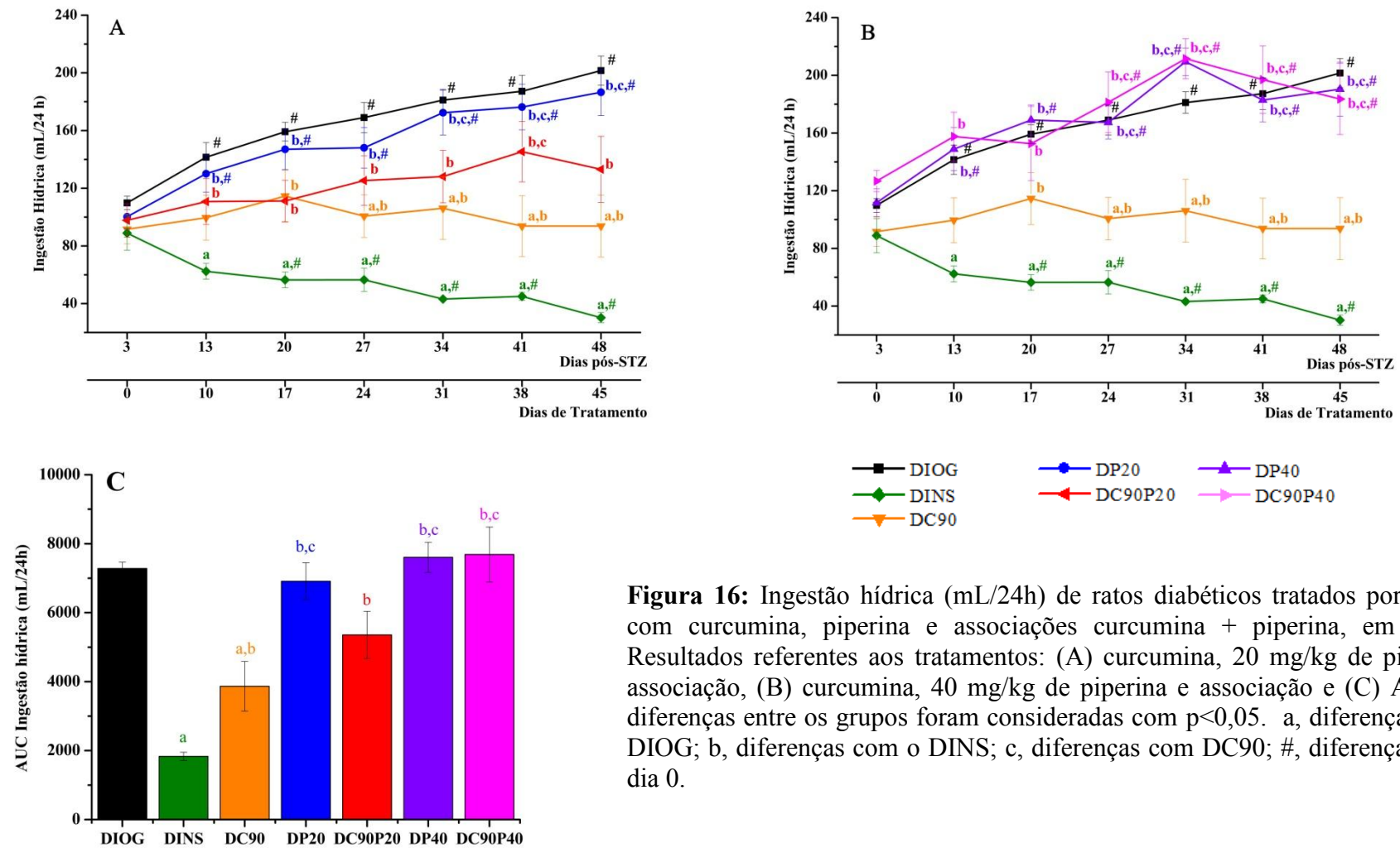


Figura 16: Ingestão hídrica (mL/24h) de ratos diabéticos tratados por 45 dias com curcumina, piperina e associações curcumina + piperina, em iogurte. Resultados referentes aos tratamentos: (A) curcumina, 20 mg/kg de piperina e associação, (B) curcumina, 40 mg/kg de piperina e associação e (C) AUC. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com o DIOG; b, diferenças com o DINS; c, diferenças com DC90; #, diferenças com o dia 0.

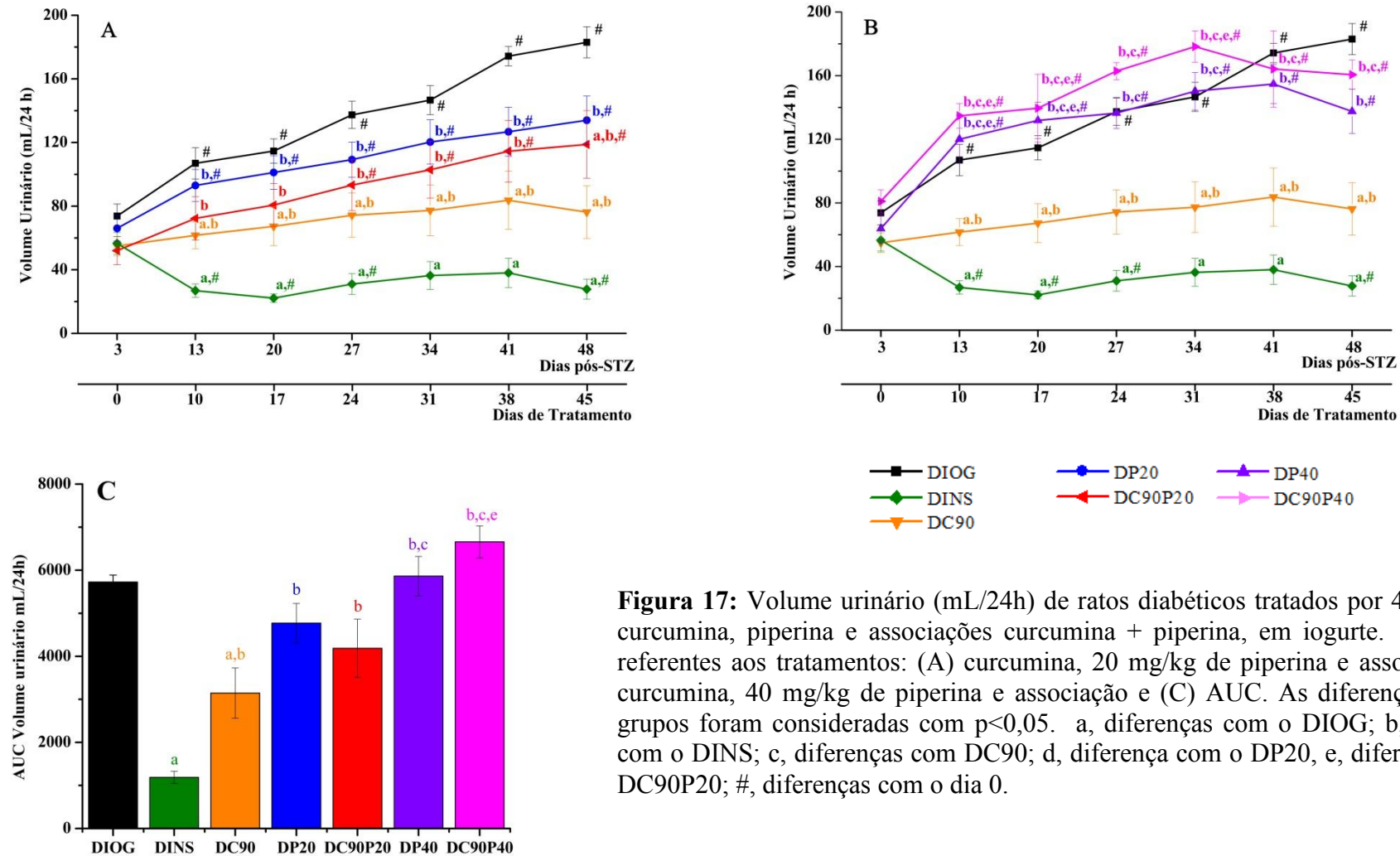


Figura 17: Volume urinário (mL/24h) de ratos diabéticos tratados por 45 dias com curcumina, piperina e associações curcumina + piperina, em iogurte. Resultados referentes aos tratamentos: (A) curcumina, 20 mg/kg de piperina e associação, (B) curcumina, 40 mg/kg de piperina e associação e (C) AUC. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com o DIOG; b, diferenças com o DINS; c, diferenças com DC90; d, diferença com o DP20; e, diferença com o DC90P20; #, diferenças com o dia 0.

Na Tabela 1 estão apresentados os pesos dos músculos esqueléticos *extensor digitorum longus* (EDL) e *soleus* e dos tecidos adiposos brancos epididimal e retroperitoneal de ratos diabéticos pertencentes aos diferentes grupos experimentais no final dos 45 dias de tratamento. Acompanhando o mesmo perfil de resposta observado no peso corporal, ratos diabéticos não tratados (DIOG) apresentaram peso de tecidos musculares e adiposos reduzidos, mostrando que nos ratos diabéticos observa-se um estado de catabolismo típico de deficiência insulínica, que certamente contribui para o menor ganho de peso corporal em animais (Figura 14). Como esperado, o tratamento de ratos diabéticos com insulina promoveu maior ganho de massa muscular e adiposa, em relação aos demais tratamentos utilizados, explicando o maior ganho de peso corporal observado em animais do grupo DINS. O tratamento de ratos diabéticos com curcumina (DC90) também foi capaz de promover ganho de massa adiposa e muscular maior em relação ao grupo DIOG. A associação de curcumina e 20mg de piperina/kg pc (DC90P20) promoveu prejuízos no ganho de massa muscular e adiposa de ratos diabéticos em relação ao efeito observado no tratamento somente com curcumina (DC90), uma vez que os pesos dos tecidos adiposos e musculares do grupo DC90P20 foram semelhantes aos valores observados em DIOG. No grupo DC90P40, estes prejuízos foram ainda maiores, em relação ao tratamento com curcumina somente. Estes efeitos da associação curcumina e piperina, nas duas doses estudadas, refletiram-se no prejuízo observado no ganho de peso corporal de animais destes grupos, em relação ao ganho de peso corporal do grupo DC90. Animais tratados somente com piperina, para ambas as doses, apresentaram valores semelhantes, de peso dos músculos e tecidos adiposos, em relação àqueles observados no grupo DIOG.

Tabela 1: Peso dos músculos esqueléticos e tecidos adiposos brancos de animais diabéticos não tratados e tratados com curcumina, piperina e associações durante 45 dias.

Grupo	Músculos esqueléticos		Tecidos adiposos brancos	
	<i>Soleus</i> (g)	EDL (g)	Epididimal (g)	Retroperitoneal (g)
DIOG	0,123±0,007	0,109±0,008	1,807±0,239	1,038±0,229
DINS	0,163±0,005 ^a	0,168±0,005 ^a	5,259±0,498 ^a	3,807±0,565 ^a
DC90	0,139±0,007 ^b	0,141±0,007 ^{a,b}	3,386±0,480 ^{a,b}	2,578±0,535 ^{a,b}
DP20	0,116±0,006 ^b	0,109±0,008 ^{b,c}	1,763±0,203 ^{b,c}	0,703±0,158 ^{b,c}
DC90P20	0,124±0,008 ^b	0,119±0,009 ^{b,c}	2,512±0,442 ^b	1,266±0,406 ^{b,c}
DP40	0,113±0,008 ^b	0,094±0,009 ^{b,c}	1,552±0,240 ^{b,c}	0,685±0,210 ^{b,c}
DC90P40	0,097±0,005 ^{b,c}	0,078±0,006 ^{b,c,e}	1,212±0,083 ^{b,c}	0,341±0,199 ^{b,c}

As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0.05$. a, diferenças com o DIOG; b, diferenças com o DINS; c, diferenças com DC90; d, diferença com o DP20, e, diferença com o DC90P20; #, diferenças com o dia 0.

4.2. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE RATOS DIABÉTICOS TRATADOS COM CURCUMINA, PIPERINA E ASSOCIAÇÕES

Na Figura 18 pode ser observado que a indução do diabetes em ratos foi eficaz, uma vez que todos os grupos apresentaram valores médios de glicemia de aproximadamente 440 mg/dL no início do experimento, confirmando o pareamento e permitindo assim comparações temporais inter e intra grupos no decorrer do experimento, e consequentemente, após o início dos diversos tratamentos. O grupo DIOG, durante todo o período experimental, apresentou um aumento progressivo na concentração de glicose, mostrando a piora do estado diabético nos animais não tratados. Como esperado, o tratamento de ratos diabéticos com insulina foi eficaz na redução da glicemia logo após o início do tratamento, mantendo a glicemia durante os 45 dias de tratamento em valores próximos à normalidade. O tratamento com 90mg de curcumina/kg pc (DC90) também foi capaz de promover redução na glicemia de animais diabéticos como observado no 10º dia de tratamento em relação ao grupo DIOG, chegando à redução de 50% ao final do experimento. A associação da curcumina

com 20mg de piperina/kg pc (DC90P20) não promoveu nenhuma alteração adicional na glicemia em comparação ao grupo DC90, sendo observados nestes grupos glicemias semelhantes (Figura 18A). Contudo, a associação de curcumina com 40mg de piperina/kg pc (DC90P40), além de não promover nenhum efeito aditivo àquele da curcumina sozinha, contrariamente apresentou uma piora no estado diabético, uma vez que os valores de glicemia foram 88% maiores em relação ao grupo DC90 após 45 dias de tratamento, portanto esta dose de piperina anulou o benéfico da curcumina sobre a glicemia dos ratos diabéticos (Figura 18B). O grupo DP20 apresentou redução na glicemia de 39% quando comparado ao grupo DIOG ao final dos 45 dias de tratamento, um perfil de resposta semelhante ao observado no grupo DC90 (Figura 18A), enquanto que o grupo DP40 não apresentou nenhuma redução na glicemia, apresentando valores semelhantes àqueles observados no grupo DIOG (Figura 18B). Na Figura 17C, pode-se observar que o tratamento com insulina promoveu redução de 75% na glicemia em relação ao DIOG e, apesar de os tratamentos com curcumina, 20 mg de piperina/kg pc e associações não promoverem redução na glicemia em concentrações semelhantes ao grupo DINS, esses tratamentos foram capazes de reduzir a glicemia em 34, 36 e 28%, respectivamente, em relação ao DIOG. Já os tratamentos com 40 mg de piperina/kg pc e associação com curcumina não promoveram redução na glicemia em relação ao grupo DIOG.

Os valores de glicosúria dos animais diabéticos não tratados e submetidos aos diversos tratamentos por 45 dias estão apresentados na Figura 19. O grupo DIOG mostrou um aumento progressivo nos valores de glicosúria, um perfil de resposta semelhante ao observado na glicemia, representando uma piora progressiva do estado diabético dos animais não tratados. O tratamento dos ratos diabéticos com insulina promoveu redução na concentração urinária de glicose como observado no 10º dia de tratamento e manteve-se constante, com redução de 95% em relação ao grupo DIOG até o final do experimento. O grupo DC90 apresentou valores de glicosúria praticamente constantes durante o período experimental, assim, não foi observada a piora neste parâmetro, tal como ocorreu com o grupo DIOG, alcançando redução de 73% ao final do experimento em relação ao grupo DIOG. O grupo DC90P20 (Figura 19A), assim como observado na glicemia, apresentou redução na glicosúria em concentrações semelhantes aos encontrados no grupo DC90, já o grupo DC90P40 (Figura 19B) não apresentou a redução da glicosúria como observado no grupo DC90, apresentando

glicosúria semelhantes aos encontrados no grupo DIOG. O grupo DP20 (Figura 19A) apresentou valores de glicosúria baixos durante todo o período experimental, com redução de 38% em relação ao grupo DIOG no 45º dia de tratamento. O grupo DP40 (Figura 19B) não apresentou nenhuma redução de glicosúria, com valores semelhantes àqueles encontrados no grupo DIOG. Na Figura 19C, assim como observado para glicemia, os grupos DC90, DP20 e DC90P20 apresentaram redução na glicosúria de 59, 31 e 28%, respectivamente, em relação ao DIOG. Já os grupos DP40 e DC90P40 não apresentaram nenhuma redução na glicosúria, comportando-se de forma semelhante ao grupo DIOG.

A concentração plasmática de TAG de ratos diabéticos durante os 45 dias de tratamento estão apresentados na Figura 20. O grupo DIOG apresentou aumento progressivo na concentração de TAG durante todo o período experimental. O grupo DINS apresentou redução na concentração de TAG quando comparado ao grupo DIOG, como observado no 24º dia de tratamento, com redução de 66% ao término do tratamento. O grupo DC90 apresentou um comportamento semelhante ao grupo DINS em relação a concentração de TAG, com valores 60% menores em relação aos animais não tratados ao término do tratamento. Apesar da concentração de TAG apresentarem-se maiores no grupo DC90P20 em relação ao grupo DC90, estes valores ainda foram estatisticamente menores em relação ao DIOG. O grupo DC90P40 não apresentou melhorias neste parâmetros, sendo encontrados, após 45 dias, com valores estatisticamente maiores aos encontrados nos grupos DINS e DC90. Os grupos DP20 e DP40 não apresentaram aumento progressivo nas concentrações plasmáticas de TAG, mantendo as concentrações constantes durante os 45 dias de tratamento, e menores que o grupo DIOG, porém maiores que o grupo DC90 e DINS. Figura 20C pode-se observar que o tratamento com insulina (DINS) e curcumina (DC90) promoveu uma redução de 52 e 44% nas concentrações de TAG quando comparados ao grupo DIOG. Os grupos tratados com piperina (DP20 e DP40) e suas associações com 90 mg de curcumina/kg pc a (DC90P20 e DC90P40) promoveram reduções significativas nas concentrações de TAG de 32, 34, 32 e 22%, respectivamente quando comparado ao grupo DIOG.

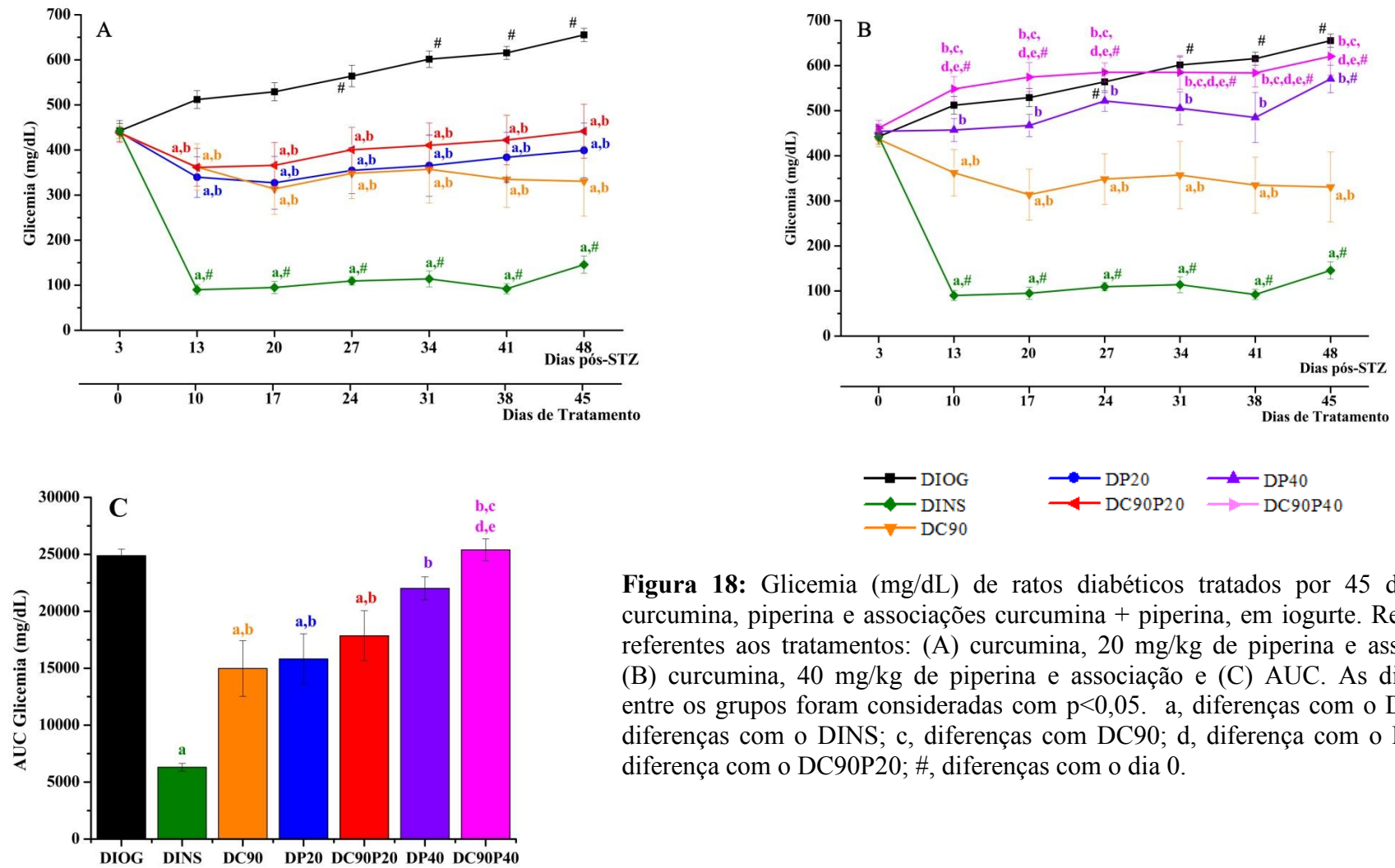


Figura 18: Glicemia (mg/dL) de ratos diabéticos tratados por 45 dias com curcumina, piperina e associações curcumina + piperina, em iogurte. Resultados referentes aos tratamentos: (A) curcumina, 20 mg/kg de piperina e associação, (B) curcumina, 40 mg/kg de piperina e associação e (C) AUC. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com o DIOG; b, diferenças com o DINS; c, diferenças com DC90; d, diferença com o DP20, e, diferença com o DC90P20; #, diferenças com o dia 0.

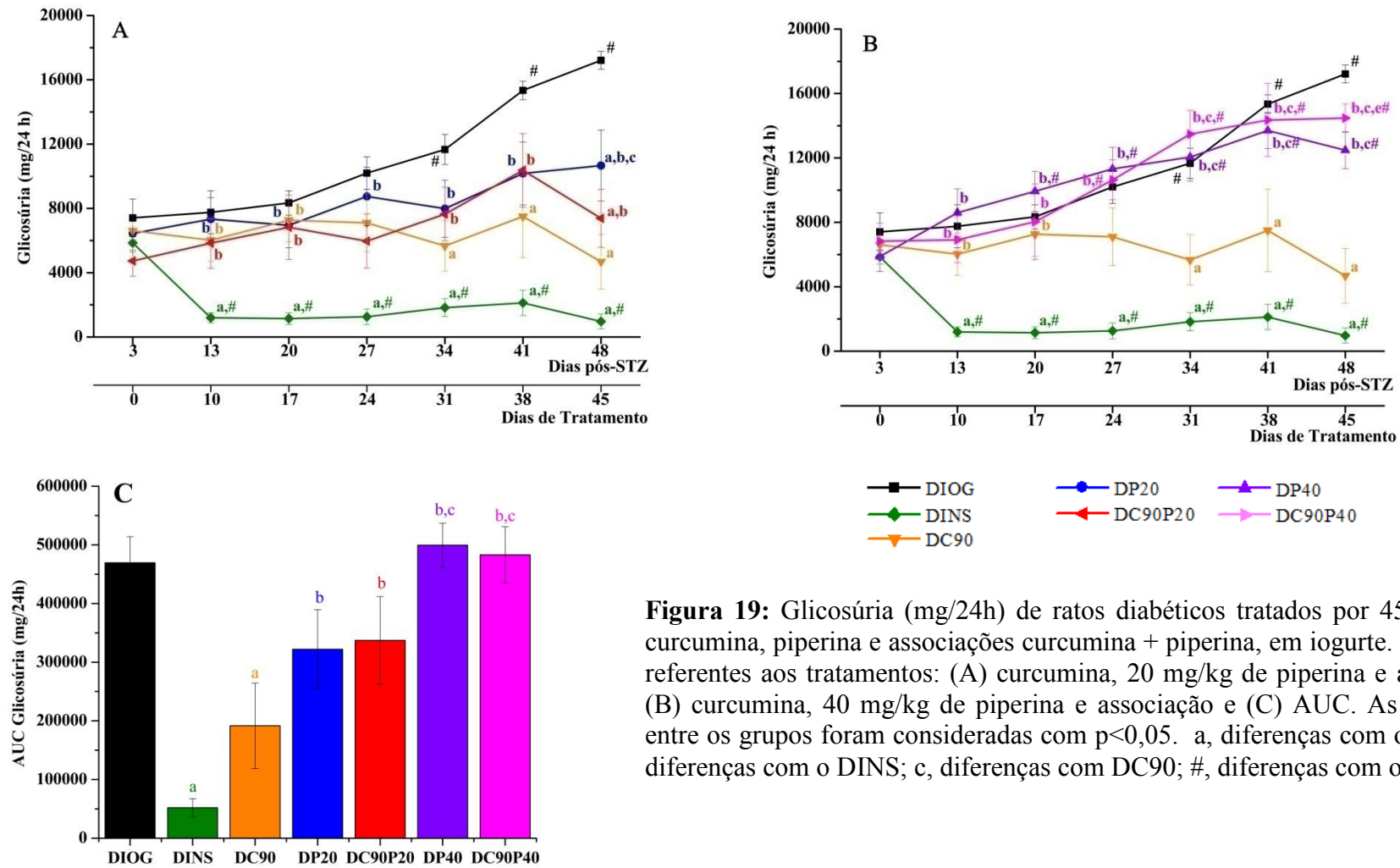


Figura 19: Glicosúria (mg/24h) de ratos diabéticos tratados por 45 dias com curcumina, piperina e associações curcumina + piperina, em iogurte. Resultados referentes aos tratamentos: (A) curcumina, 20 mg/kg de piperina e associação, (B) curcumina, 40 mg/kg de piperina e associação e (C) AUC. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com o DIOG; b, diferenças com o DINS; c, diferenças com DC90; #, diferenças com o dia 0.

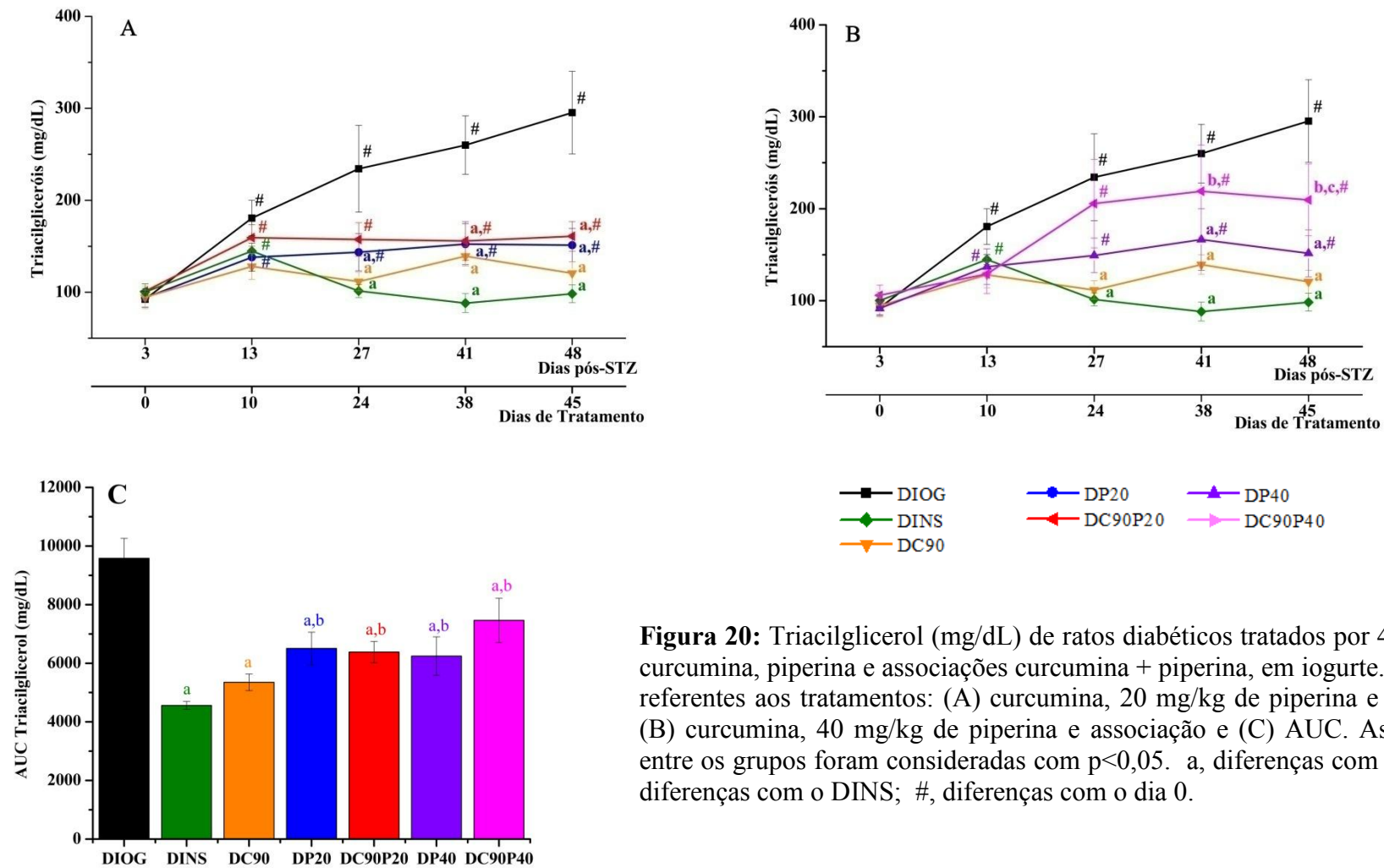


Figura 20: Triacilglicerol (mg/dL) de ratos diabéticos tratados por 45 dias com curcumina, piperina e associações curcumina + piperina, em iogurte. Resultados referentes aos tratamentos: (A) curcumina, 20 mg/kg de piperina e associação, (B) curcumina, 40 mg/kg de piperina e associação e (C) AUC. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com o DIOG; b, diferenças com o DINS; #, diferenças com o dia 0.

