

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



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

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

RENATA PIRES DE ASSIS

Araraquara
2016

RENATA PIRES DE ASSIS

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

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

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

Araraquara/SP
2016

Ficha Catalográfica

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

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

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

Orientador: Iguatemy Lourenço Brunetti

Coorientador: Amanda Martins Baviera

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

CAPES: 40300005

RENATA PIRES DE ASSIS

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

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

Araraquara, 26 de julho de 2016.

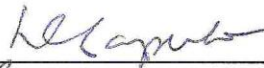
BANCA EXAMINADORA



IGUATEMY LOURENÇO BRUNETTI



MAURO-SOLA- PENNA



LUCIANA CHAGAS CAPERUTO



KATIA SIVIERI



ANA ANGÉLICA HENRIQUE FERNANDES

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

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

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

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

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

LISTA DE TABELAS

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

LISTA DE ABREVIATURAS

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

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

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

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

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

ANEXOS

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

1.1 Justificativa

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 Diabetes mellitus

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2.2 Estresse oxidativo e diabetes mellitus

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

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

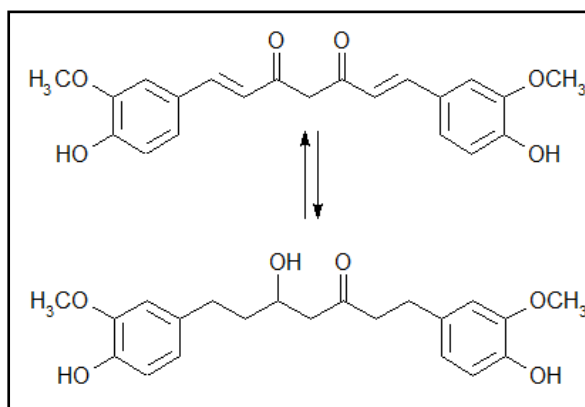
complicações crônicas associadas ao DM e a obesidade, resultando em aumento da morbidade e mortalidade dos indivíduos diabéticos (NEWSHOLME et al., 2007; MADONNA; DE CATERINA, 2011; BANDEIRA et al., 2013; FORBES; COOPER, 2013).

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

1.2.3 Curcumina e diabetes mellitus

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2.4 Carotenoides e diabetes mellitus

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

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

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

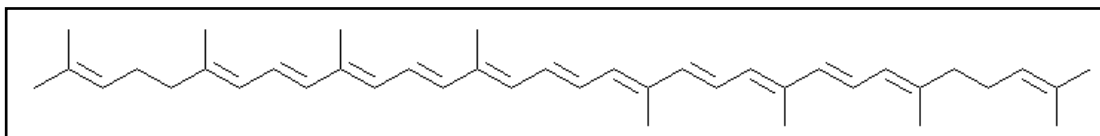
compostos suas características relacionadas à cor e suas propriedades antioxidantes (STAHL; SIES, 2003). Devido à presença de duplas ligações conjugadas, os carotenoides podem sofrer isomerização *cis/trans*. Embora isômeros *trans* sejam mais comumente encontrados nos alimentos e sejam mais estáveis,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

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

1.2.4.1 Licopeno

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

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



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

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

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

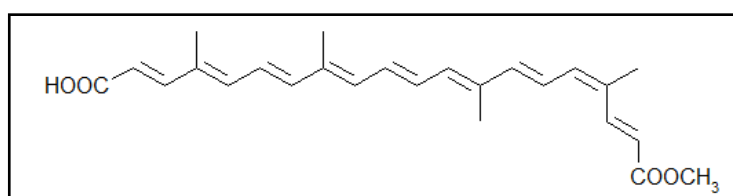
1.2.4.2 Bixina

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

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

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

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



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

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

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

fitoterápicos que possam exercer efeitos benéficos frente às diversas alterações observadas nos metabolismos de carboidratos e lipídeos e no combate ao estresse oxidativo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar as alterações de biomarcadores fisio-metabólicos e do estresse oxidativo em ratos diabéticos (indução por estreptozotocina) e camundongos no modelo de obesidade/resistência insulínica (indução por dieta hiperlipídica/hipercalórica) tratados com iogurte enriquecido com curcumina, bixina e licopeno, isolados ou em misturas.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Modelo experimental de diabetes mellitus tipo 1 (DM1)

Durante 50 dias de tratamento, avaliar os efeitos da curcumina bixina e licopeno incorporados no iogurte, isolados ou em misturas, administrados por via oral em ratos diabéticos, monitorando:

- i) parâmetros fisiológicos: peso corporal, ingestão hídrica, consumo de ração, volume urinário e massas dos tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal e dos músculos esqueléticos *soleus* e *extensor digitorum longus* (EDL);
- ii) parâmetros bioquímicos relacionados à alterações no metabolismo energético, função hepática e renal: glicemia, colesterol total, colesterol-HDL, TAG, ALT, AST, fosfatase alcalina (ALP), conteúdo de glicogênio hepático, glicosúria, ureia urinária, proteinúria;
- iii) parâmetros bioquímicos plasmáticos relacionados ao estresse oxidativo: malondialdeído (MDA), LDL-oxidada;
- iv) parâmetros bioquímicos hepáticos relacionados ao estresse oxidativo: MDA, proteínas carboniladas (PCO), bem como as atividades das enzimas antioxidantes: glutathione peroxidase (GSH-Px), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) e níveis de glutathione reduzida (GSH).

2.2.2 Modelo experimental de obesidade/resistência insulínica

Durante os tratamentos (8 semanas), avaliou-se os efeitos da curcumina, bixina e licopeno, incorporados ao iogurte, e administrados isolados por via oral em camundongos machos (C57B1/6J) submetidos ao modelo experimental de obesidade/resistência insulínica induzido por dieta hiperlipídica/hipercalórica, *high-fat* (HF), no desenvolvimento de distúrbios metabólicos, monitorando:

- i) parâmetros fisiológicos: peso corporal, ingestão alimentar, massas dos tecidos adiposos brancos (epididimal, retroperitoneal e inguinal) e marrom (interescapular), músculos esqueléticos *soleus*, EDL e *gastrocnemius*, composição corporal via ressonância magnética nuclear (RMN) de tecido adiposo, massa magra e fluidos, conteúdo energético das fezes.
- ii) parâmetros bioquímicos plasmáticos: glicose (monitoramento da homeostase da glicose: ITT e TTGO), colesterol total, triacilglicerol, insulina e MDA.
- iii) parâmetros bioquímicos teciduais: triacilglicerol, MDA, SOD, CAT e GSH-Px.
- iv) biomarcadores inflamatórios: IL-6, TNF- α .

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Experimento 1: Avaliação das alterações fisiológicas e bioquímicas de ratos normais e diabéticos tratados com curcumina e carotenoides, isolados e em misturas, incorporados ao iogurte.

3.1.1 Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*) com peso de 150 ± 10 g (\pm 45 dias de idade), provenientes do Biotério Central do Câmpus de Botucatu, UNESP. Durante todo o período experimental, os animais permaneceram no Biotério Setorial do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP, em ambiente com temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) e umidade ($55 \pm 5\%$) controladas, com ciclo de luz de 12 horas.

Antes do início dos experimentos, os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais, com ração e água *ad libitum*, durante 3 dias, para adaptação.

Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/UNESP, Câmpus de Araraquara/SP (CEUA/FCF/CAr nº 44/2013, Anexo I).

3.1.2 Indução do DM experimental

Após o período de adaptação, os animais foram submetidos a jejum de 12 horas para indução do DM experimental. O DM foi induzido via administração intravenosa (jugular) de 40 mg de estreptozotocina (STZ)/kg peso corporal, solubilizada em tampão citrato (10 mmol/L, pH 4,5). Para realizar a administração de STZ na veia jugular, utilizou-se isoflurano, um anestésico volátil.

Três dias após a indução do diabetes, os animais foram pareados utilizando valores individuais de glicemia e peso corporal, culminando em valores médios que apresentavam a melhor semelhança possível, o que proporcionou o início do experimento em condições sem diferenças significativas de peso corporal e glicemia. O pareamento é de extrema importância, pois permite a comparação temporal intra e intergrupos dos efeitos causados pelos tratamentos avaliados.

Juntamente aos animais diabéticos, conduziu-se um grupo de animais normais, não diabéticos.

3.1.3 Tratamento de animais diabéticos com iogurte enriquecido com curcumina , bixina ou licopeno, isolados e em misturas

É válido ressaltar que as doses de licopeno e bixina utilizadas nos experimentos foram estabelecidas de acordo com experimentos-piloto realizados previamente em nosso laboratório (5,5 mg/kg e 11 mg/kg de bixina; 45 mg/kg e 90mg/kg de licopeno), tais doses foram selecionadas com base em estudos prévios da literatura (ZHU; WANG; XU, 2011; PALOZZA et al., 2012; FERREIRA et al., 2013). A dose da curcumina foi a mesma que promoveu a resposta mais efetiva na melhoria das alterações fisiológicas e bioquímicas no DM estreptozotocínico (GUTIERRES et al., 2012; ARCARO et al., 2014; GUTIERRES et al., 2015).

Os grupos conduzidos no experimento foram:

- ✓ Normal tratado com iogurte (NIOG, n = 10);
- ✓ Diabético tratado com iogurte (DIOG, n = 10);
- ✓ Diabético tratado com 4 U de insulina (DINS, n=10);
- ✓ Diabético tratado com 90 mg/kg de curcumina (DC) incorporada em iogurte (n=10);
- ✓ Diabético tratado com 5,5 mg/kg de bixina (DB) incorporada em iogurte (n=10);
- ✓ Diabético tratado com 90 mg/kg de curcumina e 5,5 mg/kg de bixina (DCB) incorporadas em iogurte (n=10);
- ✓ Diabético tratado com 45 mg/kg de licopeno (DL) incorporado em iogurte (n=10);
- ✓ Diabético tratado com 90 mg/kg de curcumina e 45 mg/kg de licopeno (DCL) incorporados em iogurte (n=10).

Realizou-se a incorporação da curcumina e/ou bixina e/ou licopeno ao iogurte natural (Nestlé[®], contendo: *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*) em ambiente termostático (25°C), durante 90 segundos a 27000 rpm em homogeneizador (modelo Metabo). Os ativos naturais utilizados nos tratamentos foram: curcumina (> 65%, Sigma Aldrich), bixina (60%, Lychnoflora) e licopeno (10,13%, PHD Com. Imp. Exp. LTDA).

Animais dos grupos NIOG e DIOG receberam 0,5 mL de iogurte natural (Nestlé[®]) por gavagem, duas vezes ao dia; animais do grupo DINS receberam 2U/animal de insulina (Humolin[®]) preparada em NaCl 0,85%, por via subcutânea, duas vezes ao dia; animais do grupo DC receberam 45 mg/kg de curcumina incorporada ao iogurte, duas vezes ao dia; animais do grupo DB receberam 2,75 mg/kg de bixina incorporada ao iogurte, duas vezes ao dia; animais do grupo DL receberam 22,5 mg/kg de licopeno incorporado ao iogurte, duas vezes ao dia; animais dos grupos relacionados às combinações entre curcumina e carotenoides (DCB e DCL) receberam as mesmas doses acima descritas para os compostos isolados. As administrações das suspensões (via gavagem) e de insulina (via subcutânea) foram realizadas diariamente, às 8:00 h e às 17:00 h, durante 50 dias. As massas de curcumina, bixina e licopeno foram ajustadas de acordo com a média do peso dos animais de seus respectivos grupos.

Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno com água e ração *ad libitum* e, dois dias antes da coleta das amostras de sangue e urina, foram colocados em gaiolas metabólicas individuais.

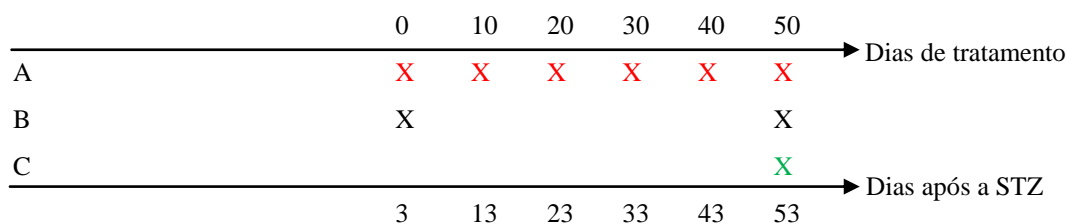
Torna-se importante salientar que neste estudo os animais foram submetidos à jejum prévio de 12 horas, para todas as coletas realizadas durante o período experimental. As amostras de plasma foram obtidas do sangue coletado pela cauda dos animais, após vasodilatação periférica, em microtubos heparinizados (Hemofol[®]). O sangue coletado foi centrifugado durante 10 minutos a 2500 rpm e o plasma obtido foi separado para as determinações bioquímicas.

A cada 10 dias foram avaliados os parâmetros fisiológicos (peso corporal, consumo de ração de 12 horas, ingestão hídrica e volume urinário de 24 horas, sendo a urina coletada em frasco contendo 300 µL de tolueno), bem como os parâmetros bioquímicos plasmáticos (glicemia, colesterol total, triacilgliceróis) e urinários (glicosúria, proteinúria e ureia). As enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (ALP) foram avaliadas no dia 0 e após 50 dias de tratamento.

Após 50 dias de tratamento, o sangue foi coletado pela cauda dos animais para determinação das enzimas ALT, AST e ALP, e após essa coleta, os animais foram eutanasiados por decapitação e o sangue foi utilizado para determinação dos demais parâmetros bioquímicos plasmáticos anteriormente citados. Também foram utilizadas amostras de plasma para as determinações de níveis plasmáticos de HDL-colesterol, malondialdeído (MDA) e LDL-oxidada.

Os tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal e os músculos esqueléticos *soleus* e *extensor digitorum longus* (EDL) foram retirados e pesados. O fígado também foi retirado e congelado (-80°C), o qual foi utilizado para diversas análises: biomarcadores de estresse oxidativo (MDA, PCO); determinação da atividade de enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GSH-Px); níveis de GSH; conteúdo de glicogênio hepático (Fluxograma 1).

Fluxograma 1: Análises realizadas durante o período experimental



X: Peso corporal, consumo de ração, ingestão hídrica, volume urinário, glicemia, triacilglicerol, colesterol total.

X: AST, ALT, ALP.

X: Pesagem dos músculos EDL e *soleus* e das gorduras retroperitoneal e epididimal; dosagem do conteúdo de glicogênio hepático e dos níveis de colesterol-HDL, MDA (hepático e plasmático), PCO, LDL-oxidada, GSH, bem como determinação da atividade das enzimas CAT, SOD, GSH-Px.

3.1.4 Determinações analíticas

3.1.4.1 Biomarcadores do metabolismo de carboidratos, lipídeos e função hepática e renal

As concentrações plasmáticas dos parâmetros bioquímicos foram realizadas utilizando kits comerciais da Labtest Diagnóstica S.A., exceto para glicosúria, glicogênio hepático e proteínas totais.

- ✓ **Glicemia:** método da glicose-oxidase (TRINDER, 1969; HALL, 2003);
- ✓ **Colesterol Total:** método enzimático de ação sequencial de colesterol esterase e colesterol-oxidase (MROZ, 2003);
- ✓ **Colesterol-HDL:** método indireto por inibição seletiva com polioxietileno laurel éter (RIFAI; WARNICK, 2006);
- ✓ **Triacilgliceróis:** método enzimático de ação sequencial de lipase e gliceroquinase (RIFAI; WARNICK, 2006);
- ✓ **ALT:** método cinético, acoplado a lactato desidrogenase (WRÓBLENSKI; LADUE, 1956);
- ✓ **AST:** método cinético, acoplado a malato desidrogenase (BERGMEYER et al. 1977);
- ✓ **ALP:** método colorimétrico (SCANDINAVIAN, 1974);

- ✓ **Ureia urinária:** método da urease (BOLLETER; BUSHMAN; TIDWELL, 1961; BERNT; BERGMEYER, 1985);
- ✓ **Proteinúria:** método do vermelho de pirogalol (BRADFORD, 1976);
- ✓ **Glicosúria:** método da o-toluidina (DUBOWSKI, 1962);
- ✓ **Glicogênio hepático:** O conteúdo de glicogênio hepático foi determinado pelo método da antrona, após extração do glicogênio que consiste na digestão do fígado em 30% de KOH à 100°C, e precipitação com etanol. O ácido sulfúrico hidrolisa o glicogênio transformando em glicose. A antrona reage com a glicose e gera um cromóforo (esverdeado) com absorção a 540 nm. Realizou-se uma curva padrão com glicose, obteve-se um fator e calculou-se a concentração de glicogênio hepático (VIES, 1953).
- ✓ **Proteínas totais:** As concentrações de proteínas totais nos sobrenadantes de homogenato de fígado foram realizadas de acordo com o método de Lowry et al. (1951), e determinadas espectrofotometricamente em 660 nm. Os resultados foram expressos utilizando uma da curva analítica com albumina bovina sérica.

3.1.4.2 Biomarcadores relacionados ao estresse oxidativo

3.1.4.2.1 Preparo das amostras

Foram homogeneizados 0,25 g de fígado em 1 mL de solução de cloreto de potássio (1,15%) a 4°C, para a análise de MDA; 0,2 g de fígado em 1 mL de tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 6,7) contendo EDTA (1mM), para análise de PCO; 0,1 g de fígado em 1 mL de solução de EDTA (0,02 M), para análise de GSH. Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 g durante 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram utilizados para as análises.

- ✓ **Malondialdeído (MDA) no plasma e fígado:** as amostras (plasma e homogenato de fígado) foram submetidas à desproteinização (PILZ et al.,2000). Os níveis de MDA foram determinados segundo por Kohn; Liversedge (1944), pela análise de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA), com formação de complexo determinado espectrofotometricamente em 535 nm (fígado) ou fluorimetricamente nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 510 e 553 nm, respectivamente (plasma). Foi realizada curva analítica com o 1,1,3,3-tetrametoxipropano. Os resultados foram expressos em µmol/L de MDA (plasma) ou µmol de MDA/g de tecido (fígado).

- ✓ **Proteínas carboniladas (PCO):** As proteínas carboniladas foram determinadas segundo metodologia descrita por Levine et al. (1994). Os grupos carbonilas nas proteínas reagem com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) em meio ácido, formando 2,4-dinitrofenilhidrazona, monitorada espectrofotometricamente em 370 nm. A concentração de PCO na amostra foi obtida utilizando o coeficiente de extinção molar da hidrazona ($22.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e expressa em μmol de PCO/mg de proteína (fígado).

- ✓ **LDL-oxidada:** Para determinação dos níveis plasmáticos de LDL-oxidada utilizou-se imunoenensaio baseado na interação do antígeno-anticorpo e revelação por reação enzimática (ELISA) que gera um produto monitorável por espectrofotometria, a 450 nm (ELISA Kit for oxidized low density lipoprotein of *Rattus norvegicus*, Uscn Life Science Inc., Wuhan, hubei, China).

- ✓ **Glutationa reduzida (GSH):** as concentrações de GSH foram quantificadas de acordo com Sedlak; Lindsay (1968), em função da redução do ácido 5,5-ditio-2-nitrobenzoico (DTNB), medido espectrofotometricamente em 412 nm. Os resultados foram expressos em mmol de GSH/g de tecido (fígado).

3.1.4.3 Biomarcadores relacionados à atividade antioxidante

3.1.4.3.1 Preparo das amostras

As amostras de fígado (0,1g) foram homogeneizadas em 1 mL de tampão fosfato de sódio (10 mmol/L, pH 7,4) a 4°C. Os homogenatos foram centrifugados a 10.000g durante 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram usados para as análises das atividades de SOD, CAT e GSH-Px.

- ✓ **Superóxido dismutase (SOD):** determinou-se a atividade da SOD de acordo com Beauchamp e Fridovich (1971), onde a oxidação da xantina gera o ânion superóxido sob a atividade catalítica da xantina oxidase, o qual reduz o *nitroblue tetrazolium* (NBT) a uma formazana. Na presença de SOD ocorre inibição da redução do NBT, monitorada em 550 nm. Os resultados foram expressos em U de SOD/mg de proteína (fígado). Uma unidade de

SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a redução do NBT em 50%.

- ✓ **Catalase (CAT):** determinou-se a atividade da CAT pelo monitoramento do desaparecimento do H_2O_2 em 230 nm (BEERS; SIZER, 1952). Os resultados foram expressos em mmol de H_2O_2 consumido/min/mg de proteína (fígado).

- ✓ **Glutathione peroxidase (GSH-Px):** determinou-se a atividade da GSH-Px de acordo com o método descrito por Rush; Scandiford (2003). A GSH-Px catalisa a oxidação de GSH na presença de H_2O_2 . Na presença de glutathione reductase (GR), a glutathione oxidada (GSSH) é reduzida à GSH com oxidação concomitante do NADPH à $NADP^+$. A oxidação do NADPH é monitorada pela diminuição da absorbância em 340 nm. Os resultados foram expressos em mmol de NADPH consumido/min/mg de proteína (fígado).

3.1.5 Análise Estatística

Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM). Os dados foram analisados por análise de variância One-way (ANOVA) seguida pelo Student-Newman-Keuls, para comparações intergrupos temporais de parâmetros fisiológicos, bioquímicos, e parâmetros relacionados ao estresse oxidativo e atividade antioxidante. Para as comparações intragrupos de parâmetros fisiológicos e bioquímicos em relação ao dia 0, utilizou-se o test t Student. Foram consideradas diferenças significativas quando $p < 0,05$. As análises supracitadas, foram realizadas utilizando o programa GraphPad InStat[®] 3.05.

3.2 Experimento 2: Avaliação das alterações fisiológicas e bioquímicas de camundongos submetidos ao modelo de obesidade/resistência insulínica, tratados com curcumina, licopeno e bixina isolados, incorporados ao iogurte

Foram utilizados camundongos machos (C57B1/6J) com 8 semanas e peso de $22,0 \pm 2,0$ g. Os animais permaneceram no biotério do “*Quebec Heart and Lung Institute*” em ambiente com ciclo de luz controlado e alimentação e água *ad libitum*. Após 2 semanas de

adaptação e recebendo dieta padrão (*chow*, Teklad 2018, Harlan), os camundongos foram alimentados por 8 semanas com **dieta controle/normocalórica** (*low-fat*, LF, 3,85 kcal/g, 4,3 g lipídeos/100 g dieta; Research Diets Inc., Open Source Diets) ou **dieta hiperlipídica/hipercalórica** (*high-fat*, HF, 4,43 kcal/g, 24 g lipídeos/100 g dieta; Research Diets Inc., Open Source Diets). É importante salientar que as dietas *low-fat* e *high-fat* são mutuamente relativas (Tabela 1). Todos os animais receberam água *ad libitum* durante todo o período experimental.

Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da *Université Laval* (n° 2015100-1, Anexo II).

Os camundongos foram aleatoriamente divididos em 6 grupos, e receberam as respectivas dietas e tratamentos:

- ✓ L: dieta *low-fat*, tratados com água, via gavagem (n=12);
- ✓ H: dieta *high-fat*, tratados com água, via gavagem (n=12);
- ✓ HIOG: dieta *high-fat*, tratados com iogurte, via gavagem (n=12);
- ✓ HC: dieta *high-fat*, tratados com 90 mg/kg de curcumina incorporada em iogurte, via gavagem (n=12);
- ✓ HB: dieta *high-fat*, tratados com 5,5 mg/kg de bixina incorporada em iogurte, via gavagem (n=12);
- ✓ HL: dieta *high-fat*, tratados com 45 mg/kg de licopeno incorporado em iogurte, via gavagem (HL, n=12).

Tabela 1:
Composição das dietas controle/normocalórica (LF) e hiperlipídica/hipercalórica (HF)

	<i>Low-fat (LF)</i> (g/100g)		<i>High-fat (HF)</i> (g/100g)	
	g (%)	kcal (%)	g (%)	kcal (%)
Proteínas	19,2	20	24	20
Carboidratos	67,3	70	41	35
Lipídeos	4,3	10	24	45
Total		100		100
kcal/g	3,85		4,73	
Ingredientes	G	Kcal	G	Kcal
Caseína	200	800	200	800
L-Cistina	3	12	3	12
Amido de milho	452,2	1808,8	72,8	291
Maltodextrina	75	300	100	400
Sacarose	172,8	691,2	172,8	691,2
Celulose	50	0	50	0
Óleo de soja	25	225	25	225
Banha	20	180	177,5	1598
Mistura de mineral	10	0	10	0
Fosfato dicálcico	13	0	13	0
Carbonato de cálcio	5,5	0	5,5	0
Citrato de potássio	16,5	0	16,5	0
Mix de vitaminas	10	40	10	40
Bitartarato de colina	2	0	2	0
Corante vermelho	0,01	0	0,05	0
Corante amarelo	0,04	0	-	-
Total	1055,05	4057	858,15	4057

Quantidades dos componentes de acordo com especificações fornecidas por Research Diets Inc., Open Source Diets.

Os ativos naturais citados anteriormente (item 4.1.3) foram incorporados ao iogurte natural (Liberté, Liberté Classique, Canada, contendo: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis*), durante 5 minutos a 1800 rpm em homogeneizador (Fisher). As administrações das suspensões (via gavagem) foram realizadas diariamente às 8:00 h, durante 8 semanas. O volume de gavagem variou em função do peso dos animais, com valores próximos a 150 µL para cada animal.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais com água e respectivas dietas *ad libitum*. Ingestão alimentar e peso corporal foram determinados 3 vezes por semana.

A fim de monitorar as alterações na composição corporal, os animais foram submetidos à análise via RMN (Bruker LF90 proton-NMR Minispec; Bruker Optics; The Woodlands, TX), onde foram determinadas as massas (g) dos tecidos adiposos, massa magra e fluido corporal. Tal procedimento foi realizado antes do início do tratamento com os ativos naturais (semana de aclimatação) e repetido após 7 semanas de tratamento.

Na 7ª semana, também foram coletadas as fezes de 24 horas, as quais foram imediatamente armazenadas a -80°C. O conteúdo energético das fezes foi determinado por bomba calorimétrica (6100 Compensated Jack calorimeter, Parr Instrument Company; Moline, EUA).

Após 8 semanas de oferta das dietas LF ou HF e dos respectivos tratamentos com os ativos naturais em iogurte, os animais foram submetidos a jejum de 6 horas, e subsequente a esse período os animais foram anestesiados em câmaras saturadas com isoflurano e eutanasiados por punção cardíaca. O sangue foi coletado em tubos com EDTA e imediatamente centrifugado (10 minutos, 3500 rpm), a fim de obter o plasma para posteriores análises bioquímicas (item 4.2.2). Também foram retirados os tecidos adiposos brancos (epididimal, retroperitoneal e inguinal), tecido adiposo marrom (interescapular), músculos esqueléticos *soleus*, *extensor digitorum longus* (EDL) e *gastrocnemius*, fígado, coração, pâncreas, intestino (duodeno, jejuno, íleo e ceco) e tíbia. Os tecidos foram pesados e armazenados (-80°C) para posteriores análises (item 4.2.2).

3.2.1 Homeostase da glicose

Na 7ª semana de tratamento, realizou-se o teste de tolerância à insulina intraperitoneal (ITT) de acordo com Protzek et al. (2010), com adaptações. Os camundongos foram submetidos a jejum de 6 horas e a concentração de glicose plasmática foi mensurada com glicosímetro Accu-Check (Bayer AG; Leverkusen, Germany) antes (0 min) e após (5, 10, 15, 20, 30 e 60 min) a administração de insulina (0,65 UI/kg de peso corporal), via intraperitoneal.

Na 8ª semana de tratamento, os camundongos foram submetidos ao teste de tolerância à glicose oral (TTGO), como descrito por Xu et al. (2009), com modificações. Os animais foram jejuados por 12 horas (*overnight*), a glicemia foi determinada antes (0 min) e depois (15, 30, 60, 90, 120 min) da sobrecarga de glicose (1 g/kg de peso corporal, via oral),

utilizando glicosímetro Accu-Check (Bayer AG; Leverkusen, Germany). Além disso, amostras de sangue (~30 µL) foram coletadas em cada tempo do TTGO e centrifugadas. Utilizou-se o plasma para avaliar a insulinemia (ELISA, American Laboratory Products Company, ALPCO, Salem, USA). Foi calculado o HOMA-IR (“*homeostatic model assessment of insulin resistance*”), baseado na seguinte fórmula: insulinemia de jejum (µUI/mL) x glicemia de jejum (mM)/22,5.

3.2.2 Determinações analíticas

3.2.2.1 Biomarcadores do metabolismo lipídico

As concentrações plasmáticas e hepáticas dos parâmetros bioquímicos foram realizadas utilizando kits comerciais da Randox Laboratories, Crumlin, UK.

-Plasmáticos:

- ✓ **Colesterol Total:** método enzimático de ação sequencial de colesterol esterase e colesterol-oxidase (MROZ, 2003);
- ✓ **Triacilgliceróis:** método enzimático de ação sequencial de lipase e gliceroquinase (RIFAI; WARNICK, 2006).

- Hepático:

- ✓ **Conteúdo de triacilglicerol hepático:** Primeiramente, realizou-se a extração (clorofórmio:metanol) de lipídeos totais de acordo com Folch; Lees; Sloane Stanley (1956), subsequente realizou-se a determinação de triacilglicerol, com a mesma metodologia utilizada para determinação dos níveis plasmáticos de triacilgliceróis.

3.2.2.2 Biomarcadores relacionados à avaliação da defesa antioxidante endógena e biomarcadores inflamatórios

Monitorou-se biomarcador do estresse oxidativo, MDA, bem como as atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-Px. As metodologias utilizadas para realização desses ensaios estão descritas no item 3.1.4.2.

Para o monitoramento do perfil inflamatório, foram avaliadas as concentrações de TNF α e IL-6 (DuoSet ELISA, R&D Systems, USA), no fígado. Os resultados foram expressos em pg/mL.

3.2.3 Análise Estatística

Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM). As análises estatísticas foram realizadas utilizando análise de variância One-way (ANOVA) seguida pelo Dunnett em testes com comparações múltiplas (GraphPad, InStat[®] 3.05). Utilizou-se a análise de variância two-way repeated measure (ANOVA) seguida pelo Bonferroni, para comparações no ganho de peso corporal, ingestão alimentar e consumo energético, ITT, TTGO, e insulinemia. Utilizou-se o Teste t para análises intergrupos (L e H). Todos os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

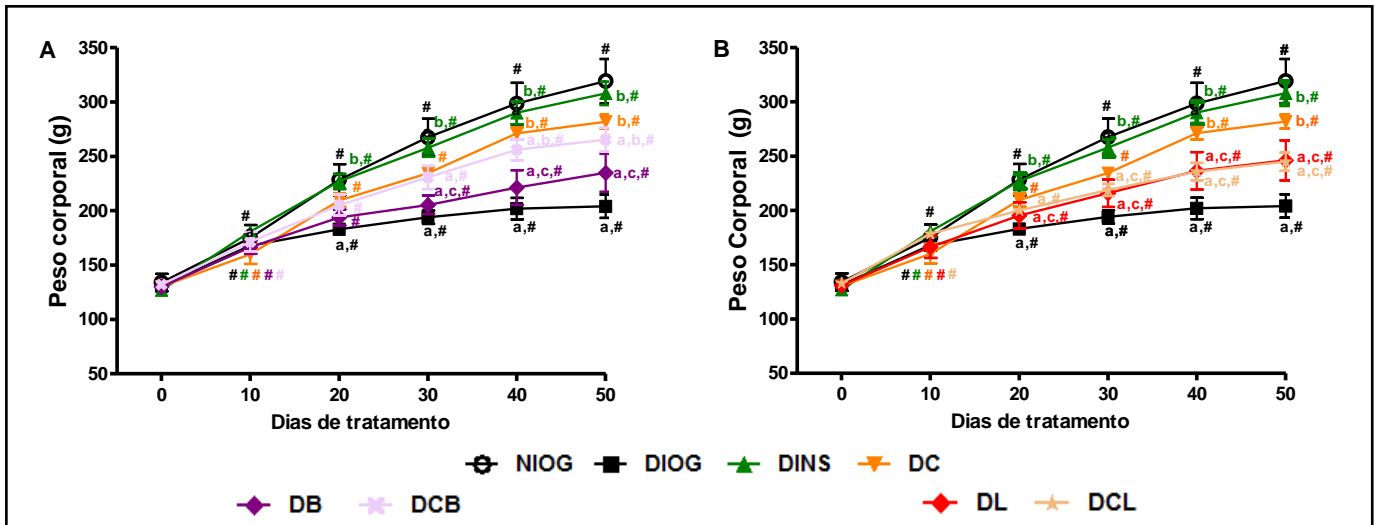
4.1 Experimento 1 : Avaliação das alterações fisiológicas e bioquímicas de ratos normais e diabéticos tratados com curcumina e carotenoides, isolados e em misturas, incorporados ao iogurte.