Na Figura 21 estão apresentadas as concentrações plasmáticas de colesterol total de ratos diabéticos tratados e não tratados durante os 45 dias. É possível observar que os ratos diabéticos não tratados apresentaram concentrações de colesterol total elevadas ao longo de todo o período experimental, alcançando valores de aproximadamente 90 mg/dL ao final do tratamento em relação aos valores iniciais de 75 mg/dL. Animais diabéticos tratados com insulina (DINS) ou com 90 mg de curcumina/kg pc (DC90) apresentaram queda progressiva nas concentrações de colesterol total, como observado no 10º dia de tratamento, em relação ao início do experimento, apresentando concentrações menores de colesterol quando comparados ao grupo controle DIOG em todos os períodos avaliados. O grupo DC90P20 (Figura 21A) apresentou comportamento semelhante ao grupo DC90, com valores significativamente menores de colesterol plasmático em relação aos valores de DIOG, como observado no 10º dia de tratamento. O grupo DC90P40 (Figura 21B), apesar de apresentar valores um pouco mais elevados de colesterol em relação aos grupos DC90 e DC90P20, estes não foram estatisticamente maiores, contudo o grupo apresentou uma redução significativa nas concentrações de colesterol total quando comparado ao grupo DIOG, após 45 dias de tratamento. Os grupos DP20 e DP40 apresentam queda semelhantemente nas concentrações plasmáticas de colesterol, como observado no 10º dia e permaneceu até o final do tratamento, com redução de aproximadamente 20% em ambos os grupos, em relação ao grupo DIOG, após 45 dias de tratamento. Figura 21C pode observar que o tratamento com insulina promoveu uma redução nas concentrações de colesterol total em 25% quando comparado ao grupo DIOG. Os grupos DC90, DP20 e DC90P20 apresentaram uma redução de 22, 15 e 18%, respectivamente, quando comparado ao grupo DIOG. Os tratamentos com 40 mg de piperina/kg pc (DP40) e sua associação com curcumina (DC90P40) apresentaram uma redução de 13 e 14%, respectivamente quando comparados ao grupo DIOG.

Na Figura 22 estão apresentados os valores de colesterol-HDL de animais diabéticos tratados e não tratados durante os 45 dias de experimento. Não houve qualquer alteração nas concentrações plasmáticas de colesterol-HDL de ratos diabéticos submetidos aos diferentes tratamentos, em relação aos valores encontrados em animais diabéticos não tratados, durante todo o período analisado.

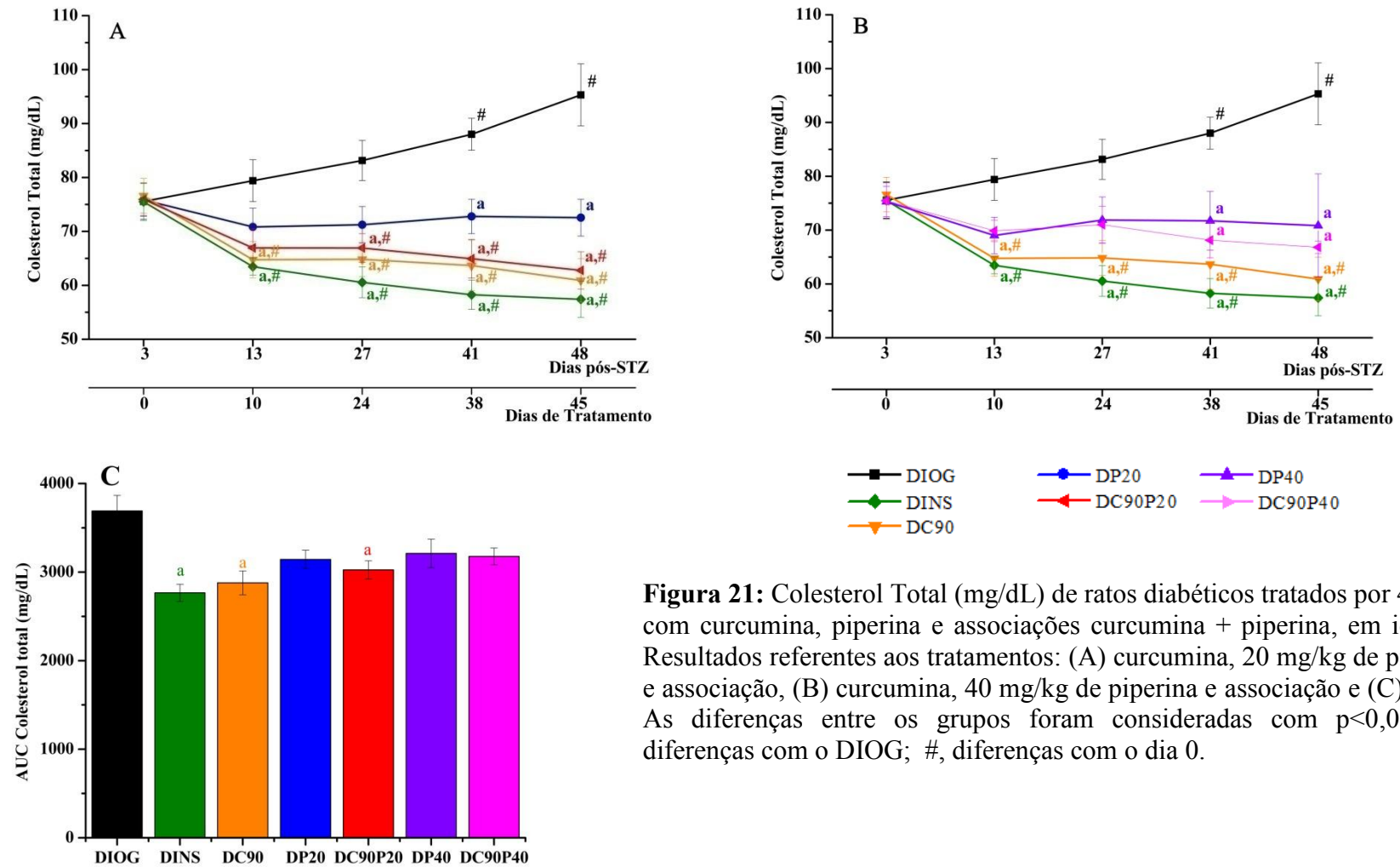


Figura 21: Coolesterol Total (mg/dL) de ratos diabéticos tratados por 45 dias com curcumina, piperina e associações curcumina + piperina, em iogurte. Resultados referentes aos tratamentos: (A) curcumina, 20 mg/kg de piperina e associação, (B) curcumina, 40 mg/kg de piperina e associação e (C) AUC. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com o DIOG; #, diferenças com o dia 0.

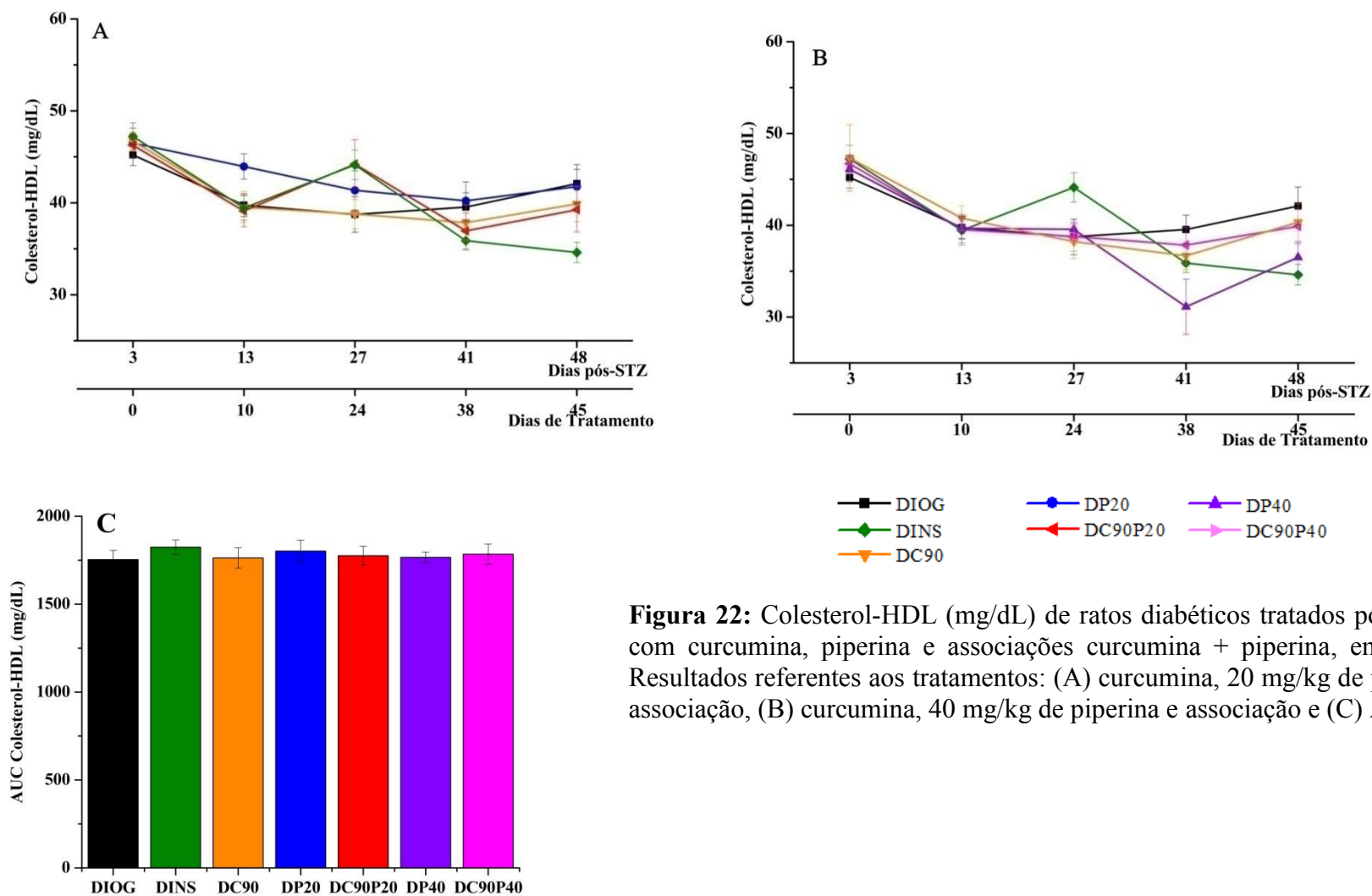


Figura 22: Colesterol-HDL (mg/dL) de ratos diabéticos tratados por 45 dias com curcumina, piperina e associações curcumina + piperina, em iogurte. Resultados referentes aos tratamentos: (A) curcumina, 20 mg/kg de piperina e associação, (B) curcumina, 40 mg/kg de piperina e associação e (C) AUC.

Nas Figuras 23, 24 e 25 estão apresentados os resultados referentes a atividade plasmática das enzimas ALT, AST e ALP, respectivamente, biomarcadores de lesão/disfunção hepática, de ratos diabéticos não tratados ou submetidos aos diversos tratamentos durante 45 dias. O diabetes experimental em ratos (representado por DIOG) foi capaz de promover alterações importantes nas atividades plasmáticas destes marcadores de lesão hepática, com aumento progressivo nas atividades de ALT, AST e ALP dos animais diabéticos em relação ao início do experimento, evidenciando assim que a manutenção da hiperglicemia por longos períodos é capaz de promover danos ao tecido hepático, provavelmente relacionados ao estresse oxidativo. Estes achados corroboram dados anteriores de nosso laboratório (MORI et al., 2003; GUTIERRES et al., 2012).

A atividade de ALT no plasma dos animais diabéticos não tratados e tratados por 45 dias estão apresentados na Figura 23. O tratamento de ratos diabéticos com insulina foi capaz de promover redução significativa na atividade de ALT, como observado no 17º dia de tratamento, alcançando redução de 65% nos níveis desta enzima em relação ao grupo DIOG ao final dos 45 dias de tratamento. O grupo DC90 apresentou atividades praticamente constantes de ALT durante os 45 dias de tratamento, demonstrando assim um efeito “hepatoprotetor” da curcumina nos animais diabéticos. O tratamento de ratos diabéticos com a associação da curcumina e piperina (DC90P20, Figura 23A), corroborando com os parâmetros previamente analisados, não mostraram qualquer benefício adicional ao efeito da curcumina sobre a atividade de ALT. No entanto, a associação da curcumina e piperina (DC90P40, Figura 23B) mostrou-se prejudicial, uma vez que o grupo DC90P40 apresentou elevação na atividade de ALT como observado no 17º de tratamento, alcançando valores significativamente acima daqueles observados no grupo DIOG, demonstrando assim que o tratamento com esta associação foi capaz de promover prejuízos hepáticos adicionais aos observados com o estado diabético “*per se*”. O grupo DP20 (Figura 23A) apresentou atividades plasmáticas de ALT constantes durante os 45 dias de tratamento, tal como observado nos grupos DC90 e DC90P20, apresentando redução de 50% em comparação ao grupo DIOG ao final dos 45 dias de tratamento. O grupo DP40 (Figura 23B) não apresentou nenhuma alteração em relação a atividade plasmática de ALT. Na Figura 23C, pode-se observar que os tratamentos com curcumina (DC90), piperina (DP20) e associação (DC90P20) promoveram redução na atividade plasmática de ALT de ratos diabéticos, de 40, 39 e

31%, respectivamente, em relação ao DIOG. O tratamento com 40 mg de piperina/kg pc não promoveu redução na atividade de ALT, sendo que o grupo DP40 permaneceu com valores de ALT próximos ao DIOG. O tratamento com a associação entre curcumina e 40 mg de piperina/kg pc (DC90P40) promoveu aumento significativo na atividade plasmática de ALT quando comparados aos valores observados em todos os grupos analisados, incluindo o DIOG.

A atividade plasmática de AST de animais diabéticos nos diferentes tratamentos está apresentados na Figura 24. A atividade de AST foi mantida baixa ao longo dos 45 dias de tratamento com insulina, sendo observada redução de 54% em relação ao grupo DIOG ao final do experimento. O tratamento com 90mg de curcumina/kg pc (DC90) também foi capaz de manter constantes as atividades de AST de ratos diabéticos durante todo o período de tratamento, alcançando redução de 43% em relação aos animais diabéticos não tratados, após 45 dias. A associação da curcumina e piperina (DC90P20, Figura 24A) não promoveu nenhum benefício adicional nos níveis de AST de ratos diabéticos, em relação ao tratamento com curcumina somente, durante o período experimental. Já a associação da curcumina e piperina (DC90P40, Figura 24B) foi capaz de impedir os benefícios promovidos nos níveis de AST pelo tratamento com curcumina sozinha, uma vez que a atividade desta enzima nestes animais foram semelhantes àqueles observados nos animais diabéticos sem tratamento (DIOG), durante o período experimental. Na Figura 24C observamos que o tratamento com insulina promove a redução na atividade de AST de 33% em relação ao grupo DIOG. Os tratamentos com curcumina (DC90), 20 mg de piperina/kg pc (DP20) e suas associações (DC90P20) reduziram em 27, 24 e 23%, respectivamente. Já os grupos DP40 e DC90P40 não apresentaram nenhuma redução nos níveis de AST, comportando-se de forma semelhante ao grupo DIOG.

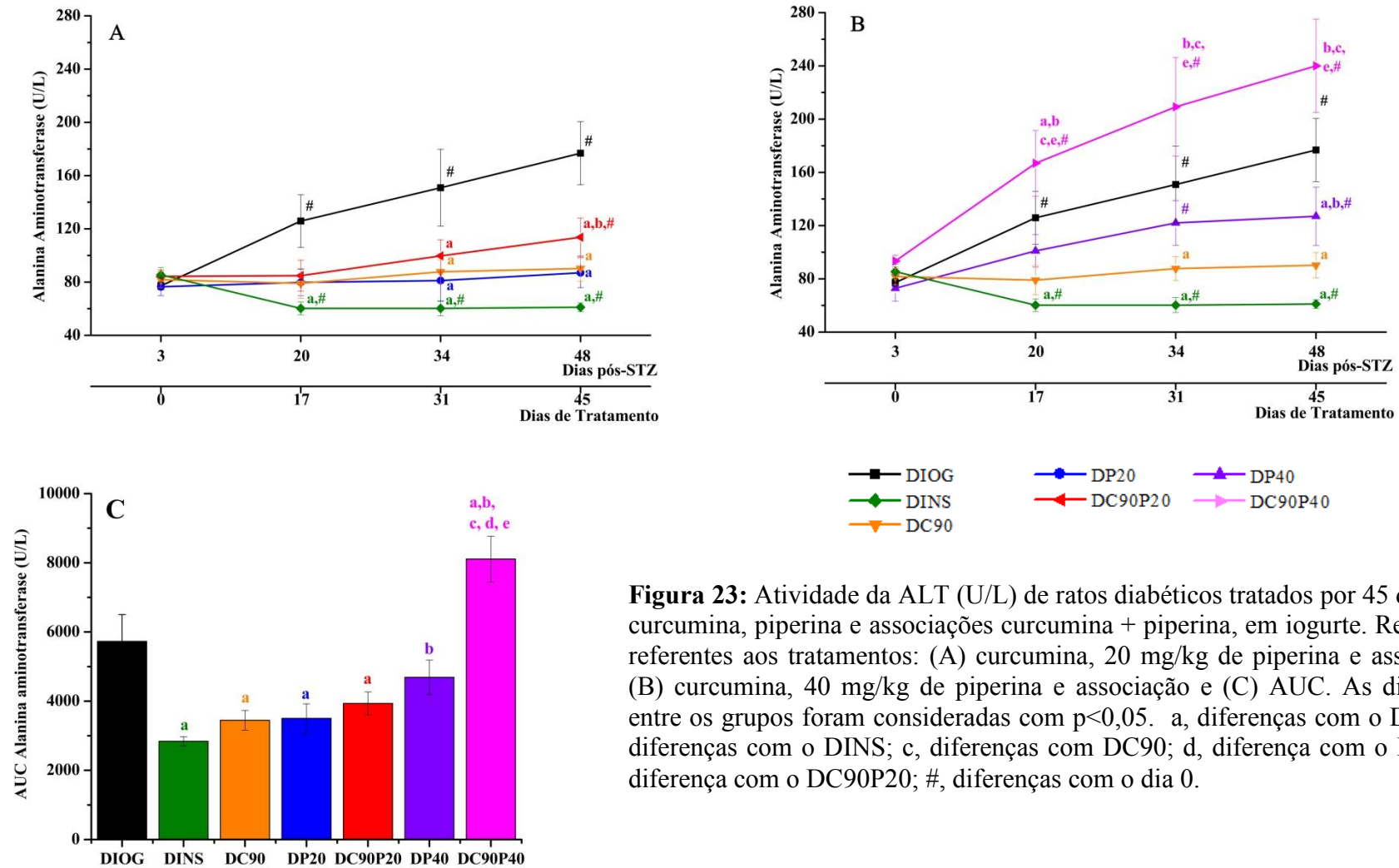


Figura 23: Atividade da ALT (U/L) de ratos diabéticos tratados por 45 dias com curcumina, piperina e associações curcumina + piperina, em iogurte. Resultados referentes aos tratamentos: (A) curcumina, 20 mg/kg de piperina e associação, (B) curcumina, 40 mg/kg de piperina e associação e (C) AUC. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com o DIOG; b, diferenças com o DINS; c, diferenças com DC90; d, diferença com o DP20, e, diferença com o DC90P20; #, diferenças com o dia 0.

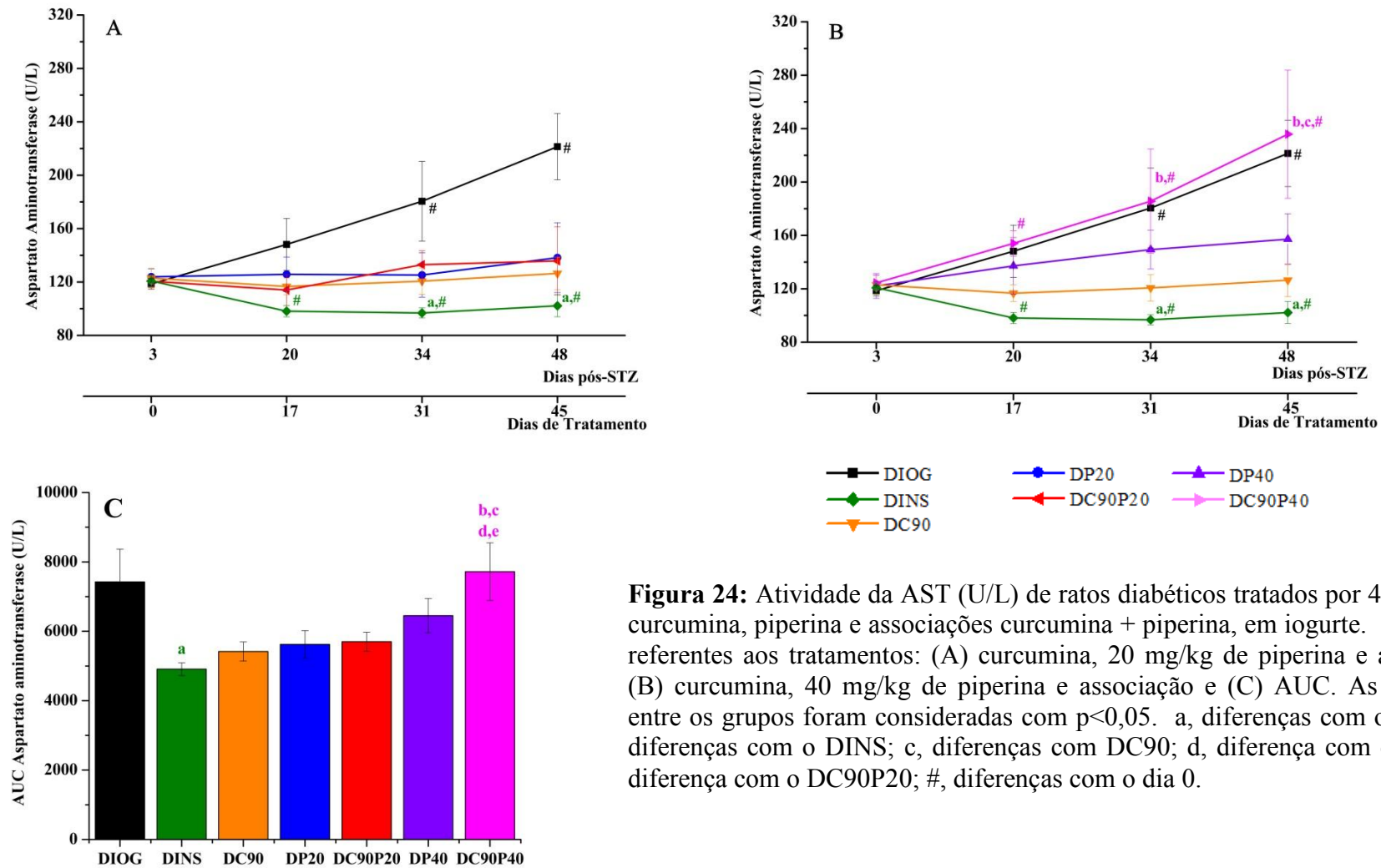


Figura 24: Atividade da AST (U/L) de ratos diabéticos tratados por 45 dias com curcumina, piperina e associações curcumina + piperina, em iogurte. Resultados referentes aos tratamentos: (A) curcumina, 20 mg/kg de piperina e associação, (B) curcumina, 40 mg/kg de piperina e associação e (C) AUC. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com o DIOG; b, diferenças com o DINS; c, diferenças com DC90; d, diferença com o DP20, e, diferença com o DC90P20; #, diferenças com o dia 0.

Na Figura 25 estão apresentadas as atividades plasmáticas de ALP de ratos diabéticos durante os 45 dias de tratamento. O grupo DINS apresentou queda progressiva na atividade de ALP, alcançando redução de 74% em relação ao grupo DIOG após 45 dias de tratamento. O tratamento com curcumina (DC90) mostrou-se eficaz na prevenção das alterações promovidas pelo diabetes sobre a atividade de ALP, uma vez que a atividade desta enzima apresentou-se praticamente constante no plasma de animais diabéticos tratados somente com curcumina, durante todo o experimento. A associação da curcumina com 20mg de piperina/kg pc (DC90P20, Figura 25A) não foi capaz de promover benefícios adicionais àqueles já observados no grupo DC90, apesar da leve tendência a valores maiores na atividade de ALP no grupo DC90P20, no entanto estes permaneceram menores em relação ao DIOG durante todo o experimento. Já a associação da curcumina com 40mg de piperina/kg pc (DC90P40, Figura 25B) mostrou-se prejudicial em relação a atividade de ALP, tal como anteriormente observado para as enzimas ALT e AST, uma vez que os benefícios promovidos pelo tratamento com curcumina não foram mais observados; a atividade de ALP de ratos diabéticos do grupo DC90P40 foram progressivamente maiores como observado no 17º dia de tratamento, apresentando valores semelhantes aos observados no grupo DIOG. O tratamento com 20mg de piperina/kg pc sozinha (Figura 25A) também foi capaz de prevenir as alterações causadas pelo diabetes a atividade de ALP, uma vez que o grupo DP20 apresentou atividade constante desta enzima durante todo o período experimental, com redução de 40% quando comparado ao grupo DIOG após 45 dias de tratamento. Já os animais tratados com 40mg/kg de piperina sozinha (DP40, Figura 25B) apresentaram níveis um pouco elevados em relação ao grupo DP20, não apresentando diferenças estatísticas entre eles. Na Figura 25C, pode-se observar que o grupo DINS apresentou redução na atividade de ALP de 57% em relação ao grupo DIOG. Os tratamentos com curcumina (DC90), 20 mg de piperina/kg pc (D020) e sua associação (DC90P20) também promoveram a redução na atividade de ALP em 43, 38 e 28% respectivamente quando comparado ao DIOG. Os grupos DP40 e DC90P40 não apresentaram redução nesse parâmetro permanecendo semelhante ao DIOG

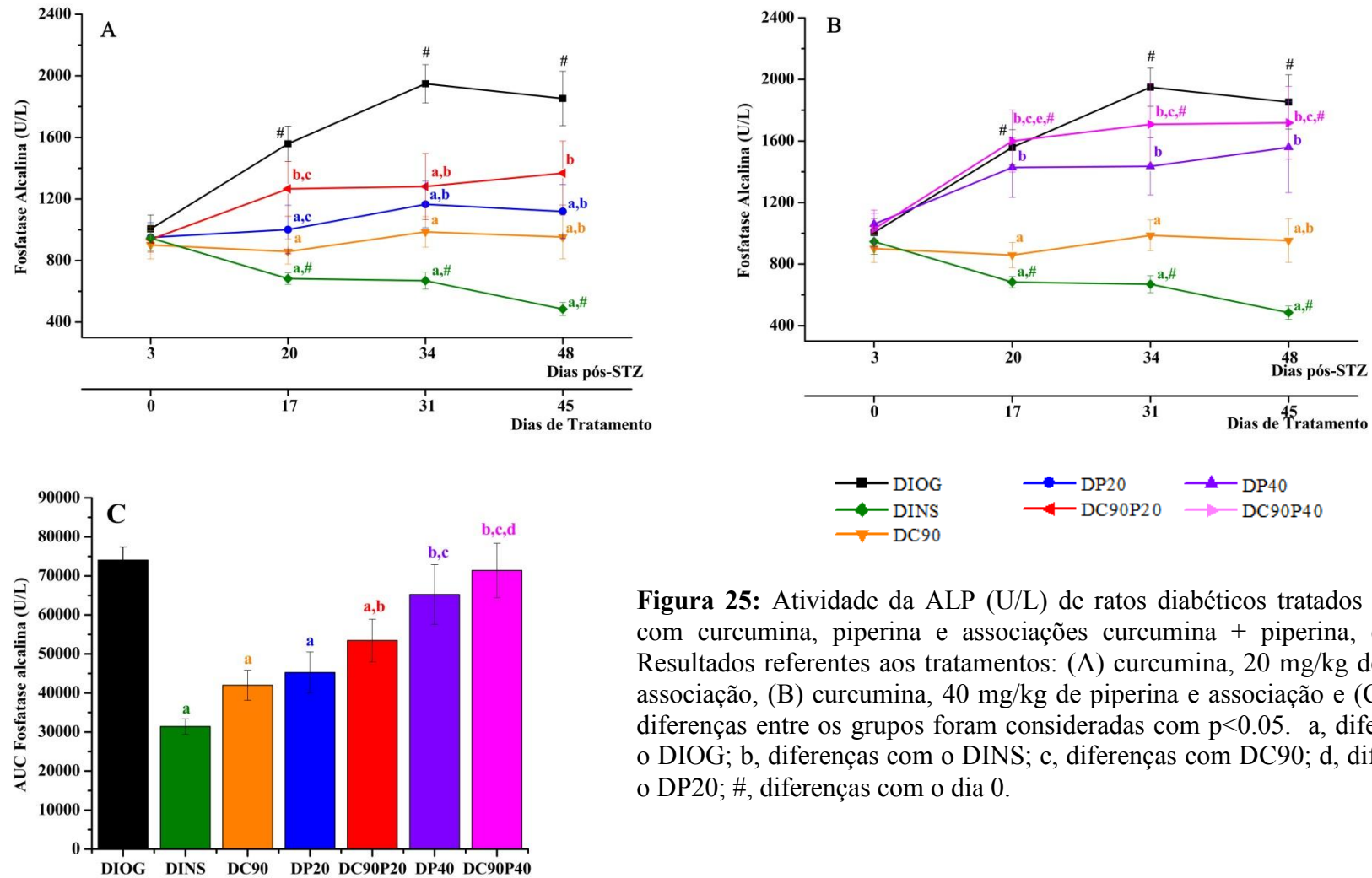


Figura 25: Atividade da ALP (U/L) de ratos diabéticos tratados por 45 dias com curcumina, piperina e associações curcumina + piperina, em iogurte. Resultados referentes aos tratamentos: (A) curcumina, 20 mg/kg de piperina e associação, (B) curcumina, 40 mg/kg de piperina e associação e (C) AUC. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0.05$. a, diferenças com o DIOG; b, diferenças com o DINS; c, diferenças com DC90; d, diferença com o DP20; #, diferenças com o dia 0.

Os valores de ureia urinária dos animais diabéticos estão apresentados na Figura 26. O grupo DIOG apresentou um aumento progressivo na concentração de ureia urinária, representando uma piora progressiva do estado diabético dos animais não tratados. A concentração de ureia na urina tem relação direta com o catabolismo proteico, uma vez que a ureia é o produto nitrogenado final da degradação de aminoácidos, estes utilizados para a produção de glicose através do processo de gliconeogênese (hepática e renal); considerando serem ambos os processos inibidos pela insulina, a gliconeogênese e a proteólise muscular, estão estimulados em ratos diabéticos, assim é esperada concentração urinárias de ureia maiores com a progressão do diabetes, concomitante ao aumento progressivo nos valores de glicemia (Figura 18), e o menor peso dos músculos esqueléticos de ratos diabéticos sem tratamento como observado neste experimento (Tabela 1). O tratamento de ratos diabéticos com insulina promoveu redução na concentração de ureia urinária como observado como observado no 10º dia de tratamento, e manteve-se constante a partir deste período, com redução de 69% em relação ao grupo DIOG ao término do tratamento. O tratamento de ratos diabéticos com 90 mg de curcumina/kg pc (DC90) também promoveu benefícios nas concentrações de ureia na urina, uma vez que os valores de ureia urinária permaneceram praticamente constantes durante todo o período experimental, alcançando valores 52% menores em relação ao grupo DIOG ao final do experimento. O tratamento com a associação curcumina e 20 mg/kg de piperina (DC90P20, Figura 26A) não promoveu alterações adicionais na concentração de ureia urinária além daquelas já promovidas pelo tratamento com curcumina somente. Já a associação curcumina e 40 mg de piperina/kg pc (DC90P40, Figura 26B) promoveu prejuízos na ação da curcumina, uma vez que a concentração de ureia na urina de ratos diabéticos tratados com esta associação foram estatisticamente semelhantes aos observados em animais do grupo DIOG. O grupo DP20 (Figura 26A) apresentou valores de ureia urinária diminuídos durante todo o período experimental, e o grupo DP40 (Figura 26B) não apresentou qualquer melhoria neste parâmetro. Na Figura 25C pode observar que o tratamento com insulina promoveu redução na concentração de ureia urinária de 56% quando comparado ao grupo DIOG. Os tratamentos com curcumina (DC90), 20 mg de piperina/kg pc (DP20) e suas associações (DC90P20) promoveram reduções de 34, 45 e 32%, respectivamente, quando comparados ao grupo DIOG. Os grupos DP40 e DC90P40 não valores significativamente menores que o DIOG.

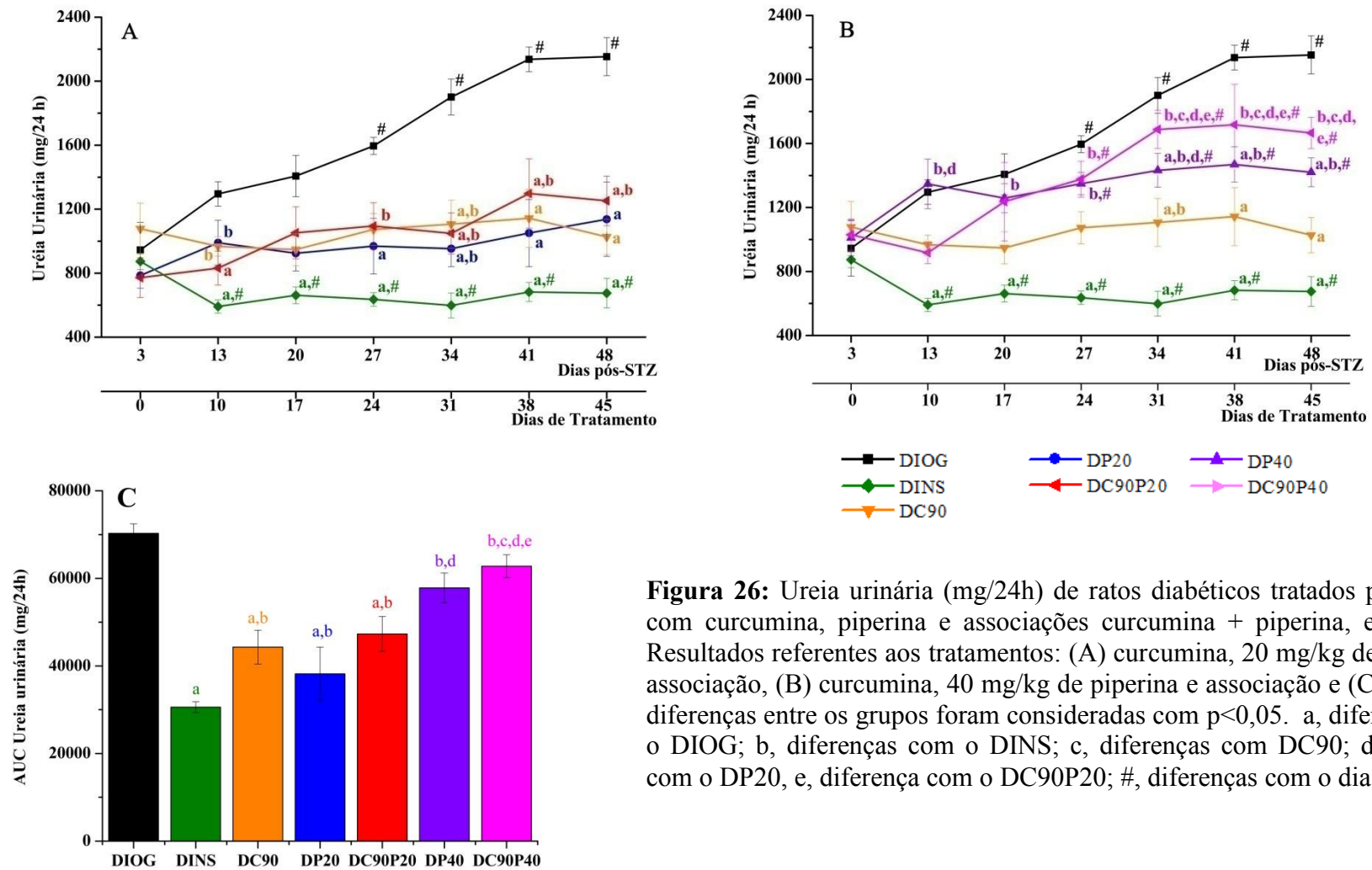


Figura 26: Ureia urinária (mg/24h) de ratos diabéticos tratados por 45 dias com curcumina, piperina e associações curcumina + piperina, em iogurte. Resultados referentes aos tratamentos: (A) curcumina, 20 mg/kg de piperina e associação, (B) curcumina, 40 mg/kg de piperina e associação e (C) AUC. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com o DIOG; b, diferenças com o DINS; c, diferenças com DC90; d, diferença com o DP20, e, diferença com o DC90P20; #, diferenças com o dia 0.

Os valores de proteinúria dos ratos diabéticos estão apresentados na Figura 27. Animais diabéticos não tratados apresentaram valores progressivamente elevados de proteína na urina durante os 45 dias de experimento. A proteinúria é um importante biomarcador de lesão renal no diabetes, pois permite o acompanhamento da evolução da lesão renal em decorrência da falta de tratamento da hiperglicemia. É possível observar que o tratamento com insulina preveniu o aumento na concentração de proteína na urina de ratos diabéticos, alcançando valores 53% menores em comparação ao grupo não tratado (DIOG) no último dia de tratamento. O tratamento com curcumina (DC90) também foi capaz de diminuir na proteinúria de animais diabéticos, como observado no 38º dia de tratamento o grupo DC90 apresentou valores significativamente menores quando comparados ao grupo DIOG, alcançando redução de 40% no último dia de tratamento em relação aos valores de proteinúria de animais não tratados. Já o grupo DC90P20 (Figura 27A) apresentou concentração de proteína na urina semelhante ao observados no grupo DC90, demonstrando assim que a associação de curcumina com 20 mg de piperina/kg pc (DC90P20) não é capaz de promover benefícios adicionais àqueles observados com o tratamento com curcumina somente, tal como foi observado para todos os demais parâmetros analisados neste presente trabalho. Já a associação curcumina e 40 mg de piperina/kg pc (DC90P40, Figura 27B) mostrou-se prejudicial sobre os efeitos benéficos sobre a proteinúria em relação ao grupo somente com curcumina, uma vez que a concentração de proteína na urina no grupo DC90P40 foram progressivamente maiores, acompanhando praticamente o mesmo perfil de resposta do grupo DIOG. O grupo DP20 (Figura 27A) apresentou concentração de proteinúria semelhantes aos encontrados nos grupos DC90 e DC90P20, com valores significativamente menores a partir do 38º dia de tratamento em relação ao grupo DIOG. Já o tratamento com 40 mg de piperina/kg pc (DP40, Figura 27B) não apresentou qualquer benefício sobre as concentrações de proteína na urina, sendo que a concentração observada no grupo DP40 foi semelhante aquele encontrado no grupo DIOG. Na Figura 27C, pode observar que o grupo DINS apresentou uma redução na concentração de proteinúria de 52% quando comparado ao grupo DIOG. Os grupos DC90, DP20 e DC90P20 também apresentaram reduções neste parâmetro de 33, 27 e 28%, respectivamente, quando comparados ao grupo DIOG. Já os tratamentos com 40 mg/kg de piperina (DP40) e sua associação (DC90P40) não promoveram reduções quando comparado ao grupo DIOG.

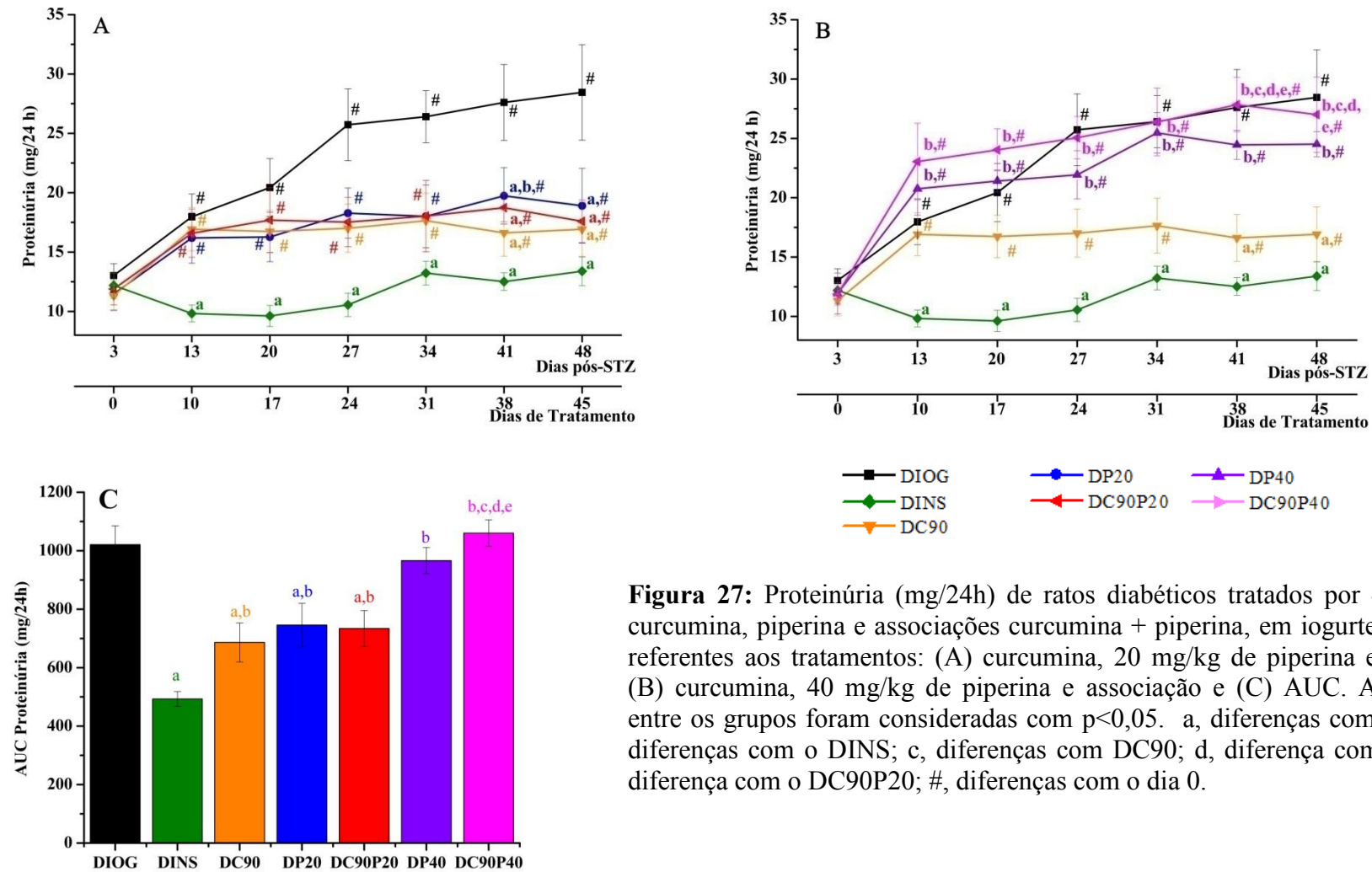


Figura 27: Proteinúria (mg/24h) de ratos diabéticos tratados por 45 dias com curcumina, piperina e associações curcumina + piperina, em iogurte. Resultados referentes aos tratamentos: (A) curcumina, 20 mg/kg de piperina e associação, (B) curcumina, 40 mg/kg de piperina e associação e (C) AUC. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com o DIOG; b, diferenças com o DINS; c, diferenças com DC90; d, diferença com o DP20, e, diferença com o DC90P20; #, diferenças com o dia 0.

4.3 PARÂMETROS RELACIONADOS AO ESTRESSE OXIDATIVO

Nas Figuras 28 e 29 estão apresentadas as concentrações de MDA no fígado e no plasma, respectivamente, de ratos diabéticos após 45 dias de tratamento. O grupo DIOG apresentou concentrações elevadas de MDA, tanto no fígado quanto no plasma, mostrando assim o desenvolvimento de estresse oxidativo em animais com diabetes estreptozotocínico, especialmente com aumento na peroxidação lipídica. Já o grupo DINS apresentou valores reduzidos de MDA no plasma e fígado, em relação ao DIOG, deixando claro que o tratamento insulínico é capaz de reverter a peroxidação lipídica (LPO) nestes animais. O tratamento com curcumina promoveu redução na concentração de MDA no fígado e no plasma de 42 e 39%, respectivamente, sendo a concentração de MDA semelhante ao observado no grupo DINS. Os grupos tratados com 20 mg de piperina/kg pc (DP20) e sua associação com curcumina (DC90P20) apresentaram redução na concentração de MDA no plasma (22 e 40%, respectivamente) e no fígado (35 e 34%, respectivamente) em relação ao grupo DIOG. O tratamento com 40 mg de piperina/kg pc (DP40) promoveu redução na concentração de MDA no fígado e no plasma de 32 e 14%, respectivamente, quando comparado ao grupo DIOG. O grupo DC90P40 apresentou valores elevados de MDA em ambos os tecidos, e semelhantes ao grupo DIOG, representando assim a anulação dos efeitos benéficos da curcumina quando administrada sozinha.

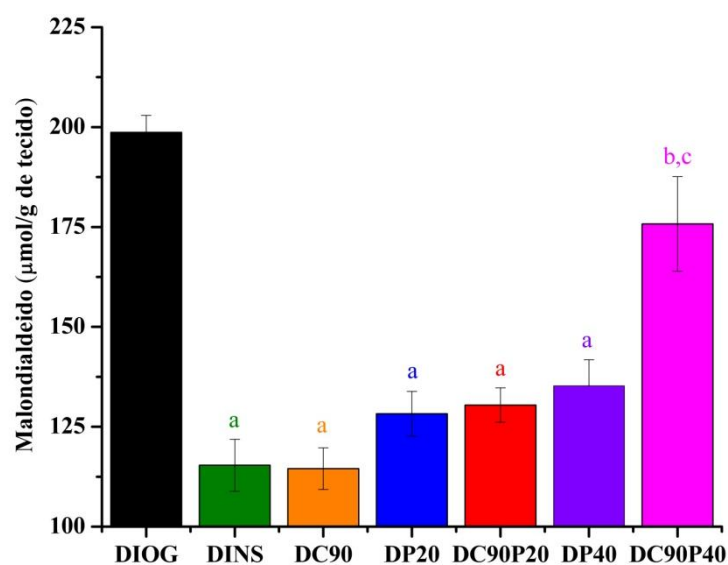


Figura 28: Concentração de MDA (µmol/g de tecido) no fígado de ratos diabéticos tratados por 45 dias com curcumina, piperina e associação curcumina + piperina, em iogurte. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com o DIOG; b, diferenças com o DINS; c, diferenças com DC90.

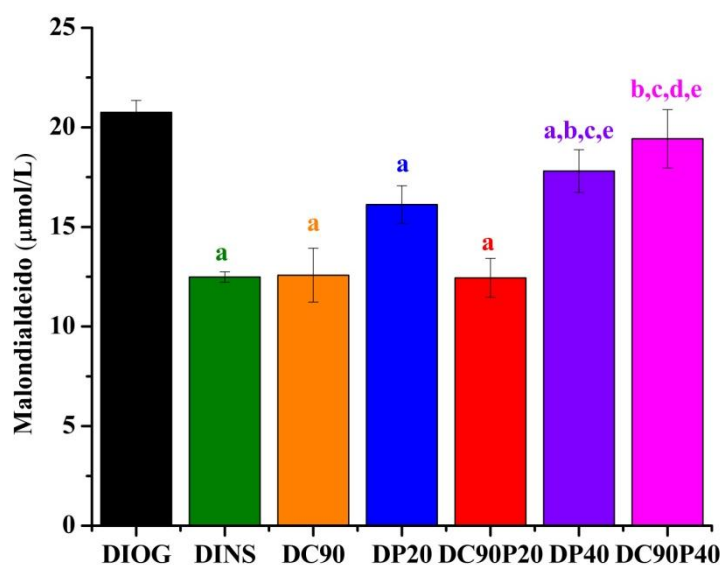


Figura 29: Concentração de MDA (µmol) plasmático de ratos diabéticos tratados por 45 dias com curcumina, piperina e associação curcumina + piperina, em iogurte. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com o DIOG; b, diferenças com o DINS; c, diferenças com DC90; d, diferenças com o DP20; e, diferenças com o DC90P20.

A concentração de PCO no fígado de animais diabéticos tratados por 45 dias estão apresentados na Figura 30. Assim como observado para a concentração de MDA, a concentração de PCO nos animais do grupo DIOG estava elevada, indicando que, além da peroxidação lipídica, a oxidação de proteínas também contribui para o estresse oxidativo neste modelo experimental. Animais diabéticos tratados com insulina apresentaram redução de 72% nos níveis de PCO em relação ao grupo DIOG. Os tratamentos com curcumina (DC90), 20 mg de piperina/kg pc (DP20) e a associação entre dois compostos (DC90P20) promoveram redução na concentração de PCO de 55, 53 e 50%, respectivamente, em relação ao DIOG. O grupo DP40 apresentou redução na concentração de PCO de 27% quando comparado ao grupo DIOG, entretanto o tratamento não foi tão efetivo quando o DINS, DC90, DP20 ou DC90P20. O grupo DC90P40 não apresentou nenhuma alteração na concentração de PCO em relação ao grupo DIOG, representando assim que esta associação anula os benefícios do tratamento com curcumina sozinha.

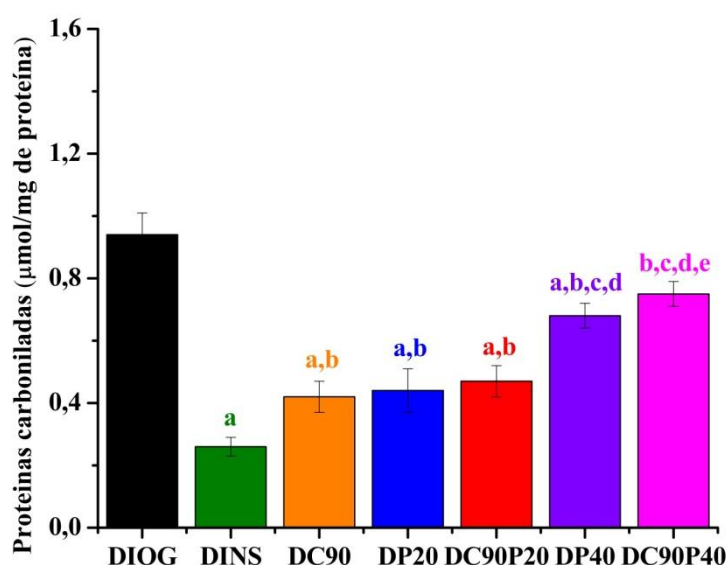


Figura 30: Efeito Concentração de PCO ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) no fígado de ratos diabéticos tratados por 45 dias com curcumina, piperina e associação curcumina + piperina, em iogurte. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com o DIOG; b, diferenças com o DINS; c, diferenças com DC90; d, diferenças com o DP20; e, diferenças com o DC90P20.

Na Figura 31 estão apresentadas as concentrações de GSH no fígado dos animais diabéticos tratados durante 45 dias. As concentrações de GSH nos animais do grupo DIOG estavam reduzidas, enquanto que o tratamento com insulina promoveu aumento de 157% nos níveis de GSH em relação ao grupo DIOG. Os tratamentos com curcumina (DC90) e piperina (DP20) promoveram aumento na concentração de GSH de 93 e 67%, respectivamente, quando comparados ao DIOG. O grupo DP40 apresentou valores semelhantes ao grupo DIOG. Já os grupos DC90P20 e DC90P40 não apresentaram alterações na concentração de GSH, ficando com valores de GSH próximos ao grupo DIOG.

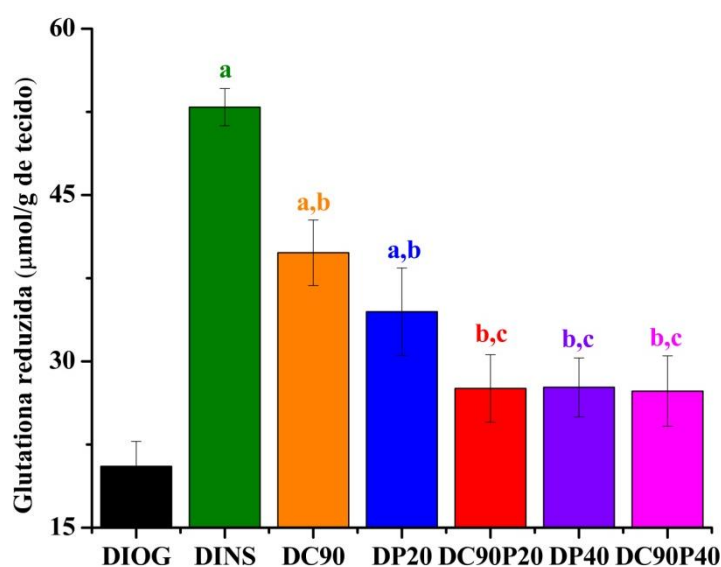


Figura 31 Concentração de GSH ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) no fígado de ratos diabéticos tratados por 45 dias com curcumina, piperina e associação curcumina + piperina, em iogurte. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com o DIOG; b, diferenças com o DINS; c, diferenças com DC90; d, diferenças com o DP20; e, diferenças com o DC90P20.

Na Figura 32 estão apresentados os valores de atividade da SOD em fígado de ratos diabéticos tratados por 45 dias. A atividade da SOD no fígado de animais do grupo DIOG foi baixa, enquanto que o grupo DINS apresentou aumento de 7 vezes na atividade da SOD quando comparado ao grupo DIOG. O tratamento com curcumina promoveu aumento de 5 vezes na atividade da SOD quando comparado ao grupo DIOG. Os grupos DP20 e DC90P20 apresentaram valores elevados na atividade da SOD quando comparados ao grupo DIOG, sendo este aumento de 170 e 231%, respectivamente. Os grupos DP40 e DC90P40 não apresentaram alterações na atividade da SOD quando comparados ao grupo DIOG.

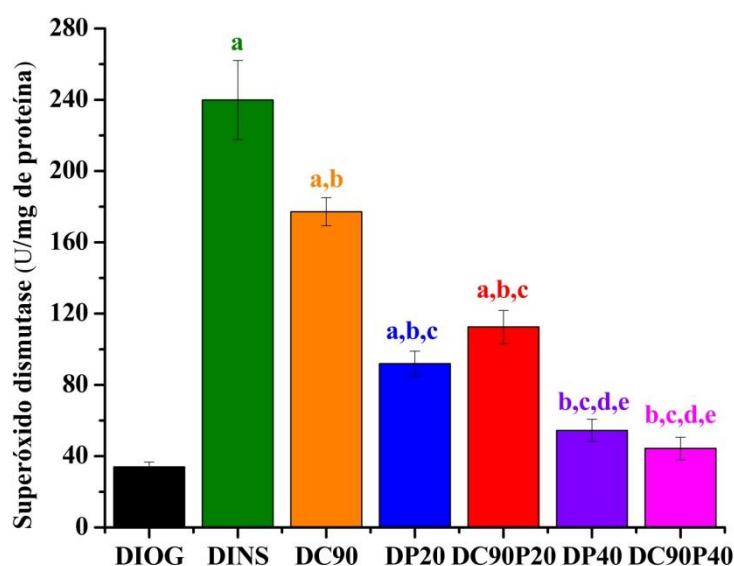


Figura 32: Atividade da SOD (U/mg de proteína) no fígado de ratos diabéticos tratados por 45 dias com curcumina, piperina e associação curcumina + piperina, em iogurte. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com o DIOG; b, diferenças com o DINS; c, diferenças com DC90; d, diferenças com o DP20; e, diferenças com o DC90P20.