Para eliminar as interferências referentes à ingestão alimentar nos níveis de biomarcadores do metabolismo lipídico, escolheu-se como conduta pré-analítica a realização de jejum de 12 horas para a coleta das amostras dos ratos. Observou-se que o jejum de 12 horas causou interferências quantitativas em alguns parâmetros fisiológicos, tais como: consumo de ração, ingestão hídrica e volume urinário, e conseqüentemente em parâmetros bioquímicos urinários: glicosúria, proteinúria e ureia urinária. Contudo, quando comparamos estes resultados com estudos anteriores do laboratório realizados com ratos alimentados (GUTIERRES et al., 2012; ARCARO et al., 2014), pode-se concluir que as alterações qualitativas foram mantidas quando feitas as comparações antes (dia 0) e após os tratamentos, bem como a esperada piora dos parâmetros em animais diabéticos sem tratamento; ou seja, o jejum não prejudicou os nossos resultados de maneira qualitativa, exceto para os biomarcadores urinários que, devido ao volume urinário diminuído, sofreram maiores interferências.

4.1.1 Parâmetros fisiológicos de ratos diabéticos tratados com curcumina e/ou bixina e/ou licopeno

Nas Figuras 4A e B observa-se a evolução do peso corporal de animais normais e diabéticos não tratados e tratados com os ativos naturais em iogurte durante 50 dias. O grupo NIOG apresentou ganho de peso acentuado quando comparado ao grupo DIOG, bem como quando comparado aos animais diabéticos tratados (grupos DB, DL, DCB e DCL). O grupo DIOG apresentou o menor ganho de peso em relação aos demais grupos de animais diabéticos que receberam os diferentes tratamentos, durante todo o período experimental. O grupo DINS apresentou o maior ganho de peso corporal em relação aos grupos de animais diabéticos, apresentando aumento progressivo durante todo o período experimental e com valores muito próximos aos animais normais (NIOG). Os animais tratados com curcumina (DC) apresentaram ganho de peso corporal significativo em relação ao grupo DIOG, principalmente depois do 40º dia de tratamento. Os tratamentos de ratos diabéticos com bixina (DB) ou licopeno (DL) aumentaram o ganho de peso corporal, porém sem diferença significativa quando comparados ao grupo DIOG. A co-administração curcumina + bixina (DCB) em iogurte promoveu benefícios no ganho de peso corporal, a partir do 40º dia de tratamento, quando comparado ao grupo DIOG. Assim, podemos observar os benefícios da suplementação combinada (curcumina + bixina) em comparação ao tratamento isolado com bixina (DB). Apesar da tendência de aumento no ganho de peso corporal de ratos diabéticos tratados com curcumina + licopeno, não foi observada diferença estatística no ganho de peso corporal quando comparados com os grupos DIOG e DCL. Portanto, pode-se observar que os benefícios no ganho de peso corporal com o tratamento com curcumina em iogurte foram mantidos quando a curcumina foi co-administrada com bixina (DCB) em iogurte.

Figura 4: Peso corporal (g) de ratos normais e ratos diabéticos tratados por 50 dias com curcumina e/ou bixina, e/ou licopeno, em iogurte.



(A) curcumina e/ou bixina (B) curcumina e/ou licopeno. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com o NIOG; b, diferenças com o DIOG; c, diferenças com DINS; d, diferenças com DC; e, diferenças com DB; f, diferenças com DCB; g, diferenças com DL; h, diferenças com DCL. #, diferenças com o dia 0.

Na Tabela 2 estão apresentados os valores referentes ao consumo de ração, ingestão hídrica e volume urinário de ratos normais e diabéticos, antes (dia 0) e depois de 50 dias dos diferentes tratamentos.

Em relação ao consumo de ração, os animais do grupo DIOG apresentaram aumento no consumo de ração após 50 dias, o que retrata o quadro de polifagia típico de animais em modelo de DM estreptozotocínico. Os tratamentos de ratos diabéticos com insulina (DINS), curcumina (DC) e bixina (DB) promoveram benefícios no consumo de ração (Tabela 2), com redução de 56%, 39%, 19%, respectivamente, em relação ao grupo DIOG, após 50 dias de tratamento. Os demais tratamentos (DL, DCB, DCL) não promoveram alterações no consumo de ração dos ratos diabéticos, quando comparados ao grupo DIOG.

Todos os grupos de animais diabéticos (após 3 dias de diabetes) apresentaram um aumento significativo da ingestão hídrica no dia 0, quando comparados aos animais normais (NIOG). Após 50 dias de tratamento, observamos que o grupo DIOG apresentou um aumento de 105% na ingestão hídrica em relação ao início do tratamento (dia 0), caracterizando a polidipsia do estado diabético; já o tratamento de ratos diabéticos com insulina (DINS) foi capaz de reduzir em 50% a ingestão hídrica, em relação ao início do tratamento. O tratamento com curcumina (DC) impediu o aumento da ingestão hídrica, ou seja, não houve diferença

entre o dia 0 e o dia 50, e os valores se apresentaram diminuídos quando comparados ao DIOG. O tratamento de ratos diabéticos com bixina (DB) não impediu o aumento de ingestão hídrica, alcançando valores próximos ao grupo DIOG, no final do tratamento. Os animais diabéticos tratados com licopeno (DL) apresentaram aumento de ingestão hídrica em relação ao início do tratamento, porém ao final do experimento apresentaram menor ingestão hídrica em relação ao grupo DIOG. As co-administrações (DCB e DCL) não foram capazes de trazer benefícios na ingestão hídrica, que alcançaram valores próximos ao grupo DIOG.

Tal como observado para a ingestão hídrica, o grupo DIOG apresentou aumento no volume urinário, em relação ao início do tratamento, mostrando assim a poliúria típica de animais diabéticos. Os animais diabéticos que receberam insulina (DINS) apresentaram uma redução de 75% no volume urinário, em relação ao DIOG, após 50 dias de tratamento. O volume urinário dos animais diabéticos tratados com curcumina (DC) também se mostrou reduzido (41%) em relação ao grupo DIOG. Os demais tratamentos (DB, DL, DCB, DCL) não promoveram nenhuma alteração no volume urinário de ratos diabéticos, apresentando valores semelhantes quando comparados aos animais diabéticos sem tratamento (DIOG).

Na Tabela 3 estão apresentadas as massas dos músculos esqueléticos *soleus* e EDL e dos tecidos adiposos brancos epididimal e retroperitoneal de ratos normais e diabéticos após os diferentes tratamentos, ao final de 50 dias. Ratos diabéticos DIOG apresentaram pesos de tecidos musculares e adiposos reduzidos, quando comparados ao grupo NIOG, caracterizando o estado catabólico típico da deficiência insulínica, o qual contribuiu para o menor ganho de peso corporal (Figuras 4A e B). O tratamento de ratos diabéticos com insulina (DINS) promoveu o maior ganho de massa muscular e adiposa, alcançando valores semelhantes aos animais normais (NIOG), explicando assim o maior ganho de peso corporal. Animais diabéticos tratados com curcumina (DC) apresentaram um aumento significativo no ganho de massa muscular (*soleus* e EDL) e de tecido adiposo epididimal, quando comparado ao grupo DIOG. Os animais dos grupos DB e DL não apresentaram ganho de massa muscular e adiposa quando comparados ao DIOG. A co-administração da curcumina + bixina (DCB) promoveu ganho significativo de massa muscular (*soleus* e EDL) e adiposa (epididimal), em relação ao grupo DIOG. Embora a co-administração curcumina + licopeno (DCL) não tenha promovido um aumento significativo no ganho de peso corporal, as massas de tecido muscular (*soleus* e EDL) e adiposo (epididimal) foram maiores quando comparadas aos valores em animais DIOG.

Os resultados deste estudo corroboraram dados prévios do laboratório (GUTIERRES et al., 2012; ARCARO et al., 2014), os quais mostraram os benefícios da curcumina incorporada em iogurte em parâmetros fisiológicos alterados neste modelo experimental, tais como: ganho de peso corporal, ganho de massa muscular esquelética e massa adiposa, diminuição do consumo de ração, da ingestão hídrica e volume urinário.

Os benefícios dos tratamentos com os carotenoides bixina e licopeno incorporados ao iogurte em parâmetros fisiológicos e bioquímicos de animais diabéticos corroboram os dados encontrados por Roehrs et al. (2014). Esses autores observaram melhorias em parâmetros bioquímicos (glicemia, triacilglicerol e colesterol total) em animais diabéticos tratados com bixina em solução oleosa. Benefícios em parâmetros fisiológicos (peso corporal e tecido adiposo) também foram observados em ratos hipercolesterolêmicos tratados com extrato aquoso de bixina (DE PAULA et al., 2009). O tratamento de animais diabéticos com licopeno em azeite de oliva não levou a melhorias em parâmetros fisiológicos, como peso corporal, ingestão alimentar e hídrica, mas foi benéfico frente aos parâmetros bioquímicos, tais como: aumento dos níveis séricos de insulina, diminuição dos níveis de glicose, colesterol total, TAG, ALT e AST (BAYRAMOGLU; BAYRAMOGLU; SENTURK, 2013).

Tabela 2: Parâmetros fisiológicos: consumo de ração (g/12h), ingestão hídrica (mL/24h), volume urinário (mL/24h) de animais normais, diabéticos não tratados e tratados com curcumina e/ou bixina, e/ou licopeno, incorporados em iogurte, durante 50 dias.

Grupos	Consumo de ração (g/12h)		Ingestão hídrica (mL/24h)		Volume urinário (mL/24h)	
	Dia 0	Dia 50	Dia 0	Dia 50	Dia 0	Dia 50
NIOG	7,46 ± 0,50	8,45 ± 0,49	8,57 ± 1,36	10,83 ± 0,86	6,31 ± 0,90	10,60 ± 0,50
DIOG	9,93 ± 1,38	18,93 ± 1,76 (a,#)	40,75 ± 5,72 (a)	83,80 ± 24,58 (a)	32,00 ± 4,61 (a)	77,33 ± 14,26 (a,#)
DINS	9,27 ± 1,52	8,38 ± 0,46 (b)	39,57 ± 7,01 (a)	19,56 ± 2,26 (b)	28,50 ± 3,89 (a)	19,32 ± 2,60 (b)
DC	7,75 ± 0,77	11,43 ± 2,28 (b)	42,20 ± 4,62 (a)	47,00 ± 18,53	33,00 ± 3,24 (a)	45,83 ± 12,52 (a,c)
DB	10,29 ± 1,89	15,25 ± 1,82 (a,c)	42,89 ± 6,55 (a)	75,17 ± 13,19 (a,c)	33,38 ± 5,51 (a)	75,57 ± 11,42 (a,c,#)
DCB	9,10 ± 0,62	21,40 ± 2,87 (a,c,d)	43,67 ± 8,32 (a)	98,40 ± 16,43 (a,c,d)	30,88 ± 5,88 (a)	88,20 ± 12,80 (a,c,d)
DL	10,45 ± 1,45	17,94 ± 2,31 (a,c,d,#)	42,00 ± 5,02 (a)	55,43 ± 12,47 (a,c)	34,44 ± 3,35 (a)	72,83 ± 9,78 (a,c,#)
DCL	10,15 ± 1,13	17,75 ± 1,66 (a,c,d,#)	45,40 ± 3,86 (a)	77,67 ± 5,83 (a,c,#)	36,00 ± 2,81 (a)	78,50 ± 3,94 (a,c,#)

As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DINS; d, diferenças com DC; e, diferenças com DB; f, diferenças com DCB; g, diferenças com DL; h, diferenças com DCL; #, diferenças com o dia 0.

Tabela 3: Peso dos músculos esqueléticos e tecidos adiposos brancos de animais normais, diabéticos não tratados e tratados com curcumina e/ou bixina, e/ou licopeno, incorporados em iogurte, durante 50 dias.

Grupos	Músculos Esqueléticos		Tecidos Adiposos Brancos	
	<i>Soleus</i> (g)	EDL (g)	Epididimal (g)	Retroperitoneal (g)
NIOG	0,155 ± 0,003	0,151 ± 0,004	4,753 ± 0,478	4,517 ± 0,304
DIOG	0,105 ± 0,007 (a)	0,096 ± 0,006 (a)	1,226 ± 0,112 (a)	0,611 ± 0,170 (a)
DINS	0,163 ± 0,004 (b)	0,153 ± 0,005 (b)	4,348 ± 0,258 (b)	3,949 ± 0,449 (b)
DC	0,137 ± 0,004 (a,b)	0,121 ± 0,004 (a,b)	1,873 ± 0,119 (a,b,c)	1,242 ± 0,180 (a,c)
DB	0,109 ± 0,010 (a,c)	0,095 ± 0,008 (a,c)	1,603 ± 0,262 (a,c)	0,768 ± 0,276 (a,c)
DCB	0,134 ± 0,007 (a,b)	0,118 ± 0,004 (a,b)	2,160 ± 0,140 (a,b,c)	1,190 ± 0,136 (a,c)
DL	0,107 ± 0,010 (a,c)	0,093 ± 0,008 (a,c)	1,522 ± 0,229 (a,c)	0,808 ± 0,248 (a,c)
DCL	0,120 ± 0,005 (a,b)	0,115 ± 0,008 (a,b)	1,661 ± 0,033 (a,b,c)	1,214 ± 0,186 (a,c)

As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DINS; d, diferenças com DC; e, diferenças com DB; f, diferenças com DCB; g, diferenças com DL; h, diferenças com DCL.

4.1.2 Parâmetros bioquímicos de ratos diabéticos tratados com curcumina e/ou bixina e/ou licopeno

Os grupos formados por animais diabéticos apresentaram valores de glicemia de aproximadamente 450 mg/dL no pareamento (animais alimentados), o que nos permite a validação da instalação do DM experimental estreptozotocínico. Após o pareamento, todas as demais coletas foram realizadas com os animais jejuados por 12 horas, visando otimizar as condições para o estudo dos tratamentos com os ativos naturais no metabolismo lipídico.

Nas Figuras 5A e B estão apresentados os valores de glicemia de animais normais e diabéticos não tratados e tratados com iogurte enriquecido com curcumina, bixina, licopeno ou combinações, durante 50 dias.

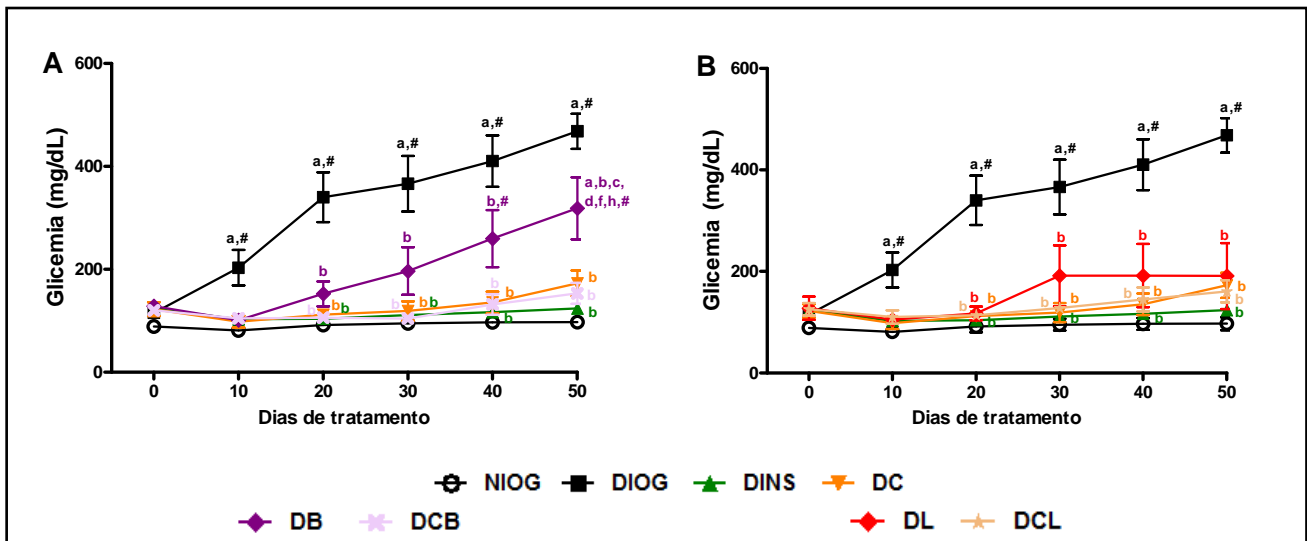
Os valores de glicemia dos animais normais tratados com iogurte (NIOG) mantiveram-se em valores dentro da normalidade, desde o pareamento até o final do período experimental.

No decorrer do período experimental, o grupo DIOG apresentou níveis glicêmicos progressivamente maiores, ficando evidente a cronicidade do diabetes nestes animais. O tratamento com insulina (DINS) foi efetivo na redução da glicemia de animais diabéticos, desde o início até o término do período do tratamento, deixando os níveis glicêmicos

próximos aos valores de normalidade. O tratamento com curcumina (DC) foi capaz de promover redução na glicemia de jejum de animais diabéticos, apresentando queda de 62% após 50 dias de tratamento em relação ao grupo DIOG, alcançando os valores de glicemia de animais diabéticos tratados com insulina (DINS) (Figura 5). Estes resultados distinguem-se daqueles encontrados anteriormente por Gutierrez et al. (2012) e Arcaro et al. (2014), entretanto é compulsório mencionar que estes autores investigaram os efeitos da curcumina incorporada ao iogurte em ratos diabéticos no estado alimentado, nos quais os níveis glicêmicos foram mantidos do início até o final do tratamento com curcumina, apresentando no entanto uma redução significativa em relação ao grupo DIOG, mas sem alcançar os valores de glicemia de animais DINS. Os tratamentos com bixina (DB) e licopeno (DL) também promoveram redução nos níveis glicêmicos, quando comparados ao grupo DIOG (Figura 5A), no entanto não atingiram a mesma magnitude do tratamento com curcumina (DC), assim indicando ser a curcumina mais eficiente na redução da glicemia. Vale ressaltar que os níveis glicêmicos do grupo DB foram significativamente aumentados depois do 40º dia de tratamento, quando comparado ao dia 0 (Figura 5A).

A co-administração de curcumina + bixina (DCB) ou curcumina + licopeno (DCL) mostraram ser mais efetivas na redução da glicemia em comparação aos tratamentos isolados com os carotenoides, pois os animais DCB e DCL atingiram níveis glicêmicos próximos aos valores de animais DC (Figura 5A e B). Portanto, a co-administração curcumina + licopeno ou curcumina + bixina, agrega benefícios ao controle dos níveis glicêmicos de animais diabéticos, quando comparados aos tratamentos com os carotenoides isolados, em especial a bixina.

Figura 5: Glicemia (mg/dL) de ratos normais e ratos diabéticos tratados por 50 dias com curcumina e/ou bixina, e/ou licopeno, em iogurte.



(A) curcumina e/ou bixina (B) curcumina e/ou licopeno. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com o NIOG; b, diferenças com o DIOG; c, diferenças com DINS; d, diferenças com DC; e, diferenças com DB; f, diferenças com DCB; g, diferenças com DL; h, diferenças com DCL. #, diferenças com o dia 0.

Estão apresentados na Tabela 4 os resultados referentes aos biomarcadores urinários, glicosúria e ureia urinária, de animais normais e diabéticos, no início (dia 0) e depois de 50 dias dos diferentes tratamentos. No início do experimento, todos os grupos de animais diabéticos apresentaram valores semelhantes de glicosúria e ureia urinária, e estes apresentaram-se significativamente maiores quando comparados aos valores em animais normais (NIOG), exceto para a glicosúria, a qual não foi determinada em animais normais.

O grupo DIOG mostrou um aumento significativo nos valores de glicosúria no final do experimento, um perfil de resposta semelhante ao observado na glicemia, representando uma piora progressiva do estado diabético nestes animais tratados somente com iogurte (DIOG). Como esperado, o tratamento dos ratos diabéticos com insulina (DINS) reduziu em 88% a concentração de glicose urinária em relação ao dia 0, e promoveu 95% de redução quando comparado ao grupo DIOG, no final do tratamento. O controle da glicemia alcançado no tratamento com curcumina (DC) também foi refletido neste parâmetro, uma vez que os níveis de glicose urinária não se alteraram ao término do tratamento, alcançando uma redução de 60% quando comparado ao grupo DIOG. Os tratamentos com bixina (DB) ou licopeno (DL) também reduziram a glicosúria após 50 dias de tratamento, quando comparados aos animais DIOG. O grupo DCB não apresentou melhoras na glicosúria, apresentando níveis próximos ao

grupo DIOG após 50 dias de tratamento. Já o grupo DCL, tal como os tratamentos isolados (DC e DL), conseguiram reduzir os níveis de glicose urinária, em relação ao grupo DIOG.

Tabela 4: Glicosúria (mg/24h) e uréia urinária (mg/24h) de animais normais, diabéticos não tratados e tratados com curcumina e/ou bixina, e/ou licopeno, incorporados em iogurte, durante 50 dias.

Grupos	Glicosúria (mg/24h)		Ureia urinária (mg/24h)	
	Dia 0	Dia 50	Dia 0	Dia 50
NIOG	----	----	325,21 ± 18,91	422,82 ± 36,66 (#)
DIOG	25,41 ± 2,96	64,23 ± 4,50 (#)	489,53 ± 26,56 (a)	1040,43 ± 107,87 (a,#)
DINS	21,80 ± 4,11	2,61 ± 0,60 (b,#)	448,07 ± 42,45 (a)	514,71 ± 27,45 (b)
DC	23,99 ± 2,00	25,76 ± 9,91 (b,c)	489,12 ± 20,94 (a)	684,47 ± 82,46 (b)
DB	26,96 ± 4,21	35,55 ± 9,95 (b,c)	475,74 ± 49,59 (a)	968,45 ± 85,12 (a,c,d,#)
DCB	25,14 ± 7,10	59,30 ± 7,70 (c,d)	452,82 ± 51,61 (a)	1046,46 ± 95,64 (a,c,d,#)
DL	23,33 ± 3,58	39,37 ± 3,10 (b,c,#)	458,94 ± 52,36 (a)	909,74 ± 45,19 (a,c,#)
DCL	24,30 ± 2,99	44,69 ± 7,70 (b,c)	481,04 ± 47,24 (a)	932,31 ± 76,70 (a,c,#)

As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com NIOG; b, diferenças com DIOG; c, diferenças com DINS; d, diferenças com DC; e, diferenças com DB; f, diferenças com DCB; g, diferenças com DL; h, diferenças com DCL; #, diferenças com o dia 0.

Os animais diabéticos sem tratamento (DIOG) apresentaram um aumento significativo na concentração de ureia urinária após 50 dias de experimento, evidenciando uma piora do estado diabético destes animais. O aumento na concentração de ureia na urina pode ser correlacionado a alterações no catabolismo proteico: a ureia é o produto nitrogenado final da degradação de aminoácidos, que são utilizados como substrato pelo processo de gliconeogênese (produção hepática de glicose); uma vez que ambos os processos gliconeogênese e proteólise muscular são inibidas pela insulina, nos ratos diabéticos tais processos estão ativos. Desta maneira, com a progressão do diabetes, a concentração de ureia urinária será maior, associada ao aumento progressivo nos níveis glicêmicos (Figura 5) e ao menor peso dos músculos esqueléticos de ratos diabéticos DIOG (Tabela 3).

O tratamento de ratos diabéticos com insulina promoveu redução de 128% nos níveis de ureia urinária em relação do grupo DIOG, após 50 dias de tratamento. Os animais que receberam curcumina (DC) também apresentaram redução (34%) nas concentrações de ureia urinária, quando comparados ao grupo DIOG. Os animais diabéticos tratados com bixina (DB), licopeno (DL) ou com as misturas (DCB e DCL) apresentaram valores aumentados na

concentração de ureia urinária, após 50 dias de tratamento; porém, quando comparados ao grupo DIOG, observou-se uma tendência de redução nas concentrações de ureia urinária (Tabela 3).

Devido ao fato de os animais estarem jejuados, existiram interferências na determinação de proteinúria em todos os grupos experimentais; o jejum fez com que os animais apresentassem uma redução na ingestão hídrica, e conseqüentemente uma redução no volume urinário, fazendo com que a presença de ração na urina causasse uma interferência mais evidente, alterando assim os níveis de proteína na urina

A atividade antidiabética da curcumina e os mecanismos envolvidos nesta atividade têm sido descritos (GUTIERRES et al., 2012; ZHANG et al., 2013; ARCARO et al., 2014). A estimulação da liberação de insulina pelas células β pancreáticas (BEST; ELLIOTT; BROWN, 2007), poderia explicar alguns benefícios observados em ratos diabéticos tratados com curcumina incorporada em iogurte, tais como a redução na glicemia (Figura 5) e manutenção da glicosúria (Tabela 4), o aumento no ganho de peso corporal (Figura 4) e de massa muscular e adiposa (Tabela 3) e redução no consumo de ração (Tabela 2), quando comparados aos ratos diabéticos tratados somente com iogurte (DIOG). Recentemente, Gutierrez et al. (2015) também demonstraram que o tratamento de ratos diabéticos com iogurte enriquecido com curcumina melhorou a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina, os quais foram associados ao aumento nos níveis de fosforilação de AKT e translocação de GLUT4 nos músculos esqueléticos *gastrocnemius*, e conseqüentemente aumento da captação de glicose. Inibição da gliconeogênese hepática também tem sido associada à curcumina (NA et al., 2011). Tanto o aumento na captação de glicose na musculatura esquelética quanto a inibição na neoglicogênese hepática podem estar relacionados com a capacidade da curcumina em ativar a proteína quinase dependente de AMP (AMPK) (FUJIWARA et al., 2008; NA et al., 2011). Assim, estes achados explicam, pelo menos em parte, o efeito anti-hiperglicêmico da curcumina incorporada ao iogurte.

O tratamento de ratos diabéticos com 5,5 mg/kg de bixina em iogurte reduziu os níveis glicêmicos, em relação aos animais diabéticos tratados apenas com iogurte (DIOG) (Figura 5). O efeito anti-hiperglicêmico da bixina pode ser explicado pela ativação dos receptores de PPAR- γ (*peroxisome proliferator-activated receptor- γ*) pela bixina (TAKAHASHI et al., 2009); tem sido demonstrado que agonistas deste receptor, como por exemplo fármacos antidiabéticos da classe das tiazolidinedionas (TZD), são capazes de estimularem a

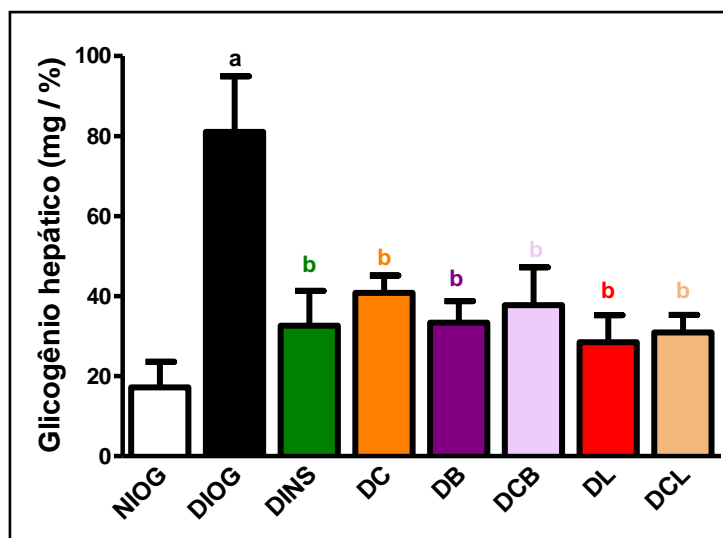
diferenciação de adipócitos, conduzindo a um aumento no número de adipócitos sensíveis a insulina (TAKAHASHI et al., 2009).

O tratamento de ratos diabéticos com 45 mg/kg de licopeno em iogurte reduziu os níveis glicêmicos (Figura 5), corroborando com os achados de Bayramoglu; Bayramoglu; Senturk (2013), onde ratos diabéticos tratados com 2,5 mg/kg de licopeno em azeite de oliva apresentaram redução na glicemia e aumento na concentração de insulina plasmática; os autores sugerem que o efeito anti-hiperglicêmico do licopeno pode ser explicado pelo aumento na secreção de insulina.

Na Figura 6 estão apresentados os valores de glicogênio hepático de animais normais e animais diabéticos não tratados e tratados com curcumina, bixina ou licopeno, isolados ou em misturas. Após 50 dias de tratamento, observou-se um aumento significativo no conteúdo de glicogênio hepático de ratos DIOG jejuados em comparação aos valores encontrados em ratos NIOG também jejuados. Os animais diabéticos e jejuados dos grupos DC, DB, DL, DCB e DCL tiveram redução no conteúdo de glicogênio hepático em relação aos animais DIOG, apresentando valores próximos aos encontrados em ratos DINS e ratos NIOG. Estes resultados também não estão de acordo com achados anteriores do laboratório de Gutierrez et al. (2012), onde foi observado que o tratamento de ratos diabéticos com curcumina em iogurte aumentou o glicogênio hepático em comparação aos ratos diabéticos tratados somente com iogurte. Entretanto, no presente estudo, o conteúdo de glicogênio foi avaliado em amostras de fígado obtidas de animais jejuados, diferentemente do que foi estudado por Gutierrez et al. (2012), que utilizaram amostras de fígado de animais alimentados.

Considerando o que já é conhecido em relação aos efeitos da insulina na preservação dos estoques de glicogênio hepático, foi inesperado o encontro de diminuição no conteúdo de glicogênio em fígado de animais diabéticos tratados com insulina, no entanto nossos resultados são apoiados pela literatura. Oliveira et al. (2007) investigaram o conteúdo de glicogênio em fígado de ratos diabéticos (estreptozotocínico) após 24 horas de jejum. Após este período de jejum, o conteúdo de glicogênio hepático de ratos diabéticos foi significativamente maior quando comparados aos valores em ratos normais e jejuados. A combinação entre o aumento na velocidade da gliconeogênese hepática em ratos diabéticos (AKIMOTO et al., 2000) e o aumento na atividade da glicogênio sintase em fígado de ratos diabéticos jejuados (GANNON; NUTTALL, 1997) pode explicar, pelo menos em parte, os valores elevados de glicogênio no fígado destes animais.

Figura 6: Glicogênio hepático (mg/%) de ratos normais e ratos diabéticos jejuados tratados por 50 dias com curcumina e/ou bixina, e/ou licopeno, em iogurte.



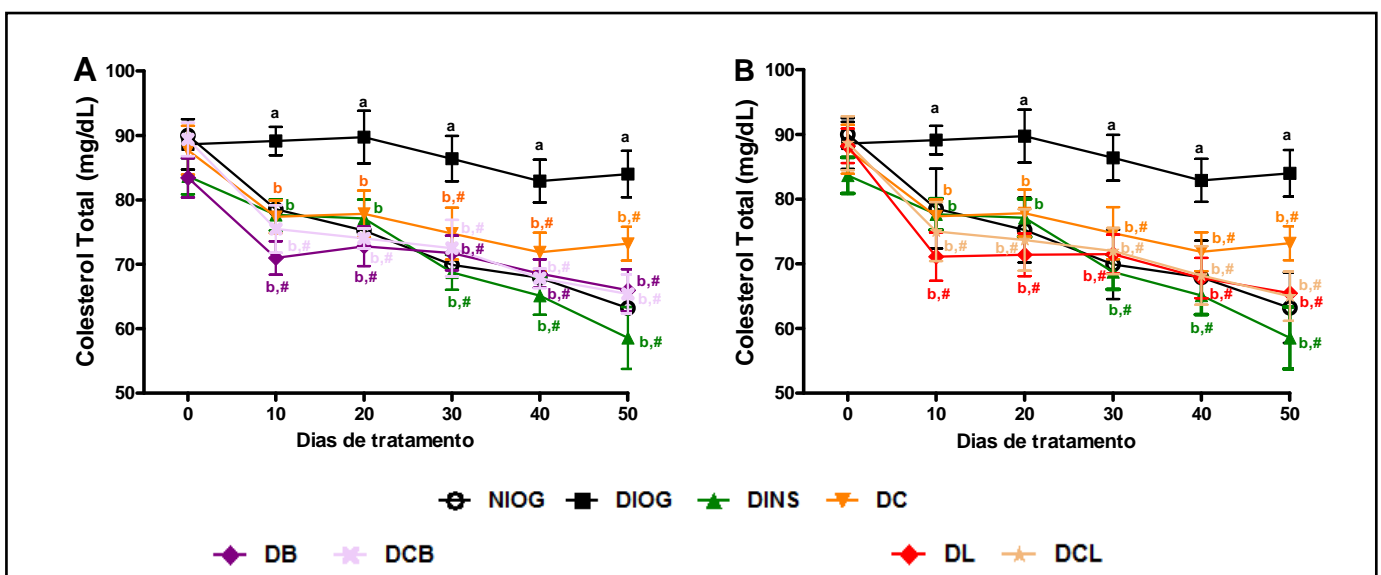
Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com o NIOG; b, diferenças com o DIOG; c, diferenças com DINS; d, diferenças com DC; e, diferenças com DB; f, diferenças com DCB; g, diferenças com DL; h, diferenças com DCL.