Na Figura 33 estão representadas as atividades da CAT em fígado de ratos diabéticos após 45 dias de tratamento. Assim com a atividade da SOD, a atividade da CAT estava reduzida no grupo DIOG, enquanto que o grupo DINS apresentou aumento de 105% na atividade da CAT em comparação ao grupo DIOG. O tratamento com curcumina (DC90) e com a associação entre curcumina + 20 mg de piperina/kg pc (DC90P20) promoveu aumento na atividade da CAT quando comparado ao grupo DIOG, de 57 e 55%, respectivamente, entretanto os tratamentos não foram tão efetivos quanto o tratamento com insulina. Os grupos DP20 e DP40 apresentaram aumento significativo na atividade da CAT, de 27 e 24%, respectivamente, quando comparado ao grupo DIOG. Já o tratamento com curcumina + 40 mg de piperina/kg pc, promoveu aumento de apenas 19% na atividade da CAT em relação ao DIOG, mostrando mais uma vez que a associação anulou os efeitos do tratamento com curcumina sozinha.

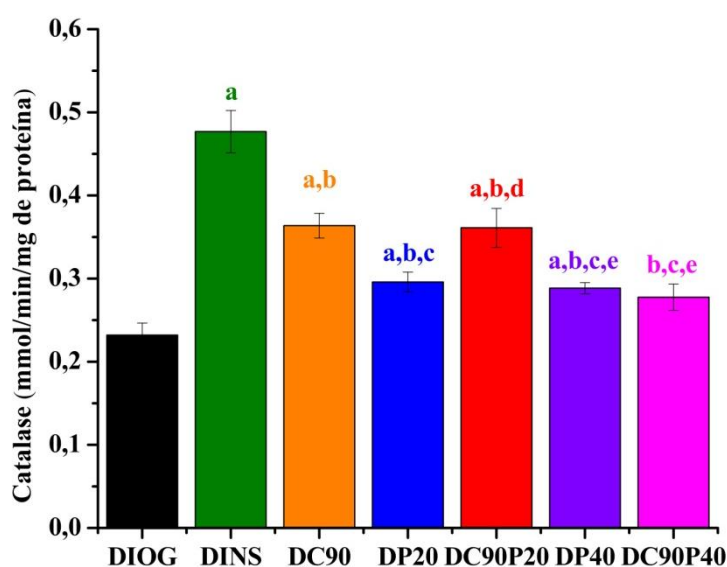


Figura 33: Atividade da CAT (mmol/min/mg de proteína) no fígado de ratos diabéticos tratados por 45 dias com curcumina, piperina e associação curcumina + piperina, em iogurte. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com o DIOG; b, diferenças com o DINS; c, diferenças com DC90; d, diferenças com o DP20; e, diferenças com o DC90P20.

A atividade da GPx no fígado de ratos diabéticos estão representados na Figura 34. A atividade da GPx no fígado de animais do grupo DIOG estava reduzida, enquanto que o tratamento com insulina (DINS) aumentou a atividade da GPx em 99% quando comparado ao grupo DIOG. O tratamento com curcumina (DC90) ou com 20 mg de piperina/kg pc (DP20) promoveu aumento na atividade da GPx em 69 e 52%, respectivamente, quando comparados ao grupo DIOG. Já a associação entre curcumina e 20 mg de piperina/kg pc (DC90P20) promoveu aumento da atividade de GPx de 39% em relação ao grupo DIOG, sendo esta atividade menor em relação ao tratamento com curcumina sozinha. O grupo DP40 permaneceu com valores de atividade da GPx semelhantes ao grupo DIOG, enquanto que o grupo DC90P40 apresentou redução de 25% na atividade de GPx em relação ao grupo DIOG, ressaltando que a associação anulou os benefícios do tratamento com curcumina sozinha.

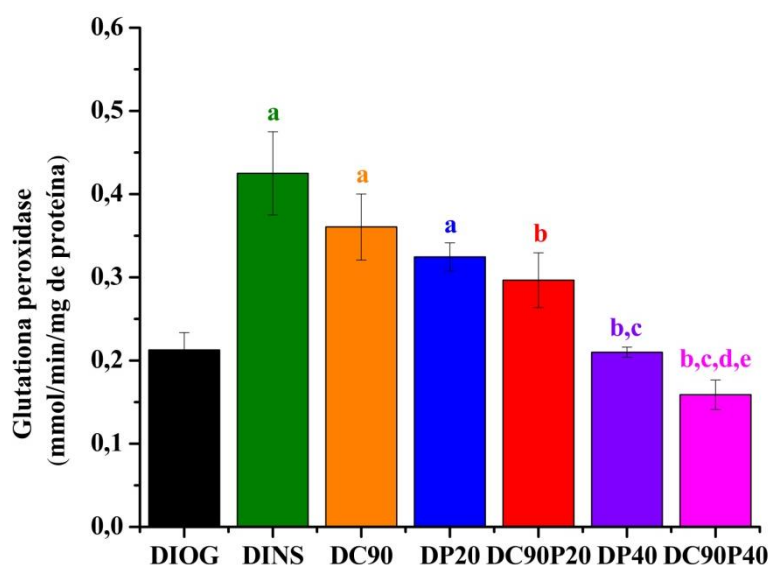


Figura 34 Atividade da GPx (mmol/min/mg de proteína) no fígado de ratos diabéticos tratados por 45 dias com curcumina, piperina e associação curcumina + piperina, em iogurte. As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com o DIOG; b, diferenças com o DINS; c, diferenças com DC90; d, diferenças com o DP20; e, diferenças com o DC90P20.

5. DISCUSSÃO

A partir desses resultados, reiteramos dados anteriores (GUTIERRES et al., 2012), que mostraram a atividade antidiabética da curcumina incorporada no iogurte, quando administrada a ratos diabéticos (indução com estreptozotocina), como redução da hiperglicemia, dislipidemia e melhoria de diversos parâmetros fisiológicos alterados neste modelo: como por exemplo, ganho de peso corporal, de ganho de massa de músculos esqueléticos e tecidos adiposos brancos; diminuição do consumo de ração e ingestão hídrica e do volume urinário. Além disso, os distúrbios observados em ratos diabéticos relacionados com disfunção hepática e renal, bem como alterações em parâmetros relacionados ao estresse oxidativo, também foram prevenidos ou melhorados após o tratamento com curcumina.

No entanto, mesmo após a administração de uma dose elevada de curcumina, as ações benéficas sobre o diabetes mellitus foram menores em comparação às encontradas após a administração de insulina; tal diferença pode ser uma consequência da conhecida baixa biodisponibilidade da curcumina quando administrada por via oral. Para melhorar as ações benéficas da curcumina contra os distúrbios do diabetes experimental, o presente estudo investigou as mudanças em vários parâmetros bioquímicos e fisiológicos de ratos diabéticos tratados com a associação de curcumina e piperina incorporados no iogurte. É bem conhecido que a piperina possui a propriedade de aumentar a biodisponibilidade de fármacos, incluindo a curcumina, ação esta atribuída à capacidade da piperina em inibir as enzimas envolvidas na biotransformação de xenobióticos. Surpreendentemente, o tratamento de ratos diabéticos com a associação de curcumina e piperina não promoveu qualquer resposta adicional em relação à atividade antidiabética observada com a curcumina sozinha, pelo contrário, a associação de curcumina com piperina, quando administradas em conjunto com a maior dose de piperina, anulou os efeitos benéficos da curcumina sobre os distúrbios do diabetes, evidenciando ser a biotransformação da curcumina um passo essencial para a sua atividade antidiabética.

Vários mecanismos têm sido recentemente descritos para explicar a capacidade de curcumina em promover redução na glicemia; i) aumento da liberação de insulina através de estimulação direta da atividade elétrica das células beta do pâncreas (BEST; ELLIOTT; BROWN, 2007); ii) aumento da sensibilidade periférica à insulina

(XAVIER et al., 2012); iii) aumento na expressão do GLUT4 e, consequentemente, a captação de glicose, pela musculatura esquelética (NA et al., 2011), entre outros. Além das respostas que culminam no efeito anti-hiperglicemiante, os mecanismos supracitados podem também estar relacionados com o estímulo de processos anabólicos e com a inibição de processos catabólicos após a administração de curcumina, o que poderia explicar o aumento observado no peso dos tecidos adiposos e musculares (Tabela 1) e no peso corporal (Figura 13) dos ratos diabéticos tratados com curcumina incorporada no iogurte, em comparação com ratos tratados apenas com o veículo. Considerando os trabalhos que relatam que o tratamento com curcumina promove aumento da insulinemia, a redução no consumo de ração de ratos diabéticos tratados com este pigmento (Figura 14) pode também ser consequência deste efeito, uma vez que o controle do consumo de ração ocorre através da ação da insulina no hipotálamo (FIGLEWICZ; SIPOLS, 2010).

Estudos têm postulado que a redução na glicemia após o tratamento com curcumina deve ser também consequência de inibição da gliconeogênese hepática, uma vez que tem sido demonstrado que a curcumina é capaz de inibir as atividades de G6Pase e PEPCCK, enzimas-chave da gliconeogênese (FUJIWARA et al., 2008). Além disso, tem sido proposto que pelo menos dois dos mecanismos relacionados aos efeitos antidiabéticos da curcumina, quais sejam, o aumento da captação de glicose dependente de GLUT4 e a redução na produção hepática de glicose pela inibição da gliconeogênese, estão associados à ativação da proteína quinase dependente de AMP, AMPK (FUJIWARA et al., 2008; NA et al., 2011). Estes mecanismos relacionados com o efeito antihyperglicemiante da curcumina são corroborados pelos resultados deste estudo, uma vez que ratos diabéticos tratados com curcumina incorporada ao iogurte apresentaram redução nas concentrações de glicose no sangue (Figura 17) e na urina (Figura 18) e redução na concentração de ureia urinária (Figura 25). Considerando que os aminoácidos são utilizados como substratos neoglicogênicos, uma inibição na velocidade de gliconeogênese irá reduzir a desaminação de aminoácidos, destinando menor quantidade de alfa-cetoácidos necessários para a síntese de glicose, bem como, menor quantidade de amino grupos para a produção de ureia.

A correção da glicemia é um mecanismo eficiente para prevenir as complicações a longo prazo do DM, principalmente aquelas relacionadas ao estresse oxidativo e aos danos teciduais. Particularmente no fígado, o estresse oxidativo pode promover uma

grande variedade de complicações. O aumento da exposição ao fígado às ERO está associado com o aparecimento de esteatose hepática e sua progressão para hepatite esteatótica (VIDELA, 2009). Alterações no equilíbrio redox, promovendo oxidação de grupos tióis, nitrosilação, glutationilação e formação de pontes dissulfeto têm comprometido a atividade de vários componentes pertencentes às vias de transdução de sinais no fígado (CUBERO; TRAUTWEIN, 2011). As consequências deletérias do estresse oxidativo no fígado podem ser extremamente prejudiciais no DM, uma vez que este tecido é vital para o metabolismo de carboidratos e lipídeos. De acordo com os resultados deste estudo, o estresse oxidativo em ratos diabéticos foi bem caracterizado, uma vez que foram encontradas concentrações maiores de biomarcadores de LPO e de oxidação de proteínas, tais como o MDA (Figuras 27 e 28) e como as PCO (Figura 29). Além disso, as atividades das enzimas antioxidantes, bem como a concentração de GSH, estavam menores no fígado de ratos diabéticos (Figura 30).

Vários estudos têm relatado a baixa atividade de enzimas antioxidantes no fígado de ratos diabéticos (EVELSON et al., 2005; LUCCHESI et al., 2013). Para a baixa atividade de SOD no diabetes tem sido postulado à glicação da enzima, resultando em sua inativação e subsequente fragmentação (TANIGUCHI et al., 1996). Considerando a possibilidade de acumular $O_2^{\bullet-}$ devido à baixa atividade da SOD (glicação), as subseqüentes quedas nas atividades de CAT e GPx poderiam ser explicadas pela capacidade do $O_2^{\bullet-}$ inibir estas enzimas (KONO; FRIDOVICH, 1983; BLUM; FRIDOVICH, 1985). Estudos também têm associado queda na atividade de enzimas antioxidantes em ratos diabéticos com diminuição na expressão do mRNA e nas concentrações proteicas destas enzimas em termos de massa (SINDHU et al., 2004; SADI; YILMAZ; GÜRAY, 2008). A concentração baixa de GSH observados no fígado de ratos diabéticos (Figura 30) pode ser consequência do aumento do fluxo de glicose através da via dos poliois, consumindo NADPH na formação de sorbitol, uma condição que prejudica a regeneração de GSH (LEE; CHUNG, 1999). Consequentemente, a baixa concentração de GSH podem também participar na instalação do estresse oxidativo no fígado de ratos diabéticos, uma vez que a GSH é um importante inibidor de LPO mediada por aumento de ERO (MEISTER; ANDERSON, 1983).

As consequências prejudiciais do estresse oxidativo no fígado de ratos diabéticos podem ser observadas pelo aumento progressivo na atividade plasmática de ALT, AST

e ALP (Figuras 22, 23 e 24, respectivamente). O aumento progressivo destas enzimas no plasma de ratos diabéticos já foi descrito anteriormente (MORI et al., 2003; GUTIERRES et al., 2012) e tem correlação positiva com o aumento da liberação destas enzimas por tecidos danificados pelo estresse oxidativo (KORUK et al., 2004). É importante observar que todas estas mudanças relacionadas ao estresse oxidativo no diabetes foram revertidas com o tratamento com insulina.

O tratamento com curcumina incorporada em iogurte reverteu parcialmente as mudanças associadas ao estresse oxidativo em ratos diabéticos, promovendo aumento na atividade de enzimas antioxidantes e a redução nas concentrações de biomarcadores do estresse oxidativo. É bem conhecido que a curcumina possui potente atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* relacionada a sua capacidade de sequestrar ERO (BARZEGAR; MOOSAVI-MOVAHEDI, 2011) e assim inibir a LPO (MEGHANA K, SANJEEV G, RAMESH, 2007). Ak; Gülçin (2008) demonstraram que a curcumina possui grande capacidade de captura do $O_2^{\bullet-}$, maior que outros antioxidantes potentes, tais como o α -tocoferol e o trolox. Sabe-se que o aumento na produção mitocondrial $O_2^{\bullet-}$ - estimula a atividade de NADPH oxidases, exacerbando a produção de $O_2^{\bullet-}$, o que pode representar um ciclo vicioso (*feed forward*) na produção de ERO (DIKALOV, 2011). A redução na geração ou a captura de $O_2^{\bullet-}$ após o tratamento com curcumina pode alterar os efeitos deletérios deste radical sobre as atividades de CAT e GPx (descritos acima), o que contribui para diminuir as consequências deletérias a outras biomoléculas; embora apresente reatividade com velocidades limitadas, o $O_2^{\bullet-}$ é precursor de outras espécies altamente reativas, principalmente radicais hidroxila ($\bullet OH$), que participam da oxidação tanto de lipídeos (GIROTTI, 1998) quanto de proteínas (PENNATHUR et al., 2001). Além disso, ao se observar aumento na concentração de GSH no fígado de ratos diabéticos tratados com curcumina incorporada no iogurte (Figura 30), pode-se sugerir que o efeito antihiperglicemiante da curcumina contribui para uma diminuição do fluxo de glicose através da via dos polióis. Considerando-se que a GSH é um substrato essencial para a atividade de GPx, aumento na concentração de GSH também pode contribuir para o aumento na atividade de GPx observado no fígado de ratos diabéticos tratados com curcumina (Figura 33).

A restauração do sistema antioxidante dependente de glutathione reduzida pode ser útil no combate das alterações deletérias causadas pelas ERO em biomoléculas, contribuindo para explicar a queda observada na concentração de MDA e PCO em

fígado de ratos diabéticos tratados com curcumina (Figuras 27 e 29, respectivamente). Os efeitos benéficos da curcumina contra as consequências deletérias do estresse oxidativo em fígado de ratos diabéticos foram corroborados pela redução nas atividades de ALT, AST e ALP (Figuras 22, 23 e 24, respectivamente). Considerando que o tratamento de ratos diabéticos com curcumina incorporada em iogurte, também promoveu redução da proteinúria (Figura 26), pode ser considerado que há efeitos protetores da curcumina sobre a função renal, corroborando estudos anteriores que mostram os benefícios deste pigmento sobre a função renal (NABAVI et al., 2012; MORSY et al., 2013).

A condição de deficiência na secreção de insulina e/ou os estados hiperglicêmicos acarretam dislipidemia em indivíduos com DM tipo 1 ou tipo 2, representada principalmente por aumento na concentração de TAG, aumento na concentração do colesterol-LDL e baixa concentração do colesterol-HDL, os quais predis põem os indivíduos a um maior risco para aterosclerose (GOLDBERG, 2001). Os resultados deste estudo mostraram que o tratamento com curcumina incorporada em iogurte reduziu a concentração de TAG e do colesterol total dos ratos diabéticos à semelhantes àqueles observados em ratos diabéticos tratados com insulina (Figuras 19 e 20, respectivamente). Ejaz et al. (2009) descreveram uma tendência de diminuição na concentração sérica de TAG de camundongos alimentados com dieta rica em gordura e suplementada com curcumina, efeito este atribuído ao aumento na expressão da enzima carnitina palmitoil transferase-1 (estimulando a oxidação de ácidos graxos) e diminuição na expressão de glicerol-3-fosfato-aciltransferase-1 (inibindo a esterificação dos ácidos graxos) no tecido adiposo subcutâneo, ambos mecanismos dependentes de ativação de AMPK. Os ratos alimentados com uma dieta rica em gordura, e suplementada com curcumina, também apresentaram, no fígado, aumento na expressão de colesterol 7 α -hidroxilase, enzima limitante do processo de biossíntese de ácidos biliares a partir de colesterol, o que pode explicar o efeito hipocolesterolêmico da curcumina (KIM; KIM, 2010). Regulação do receptor de LDL também tem sido reportada em células HepG2 tratadas com curcumina (PESCHEL; KOERTING; NASS, 2009).

Apesar dos diversos benefícios promovidos pela curcumina no diabetes, especialmente em caráter experimental, ainda faltam evidências destes benefícios em ensaios clínicos, o que dificulta a aprovação do uso da curcumina como agente

antidiabético (SAHEBKAR, 2013). Entretanto, a baixa biodisponibilidade da curcumina, quando administrada por via oral, tem sido citada como um passo limitante para a sua eficácia na terapêutica, sendo explicada pela baixa absorção, rápida metabolização e excreção (ANAND et al., 2008). Concentrações extremamente baixas de curcumina foram encontradas no plasma de roedores (IRESON et al., 2001) e humanos (SHARMA et al., 2001) após receberem curcumina por via oral. Várias abordagens que tentam superar a baixa biodisponibilidade da curcumina têm sido recentemente descritas (SUN et al., 2012; PRASAD; TYAGI; AGGARWAL, 2014), dentre elas, a associação com fármacos capazes de aumentar biodisponibilidade de origem natural, como a piperina.

É bem descrito que a piperina possui a capacidade de aumentar a biodisponibilidade de drogas através de inibição de várias enzimas que participam na biotransformação hepática e intestinal de xenobióticos, tais como aril hidroxilase, UDP-glucuronil-transferase hepática e citocromo P450 microsomal (SRINIVASAN, 2007). Embora alguns estudos tenham mostrado aumento na biodisponibilidade da curcumina quando co-administrada com piperina, tanto em humanos como em roedores (SHOBA et al., 1998; RYU et al., 2006), carecem estudos que tratem das alterações das propriedades farmacodinâmicas da curcumina quando administrada em associação com piperina. Surpreendentemente, o tratamento de ratos diabéticos com associação entre curcumina e piperina incorporadas no iogurte, em proporções semelhantes àsquelas utilizadas em estudos farmacocinéticos, não promoveu nenhuma alteração (90 mg de curcumina/kg pc + 20 mg de piperina/kg pc) ou até mesmo anulou (90 mg de curcumina/kg pc + 40 mg de piperina/kg pc) atividades antidiabéticas e antioxidantes observadas com a curcumina sozinha.

É bem descrito que a curcumina, quando administrada por via oral, passa rapidamente por processos de redução e conjugação no intestino e no fígado tanto de seres humanos (VAREED et al., 2008) quanto de roedores, como por exemplo camundongos (PAN; HUANG; LIN, 1999) e ratos (RAVINDRANATH; CHANDRASEKHARA, 1980); estes processos geram diversos metabolitos de curcumina, e que incluem: dihidrocurcumina (DHC), tetrahidrocurcumina (THC), hexahidrocurcumina (HHC), octahidrocurcumina (OHC), glucoronídeo de curcumina e sulfato de curcumina (ANAND et al., 2008). Portanto, o aumento na concentração plasmática de curcumina na presença de piperina ocorre como consequência da

capacidade da piperina em inibir as enzimas envolvidas nestes processos de biotransformação. Considerando que as atividades antidiabética e antioxidante da curcumina não foram melhoradas na presença de 20 mg de piperina/kg pc, e até mesmo foram anuladas na presença de 40 mg de piperina/kg pc, podemos considerar a possibilidade de que a curcumina seja um pró-fármaco, gerando metabólito(s) com capacidade de atenuar as consequências deletérias de estados de deficiência insulínica.

Deste modo, várias evidências têm demonstrado que a THC, um dos principais metabólitos da curcumina, tem atividades antidiabética e antioxidante mais relevantes em relação à curcumina (OKADA et al., 2001; KIM et al., 2009). Uma série de estudos, quali e quantitativos, realizados por Murugan; Pari (2006; 2007a) mostrou os efeitos antihiperlipidêmicos de THC quando administrada a ratos diabéticos. Os autores também observaram que ratos diabéticos tratados com THC apresentaram redução na concentração de AGL circulante e de glicose, acompanhados por concentrações elevadas de insulina, em comparação aos ratos não tratados (MURUGAN; PARI, 2007b). Alguns mecanismos intracelulares relacionados à curcumina no controle do metabolismo de carboidratos também foram descritos para a THC: em células de hepatoma humano (Hep3B) e de rato (H4IIE), a ativação de AMPK por THC foi cerca de 250 vezes maior em relação àquela promovida por curcumina, culminando em supressão mais eficiente na expressão de genes que codificam para enzimas da gliconeogênese, G6Pase e PEPCK (KIM et al., 2009). Foi também observado que o THC reduz os biomarcadores do estresse oxidativo no fígado e rins (MURUGAN; PARI, 2007; PARI et al., 2010). Além do THC, deve ser considerada a possibilidade dos glucuronídeos de curcumina terem atividade antidiabética, uma vez que são descritos como um dos principais metabólitos presentes em maior quantidade no plasma de ratos, após receberem curcumina oralmente (IRESON et al. 2001). Pfeiffer et al. (2007) mostraram que o glucoronidos de curcumina têm maior atividade de inibição na montagem de proteínas dos microtúbulos, em relação a curcumina. Também já foram observados os efeitos benéficos de THC contra as consequências do estresse oxidativo em ratos diabéticos, tais como redução em biomarcadores de LPO e de toxicidade tecidual, com alterações histológicas, principalmente em fígado e rim (MURUGAN; PARI, 2007b; PARI; KARTHIKESAN; MENON, 2010). Da mesma forma, os dados aqui apresentados mostram que o tratamento por longo prazo com curcumina

incorporada iogurte reduziu a concentração dos biomarcadores de toxicidade hepática e renal, no entanto, estes benefícios foram anulados com a associação de curcumina + 40 mg de piperina/kg pc.

Embora dados experimentais e ensaios clínicos mostrem que a curcumina é segura, mesmo em doses muito elevadas, e também bem tolerada (SHOBA et al., 1998; LAO et al., 2006), evidências têm apontado que a curcumina pode ter efeitos adversos *in vivo*, principalmente quando administrada por períodos longos (BURGOS-MORÓN et al., 2010). Estudo em pacientes com câncer colorretal em estado avançado, em tratamento com quimioterapia padrão, e tratados com cápsulas de curcumina em doses que variam entre 0,45 e 3,6 g/dia por 4 meses, mostrou que estes pacientes apresentaram náuseas, diarreia e aumento na atividade sérica de ALP e de lactato desidrogenase (LDH) em comparação aos pacientes que não receberam curcumina (SHARMA et al., 2004). Hepatotoxicidade também foi observada em camundongos que receberam por 14 dias extratos de cúrcuma, onde a curcumina é o principal componente ativo (DESHPANDE et al., 1998). Aumento nas concentrações de curcumina pode alterar sua atividade antioxidante para pró-oxidante (SANDUR et al., 2007), provavelmente devido à capacidade da curcumina em estimular a atividade da enzima NADPH-oxidase mitocondrial, envolvida na produção de ERO (FANG; LU; HOLMGREN, 2005). Em conjunto, estes estudos corroboram os resultados relacionados à completa ausência de atividade antidiabética da curcumina, quando associada com 40 mg de piperina/kg pc, em comparação aos efeitos benéficos observados com a curcumina sozinha. Se uma dose mais elevada de piperina causa uma potente inibição da biotransformação da curcumina, a probabilidade de a curcumina atingir concentrações tóxicas em vários tecidos estaria aumentada.

Deve ser destacado que atividade de ALT de ratos diabéticos tratados com curcumina e 40 mg de piperina/kg pc foram muito aumentados em comparação aos valores encontrados em ratos diabéticos tratados com curcumina ou piperina, sem associação, bem como em comparação aos ratos diabéticos não tratados (Figura 22), mostrando a toxicidade desta associação no diabetes. Embora a atividade plasmática de ALT seja um biomarcador altamente sensível de hepatotoxicidade, este aumento na atividade plasmática de ALT observados com a associação de curcumina e piperina deve ser interpretado com cautela, uma vez que pode representar um desvio para outras

vias de biotransformação as quais poderiam ainda favorecer a geração de metabólitos tóxicos. Tanto em humanos quanto em ratos há duas isoformas da enzima ALT, em que a expressão não é restrita ao fígado; ALT1 é encontrada no intestino, fígado, tecido adiposo, músculo e coração, e a ALT2 é encontrada no fígado, músculo, cérebro e tecido adiposo branco (Yang et al., 2002; Yang et al., 2009).

Outro achado inesperado neste estudo está relacionado aos efeitos benéficos do tratamento de ratos diabéticos com piperina, em sua menor dose, à vários parâmetros alterados nestes animais. Considerando que a dose de 40mg de piperina/kg pc não promoveu os mesmos efeitos benéficos encontrados com 20mg de piperina/kg pc, pode-se sugerir que doses maiores de piperina alcancem efeitos tóxicos. Piyachaturawat et al. (1983) encontraram toxicidade em ratos que receberam administração única de piperina em doses de 100 a 500mg/kg pc; os autores conjecturaram que a utilização de piperina durante um longo período de tempo pode atingir concentrações tóxicas. No entanto, quando 20 mg de piperina/kg pc foi co-administrada a ratos diabéticos com curcumina, os efeitos benéficos desta associação foram muito semelhantes aos observados nos tratamentos com piperina ou curcumina, sem associação, ou seja, não foram observados efeitos sinérgicos. É importante observar que estes dois compostos naturais ativam alguns efetores intracelulares em comum para controlar o metabolismo dos carboidratos e lipídeos, como por exemplo a AMPK, o que poderia explicar a ausência de sinergismo. Em estudo realizado por Choi et al. (2013), ratos adaptados a uma dieta rica em gordura e tratados com piperina apresentaram melhorias no perfil lipídico, relacionadas com aumento na concentração plasmática de adiponectina, que por sua vez estimula a oxidação de ácidos graxos e inibe a lipogênese, sendo este mecanismo dependente de AMPK. No mesmo estudo, também foi observado que o tratamento com piperina aumentou a fosforilação de AKT, aumentando, assim, a translocação de transportadores de glicose do tipo 2 (GLUT2) no fígado de ratos adaptados à dieta rica em gordura, melhorando a captação de glicose. A ativação de AMPK e a subsequente estimulação da oxidação de lipídeos e da captação de glicose também foram demonstradas para a curcumina e seus metabólitos como a THC, tal como descrito anteriormente.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo fornece evidências claras para a ausência de efeitos sinérgicos nas atividades antidiabética e antioxidante da curcumina, quando administrada em associação com piperina a ratos diabéticos. O bloqueio total dos benefícios da curcumina, quando associada à maior dose de piperina, sugere ser a biotransformação da curcumina essencial para as suas atividades antidiabética e antioxidante, uma vez que as administrações isoladas de piperina na menor dose ou de curcumina melhoram diversos parâmetros alterados no diabetes mellitus. A associação entre curcumina e piperina não promove melhoria adicional ou mesmo anula (na maior dose de piperina) os efeitos benéficos sobre os parâmetros alterados no diabetes, o que evidencia a participação de metabólito(s) da curcumina para sua ação farmacodinâmica. Considerando ainda o aumento observado nos biomarcadores de toxicidade hepática, podemos sugerir ser tóxica a associação curcumina e piperina e/ou prejudicial na redução da hiperglicemia em relação aos tratamentos isolados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOLLAHI, M., RANJBAR, A., SHADNIA, S., NIKFAR, S., REZAIEE, A. Pesticides and oxidative stress: a review. **Med Sci Monit.** v.10(6), p.RA141-7, 2004.