Nas Figuras 7A e B estão apresentados os níveis plasmáticos de colesterol total de animais normais e diabéticos não tratados e tratados com os ativos naturais isolados ou em misturas, no iogurte, durante 50 dias. Animais normais tratados com iogurte (NIOG) apresentaram níveis de colesterol dentro da normalidade. Animais DIOG apresentaram níveis elevados de colesterol no decorrer de todo período experimental. O tratamento com insulina (DINS) foi eficiente na redução da concentração de colesterol durante todo o experimento, quando comparado ao grupo DIOG. O grupo DC apresentou, no 10º dia de tratamento, 13% de redução nos níveis de colesterol quando comparado ao grupo DIOG, e assim se manteve durante todo o período experimental. A partir do 10º dia de experimento, os tratamentos com bixina (DB) e licopeno (DL), reduziram de maneira acentuada (23% e 20%, respectivamente) os níveis de colesterol, quando comparados ao grupo DIOG. Os níveis de colesterol foram significativamente diminuídos nas co-administrações (DCB e DCL), acompanhando o perfil de resposta dos tratamentos isolados (DC, DB e DL).

Na Figura 8 estão apresentados os níveis plasmáticos de colesterol-HDL de animais normais e diabéticos não tratados e tratados com curcumina, bixina ou licopeno, isolados ou em misturas, após 50 dias. Animais normais (NIOG) apresentaram níveis de HDL dentro da normalidade. Após 50 dias de experimento, os níveis HDL encontraram-se diminuídos nos animais diabéticos que receberam somente iogurte (DIOG), e o mesmo ocorreu com os

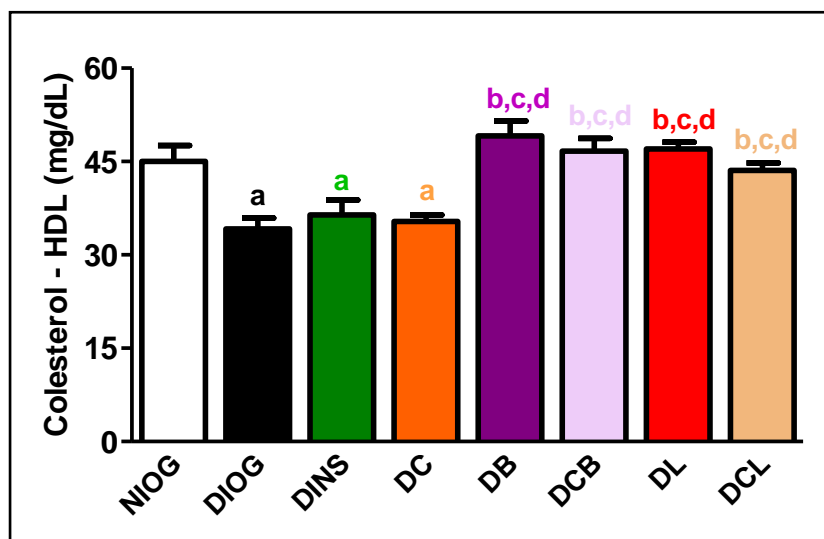
animais diabéticos que foram tratados com insulina (DINS) ou com curcumina em iogurte (DC). Os tratamentos de animais diabéticos por 50 dias com iogurte enriquecido com licopeno (DL) ou bixina (DB) aumentaram os níveis de HDL em 33% e 39%, respectivamente, quando comparados ao grupo DIOG. Os tratamentos combinados de curcumina e os carotenoides (DCB e DCL) mantiveram os mesmos efeitos benéficos dos carotenoides isolados na promoção de aumento nos níveis de HDL. A capacidade de aumentar os níveis de HDL em ratos diabéticos reitera os possíveis benefícios de uma terapia com misturas de antioxidantes naturais para combater os distúrbios do DM.

Figura 7: Colesterol total (mg/dL) de ratos normais e ratos diabéticos tratados por 50 dias com curcumina e/ou bixina, e/ou licopeno, em iogurte.



(A) curcumina e/ou bixina (B) curcumina e/ou licopeno. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com o NIOG; b, diferenças com o DIOG; c, diferenças com DINS; d, diferenças com DC; e, diferenças com DB; f, diferenças com DCB; g, diferenças com DL; h, diferenças com DCL. #, diferenças com o dia 0.

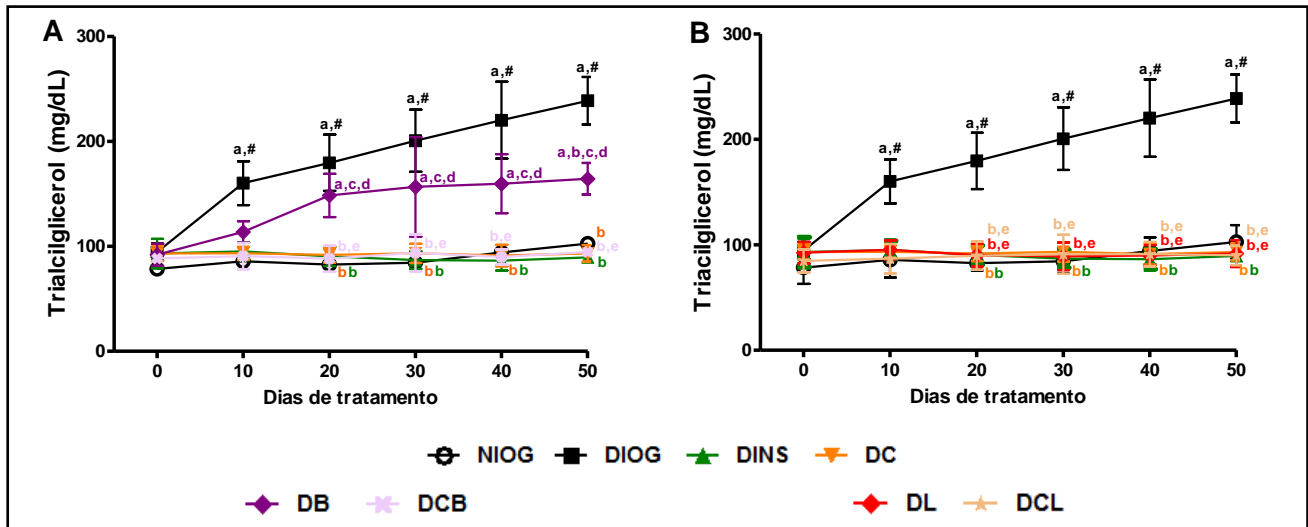
Figura 8: Colesterol-HDL (mg/dL) de ratos normais e ratos diabéticos tratados por 50 dias com curcumina e/ou bixina, e/ou licopeno, em iogurte.



Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com o NIOG; b, diferenças com o DIOG; c, diferenças com DINS; d, diferenças com DC; e, diferenças com DB; f, diferenças com DCB; g, diferenças com DL; h, diferenças com DCL.

Nas Figuras 9A e B estão apresentados os níveis plasmáticos de triacilgliceróis (TAG) de animais normais e diabéticos não tratados e tratados com os ativos naturais em iogurte, isolados ou em misturas, durante 50 dias. O grupo DIOG apresentou um aumento progressivo nas concentrações de TAG, em relação ao grupo NIOG. O tratamento com insulina foi capaz de prevenir o aumento nos níveis de TAG de ratos diabéticos. O grupo DC apresentou um comportamento semelhante ao grupo DINS, com prevenção na elevação das concentrações de TAG. O tratamento com licopeno (DL) também preveniu o aumento nos níveis de TAG, (Figura 9B). O tratamento com bixina (DB) foi capaz de promover uma redução significativa nos níveis de TAG, entretanto com menor magnitude em comparação ao grupo DL, apresentando diferença significativa em relação do DIOG somente a partir do 40º dia de tratamento (Figura 9A). As misturas curcumina + bixina (DCB) e curcumina + licopeno (DCL) também preveniram o aumento nos níveis de TAG, preservando assim o mesmo efeito benéfico observado nos tratamentos isolados (especialmente DC e DL), em comparação ao grupo DIOG.

Figura 9: Triacilglicerol plasmático (mg/dL) de ratos normais e ratos diabéticos tratados por 50 dias com curcumina e/ou bixina, e/ou licopeno, em iogurte.



(A) curcumina e/ou bixina (B) curcumina e/ou licopeno. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com o NIOG; b, diferenças com o DIOG; c, diferenças com DINS; d, diferenças com DC; e, diferenças com DB; f, diferenças com DCB; g, diferenças com DL; h, diferenças com DCL. #, diferenças com o dia 0.

Condições de deficiência na secreção de insulina e/ou estados hiperglicêmicos crônicos podem culminar em dislipidemia em indivíduos com DM tipo 1 ou tipo 2, caracterizada pelo aumento nos níveis plasmáticos de TAG, colesterol total, colesterol-LDL e baixa concentração plasmática do colesterol-HDL, os quais, juntamente com a hiperglicemia, desempenham um papel importante no desenvolvimento de doenças vasculares oclusivas, predispondo assim os indivíduos diabéticos a um maior risco para aterosclerose, uma das principais complicações a longo prazo do DM (GOLDBERG, 2001; JENKINS et al., 2003; CERIELLO, 2005).

O tratamento com curcumina incorporada em iogurte reduziu os níveis plasmáticos de colesterol e TAG de ratos diabéticos, alcançando concentrações próximas aos animais diabéticos tratados com insulina (Figura 7 e 9, respectivamente). Ejaz et al. (2009) demonstrou que a curcumina promove ativação de AMPK, a qual participa do efeito hipolipidêmico da curcumina, estimulando a oxidação de ácidos graxos (aumentando a expressão de carnitina palmitoil transferase-1) e inibindo a lipogênese (diminuindo a expressão de glicerol-3-fosfato-aciltransferase-1), no tecido adiposo de camundongos obesos alimentados com dieta rica em gordura e suplementada com curcumina; foi também observada

uma tendência de diminuição nos níveis de TAG plasmático. Esses dados corroboram os nossos resultados relacionados à redução na dislipidemia de ratos diabéticos tratados com curcumina incorporada em iogurte (Figura 7 e 9).

Poucos estudos têm sido realizados sobre os efeitos da bixina nos sintomas do DM, entretanto os achados são promissores. O tratamento de ratos diabéticos com bixina incorporada ao iogurte promoveu redução significativa nos níveis plasmáticos de colesterol quando comparado aos ratos tratados somente com iogurte (DIOG) (Figura 7A). Esse efeito benéfico da bixina no metabolismo lipídico pode ser explicado pela ativação de receptor PPAR- α , o qual aumenta a expressão de genes envolvidos na captação e oxidação de ácidos graxos no fígado (TAKAHASHI et al., 2009; ROEHRS et al., 2014). O receptor PPAR- α é expresso principalmente em tecidos com elevada capacidade de oxidação de ácidos graxos e metabolismo peroxissomal, e é ativado por vários compostos isoprenoides, tal como a bixina (GOTO et al., 2010). Em estudo realizado por Roehrs et al. (2014), observou-se que o tratamento de ratos diabéticos durante 30 dias com 10 e 100 mg/kg de bixina promoveu redução nos níveis plasmáticos de glicose, TAG e colesterol. Os nossos achados estão de acordo com o estudo realizado por Roehrs et al. (2014), uma vez que ratos diabéticos tratados com iogurte enriquecido com bixina apresentaram baixos níveis plasmáticos de glicose (Figura 5) e TAG (Figura 9). A redução no colesterol plasmático promovida pela bixina (Figura 7) foi similar ao efeito do licopeno.

De Paula et al. (2009) utilizaram um modelo de ratos com hipercolesterolemia (dieta rica em lipídeos) e que receberam tratamento com extrato aquoso de urucum, os autores observaram redução no colesterol total e colesterol-LDL. Estes dados corroboram os achados de nosso estudo, uma vez que também observamos a redução nos níveis plasmáticos de colesterol em animais diabéticos tratados com bixina (Figura 7).

Têm sido encontradas evidências em relação ao efeito antihipercolesterolêmico do licopeno. De acordo com Palozza e colaboradores (2012), vários mecanismos explicam os efeitos benéficos do licopeno sobre o metabolismo do colesterol: inibição na expressão e atividade da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima-A redutase (HMG-CoA redutase, enzima limitante na via de síntese do colesterol); inibição na síntese do receptor de LDL (protegendo as células do acúmulo excessivo de colesterol); inibição na atividade da acil-coenzima A : colesterol aciltransferase (ACAT, prevenindo o acúmulo de éster de colesterol nas células); aumento na expressão de *ATP-binding cassette transporter A1* (ABCA1, aumentando o efluxo

de colesterol); aumento nos níveis circulantes da lipoproteína HDL, que tem potencial antiaterogênico.

Os resultados deste estudo também corroboram os dados já relatados na literatura, onde o tratamento de animais diabéticos com licopeno promoveu redução nos níveis plasmáticos de colesterol total, colesterol-LDL e TAG, quando comparado aos animais sem tratamento (ALI; AGHA, 2009; PALOZZA et al., 2012).

Na Tabela 5 estão apresentadas as atividades plasmáticas das enzimas hepáticas de animais normais e diabéticos não tratados e tratados com curcumina, bixina ou licopeno, isolados ou em misturas, em iogurte, após 50 dias. Animais diabéticos não tratados (DIOG) apresentaram aumento significativo nas atividades de ALT, AST e ALP no final dos 50 dias de experimento. Animais diabéticos tratados com insulina (DINS) apresentaram níveis plasmáticos diminuídos das enzimas supracitadas, após 50 dias de tratamento, quando comparados com o grupo DIOG, corroborando dados prévios do laboratório (MORI et al., 2003; ARCARO et al., 2014).

O tratamento com curcumina (DC) foi capaz de manter os níveis de ALT, AST e ALP inalterados desde o tempo 0 até o 50º dia de tratamento, com redução significativa em relação ao grupo DIOG, tal como anteriormente observado por Arcaro et al. (2014).

O tratamento de ratos diabéticos com iogurte enriquecido com bixina (DB) não promoveu benefícios nos níveis plasmáticos da ALT, cujos níveis foram semelhantes ao grupo DIOG no final do experimento; os níveis AST se mantiveram inalterados em ratos DB desde o tempo 0 até o 50º dia de tratamento, porém no final do experimento observa-se melhoria significativa em relação ao grupo DIOG; os níveis plasmáticos de ALP foram discretamente aumentados em ratos DB em relação ao início do tratamento, mas apresentaram queda significativa em relação ao grupo DIOG, no final do tratamento.

O tratamento com licopeno (DL) por 50 dias foi capaz de promover uma redução significativa nos níveis plasmáticos de ALT, AST e ALP, quando comparados aos valores encontrados em animais diabéticos sem tratamento (DIOG).

Animais diabéticos tratados com curcumina + bixina (DCB) não apresentaram alterações nos níveis plasmáticos de ALT e ALP, no entanto apresentaram redução significativa nos níveis de AST quando comparados ao grupo DIOG. Animais diabéticos tratados com curcumina + licopeno (DCL) tiveram níveis plasmáticos de ALT aumentados após 50 dias, não apresentando diferença significativa quando comparados ao DIOG; os

níveis de AST foram reduzidos em relação ao grupo DIOG, no final do experimento; e os níveis plasmáticos de ALP não foram diferentes quando comparados ao grupo DIOG.

Tabela 5: Atividades das enzimas ALT, AST e ALP (U/L) em plasma de animais normais, diabéticos não tratados e tratados com curcumina e/ou bixina, e/ou licopeno, incorporados em iogurte, durante 50 dias.

Grupos	ALT (U/L)		AST (U/L)		ALP (U/L)	
	Dia 0	Dia 50	Dia 0	Dia 50	Dia 0	Dia 50
NIOG	69,88 ± 7,01	60,33 ± 7,58	150,57 ± 5,42	136,54 ± 9,13	300,17 ± 47,78	209,17 ± 36,46
DIOG	90,20 ± 4,98	194,54 ± 17,66 (a,#)	161,55 ± 8,22	255,69 ± 17,70 (a,#)	471,00 ± 32,03	1133,29 ± 98,69 (a,#)
DINS	92,75 ± 8,78	71,00 ± 4,23 (b,#)	177,88 ± 8,34	142,70 ± 6,71(b,#)	473,50 ± 46,42	212, 13 ± 23,81 (b,#)
DC	91,11 ± 4,19	115,14 ± 18,57 (b)	166,78 ± 8,64	168,38 ± 10,02 (b)	494,90 ± 41,87	475,60 ± 102,92 (b)
DB	93,88 ± 7,02	158,60 ± 23,55 (a,c)	181,88 ± 15,57	199,00 ± 9,89 (a,b)	480,00 ± 86,79	546,80 ± 161,14 (a,b,c)
DCB	93,00 ± 3,24	140,50 ± 12,95	167,43 ± 6,40	175,67 ± 9,84 (b)	478,17 ± 63,12	824,60 ± 113,26 (a,c,#)
DL	89,13 ± 8,47	123,00 ± 20,96 (b)	181,14 ± 17,31	175,00 ± 10,19 (b)	472,44 ± 44,43	630,33 ± 93,77 (b,#)
DCL	89,38 ± 3,08	163,00 ± 6,14 (a,c,#)	169,71 ± 10,97	202,40 ± 2,38 (a,b)	471,50 ± 32,31	801,60 ± 86,19 (a,c,#)

Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com o NIOG; b, diferenças com o DIOG; c, diferenças com DINS; d, diferenças com DC; e, diferenças com DB; f, diferenças com DCB; g, diferenças com DL; h, diferenças com DCL.

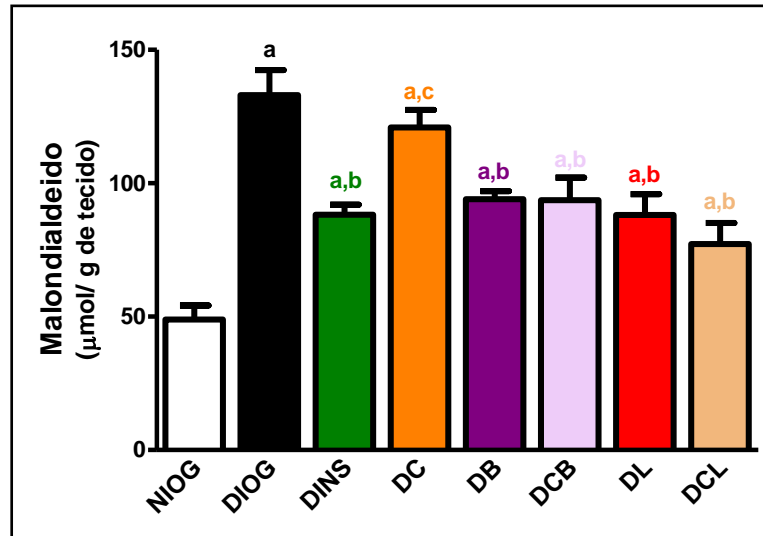
4.1.3 Biomarcadores relacionados ao estresse oxidativo e atividade antioxidante de ratos diabéticos tratados com curcumina e/ou bixina e/ou licopeno

Nas Figuras 10 e 11 estão apresentadas as concentrações de MDA no fígado e no plasma, respectivamente, de animais normais e animais diabéticos após 50 dias de tratamento com os ativos naturais isolados ou em misturas. O grupo DIOG apresentou concentrações elevadas de MDA, tanto no fígado quanto no plasma, quando comparado ao grupo NIOG, o que reflete o desenvolvimento de estresse oxidativo em animais diabéticos. O grupo DINS apresentou valores reduzidos de MDA no plasma e no fígado, em relação ao DIOG, demonstrando que o tratamento com insulina foi capaz de prevenir a peroxidação lipídica (LPO) nestes animais.

Os animais diabéticos tratados com curcumina (DC) não apresentaram redução nos níveis de MDA no fígado. Já os animais tratados com bixina (DB) ou licopeno (DL) apresentaram redução significativa nos níveis de MDA hepático, de 29% e 34%, respectivamente, quando comparados ao grupo DIOG, alcançando valores próximos aos animais DINS. Os tratamentos com curcumina + carotenoides (DCB ou DCL) também reduziram os níveis de MDA hepático, em 29% e 42%, respectivamente, quando comparados ao DIOG, apresentando valores próximos aos tratamentos isolados (DB e DL) (Figura 10).

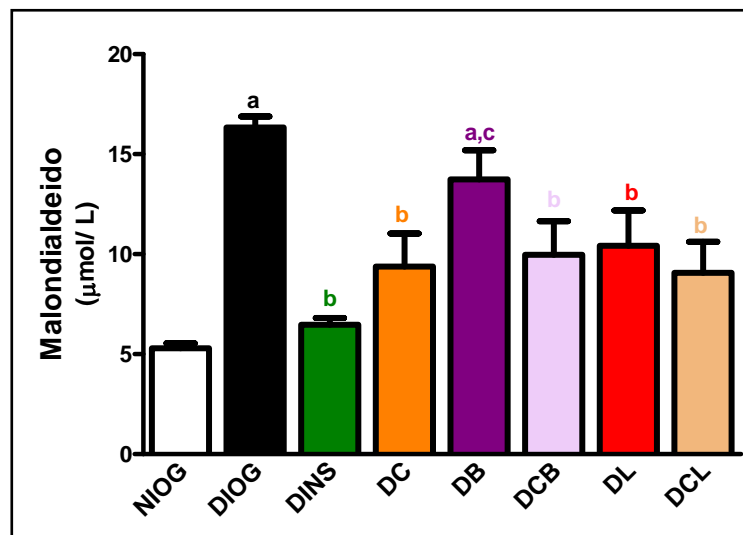
O grupo DC apresentou diminuição significativa (43%) nos níveis de MDA no plasma, em relação ao DIOG. O tratamento com a bixina (DB) não foi capaz de reduzir os níveis de MDA plasmático. Já o tratamento com o licopeno (DL) reduziu 36% os níveis de MDA plasmático, quando comparados ao grupo DIOG. Quando os carotenoides foram associados à curcumina (DCB e DCL), observou-se redução de 39% e 44%, respectivamente, nos níveis plasmáticos de MDA, em relação do grupo DIOG (Figura 11), alcançando valores próximos aos grupos DC e DL.

Figura 10: Concentração de MDA ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) no fígado de ratos normais e ratos diabéticos tratados por 50 dias com curcumina e/ou bixina, e/ou licopeno, em iogurte.



Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com o NIOG; b, diferenças com o DIOG; c, diferenças com DINS; d, diferenças com DC; e, diferenças com DB; f, diferenças com DCB; g, diferenças com DL; h, diferenças com DCL.

Figura 11: Concentração de MDA (μmol) no plasma de ratos normais e ratos diabéticos tratados por 50 dias com curcumina e/ou bixina, e/ou licopeno, em iogurte.

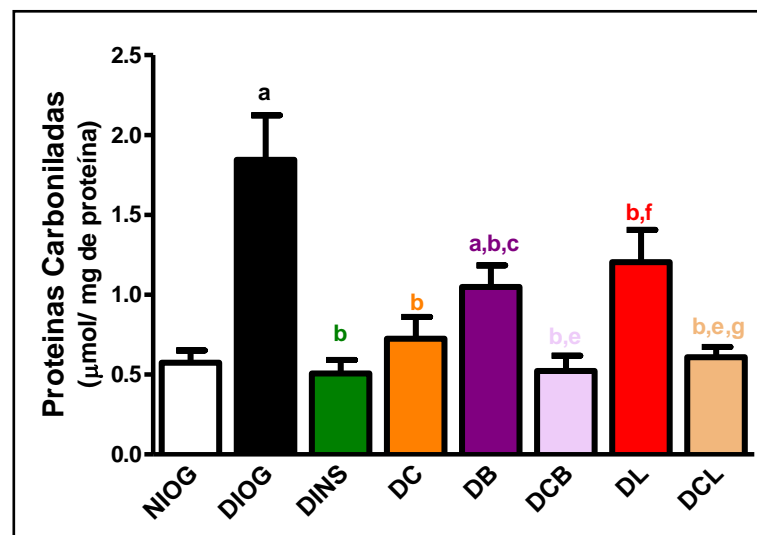


Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com o NIOG; b, diferenças com o DIOG; c, diferenças com DINS; d, diferenças com DC; e, diferenças com DB; f, diferenças com DCB; g, diferenças com DL; h, diferenças com DCL.

Carotenoides polares (tais como a bixina) têm velocidade de depuração plasmática rápida (ETOH et al, 2000); portanto, se a bixina tem uma menor meia-vida plasmática, esta pode ser a razão pela qual os níveis de MDA não foram diminuídos no plasma de ratos diabéticos tratados com bixina (Figura 11), em comparação ao efeito protetor antioxidante promovido pelo licopeno no plasma de ratos diabéticos.

Os níveis de PCO no fígado de animais normais e diabéticos após 50 dias de tratamento encontram-se na Figura 12. Os níveis de PCO em animais DIOG apresentaram-se elevados quando comparados aos valores em animais NIOG, o que indica que, além da LPO, a oxidação de proteínas também reitera a instalação do estresse oxidativo neste modelo experimental de DM. O tratamento com insulina (DINS) foi capaz de reduzir em 72% os níveis hepáticos de PCO em relação ao grupo DIOG. Os animais diabéticos tratados com curcumina (DC), bixina (DB) e licopeno (DL) também apresentaram redução nos níveis de PCO, de 61%, 43% e 35%, respectivamente, em relação ao grupo DIOG. Os tratamentos com as misturas dos ativos naturais (DCB e DCL) promoveram redução adicional nos níveis de PCO, em comparação aos tratamentos com os carotenoides isolados (DB e DL), observando-se assim um efeito combinado que mantém o benefício da curcumina na redução da oxidação de proteínas no DM.

Figura 12: Concentração de PCO ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) no fígado de ratos normais e ratos diabéticos tratados por 50 dias com curcumina e/ou bixina, e/ou licopeno, em iogurte.

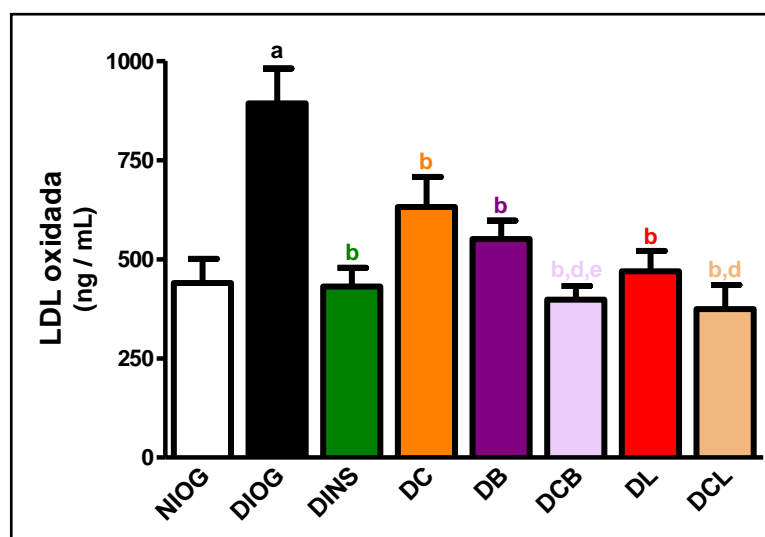


Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com o NIOG; b, diferenças com o DIOG; c, diferenças com DINS; d, diferenças com DC; e, diferenças com DB; f, diferenças com DCB; g, diferenças com DL; h, diferenças com DCL.

Na Figura 13 estão apresentadas as concentrações de LDL-oxidada no plasma de ratos normais e diabéticos após 50 dias de tratamento com os antioxidantes naturais em iogurte. Animais do grupo DIOG apresentaram um aumento significativo (103%) nos níveis de LDL-oxidada quando comparados ao grupo NIOG. O tratamento com insulina foi capaz de prevenir completamente o aumento nos níveis de LDL-oxidada em animais diabéticos.

Os animais diabéticos tratados com curcumina (DC), bixina (DB) ou licopeno (DL) apresentaram níveis de LDL-oxidada significativamente menores em 32%, 38% e 48%, respectivamente, quando comparados aos animais DIOG. Os tratamentos com as misturas (DCB e DCL) promoveram efeitos combinados, com redução adicional nos níveis de LDL-oxidada quando comparados aos valores em animais DC e DB (Figura 13).

Figura 13: Concentração de LDL oxidada (ng/mL) no plasma de ratos normais e ratos diabéticos tratados por 50 dias com curcumina e/ou bixina, e/ou licopeno, em iogurte.

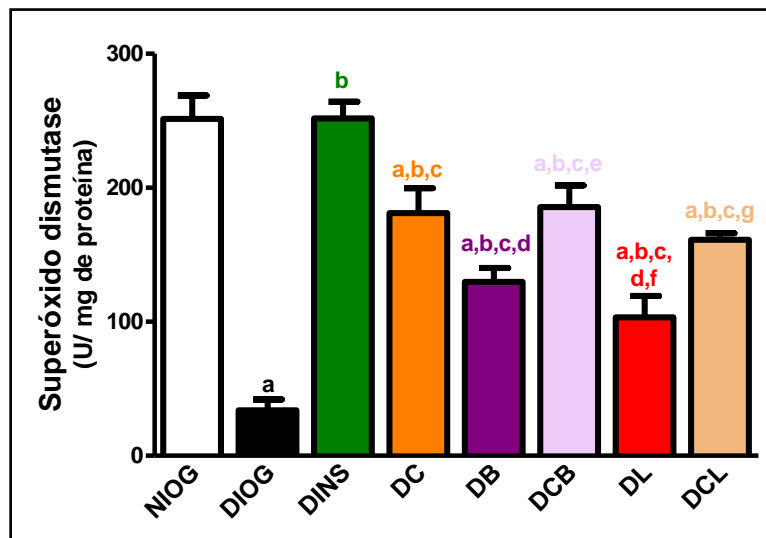


Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com o NIOG; b, diferenças com o DIOG; c, diferenças com DINS; d, diferenças com DC; e, diferenças com DB; f, diferenças com DCB; g, diferenças com DL; h, diferenças com DCL.

A combinação entre a capacidade antioxidante do licopeno e os níveis reduzidos de colesterol pode explicar a redução observada nos níveis de LDL-oxidada (Fig. 13). Os níveis de HDL também aumentaram após o tratamento com licopeno (Fig. 8). A redução dos níveis de LDL oxidada (Figura 13) e aumento dos níveis de HDL (Figura 8) após o tratamento de ratos diabéticos com iogurte enriquecido com bixina foram similares aos efeitos do tratamento com licopeno.

Na Figura 14 estão apresentados os valores de atividade da SOD no fígado de animais normais e diabéticos após 50 dias de tratamento com os ativos naturais isolados ou em misturas, em iogurte. O grupo DIOG apresentou uma redução de aproximadamente 9 vezes na atividade da SOD em relação ao grupo NIOG, o que representa queda significativa na proteção antioxidante no DM. Animais diabéticos tratados com insulina (DINS) apresentaram um aumento de aproximadamente 6 vezes na atividade da SOD quando comparados aos animais do grupo DIOG, alcançando valores semelhantes ao NIOG. O tratamento de ratos diabéticos com curcumina em iogurte (DC) promoveu um aumento de aproximadamente 5 vezes na atividade da SOD quando comparado ao grupo DIOG. Os grupos DB e DL também apresentaram aumento (aproximadamente 3 e 2 vezes, respectivamente), na atividade da SOD, em relação ao grupo DIOG. A co-administração de curcumina com os carotenoides promoveu efeitos combinados no aumento da atividade da SOD, ou seja, animais DCB apresentaram um aumento de 43% na atividade da SOD em relação ao DB, e animais DCL apresentaram um aumento de 48% na atividade da SOD em relação ao DL. Sendo assim, os tratamentos combinados curcumina + bixina e curcumina + licopeno mantiveram os mesmos benefícios do tratamento com curcumina no aumento da atividade de SOD (Figura 14).

Figura 14: Atividade da SOD (U/mg de proteína) no fígado de ratos normais e ratos diabéticos tratados por 50 dias com curcumina e/ou bixina, e/ou licopeno, em iogurte.



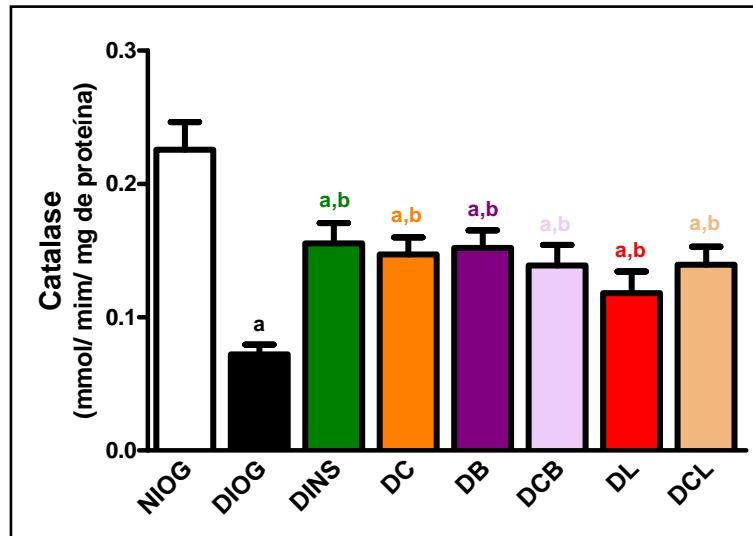
Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com o NIOG; b, diferenças com o DIOG; c, diferenças com DINS; d, diferenças com DC; e, diferenças com DB; f, diferenças com DCB; g, diferenças com DL; h, diferenças com DCL.

Os valores de atividade de CAT no fígado de animais normais e diabéticos após 50 dias de tratamento com os antioxidantes naturais estão apresentados na Figura 15. Houve uma redução significativa de 214% na atividade da CAT em fígado de animais DIOG quando comparado ao grupo NIOG. Já o grupo DINS apresentou aumento de 116% na atividade da CAT quando comparado ao grupo DIOG. Os tratamentos com curcumina (DC), bixina (DB) e licopeno (DL), isoladamente, aumentaram a atividade da CAT em 104%, 11% e 66%, respectivamente, em relação ao grupo DIOG. Os tratamentos com as misturas curcumina + bixina ou curcumina + licopeno promoveram aumentos significativos na atividade da CAT em 93% e 94%, respectivamente, em relação ao grupo DIOG, apresentando valores muito próximos aos grupos DINS, DC, DB ou DL.

Na Figura 16 estão apresentados os valores de atividade da GSH-Px no fígado de animais normais e diabéticos após 50 dias de tratamento. A atividade da GSH-Px em animais diabéticos DIOG apresentou-se 147% reduzida em relação ao grupo NIOG. O tratamento de ratos diabéticos com insulina (DINS) preveniu a queda na atividade da GSH-Px, que se apresentou semelhante ao grupo NIOG. Os animais diabéticos tratados com curcumina (DC) apresentaram aumento de 64% na atividade da GSH-Px quando comparados ao grupo DIOG. Os demais tratamentos (DB, DL, DCB e DCL) não promoveram melhorias na atividade da GSH-Px, que permaneceu com valores semelhantes aos observados no grupo DIOG.

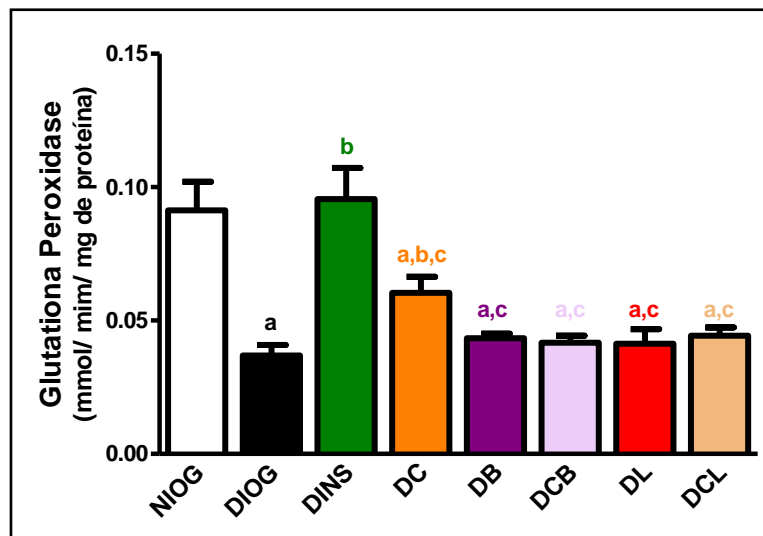
Na Figura 17 estão apresentados os resultados relacionados às alterações nas concentrações de GSH no fígado de animais normais e diabéticos após 50 dias de tratamento com curcumina, licopeno ou bixina, isolados ou co-administrados. O grupo DIOG apresentou diminuição de cerca de 160% na concentração de GSH, em comparação ao grupo NIOG. O grupo DINS apresentou valores de GSH maiores (148%) em relação ao grupo DIOG, alcançando valores semelhantes ao NIOG. Os tratamentos referentes aos grupos DC, DB, DL, DCB e DCL foram eficientes na promoção de aumento nos níveis de GSH em 117%, 80%, 77%, 68% e 134%, respectivamente, quando comparados ao grupo DIOG.

Figura 15: Atividade da CAT (mmol/min/mg de proteína) no fígado de ratos normais e ratos diabéticos tratados por 50 dias com curcumina e/ou bixina, e/ou licopeno, em iogurte.



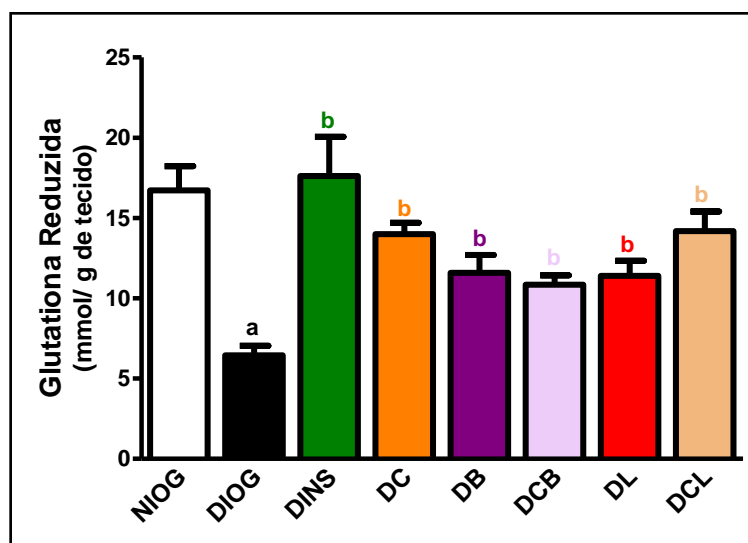
Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com o NIOG; b, diferenças com o DIOG; c, diferenças com DINS; d, diferenças com DC; e, diferenças com DB; f, diferenças com DCB; g, diferenças com DL; h, diferenças com DCL.

Figura 16: Atividade da GSH-Px (mmol/min/mg de proteína) no fígado de ratos normais e ratos diabéticos tratados por 50 dias com curcumina e/ou bixina, e/ou licopeno, em iogurte.



Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com o NIOG; b, diferenças com o DIOG; c, diferenças com DINS; d, diferenças com DC; e, diferenças com DB; f, diferenças com DCB; g, diferenças com DL; h, diferenças com DCL.

Figura 17: Concentração de GSH (mmol/g de tecido) no fígado de ratos normais e ratos diabéticos tratados por 50 dias com curcumina e/ou bixina, e/ou licopeno, em iogurte.



Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com o NIOG; b, diferenças com o DIOG; c, diferenças com DINS; d, diferenças com DC; e, diferenças com DB; f, diferenças com DCB; g, diferenças com DL; h, diferenças com DCL.

De acordo com os resultados apresentados, o estresse oxidativo em ratos diabéticos foi instalado, uma vez que houve elevação nos níveis de biomarcadores plasmáticos ou hepáticos de peroxidação lipídica (MDA), oxidação de proteínas (PCO) e oxidação de LDL (LDL-oxidada) (Figuras 10 a 13), bem como diminuição nas atividades das enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GSH-Px) e nos níveis de GSH (Figuras 14 a 17). Achados semelhantes foram previamente observados por Ali; Agha (2009), Arcaro et al. (2014) e Roehrs et al. (2014).

A hiperglicemia crônica no DM contribui para o estabelecimento do estresse oxidativo em muitos tecidos (fígado, rim, retina, nervos periféricos) devido a uma produção exacerbada de ERO, principalmente pela cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (BROWNLEE, 2005). Assim, o efeito anti-hiperglicêmico do iogurte enriquecido com curcumina pode explicar, pelo menos em parte, a redução nos níveis de biomarcadores de estresse oxidativo (MDA plasmático e PCO hepática, Figuras 11 e 12, respectivamente) e o aumento na atividade de enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-Px (Figuras 14 -16) e níveis de GSH (Figura 17) em ratos diabéticos. Contudo, a curcumina também tem a capacidade de sequestrar ERO (AK; GÜLÇİN, 2008; BARZEGAR; MOOSAVI-MOVAHEDI, 2011) e de

inibir LPO (MEGHANA; SANJEEV; RAMESH, 2007), que podem também corroborar com sua atividade antioxidante *in vivo*.

No entanto, é válido ressaltar que algumas respostas antioxidantes da curcumina não alcançaram os níveis das respostas relacionadas ao tratamento com insulina, tal como a redução nos níveis de MDA (fígado e plasma) e LDL-oxidada, bem como o aumento na atividade da SOD e GSH-Px. Assim, podemos inferir que ratos diabéticos tratados com curcumina incorporada em iogurte ainda estão sob condições de estresse oxidativo, sendo que a cronicidade desta condição pode permitir uma instalação progressiva de danos teciduais.

Estudos mostram a atividade antidiabética e antioxidante dos tratamentos isolados com licopeno ou bixina. Os efeitos benéficos do licopeno no DM têm sido atribuídos ao seu potencial antioxidante, melhorando a disfunção endotelial via redução do estresse oxidativo em aorta e também reduzindo os níveis de LDL-oxidada (ZHU; WANG; XU, 2011). O licopeno também desempenhou um papel importante na proteção contra a nefropatia diabética devido ao aumento na atividade da SOD e GSH-Px, diminuindo os níveis de MDA (GUO; LIU; WANG, 2015).

Em estudo realizado por Roehrs et al. (2014), os autores observaram que o tratamento de ratos diabéticos com bixina também promoveu aumento na atividade da SOD, no entanto não houve alterações nas atividades da CAT e GSH-Px. Em nosso estudo a bixina incorporada em iogurte também diminuiu os níveis hepáticos de MDA e PCO (Figura 10 e 12) e aumentou as atividades da SOD (Figura 14) e CAT (Figura 15) e os níveis de GSH (Figura 17). Todos estes achados acima descritos nos estimularam a estudar a combinação de curcumina com outros compostos naturais, em especial os carotenoides, e que podem contribuir com efeitos benéficos adicionais no tratamento do DM.

Os nossos resultados mostraram que os tratamentos com as misturas curcumina + licopeno ou curcumina + bixina não apresentaram efeito aditivo ou combinado na redução da glicemia ou da dislipidemia de ratos diabéticos. Contudo, efeitos combinados foram observados em biomarcadores de estresse oxidativo, principalmente nos níveis de LDL-oxidada (Figura 13), o qual é um importante fator de risco para doenças cardiovasculares. Foram também observados efeitos combinados na redução dos níveis de PCO (Figura 12) e no aumento na atividade da SOD (Figura 14). Além dos efeitos combinados no combate ao estresse oxidativo no DM, outro importante achado deste estudo foi a capacidade de agregar um novo benefício com esta terapia combinada de ativos naturais, o qual não foi previamente

observado no tratamento isolado com curcumina: as misturas de curcumina com licopeno ou bixina foram capazes de aumentar os níveis de HDL, sendo este um efeito benéfico atribuído aos carotenoides, e que foi mantido com as misturas (DCB e DCL).

Já é bem conhecido que os carotenoides são transportados na circulação principalmente em associação às lipoproteínas. Tem sido demonstrado que o licopeno e a bixina são transportados predominantemente em LDL e HDL (PARKER, 1996; PARK; MATHISON; CHEW, 2016). Os carotenoides apresentaram um papel importante na proteção de LDL contra a oxidação, em proporção distinta quando comparados aos efeitos da curcumina (Figura 13). Pode ser sugerido que a LDL é diretamente protegida contra danos oxidativos pela capacidade antioxidante dos carotenoides por ela transportados. Embora a redução da glicemia, após os tratamentos com os carotenoides isolados, não atingiu a mesma resposta da curcumina isolada (Figura 5), não pode ser descartada a possibilidade de os carotenóides protegerem a LDL contra oxidação devido ao seu potencial anti-hiperglicêmico. Já a curcumina parece prevenir a oxidação da LDL por um mecanismo não dependente de transporte de lipoproteína, uma vez que a curcumina é carregada na circulação pela albumina (KIM et al., 2012); sabe-se que a capacidade antioxidante da curcumina é preservada quando associada à albumina (YANG et al., 2013).

O efeito sinérgico do licopeno quando combinado com outros antioxidantes naturais na proteção contra a oxidação da LDL foi observado anteriormente, em um estudo *in vitro*, via oxidação da lipoproteína estimulada pela incubação com AAPH ou íons de cobre. Foi observado que o licopeno age sinergisticamente com antioxidantes naturais (vitamina E, glabridina, ácido rosmarínico e ácido carnósico) contra a oxidação da LDL. O efeito sinérgico na proteção contra a oxidação da LDL foi explicado pela combinação dos mecanismos antioxidantes destes compostos e de suas localizações nas lipoproteínas (FUHRMAN et al., 2000).

Para nosso estudo, estes mecanismos combinados poderiam ser também úteis para explicar os efeitos combinados observados *in vivo* na proteção contra a oxidação de LDL: *i*) a localização dos antioxidantes em biomoléculas que circulam de maneiras distintas, ou seja, a curcumina ligada à albumina e os carotenoides diretamente associados a LDL, e *ii*) os mecanismos antioxidantes distintos, enquanto curcumina é capaz de doar o átomo de hidrogênio do grupo fenólico e o hidrogênio metilênico central na unidade hepta-dienona e também apresenta elevada capacidade de ligação ao ferro (AK; GÜLÇİN, 2008; MAHFOUZ;

ZAOU; KUMMEROW, 2009), licopeno (e possivelmente a bixina) previne a peroxidação lipídica via captura do oxigênio singlete (DI MASCIO; KAISER; SIES, 1989) e de radicais peroxila (MILLER et al., 1996). Finalmente, deve-se destacar que os efeitos combinados de curcumina e carotenoides na prevenção da oxidação da LDL foram tão efetivos que os níveis de LDL-oxidada de ratos DCB e DCL foram semelhantes aos valores encontrados em ratos NIOG e DINS (Figura 13).

Além de prevenir a oxidação da LDL em ratos diabéticos, a terapia combinada de curcumina com carotenoides também deverá mostrar benefícios contra as complicações cardiovasculares via aumento nos níveis de HDL (Figura 8). O principal papel de HDL no transporte reverso do colesterol é transportar o excesso de colesterol das células, incluindo células espumosas, e leva-lo ao fígado, o qual é responsável pela eliminação do colesterol nas fezes, seja na forma de esteróis neutros ou como ácidos biliares (ANNEMA; TIETGE, 2012). Conseqüentemente, o HDL diminui a formação de células espumosas e placas aterogênicas. McEneny et al. (2013) demonstraram que a suplementação com licopeno altera a atividade de enzimas que participam do metabolismo de HDL, diminuindo a atividade da enzima transferidora de ésteres de colesterol (CETP) e aumentando a atividade da lecitina colesterol acil transferase (LCAT), que em conjunto contribuem para o aumento nos níveis de HDL após o tratamento com licopeno.

Além do aumento nos níveis circulantes de HDL, a melhoria em sua capacidade antioxidante tem sido apontada como uma estratégia central associada a intervenções terapêuticas antiaterogênicas que sejam eficazes. O potencial antioxidante do HDL tem sido relacionado a paraoxonase 1 (PON1) (LITVINOV; MAHINI; GARELMABI, 2012). A PON1 encontra-se especialmente em associação ao HDL, e sua atividade antioxidante está relacionada a sua habilidade em hidrolisar peróxidos lipídicos (GUGLIUCCI; MENINI, 2015). Além de proteger o HDL contra o dano oxidativo (AVIRAM et al., 1998), tem sido consistentemente mostrado que a PON1 atenua a oxidação da LDL (DURRINGTON; MACKNESS; MACKNESS, 2001; MACKNESS; MACKNESS, 2013). A suplementação com licopeno tem aumentado a atividade da PON1 em associação aos níveis aumentados de HDL (MCENENY et al., 2013), bem como tem participado na prevenção da perda da atividade da PON1 devido ao diabetes experimental (YEGIN; YUR; CEYLAN, 2013).

Este estudo mostra evidências de que o iogurte enriquecido com curcumina e carotenoides (licopeno ou bixina) melhora vários parâmetros alterados em ratos diabéticos,

principalmente os parâmetros relacionados ao estresse oxidativo e ao risco cardiovascular. Até onde sabemos, este estudo é o primeiro que apresenta dois resultados potencialmente importantes sobre os benefícios *in vivo* para o DM de uma terapia combinada com estes compostos naturais.

Podemos salientar nesse modelo que houve intensa redução nos níveis de LDL-oxidada de ratos diabéticos tratados com as misturas de curcumina e licopeno ou curcumina e bixina em iogurte, cujos níveis foram abaixo em relação aos encontrados com os tratamentos isolados (curcumina e bixina), alcançando valores semelhantes aos animais normais, não diabéticos.

Outra observação relevante é que a co-administração de curcumina e carotenoides aumentou os níveis de HDL dos ratos diabéticos, ampliando os efeitos benéficos da curcumina incorporada ao iogurte. Estudos anteriores apontam que o iogurte enriquecido somente com curcumina melhora vários parâmetros de ratos diabéticos, entretanto nenhuma alteração foi observada nos níveis de HDL (GUTIERRES et al., 2012; ARCARO et al., 2014). Em função disso, torna-se evidente que a combinação de curcumina com carotenoides em iogurte tem um excelente potencial para proteger os indivíduos diabéticos das complicações em longo prazo relacionadas com doenças cardiovasculares.

4.2 Experimento 2: Avaliação das alterações fisiológicas e bioquímicas de camundongos submetidos ao modelo de obesidade/resistência insulínica, tratados com curcumina, licopeno e bixina isolados, incorporados ao iogurte

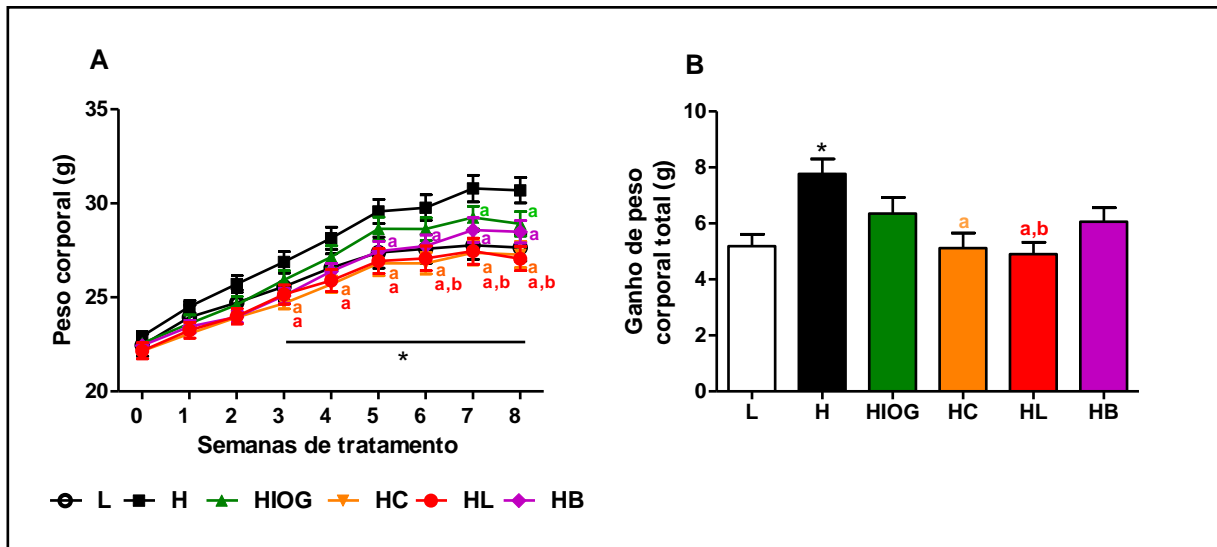
Uma vez investigados os efeitos dos ativos naturais (curcumina, bixina e licopeno) no modelo experimental de diabetes mellitus tipo 1, e assim podendo observar os diversos benefícios destes tratamentos no modelo citado, tornou-se importante a investigação dos efeitos dos mesmos antioxidantes na prevenção da instalação de distúrbios metabólicos em camundongos (C57B1/6J) submetidos ao modelo de obesidade e resistência insulínica, induzido por dieta hiperlipídica-hipercalórica (*high-fat*, HF). Para a realização desta investigação, houve a colaboração do laboratório do Prof. Dr. André Marette, no “Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec”, da *Université Laval*, Quebec/Canada, local onde o Experimento 2 foi realizado.

4.2.1 Parâmetros fisiológicos de camundongos submetidos às dietas LF ou HF e tratados com curcumina, bixina ou licopeno, em iogurte, durante 8 semanas

Na Figura 18A pode-se observar a evolução do peso corporal de animais alimentados com dieta LF ou HF, tratados com iogurte ou com os ativos naturais incorporados ao iogurte, durante 8 semanas. Tal como esperado, o grupo L apresentou menor ganho de peso quando comparado ao grupo H, a partir da terceira semana de tratamento, mostrando a instalação de obesidade neste modelo experimental (grupo H). Quando os animais alimentados com dieta HF receberam iogurte (grupo HIOG), estes apresentaram redução significativa no peso corporal a partir da 7^a semana, quando comparados ao grupo H. A administração de curcumina incorporada em iogurte (HC) a camundongos alimentados com a dieta HF também foi capaz de reduzir significativamente o ganho de peso quando comparado ao grupo H e, embora o grupo HC apresentasse valores menores em relação ao grupo HIOG, esta diferença não foi significativa. O tratamento com licopeno incorporado ao iogurte (HL) reduziu significativamente o ganho de peso corporal, a partir da 3^a semana de tratamento, quando comparado ao grupo H, e a partir da 6^a semana, quando comparado ao grupo HIOG, ambas as diferenças se mantiveram até o final do tratamento. O tratamento com bixina incorporada ao iogurte (HB) promoveu uma tendência de redução no ganho de peso corporal em comparação ao grupo HIOG, e redução significativa a partir da 5^a semana em relação ao grupo H.

Na Figura 18B, pode-se observar o ganho de peso corporal total dos animais após 8 semanas de oferta das dietas LF e HF e os respectivos tratamentos, evidenciando a eficiência dos tratamentos com curcumina e licopeno incorporados ao iogurte na redução de ganho de peso corporal em relação aos animais somente alimentados com a dieta HF.

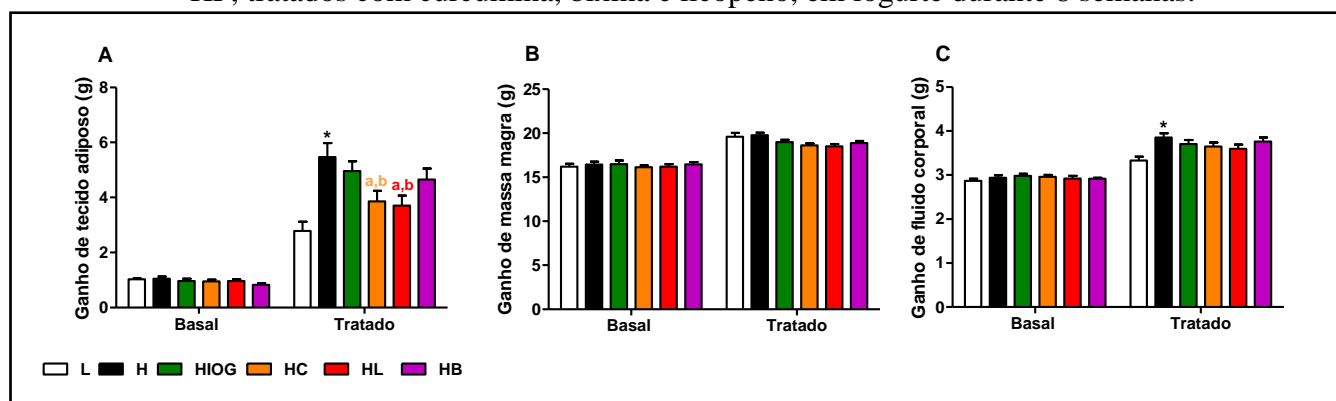
Figura 18: Peso corporal (A) e ganho de peso corporal total (B) de camundongos alimentados com as dietas LF ou HF e tratados com curcumina, bixina ou licopeno, em iogurte, durante 8 semanas.



Os dados estão expressos como média \pm erro padrão. *diferenças com L ($p < 0.05$); a, diferenças com H; b, diferenças com HIOG; c, diferenças com HC; d, diferenças com HL; e, diferenças com HB ($p < 0,05$).

Além do monitoramento do peso corporal durante todo o período experimental, foi avaliada a composição corporal dos animais via RMN, antes e após 8 semanas de oferta das dietas LF ou HF, e seus respectivos tratamentos (Figura 19). No estado basal, ou seja, antes de receberem dieta ou tratamento, os animais não apresentaram diferenças nas massas de tecido adiposo (A), massa magra (B) e fluidos corporais (C). Após os tratamentos, nota-se aumento significativo de tecido adiposo nos animais do grupo H, quando comparados com o grupo L. O grupo HIOG não apresentou redução significativa na massa de tecido adiposo quando comparado com o grupo H. Os tratamentos com curcumina (HC) e licopeno (HL) tiveram uma redução evidente do tecido adiposo em animais alimentados com dieta HF, sendo que os grupos HC e HL apresentaram diferenças significativas quando comparados com grupo HIOG e H (Figura 19A), corroborando o que foi observado no ganho de peso corporal (Figura 18). Em relação à massa magra, não foram observadas diferenças significativas em todos os grupos experimentais (Figura 19B). Para os fluidos corporais, o grupo H apresentou aumento significativo na massa de fluidos corporais quando comparado com o grupo L, enquanto que os demais grupos não apresentaram diferenças significativas (Figura 19C).

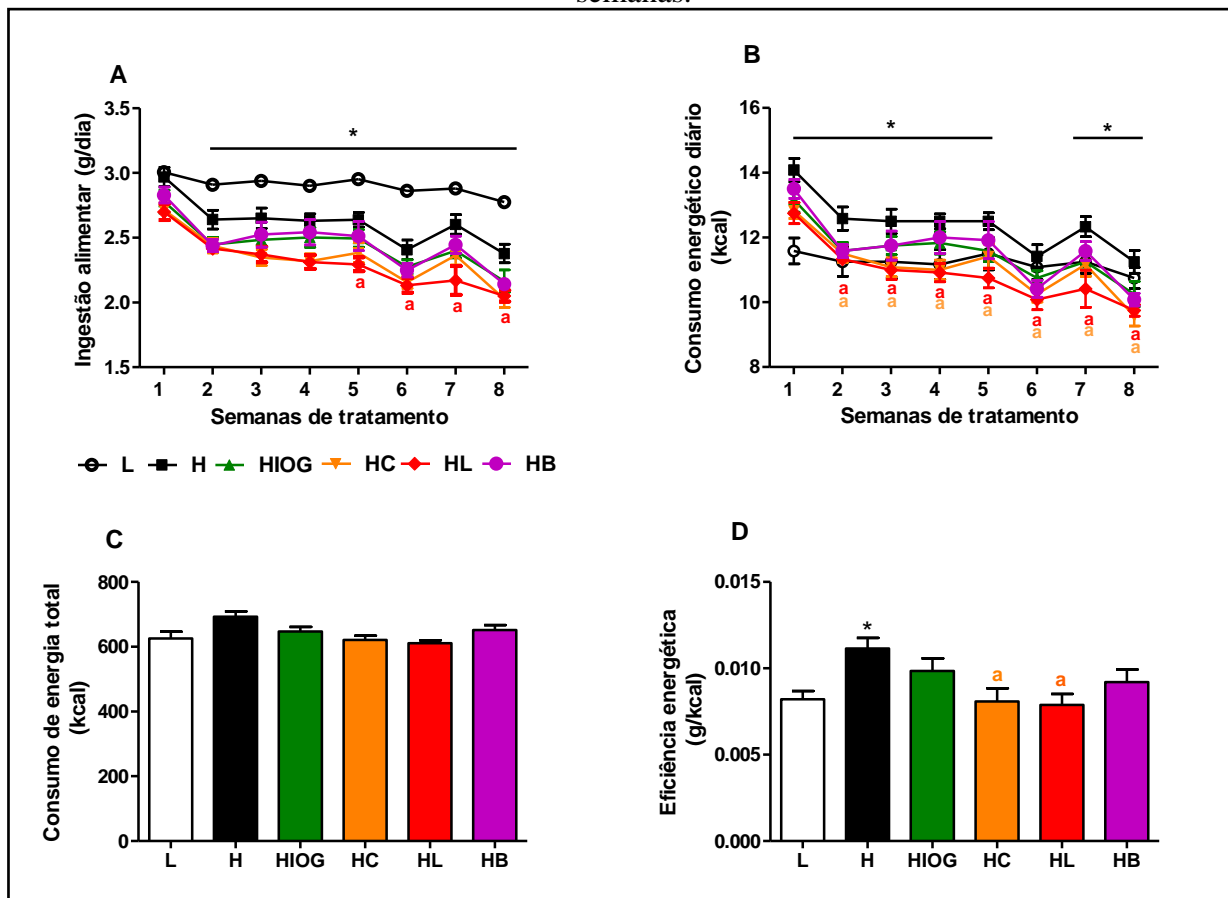
Figura 19: Efeitos na composição corporal em camundongos alimentados com dieta LF ou HF, tratados com curcumina, bixina e licopeno, em iogurte durante 8 semanas.



(A) Ganho de tecido adiposo (B) Ganho de massa magra (C) Ganho de fluido corporal. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão. *diferenças com L ($p < 0.05$); a, diferenças com H; b, diferenças com HIOG; c, diferenças com HC; d, diferenças com HL; e, diferenças com HB ($p < 0,05$).

Na Figura 20 estão apresentados os valores de ingestão alimentar, bem como a ingestão energética diária e total e a eficiência energética dos camundongos submetidos às dietas LF ou HF. O ganho de peso corporal (Figura 18) pode ser explicado, pelo menos em parte, pela ingestão energética (kcal) durante o período experimental. Todos os animais alimentados com a dieta HF apresentaram uma menor ingestão alimentar (g/dia) em comparação aos animais alimentados com dieta LF (Figura 20A), no entanto não foram observadas diferenças na ingestão energética total (kcal) entre os grupos (Figura 20C). Mesmo com menor ingestão alimentar, animais do grupo H apresentaram maior consumo energético diário (kcal) (Figura 20B), bem como maior eficiência energética (g/kcal) (Figura 20D) em relação aos animais do grupo L, isso significa que os animais do grupo H tiveram maior eficiência em converter a mesma quantidade de calorias em maior massa corpórea (g) quando comparados aos animais do grupo L. O tratamento com licopeno foi capaz de reduzir significativamente a ingestão alimentar (Figura 20A), o consumo energético diário (Figura 20B) e a eficiência energética (Figura 20D) em comparação aos animais H. O tratamento com curcumina também foi capaz de reduzir o consumo energético diário (Figura 20B) e a eficiência energética (Figura 20D) em relação aos animais H.