ACHARYA, S. G., MOMIN, A. H., GAJJAR A. V. Review of Piperine as a Bio-enhancer **Am. J. Pharm Tech Res.** v.2(2), p.31-44, 2012.

ACHESON, K. J. Carbohydrate for weight and metabolic control: Where do we stand? **Nutrition.** v.26, p. 141-145, 2010.

ADA. Standards of medical care in diabetes. **Diabetes Care**, v. 33(S1), p.S11-61, 2010.

AGGARWAL, B. B. Targeting Inflammation-Induced Obesity and Metabolic Diseases by Curcumin and Other Nutraceuticals **Annu Rev Nutr.** v.30, p.173–199, 2010.

AHMAD, N., FAZAL, H., ABBASI, B. H., FAROOQ, S., ALI, M., KHAN, M. A. Biological role of Piper nigrum L. (Black pepper): A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.** V.2(3), p.1945-1953, 2012.

AK, T., GÜLÇİN, I. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. **Chem Biol Interact.** v.174(1), p.27-37, 2008.

ALLEN, C. F. H. "2,4-Dinitrophenylhydrazine", **Org. Synth.** v.2, p.228, 1943.

ANAND P, THOMAS S. G., KUNNUMAKKARA A. B., SUNDARAM C., HARIKUMAR K. B., SUNG B., THARAKAN S. T., MISRA K., PRIYADARSINI I. K., RAJASEKHARAN K. N., AGGARWAL B. B. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. **Biochem Pharmacol.** v.76(11), p.1590-611, 2008.

ANAND, P., KUNNUMAKKARA, A. B., NEWMAN, R. A., AGGARWAL, B. B. Bioavailability of curcumin: problems and promises. **Mol Pharm**, v.4, p.807-18, 2007.

ANJO, D. L. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**. v.3(2), p.145-154, 2004.

ARSA, G., LIMA, L., ALMEIDA, S. S., MOREIRA, S. R.; CAMPBELL, C. S. G.; SIMÕES, H. G.; Diabetes Mellitus tipo 2: Aspectos fisiológicos, genéticos e formas de exercício físico para seu controle. **Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum** v.11(1), p.103-111, 2009.

ARUN, N., NALINI, N. Efficacy of turmeric on blood sugar and polyol pathway in diabetic albino rats. **Plant Foods Hum Nutr** v.57, p.41-52, 2002.

ASAI, A., MIYAZAWA, T. Occurrence of orally administered curcuminoid as glucuronide and glucuronide/sulfate conjugates in rat plasma. **Life Sci**. v.67, p.2785-2793, 2000.

ATAL, C. K., ZUTSHI, U., RAO, P. G. Scientific evidence on the role of ayurvedic herbals on bioavailability of drugs. **J. Ethnopharm.** v.4(2), p.229-232, 1981.

BABU, P. S., SRINIVASAN, K. Renal lesions in streptozotocin-induced diabetic rats maintained on onion and capsaicin containing diets. **Journal of Nutrition Biochemistry**, v.10, p.477-483, 1999.

BANDEIRA, S. M., FONSECA, L. J. S., GUEDES, G. S., RABELO, L. A., GOULART, M. O. F., VASCONCELOS, S. M. L. Oxidative Stress as an Underlying Contributor in the Development of Chronic Complications in Diabetes Mellitus **Int. J. Mol. Sci.** v,14, p.3265-3284, 2013.

BANO, G., RAINA, R. K., ZUTSHI, U., BEDI, K. L., JOHRI, R. K., SHARMA, S. C. Effect of piperine on bioavailability and pharmacokinetics of propranolol and theophylline in healthy volunteers. **Eur. J. Clin. Pharm.** v.41(6), p.615-617, 1991.

BARONE, B., RODACKI M., CENCI M. C. P., ZAJDENVERG, L., MILECH A., OLIVEIRA J. E. P. Cetoacidose diabética em adultos: atualização de uma complicação antiga. **Arq Bras Endocrinol Metab**, São Paulo, v.51(9), p.1434-1447, 2007.

BARZEGAR, A., MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A. Intracellular ROS protection efficiency and free radical-scavenging activity of curcumin. **PLoS One**. v.6(10), p.e26012., 2011

BATISTA, F.; MONTEIRO, A.C. Estudo comparativo entre a sensibilidade protetora dos pés e mãos em portadores de Diabetes Mellitus. **Diabetes Clínicas**, v.10(3), p.207, 2006.

BEAUCHAMP, C., FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutase: Improved assays and assay applicable to acrylamide gels. **Anal Biochem**; v.44(1), p.276-87, 1971.

BEERS, R. F. J. R., SIZER, I. W. A spectrophotometric method of measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **J Biol Chem**. v.195(1), p.133-40, 1952.

BERGMEYER, H.U. Methods of Enzymatic Analysis, Florida: **VCH**. v.9, p.449-453, 1977

BEST, L, ELLIOTT, A. C., BROWN, P. D. Curcumin induces electrical activity in rat pancreatic beta-cells by activating the volume-regulated anion channel. **Biochem Pharmacol**. v.73(11), p.1768-75, 2007.

BLUM, J., FRIDOVICH, I. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. **Arch Biochem Biophys**. v.240(2), p.500-8, 1985.

BOLLETER, W. T., BUSHMAN, C. J., TIDWELL, P. W. Spectrophotometric determination of ammonia as indophenol. **Analytical Chemistry**, v.33, p.592-594, 1961.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** v.72, p.248-254, 1976.

BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. **Diabetes**, New York, v.54(6), p.1615-1625, 2005.

BURGOS-MORÓN, E., CALDERÓN-MONTAÑO, J. M, SALVADOR, J., ROBLES, A., LÓPEZ-LÁZARO, M. The dark side of curcumin. **Int J Cancer**. v.126(7), p.1771-5, 2010.

CECARINI, V.; GEE, J.; FIORETTI, E.; AMICI, M.; ANGELETTI, M.; ELEUTERI, A. M.; KELLER, J.N. Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1773, n.2, p.93-104, 2006.

CHEN, C., JOHNSTON, T. D., JEON, H., GEDALY, R., MCHUGH, P. P., BURKE, T. G., RANJAN, D. An in vitro study of liposomal curcumin: stability, toxicity and biological activity in human lymphocytes and Epstein–Barr virus-transformed human B-cells. **Int J Pharm** v.36, p.133–139, 2009.

CHOI, S., CHOI, Y., CHOI, Y., KIM, S., JANG, J., PARK, T. Piperine reverses high fat diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance in mice. **Food Chem.** v.141(4), p.3627-35, 2013

CHONPATHOMPIKUNLERT, P., WATTANATHORN, J., MUCHIMAPURA, S. Piperine, the main alkaloid of Thai black pepper, protects against neurodegeneration and cognitive impairment in animal model of cognitive deficit like condition of Alzheimer's disease. **Food and Chemical Toxicology** v.48(3), p.798-80, 2010.

CLIFFORD, N. W., IYER, k. s., AND COLIN L. RASTON, C. L. Encapsulation and controlled release of nutraceuticals using mesoporous silica capsules **J. Mater. Chem.**, v.18, p.162–165, 2008

CUBERO, F. J., TRAUTWEIN, C. Oxidative Stress and Liver Injury. In: Monga SPS, Cagle PT. **Molecular Pathology of Liver Diseases**. Springer, p. 427-35, 2011.

DAS, B. P., CHOWDHURY, D. N., CHOWDHURY, B., DAS, G. K., RAY, T. Studies on some alkaloides for toxicity on larvae of *Culex quinquefascitus*. **Indian J. Environ. Health**, v.38, p.81-85, 1996.

DAVIES, J. L., KAWAGUCHI, Y., BENNETT, S. T., COPEMAN, J. B., CORDELL, H. J., PRITCHARD, L. E., REED, P. W., GOUGH, S. C., JENKINS, S. C., PALMER, S. M. A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. **Nature** v.371, p.130–136, 1994.

DESHPANDE, S. S., LALITHA, V. S., INGLE, A. D., RASTE, A. S., GADRE, S. G., MARU, G. B. Subchronic oral toxicity of turmeric and ethanolic turmeric extract in female mice and rats. **Toxicol Lett**. v.95(3), p.183-93, 1998.

DIKALOV S. Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. **Free Radic Biol Med**. v.51(7), p.1289-301,2011

DU, X.L. et al. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the AKT site. **J Clin Invest**, v.108(9), p.1341-1348, 2001.

DUBOWSKI, K. M. An o-toluidine method for body fluid glucose determination. **Clinical Chemistry**, v.8, p.215-235, 1962.

EBERHARDT, M. K. Reactive oxygen metabolites: chemistry and medical consequences, Ed. **CRC Press**, Florida, 2001.

EJAZ, A., WU, D., KWAN, P., MEYDANI, M. Curcumin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes and angiogenesis and obesity in C57/BL mice. **J Nutr**. v.139(5), p.919-25, 2009.

EL-BENNA, J., DANG P. M., GOUGEROT-POCIDALO M. A., ELBIM C. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v.53(3), p.199-206, 2005.

ELLMAN, G.L. Tissue sulfhydryl groups. **Arch Biochem Biophys** v.82, p.70-7, 1959.
EVELSON, P., SUSEMIHL, C., VILLARREAL, I., LLESUY, S., RODRÍGUEZ, R., PEREDO, H. et al. Hepatic morphological changes and oxidative stress in chronic streptozotocin-diabetic rats. **Ann Hepatol**. v.4(2), p.115-20, 2005.

FANG, J., LU, J., HOLMGREN, A. Thioredoxin reductase is irreversibly modified by curcumin: a novel molecular mechanism for its anticancer activity. **J Biol Chem**. v.280(26), p.25284-90, 2005.

FARHANGKHOEE, H., KHAN, Z. A., CHEN, S., CHAKRABARTI, S. Differential
FELIG, P; BERGMAN, M. The endocrine pancreas: effects of curcumin on vasoactive factors in the diabetic rat heart. **Nutr Metab (Lond)** v.3(27). P.1-8, 2006

FELIG, P; BAXTER, J. D.; FROHMAN, L. A. Endocrinology and Metabolism. 3ed, **Mcgraw-Hill**, January 15, 1995

FIGLEWICZ, D. P., SIPOLS, A. J. Energy regulatory signals and food reward. **Pharmacol Biochem Behav**. v.97(1), p.15-24, 2010.

FORBES, J. M., COOPER, M. E. Mechanisms of Diabetic Complications **Physiol Rev** v.93, p.137–188, 2013.

FUJIWARA, H., HOSOKAWA, M., ZHOU, X., FUJIMOTO, S., FUKUDA, K., TOYODA, K. et al. Curcumin inhibits glucose production in isolated mice hepatocytes. **Diabetes Res Clin Pract**. v.80(2), p.185-91, 2008.

GANNONG, W.F. *Fisiologia Médica*. 22ed. Rio de Janeiro: **McGraw Hill Interamericana do Brasil**, 2006.

GIACCO, F., BROWNLEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circ Res**, v.107(9), p.1058-1070, 2010.

GIROTTI AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. **J Lipid Res**. v.39(8), p.1529-42, 1998.

GOLDBERG, I. J. Clinical review 124: Diabetic dyslipidemia: causes and consequences. **J Clin Endocrinol Metab**. V.86(3), p.965-71, 2001.

GUTIERRES V. O., PINHEIRO, C. M., ASSIS, R. P., VENDRAMINI, R. C., PEPATO, M. T., BRUNETTI, I. L. Curcumin-supplemented yoghurt improves physiological and biochemical markers of experimental diabetes. **Br J Nutr**. v.108(3), p.440-8, 2012.

GUYTON, A. C. & HALL, J.E. *Fisiologia Humana*. 9.ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 1996.

HALLIWELL, B., GUTTERRIDGE, J. M. C. Free radical in Biology and Medicine. 3rd ed. New York: **Oxford Science Publications**, 2010

HOLDER, G. M., PLUMMER, J. L., RYAN, A. J. The metabolism and excretion of curcumin (1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6- heptadiene-3,5-dione) in the rat. **Xenobiotica** v.8, p.761-768, 1978.

HUANG, Q., YU, H., RU, Q. Bioavailability and Delivery of Nutraceuticals Using Nanotechnology **journal of food science**. v.75(1), p. R50-7. , 2010

INTERNATIONAL IABETES FEDERATION (IDF). The global burden. In: **IDF Diabetes Atlas**, 2014. 6th. Belgium, p.29-49. Acessado via <http://www.idf.org/diabetesatlas>. Accessed 05 May 2014.

IRESO, C. R., JONES, D. J., ORR, S., COUGHTRIE, M. W., BOOCO, D. J., WILLIAMS, M. L., FARMER, P. B., STEWARD, W. P., GESCHER, A. J. Metabolism

of the cancer chemopreventive agent curcumin in human and rat intestine. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Pre.** v.11, p.105-111, 2002.

IRESO, C., ORR, S., JONES, D. J., VERSCHOYLE, R., LIM, C. K., LUO, J. L., HOWELLS, L., PLUMMER, S., JUKES, R., WILLIAMS, M., STEWARD, W. P., GESCHER, A. Characterization of metabolites of the chemopreventive agent curcumin in human and rat hepatocytes and in the rat in vivo, and evaluation of their ability to inhibit phorbol ester-induced prostaglandin E2 production. **Cancer Res.** v.61, p.1058-1064, 2001.

ITTHIPANICHPOONG, C., RUANGRUNGSI, N., KEMSRI, W., SAWASDIPANICH, A. Antispasmodic effects of curcuminoids on isolated guinea-pig ileum and rat uterus. **Journal of the Medical Association Thailand**, v.86, p.299-309, 2003.

JACOBSON, A.M. Current concepts: the psychological care of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **New England Journal Medicine**, v.334, p.1249-1253, 1996.

JAY, D., HITOMI, H., GRIENDLING, K. K. Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. **Free Radic Biol Med** v.40, p.183-92, 2006.

JOHRI, R. K., THUSU, N., KHAJURIA, A., ZUTSHI, U. Piperine-mediated changes in the permeability of rat intestinal epithelial-cells the status of gamma-glutamyl transpeptidase 161 activity, uptake of amino-acid and lipid-peroxidation. **Biochem. Pharmacol.** v.43(7), p.1401-1407, 1992.

JÚNIOR, L. R., HÖEHR, N. F., VELLASCO, A. P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo **Quim. Nova**, v.24(1), p.112-119, 2001.

KAHN, C. R., SALTIEL, A. R. The molecular Mechanism of insulin action and the regulation of glucose and lipid metabolism. In Principles of Diabetes Mellitus, 2ed, Editor Leonid Poretsky, **Springer**, 2010

KEENAN, H. A., SUN, J. K., LEVINE, J., DORIA, A., AIELLO, L. P., EISENBARTH, G., BONNER-WEIR, S., KING, G. L. Residual insulin production and pancreatic β -cell turnover after 50 years of diabetes: Joslin Medalist Study. **Diabetes** v.59, p.2846–2853, 2010.

KHAJURIA, A., THUSU, N., ZUTSHI, U. Piperine modulates permeability characteristics of intestine by inducing alterations in membrane dynamics: Influence on brush border membrane fluidity, ultrastructure and enzyme kinetics. **Phytomedicine** v.9(3), p.224-231, 2002.

KIM M, KIM Y. Hypocholesterolemic effects of curcumin via up-regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase in rats fed a high fat diet. **Nutr Res Pract.** v.4(3), p.191-5, 2010

KIM, T., DAVIS, J., ZHANG, A. J., HE, X., MATHEWS, S. T. Curcumin activates AMPK and suppresses gluconeogenic gene expression in hepatoma cells. **Biochem Biophys Res Commun.** v.388(2), p.377-82, 2009

KOHN, H. I., LIVERSEDGE, M. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione. **J Pharmacol Experimen Ther.** v.82(3), p.292-300, 1944.

KONO, Y., FRIDOVICH, I. Inhibition and reactivation of Mn-catalase. Implications for valence changes at the active site manganese. **J Biol Chem.** v.258(22), p.13646-8, 1983.

KORUK M, TAYSI S, SAVAS MC, YILMAZ O, AKCAY F, KARAKOK M. Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in patients with nonalcoholic steatohepatitis. **Ann Clin Lab Sci.** v.34(1), p.57-62, 2004.

KOUL, S., KOUL, J. L., TANEJA, S. C., DHAR, K. L. JAMWAL, D. S., SINGH, K., REEN, R. K., SINGH, J. Structure-Activity Relationship of Piperine and its Synthetic Analogues for their Inhibitory Potentials of Rat Hepatic Microsomal Constitutive and

Inducible Cytochrome P450 Activities, **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.8, p.251-268, 2000.

LAO, C. D., RUFFIN, M. T. 4th, NORMOLLE, D., HEATH, D. D., MURRAY, S. I., BAILEY, J. M., BOGGS, M. E., CROWELL, J., ROCK, C. L., BRENNER, D. E.. Dose escalation of a curcuminoid formulation. **BMC Complementary Alternative Medicine**, v.6, p.10, 2006.

LEE, A. Y., CHUNG, S. S. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. **FASEB J.** v.13(1), p.23-30, 1999.

LEE, H., NISHIKAWA, A., TANIGUCHI, N. Method of measuring SOD activity. **Oriental Yeast Co., Ltd.** 1990

LEU, J. P., ZONSZEIN, J. Diagnostic criteria and classification of Diabetes. In Principles of Diabetes Mellitus, 2ed, Editor Leonid Poretsky, **Springer**, 2010

LEVINE, R. L., WILLIAMS, J. A., STADTMAN, E. R., SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol** v.233, p.346-57, 1994.

LI, J., LIU, Y., WEI, J. Q., WANG, K., CHEN, L. X., YAO, X. S., QIU, F. Isolation and identification of phase 1 metabolites of curcuminoids in rats. **Planta Med.**, v.78, p.1351-1356, 2012.

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem.** v.193(1), p.265-75, 1951.

LUCCHESI, A. N., FREITAS, N. T., CASSETTARI, L. L., MARQUES, S. F., SPADELLA, C. T. Diabetes mellitus triggers oxidative stress in the liver of alloxan-treated rats: a mechanism for diabetic chronic liver disease. **Acta Cir Bras.** V.28(7), p.502-8, 2013.

MADONNA R, DE CATERINA R. Cellular and molecular mechanisms of vascular injury in diabetes--part I: pathways of vascular disease in diabetes. **Vascul Pharmacol.** v.54(3-6), p.68-74, 2011.

MAITI, K., MUKHERJEE, K., GANTAIT, A., SAHA, B. P., MUKHERJEE, P. K.. Curcumin–phospholipid complex: preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats. **Int J Pharm** v.330, p.155–163, 2007.

MAŁECKI, M., SKUPIEŃ, J. Problems in differential diagnosis of diabetes types. **Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej**, v.118, p.7-8, 2008.

MARCAYLO, T. H., STEWARD, W. P., GESCHER, A. J. Rapid analysis of curcumin and curcumin metabolites in rat biomatrices using a novel ultraperformance liquid chromatography (UPLC) method. **J. Agric. Food Chem**, v.57, p.797-803, 2009.

MEGHANA, K., SANJEEV, G., RAMESH, B. Curcumin prevents streptozotocin-induced islet damage by scavenging free radicals: a prophylactic and protective role. **Eur J Pharmacol.** v.577(1-3), p.183-91, 2007.

MEGHWAL, M., GOSWAMI, T. K. Piper nigrum and Piperine: An Update. **Phytother Res.** v.27(8), p.1121-30, 2013.

MEISTER, A., ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annu Rev Biochem.** v.52, p.711-60, 1983.

METZLER, M., PFEIFFER, E., SCHULZ, S. I., DEMPE, J. S. Curcumin Uptake and Metabolism. **Biofactors**, v.39(1), p.14–20, 2013

MORAES F. P.; COLLA L. M. Functional foods. Part 2: the impact on current regulatory terminology /**Revista Eletrônica de Farmácia** v.3(2), p.99-112, 2006.

MORI, D. M., BAVIERA, A. M., DE OLIVEIRA RAMALHO, L. T., VENDRAMINI, R. C., BRUNETTI, I. L., PEPATO, M. T. Temporal response pattern of biochemical

analytes in experimental Diabetes. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.38, p.183-191, 2003.

MORSY, M. A., IBRAHIM, S. A., AMIN, E. F., KAMEL, M. Y., RIFAAI, R. A., HASSAN, M. K. Curcumin ameliorates methotrexate-induced nephrotoxicity in rats. **Adv Pharmacol Sci**. 387071, 2013.

MROZ J. R., Clinical enzymology. In: ANDERSON, S. C., COCKAYNE, S. Clinical Chemistry: Concepts & Applications. New York: **McGraw Hill**. Cap.11, p.179-202, 2003.

MURUGAN P, PARI L. Influence of tetrahydrocurcumin on hepatic and renal functional markers and protein levels in experimental type 2 diabetic rats. **Basic Clin Pharmacol Toxicol** v.101, p.241-5, 2007.

MURUGAN, P., PARI, L. Effect of tetrahydrocurcumin on lipid peroxidation and lipids in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. **Basic Clin Pharmacol Toxicol** v.99, p.122-7, 2006

MURUGAN, P., PARI, L. Influence of tetrahydrocurcumin on hepatic and renal functional markers and protein levels in experimental type 2 diabetic rats. **Basic Clin Pharmacol Toxicol** v.101, p.241-5, 2007.

NA, L. X., ZHANG, Y. L., LI, Y., LIU, L. Y., LI, R., KONG, T. SUN C. H. Curcumin improves insulin resistance in skeletal muscle of rats. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**. v.21(7), p.526-33, 2011.

NABAVI, S. F., MOGHADDAM, A. H., ESLAMI, S., NABAVI, S. M. Protective effects of curcumin against sodium fluoride-induced toxicity in rat kidneys. **Biol Trace Elem Res**. v,145(3), p.369-74, 2012.

NANDAKUMAR, D. N., NAGARAJ, V. A., VATHSALA, P. G., RANGARAJAN, P., PADMANABAN, G. Curcumin-artemisinin combination therapy for malaria. **Antimicrob Agents Chemother.** v.50(5), p.1859–1860, 2006.

NAZ, S., JABEEN, S., ILYAS, S., MANZOOR, F., ASLAM, F., ALI, A. Antibacterial activity of *Curcuma longa* varieties against different strains of Bacteria. **Pak. J. Bot.** v.42, p.455-462, 2010.

NEWSHOLME, P., HABER, E. P., HIRABARA S. M., REBELATO E. L., PROCOPIO J., MORGAN D., OLIVEIRA-EMILIO H. C., CARPINELLI A. R., CURI R. Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. **The Journal of Physiology** v.583, p.9-24, 2007.

OKADA, K., WANGPOENGTRAKUL, C., TANAKA, T., TOYOKUNI, S., UCHIDA, K., OSAWA, T. Curcumin and especially tetrahydrocurcumin ameliorate oxidative stress-induced renal injury in mice. **J Nutr.** v.131(8), p.2090-5, 2001.

OLOFSSON, E. M., MARKLUND, S. L., BEHNDIG, A. Enhanced diabetes-induced cataract in copper-zinc superoxide dismutase-null mice. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** v.50(6), p.2913-8, 2009.

OLSZANECKI, R., JAWIEŃ, J., GAJDA, M., MATEUSZUK, L., GEBSKA, A., KORABIOWSKA, M., CHŁOPICKI, S., KORBUT, R. Effect of curcumin on atherosclerosis in apoE/ LDL-R double knockout mice. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.56, p.627-635, 2005.

ORRENIUS, S.; GOGVADZE, V.; ZHIVOTOVSKY, B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.47, p.143-183, 2007.

OSAWA, C. C., FELÍCIO, P. E., GONÇALVES, L. A. G. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e Alternativos, **Quim. Nova**, v.28(4), p.655-663, 2005

PAN, M. H., HUANG, T. M., LIN, J. K. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. **Drug Metab Dispos.** v.27(4), p.486-94, 1999.

PARI L, KARTHIKESAN K, MENON V. P. Comparative and combined effect of chlorogenic acid and tetrahydrocurcumin on antioxidant disparities in chemical induced experimental diabetes. **Mol Cell Biochem.** V.341(1-2), P.109-17. 2010

PARI, L., KARTHIKESAN, K., MENON, V. P. Comparative and combined effect of chlorogenic acid and tetrahydrocurcumin on antioxidant disparities in chemical induced experimental diabetes. **Mol Cell Biochem.** v.341(1-2), p.109-17, 2010

PENNATHUR, S., WAGNER, J. D., LEEUWENBURGH, C., LITWAK, K. N., HEINECKE, J. W. A hydroxyl radical-like species oxidizes cynomolgus monkey artery wall proteins in early diabetic vascular disease. **J Clin Invest.** v.107(7), p.853-60, 2001.

PEPATO, M. T., KELLER, E. H., BAVIERA, A. M., KETTELHUT, I. C., VENDRAMINI, R. C., BRUNETTI, I. L. Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats. **Journal Ethnopharmacology**, v.81, p.191-197, 2002.

PÉREZ-ARRIAGA, L., MENDOZA-MAGAÑA, M. L., CORTÉS-ZÁRATE, R., CORONA-RIVERA, A., BOBADILLA-MORALES, L., TROYO-SANROMÁN, R., RAMÍREZ-HERRERA MA, M. A. Cytotoxic effect of curcumin on *Giardia lamblia* trphozoites. **Acta Tropica**, v.98, p.152-161, 2006.

PESCHEL, D., KOERTING, R., NASS, N. Curcumin induces changes in expression of genes involved in cholesterol homeostasis. **J Nutr Biochem.** v.18(2), p.113-9, 2007.

PFEIFFER E, HOEHLE S. I, WALCH S. G, RIESS A, SÓLYOM A. M, METZLER M. Curcuminoids form reactive glucuronides in vitro. **J Agric Food Chem.** v.55(2), p.538-44, 2007.

PILZ, J., MEINEKE, I., GLEITER, C. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. **J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed.** v.742, p.315-25, 2000.

PIYACHATURAWAT P, GLINSUKON T, TOSKULKAO C. Acute and subacute toxicity of piperine in mice, rats and hamsters. **Toxicol Lett.** V.16(3-4), p.351-9, 1983.

PRASAD, S., TYAGI, A. K., AGGARWAL, B. B. Recent Developments in Delivery, Bioavailability, Absorption and Metabolism of Curcumin: the Golden Pigment from Golden Spice. **Cancer Res Treat.** v.46(1), p.2-18, 2014.

RAVINDRANATH, V., CHANDRASEKHARA, N. Absorption and tissue distribution of curcumin in rats. **Toxicology.** v.16(3), p.259-65, 1980.

RAVINDRANATH, V., CHANDRASEKHARA, N. Metabolism of curcumins studies with [3H] curcumin. **Toxicology,** v.22, p.337-344, 1982.

RIBEIRO, T. S., Transformações químicas no inibitor natural de piperina e avaliação da atividade tóxica sobre Trypanosoma cruzi. **Dissertação de Mestrado,** UFRIRJ, 2004.

RIFAI, N., WARNICK, G. R. Lipids, Lipoproteins, Apolipoproteins, and Other Cardiovascular Risk Factors. In: BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R.; BRUNS, D.E. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 40ed. St. Louis: **Elsevier Saunders.** Cap.26, p.903-981, 2006.

RINGMAN, J. M., FRAUTSCHY, S. A., COLE, G. M., MASTERMAN, D. L., CUMMINGS, J. L. A Potential Role of the Curry Spice Curcumin in Alzheimer's Disease. **Current Alzheimer Research,** v.2, p.1-6, 2005

ROLO, P. A.; PALMEIRA, M. C. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.212, p.167-178, 2006.

RUSH, J. W., SANDIFORD, S. D. Plasma glutathione peroxidase in healthy young adults: influence of gender and physical activity. **Clin Biochem**. v.36(5), p.345-51, 2003.

RYU, E. K., CHOE, Y. S., LEE, K. H., CHOI, Y., KIM, B. T. Curcumin and dehydrozingerone derivatives: synthesis, radiolabeling, and evaluation for beta-amyloid plaque imaging. **J Med Chem**. v.49(20), p.6111-9, 2006.

SADI, G., YILMAZ, O., GÜRAY, T. Effect of vitamin C and lipoic acid on streptozotocin-induced diabetes gene expression: mRNA and protein expressions of Cu-Zn SOD and catalase. **Mol Cell Biochem**. v.309(1-2), p.109-16, 2008.

SAHEBKAR, A. Why it is necessary to translate curcumin into clinical practice for the prevention and treatment of metabolic syndrome? **Biofactors**. v.39(2), p.197-208, 2013.

SANDUR, S. K., ICHIKAWA, H., PANDEY, M. K., KUNNUMAKKARA, A. B., SUNG, B., SETHI, G. et al. Role of pro-oxidants and antioxidants in the anti-inflammatory and apoptotic effects of curcumin (diferuloylmethane). **Free Radic Biol Med**. v.43(4), p.568-80, 2007

SCANDINAVIAN, Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation, v.33, p.291-306, 1974

SEDLAK, J., LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissues with Ellmann's reagent. **Anal Biochem**. v.25(1), p.192-205, 1968.

SHARMA, R. A., EUDEN, S. A., PLATTON, S. L., COOKE, D. N., SHAFAYAT, A., HEWITT, H. R. et al. Phase I clinical trial of oral curcumin: biomarkers of systemic activity and compliance. **Clin Cancer Res.** v.10(20), p.6847-54, 2004

SHARMA, R. A., MCLELLAND, H. R., HILL, K. A., IRESOON, C. R., EUDEN, S. A., MANSON, M. M. et al. Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of oral Curcuma extract in patients with colorectal cancer. **Clin Cancer Res.** v.7(7), p.1894-900, 2001.

SHARMA, R. A., STEWARD, W. P., GESCHER, A. J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin. **Adv Exp Med Biol** v.595, p.453-70, 2007.

SHOBA, G., JOY, D., JOSEPH, T., MAJEED, M., RAJENDRAN, R., SRINIVAS, P. S. INFLUENCE of piperine on the pharmacokinetic of Curcumin in animals and human volunteers. **Planta Med.** v.64, p.353-365, 1998.

SIDDIQUI, A. A., SIDDIQUI, S. A., AHMAD, S., SIDDIQUI, S., AHSAN, I., SAHU, k. Diabetes: Mechanism, Pathophysiology and Management-A Review **International Journal of Drug Development & Research.** v.5(2), 2013.

SINDHU R. K, KOO J. R, ROBERTS C. K, VAZIRI N. D. Dysregulation of hepatic superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in diabetes: response to insulin and antioxidant therapies. **Clin Exp Hypertens.** v.26(1), p.43-53, 2004.

SONG, F. JIA W., YAO Y., HU Y., LEI L., LIN J., SUN X., LIU L. Oxidative stress, antioxidant status and DNA damage in patients with impaired glucose regulation and newly diagnosed type 2 diabetes. **Clin Sci,** v.112(12), p.599-606, 2007.

SRINIVASAN, K. Black pepper and its pungent principle-piperine: a review of diverse physiological effects. **Crit Rev Food Sci Nutr.** v.47(8), p.735-48, 2007.

SRIVIVASAN, A., MENON, V. P., PERIASWAMY, V., RAJASEKARAN, K. N. Protection of pancreatic beta-cell by the potential antioxidant bis-o-hydroxycinnamoyl

methane, analogue of natural curcuminoid in experimental diabetes. **Journal Pharmaceutical Science**, v.6, p.327-333, 2003.

STÖHR, J. R., XIAO, P. G., BAUER, R. Constituents of inhibit Piper species and their inhibitory activity on prostaglandin and leukotriene biosynthesis in vitro. **J. Ethnopharmacol.**, v.75, p.133-139, 2001.

STUMP, C. S., NAIR, K. S. Alterations in protein metabolism in Diabetes Mellitus. In Principles of Diabetes Mellitus, 2ed, Editor Leonid Poretsky, **Springer**, 2010

SUN, M., SU, X., DING, B., HE, X., LIU, X., YU, A. et al. Advances in nanotechnology-based delivery systems for curcumin. **Nanomedicine (Lond)**. v.7(7), p.1085-100, 2012.

SURYANARAYANA, P., SATYANARAYANA, A., BALAKRISHNA, N., KUMAR, P. U., REDDY, G. B. Effect of turmeric and curcumin on oxidative stress and antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rat. **Med Sci Monit** v.13(12), p.BR286-92, 2007.

TANIGUCHI, N., KANETO, H., ASAHI, M., TAKAHASHI, M., WENYI, C., HIGASHIYAMA S. et al. Involvement of glycation and oxidative stress in diabetic macroangiopathy. **Diabetes**. v.45(3), p.S81-3, 1996.

TANNUS, L. R. M. et al. Diabetes mellitus do tipo 1A na primeira infância de gêmeos dizigóticos: associação entre fatores genéticos e ambientais. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v.51(1), 2007.

TRINDER, P. Determination of blood glucose using 4-amino phenazone as oxygen acceptor. **Journal Clinical Pathology**, v.22, p.158-161, 1969.

VAREED, S. K., KAKARALA, M., RUFFIN, M. T., CROWELL, J. A., NORMOLLE, D. P., DJURIC, Z. et al. Pharmacokinetics of curcumin conjugate metabolites in healthy human subjects. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. v.17(6), p.1411-7, 2008

VIDELA, L. A. Oxidative stress signaling underlying liver disease and hepatoprotective mechanisms. **World J Hepatol.** v.1(1), p.72-8, 2009.

WAHLSTROM, B., BLENNOW, G. A study on the fate of curcumin in the rat. **Acta Pharmacol. Toxicol.** v.43, p.86-92, 1978.

WAJCHENBERG, B. L. Disfunção endotelial no diabetes tipo 2. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.46(5), p.514-519, 2002.

WRÓBLENSKI, F., LADUE, J. S. Serum glutamic-pyruvic transaminase in cardiac and hepatic disease. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.91, p.569-571, 1956.

XAVIER, S., SADANANDAN, J., GEORGE, N., PAULOSE, C. S. β_2 -adrenoceptor and insulin receptor expression in the skeletal muscle of streptozotocin induced diabetic rats: antagonism by vitamin D₃ and curcumin. **Eur J Pharmacol.** v.687(1-3), p.14-20, 2012.

YALLAPU, M. M., MAHER, D. M., SUNDRAM, V., BELL, M. C., JAGGI, M., CHAUHAN, S. C. Curcumin induces chemo/radio-sensitization in ovarian cancer cells and curcumin nanoparticles inhibit ovarian cancer cell growth. **J Ovarian Res.** v.3(11), 2010.

YANG, K. Y., LIN, L. C., TSENG, T. Y., WANG, S. C., TSAI, T. H. Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from *Curcuma longa* by LC-MS/MS. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.** v.15, p.183-9, 2007.

YANG, R. Z., BLAILEANU, G., HANSEN, B. C., SHULDINER, A. R, GONG, D. W. cDNA cloning, genomic structure, chromosomal mapping, and functional expression of a novel human alanine aminotransferase. **Genomics.** v.79(3), p.445-50, 2002.

YANG, R. Z., PARK, S., REAGAN, W. J., GOLDSTEIN, R., ZHONG, S., LAWTON, M. et al. Alanine aminotransferase isoenzymes: molecular cloning and quantitative

analysis of tissue expression in rats and serum elevation in liver toxicity. **Hepatology**, v.49(2), p.598-607, 2009.

ZBARSKY, V., DATLA, K. P., PARKAR, S., RAI, D. K., ARUOMA, O. I., DEXTER, D. T. Neuroprotective properties of the natural phenolic antioxidants curcumin and naringenin but not quercetin and fisetin in a 6-OHDA model of Parkinson's disease. **Free Radical Research**, v.39, p.1119-1125, 2005.

ZENG, Y. C., QIU, F., LIU, Y., QU, G. X., YAO, X. S. Isolation and identification of phase 1 metabolites of demethoxycurcumin in rats. **Drug Metab. Dispos.**, v.35, p.1564-1573, 2007.

ZHANG, D., FU, M., GAO, S., LIU, J. Curcumin and Diabetes: A Systematic Review **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2013, p.636053, 2013

ANEXO I – CARTA DE APROVAÇÃO PELO CEUA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 43/2012

Interessado: CARLOS ALBERTO ARCARO FILHO

Orientador: Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti

Projeto: Avaliação da atividade antidiabética, em modelo *in vivo*, da curcumina administrada em suspensão de iogurte na presença e na ausência de piperina

Parecer nº 08/2013 – Comissão de Ética no Uso de Animais

O Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais, desta Faculdade, aprovou **ad-referendum** as adequações feitas no protocolo do projeto de pesquisa "Avaliação da atividade antidiabética, em modelo *in vivo*, da curcumina administrada em suspensão de iogurte na presença e na ausência de piperina", apresentado pelo pós-graduando CARLOS ALBERTO ARCARO FILHO, sob orientação do Professor Doutor Iguatemy Lourenço Brunetti, do Departamento de Análises Clínicas, desta Faculdade.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em MAIO de 2013, em formulário para este fim.

Araraquara, 18 de março de 2013.

Prof. Dr. CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA

1. COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DE ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

De: "PLOS ONE" <no-reply@editorialmanager.com>

Assunto: Submission Confirmation for Piperine, a natural bioenhancer, nullifies the antidiabetic and antioxidant activities of curcumin in streptozotocin-diabetic –

[EMID:38801ae83a6fdebfb]

Data: Ter, Julho 8, 2014 7:48 pm

Para: Iguatemy Lourenço Brunetti <brunetti@fcfar.unesp.br>

PONE-D-14-30565

Piperine, a natural bioenhancer, nullifies the antidiabetic and antioxidant activities of curcumin in streptozotocin-diabetic rats

PLOS ONE

Dear Mr Brunetti,

Thank you for submitting your manuscript entitled "Piperine, a natural bioenhancer, nullifies the antidiabetic and antioxidant activities of curcumin in streptozotocin-diabetic rats" to PLOS ONE. Your assigned manuscript number is PONE-D-14-30565.

We will now begin processing your manuscript and may contact you if we require further information. You will receive an update once your manuscript passes our in-house technical check; you can also check the status of your manuscript by logging into your account at <http://pone.edmgr.com/>.

Please visit EveryONE (<http://blogs.plos.org/everyone>), the PLOS ONE community for our published authors and readers, to find out what the journal is thinking, changing and doing.

If you have any inquiries or other comments regarding this manuscript, please contact plosone@plos.org.

Thank you for your support of PLOS ONE.

Kind regards,

PLOS ONE

2. ARTIGO

Piperine, a natural bioenhancer, nullifies the antidiabetic and antioxidant activities of curcumin in streptozotocin-diabetic rats

Carlos Alberto Arcaro, Vânia Ortega Gutierrez, Renata Pires de Assis, Thais Fernanda Moreira, Paulo Inácio da Costa, Amanda Martins Baviera, Iguatemy Lourenço Brunetti*

Institutional address:

Department of Clinical Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University - UNESP, Araraquara, São Paulo, Brazil

*** Corresponding author**

Iguatemy Lourenço Brunetti

Department of Clinical Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University

Rua Expedicionários do Brasil, 1621, CEP 14801 360, Araraquara, São Paulo, Brazil

Phone: +55 16 3301 5703

Fax: +55 16 3322 0073

E-mail: brunetti@fcfar.unesp.br

Abstract

Knowing that curcumin has low bioavailability when administered orally, and that piperine has bioenhancer activity by inhibition of hepatic and intestinal biotransformation processes, the aim of this study was to investigate the antidiabetic and antioxidant activities of curcumin (90mg/kg) and piperine (20 or 40mg/kg), alone or in association, incorporated in yoghurt, to streptozotocin (STZ) induced diabetic rats. The treatment for 45 days of STZ-diabetic rats with curcumin incorporated in yoghurt improved all parameters altered in this experimental model of diabetes, such as physiological parameters obtained in metabolic cages, glycemia, dyslipidemia, markers of liver and kidney dysfunction, as well as improved the oxidative stress, increasing the activities of antioxidant enzymes and decreasing the levels of malondialdehyde and protein carbonyl groups. All these improvements did not reach the response observed in diabetic rats treated with insulin. The treatment of STZ-diabetic rats with yoghurt supplemented with the association of curcumin and 20mg/kg piperine did not change the antidiabetic and antioxidant activities of curcumin; however, the association of curcumin and 40mg/kg piperine abrogated these activities of curcumin. In addition, the alanine aminotransferase levels were further increased in diabetic rats treated with curcumin and 40mg/kg piperine in comparison to untreated diabetic rats. These findings show that curcumin biotransformation is important in activating its antidiabetic potential, which may be related to a metabolite(s) of curcumin.

Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a chronic endocrine disease characterized by disorders in the metabolism of carbohydrates, lipids and proteins due to a deficiency in the insulin production by pancreas beta cells and/or to an increase in the insulin resistance in peripheral tissues, especially liver, skeletal muscles and adipose tissues. The International Diabetes Federation (IDF) estimated the world prevalence of DM for the years 2013 and 2035, showing alarming data: in 2013 more than 382 million people had diabetes, with estimation to rise to 592 million by 2035 [1]. These epidemic proportions of DM all around the world, in parallel with the rise of obesity, are explained by the combination of some factors, as example the rapid urbanization, nutritional transition, and diminished physical activity [2]. The metabolic impairments observed in DM, mainly those leading to hyperglycemia, account for the establishment of the microvascular complications, such as nephropathy, neuropathy and retinopathy, diminishing the life quality and expectancy of diabetic individuals. In addition, DM is also associated with a high risk of macrovascular complications, including heart diseases and stroke, due to dyslipidemia, which is characterized by the “lipid triad”: elevated triglycerides (TG), low levels of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), and the predominance of small dense low-density lipoprotein (LDL) particles [3].

It is well known that chronic hyperglycemia in DM has a crucial role in the development of disorders in the equilibrium pro-oxidant/antioxidant, a condition known as oxidative stress, affecting tissues in which the glucose uptake occurs in an insulin-independent mechanism, mainly pancreas, vascular endothelium, retina, kidney and liver; increased intracellular glucose levels lead to an overproduction of reactive oxygen species (ROS) mainly via mitochondrial electron transport chain [4]. Moreover, the decreased activity of antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) has been also involved in the establishment of oxidative stress in insulin deficient states [5]. Increased ROS levels have been implicated in the damage and loss of function of various biomolecules, leading to cellular and tissue injuries [6]. Moreover, ROS have been also postulated as initiator factors of various intracellular processes involved in the genesis of the micro- and macrovascular complications related to DM [7].

The treatment of DM has as the main objective the maintenance of glycemia levels close to normality, which can be achieved by correcting some biochemical disturbances, for example: *i*) improving the insulin sensitivity and the glucose uptake by peripheral tissues; *ii*) decreasing the hepatic glucose output; *iii*) stimulating the pancreas insulin release. In addition, considering the involvement of oxidative stress in the development of long-term complications of DM, it is crescent the interest in the use of antioxidants, especially those from natural origin, in association with the conventional antidiabetic therapy [8,9,10].

Nowadays, it is clear that nutrition may influence in the prevention of various chronic diseases, including DM. Also, changes in the nutritional behavior are helpful in the treatment of chronic diseases and in the prevention of their long-term related complications. In this line, the “functional foods” concept raises from the knowledge about the health benefits of traditional foods beyond their basic nutritional functions [11]. The presence of biologically active ingredients explains the potential of functional foods in preventing and/or reducing the risk of diseases. Plant sterols, fibers, alkaloids, and polyphenols are examples of compounds found in the functional foods those posses a wide spectrum of biological activities against human diseases [12,13].

Curcumin is a polyphenol (diferuloylmethane), yellow pigment found in the rhizomes of turmeric (*Curcuma longa* L.) that has been traditionally used as food flavoring. In recent decades, curcumin has showed multifunctional pharmacological properties [14], including antidiabetic activity [15]. In addition, recent studies have postulated that some of the beneficial effects of curcumin against diabetes symptoms are related to its antioxidant potential [16,17]. Study from our laboratory [18] showed that the treatment of streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats with 90 mg/kg curcumin incorporated into yoghurt for 31 days improved various physiological and biochemical parameters classically altered in this experimental model of diabetes, as well as reduce the biomarkers of liver and kidney dysfunction. However, although it has been observed improvements in several symptoms of STZ-diabetic rats, the therapeutic efficacy of curcumin was still lower than the responses found with the insulin treatment.

The extensive range of pharmacological potentials of curcumin meets a problem related to its low bioavailability when administered orally [19], which could be limiting its therapeutic efficacy as well as the translation of experimental evidences into clinical trials, hampering the clinical approval of the curcumin use as a therapeutic antidiabetic

agent [20]. The low bioavailability of curcumin is explained by its poor absorption, rapid rate of metabolism and excretion from the body [21]. Attempting to overcome its situation, several vehicles and associations with curcumin have been tested, such as curcumin-loaded nanoparticles, liposomes, micelles, among others [22,23]. The association of curcumin with bioenhancers of natural origin has been also investigated. Piperine, an alkaloid isolated from *Piper nigrum* fruits is one of the first purified natural molecules with bioenhancer properties [24]; piperine increases the bioavailability of drugs by inhibiting the biotransformation processes occurring in liver and intestine. Despite the studies showing the changes in the pharmacokinetic properties of curcumin when co-administered with piperine [25,26], little is known about the pharmacodynamics changes of curcumin in this association. Therefore, the aim of the present study was to investigate the changes promoted by the long-term treatment of STZ-diabetic rats with the association of curcumin and/or piperine incorporated into yoghurt on various biomarkers related to the metabolic and oxidative disturbances observed in this experimental model of DM.

Material and methods

Animals

Male Wistar rats weighing 140-160 g (6 weeks) were housed into individual metabolic cages, under environmentally controlled conditions of temperature ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) and humidity ($55 \pm 5\%$) and with a 12 h light/dark cycle. Rats had free access to water and normal lab chow diet (Purina[®] Labina) throughout the 45 days of experiment. The study was conducted in compliance with recommendations of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and the experimental procedures received prior institutional approval by the Committee for Ethics in Animal Experimentation from the School of Pharmaceutical Sciences, UNESP, Araraquara (resolution n° 08/2013).

Induction of diabetes

After a initial period of adaptation, experimental diabetes was induced by a single intravenous injection of 40 mg/kg streptozotocin (STZ, Sigma Aldrich, USA) dissolved in 0.01 M citrate buffer (pH 4.5), in previously 14 h fasted rats. All animals were anesthetized with isoflurane. Three days after STZ administration, rats with postprandial glycemia values of approximately 24.97 mmol/L were used in the experiments. Plasma glucose levels were determined by the glucose oxidase method [27] using commercial kit (Labtest Diagnostica SA, Brazil).

Experimental design and treatment

Curcumin (Sigma Aldrich, USA), piperine (Sigma Aldrich, USA) alone or in association were mixed with plain yoghurt (Nestlé®, Brazil) with a homogenizer operating at 27,000 rpm for 90 seconds, at a controlled ambient temperature (25°C). Three days after diabetes induction, diabetic (D) rats were assigned into seven groups according similar mean values of glycemia and body weight: diabetic rats treated with yoghurt (DYOG); 90mg/kg curcumin into yoghurt (DC90); piperine at doses of 20mg/kg (DP20) or 40mg/kg (DP40) into yoghurt; association of 90mg/kg curcumin + 20mg/kg piperine (DC90P20) or 90mg/kg curcumin + 40mg/kg piperine (DC90P40) into yoghurt; 4U insulin (DINS). Rats of all groups (except DINS) were treated by gavage twice a day, at 08:00 h and 17:00 h, for 45 days. The curcumin, piperine and associations were administered as a half dose in 0.5 mL of yoghurt, totaling 1.0 mL/rat/day of treatment-supplemented on yoghurt. Rats of the DINS group received two subcutaneous injections of insulin (Biohulin®, NU-100, Brazil), 2U/rat each injection (08:00 h and 17:00 h), for 45 days.

During the experiment, several physiological and biochemical parameters were monitored. Body weight, food and water intake and urinary volume were monitored in a period of 24 h. An aliquot of urine was taken for the determination of the biochemical parameters glycosuria, urinary urea and proteinuria. Blood samples were collected from the tail in heparinized tubes (Hemofol®, 5.000 UI/mL, Brazil) and plasma samples were obtained for the determination of glucose, total-cholesterol (total-C), HDL-cholesterol

(HDL-C) and triglycerides (TG) and for the activities of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and alkaline phosphatase (ALP). The parameters body weight, water and food intake, urinary volume, glycemia, glycosuria, urinary urea and proteinuria were determined weekly throughout the experiment. The plasma activities of AST, ALT and ALP and the plasma levels of TG, total-C and HDL-C were determined at every 15 days. The plasma levels of glucose, TG, total-C, HDL-C, ALT, AST and ALP and the urinary levels of protein and urea were determined using commercial kits (Labtest Diagnostica SA, Brazil) The o-toluidine method was used for the analysis of glycosuria [28].

At the end of the treatment, blood samples were collected from the tail for AST, ALT and ALP measurements and then the rats were euthanized by decapitation and blood was collected for the other biochemical analysis previously described. The *soleus* and *extensor digitorum longus* (EDL) skeletal muscles and the retroperitoneal and epididymal white adipose tissues were immediately removed and weighed, as was a piece of the liver, which was immediately stored at -80°C until analysis of oxidative stress parameters and antioxidant activity enzymes.

Oxidative stress biomarkers and antioxidant enzymes activity

Lipid peroxidation (LPO)

Liver samples (0.25g) were homogenized in 1 mL of 1.15% potassium chloride at 4°C. The homogenates were centrifuged at 10,000 *g* for 10 min at 4°C and the supernatants were used for the analysis. Plasma and liver supernatants were previously deproteinized according Pilz et al. [29]. LPO dienes products, including malondialdehyde (MDA), were measured through thiobarbituric acid (TBA) reaction [30]. The MDA levels in liver were measured spectrophotometrically at 535 nm and MDA levels in plasma were measured fluorometrically with excitation and emission wavelengths of 380 and 460 nm, respectively and 1,1,3,3-tetramethoxypropane was used as a standard. Results were expressed as μmol of MDA/L (plasma) or μmol of MDA/g tissue (liver).

Protein carbonyl groups (PCO)

The PCO were determined according to the method of Levine et al. [31]; the carbonyl groups in proteins reacted with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) to form 2,4-dinitrophenylhydrazone, which was estimated spectrophotometrically at 370 nm. Results were expressed as μmol of PCO/mg protein.

Reduced glutathione (GSH)

Non-protein sulphydryl groups represent an indirect measurement of GSH and were determined according to the method of Sedlak and Lindsay [32], which measures the reduction of 5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) at 412 nm. Results were expressed as mmol of GSH/g tissue.

Measurement of antioxidant enzyme activities**Sample preparation**

Liver samples (0.1g) were homogenized in 1 mL of sodium phosphate buffer (10 mmol/L, pH 7.4) at 4°C. The homogenates were centrifuged at 10,000 *g* for 10 min at 4°C and the supernatants were used for the analysis of CAT, GSH-Px and SOD activities. The protein levels in the liver supernatants were determined according to Lowry et al. [33], using bovine serum albumin as standard.

Catalase (CAT) activity

CAT activity was measured according to the method of Beers and Sizer [34] by monitoring the disappearance of hydrogen peroxide (H_2O_2) at 230 nm. Results were expressed as μKat /mg protein.

Glutathione Peroxidase (GSH-Px) activity

GSH-Px activity was determined according to the method of Rush and Sandiford [35]. GPx catalyzes the oxidation of GSH in the presence of H_2O_2 . In the presence of glutathione reductase, the oxidized glutathione is reduced to GSH with concomitant oxidation of NADPH to NADP^+ . NADPH disappearance was monitored at 340 nm. Results were expressed as $\mu\text{Kat}/\text{mg}$ protein.

Superoxide dismutase (SOD) activity

The activity of SOD on liver were evaluated according to Beauchamp and Fridovich [36], where xanthine oxidase reaction with xanthine and generates superoxide anion ($\text{O}_2^{\bullet-}$), which reduces nitroblue tetrazolium chloride (NBT) to a formazan product. The assay is based on the SOD inhibition of NBT reduction, monitored at 550 nm. Results were expressed as U/mg protein. One unit of SOD is defined as the enzyme amount required to inhibit the rate of NBT reduction by 50%.

Statistical analysis

Data were expressed as mean $\pm$ standard error of mean (SEM). One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student-Newman-Keuls test was used to compare the temporal inter-group differences about the physiological, biochemical, oxidative stress parameters and of the area under the curve (AUC). Paired Student's t test was used to compare the intra-group changes in the physiological and biochemical parameters, relative to day 0. Differences were considered significant at $p < 0.05$. Statistical analyses were performed using the program Graphpad Instat[®] 3.05 (GraphPad Software, USA).

Results

Plasma glucose levels

According our results, it can be observed that the induction of diabetes in rats was effective, since all groups started the experiment with blood glucose levels of approximately 24.97 mmol/L. The DYOG group showed an increase in the glycemia levels throughout the experimental period, characterizing a worsening of the diabetic state. The treatment of diabetic rats with insulin (DINS) was effective in reducing glycemia, maintaining the glucose levels near to normal values during the 45 days of treatment. Although did not reach the same degree of response observed to insulin, the treatment of diabetic rats with curcumin-supplemented yoghurt improved the glycemia control, since it avoided the progressive increase in the glycemia as observed in DYOG, in agreement with previous results from Gutierrez et al. [18]. The treatment with the association of curcumin + 20 mg/kg piperine (DC90P20) did not promote any beneficial effect on glycemia when compared with values from rats treated with curcumin alone. However, when diabetic rats were treated with curcumin + 40 mg/kg piperine (DC90P40), the improvement in the glycemia control promoted by curcumin was impaired, since the glycemia values were similar those observed in DYOG. The treatment with 20 mg/kg piperine (DP20) also prevented the progressive increase in the glycemia, while the values found in diabetic rats treated with 40 mg/kg piperine (DP40) were similar those observed in DYOG (Figure 1A). In the Figure 1B, it can be noted that plasma glucose levels were decreased in DINS (75%), DC90 (40%), DP20 (37%), and DC90P20 (29%) groups when compared to DYOG. DP40 and DC90P40 groups did not have differences in glycemia levels in comparison to DYOG.

Body weight

The lowest body weight gain observed in DYOG is a consequence of the catabolic state typical of insulin-deficient states. In agreement with the minor body weight gain, DYOG showed the lower weights of adipose tissues and skeletal muscles (Figure 2A, Table 2). As expected, the DINS group recovered the ability to grow normally, from the 17th day of treatment; at the end of the treatment, DINS showed the

higher weights of adipose and muscle tissues. The DC90 group also showed an increased body weight gain, from 38th day of treatment, in comparison to all other groups, with exception of DINS, corroborated by the increased weight of adipose tissues and EDL muscles. The DC90P20 group showed body weight gain and adipose and muscles weights similar to those observed with DYOG, showing that the association of curcumin with piperine impaired the benefits previously observed with curcumin alone. Both the DP20 and DP40 groups showed body weight values similar to DYOG; the minor body weight gain of DP20 and DP40 groups was corroborated by lower weight of adipose tissues and skeletal muscles. Highlighting the detrimental effects of the association of curcumin and piperine in diabetic symptoms, the body weight gain of DC90P40 group was decreased in comparison to DC90, and had a trend to be lower than that of DYOG, at the end of the experiment. The weights of adipose tissues and skeletal muscles were also decreased in comparison to values from DC90 (Figure 2A, Table 2). In the Figure 2B, it can be observed that the beneficial effect of curcumin on body weight was comparable to that of insulin, since the body weight was similar between DC90 and DINS groups and were 22% and 27% increased, respectively, in comparison to DYOG. The body weight values of diabetic rats treated with piperine (DP20 or DP40) or its associations with curcumin (DC90P20 and DC90P40) were similar those of DYOG.