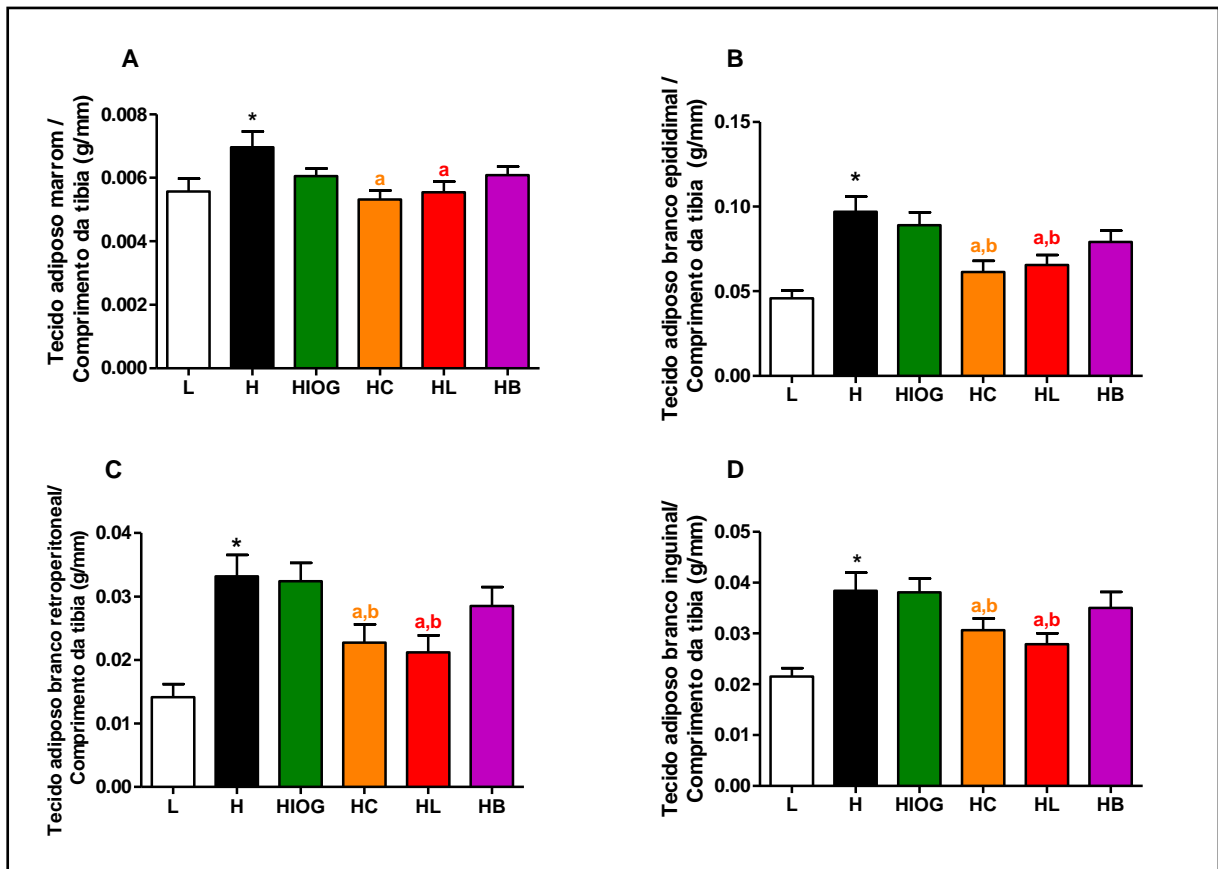
Figura 20: Ingestão alimentar e ingestão energética de camundongos alimentados com as dietas LF ou HF e tratados com curcumina, bixina ou licopeno, em iogurte, durante 8 semanas.



(A) Ingestão alimentar (B) Consumo energético diário (C) Consumo de energia total (D) Eficiência energética (razão entre o ganho de peso corporal (g) e consumo de energia total (kcal) *100). Os dados estão expressos como média \pm erro padrão. *diferenças com L ($p < 0.05$); a, diferenças com H; b, diferenças com HIOG; c, diferenças com HC; d, diferenças com HL; e, diferenças com HB ($p < 0.05$).

Na Figura 21, estão apresentados os pesos do tecido adiposo marrom interescapular (A) e dos tecidos adiposos brancos epididimal (B), retroperitoneal (C) e inguinal (D). O grupo H apresentou aumento significativo nos pesos dos tecidos adiposos marrom e brancos quando comparado ao grupo L. O grupo HIOG apresentou uma tendência de redução nos pesos dos tecidos adiposos marrom e branco epididimal, quando comparado ao grupo H (Figuras 21A e B). Os tratamentos com curcumina (HC) ou com licopeno (HL) reduziram significativamente os pesos dos tecidos adiposos marrom e brancos epididimal, retroperitoneal e inguinal, quando comparados aos grupos H e HIOG. Houve uma tendência de redução no peso do tecido adiposo branco epididimal em animais tratados com bixina (HB), quando comparados com o grupo HIOG e H.

Figura 21: Peso dos tecidos adiposos marrom e brancos de animais alimentados com as dietas LF ou HF, tratados com curcumina, bixina ou licopeno, em iogurte, durante 8 semanas.



(A) Tecido adiposo marrom (B) Tecido adiposo branco: epididimal (C) retroperitoneal (D) inguinal. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão. *diferenças com L ($p < 0.05$); a, diferenças com H; b, diferenças com HIOG; c, diferenças com HC; d, diferenças com HL; e, diferenças com HB ($p < 0.05$).

Na Tabela 6 estão apresentados os pesos dos músculos esqueléticos *soleus*, EDL e *gastrocnemius*, e dos tecidos fígado, coração e pâncreas, de animais submetidos às dietas LF ou HF, e tratados com curcumina, bixina ou licopeno, incorporados ao iogurte. Em todos os grupos estudados, não foram observadas diferenças nos pesos dos músculos, tanto após a instalação do modelo de obesidade quanto após os tratamentos com iogurte ou ativos naturais incorporados em iogurte. Com relação ao peso do pâncreas, o grupo H apresentou maior peso quando comparado ao grupo L; os tratamentos com curcumina, licopeno ou bixina apresentaram um menor peso do pâncreas, quando comparados ao grupo H. O peso do fígado somente foi alterado nos grupos HIOG e HL, que apresentaram valores menores quando comparados com o grupo H.

Tabela 6: Peso (g) de músculos esqueléticos e tecidos de animais alimentados com as dietas LF ou HF e tratados com curcumina, bixina ou licopeno, em iogurte, durante 8 semanas

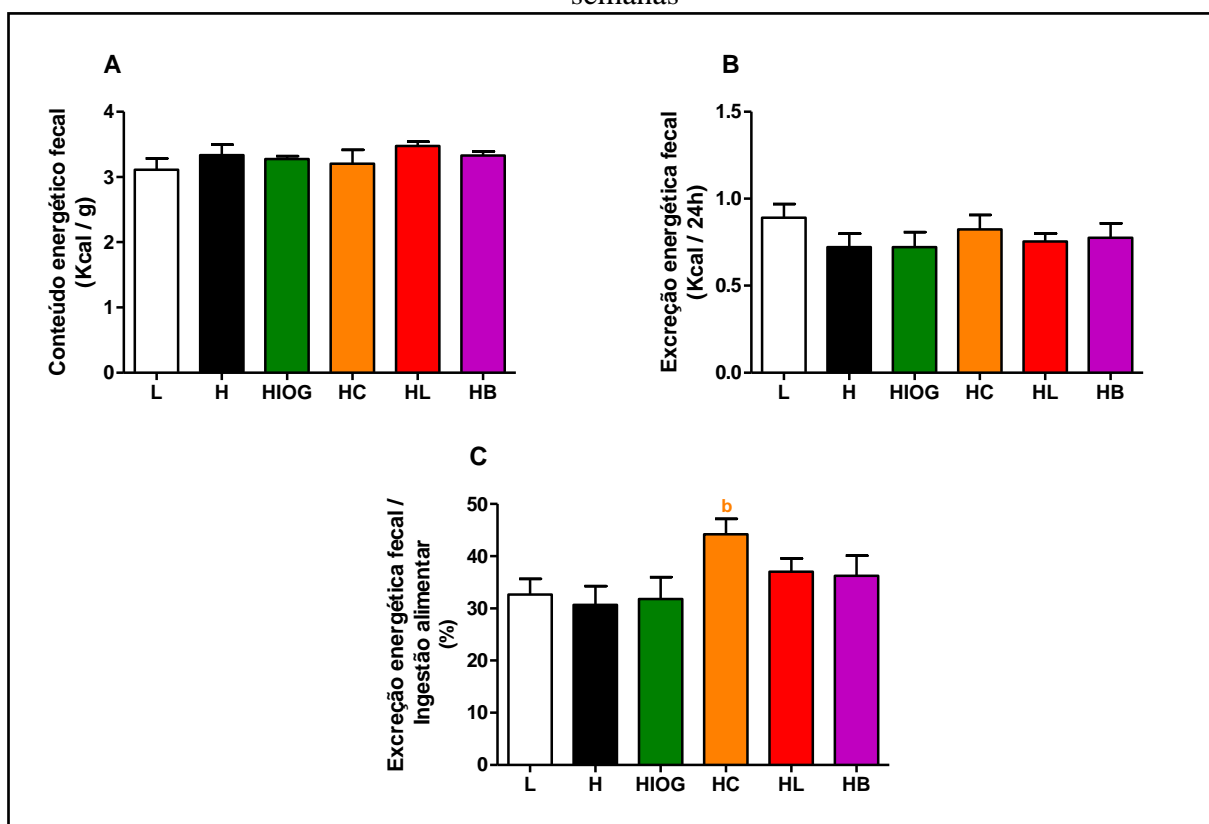
	L	H	HIOG	HC	HL	HB
<i>Soleus</i>	0,0011± 0,0004	0,0012± 0,0001	0,0011± 0,0002	0,0011± 0,0002	0,0011± 0,0002	0,0011± 0,0001
EDL	0,0013± 0,0002	0,0013± 0,0001	0,0013± 0,0002	0,0014± 0,0002	0,0013± 0,0001	0,0013± 0,0003
<i>Gastrocnemius</i>	0,018±0,001	0,019± 0,001	0,018± 0,003	0,018± 0,003	0,017± 0,001	0,017± 0,001
Fígado	0,9238±0,04	0,9126±0,01	0,8215±0,01(a)	0,8688±0,02	0,8129±0,01(a)	0,8415±0,03
Pâncreas	0,2486± 0,02	0,2806±0,03(*)	0,2442± 0,02	0,2320±0,02(a)	0,2260± 0,01(a)	0,2419±0,01(a)
Coração	0,1374± 0,02	0,1372± 0,01	0,1302± 0,02	0,1210± 0,03	0,1258± 0,01	0,1302± 0,02

Os dados estão expressos como média ± erro padrão. *diferenças com L ($p<0.05$); a, diferenças com H; b, diferenças com HIOG; c, diferenças com HC; d, diferenças com HL; e, diferenças com HB ($p<0,05$).

Na Figura 22, estão apresentados os valores referentes ao conteúdo energético fecal (A), excreção energética das fezes (B), excreção energética fecal / ingestão alimentar (C) dos animais submetidos às dietas LF ou HF e tratados com curcumina, bixina ou licopeno, incorporados ao iogurte.

Os valores de conteúdo energético fecal e excreção energética fecal não apresentaram diferenças significativas entre todos os grupos experimentais. Portanto, quando analisamos a relação entre a excreção energética fecal / ingestão alimentar, ou seja, a energia não absorvida, podemos observar que o tratamento com curcumina (HC) apresentou diferença significativa com relação à absorção de energia da dieta, quando comparado com H, HIOG, HL e HB. Esse efeito pode sugerir uma alteração do perfil da microbiota intestinal, uma vez que já está demonstrado que um dos mecanismos pelos quais a microbiota pode contribuir para causar obesidade está relacionado a um aumento da absorção intestinal de energia da dieta (ANHÊ et al. 2015).

Figura 22: Conteúdo energético fecal e excreção energética fecal de animais alimentados com as dietas LF ou HF, tratados com curcumina, bixina ou licopeno, em iogurte, durante 8 semanas



(A) Conteúdo energético fecal (B) Excreção energética fecal (C) Excreção energética fecal/ingestão alimentar. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão. *diferenças com L ($p < 0.05$); a, diferenças com H; b, diferenças com HIOG; c, diferenças com HC; d, diferenças com HL; e, diferenças com HB ($p < 0,05$).

4.2.2 Parâmetros bioquímicos de camundongos submetidos às dietas LF e HF, e tratados com curcumina, bixina ou licopeno, em iogurte, durante 8 semanas

Estudos recentes têm demonstrado que a dieta HF, além de induzir o acúmulo de gorduras nos tecidos adiposos, também promove alterações no metabolismo de carboidratos e lipídeos (QIAO et al., 2014; VAZQUEZ PRIETO, et al., 2015). Também já estão bem consolidados neste modelo experimental de obesidade e resistência insulínica achados relacionados à prevenção das alterações metabólicas, inclusive homeostase da glicose, por produtos naturais (ANHÊ et al., 2014).

A fim de avaliar o efeito do tratamento com os antioxidantes naturais incorporados ao iogurte frente à homeostase da glicose e a sensibilidade dos tecidos à insulina, foram

realizados o teste de tolerância a insulina (ITT), cujos resultados estão apresentados na Figura 23, e o teste de tolerância oral a glicose (TTGO), cujos resultados estão na Figura 24.

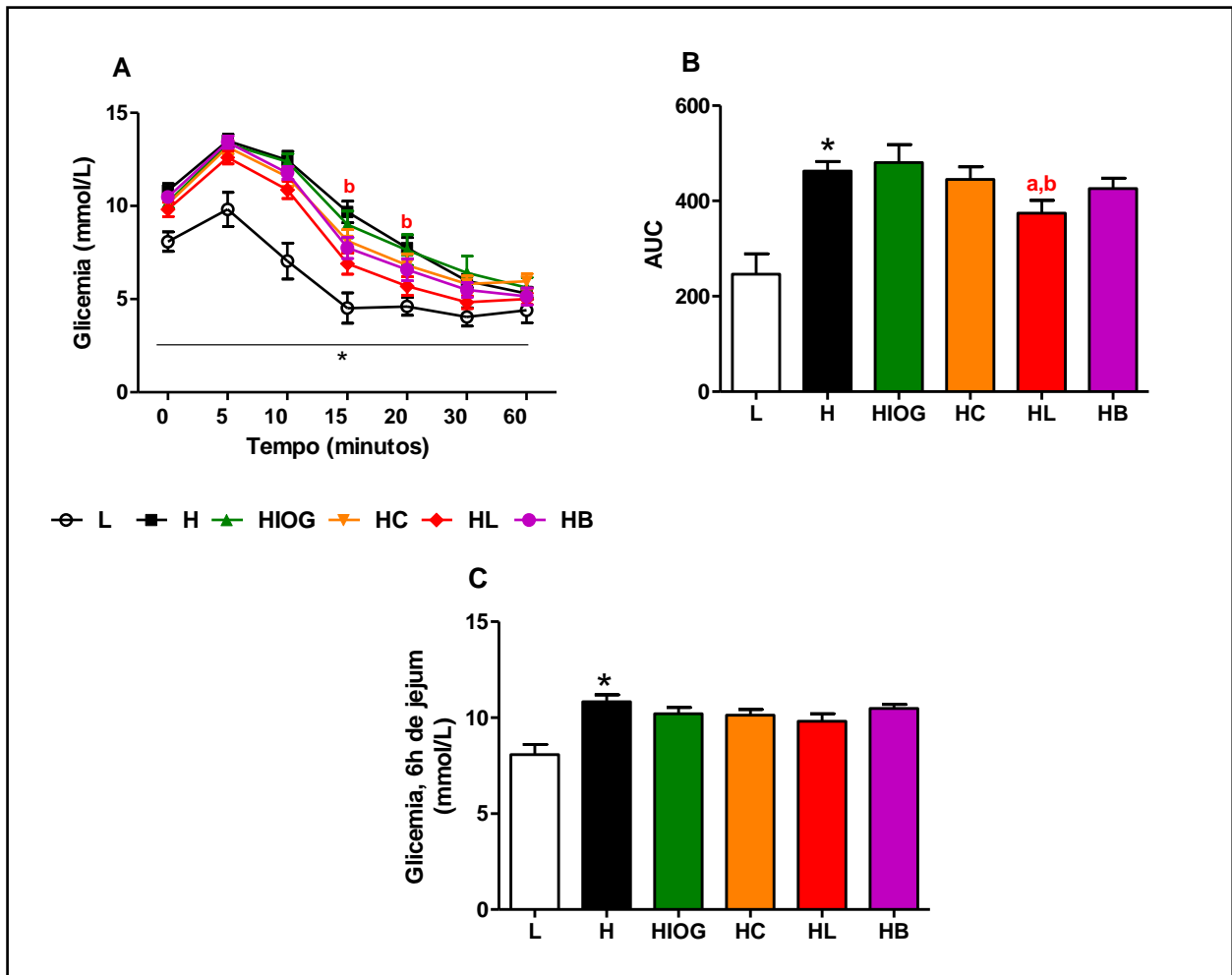
O ITT tem como objetivo avaliar *in vivo* de forma direta a sensibilidade dos tecidos à insulina. Após a administração de insulina exógena, ocorre queda progressiva nos valores de glicemia. Um tratamento que promova aumento na sensibilidade à insulina culmina em uma maior velocidade de queda na glicemia no ITT, que pode ser consequência de dois fatores: i) aumento na captação de glicose pelos tecidos em resposta à insulina e/ou ii) inibição da produção hepática de glicose .

Durante o ITT, os níveis glicêmicos dos animais que receberam dieta LF foram significativamente menores em relação aos níveis glicêmicos dos animais que receberam somente a dieta HF (grupo H), mostrando uma menor capacidade destes animais em reduzir a glicemia após o desafio com insulina, o que representa uma diminuição da sensibilidade à insulina nos animais do grupo H (Figura 23A). Os animais que receberam dieta HF e foram tratados com iogurte (HIOG) apresentaram níveis glicêmicos semelhantes ao grupo H, após a administração de insulina, indicando que o iogurte sozinho não é capaz de prevenir ou amenizar a resistência à insulina promovida pela dieta HF. Os animais tratados com curcumina (HC) ou com bixina (HB) também não apresentaram diferenças nos valores de glicemia, em qualquer tempo de monitoramento no ITT, quando comparados aos animais dos grupos H e HIOG. O tratamento com licopeno (HL) promoveu melhorias significativas na responsividade dos animais frente ao desafio com insulina, uma vez que houve uma queda mais evidente na glicemia, em especial nos tempos 15 e 20 minutos, em comparação aos grupos H e HIOG (Figura 23A). Na Figura 23B, a área sob a curva (AUC), reitera-se o efeito benéfico do tratamento com licopeno incorporado ao iogurte (HL) nos níveis glicêmicos frente ao desafio com insulina, assim podemos sugerir que os animais tratados com licopeno incorporado ao iogurte apresentaram uma melhoria na sensibilidade à insulina, em comparação aos grupos H e HIOG.

Na Figura 23C está apresentados os valores de glicemia de jejum, na qual pode-se observar aumento significativo nos níveis glicêmicos do grupo H, quando comparado com o grupo L. Os animais dos grupos HIOG, HC, HL e HB não apresentaram diferenças significativas na glicemia de jejum, em relação ao grupo H.

Nos ensaios de ITT e TTGO, também pode-se observar prejuízos na glicemia de jejum, podendo indicar prejuízos no fígado de responder ao controle inibitório da insulina sobre a neoglicogênese.

Figura 23: Tolerância à insulina de camundongos alimentados com as dietas LF ou HF e tratados com curcumina, bixina ou licopeno, em iogurte, durante 8 semanas.



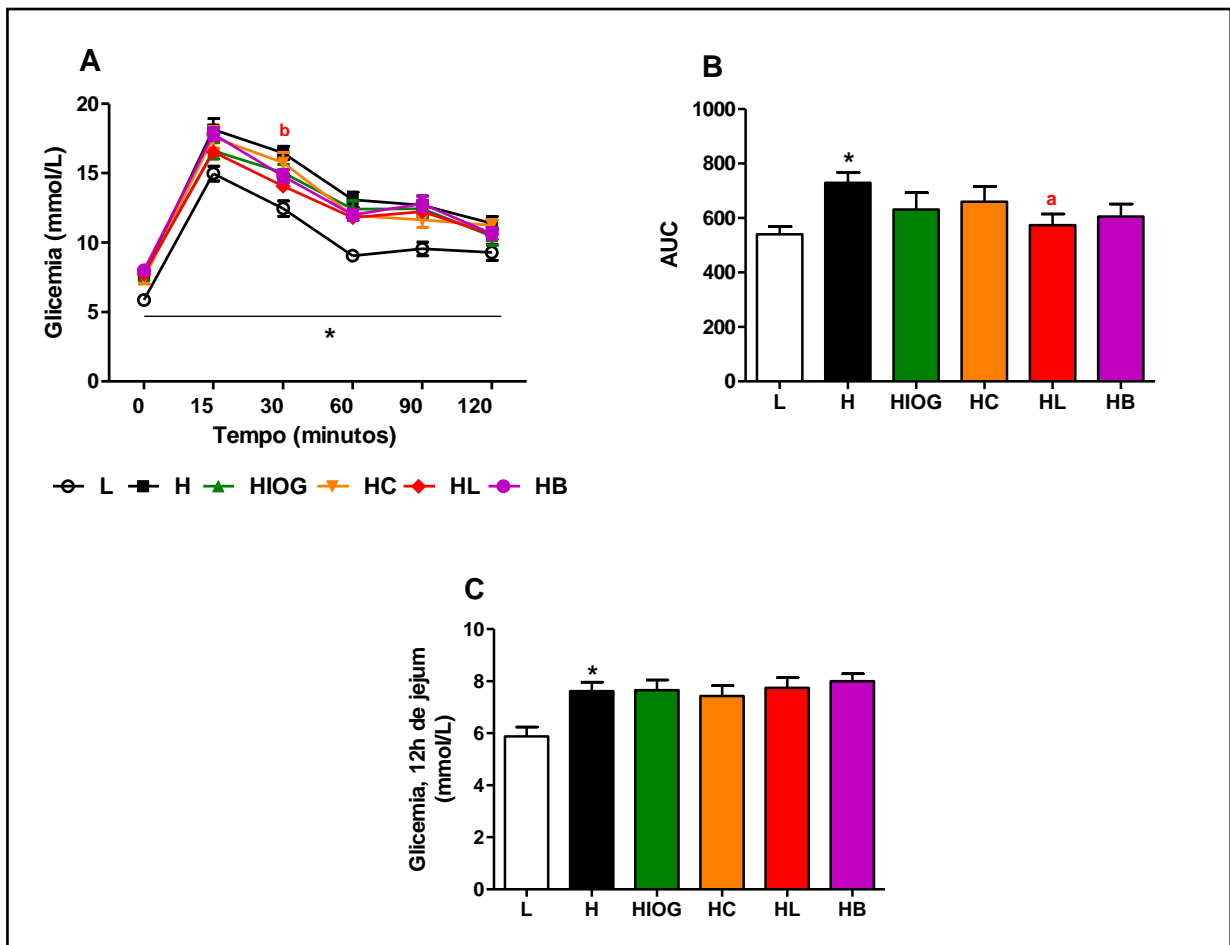
(A) Teste de tolerância à insulina (B) AUC (C) Glicemia de 6h de jejum. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão. *diferenças com L ($p < 0.05$); a, diferenças com H; b, diferenças com HIOG; c, diferenças com HC; d, diferenças com HL; e, diferenças com HB ($p < 0,05$).

Em condições onde não há o estabelecimento de distúrbios metabólicos, a capacidade de restaurar as condições normoglicêmicas é atribuída principalmente ao funcionamento adequado de dois processos metabólicos: *i*) a produção e secreção de insulina pelo pâncreas, e *ii*) a capacidade dos tecidos em responder ao hormônio, que em conjunto estimulam a captação de glicose e a sua oxidação e/ou armazenamento pelos tecidos. Prejuízos nestes processos podem explicar condições de intolerância à glicose.

Na Figura 24 encontram-se os resultados relacionados ao perfil glicêmico no teste de tolerância oral à glicose (TTGO) de animais submetidos às dietas LF e HF e os respectivos tratamentos. Após o desafio com glicose, os níveis glicêmicos dos animais que receberam somente a dieta HF (grupo H) foram significativamente aumentados em comparação aos animais que receberam a dieta LF, o que representa uma condição de menor tolerância à glicose; pode-se observar que 120 minutos após a sobrecarga oral de glicose, os níveis glicêmicos do grupo H continuaram maiores em relação aos valores encontrados nos animais do grupo LF (Figura 24A). Somente o tratamento com licopeno incorporado ao iogurte (HL) foi capaz de melhorar o perfil glicêmico de animais após a sobrecarga de glicose, em comparação aos grupos H e HIOG, melhoria esta que refletiu-se em menor AUC da glicemia em relação ao H (Figura 24B). Portanto pode-se sugerir que a tolerância à glicose foi significativamente aumentada no grupo HL quando comparado ao H. Além disso, vale a pena destacar que, embora os tratamentos com iogurte, curcumina ou bixina não tenham promovido alterações estatisticamente significantes no perfil glicêmico pós-sobrecarga em relação ao grupo H, a AUC dos grupos HIOG, HC e HB foram diminuídas em relação a AUC do grupo H, o que sugere que esses tratamentos apresentem uma tendência a melhorar a tolerância à glicose dos animais em dieta HF.

Na Figura 24C estão os valores de glicemias de jejum, na qual pode-se observar aumento significativo nos níveis glicêmicos do grupo H, quando comparado com o grupo L. Os animais dos grupos HIOG, HC, HL e HB não apresentaram diferenças significativas na glicemia de jejum, em relação ao grupo H.

Figura 24: Tolerância oral à glicose de camundongos alimentados com as dietas LF ou HF e tratados com curcumina, bixina ou licopeno, em iogurte, durante 8 semanas.



(A) Teste de tolerância oral a glicose (B) AUC (C) Glicemia de 12h de jejum. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão. *diferenças com L ($p < 0.05$); a, diferenças com H; b, diferenças com HIOG; c, diferenças com HC; d, diferenças com HL; e, diferenças com HB ($p < 0,05$).

Na Figura 25, estão apresentados os níveis insulinêmicos durante o TTGO de camundongos alimentados com as dietas LF ou HF e tratados somente com iogurte (HIOG) ou iogurte enriquecido com curcumina (HC), licopeno (HL) ou bixina (HB).

Embora os animais que receberam os tratamentos com curcumina, licopeno ou bixina não tenham sido capazes de melhorar a glicemia de jejum (Figura 24), o tratamento com licopeno incorporado ao iogurte (HL) promoveu redução significativa na insulinemia de jejum em relação aos grupos H e HIOG (Fig. 25 B), desta forma podemos sugerir que o tratamento com licopeno melhora a sensibilidade à insulina de animais alimentados com a dieta HF.

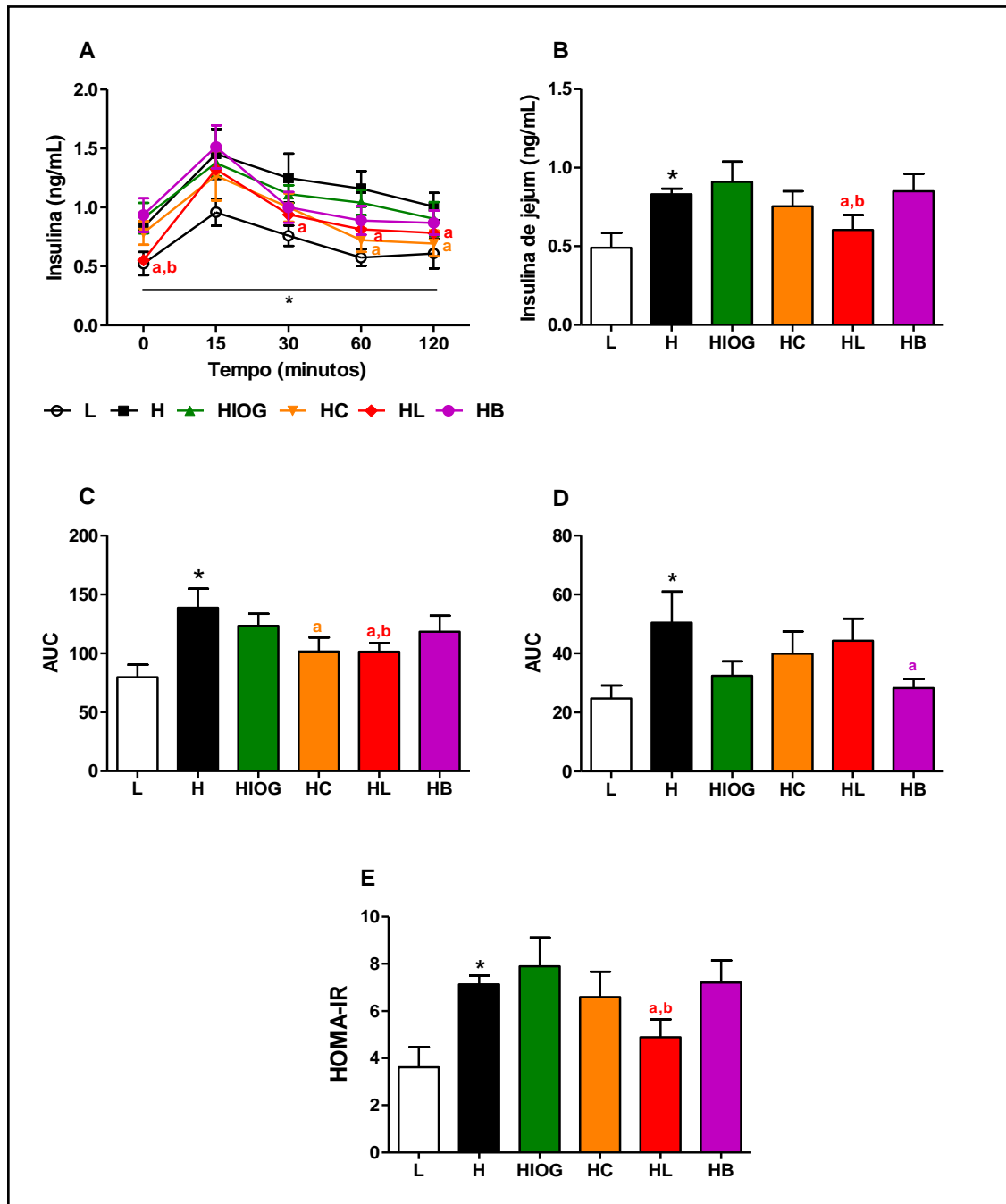
Também foi calculado o HOMA-IR, um parâmetro utilizado na análise da sensibilidade à insulina. De acordo com o HOMA-IR, pode ser reforçada a melhoria na

sensibilidade à insulina nos animais que foram tratados com licopeno incorporado ao iogurte, quando comparados aos grupos H e HIOG (Figura 25E).

Nas Figuras 25 C e D estão apresentadas as AUC referentes à insulinemia durante o TTGO, nas quais podemos obter dois comportamentos de respostas frente aos critérios adotados para a construção das curvas: na Figura 25C não foram utilizadas as médias dos valores de insulina do tempo 0 como *baseline* para a construção da AUC, e sim até os valores integrados de insulina anteriores à sobrecarga de glicose, isto é, levou-se em consideração a insulinemia de jejum; já na Figura 25D assumiu-se como *baseline* os valores médios de insulina a partir do tempo 0, isto é, as alterações nos níveis de insulina após a sobrecarga de glicose. Assim, dois perfis de respostas foram observados. Considerando ou não os valores de insulina anteriores à sobrecarga de glicose como *baseline* das AUC, observa-se aumento significativo nos níveis séricos de insulina no grupo H quando comparado ao grupo L. Na Figura 25C nota-se que o tratamento com curcumina (HC) promoveu diminuição da insulinemia em relação ao grupo H; já o tratamento com licopeno (HL) também reduziu a insulinemia em relação aos grupos H e HIOG. Na Figura 25D, os grupos HIOG, HC e HL apresentaram uma tendência de diminuição nos níveis plasmáticos de insulina, no entanto não foram observadas diferenças significativas quando comparados ao grupo H; o tratamento com bixina (HB) promoveu diminuição significativa na insulinemia quando comparado ao grupo H.

Estes achados permitem duas interpretações: na Figura 25C, podem ser observadas alterações devido tanto ao modelo quanto aos tratamentos que tenham previamente afetado a função pancreática de secreção de insulina independente da sobrecarga de glicose. Já na Figura 25D, os resultados permitem observar as alterações nos níveis insulinêmicos em resposta ao desafio com glicose, desconsiderando a insulinemia de jejum, que pode estar alterada mesmo sem a realização do ensaio funcional.

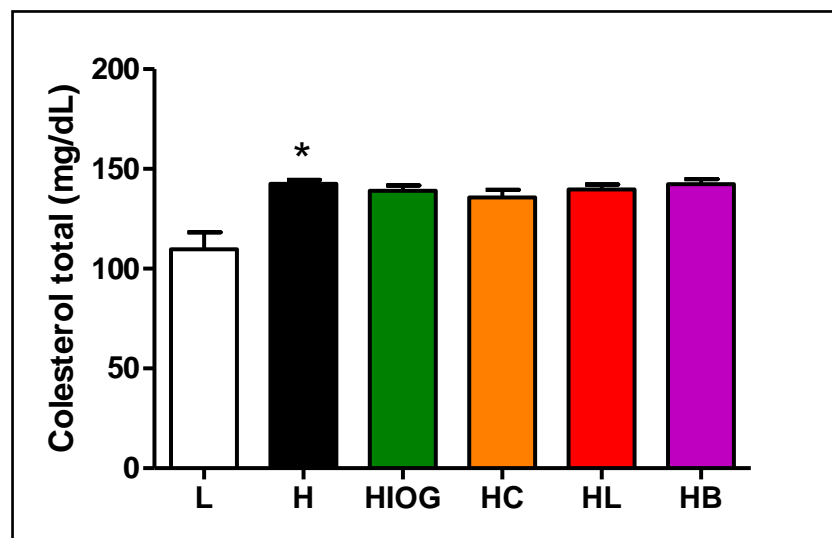
Figura 25: Insulinemia durante o TTGO de camundongos alimentados com as dietas LF ou HF e tratados com curcumina, bixina ou licopeno, em iogurte, durante 8 semanas.



(A) Insulinemia durante o TTGO (B) Insulinemia de jejum (C) AUC, com *baseline* com insulinemia integrada, antes e após a sobrecarga de glicose (D) AUC, com *baseline* com insulinemia após a sobrecarga de glicose (E) HOMA-IR. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão. *diferenças com L ($p < 0.05$); a, diferenças com H; b, diferenças com HIOG; c, diferenças com HC; d, diferenças com HL; e, diferenças com HB ($p < 0,05$).

Na Figura 26 estão apresentados os níveis plasmáticos de colesterol total dos animais submetidos às dietas LF e HF, tratados com iogurte ou com iogurte suplementado com os ativos naturais. Os animais que receberam dieta HF, tratados ou não com iogurte ou com os ativos naturais, apresentaram aumento significativo nos níveis plasmáticos de colesterol quando comparados com animais que receberam a dieta LF.

Figura 26: Colesterol total plasmático (mg/dL) de camundongos alimentados com as dietas LF ou HF e tratados com curcumina, bixina ou licopeno, em iogurte, durante 8 semanas.



Os dados estão expressos como média \pm erro padrão. *diferenças com L ($p < 0,05$); a, diferenças com H; b, diferenças com HIOG; c, diferenças com HC; d, diferenças com HL; e, diferenças com HB ($p < 0,05$).

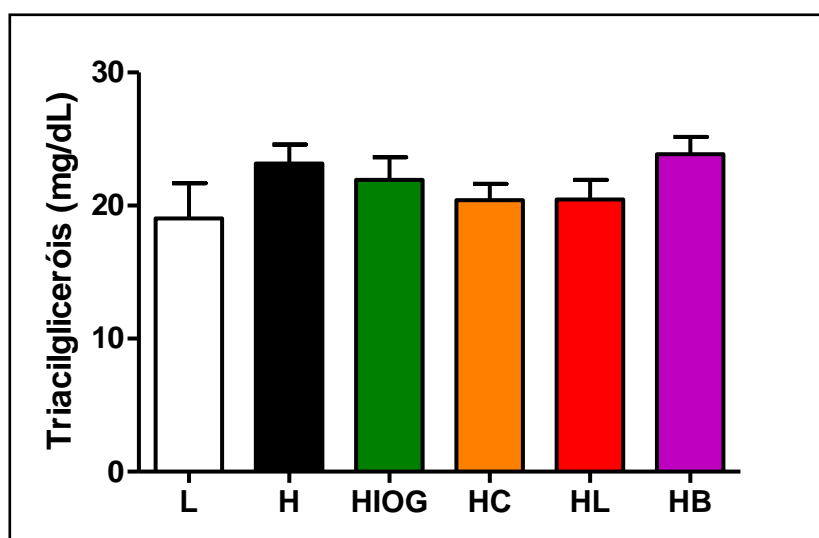
Os níveis plasmáticos e hepáticos de triacilgliceróis dos animais submetidos às dietas LF e HF, tratados com iogurte ou com iogurte suplementado com os ativos naturais, estão apresentados nas Figuras 27 e 28, respectivamente.

Não foi possível observar diferenças significativas entre os grupos experimentais em relação aos níveis plasmáticos de triacilgliceróis, embora seja observada uma tendência de aumento nos níveis de triacilgliceróis em animais que receberam a dieta HF. Já os animais tratados com curcumina (HC) e licopeno (HL) apresentaram uma tendência de redução nos níveis de triacilgliceróis plasmáticos, em relação aos grupos HF e HIOG. O tratamento com bixina (HB) também não foi capaz de promover melhoria nos níveis de triacilgliceróis plasmáticos após 8 semanas de tratamento (Figura 27), quando comparado com os grupos H e HIOG.

Nesse modelo experimental, é evidente o acúmulo de triacilgliceróis e ácidos graxos livres no fígado, como consequência das mudanças no influxo, síntese, oxidação e transporte de ácidos graxos. Consequentemente, há desequilíbrio em processos oxidativos, diminuição da produção hepática de ATP, resistência insulínica e indução na produção citocinas pró-inflamatórias, como resultado da disfunção mitocondrial, lipoperoxidação e ativação de vias inflamatórias (KAKIMOTO e KOWALTOWSKI, 2016). Assim, torna-se importante a investigação de ativos naturais que atuem na melhoria frente aos eventos supracitados.

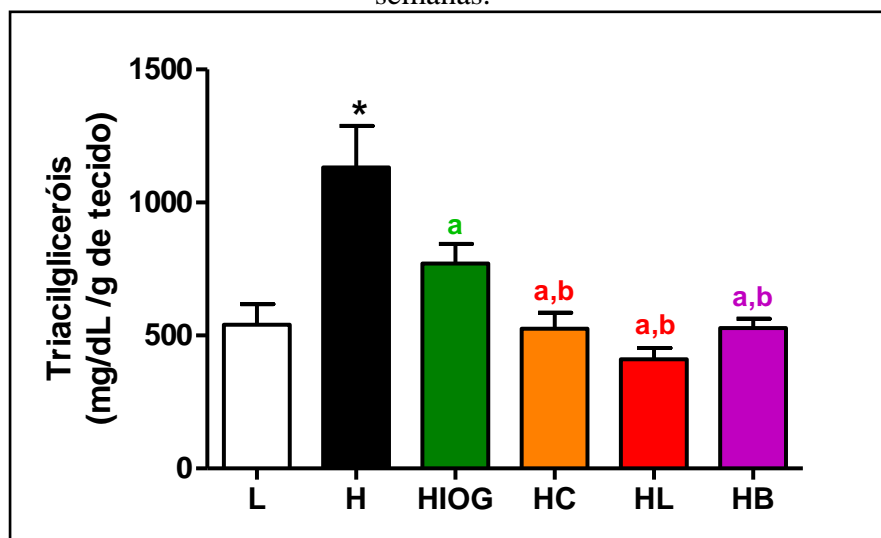
Os níveis hepáticos de triacilgliceróis foram aumentados nos animais que receberam dieta HF quando comparados com os animais que receberam a dieta LF. Os animais que receberam HF e foram tratados com o iogurte (HIOG) apresentaram redução de 32% nos níveis de triacilgliceróis quando comparados com o grupo HF, porém quando os animais foram tratados com os ativos naturais incorporados ao iogurte, a redução nos níveis hepáticos de TAG tornou-se ainda mais evidente em relação aos grupos HIOG e HF (Figura 28): os tratamentos com curcumina (HC), licopeno (HL) e bixina (HB) promoveram redução nos níveis hepáticos de triacilgliceróis de 32%, 47% e 67%, respectivamente quando comparados com o grupo HIOG.

Figura 27: Triacilglicerol plasmático (mg/dL) de camundongos alimentados com as dietas LF ou HF e tratados com curcumina, bixina ou licopeno, em iogurte, durante 8 semanas.



Os dados estão expressos como média \pm erro padrão. *diferenças com L ($p < 0,05$); a, diferenças com H; b, diferenças com HIOG; c, diferenças com HC; d, diferenças com HL; e, diferenças com HB ($p < 0,05$).

Figura 28: Triacilglicerol hepático (mg/dL /g de tecido) de camundongos alimentados com as dietas LF ou HF e tratados com curcumina, bixina ou licopeno, em iogurte, durante 8 semanas.

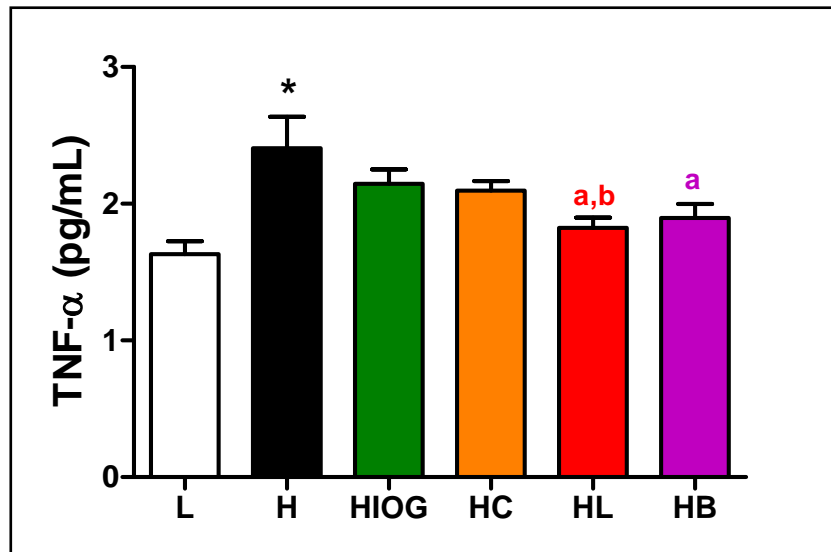


Os dados estão expressos como média \pm erro padrão. *diferenças com L ($p < 0.05$); a, diferenças com H; b, diferenças com HIOG; c, diferenças com HC; d, diferenças com HL; e, diferenças com HB ($p < 0,05$).

4.2.3 Parâmetros relacionados ao estado inflamatório, estresse oxidativo e atividade antioxidante de camundongos submetidos à dieta LF e HF, e tratados com curcumina, bixina e licopeno, em iogurte, durante 8 semanas

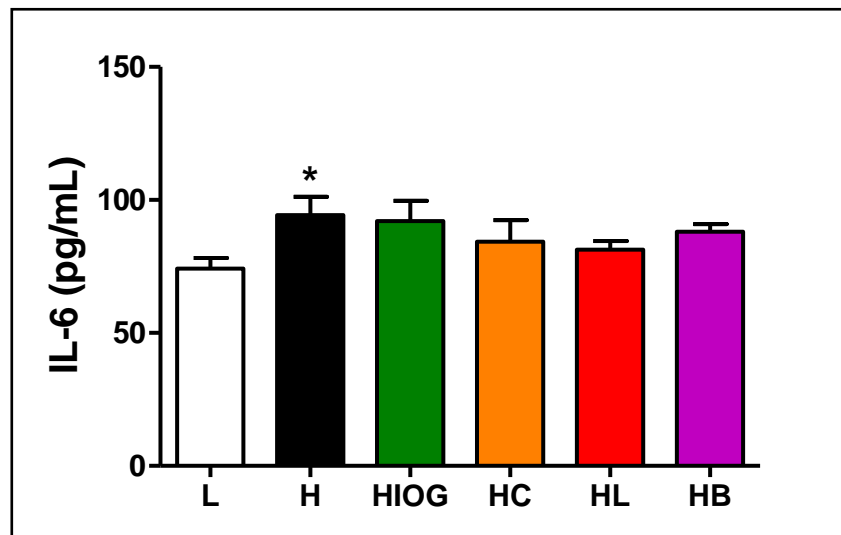
Os níveis hepáticos de TNF- α (Figura 29) e IL-6 (Figura 30) foram significativamente aumentados nos camundongos alimentados com dieta HF, em comparação aos animais alimentados com dieta LF. O tratamento com iogurte (HIOG) e o tratamento com curcumina incorporada ao iogurte (HC) não foram capazes de reduzir os níveis hepáticos de TNF- α e IL-6, apresentando resultados semelhantes ao grupo H. Os animais tratados com licopeno (HL) apresentaram redução significativa nos níveis de TNF- α , quando comparados com os grupos H e HIOG, mas não alterou os níveis de IL-6. Os animais tratados com bixina (HB) também apresentaram redução nos níveis hepáticos de TNF- α , quando comparado com o grupo H, mas também não houve alteração nos níveis de IL-6, quando comparado com os grupos H e HIOG.

Figura 29: Níveis de fator de necrose tumoral- α (pg/mL) no fígado de camundongos alimentados com as dietas LF ou HF e tratados com curcumina, bixina ou licopeno, em iogurte, durante 8 semanas.



Os dados estão expressos como média \pm erro padrão. *diferenças com L ($p < 0.05$); a, diferenças com H; b, diferenças com HIOG; c, diferenças com HC; d, diferenças com HL; e, diferenças com HB ($p < 0,05$).

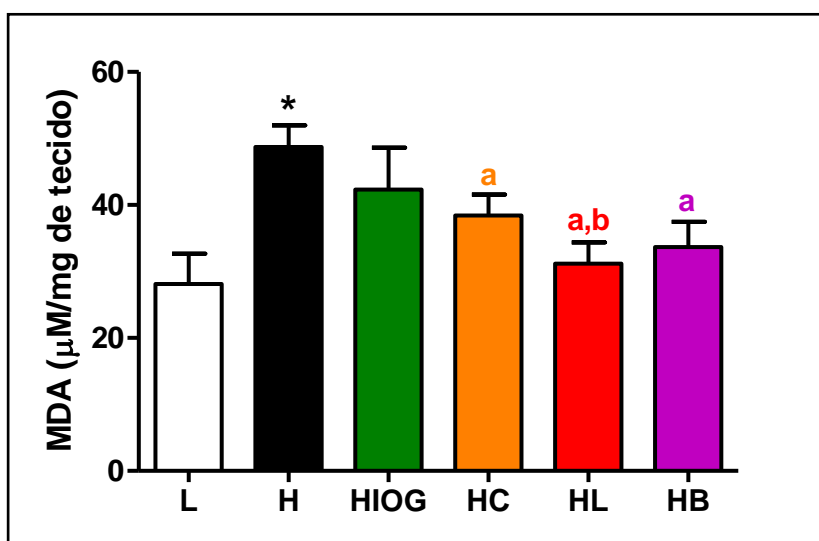
Figura 30: Níveis de interleucina-6 (pg/mL) no fígado de camundongos alimentados com as dietas LF ou HF e tratados com curcumina, bixina ou licopeno, em iogurte, durante 8 semanas.



Os dados estão expressos como média \pm erro padrão. *diferenças com L ($p < 0.05$); a, diferenças com H; b, diferenças com HIOG; c, diferenças com HC; d, diferenças com HL; e, diferenças com HB ($p < 0,05$).

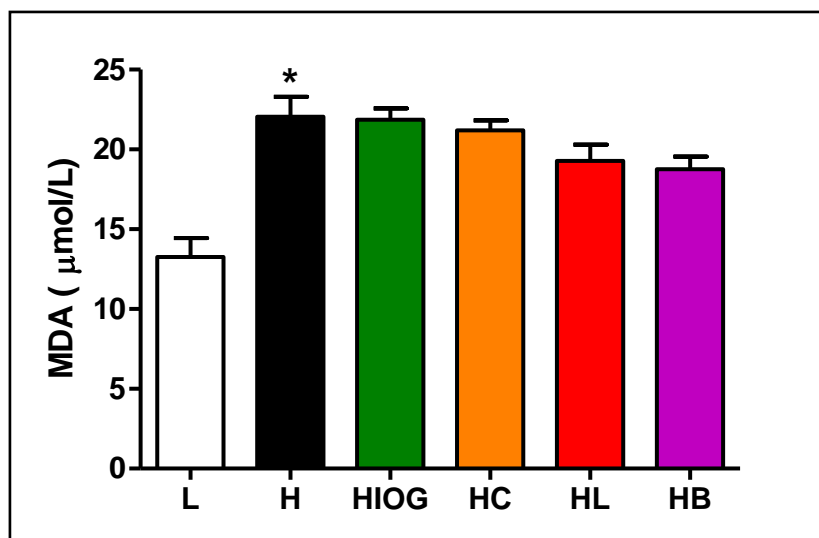
Os níveis de MDA hepático e plasmático foram aumentados nos animais do grupo H, em relação aos animais do grupo L (Figura 31 e 32, respectivamente). Os animais tratados com iogurte não apresentaram alterações nos níveis hepático e plasmático de MDA, porém os tratamentos com os antioxidantes naturais (HC, HL, HB) em iogurte mostraram uma importante redução dos níveis hepáticos de MDA, quando comparados com os animais dos grupos H ou HIOG (Figura 31). Embora tenha sido observada uma tendência de redução nos níveis de MDA plasmático em animais tratados com antioxidantes naturais, não foram observadas diferenças significativas quando comparados com os grupos H e HIOG (Figura 32).

Figura 31: Níveis de MDA ($\mu\text{M/g}$ de tecido) no fígado de camundongos alimentados com as dietas LF ou HF e tratados com curcumina, bixina ou licopeno, em iogurte, durante 8 semanas.



Os dados estão expressos como média \pm erro padrão. *diferenças com L ($p < 0,05$); a, diferenças com H; b, diferenças com HIOG; c, diferenças com HC; d, diferenças com HL; e, diferenças com HB ($p < 0,05$).

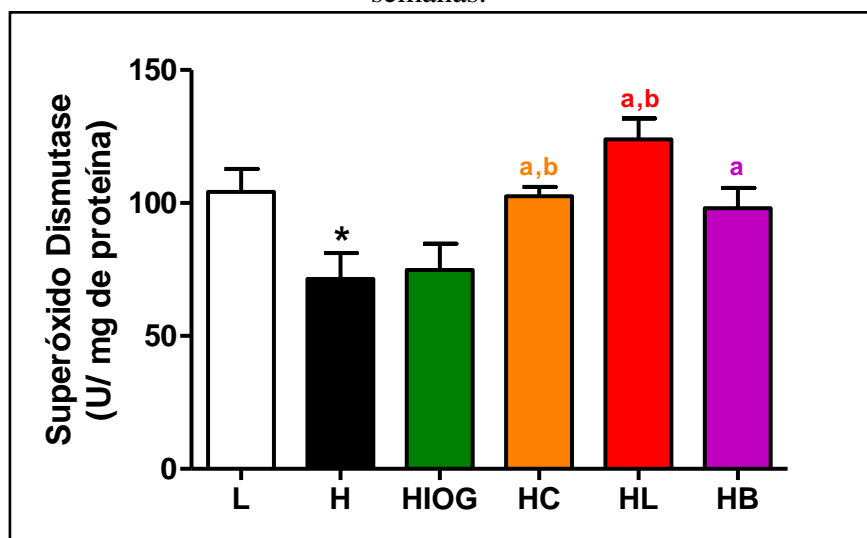
Figura 32: Níveis de MDA (μmol) plasmático de camundongos alimentados com as dietas LF ou HF e tratados com curcumina, bixina ou licopeno, em iogurte, durante 8 semanas.



Os dados estão expressos como média \pm erro padrão. *diferenças com L ($p < 0.05$); a, diferenças com H; b, diferenças com HIOG; c, diferenças com HC; d, diferenças com HL; e, diferenças com HB ($p < 0,05$).

Na Figura 33 estão apresentados os valores da atividade da SOD no fígado de animais submetidos às dietas LF ou HF, após 8 semanas de tratamento. O grupo H apresentou 32% de redução na atividade da SOD em relação do grupo L. O tratamento somente com iogurte (HIOG) não promoveu alteração na atividade da SOD, quando comparado com o grupo H. Os animais tratados com curcumina (HC), licopeno (HL) e bixina (HB) apresentaram aumento de 37%, 66%, 31%, respectivamente, na atividade da SOD, quando comparado ao grupo HIOG. É interessante observar que todos os tratamentos com os antioxidantes naturais foram capazes de prevenir a perda da atividade de SOD causada pela dieta HF.

Figura 33: Atividade da SOD (U/mg de proteína) no fígado de camundongos alimentados com as dietas LF ou HF e tratados com curcumina, bixina ou licopeno, em iogurte, durante 8 semanas.



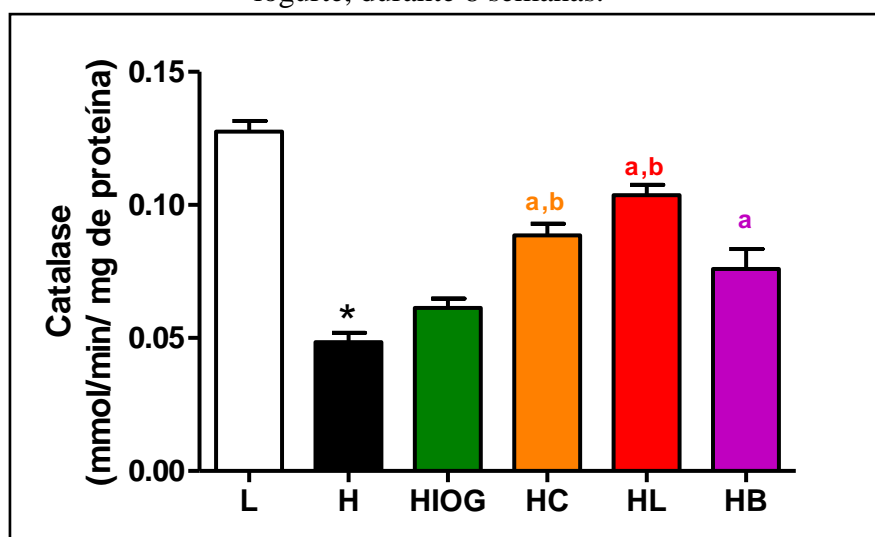
Os dados estão expressos como média \pm erro padrão. *diferenças com L ($p < 0,05$); a, diferenças com H; b, diferenças com HIOG; c, diferenças com HC; d, diferenças com HL; e, diferenças com HB ($p < 0,05$).

Os valores de atividade da CAT no fígado de animais submetidos à dieta LF ou HF, após 8 semanas de tratamento, estão apresentados na Figura 34. Houve uma significativa redução (67%) na atividade da CAT em fígado de animais alimentados com dieta HF (grupo H), quando comparado ao grupo L. Os tratamentos com curcumina (HC) ou licopeno (HL) foram capazes de aumentar 33% e 67%, respectivamente, a atividade da CAT, em relação ao grupo HIOG, e 83% e 116%, respectivamente, em relação ao grupo H. O tratamento com bixina (HB) também promoveu aumento na atividade da CAT (56%), quando comparado com o grupo H, mas quando comparado ao grupo HIOG não apresentou diferença significativa.

Na Figura 35 estão apresentados os valores de atividade da GSH-Px no fígado de animais submetidos à dieta LF ou HF, após 8 semanas de tratamento. O grupo H apresentou uma redução de 34% na atividade da GSH-Px, quando comparado ao grupo L. O tratamento somente com iogurte (HIOG) não alterou a atividade de GSH-Px, em relação ao grupo H. Os grupos HC, HL e HB apresentaram aumento na atividade de GSH-Px de 41%, 33% e 34%, respectivamente, quando comparados com o grupo HIOG, e 68%, 58% e 65%, respectivamente, em relação ao grupo H. Tal como observado com a atividade de SOD, todos os tratamentos com os antioxidantes naturais foram capazes de prevenir a perda da atividade de GSH-Px causada pela dieta HF.

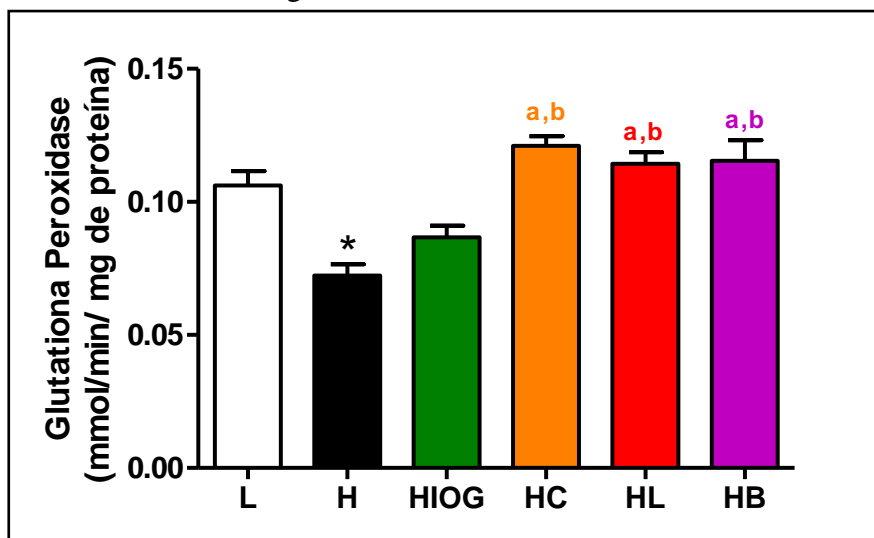
Com a análise em conjunto dos resultados referentes aos biomarcadores de lesão oxidativa (MDA) e de proteção antioxidante (atividades de SOD, CAT e GSH-Px), podemos constatar que o modelo experimental de obesidade e resistência à insulina induzido pela dieta HF, foi capaz de promover um quadro importante de estresse oxidativo. As intervenções com os ativos naturais em iogurte foram capazes de prevenir a perda das defesas antioxidantes endógenas de animais alimentados com a dieta HF, o que corrobora, pelo menos em parte, os níveis reduzidos de MDA. Assim, pode-se inferir que a capacidade antioxidante intrínseca destes compostos como um componente importante no combate ao estresse oxidativo nestes animais.

Figura 34: Atividade da CAT (mmol/min/mg de proteína) no fígado de camundongos alimentados com as dietas LF ou HF e tratados com curcumina, bixina ou licopeno, em iogurte, durante 8 semanas.



Os dados estão expressos como média \pm erro padrão. *diferenças com L ($p < 0.05$); a, diferenças com H; b, diferenças com HIOG; c, diferenças com HC; d, diferenças com HL; e, diferenças com HB ($p < 0,05$).

Figura 35: Atividade da GSH-Px (mmol/min/mg de proteína) no fígado de camundongos alimentados com as dietas LF ou HF e tratados com curcumina, bixina ou licopeno, em iogurte, durante 8 semanas.



Os dados estão expressos como média \pm erro padrão. *diferenças com L ($p < 0.05$); a, diferenças com H; b, diferenças com HIOG; c, diferenças com HC; d, diferenças com HL; e, diferenças com HB ($p < 0,05$).

5. CONCLUSÃO

Foram avaliados os efeitos de tratamentos isolados e combinados de ativos naturais, incorporados ao iogurte, em parâmetros fisiológicos, bioquímicos e biomarcadores de estresse oxidativo alterados em dois modelos experimentais de distúrbios metabólicos: em ratos sob modelo de DM tipo 1, e em camundongos sob modelo de obesidade e resistência à insulina. Os resultados mostraram diversos benefícios dos tratamentos com iogurte enriquecido com os ativos naturais, administrados de forma isolada ou em combinações, para as duas condições estudadas, fornecendo evidências importantes dos efeitos isolados e combinados da suplementação do iogurte com curcumina e co-administração com carotenoides, licopeno e bixina. Especificamente em relação às misturas dos ativos naturais em iogurte, nota-se que os benefícios combinados das misturas foram evidenciados pelo efeito anti-hiperglicêmico da curcumina associado ao aumento nos níveis de colesterol-HDL promovido pelos carotenoides, bem como foram observadas melhorias em biomarcadores de estresse oxidativo e redução da oxidação da LDL.

Foram observados efeitos benéficos dos tratamentos isolados com os ativos naturais em iogurte, e também do iogurte sozinho, frente aos distúrbios instalados no modelo de obesidade e resistência insulínica induzido por dieta hiperlipídica/hipercalórica. Em especial,

podem ser citadas as melhorias na adiposidade, acúmulo de triacilgliceróis hepático, restauração de mecanismos de defesas antioxidantes e diminuição na resistência à insulina, intolerância à glicose e perfil inflamatório.

Podemos sugerir que os ativos naturais podem exercer benefícios no combate aos prejuízos relacionados à obesidade, síndrome metabólica e diabetes mellitus. A integração destes resultados nos permite concluir que os benefícios isolados ou combinados dos tratamentos com curcumina e carotenoides incorporados em iogurte substanciam as investigações e estimulam o avanço nos estudos da utilização de misturas de ativos naturais, em especial aqueles que apresentam potencial antiaterogênico, anti-inflamatório e antioxidante, mitigando o risco cardiovascular.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL AZIZ, M.T.; EL-ASMAR, M.F.; EL NADI, E.G.; WASSEF, M.A.; AHMED, H.H.; RASHED, L.A.; OBAIA, E.M.; SABRY, D.; HASSOUNA, A.A.; ABDEL AZIZ, A.T. The effect of curcumin on insulin release in rat-isolated pancreatic islets. **Angiology**, v.61, p.557-566, 2010.

AGARWAL, S.; RAO, A.V. Tomato lycopene and low density lipoprotein oxidation: a human dietary intervention study. **Lipids**, v.33, p.981-984, 1998.

AK, T.; GÜLÇİN, I. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. **Chemico-Biological Interactions**, v.174, p.27-37, 2008.

AKIMOTO, L. S.; PEDRINHO, S.R.; LOPES, G.; BAZOTTE, R.B. Rates of gluconeogenesis in perfused liver of alloxan-diabetic fed rats. **Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.** v.107, p.65-77, 2000.

ALI, M.M.; AGHA, F.G. Amelioration of streptozotocin-induced diabetes mellitus, oxidative stress and dyslipidemia in rats by tomato extract lycopene. **The Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation**, v.69, p.371-379, 2009.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Classification and Diagnosis of Diabetes. **Diabetes Care**, v.38, p.S8-S16, 2015.

ANDERSON, J.W.; GILLILAND, S.E. Effect of fermented milk (yogurt) containing *Lactobacillus acidophilus* L1 on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans. **J Am Coll Nutr**, v.18, n.1, p. 43-50, 1999.

ANNEMA, W.; TIETGE, U. J. Regulation of reverse cholesterol transport - a comprehensive appraisal of available animal studies. **Nutr. Metab**, v. 9, p.1-18, 2012.

ANHÊ, F.F.; ROY, D.; PILON, G.; DUDONNÉ, S.; MATAMOROS, S.; VARIN, T.V.; GAROFALO, C.; MOINE, Q.; DESJARDINS, Y.; LEVY, E.; MARETTE, A. A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased *Akkermansia* spp. population in the gut microbiota of mice. **Gut microbiota**, v.0, p. 1-12, 2014.

ANHÊ, F.F.; VARIN, T.V.; LE BARZ, M.; DESJARDINS, Y.; LEVY, E.; ROY, D.; MARETTE, A. Gut Microbiota Dysbiosis in Obesity-Linked Metabolic Diseases and Prebiotic Potential of Polyphenol-Rich Extracts. **Curr Obes Rep**, p.1-12, 2015.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA), Resolução nº18, de 30 de abril de 1999.

ARCARO, C.A.; GUTIERRES, V.O.; ASSIS, R.P.; MOREIRA, T.F.; COSTA, P.I.; BAVIERA, A.M.; BRUNETTI, I.L. Piperine, a natural bioenhancer, nullifies the antidiabetic and antioxidant activities of curcumin in streptozotocin-diabetic rats. **PLoS one**, v.9, p.e113993, 2014.

ASHRAF, R.; SHAH, N.P. Immune system stimulation by probiotic microorganisms. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 54, n.7, p. 938-956, 2014.

ASTRUP, A. Yogurt and dairy product consumption to prevent cardiometabolic diseases: epidemiologic and experimental studies. **Am J Clin Nutr**, v. 99, p. 1235S-1242S, 2014.