Physiological parameters

In the Table 1 are shown the values of food and water intake and urinary volume of diabetic animals before (day 0) and after 45 days of the different treatments. After 45 days of experiment, the classical symptoms of STZ-induced diabetes were observed in DYOG, such as polyphagia, polydipsia and polyuria, in comparison to day 0. As expected, the treatment of diabetic rats with insulin prevented all these symptoms. The treatment of diabetic rats with curcumin-supplemented yoghurt also prevented the impairments in the physiological parameters related to insulin deficiency, since the food and water intake and the urinary volume in DC90 were similar between the day 0 and the day 45 and they were also decreased when compared to DYOG. Diabetic rats from DP20 and DP40 groups had minor food intake in comparison to DYOG, but the values

of water intake and urinary volume were similar those of untreated diabetic rats. Food intake of diabetic rats treated with curcumin + 20 mg/kg of piperine was similar that of DC90 group, and water intake and urinary volume were similar those of DP20. As observed to glycemia and body weight, the association of curcumin with 40mg/kg piperine seems to be detrimental to diabetes state, since this association impaired the beneficial effects previously observed with curcumin alone in food and water intake and urinary excretion.

Lipid profile

The medium plasma levels of TG, Total-C and HDL-C of the different groups were very similar at day 0 (Table 1). At the end of the experiment, the DYOG group showed impairment in lipid profile, with increased levels of TG and total-C, while the treatment with insulin avoided these disturbances, even decreasing the total-C levels. The treatment with curcumin, alone or associated with 20mg/kg piperine, also improved TG, which levels were lower than DYOG; however, the final TG levels in DC90P20 group were increased in comparison to day 0. At the end of the treatment, the DP20 and DP40 groups showed a reduction in TG levels when compared to DYOG group, but the values were increased in comparison to day 0. Here again, rats from DC90P40 group showed the same impairment in TG levels as observed in DYOG (Table 1). The levels of total-C were reduced in plasma from diabetic animals treated with curcumin alone (DC90) or with curcumin + 20mg/kg piperine (DC90P20), in comparison to the values of day 0, in the same group, and in comparison to DYOG. Although not different in relation to time 0, the treatment of diabetic rats with piperine (DP20 or DP40) avoided the increase in the total-C levels as observed in DYOG. Total-C was the unique parameter not impaired by the treatment with curcumin + 40mg/kg piperine: after 45 days of experiment, rats from DC90P40 group showed total-C levels diminished when compared to DYOG (Table 1). Neither the chronicity of the experimental groups or the different treatments led to changes in the HDL-C levels.

Urinary biomarkers of carbohydrate metabolism and kidney dysfunction

At the beginning of the experiment, all groups showed similar values of glycosuria, proteinuria and urinary urea (Table 1). Increased levels of these urinary biomarkers were observed in DYOG after 45 days, as a consequence of uncontrolled glycemia levels (glycosuria), increased amino acid catabolism (urinary urea) and kidney dysfunction (proteinuria), typical symptoms of chronic diabetes. As expected, the treatment with insulin avoided the increase in these urinary biomarkers, even decreasing the glycosuria and the urinary urea levels in comparison to day 0, and preventing the establishment of kidney failure. The glycemic control observed in diabetic rats treated with curcumin reflected in the urinary parameters: the urinary levels of glucose, urea and protein in rats from DC90 or DC90P20 groups after 45 days of treatment were lower than values from DYOG; however, even decreased, the proteinuria values at the end of the experiment were higher than day 0, in both groups (Table 1). As observed to various other parameters previously described, the beneficial effects promoted by curcumin in urinary biomarkers were abrogated in the presence of 40mg/kg piperine. The treatment with 20mg/kg piperine also improved the urinary biomarkers levels in diabetic rats in comparison to DYOG, but they were impaired in the treatment with 40mg/kg piperine alone (Table 1).

Liver toxicity profile

The development of liver dysfunction in STZ-diabetic rats was accompanied by measuring the plasma activities of ALT, AST, and ALP, since the beginning until the end of the experiment, as well as the changes in these biomarkers promoted by the different treatments. The levels of ALT, AST and ALP were progressively increased in plasma from untreated diabetic rats (DYOG); as expected, the treatment of diabetic rats with insulin (DINS) prevented this increase (Figures 3A, 3C, 3E). These data are in agreement with previous results from our laboratory [37]. Maintenance in ALT, AST and ALP levels close to values of day 0 was observed in diabetic rats treated with curcumin (DC90) or with 20mg/kg piperine (DP20) (Figures 3A, 3C, 3E).

It is interesting to note that ALT and ALP seem to be sensitive biomarkers of liver toxicity in comparison to AST. ALT levels were slightly increased in plasma of rats from DC90P20 group in comparison to the beginning of the experiment, as well as in rats from DP40 group, a profile not observed in DC90 or DP20 groups (Figure 3A). The activity of ALP were also increased in plasma of rats from DC90P20 group in comparison to DINS, but still remained similar to values of DC90 or DP20 groups (Figure 3F). In rats treated with 40mg/kg piperine, the ALP levels were increased and did not differ from values found in DYOG (Figure 3F).

The levels of ALT, AST and ALP were markedly increased in plasma of diabetic rats treated with curcumin + 40mg/kg piperine; the levels of AST (Figures 3C and 3D) and ALP (Figures 3E and 3F) in DC90P40 group were similar those found in DYOG. The development of liver toxicity by the association curcumin + 40mg/kg piperine was noted by the ALT levels, since the activity of this enzyme in rats of DC90P40 group was even higher than DYOG (Figures 3A and 3B).

Oxidative stress biomarkers and antioxidant parameters

As observed in Table 3, the oxidative stress was well-characterized in liver and plasma of STZ-diabetic rats, since the levels of MDA (liver or plasma) and PCO (liver) were increased in rats from DYOG, and the activities of hepatic antioxidant enzymes SOD, CAT and GSH-Px were decreased, as well as the GSH levels. As expected, the treatment with insulin prevented the oxidative stress installation in liver of diabetic rats.

Although it has not achieved the magnitude of the insulin responses, the treatment of diabetic rats with curcumin incorporated into yoghurt reduced the oxidative stress, since the levels of MDA and PCO were lower and the activities of antioxidant enzymes and the GSH levels were higher than those found in DYOG. The association of curcumin + 20mg/kg piperine (DC90P20) promoted similar changes in the oxidative stress biomarkers and in CAT activity as those found in the treatment with curcumin alone; however, the antioxidant glutathione system seems to be impaired in DC90P20 group, since both GSH-Px activity and GSH levels were similar those found in DYOG.

SOD activity was increased in DC90P20 group when compared to DYOG, but was minor in comparison to DC90 (Table 3).

Decreased levels of MDA and PCO and increased activities of SOD and CAT were observed in rats from DP20 group and, in a lesser extent, in DP40 group; GSH-Px activity remained impaired in liver from diabetic rats treated with 20 or 40mg/kg piperine, although GSH levels were elevated in DP20 group. All markers of oxidative stress and antioxidant activities were similar between DYOG and DC90P40 groups, with exception to PCO (Table 3), denoting the absence of beneficial effects of the association curcumin + 40mg/kg piperine (DC90P20) against the oxidative stress in diabetes.

Discussion

Data from this study reiterated previous findings [18], showing the antidiabetic activity of curcumin incorporated into yoghurt when administered to STZ-diabetic rats, with reduction of blood glucose levels, dyslipidemia and improvement of body weight gain, mass of skeletal muscles and adipose tissues, food and water intake, and urinary volume; in addition, disturbances related to liver and kidney functions and to oxidative stress were also partially prevented after curcumin treatment. However, even administering a high dose of curcumin, its beneficial actions on diabetes remained lower those found with insulin, which could be a consequence of its low bioavailability. Attempting to improve these beneficial actions of curcumin, the present study also investigated the changes in various biochemical and physiological parameters of diabetic rats treated with yoghurt supplemented with the association of curcumin and piperine. It is well known that piperine has bioenhancer activity, attributed to its ability to inhibit enzymes involved in the biotransformation processes. Surprisingly, the treatment of diabetic rats with the association of curcumin and piperine did not promote any additional response related to the antidiabetic activity observed with curcumin alone, on the contrary, the association impaired the curcumin benefits when administered together with a higher dose of piperine, suggesting that the biotransformation of curcumin is an essential step to its antidiabetic activity.

Various mechanisms have been recently described to explain the antidiabetic activity of curcumin. Stimulation of insulin release from pancreas beta cells [38] could explain the various benefits observed in diabetic rats treated with curcumin-supplemented yoghurt, such as reduction in glycemia (Figure 1) and subsequently glycosuria (Table 1), increase in the weight of adipose and muscle tissues (Table 2) and of body weight (Figure 2) and reduction in the food intake (Table 1) in comparison to rats treated only with vehicle. Increase in the expression of glucose transporter type 4 (GLUT4), and consequently the glucose uptake, in skeletal muscles [39], and inhibition of the activities of glucose-6-phosphatase (G6Pase) and phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), key enzymes of gluconeogenesis [40] are also related to the ability of curcumin to reduce blood glucose levels. It has been proposed that these two last mechanisms related to the antidiabetic potential of curcumin are associated with the activation of adenosine monophosphate-dependent kinase, AMPK [39,40]. The gluconeogenesis inhibition after curcumin treatment is corroborated by the fall observed in the urinary urea levels (Table 1), since an inhibition of this process will dispose less alpha-ketoacids for the glucose synthesis, and so less amino groups for the urea production.

Correction of blood glucose levels is an efficient mechanism to prevent the long-term complications of DM, mainly those related to oxidative stress and tissue damage. Particularly in liver, oxidative stress may induce a wide range of complications. Increased liver exposure to ROS is associated with the onset of steatosis and its progression to steatohepatitis [41] and with various redox alterations that impair the activity of components belonging to signal transduction pathways [42]. According our data, oxidative stress in the STZ-diabetic rats was well characterized, since we found high levels of biomarkers of LPO (MDA) and of protein oxidation (PCO). Furthermore, the activities of antioxidant enzymes, as well as the levels of GSH, were decreased in the liver of STZ-diabetic rats (Table 3), as previously reported by other studies [43,44]. Low SOD activity in diabetes has been attributed to glycation of the enzyme, resulting in its fragmentation and subsequent inactivation [45]. Considering that low SOD activity lead to $O_2^{\bullet-}$ accumulation, it could explains the low activities of CAT and GSH-Px, since these enzymes are inhibited by increased levels of $O_2^{\bullet-}$ [46,47]. Decrease in both mRNA expression and protein content of antioxidant enzymes have

been also found in association with the fall in their activities in STZ-diabetic rats [5,48]. The low levels of GSH in liver of diabetic rats (Table 3) may be a consequence of the increased glucose flux through the polyol pathway, consuming NADPH in the sorbitol formation, impairing the regeneration of GSH [49]. Taken together, the harmful impacts of oxidative stress in liver of diabetic rats may be noted by the progressive increase in the circulating levels of ALT, AST and ALP (Figure 3). Progressive elevation of these enzymes in plasma of diabetic rats was previously described [18,37] and has a positive correlation with the increased release from tissues damaged by oxidative stress [50]. It is important to note that all these changes related to oxidative stress in diabetes were prevented by insulin treatment.

The treatment with curcumin-supplemented yoghurt partially reversed the changes associated with oxidative stress in diabetic rats, increasing the activity of antioxidant enzymes and reducing the levels of oxidative stress biomarkers (Table 3). Studies have shown that curcumin possesses a potent *in vivo* antioxidant activity related to its ability to scavenge ROS [51] and to inhibit LPO [52]. Ak and Gülçin [53] had shown the strong scavenging activity of curcumin against $O_2^{\bullet-}$, which was higher than other potent antioxidants, such as α -tocopherol and trolox. It is known that the increased mitochondrial $O_2^{\bullet-}$ production stimulates the activity of NADPH oxidases, exacerbating $O_2^{\bullet-}$ levels, representing a feed-forward vicious cycle of ROS production [54]. So, curcumin may decrease ROS production by both scavenging $O_2^{\bullet-}$ and also decreasing the glucose levels; decreasing $O_2^{\bullet-}$, curcumin may also avoid its impaired effects on CAT and GSH-Px, as well as its deleterious consequences against other biomolecules. Also, $O_2^{\bullet-}$ is a precursor of other highly reactive species, mainly hydroxyl ($\bullet OH$) radicals, which participates in the oxidation of both lipids [55] and proteins [56]. The increased GSH levels in liver of diabetic rats treated with curcumin (Table 3) can be also related to its antihyperglycemic effect, since less glucose undergoes the polyol pathway. Considering that GSH is a substrate of GSH-Px, increase in the GSH disposal may also explains the increase in the GSH-Px activity in liver of curcumin-treated diabetic rats. The restoration of glutathione antioxidant system may be helpful to combat the deleterious changes caused by ROS in biomolecules, leading to a fall in the MDA and PCO. Finally, the reduction in the hepatic oxidative stress by curcumin was corroborated by the diminished plasma activities of ALT, AST and ALP (Figure 3), in

agreement with previous findings [18]. Curcumin incorporated into yoghurt also promoted reduction in proteinuria (Table 1), which could be related to its effects against oxidative stress in kidney, as previously described [57,58].

Defective insulin secretion and/or action with hyperglycemia account for dyslipidemia in individuals with type 1 or type 2 DM, mainly represented by increased levels of TG and small dense LDL and low levels of HDL-C, which together predispose individuals to an increased risk for atherosclerosis [59]. Our results showed that the treatment with curcumin reduced the total-C and TG levels of diabetic rats to values that did not differ from those observed in rats treated with insulin (Table 1). Ejaz et al. [60] reported a trend of diminished TG levels in serum of mice fed a high-fat diet supplemented with curcumin, which was attributed to the increased expression of carnitine palmitoyl transferase-1 (stimulating fatty acid oxidation) and decreased expression of glycerol-3-phosphate acyltransferase-1 (inhibiting fatty acid esterification) in the subcutaneous adipose tissue, both mechanisms depending on AMPK activation. Rats fed a high-fat diet supplemented with curcumin also showed increased expression of hepatic cholesterol 7 α -hydroxylase, a limiting enzyme in the biosynthesis of bile acids from cholesterol, which could explain the hypocholesterolemic effect of curcumin [61]. Up-regulation of the LDL-receptor has been also reported in human hepatoma HepG2 cells treated with curcumin [62].

It is well known that piperine has the ability to increase the bioavailability of drugs by inhibiting various enzymes that participate in the hepatic and intestinal biotransformation of xenobiotics, such as aryl hydroxylase, UDP-glucuronyl transferase and hepatic microsomal cytochrome P₄₅₀ [63]. Although some studies had shown the pharmacokinetic properties of curcumin when co-administered with piperine, with increase in its plasma levels, the pharmacodynamic changes of curcumin in this association has been poorly studied. To our surprise, when STZ-diabetic rats were treated with the association of curcumin and piperine at a similar ratios used in pharmacokinetic studies, no changes (curcumin/piperine, 90/20) or even loss (curcumin/piperine, 90/40) in the antidiabetic and antioxidant activities of curcumin were observed. Curcumin, when orally administered, undergoes rapid reduction and conjugation pathways occurring in the intestine and liver of human subjects [64] and rodents, such as mice [65] and rats [66]; these processes produce various curcumin

metabolites, including dihydrocurcumin, tetrahydrocurcumin (THC), hexahydrocurcumin, octahydrocurcumin, curcumin glucuronides and curcumin sulfate [21]. Therefore, increased circulating levels of curcumin are expected in the presence of piperine. Considering that both the antidiabetic and antioxidant activities of 90mg/kg curcumin were not improved in the presence of 20mg/kg piperine, and they were even abolished in the presence of 40mg/kg piperine, an increase in the circulating levels of curcumin may not be a useful approach to ameliorate all its pharmacodynamic actions, suggesting that curcumin can be considered a prodrug, generating metabolites that have the ability to prevent the deleterious consequences of insulin deficiency states. It is interesting to note that disturbances in the ALT (Figure 3) and GSH (Table 3) levels and in the GSH-Px activity (Table 3) were early detected in diabetic rats treated with curcumin + 20mg/kg piperine, showing that these biomarkers are more sensitive in monitoring the impairments of this association in diabetes.

The biological activities of curcumin metabolites are being a matter of extensive studies, alerting us for the caution when comparing the biological effects of curcumin evaluated through *in vivo*, *ex vivo* or *in vitro* approaches [20]. In this way, studies demonstrated that THC, one of the major metabolites, has antidiabetic and antioxidant activities greater than those of curcumin [67,68]. In addition, some of the intracellular mechanisms of curcumin to control the carbohydrate metabolism were also found to THC; in human (Hep3B) and rat (H4IIE) hepatoma cells, the activation of AMPK by THC was about 250 times greater than that promoted by curcumin, leading to a more efficient suppression in the gene expression of the gluconeogenic enzymes G6Pase and PEPCCK [69]. It has been also observed that THC reduces the biomarkers of oxidative stress in liver and kidney [68,70]. Beyond THC, it cannot be discharged the possibility of curcumin glucuronides to have antidiabetic activity, since they are one of the major metabolites appearing in plasma of rats receiving curcumin orally [71]. Pfeiffer et al. [72] showed that curcumin glucuronides have higher biological activity (inhibition in the assembly of microtubule proteins) than curcumin.

Although experimental data and clinical trials had shown that curcumin is safe even at very high doses and also well-tolerated [25,73], accumulating evidence has pointing that curcumin may have *in vivo* adverse effects, mainly when administered at very long periods [74,75]. These findings corroborate data from this study about the

complete absence of the antidiabetic activity of curcumin when associated with 40mg/kg piperine. If a higher dose of piperine causes a major inhibition in the curcumin biotransformation, the probability of curcumin in reaching toxic levels at various tissues will be increased; deviation to other biotransformation routes can be also favoring the generation of metabolites that are toxic at higher levels. It must be highlighted that the ALT levels of diabetic rats treated with curcumin + 40mg/kg piperine were very increased in comparison to values from rats treated with the curcumin or piperine alone and even increased to values from untreated diabetic rats (Figure 3), showing the toxicity of this association to diabetes.

Another unexpected finding of this study was related to the beneficial effects of 20mg/kg piperine to various parameters monitored in diabetic rats. Considering that 40mg/kg piperine did not show the same beneficial effects found with the minor dose, it can be suggested that higher doses of piperine reach toxicological effects. Piyachaturawat et al. [76] found toxicity to mice that received one-single administration of piperine in doses varying of 100 to 500mg/kg; the authors comment that the use of piperine for a long period of time may reach toxic concentrations. The present study also showed that there were no additional effects when 20mg/kg piperine was administered to STZ-diabetic rats together with curcumin. It is important to observe that these two natural compounds activate some intracellular effectors in common to control the metabolism of carbohydrates and lipids, such as AMPK, which could explain the absence of synergism when they are administered together. In a study by Choi et al. [77], mice adapted to a high-fat diet and treated with piperine showed improvement in lipid profile, related to an increase in the plasma levels of adiponectin, which in turns stimulated the hepatic fatty acid oxidation and inhibited the lipogenesis in an AMPK-dependent mechanism. In the same study, it was also observed that piperine treatment increased the phosphorylation levels of AKT, thereby increasing the GLUT2 translocation in liver of high-fat diet mice, improving glucose uptake. Activation of AMPK and the subsequent stimulation of both lipid oxidation and tissue glucose uptake were also demonstrated for curcumin and its metabolite THC, as previously described.

In conclusion, the present study provided clear evidences for the absence of additional effects in the antidiabetic and antioxidant activities of curcumin when administered with piperine to STZ-diabetic rats. The inhibition of biotransformation

processes increases the bioavailability of drugs, however this strategy will not necessarily increase the pharmacodynamic actions, indeed, it can be favoring the reach of undesirable or even toxic levels, depending on the ratio drug/bioenhancer. Finally, the blockade of the curcumin benefits when administered with a higher piperine dose evidences that the biotransformation of curcumin is very important to its antidiabetic activity.

Acknowledgements

We thank Vivian Boter Bergamasco for the technical assistance and the Brazilian foundations.

References

- [1] International Diabetes Federation (IDF, 2014). The global burden. In: IDF Diabetes Atlas, 6th edn. Belgium, pp 29-49. Available via <http://www.idf.org/diabetesatlas>. Accessed 05 May 2014.
- [2] Hu FB. (2011) Globalization of diabetes: the role of diet, lifestyle, and genes. *Diabetes Care*. 34(6):1249-57.
- [3] Solano MP, Goldberg RB. (2006) Management of dyslipidemia in diabetes. *Cardiol Rev*. 14(3):125-35.
- [4] Brownlee M. (2005) The pathobiology of diabetic complications - A unifying mechanism. *Diabetes*. 54, 1616-25.
- [5] Sindhu RK, Koo JR, Roberts CK, Vaziri ND. (2004) Dysregulation of hepatic superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in diabetes: response to insulin and antioxidant therapies. *Clin Exp Hypertens*. 26(1):43-53.
- [6] Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. (2006) Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem*. 52(4):601-23.

- [7] Madonna R, De Caterina R. (2011) Cellular and molecular mechanisms of vascular injury in diabetes--part I: pathways of vascular disease in diabetes. *Vascul Pharmacol*. 54(3-6):68-74.
- [8] Wang CZ, Mehendale SR, Yuan CS. (2007) Commonly used antioxidant botanicals: active constituents and their potential role in cardiovascular illness. *Am J Chin Med*. 35(4):543-58
- [9] Bruckbauer A, Zemel MB. (2013) Synergistic effects of metformin, resveratrol, and hydroxymethylbutyrate on insulin sensitivity. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 6:93-102.
- [10] Prabhakar PK, Prasad R, Ali S, Doble M. (2013) Synergistic interaction of ferulic acid with commercial hypoglycemic drugs in streptozotocin induced diabetic rats. *Phytomedicine*. 20(6):488-94.
- [11] Doyon M, Labrecque J. (2008) Functional foods: a conceptual definition. *Brit Food Journal*, 110(11), 1133-49.
- [12] Dillard CJ, German B (2000) Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *J Sci Food and Agricul*, 80(12), p 1744–56.
- [13] Perera PK, Li Y (2012) Functional herbal food ingredients used in type 2 diabetes mellitus *Pharmacogn Rev*. 6(11): 37–45.
- [14] Gupta SC, Kismali G, Aggarwal BB. (2013) Curcumin, a component of turmeric: from farm to pharmacy. *Biofactors*. 39(1):2-13.
- [15] Aggarwal BB. (2010) Targeting inflammation-induced obesity and metabolic diseases by curcumin and other nutraceuticals. *Annu Rev Nutr*. 30:173-99.
- [16] Yu W, Wu J, Cai F, Xiang J, Zha W, et al. (2012) Curcumin Alleviates Diabetic Cardiomyopathy in Experimental Diabetic Rats. *PLoS ONE* 7(12): e52013.
- [18] Gutierrez VO, Pinheiro CM, Assis RP, Vendramini RC, Pepato MT et al. (2012) Curcumin-supplemented yoghurt improves physiological and biochemical markers of experimental diabetes. *Br J Nutr*. 108(3):440-8.

- [19] Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. (2007) Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharm*. 4(6):807-18.
- [20] Sahebkar A. (2013) Why it is necessary to translate curcumin into clinical practice for the prevention and treatment of metabolic syndrome? *Biofactors*. 39(2):197-208.
- [21] Anand P, Thomas SG, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, et al. (2008) Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. *Biochem Pharmacol*. 76(11):1590-611.
- [22] Sun M, Su X, Ding B, He X, Liu X, et al. (2012) Advances in nanotechnology-based delivery systems for curcumin. *Nanomedicine (Lond)*. 7(7):1085-100.
- [23] Prasad S, Tyagi AK, Aggarwal BB. (2014) Recent Developments in Delivery, Bioavailability, Absorption and Metabolism of Curcumin: the Golden Pigment from Golden Spice. *Cancer Res Treat*. 46(1):2-18.
- [24] Atal CK, Dubey RK, Singh J. (1985) Biochemical basis of enhanced drug bioavailability by piperine: evidence that piperine is a potent inhibitor of drug metabolism. *J Pharmacol Exp Ther*. 232(1):258-62.
- [25] Shoba G, Joy D, Joseph T, Majeed M, Rajendran R, et al., (1998) Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Med*. 64(4):353-6.
- [26] Ryu EK, Choe YS, Lee KH, Choi Y, Kim BT. (2006) Curcumin and dehydrozingerone derivatives: synthesis, radiolabeling, and evaluation for beta-amyloid plaque imaging. *J Med Chem*. 49(20):6111-9.
- [27] Trinder, P. (1969) Determination of blood glucose using 4-amino phenazone as oxygen acceptor. *J Clin Pathol*. 22(2): 246.
- [28] Dubowski, KM. (1962) An o-toluidine method for body fluid glucose determination. *Clin Chem*. 8:215-35.
- [29] Pilz J, Meineke I, Gleiter C. (2000) Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-

dinitrophenylhydrazine derivative. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed.* 742, 315-25.

[30] Kohn HI, Liversedge M. (1944) On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione. *J Pharmacol Experimen Ther.* 82(3):292-300.

[31] Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. (1994) Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 233:346-57.

[32] Sedlak J, Lindsay RH. (1968) Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissues with Ellmann's reagent. *Anal Biochem.* 25(1):192-205.

[33] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193(1):265-75.

[34] Beers RF Jr, Sizer IW. (1952) A spectrophotometric method of measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem.* 195(1):133-40.

[35] Rush JW, Sandiford SD. (2003) Plasma glutathione peroxidase in healthy young adults: influence of gender and physical activity. *Clin Biochem.* 36(5):345-51.

[36] Beauchamp C, Fridovich I. (1971) Superoxide Dismutase: Improved assays and assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem.* 44(1):276-87.

[37] Mori DM, Baviera AM, de Oliveira Ramalho LT, Vendramini RC, Brunetti IL, et al., (2003) Temporal response pattern of biochemical analytes in experimental diabetes. *Biotechnol Appl Biochem.* 38(Pt 2):183-91.

[38] Best L, Elliott AC, Brown PD. (2007) Curcumin induces electrical activity in rat pancreatic beta-cells by activating the volume-regulated anion channel. *Biochem Pharmacol.* 1;73(11):1768-75.

[39] Na LX, Zhang YL, Li Y, Liu LY, Li R, et al. (2011) Curcumin improves insulin resistance in skeletal muscle of rats. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 21(7):526-33.

- [40] Fujiwara H, Hosokawa M, Zhou X, Fujimoto S, Fukuda K, et al. (2008) Curcumin inhibits glucose production in isolated mice hepatocytes. *Diabetes Res Clin Pract.* 80(2):185-91.
- [41] Videla LA. (2009) Oxidative stress signaling underlying liver disease and hepatoprotective mechanisms. *World J Hepatol.* 1(1):72-8.
- [42] Cubero FJ, Trautwein C. (2011) Oxidative Stress and Liver Injury. In: Monga SPS, Cagle PT. *Molecular Pathology of Liver Diseases.* Springer, p. 427-35.
- [43] Evelson P, Susemihl C, Villarreal I, Llesuy S, Rodríguez R, et al. (2005) Hepatic morphological changes and oxidative stress in chronic streptozotocin-diabetic rats. *Ann Hepatol.* 4(2):115-20.
- [44] Lucchesi AN, Freitas NT, Cassettari LL, Marques SF, Spadella CT. (2013) Diabetes mellitus triggers oxidative stress in the liver of alloxan-treated rats: a mechanism for diabetic chronic liver disease. *Acta Cir Bras.* 28(7):502-8.
- [45] Taniguchi N, Kaneto H, Asahi M, Takahashi M, Wenyi C, S. et al. (1996) Involvement of glycation and oxidative stress in diabetic macroangiopathy. *Diabetes.* 45 Suppl 3:S81-3.
- [46] Kono Y, Fridovich I. (1983) Inhibition and reactivation of Mn-catalase. Implications for valence changes at the active site manganese. *J Biol Chem.* 258(22):13646-8.
- [47] Blum J, Fridovich I. (1985) Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Arch Biochem Biophys.* 240(2):500-8.
- [48] Sadi G, Yilmaz O, Güray T. (2008) Effect of vitamin C and lipoic acid on streptozotocin-induced diabetes gene expression: mRNA and protein expressions of Cu-Zn SOD and catalase. *Mol Cell Biochem.* 309(1-2):109-16.
- [49] Lee AY, Chung SS. (1999) Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J.* 13(1):23-30.