AVIRAM, M.; ROSENBLAT, M.; BISQAIER, C.L.; NEWTON, R.S.; PRIMO-PARMO, S.L.; LA DU, B.N. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. **J. Clin. Invest.** v.101, p.1581-1590, 1998.

BALASUBRAMANYAM, M.; KOTESWARI, A.A.; KUMAR, R.S.; MONICKARAJ, S.F.; MAHESWARI, J.U.; MOHAN, V. Curcumin-induced inhibition of cellular reactive oxygen species generation: Novel therapeutic implications. **Journal Biosciences**, v.28, p.715-721, 2003.

BALLAS, Y.G.; ALVES, I.C.B.; DUARTE, W.F. Ansiedade em adolescentes portadores de diabetes mellitus. **Bol. de Psic.**, v. 56, n. 124, p. 111-125, 2006.

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

BARZEGAR, A.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A. Intracellular ROS protection efficiency and free radical-scavenging activity of curcumin. **PLoS ONE**, v.6, p.1-7, 2011.

BAYRAMOGLU, A.; BAYRAMOGLU, G.; SENTURK, H. Lycopene partially reverses symptoms of diabetes in rats with streptozotocin-induced diabetes. **Journal of medical food**, v.16, p.128-132, 2013.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutase: Improved assays and assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v.44, p.276-87, 1971.

BEERS, R.F.J.R.; SIZER, I.W. A spectrophotometric method of measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **The Journal of Biological Chemistry**, v.195, p.133-40, 1952.

BELL, I. G.; HORITA, S.; KARAM, H. J. A Polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent Diabetes Mellitus. **Diabetes**, v. 33, p.176-183, 1984.

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

BERNT, E.; BERGMEYER, H.U. Urea. In: BERGMEYER, H.U. (ed) **Methods of enzymatic analysis**, Academic Press, New York, p.401-406, 1985.

BEST, L.; ELLIOTT, A.C.; BROWN, P.D. Curcumin induces electrical activity in rat pancreatic beta-cells by activating the volume-regulated anion channel. **Biochemical Pharmacology**, v.73, p.1768–1775, 2007.

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. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. **FASEB J**, v.9, p. 1551-1558, 1995.

BROWER, V. Nutraceuticals: Poised for a healthy slice of the healthcare market? **Nature Biotechnology**, v.16, p. 728–731, 1998.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v.414, p. 813-820, 2001.

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

BRÜLL, F.; DE SMET, E.; MENSINK, R.P.; VREUGDENHIL, A.; KERKSIEK, A.; LÜTJOHANN, D.; WESSELING, G.; PLAT, J. Dietary plant stanol ester consumption improves immune function in asthma patients: results of a randomized, double-blind clinical trial. **Am J Clin Nutr.**, v.103, p. 444-453, 2016.

BUSTA, A.; ALFONSO, B.; PORETSKY, L. Role of Vitamin D in the Pathogenesis and Therapy of Type 1 Diabetes Mellitus. In: LIU, C.P. (Ed.) **Endocrinology and Metabolism - Type 1 Diabetes - Complications, Pathogenesis and Alternative Treatments**. New York: InTech, Cap. 19, 2011.

CERIELLO, A. Postprandial hyperglycemia and diabetes complications: Is it time to treat?. **Diabetes**, v.54, p.1-7, 2005.

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. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 366, p. 133-139, 2009.

CHEN, M.; SUN, Q.; GIOVANNUCI, E.; MOZAFFARIAN, D.; MANSON, J.E.; WILLETT, W.C.; HU, F.B. Dairy consumption and risk of type 2 diabetes: 3 cohorts of US adults and an updated meta-analysis. **BMC Med**, v.12, p. 215, 2014.

CHISTÉ, R.C.; YAMASHITA, F.; GOZZO, F.C.; MERCADANTE, A.Z. Simultaneous extraction and analysis by high performance liquid chromatography coupled to diode array and mass spectrometric detectors of bixin and phenolic compounds from annatto seeds. **Journal of Chromatography**, v.1218, p.57-63, 2011.

COSTA, F.R.C. Gut microbiota translocation to the pancreatic lymph nodes triggers NOD2 activation and contributes to T1D onset. **JEM**, v.213, n.7, p.1223-1239, 2016.

COYNE, T.; IBIEBELE, T.I.; BAADE, P.D.; DOBSON, A.; MCCLINTOCK, C.; DUNN, S.; LEONARD, D.; SHAW, J. Diabetes mellitus and serum carotenoids: findings of a population-based study in Queensland, Australia. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 82, p.685-693, 2005.

DE PAULA, H.; PEDROSA, M.L.; ROSSONI JÚNIOR, J.V.; HARAGUCHI, F.K.; SANTOS, R.C.; SILVA, M.E. Effect of an aqueous extract of annatto (*Bixa orellana*) seeds on lipid profile and biochemical markers of renal and hepatic function in hipercholesterolemic rats. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52, p.1373-1378, 2009.

DI MASCIO, P.; KAISER, S.; SIES, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Arch. Biochem. Biophys**, v.274, p.532-538, 1989.

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

DURRINGTON, P. N.; MACKNESS, B.; MACKNESS, M. I. Paraoxonase and atherosclerosis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.21, p.473-480, 2001.

DWYER, J.T.; WIEMER, K.L.; DARY, O.; KEEN, C.L.; KING, J.C.; MILLER, K.B.; PHILBERT, M.A.; TARASUK, V.; TAYLOR, C.L.; GAINES, P.C.; JARVIS, A.B.; BAILEY, R.L. Fortification and health: challenges and opportunities. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 6, p. 124-31, 2015.

EJAZ, A.; WU, D.; KWAN, P.; MEYDANI, M. Curcumin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes and angiogenesis and obesity in C57/BL mice. **The Journal of Nutrition**, v.139, p. 919–925, 2009.

ELIZA, J.; DAISY, P.; IGNACIMUTHU, S. Normo-glycemic and hypolipidemic effect of costunolide isolated from *Costus speciosus* (Koen ex. Retz.) Sm. In Streptozotocin-induced diabetic rats. **Chemico-Biological Interactions**, v.179, p. 329-334, 2009.

ETOH, H.; UTSUNOMIA, Y.; KOMORI, A.; MURAKAMI, Y.; OSHIMA, S.; INAKUMA, T. Carotenoids in human blood plasma after ingesting paprika juice. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v.64, p.1096-1098, 2000.

FERREIRA, J.M.; SOUSA, D.F.; SANTAS, M.B.; FONSECA, S.G.; MENEZES, D.B.; MARTINS, A.M.; DE QUEIROZ, M.G. Effects of *Bixa orellana* L. Seeds on Hyperlipidemia. **Phytotherapy Research**, v.27, p.144-147, 2013.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 226, n. 1, p. 497-509, 1956.

FORBES, J.M.; COOPER, M.E. Mechanisms of Diabetic Complications. **Physiological Reviews**, v.93, 137–188, 2013.

FUHRMAN, B.; VOLKOVA, N.; ROSENBLAT, M.; AVIRAM, M. Lycopene synergistically inhibits LDL oxidation in combination with vitamin E, glabridin, rosmarinic acid, carnosic acid, or garlic. **Antioxid. Redox Signal.**, v.2, p.491-506, 2000.

FUJISAWA, S.; ATSUMI, T.; ISHIHARA, M.; KADOMA, Y. Cytotoxicity, reactive oxygen species-generation activity and radical scavenging activity of curcumin and other related compounds. **Anti-Cancer Research**, v.24, p.563-570, 2004.

FUJIWARA, H.; HOSOKAWA, M. ZHOU, X.; FUJIMOTO, S.; FUKUDA, K.; TOYODA, K.; NISHI, Y.; FUJITA, Y.; YAMADA, K.; YAMADA, Y.; SEINO, Y.; INAGAKI, N. Curcumin inhibits glucose production in isolated mice hepatocytes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.80, p.185-191, 2008.

GAHRUIE, H.H.; ESKANDARI, M.H.; MESBAHI, G.; HANIFPOUR, M.A. Scientific and technical aspects of yogurt fortification: A review. **Food Sci Human Wellness**, v.4, p. 1-8, 2015.

GANNON, M.C.; NUTTALL, F.Q. Effect of feeding, fasting, and diabetes on liver glycogen synthase activity, protein, and mRNA in rats. *Diabetologia*, v.40, p.758-763, 1997.

GOEL, A.; KUNNUMAKKARA, A.B.; AGGARWAL, B.B. Curcumin as “curecumin”: from kitchen to clinic. **Biochemistry Pharmacology**, v.75, p.787-809, 2008.

GOLDBERG, I.J. Clinical review 124: Diabetic dyslipidemia: causes and consequences. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.86, p.965-71, 2001.

GONZÁLEZ-FERRERO, C.; SÁIZ-ABAJO, M.J. Characterization and stability studies of bioactive compounds and food matrices as evidence in support of health claims. **Int J Food Sci Nutr.**, v. 66, p. 4-12, 2015.

GUGLIUCCI, A.; MENINI, T. Paraoxonase 1 and HDL maturation. **Clin. Chim. Acta.** v.439, p.5-13, 2015.

GUO, Y.; LIU, Y.; WANG, Y. Beneficial effect of lycopene on anti-diabetic nephropathy through diminishing inflammatory response and oxidative stress. **Food Funct.**, v.6, p.1150-1156, 2015.

GUPTA, S.C.; KISMALI, G.; AGGARWAL, B.B. Curcumin, a component of turmeric: from farm to pharmacy. **Biofactors**, v.39, p.2-13, 2013.

GUTIERRES, V.O.; CAMPOS, M.L.; ARCARO, C.A.; ASSIS, R.P.; BALDAN-CIMATTI, H.M.; PECCININI, R.G.; PAULA-GOMES, S.; KETTELHUT, I.C.; BAVIERA, A.M.; BRUNETTI, I.L. Curcumin pharmacokinetic and pharmacodynamic evidences in streptozotocin-diabetic rats support the antidiabetic activity to be via metabolite(s). **Evidence Based Complementary Alternative Medicine**, p.1-13, 2015. doi:10.1155/2015/678218.

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. **The British Journal of Nutrition**, v.108, p.440-8, 2012.

HALL, M. Carbohydrates. In: Anderson, S.C.; Cockaine, S. (Eds). **Clinical Chemistry: Concepts and Applications**. New York: McGraw-Hill. cap.10, p.153-178, 2003.

HENRY, R.R.; CHILTON, R.; GARVEY, W.T. New options for the treatment of obesity and type 2 diabetes mellitus (narrative review). **J Diabetes Complications**, v.27, n.5, p. 508-518, 2013.

IDF, INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF, 2014). **The global burden**. IDF Diabetes Atlas. 6 ed. Bélgica, pp 29-49. Disponível em <http://www.idf.org/diabetesatlas>. Acesso em 15 de Junho de 2014.

JAY, D.; HITOMI, H.; GRIENDLING, K.K. Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. **Free Radical Biological Medicine**, v.40, p.183-192, 2006.

JENKINS, A.J. et al. Serum lipoproteins in the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Intervention and Complications cohort: associations with gender and glycemia. **Diabetes Care**, v.26, p.810–818, 2003.

KAPLAN, M.; AVIRAM, M.; HAYEK, T. Oxidative stress and macrophage foam cell formation during diabetes mellitus-induced atherogenesis: role of insulin therapy. **Pharmacology & Therapeutics**, v.136, p.175-85, 2012.

KARTHIKESAN, K.; PARI, L.; MENON, V.P. Combined treatment of tetrahydrocurcumin and chlorogenic acid exerts potential antihyperglycemic effect on streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. **Gen Physiol Biophys**, v. 29, p. 23-30, 2010.

KAKIMOTO, P.A.; KOWALTOWSKI, A.J. Effects of high fat diets on rodent liver bioenergetics and oxidative imbalance. **Redox Biology**, v.8, p.216-225, 2016.

GOTO, T.; TAKAHASHI, N.; HIRAI, S.; KAWADA, T. Various Terpenoids derived from herbal and dietary plants function as PPAR modulators and regulate carbohydrate and lipid metabolism. **PPAR Research**, v.48, p.39–58, 2010.

KELLY, A. M.; RAYNER, M. L.; BARNETT, A, H. Molecular Aspects of Type 1 Diabetes. **Molecular Pathology**, v.33, p. 56, 2003.

KIM, H. G.; LEE, J.H.; LEE, S.J.; OH, J.H.; SHIN, E.; JANG, Y.P.; LEE, Y.J. The increased cellular uptake and biliary excretion of curcumin by quercetin: a possible role of albumin binding interaction. **Drug Metab. Dispos.**, v.40, p.1452-1455, 2012.

KIM, J.H.; PARK, J.M.; KIM, E.K.; LEE, J.O.; LEE, S.K.; JUNG, J.H.; YOU, G.Y.; PARK, S.H.; SUH, P.G.; KIM, H.S. Curcumin stimulates glucose uptake through AMPK-p38 MAPK pathways in L6 myotube cells. **Journal of cellular physiology**, v.223, p.771-778, 2010.

KOHN, H. I.; LIVERSEDGE, M. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione. **Journal Pharmacology Experiment Ther**, v.82, p.292-300, 1944.

KUHAD, A.; SHARMA, S.; CHOPRA, K. Lycopene attenuates thermal hyperalgesia in a diabetic mouse model of neuropathic pain. **European Journal of Pain**, v.12, p.624-632, 2008.

KURODA, M.; MIMAKI, Y.; NISHIYAMA, T.; MAE, T.; KISHIDA, H.; TSUKAGAWA, M.; TAKAHASHI, K.; KAWADA, T.; NAKAGAWA, K.; KITAHARA, M. Hypoglycemic effects of turmeric (*Curcuma longa* L. rhizomes) on genetically diabetic KK-Ay mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.28, p.937-939, 2005.

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

LETCHFORD, K.; LIGGINS, R.; BURT, H. Solubilization of hydrophobic drugs by methoxy poly (ethylene glycol)-block-polycaprolactone diblock copolymer micelles: Theoretical and experimental data and correlations. **Journal Pharmaceutical Science**, v.97, p.1179-90, 2007.

LEVINE, R.L.; WILLIAMS, J.A.; STADTMAN, E.R.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v.233, p.346-357, 1994.

LESINSKI, G.B.; REVILLE, P.K.; MACE, T.A.; YOUNG, G.S.; AHN-JARVIS, J.; THOMAS-AHNER, J.; VODOVOTZ, Y.; AMEEN, Z.; GRAINGER, E.; RIEDL, K.; SCHWARTZ, S.; CLINTON, S.K. Consumption of soy isoflavone enriched bread in men with prostate cancer is associated with reduced proinflammatory cytokines and immunosuppressive cells. **Cancer Prevention Research (Phila)**, v. 8, p. 1036-44, 2015.

LIMA, L.R.P.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S.; STRINGHETA, P.C.; TINOCO, A.L.A.; SILVA, J.F. Bixina, Norbixina e Quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.38, p.196-200, 2001.

LITVINOV, D.; MAHINI, H.; GARELNABI, M. Antioxidant and anti-inflammatory role of paraoxonase 1: implication in arteriosclerosis diseases. **N. Am. J. Med. Sci**, v.4, p.523-532, 2012.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.265-275, 1951.

LUDKE, M.C.; LÓPEZ, J. Colesterol e composição dos ácidos graxos nas dietas para humanos e na carcaça suínas. **Ciência Rural**, v.29, n.1, p.181-187, 1999.

MACKNESS, M.; MACKNESS, B. Targeting paraoxonase-1 in atherosclerosis. **Expert. Opin. Ther. Targets.**, v.17, p. 829-837, 2013.

MADONNA, R.; DE CATERINA, R. Cellular and molecular mechanisms of vascular injury in diabetes part I: pathways of vascular disease in diabetes. **Vascular Pharmacology**, v.54, p.68-74, 2011.

MAHFOUZ, M. M.; ZHOU, S. Q.; KUMMEROW, F. A. Curcumin prevents the oxidation and lipid modification of LDL and its inhibition of prostacyclin generation by endothelial cells in culture. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, v.90, p.13-20, 2009.

MAITI, K.; MUKHERJEE, K.; GANTAIT, A.; SAHA, B.P.; MUKHERJEE, P.K. Curcumin-phospholipid complex: Preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats. **International Journal Pharmaceutics**, v.330, n.1-2, p.155-163, 2007.

MAZZONE, T.; CHAIT, A.; PLUTZKY, J. Cardiovascular disease risk in type 2 diabetes mellitus: insights from mechanistic studies. **Lancet**, v.371, p.1800-1809, 2008.

MCENENY, J.; WADE, L.; YOUNG, I.S.; MASSON, L.; DUTHIE, G.; MCGINTY, A.; MCMASTER, C.; THIES, F. Lycopene intervention reduces inflammation and improves HDL functionality in moderately overweight middle-aged individuals. **J. Nutr. Biochem**, v. 24, p.163-168, 2013.

MCPHERSON, H. et al. **Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**, cap.3, p.237-354, 2011.

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, p.183-191, 2007.

MEHERS, K. L.; GILLESPIE, K. M. The genetic basis for Type 1 Diabetes. **British Medical Bulletin**, v. 12, p. 115-129, 2008.

MENG, B.; LI, J.; CAO, H. Antioxidant and antiinflammatory activities of curcumin on diabetes mellitus and its complications. **Current Pharmaceutical Design**, v.19, p.2101-2113, 2013.

MILLER, N. J.; SAMPSON, J.; CANDEIAS, L.P.; BRAMLEY, P.M.; RICE-EVANS, C.A. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. **FEBS Lett.**, v.384, p.240-242, 1996.

MORAES, F.P.; COLLA, L.M. Functional foods. Part 2: the impact on current regulatory terminology. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3, 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.

MROZ, J.R. Clinical enzymology. In: ANDERSON, S.C.; COCKAYNE, S. **Clinical chemistry concepts & applications**. New York: Mc Graw-Hill, cap.11, p.179-202, 2003.

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. **Nutrition Metabolism and Cardiovascular Disease**, v.21, p.526-33, 2011.

NEWSHOLME, P.; HABER, E.P.; HIRABARA, S.M.; REBELATO, E.L.; PROCOPIO, J.; MORGAN, D.; OLIVEIRA-FILHO, 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.

OLIVEIRA, D.S.; AMADO, C.A.B.; MARTINI, M.C.; SUZUKI-KEMMELMEIER, F.; BRACHT, A. Glycogen levels and energy status of the liver of fasting rats with diabetes types 1 and 2. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.50, p.785-791, 2007.

OLSON, J.A.; KRINSKY, N.I. Introduction: the colorful fascinating world of the carotenoids: important physiological modulators. **FASEB J**, v. 9, p. 1547-1550, 1995.

PALOZZA, P.; CATALAMO, A.; SIMONE, R.E.; MELE, M.C.; CITTADINI, A. Effect of lycopene and tomato products on cholesterol metabolism. **Nutrition & Metabolism**, v.61, p.126-134, 2012.

PAN, M.H.; HUANG, T.M.; LIN, J.K.. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 27, n. 4, p. 486–494, 1999.

PANDEY, A.; GRUPTA, R.K.; SRIVASTAVA, R. Curcumin - the yellow magic. **Asian Journal of Applied Sciences**, v.4, p.343-354, 2011.

PARI, L.; MURUGAN, P. Influence of tetrahydrocurcumin on tail tendon collagen contents and its properties in rats with streptozotocin-nicotinamide induced type 2 diabetes. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v.21, p.665-671, 2007.

PARK, J. S., MATHISON, B. D., CHEW, B. P. Uptake and immunomodulatory role of bixin in dogs. **J. Anim. Sci.**, v.94, n.1, p.135-143, 2016.

PARKER, R. S. Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. **FASEB J.**, v.10, p.542-551, 1996.

PAULI, J.R. Obesidade e diabetes: bases moleculares da etiopatogenia. In: CINTRA, D.E.; ROPELLE, E.R.; PAULI, J.R. **Obesidade e diabetes – fisiopatologia e sinalização celular**. Local: São Paulo, Ed. Sarvier, 2011.

PAUMGARTTEN, F.J.R.; DE-CARVALHO, R.R.; ARAÚJO, I.B. Evaluation of the developmental toxicity of annatto in the rat. **Food Chem Toxicol.**, v.40, p. 1595–1601, 2002.

PAZ, M.; GÚLLON, P.; BARROSO, M.F.; CARVALHO, A.P.; DOMINGUES, V.F.; GOMES, A.M.; BECKER, H.; LONGHINOTTI, E.; DELERUE-MATOS, C. Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds. **Food Chemistry**, v.172, p.462-468, 2015.

PERERA, P.K.; LI, Y. Functional herbal food ingredients used in type 2 diabetes mellitus. **Pharmacognosy Reviews**, v.6, p. 37-45, 2012.

PICKUP, J.C.; WILLIAMS, G. **Textbook of Diabetes**. Oxford, UK: Blackwell Science, 2003.

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. **Journal of Chromatography**, v. 742, p. 315-325, 2000.

PRADA, P.O.; SAAD, M.J.A. Bases moleculares da sinalização da insulina. In: CINTRA, D.E.; ROPELLE, E.R.; PAULI, J.R. **Obesidade e diabetes – fisiopatologia e sinalização celular**. Local: São Paulo, Ed. Sarvier, 2011.

PROTZEK, A. O.; RAFACHO, A.; VISCELLI, B.A.; BOSQUEIRO, J.R.; CAPPELLI, A.P.; PAULA, F.M.; BOSCHERO, A.C.; PINHEIRO, E.C. Insulin and glucose sensitivity, insulin

secretion and β -cell distribution in endocrine pancreas of the fruit bat *Artibeus lituratus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 157, p. 142–148, 2010.

QIAO, Y.; SUN, J.; XIE, Z.; SHI, Y.; LE, G. Propensity to high-fat diet-induced obesity in mice is associated with the indigenous opportunistic bacteria on the interior of Peyer's patches. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, v. 55, n. 2, p. 120-128, 2014.

QURESHI, S.; SHAH, A.H.; AGEEL, A.M. Toxicity studies on *Alpinia galanga* and *Curcuma longa*. **Planta Medica**, v. 58, n. 2, p.124-127, 1992.

RAO, A.V. Lycopene tomatoes and the prevention of coronary heart disease. **Experimental Biology and Medicine**, v. 227, p.908-913, 2002.

RAO, A.V.; AGARWAL, S. Role of Antioxidant Lycopene in Cancer and Heart Disease. **Journal of the American College of Nutrition**, v.19, p. 563-569, 2000.

REIN, M.J.; RENOUF, M.; CRUZ-HERNANDEZ, C.; ACTIS-GORETTA, L.; THAKKAR, S.K.; DA SILVA PINTO, M. Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75, p.588-602, 2013.

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**. 40 ed. St. Louis: Elsevier Saunders, cap.26, p.903-981, 2006.

ROEHR, M.; FIGUEIREDO, C.G.; ZANCHI, M.M.; BOCHI, G.V.; MORESCO, R.N.; QUATRIN, A.; SOMACAL, S.; CONTE, L. EMANUELLI, T. Bixin and Norbixin have opposite effects on glycemia, lipidemia, and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. **International Journal of Endocrinology**, v. 2014, p.1-10, 2014.

RUSH, J.W.; SCANDIFORD, S.D. Plasma glutathione peroxidase in healthy young adults: influence of gender and physical activity. **Clinical Biochemistry**, v.36, p.345-351, 2003.

SAMPLE, C. H.; MARTIN, A.A.; JONES, S.; HARGRAVE, S.L.; DAVIDSON, T.L. Western-style diet impairs stimulus control by food deprivation state cues: implications for obesogenic environments. **Appetite**, v.93, p. 13-23, 2015.

SCANDINAVIAN SOCIETY FOR CLINICAL CHEMISTRY AND CLINICAL PHYSIOLOGY. Recommended methods for the determination of four enzymes in blood. **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. **Analytical Biochemistry**, v.25, p.192-205, 1968.

SEO, K.I.; CHOI, M.S.; JUNG, U.J.; KIM, H.J.; YEO, J.; JEON, S.M.; LEE, M.K. Effect of curcumin supplementation on blood glucose, plasma insulin, and glucose homeostasis related enzyme activities in diabetic db/db mice. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.52, p.995-1004, 2008.

SHAIKH, J.; ANKOLA, D.D.; BENIWAL, V.; SINGH, D.; KUMAR, M.N. Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption enhancer. **European Journal Pharmaceutical Science**, v.37, n.3-4, p.223-230, 2009.

SHARMA, S.; KULKARNI, S.; CHOPRA, K. Curcumin the active principle of turmeric (*Curcuma longa*), ameliorates diabetic nephropathy in rats. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, v.33, p.940-945, 2006.

SHAW, J.E.; SICREE, R.A.; ZIMMET, P.Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.87, p.4-14, 2010.

SHOBA, G.; JOY, D.; JOSEPH, T.; MAJEED, M.; RAJENDRAN, R.; SRINIVAS, P.S. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. **Planta Medica**, v.64, n.4, p.353-356, 1998.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.62, p.1315S-1321S, 1995.

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. **Clinical and Experimental Hypertension**, v.26, p.43-53, 2004.

SLUIJS, I.; CADIER, E.; BEULENS, J.W.; VAN DER A, D.L.; SPIJKERMAN, A.M.; VAN DER SCHOUW, Y.T. Dietary intake of carotenoids and risk of type 2 diabetes. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.** v.25, p.376-381, 2015.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2009.

SRINIVASAN, S.R.; BERENSON, G.S.; RADHAKRISHNAMURTHY, B. Glycoprotein changes in diabetic kidneys. **Diabetes**, v.19, p.171-175, 1970.

STAHL, W.; SCHWARZ, W.; SIES, H. Human serum concentrations of all-trans-beta-carotene and alpha-carotene but not 9-cis-beta-carotene increase upon ingestion of a natural isomer mixture obtained from *Dunaliella salina* (Betatene). **Journal Nutritional**, v.123, p. 847-851, 1993.

STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. **Molecular Aspects of Medicine**, v.24, p. 345-351, 2003.

STRUIJK, E.A.; HERACLIDES, A.; WITTE, D.R.; SOEDAMAH-MUTHU, S.S.; GELEIJNSE, J.M.; TOFT, U.; LAU, C.J. Dairy product intake in relation to glucose regulation indices and risk of type 2 diabetes. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v.23, n.9, p. 822-828, 2013.

TAKAHASHI, N.; GOTO, T.; TAIMATSU, A.; EGAWA, K.; KATOH, S.; KUSUDO, T.; SAKAMOTO, T.; OHYANE, C.; LEE, J.Y.; KIM, Y.I.; UEMURA, T.; HIRAI, S.; KAWADA, T. Bixin regulates mRNA expression involved in adipogenesis and enhances insulin sensitivity in 3T3-L1 adipocytes through PPAR γ activation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.390, p.1372–1376, 2009.

TANNUS, L.R.M.; OLIVEIRA, D.S.; MATHEUS, A.S.; CUNHA, E.F.; GOMES, M.B. Diabetes mellitus do tipo 1A na primeira infância de gêmeos dizigóticos: associação entre fatores genéticos e ambientais. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.51, p.142-146, 2007.

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

TOCCHINI, A.Z. MERCADANTE, A.Z.Extração e determinação, por CLAE, de bixina e norbixina em coloríficos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, p.310-313, 2001.

VAREED,S.K.; KAKARALA, M.; RUFFIN, M.T. Pharmacokinetics of curcumin conjugate metabolites in healthy human subjects. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 17, n. 6, p. 1411–1417, 2008.

VAZQUEZ PRIETO, M.A.; BETTAIEB, A.; RODRIGUEZ LANZI, C.; SOTO, V.C.; PERDICARO, D.J.; GALMARINI, C.R.; HAJ, F.G.; MIATELLO, R.M.; OTEIZA, P.I. Catechin and quercetin attenuate adipose inflammation in fructose-fed rats and 3T3-L1 adipocytes. **Molecular nutrition & food research**, v. 59, n. 4, p. 622-633, 2015.

VIES, V.D. Two methods for the determination of glycogen in liver. **The biochemical journal**, v.57, p.410-416, 1953.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Progress on the health-related Millenium Development Goals**. World Health Statistics, 2015.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Mortality Country Fact Sheet**. World Health Statistics, 2006.

WISE, J. Eating a yoghurt a day is linked to lower risk of type 2 diabetes. **BMJ**, v. 349: p. g7081, 2014.

WRÓBLENSKI, F.; LADUE, J. S. Serum glutamic- pyruvic transminase in cardiac and hepatic deases. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.91, p.569-571, 1956.

XU, E.; DUBOIS, M.J.; LEUNG, N.; CHARBONNEAU, A.; TURBIDE, C.; AVRAMOGLU, R.K.; DEMARTE, L.; ELCHEBLY, M.; STREICHERT, T.; LÉVY, E.; BEAUCHEMIN, N.; MARETTE, A. Targeted disruption of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 promotes diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. **Endocrinology**, v. 150, p. 3503-3512, 2009.

YANG, M.; WU, Y.; LI, J.; ZHOU, H.; WANG, X. Binding of curcumin with bovine serum albumin in the presence of ι -carrageenan and implications on the stability and antioxidant activity of curcumin. **J. Agric. Food Chem.**, v.61, p.7150-7155, 2013.

YEGIN, S. C.; YUR, F.; CEYLAN, E. Effect of lycopene application in rats with experimental diabetes using lipoprotein, paraoxonase and cytokines. **J. Membr. Biol.**, v.246, p.621-626, 2013.

YU, W.; WU, J.; CAI, F.; XIANG, J.; ZHA, W.; FAN, D.; GUO, S.; MING, Z.; LIU, C. Curcumin alleviates diabetic cardiomyopathy in experimental diabetic rats. **PLoS one**, v.7, p.e52013, 2012.

ZHANG, D.W.; FU, M.; GAO, S.H.; LIU, J.L. Curcumin and diabetes: a systematic review. **Evid Based Complement Alternat Med**, ID 636053, p.1-16, 2013.

ZHU, J.; WANG, C.G.; XU, Y.G. Lycopene attenuates endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats by reducing oxidative stress. **Pharmaceutical Biology**, v.49, p.1144-1149, 2011.

CAPÍTULO 2

5493691: Acknowledging Receipt

De : Oxidative Medicine and Cellular Longevity
<mohamed.elhamy@hindawi.com>

Ter, 20 de set de 2016
20:10

Assunto : 5493691: Acknowledging Receipt

Para : brunetti@fcfar.unesp.br

Cc : mohamed elhamy
<mohamed.elhamy@hindawi.com>, renatapires 17
<renatapires_17@hotmail.com>, carlos arcaro
<carlos_arcaro@hotmail.com>, vania orteg
<vania_orteg@hotmail.com>, juoriel@hotmail.com,
costapi@fcfar.unesp.br, baviera@fcfar.unesp.br

Dear Dr. Lourenço Brunetti,

The Research Article titled "Combined effects of curcumin and lycopene or bixin in yoghurt on inhibition of the LDL oxidation and the increase in HDL levels in streptozotocin-diabetic rats," by Renata Pires Assis, Carlos Alberto Arcaro, Vânia Ortega Gutierrez, Juliana Oriel Oliveira, Paulo Inácio da Costa, Amanda Martins Baviera and Iguatemy Lourenço Brunetti has been received and assigned the number 5493691.

All authors will receive a copy of all the correspondences regarding this manuscript.

Thank you for submitting your work to Oxidative Medicine and Cellular Longevity.

Best regards,

Mohamed Elhamy
Editorial Office
Hindawi Publishing Corporation
<http://www.hindawi.com>

Combined effects of curcumin and lycopene or bixin in yoghurt on inhibition of the LDL oxidation and the increase in HDL levels in streptozotocin-diabetic rats

Renata Pires Assis, Carlos Alberto Arcaro, Vânia Ortega Gutierrez, Juliana Oriel Oliveira, 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

Rodovia Araraquara Jaú, km 01 – s/n, Campos Ville, Araraquara, São Paulo, Brazil

CEP 14800-903

Phone: +55 16 3301 5703

Fax: +55 16 3322 0073

E-mail: brunetti@cfar.unesp.br

Abstract

Combination therapy based on natural compounds from medicinal plants or functional foods to manage diabetes mellitus and its complications is an emerging trend. The aim of this study was to investigate the changes promoted by the treatment of streptozotocin (STZ)-diabetic rats with yoghurt enriched with curcumin and carotenoids (lycopene or bixin), isolated or in mixtures, on biomarkers of metabolic and oxidative disturbances, mainly those associated with the cardiovascular risk. The treatment (50 days) of STZ-diabetic rats with yoghurt enriched with isolated antioxidants improved various parameters: glycemia, triglycerides and total-cholesterol plasma levels were decreased; the activities of antioxidant enzymes in plasma (paraoxonase) and liver (superoxide dismutase, catalase) were increased and biomarkers of oxidative stress were reduced, including oxidized-LDL. Isolated carotenoids, but not curcumin, increased the high-density lipoprotein (HDL) cholesterol levels. The treatment with mixtures of curcumin and lycopene or bixin had combined effects, mainly those related to the reduction of oxidized-LDL levels and increase of HDL. These findings provided evidences for the combined beneficial effects of the treatment with yoghurt enriched with curcumin and carotenoids, substantiating the need of ongoing investigations for the use of mixtures of natural antioxidants as a supplementation having antiatherogenic potential, mitigating the cardiovascular risk in diabetes.