- [50] Koruk M, Taysi S, Savas MC, Yilmaz O, Akcay F, et al., (2004) Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Ann Clin Lab Sci.* 34(1):57-62.
- [51] Barzegar A, Moosavi-Movahedi AA. (2011) Intracellular ROS protection efficiency and free radical-scavenging activity of curcumin. *PLoS One.* 6(10):e26012.
- [52] Meghana K, Sanjeev G, Ramesh B. (2007) Curcumin prevents streptozotocin-induced islet damage by scavenging free radicals: a prophylactic and protective role. *Eur J Pharmacol.* 577(1-3):183-91.
- [53] Ak T, Gülçin I. (2008) Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chem Biol Interact.* 174(1):27-37.
- [54] Dikalov S. (2011) Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free Radic Biol Med.* 51(7):1289-301.
- [55] Girotti AW. (1998) Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res.* 39(8):1529-42.
- [56] Pennathur S, Wagner JD, Leeuwenburgh C, Litwak KN, Heinecke JW. (2001) A hydroxyl radical-like species oxidizes cynomolgus monkey artery wall proteins in early diabetic vascular disease. *J Clin Invest.* 107(7):853-60.
- [57] Nabavi SF, Moghaddam AH, Eslami S, Nabavi SM. (2012) Protective effects of curcumin against sodium fluoride-induced toxicity in rat kidneys. *Biol Trace Elem Res.* 145(3):369-74.
- [58] Morsy MA, Ibrahim SA, Amin EF, Kamel MY, Rifaai RA, et al., (2013) Curcumin ameliorates methotrexate-induced nephrotoxicity in rats. *Adv Pharmacol Sci.* 2013:387071.
- [59] Goldberg IJ. (2001) Clinical review 124: Diabetic dyslipidemia: causes and consequences. *J Clin Endocrinol Metab.* 86(3):965-71.

- [60] Ejaz A, Wu D, Kwan P, Meydani M. (2009) Curcumin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes and angiogenesis and obesity in C57/BL mice. *J Nutr.* 139(5):919-25.
- [61] Kim M, Kim Y. (2010) Hypocholesterolemic effects of curcumin via up-regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase in rats fed a high fat diet. *Nutr Res Pract.* 4(3):191-5.
- [62] Peschel D, Koerting R, Nass N. (2007) Curcumin induces changes in expression of genes involved in cholesterol homeostasis. *J Nutr Biochem.* 18(2):113-9.
- [63] Srinivasan K. (2007) Black pepper and its pungent principle-piperine: a review of diverse physiological effects. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 47(8):735-48.
- [64] Vareed SK, Kakarala M, Ruffin MT, Crowell JA, Normolle DP, et al. (2008) Pharmacokinetics of curcumin conjugate metabolites in healthy human subjects. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 17(6):1411-7.
- [65] Pan MH, Huang TM, Lin JK. (1999) Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. *Drug Metab Dispos.* 27(4):486-94.
- [66] Ravindranath V, Chandrasekhara N. (1980) Absorption and tissue distribution of curcumin in rats. *Toxicology.* 16(3):259-65.
- [67] Okada K, Wangpoengtrakul C, Tanaka T, Toyokuni S, Uchida K, et al., (2001) Curcumin and especially tetrahydrocurcumin ameliorate oxidative stress-induced renal injury in mice. *J Nutr.* 131(8):2090-5.
- [68] Murugan P, Pari L. (2007) Influence of tetrahydrocurcumin on hepatic and renal functional markers and protein levels in experimental type 2 diabetic rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 101:241-5.
- [69] Kim T, Davis J, Zhang AJ, He X, Mathews ST. (2009) Curcumin activates AMPK and suppresses gluconeogenic gene expression in hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 388(2):377-82.

- [70] Pari L, Karthikesan K, Menon VP. (2010) Comparative and combined effect of chlorogenic acid and tetrahydrocurcumin on antioxidant disparities in chemical induced experimental diabetes. *Mol Cell Biochem.* 341(1-2):109-17.
- [71] Ireson C, Orr S, Jones DJ, Verschoyle R, Lim CK, et al. (2001) Characterization of metabolites of the chemopreventive agent curcumin in human and rat hepatocytes and in the rat in vivo, and evaluation of their ability to inhibit phorbol ester-induced prostaglandin E2 production. *Cancer Res.* 61(3):1058-64.
- [72] Pfeiffer E, Hoehle SI, Walch SG, Riess A, Sólyom AM, et al., (2007) Curcuminoids form reactive glucuronides in vitro. *J Agric Food Chem.* 55(2):538-44.
- [73] Lao CD, Ruffin MT 4th, Normolle D, Heath DD, Murray SI, et al. (2006) Dose escalation of a curcuminoid formulation. *BMC Complement Altern Med.* 17;6:10.
- [75] Burgos-Morón E, Calderón-Montaña JM, Salvador J, Robles A, López-Lázaro M. (2010) The dark side of curcumin. *Int J Cancer.* 126(7):1771-5.
- [74] Sharma RA, Euden SA, Platton SL, Cooke DN, Shafayat A, et al. (2004) Phase I clinical trial of oral curcumin: biomarkers of systemic activity and compliance. *Clin Cancer Res.* 10(20):6847-54.
- [75] Piyachaturawat P, Glinsukon T, Toskulkao C. (1983) Acute and subacute toxicity of piperine in mice, rats and hamsters. *Toxicol Lett.* 16(3-4):351-9.
- [77] Choi S, Choi Y, Choi Y, Kim S, Jang J, et al., (2013) Piperine reverses high fat diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance in mice. *Food Chem.* 141(4):3627-35.

Figure legends

Figure 1: Glycemia (mmol/L) of STZ-diabetic rats treated with yoghurt supplemented with curcumin, piperine, and curcumin + piperine associations. (A) Temporal responses, and (B) area under the curve (AUC).

Values are expressed as means $\pm$ SEM, n= 10. Differences between groups were analyzed with One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test ($p < 0.05$). Paired Student's t test was used to compare values in a same group relative to day 0 ($p < 0.05$). a, differences with DYOG; b, differences with DINS; c, differences with DC90; d, differences with DP20; e, differences with DC90P20; #, differences with day 0.

Figure 2: Body weight (g) of STZ-diabetic rats treated with yoghurt supplemented with curcumin, piperine, and curcumin + piperine associations.

Values are expressed as means $\pm$ SEM, n= 10. Differences between groups were analyzed with One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test ($p < 0.05$). Paired Student's t test was used to compare values in a same group relative to day 0 ($p < 0.05$). a, differences with DYOG; b, differences with DINS; c, differences with DC90; #, differences with day 0.

Figure 3: Plasma activities of ALT, AST, and ALP (μ Kat/L) of STZ-diabetic rats treated with yoghurt supplemented with curcumin, piperine, and curcumin + piperine associations. (A) (C) and (E) Temporal responses, and (B) (D) and (F) area under the curve (AUC).

Values are expressed as means $\pm$ SEM, n= 10. Differences between groups were analyzed with One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test ($p < 0.05$). Paired Student's t test was used to compare values in a same group relative to day 0 ($p < 0.05$). a, differences with DYOG; b, differences with DINS; c, differences with DC90; d, differences with DP20; e, differences with DC90P20; #, differences with day 0.

Table legends

Table 1: Physiological parameters (food and water intake, urinary volume), lipid profile (TG, total-C, HDL-C) and urinary biomarkers (glicosuria, urinary urea, proteinuria) of STZ-diabetic rats before (day 0) and after (day 45) the treatment for 45 days with yoghurt supplemented with curcumin, piperine, and curcumin + piperine associations.

Values are expressed as means $\pm$ SEM, n= 10. Differences between groups were analyzed with One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test ($p < 0.05$). Paired Student's t test was used to compare values in a same group relative to day 0 ($p < 0.05$). a, differences with DYOG; b, differences with DINS; c, differences with DC90; d, differences with DP20; e, differences with DC90P20; #, differences with day 0.

Table 2: Weight of white adipose tissues (epididimal, retroperitoneal) and skeletal muscles (*soleus*, EDL) of STZ-diabetic rats treated for 45 days with yoghurt supplemented with curcumin, piperine, and curcumin + piperine associations.

Values are expressed as means $\pm$ SEM, n= 10, Differences between groups were analyzed with One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test ($p < 0.05$). a, differences with DYOG; b, differences with DINS; c, differences with DC90; d, differences with DP20; e, differences with DC90P20.

Table 3: Oxidative stress biomarkers (liver and plasma) and antioxidant enzymes activities (liver) of STZ-diabetic rats treated for 45 days with yoghurt supplemented with curcumin, piperine, and curcumin + piperine associations.

Values are expressed as means $\pm$ SEM, n= 10. Differences between groups were analyzed with One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test ($p < 0.05$). Paired Student's t test was used to compare values in a same group relative to day 0 ($p < 0.05$). a, differences with DYOG; b, differences with DINS; c, differences with DC90; d, differences with DP20; e, differences with DC90P20; #, differences with day 0.

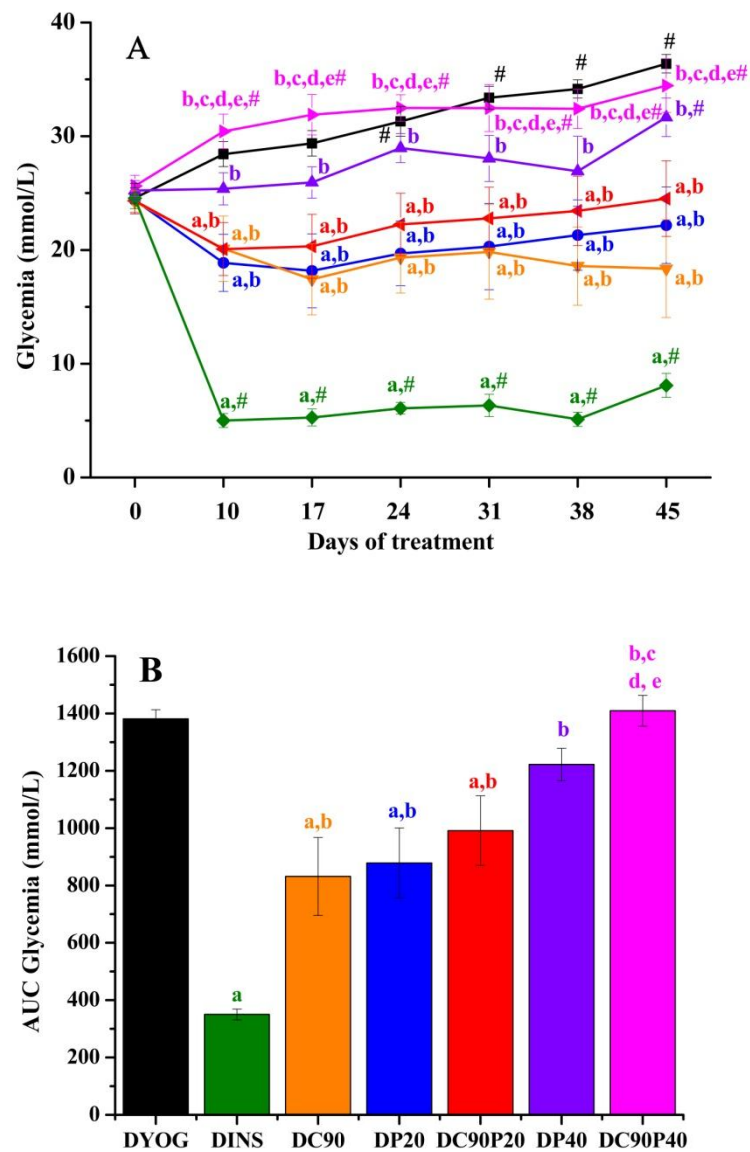


Figure 1: Effect of the treatment of STZ-diabetic rats with yoghurt supplemented with curcumin, piperine, and curcumin + piperine associations on glycemia (mmol/L). (A) Temporal responses, and (B) area under the curve (AUC). Values are expressed as means $\pm$ SEM, $n = 10$. Differences between groups were analyzed with One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test ($p < 0.05$). Paired Student's t test was used to compare values in a same group relative to day 0 ($p < 0.05$). a, differences with DYOG; b, differences with DINS; c, differences with DC90; d, differences with DP20; e, differences with DC90P20; #, differences with day 0.

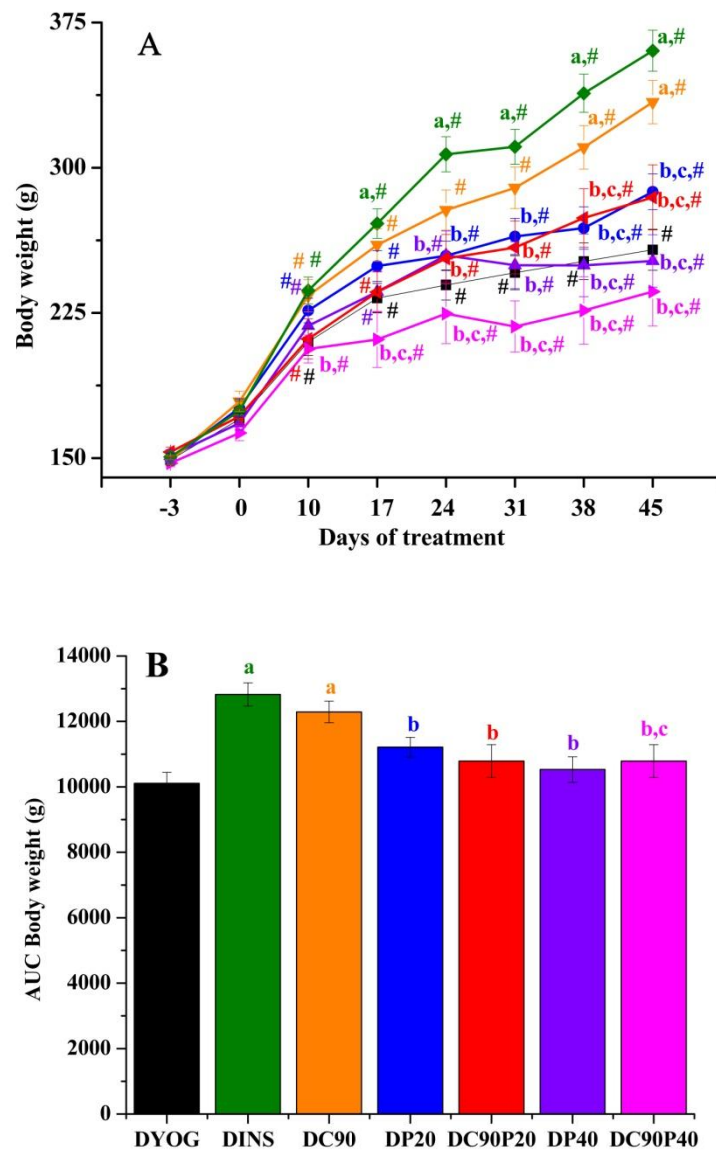


Figure 2: Effect of the treatment of STZ-diabetic rats with yoghurt supplemented with curcumin, piperine, and curcumin + piperine associations on body weight (g). (A) Temporal responses, and (B) area under the curve (AUC). Values are expressed as means $\pm$ SEM, $n=10$. Differences between groups were analyzed with One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test ($p<0.05$). Paired Student's t test was used to compare values in a same group relative to day 0 ($p<0.05$). a, differences with DYOG; b, differences with DINS; c, differences with DC90; #, differences with day 0.

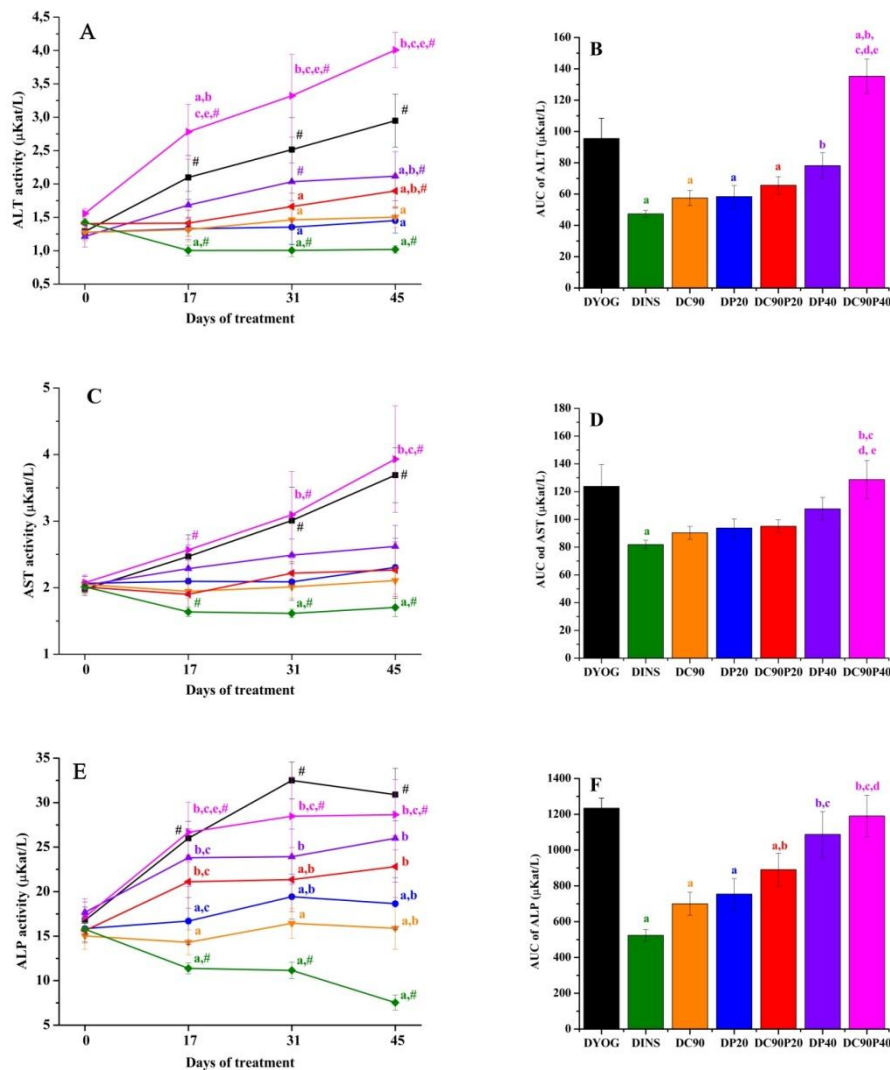


Figure 3: Effect of the treatment of STZ-diabetic rats with yoghurt supplemented with curcumin, piperine, and curcumin + piperine associations on the plasma activities of ALT, AST, and ALP ($\mu\text{Kat/L}$). (A) (C) and (E) Temporal responses, and (B) (D) and (F) area under the curve (AUC). Values are expressed as means $\pm$ SEM, $n = 10$. Differences between groups were analyzed with One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test ($p < 0.05$). Paired Student's t test was used to compare values in a same group relative to day 0 ($p < 0.05$). a, differences with DYOG; b, differences with DINS; c, differences with DC90; d, differences with DP20; e, differences with DC90P20; #, differences with day 0.

Table 1: Physiological parameters (food and water intake, urinary volume), lipid profile (TG, total-C, HDL-C) and urinary biomarkers (glicosuria, urinary urea, proteinuria) of STZ-diabetic rats before (day 0) and after (day 45) the treatment for 45 days with yoghurt supplemented with curcumin, piperine, and curcumin + piperine associations.

Groups														
	DYOG		DINS		DC90		DP20		DC90P20		DP40		DC90P40	
Parameters	Day 0	Day 45	Day 0	Day 45	Day 0	Day 45	Day 0	Day 45	Day 0	Day 45	Day 0	Day 45	Day 0	Day 45
Food intake (g/24h)	28.14 ± 1.45	46.06 ± 1.53 (#)	27.04 ± 1.07	29.68 ± 1.32 (a)	27.25 ± 1.21	33.06 ± 2.89 (a)	27.00 ± 1.40	35.68 ± 2.71 (a,#)	28.93 ± 1.52	33.89 ± 2.64 (a)	26.79 ± 1.3	39.67 ± 1.47 (b,#)	27.57 ± 0.66	43.79 ± 1.40 (b,#)
Water intake (mL/24h)	109.82 ± 4.73	201.56 ± 10.11 (#)	88.87 ± 11.52	30.29 ± 3.58 (a,#)	91.62 ± 10.19	93.78 ± 21.49 (a,b)	100.25 ± 8.25	186.53 ± 16.14 (b,#)	97.80 ± 11.62	133.13 ± 22.92 (b)	111.67 ± 9.64	190.38 ± 10.67 (b,#)	126.67 ± 7.30	183.56 ± 24.60 (b,#)
Urinary volume (mL/24h)	68.08 ± 8.94	183.00 ± 9.78 (#)	56.53 ± 6.86	27.77 ± 6.32 (a,#)	53.58 ± 6.47	76.20 ± 16.52 (a,b)	65.33 ± 8.70	134.00 ± 15.24 (b,c,#)	52.00 ± 8.88	144.58 ± 20.39 (b,c,#)	63.86 ± 8.81	137.57 ± 13.69 (b,c,#)	81.00 ± 7.30	160.57 ± 9.20 (b,c,#)
TG (mmol/L)	1.04 ± 0.10	3.33 ± 0.51 (#)	1.13 ± 0.10	1.11 ± 0.11 (a)	1.07 ± 0.14	1.36 ± 0.14 (a)	1.06 ± 0.11	1.71 ± 0.20 (a,#)	1.14 ± 0.09	1.82 ± 0.18 (a,#)	1.04 ± 0.08	1.71 ± 0.29 (a,#)	1.19 ± 0.13	2.37 ± 0.44 (b,c,#)
Total-C (mmol/L)	1.95 ± 0.09	2.46 ± 0.15 (#)	1.95 ± 0.09	1.48 ± 0.09 (a,#)	1.98 ± 0.08	1.58 ± 0.10 (a,#)	1.96 ± 0.08	1.88 ± 0.09 (a)	1.96 ± 0.08	1.62 ± 0.09 (a)	1.95 ± 0.07	1.83 ± 0.25 (a)	1.95 ± 0.09	1.73 ± 0.03 (a)
HDL-C (mmol/L)	1.15 ± 0.04	1.02 ± 0.03	1.20 ± 0.03	0.91 ± 0.02	1.23 ± 0.03	1.00 ± 0.04	1.16 ± 0.03	1.08 ± 0.05	1.20 ± 0.03	1.02 ± 0.06	1.09 ± 0.02	0.94 ± 0.04	1.22 ± 0.09	1.04 ± 0.05
Glycosuria (mol/24h)	41.12 ± 6.49	95.56 ± 3.08 (#)	32.50 ± 2.43	5.36 ± 2.57 (a,#)	36.69 ± 3.02	25.98 ± 9.40 (a)	35.72 ± 6.32	59.19 ± 12.24 (a,b,c)	26.24 ± 5.28	40.96 ± 10.02 (a,b)	32.63 ± 5.19	69.27 ± 6.32 (b,c,#)	37.92 ± 6.17	80.33 ± 4.91 (b,c,e,#)
Proteinuria (μmol/24h)	13.02 ± 0.99	28.45 ± 4.03 (#)	12.20 ± 1.11	13.29 ± 1.21 (a)	11.34 ± 1.27	16.92 ± 2.30 (a,#)	11.47 ± 1.34	18.90 ± 3.16 (a,#)	11.89 ± 1.34	17.59 ± 1.79 (a,#)	11.93 ± 1.73	24.52 ± 1.06 (b,#)	11.88 ± 1.34	31.81 ± 3.32 (b,c,d,e,#)
Urinary urea (mmol/24h)	33.73 ± 6.18	67.80 ± 4.71 (#)	31.19 ± 1.80	24.10 ± 3.32 (a,#)	38.49 ± 5.69	36.66 ± 3.95 (a)	28.04 ± 2.83	40.59 ± 8.30 (a)	27.55 ± 4.44	44.70 ± 5.54 (a,b)	36.06 ± 4.01	50.70 ± 3.23 (a,b,#)	34.29 ± 3.00	54.92 ± 5.51 (b,c,d,e,#)

Values are expressed as means ± SEM, n= 10. Differences between groups were analyzed with One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test ($p < 0.05$). Paired Student's t test was used to compare values in a same group relative to day 0 ($p < 0.05$). a, differences with DYOG; b, differences with DINS; c, differences with DC90; d, differences with DP20; e, differences with DC90P20; #, differences with day 0.

Table 2: Weight of white adipose tissues (epididimal, retroperitoneal) and skeletal muscles (*soleus*, EDL) of STZ-diabetic rats treated for 45 days with yoghurt supplemented with curcumin, piperine, and curcumin + piperine associations.

Parameters	DYOG	DINS	DC90	DP20	DC90P20	DP40	DC90P40
<i>Soleus</i> muscle (g)	0.123 ± 0.007	0.163 ± 0.005 (a)	0.139 ± 0.007 (b)	0.116 ± 0.006 (b)	0.124 ± 0.008 (b)	0.113 ± 0.008 (b)	0.097 ± 0.005 (b.c)
EDL muscle (g)	0.109 ± 0.008	0.168 ± 0.005 (a)	0.141 ± 0.007 (a.b)	0.109 ± 0.008 (b.c)	0.119 ± 0.009 (b.c)	0.094 ± 0.009 (b.c)	0.078 ± 0.006 (b.c.e)
Epididymal adipose tissue (g)	1.807 ± 0.239	5.259 ± 0.498 (a)	3.386 ± 0.480 (a.b)	1.763 ± 0.203 (b.c)	2.512 ± 0.442 (b)	1.552 ± 0.240 (b.c)	1.212 ± 0.083 (b.c)
Retroperitoneal adipose tissue (g)	1.038 ± 0.229	3.807 ± 0.565 (a)	2.578 ± 0.535 (a.b)	0.703 ± 0.158 (b.c)	1.266 ± 0.406 (b.c)	0.685 ± 0.210 (b.c)	0.341 ± 0.199 (b.c)

Values are expressed as means ± SEM, n= 10, Differences between groups were analyzed with One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test (p<0.05). a, differences with DYOG; b, differences with DINS; c, differences with DC90; d, differences with DP20; e, differences with DC90P20.

Table 3: Oxidative stress biomarkers (liver and plasma) and antioxidant enzymes activities (liver) of STZ-diabetic rats treated for 45 days with yoghurt supplemented with curcumin, piperine, and curcumin + piperine associations.

Values are expressed as means $\pm$ SEM, n= 10. Differences between groups were analyzed with One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test

Parameters	DYOG	DINS	DC90	DP20	DC90P20	DP40	DC90P40
Liver MDA ($\mu\text{mol/g}$ protein)	198.69 $\pm$ 4.26	115.37 $\pm$ 6.49 (a)	114.52 $\pm$ 5.22 (a)	128.24 $\pm$ 5.63 (a)	130.44 $\pm$ 4.29 (a)	135.23 $\pm$ 6.55 (a)	175.77 $\pm$ 11.86 (b,c)
Plasma MDA (mmol)	20.75 $\pm$ 0.6	12.48 $\pm$ 0.26 (a)	12.57 $\pm$ 1.35 (a)	16.12 $\pm$ 0.94 (a)	12.44 $\pm$ 0.97 (a)	17.80 $\pm$ 1.07 (a,b,c,e)	19.42 $\pm$ 1.46 (b,c,d,e)
Liver PCO ($\mu\text{mol/mg}$ protein)	0.94 $\pm$ 0.07	0.26 $\pm$ 0.03 (a)	0.42 $\pm$ 0.05 (a,b)	0.44 $\pm$ 0.07 (a,b)	0.47 $\pm$ 0.05 (a)	0.68 $\pm$ 0.04 (a,b,c,d)	0.75 $\pm$ 0.04 (b,c,d,e)
SOD (U/mg protein)	33.93 $\pm$ 2.80	239.85 $\pm$ 22,15 (a)	177.14 $\pm$ 7.90 (a,b)	91.89 $\pm$ 7.03 (a,b,c)	112.49 $\pm$ 9.29 (a,b,c)	54.43 $\pm$ 6.28 (b,c,d,e)	44.31 $\pm$ 6.24 (b,c,d,e)
CAT ($\mu\text{Kat/mg}$ protein)	3.86 $\pm$ 0.24	7.94 $\pm$ 0.42 (a)	6.06 $\pm$ 0.24 (a,b)	5.04 $\pm$ 0.18 (a,b)	6.01 $\pm$ 0.38 (a,b,d)	4.80 $\pm$ 0.11 (a,b,e)	4.62 $\pm$ 0.26 (b,c,e)
GSH-Px ($\mu\text{Kat/mg}$ protein)	3.54 $\pm$ 0.34	7.08 $\pm$ 0.83 (a)	6.00 $\pm$ 0.66 (a)	5.40 $\pm$ 0.28	4.94 $\pm$ 0.54 (b)	3.49 $\pm$ 0.10 (b,c)	2.64 $\pm$ 0.29 (b,c,d,e)
GSH (mM/g tissue)	20.54 $\pm$ 2.24	52.93 $\pm$ 1.67 (a)	39.80 $\pm$ 2.95 (a,b)	34.48 $\pm$ 3.95 (a,b)	27.56 $\pm$ 3.04 (b,c)	27.66 $\pm$ 2.65 (b,c)	27.32 $\pm$ 3.18 (b,c)

($p < 0.05$). Paired Student's t test was used to compare values in a same group relative to day 0 ($p < 0.05$). a, differences with DYOG; b, differences with DINS; c, differences with DC90; d, differences with DP20; e, differences with DC90P20; #, differences with day 0.