Key words: diabetes mellitus, curcumin, bixin, lycopene, combined effects, oxidative stress, cardiovascular risk

Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a chronic endocrine syndrome resulting from a deficiency in pancreas insulin production and/or insulin resistance in target tissues, leading to several impairments in carbohydrate, lipid and protein metabolism. In uncontrolled DM, hyperglycemia, dyslipidemia and various microvascular complications (diabetic nephropathy, retinopathy and neuropathy) and macrovascular manifestations (atherosclerosis, coronary artery diseases, stroke) can be observed, these are the major source of morbidity and mortality related to this disease [1]. DM affects approximately 415 million people worldwide, with estimation to rise to 642 million by 2040 [2]. Many countries experienced a fast economic and social development in the last decades, which caused concomitant shifts in dietary structure and lifestyle, leading to an excessive caloric intake and the adoption of sedentary behavior, thus accounts for the epidemic proportions of obesity and DM (mainly type 2 DM) all around the world [3]. Furthermore, despite the knowledge of the disease etiology and the existence of many therapeutic options, approximately 11% of the global health expenditure is directed to the treatment of DM and its related complications [4].

Individuals with DM have many risk factors for cardiovascular diseases (CVD), such as dyslipidemia [elevated circulating levels of triglycerides, free fatty acids and low-density lipoprotein (LDL) cholesterol, and low levels of high-density lipoprotein (HDL) cholesterol], central adiposity and hypertension [5]. CVD is the leading cause (approximately 70%) of death in people with DM [6]. Advances in the comprehension of the pathophysiological basis of CVD in DM have pointed that the combination of various factors, including oxidative stress, endothelial dysfunction, and low-grade inflammation accounts for the increased risk of CVD in people with diabetes [7]. Oxidative stress in DM originates from the increased reactive oxygen species (ROS) production mostly via mitochondrial electron transport chain [8] due to hyperglycemia maintenance. Oxidative stress in DM is a widely accepted participant in the production of oxidized LDL (ox-LDL) [9].

Under conditions of oxidative stress, metal ions or oxidants in arterial wall cells cause oxidation of phospholipids in LDL, and subsequent lipid peroxidation chain reactions produces 4-hydroxynonenal, acrolein and malondialdehyde, which lead to the chemical modification of apoB protein [10]. Ox-LDL is crucial for the development of atherosclerotic lesions [11,12]; the uptake of this modified lipoprotein occurs via scavenger receptors found in macrophages resulting in the generation of foam cells, the hallmark of the atherosclerotic

lesions formation [13]. Also, ox-LDL has various proatherosclerotic effects, such as endothelial dysfunction via stimulation of superoxide anion radical ($O_2^{\bullet-}$) production and smooth muscle vascular remodeling [14].

Considering the central role of oxidative stress in the pathogenesis of CVD, efforts have been made to the development of effective strategies based on natural antioxidants in the prevention of LDL oxidation [15].

Furthermore, a therapeutic intervention able to control the glycemia and to increase the HDL levels will offer additional protection against the long-term diabetic complications. An interesting approach to reach a wide range of beneficial effects in the treatment of DM, is the therapy based on the combination of natural products.

Combination therapy based on natural compounds from medicinal plants or functional foods to manage DM and its complications is an emerging trend [16,17], mainly due to their antioxidant potential. It must be highlighted that, in vegetables and fruits, natural antioxidants exist in combination; they act in combination for the promotion of antioxidant and other pharmacological properties, explaining the health benefits of these foods [18]. Due to the high consumption of yoghurt, fortification of this functional food with mixtures of natural compounds has recently appearing as an interesting option to treat or prevent chronic diseases [19].

Despite the studies showing the beneficial effects of curcumin and the carotenoids, lycopene and bixin, in the treatment of metabolic disturbances [20-22], there is no data available, as far as we know, about the *in vivo* beneficial effects of these natural ingredients when in mixtures. Therefore, the aim of the present study was to investigate the changes promoted by the long-term treatment of STZ-diabetic rats with yoghurt enriched with curcumin (from *Curcuma longa* L. rhizomes) lycopene (found in tomatoes, watermelon, papaya, guava and grapefruit) or bixin (from *Bixa orellana* L. seeds), isolated and in mixtures, on various biomarkers related to the metabolic and oxidative disturbances observed in this experimental model of DM.

Material and Methods

Animals

Male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) weighing 150 ± 10 g (6 weeks) were maintained 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 received water and lab chow diet (Presence, Brazil) *ad libitum* throughout the 50 days of experiment. The experimental procedures were approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation from the School of Pharmaceutical Sciences, UNESP, Araraquara, SP (CEUA/FCF/CAr resolution number 44/2013).

Induction of the experimental diabetes mellitus

After an acclimation period, 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 12-h fasted rats. Normal rats received only citrate buffer. For this procedure, all the animals were anesthetized with isoflurane. Three days after the STZ administration, rats with post-prandial glycemia values of approximately 450 mg/dL were used in the diabetic groups. Glycemia levels were determined by the glucose oxidase method [23] using commercial kit (Labtest Diagnostica SA, Brazil). Diabetic animals were matched into the different experimental groups using similar values of glycemia and body weight.

Experimental design and treatment

Curcumin (65%, Sigma Aldrich, USA), bixin (60%, Lychnoflora, Brazil) or lycopene (10.13%, PHD Com. Imp. Exp. LTDA, Brazil) were mixed with commercial plain yoghurt (170 g contain 9.1 g carbohydrates, 6.8 g protein, 7.0 g total fat, 126 kcal) (Nestlé, Brazil) using a homogenizer (27,000 rpm) for 90 seconds at a controlled ambient temperature (25°C).

Diabetic rats were distributed into seven groups (10 rats/group): diabetic rats treated with yoghurt (DYOG); 90 mg/kg curcumin in yoghurt (DC); 5.5 mg/kg bixin in yoghurt (DB); 90 mg/kg curcumin + 5.5 mg/kg bixin (DCB) in yoghurt; 45 mg/kg lycopene in yoghurt (DL); 90 mg/kg curcumin + 45 mg/kg lycopene (DCL) in yoghurt; 4U insulin (DINS). It was also performed a group of normal rats treated with yoghurt (NYOG). The treatments, except for DINS, were performed by gavage, twice a day, at 08:00 h and 17:00 h, for 50 days. The

natural compounds were administered as a half dose in 0.5 mL of yoghurt, totaling 1.0 mL/rat/day of treatments. DINS rats received two subcutaneous injections of insulin, 2U/rat each injection, at 08:00 h and 17:00 h, during 50 days.

It is important to mention that the animals were submitted to 12-h fasting for sample collections, each every 10 days during the experimental period, to minimize the interference of food intake in the results of lipid profile. Plasma samples were obtained of blood collected from the tip of the tail of the animals, in heparinized (Hemofol, Brazil; 5,000 UI/mL) microtubes, after a peripheral vasodilatation. The blood was centrifuged for 10 minutes at 2500 rpm and the plasma obtained was separated for the biochemical determinations.

At every 10 days, it were determined the body weight and the plasma levels of glucose, triglycerides (TG) and total-cholesterol (total-C), using commercial kits from Labtest Diagnostica SA, Brazil. After 50 days of treatments, the rats were euthanized by decapitation and blood samples were used for the determination of plasma biochemical parameters aforementioned. In addition, plasma samples were used for the measurement of HDL-cholesterol (HDL) using commercial kits from Labtest Diagnostica SA, Brazil, malondialdehyde (MDA) and oxidized LDL (ox-LDL). The epididymal and retroperitoneal white adipose tissues and the skeletal muscles *soleus* and *extensor digitorum longus* (EDL) were removed and weighed. A piece of the liver was also removed and frozen (-80°C) for the subsequent use for the analysis of biomarkers of oxidative damage, activities of antioxidant enzymes and GSH levels.

Oxidative stress biomarkers

Lipid peroxidation (LPO)

Liver samples (0.25 g) 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 to Pilz et al. [24]. LPO dienes products, including MDA, were measured through thiobarbituric acid (TBA) reaction [25]. MDA levels were measured spectrophotometrically at 535 nm (liver) or fluorometrically with excitation and emission wavelengths of 510 and 553 nm, respectively (plasma). 1,1,3,3-tetramethoxypropane was used as standard. The results were expressed as $\mu\text{mol/L/g}$ tissue (liver) or $\mu\text{mol/L}$ of MDA (plasma).

Protein carbonyl groups (PCO)

The PCO levels in liver were determined according to Levine et al. [26]. The carbonyl groups in proteins reacts with 2,4-dinitrophenylhydrazine to form 2,4 dinitrophenylhydrazone, which was monitored spectrophotometrically at 370 nm. The concentration of PCO was obtained by the molar extinction coefficient of the hydrazine ($22000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Results were expressed as $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein.

Oxidized LDL (ox-LDL)

Plasma levels of oxidized LDL were measured by enzyme immunoassay (ELISA) (Uscn Life Science Inc., Wuhan, Hubei, China). The results were expressed as ng/mL.

Reduced glutathione (GSH)

Non-protein sulphhydryl groups represent an indirect measurement of GSH and were determined according to Sedlak and Lindsay [27], measuring the reduction of 5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) at 412 nm. Results were expressed as mmol/L/g tissue (liver).

Paraoxonase 1 (PON1) activity

PON1 activity was determined according to Costa et al. [28], with modifications. Plasma PON1 activity was measured by the hydrolysis of paraoxon and release of *p*-nitrophenol.

The assay mixture contained 10 μL of plasma in 15 mM Tris/HCl buffer (pH 8.5) containing 0.15 mM CaCl_2 , 0.3 M NaCl, and 1.2 mM of freshly prepared paraoxon. The stock solution of 120 mM paraoxon was prepared in acetone, kept on ice; before the use these stock solution was diluted 1:40 in water, and its concentration was monitored at 265 nm, using the molar extinction coefficient of paraoxon in water ($8,900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [29].

The assay was performed at 37°C and started by the addition of paraoxon, and the activity was monitored during 5 minutes at 405 nm. The results were calculated assuming the molar extinction coefficient of *p*-nitrophenol ($18,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, [30]). The PON1 activity was expressed in units/liter, where unit = μmol paraoxon hydrolyzed/min.

Activities of the antioxidant enzymes in liver

Sample preparation

Liver samples (0.1 g) 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 the activities of SOD, CAT and GSH-Px. The protein levels in the supernatants were determined according to Lowry et al. [31], using bovine serum albumin as standard.

Superoxide dismutase (SOD) activity

SOD activity was evaluated according to Beauchamp and Fridovich [32]; the oxidation of xanthine generates superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) by the catalytic action of xanthine oxidase, which reduces nitroblue tetrazolium chloride (NBT) to a formazan product. In the presence of SOD, inhibition of NBT reduction occurs, which is monitored at 550 nm. The 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%.

Catalase (CAT) activity

CAT activity was measured by monitoring the disappearance of hydrogen peroxide (H_2O_2) at 230 nm [33]. The results were expressed as mmol of H_2O_2 consumed/min/mg protein.

Glutathione peroxidase (GSH-Px) activity

GSH-Px activity was evaluated according to Rush and Sandiford [34]. GSH-Px 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. The results were expressed as mmol of NADPH consumed/min/mg protein.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm standard error of mean (SEM). Statistical analysis was performed using One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student-Newman-

Keuls test to compare the temporal inter-group differences in body weight and in biochemical and oxidative stress biomarkers. Paired Student's t test was used to compare the intra-group changes in the parameters relative to day 0. Data were considered statistically different at $p < 0.05$. Statistical analyses were performed using the program Graphpad InStat 3.05 (GraphPad Software, USA).

Results

Body weight, adipose tissues and skeletal muscles weights

NYOG rats showed an evident body weight gain when compared with DYOG group (Figure 1A), and the weights of adipose tissues (Figure 1B) and skeletal muscles (Figure 1C) of NYOG rats were higher than DYOG, DC, DB, DCB, DL and DCL rats. DYOG rats had minor weights of adipose tissues (Figure 1B) and skeletal muscles (Figure 1C), corroborating the minor body weight gain (Figure 1A). Diabetic animals treated with insulin (DINS) had body weight gain similar that of NYOG group (Figure 1A), also having high weights of adipose and muscle tissues (Figures 1B and 1C, respectively).

Diabetic rats treated with curcumin (DC) showed a significant body weight gain when compared with DYOG rats, mainly after the 40th day of treatment (Figure 1A). Curcumin also promoted a significant increase in the weights of epididymal adipose tissues (Figure 1B) and *soleus* and EDL skeletal muscles (Figure 1C). The treatments of diabetic rats with bixin (DB) or lycopene (DL) did not promote any change in the body weight gain (Figure 1A) and in the weights of adipose tissues and skeletal muscles in comparison with DYOG rats (Figures 1B and 1C, respectively).

The co-administration of curcumin + bixin (DCB) promoted a significant body weight gain, from the 40th day of treatment, when compared with DYOG rats (Figure 1A), showing the benefits of this combined supplementation in comparison with the treatment with bixin alone. Similarly, in DCB rats, the weights of *soleus* and EDL muscles (Figure 1C) and epididymal adipose tissues (Figure 1B) were higher than values of DYOG. Although the co-administration of curcumin + lycopene (DCL) did not cause an increase in the body weight gain of diabetic rats, the weights of epididymal adipose tissues (Figure 1B) and of *soleus* and EDL muscles (Figure 1C) and were higher in DCL rats than values of DYOG. It can be concluded that the treatment with curcumin promoted an increase in the body weight gain and

preservation of adipose and muscle tissues, benefits that were maintained when curcumin was co-administered with bixin or lycopene.

Plasma glucose levels

All the groups having STZ-diabetic rats showed initial plasma glucose levels of approximately 450 mg/dL. It is important to mention that animals were matched based on glycemia values of fed state, but all other blood samples were collected after a 12-h fasting, due to the need to investigate the effects of the treatments on lipid profile.

According to the Figure 2A, it can be noted that DYOG rats showed a progressive increase in the glycemia levels, evidencing the worsening of diabetes; whereas DINS rats presented plasma glucose values near to values of normoglycemia, showing the effectiveness of insulin treatment in the glucose correction and the responsiveness of the experimental model to antihyperglycemic interventions. Glycemia of NYOG rats remained within normal values since the matching until the end of experiment (Figure 2A).

Diabetic rats treated with curcumin-enriched yoghurt (DC) showed a decrease in fasting glycemia levels, reaching values similar those of rats treated with insulin (DINS). Diabetic rats treated with yoghurt enriched with bixin (DB) or lycopene (DL) also had minor glycemia levels, when compared with DYOG (Figure 2A). It should be noted that the treatment with bixin diminished the glycemia of diabetic rats, however the values were higher than NYOG and DINS groups. Also, the glycemia levels of DB rats were significantly increased after 40 days of treatment, when compared with day 0 (Figure 2A).

The treatments with curcumin + bixin (DCB) or curcumin + lycopene (DCL) showed to be more effective in the glycemia reduction than the isolated treatments with the carotenoids; DCB and DCL rats had glycemia levels near to values of DC rats (Figure 2A). It can be concluded that the co-administration curcumin + lycopene or curcumin + bixin added benefits for the glycemia control of diabetic rats in comparison with to the isolated carotenoids, mainly for bixin.

Lipid profile

The NYOG group had fasting levels of TG (Figure 3A), total-C (Figure 3B) and HDL (Figure 4A) within the normal values. DYOG rats showed profound changes in lipid

metabolism biomarkers. It was observed a progressive increase in TG levels throughout the experimental period (Figure 3A), as well as elevated total-C levels (Figure 3B) and low HDL levels in the 50th day of the experiment (Figure 4A). The treatment with insulin (DINS) was effective in reducing the TG and total-C levels (Figures 3A and 3B, respectively) to values similar those of NYOG rats. However, the HDL levels were not changed in diabetic rats treated with insulin, which remained low after 50 days of treatment (Figure 4A).

Fasting TG in DC rats were maintained at low levels, since the 10th day of the treatment, with values similar those found in NYOG and DINS rats (Figure 3A). The total-C levels were also decreased in DC rats (Figure 3B), since the 10th day of the treatment, when compared with DYOG rats; however, no changes were observed in HDL levels of diabetic rats treated with curcumin-enriched yoghurt (Figure 4A).

The treatment of diabetic rats with lycopene (DL) prevented the increase in TG levels, which remained low since the 10th day of the treatment (Figure 3A). The treatment of diabetic rats with bixin (DB) caused a significant reduction in TG levels only after 40 days of treatment (Figure 3A). Total-C levels were significantly decreased in DB and DL groups, since the 10th day of treatment (Figure 3B). Interestingly, the HDL levels were increased in diabetic rats treated with lycopene (33%) or bixin (39%), when compared with DYOG rats (Figure 4A).

The co-administration of curcumin and carotenoids maintained the beneficial effects of the isolated treatments on lipid profile. At the moment, two results must be highlighted: *i*) the beneficial effects of curcumin on reducing the TG levels were maintained in the treatment with curcumin + bixin (Figure 3A); *ii*) the mixtures of curcumin + lycopene and curcumin + bixin maintained the beneficial effects of the carotenoids in promoting an increase in the HDL levels in diabetic rats (Figure 4A).

Oxidative stress biomarkers and antioxidant activity

It can be observed that the oxidative stress was installed in rats after 50 days of diabetes, because the levels of MDA (liver and plasma; Figures 5A and 5B, respectively), PCO (liver; Figure 5C) and ox-LDL (plasma; Figure 4B) were increased in DYOG rats, and the activities of the antioxidant enzymes PON1 (plasma; Figure 4C), SOD, CAT and GSH-Px were decreased (liver; Figures 6A, 6B, 6C, respectively), as well as the GSH levels (liver;

Figure 6D), when compared with NYOG rats. The treatment with insulin practically prevented the oxidative stress installation in plasma and liver of diabetic rats.

Although the MDA levels were not change in liver of DC rats (Figure 5B), the treatment with curcumin-enriched yoghurt decreased the levels of MDA (43%) and ox-LDL (32%) in plasma and the PCO levels (61%) in liver of diabetic rats, in comparison with DYOG (Figures 5A, 5C and 4B, respectively).

The treatment of diabetic rats with isolated carotenoids, bixin (DB) or lycopene (DL), promoted significant decreases in liver levels of MDA (29% and 34%, respectively) and PCO (43% and 49%, respectively) when compared with DYOG. While bixin was not able to reduce the plasma MDA levels of diabetic rats, the treatment with lycopene reduced the plasma MDA by 36%, when compared with DYOG (Figure 5A). Plasma ox-LDL levels were also significantly decreased after the treatment with bixin (38%) or lycopene (48%), in comparison with DYOG group (Figure 4B).

The treatments with the mixtures curcumin + bixin (DCB) or curcumin + lycopene (DCL) promoted benefits against lipoperoxidation, which maintained the best effects reached by the isolated treatments: the reduction in plasma MDA levels in DCB and DCL groups was similar those observed in DC and DL rats (Figure 5A). Liver MDA in DCB and DCL rats were significantly decreased at levels similar those of DB and DL groups (Figure 5B). Remarkably, in both PCO and ox-LDL, the treatments with mixtures led to combined effects. Liver PCO levels were further decreased in rats from DCB and DCL groups, when compared with DB and DL groups, respectively (Figure 5C). The ox-LDL levels in diabetic rats from DCB and DCL groups were also further decreased in comparison with the fall observed in DC and DB rats (Figure 4B).

Treatments of diabetic rats with yoghurt enriched with natural antioxidants, isolated or in mixtures, have also shown benefits to the endogenous antioxidant systems.

After 50 days of experiment, the treatment with curcumin-enriched yoghurt increased the activities of PON1 (32%, Figure 4C), SOD (approximately 5-fold, Figure 6A), CAT (104%, Figure 6B) and GSH-Px (64%, Figure 6C) and the levels of GSH (approximately 2-fold, Figure 6D), when compared with DYOG. Treatments with bixin or lycopene in yoghurt also increased the activities of PON1 (29 and 30%, respectively, Figure 4C), SOD (approximately 3- and 2-fold, respectively, Figure 6A) and CAT (111% and 66%, respectively, Figure 6B) and the GSH levels (80% and 77%, respectively, Figure 6D), in

comparison with DYOG group, whereas these treatments showed no improvements in GSH-Px activity (Figure 6C).

The treatments with the curcumin + bixin (DCB) or curcumin + lycopene (DCL) increased the activity of PON1 (38% and 36%, respectively), in comparison with DYOG group. The co-administration of curcumin and carotenoids promoted combined effects on the raise of SOD activity: DCB and DCL rats had additional increases in the SOD activity in comparison with DB and DL, respectively (Figure 6A), maintained the benefit promoted by curcumin. The CAT activity was increased in DCB and DCL groups in a similar magnitude of all other treatments (Figure 6B), and the activity of GSH-Px was not changed after the treatment with mixtures (Figure 6C). GSH levels were increased in DCB and DCL groups in a similar magnitude of DB and DC groups, respectively (Figure 6D).

Discussion

This study provides evidence that yoghurt enriched with curcumin and carotenoids (lycopene or bixin) improved various biomarkers in STZ-diabetic rats, mainly those related to oxidative stress and cardiovascular risk. As far as we know, this study is the first to demonstrate two potentially important findings about the *in vivo* benefits for DM of a combined therapy based on these natural compounds. Firstly, the ox-LDL levels of diabetic rats chronically treated with curcumin and lycopene or bixin were decreased below than values found in the isolated treatments, reaching values similar those of non-diabetic animals. Secondly, the co-administration of curcumin and carotenoids increased the HDL levels of diabetic rats, aggregating value to the beneficial effects of curcumin-enriched yoghurt. Previous studies showed that yoghurt enriched with curcumin alone improved various parameters of diabetic rats, however no changes were observed in the HDL levels [20, 35]. Considering this, it become clear that the combination of curcumin and these carotenoids in yoghurt has a great potential to protect diabetic individuals against long-term complications related to CVD.

The treatment with yoghurt alone did not cause any beneficial effect on the studied parameters in STZ-diabetic rats, which was an expected finding, since Gutierrez et al. [20] previously observed in this experimental DM model that the treatment of rats with yoghurt did not changed the physiological and biochemical parameters, which values remained similar

those of diabetic rats receiving water (via gavage). Beneficial effects of yoghurt alone against DM disturbances were not observed probably due to the severity of the experimental model, installed with STZ. However, the administration of curcumin and carotenoids using yoghurt solved the problem of the low solubility of these compounds in water; also, the administration of these natural compounds on yoghurt did not impair their biological actions. Current studies are ongoing in our laboratory investigating the effects of the yoghurt alone and also enriched with curcumin, lycopene or bixin, using animals under an experimental model of obesity and insulin resistance (high-fat diet), which is suitable for the study of the possible beneficial roles of yoghurt alone against DM disturbances.

Studies showing the antidiabetic and antioxidant activities of the isolated treatments with lycopene or bixin can be found. The beneficial effects of lycopene in DM have been consistently related to its antioxidant potential, attenuating the endothelial dysfunction via reduction of both the oxidative stress in aorta and the ox-LDL levels [36]. Lycopene also protected kidneys against diabetic nephropathy due to an increase in the activities of SOD and GSH-Px, lowering the MDA levels [37]. Recently, Ozmen et al. [38] observed that the treatment of STZ-diabetic rats with lycopene reduced both the vacuolization of the Langerhans islets and the loss of insulin-secreting cells, leading to a fall in the blood glucose levels in comparison with untreated diabetic rats; the authors attributed the effects of lycopene to its antioxidant activity. Corroborating these findings, the present study showed that the treatment of diabetic rats with lycopene-enriched yoghurt reduced glycemia (Fig. 2), triglycerides (Fig. 3) and markers of oxidative damage (Fig. 5), as well as increased the activities of PON1 (Fig. 4), SOD and CAT (Fig. 6) and the levels of GSH (Fig. 6). Cholesterol metabolism was also improved after the lycopene supplementation; diabetic rats treated with lycopene-enriched yoghurt had low cholesterol plasma levels in comparison with untreated diabetic rats, as previously observed [39]. HDL levels were also increased after the lycopene treatment (Fig. 4). Evidences regarding the antihypercholesterolemic effect of lycopene have been found [40].

Taken together the antioxidant capacity of lycopene may explain the reduction observed in ox-LDL levels, the increased HDL levels observed in lycopene treatment (Fig. 4) and with the reduced levels of cholesterol (Fig. 3) show the importance of lycopene to mitigate CVD risk.

Few studies about the effects of bixin on DM symptoms have been performed, however the findings are promising. Roehrs et al. [21] found that the treatment of STZ-diabetic rats for 30 days with 10 or 100 mg/kg bixin promoted a reduction in plasma levels of glucose, triglycerides and cholesterol; the treatment with bixin also reduced a marker of plasma protein oxidative damage and increased the SOD activity, without changes in CAT and GSH-Px activities. In agreement with this, our data showed that STZ-diabetic rats treated with bixin-enriched yoghurt had low plasma levels of glucose (Fig. 2) and triglycerides (Fig. 3), although the lycopene effects on these biomarkers were more pronounced. The reduction in cholesterol promoted by bixin (Fig. 3) was similar to the lycopene effect. Bixin-enriched yoghurt also decreased the hepatic levels of MDA and PCO (Fig. 5) and increased the activities of PON1 (Fig. 4), SOD and CAT (Fig. 6) and the GSH levels (Fig. 6). The reduction in the ox-LDL levels (Fig. 4) and the increase in the HDL levels (Fig. 4) after the treatment of diabetic rats with yoghurt-enriched bixin were similar to the lycopene effects. Although the isolated treatments with lycopene and bixin have promoted similar responses in the most of the parameters, the differences in the magnitude of the responses in glycemia and triglycerides between these carotenoids (lycopene better than bixin) can be explained by the fact that polar carotenoids (such as bixin) have rapid clearance rate from plasma [41]; so, if bixin has a minor half-time, this can be the reason why the MDA levels were not decreased in plasma of diabetic rats treated with bixin (Fig. 5). Finally, it must be emphasized that many studies investigated the beneficial effects of carotenoids in isolated treatments, however, some recent studies about the effects of mixtures of carotenoids (lutein with zeaxanthin) or carotenoids combined with other natural antioxidants (lycopene with ascorbic acid and/or α -tocopherol) in the prevention of complications related to metabolic disturbances are showing conflicting results [42,43], reiterating the need of ongoing investigations on mixtures of these natural compounds for the prevention of chronic diseases and their complications.

The antidiabetic and antioxidant activities of curcumin have been well documented [20, 35, 44], as well as the mechanisms explaining its antidiabetic activity. Stimulation of insulin release from pancreas beta cells [45] could explain some benefits observed in diabetic rats treated with curcumin-enriched yoghurt, such as the reduction in glycemia (Fig. 2) and the increase in the body weight gain (Fig. 1) in comparison with diabetic rats treated only with yoghurt. Recently, Gutierrez et al. [46] also showed that the treatment of STZ-diabetic rats with curcumin-enriched yoghurt improved both the glucose tolerance and the insulin

sensitivity, which was associated with an increase in the AKT phosphorylation levels and GLUT4 translocation in gastrocnemius skeletal muscles; these findings explain, at least in part, the antihyperglycemic effect of curcumin-enriched yoghurt. Chronic hyperglycemia in DM accounts for the establishment of oxidative stress in many tissues (liver, kidney, retina, peripheral nerves) due to an overproduction of ROS; so, the antihyperglycemic effect of curcumin-enriched yoghurt explains, at least in part, the reduction in the levels of oxidative stress biomarkers (MDA and PCO, Fig. 5) and the increase in the PON1 (Fig. 4), SOD, CAT and GSH-Px antioxidant enzymes (Fig. 6) and GSH levels (Fig. 6) in STZ-diabetic rats. However, curcumin also possesses the ability to scavenge ROS [47, 48] and to inhibit LPO [49], which can be also corroborating the *in vivo* antioxidant activity.

However, it is noteworthy that some antioxidant responses of curcumin did not reach the magnitude of the insulin responses, such as the reduction in MDA (liver and plasma) and in ox-LDL levels, as well as the increase in the activities of PON1, SOD and GSH-Px. So, it can be suggested that diabetic rats treated with curcumin-enriched yoghurt are still under a condition of oxidative stress, which chronicity may allow a progressive installation of tissue damage. It must be highlighted that, in the present study, the levels of plasma biomarkers were determined in fasting conditions, since food intake interferes with lipid profile of biomarkers. Thus, even noting that the curcumin treatment was able to reduce the fasting glycemia levels to values similar those of the insulin treatment, previous studies of our laboratory showed that the treatment of diabetic rats with curcumin lowered the plasma glucose in a fed state [20, 35], however without reaching the same magnitude of the insulin response, which can explain the absence of the total correction of oxidative stress in animals treated with curcumin observed in the present study. Furthermore, no improvement was observed in the HDL levels of diabetic rats treated with curcumin-enriched yoghurt. Altogether, these reasons stimulate us to study the combination of curcumin with other natural compounds that could contribute with additional benefits in the DM treatment.

The findings of the present study showed that the treatments with mixtures of curcumin + lycopene or curcumin + bixin caused combined effects on the reduction of glycemia (Fig. 2), triglycerides (Fig. 3), PCO levels (Fig. 5) and in the increase of SOD activity (Fig. 6), maintaining the best effect of the isolated treatment (i.e., curcumin). Combined effects of the mixtures were also observed in the reduction of ox-LDL levels (Fig. 4), a central risk factor for CVD. Furthermore, mixtures were able to increase the HDL levels

(Fig. 4), a beneficial effect attributed to lycopene and bixin alone that was maintained after the mixtures with curcumin.

It is interesting to note that the treatments with the isolated carotenoids or in mixtures with curcumin were not able to increase the activity of GSH-Px (Fig. 6). It can be suggested that the combination between the increase in the activities of SOD and CAT (Fig. 6) and the intrinsic antioxidant potential of the carotenoids was sufficient to reduce oxidative stress in liver of diabetic rats. This hypothesis can be corroborated by the decreased levels of MDA and PCO in liver (Fig. 5) and by the restoration of GSH levels (Fig. 6).

Carotenoids are transported into the blood circulation mostly in association with lipoproteins. It has been demonstrated that lycopene and bixin are transported predominantly in HDL and LDL [50, 51]. Apart the lipoprotein fraction carrying the carotenoids, both lycopene and bixin were able to protect LDL against oxidation in a magnitude comparable to the curcumin effect (Fig. 4). It can be suggested that LDL is directly protected against oxidative damage, at least in part, by the antioxidant capacity of the carotenoids transported into the lipoprotein. Although the glycemia reduction after the treatment with the isolated carotenoids did not reach the same response of the isolated curcumin (Fig. 2), the antihyperglycemic effect of the carotenoids can not be discharged as a protective mechanism against LDL oxidation. Curcumin seems to prevent the LDL oxidation by a mechanism non-dependent of the lipoprotein transport, since curcumin is carried by albumin into the circulation [52]; the curcumin antioxidant capacity is preserved when coupled to albumin [53].

The combined effect of lycopene with other natural antioxidants protecting LDL from oxidation had been previously observed in an elegant *in vitro* study by Fuhrman et al. [15], via lipoprotein oxidation stimulated by incubation in the presence of AAPH or copper ions. It was observed that lycopene acts synergistically with natural antioxidants (vitamin E, glabridin, rosmarinic acid, carnolic acid) as an effective antioxidant against LDL oxidation. The synergistic effect in protecting LDL against oxidation was explained by the combination of the antioxidant mechanisms of these compounds and the antioxidants localization into the lipoprotein [15]. Therefore, these mechanisms could be also helpful to explain the combined effects observed in the *in vivo* protection against LDL oxidation, in the present study: *i*) the localization of antioxidants in distinct circulating biomolecules, i.e., curcumin bound to albumin and carotenoids directly associated with LDL, and *ii*) the different antioxidant

mechanisms, while curcumin is able to donate the H-atom from phenolic group and from the central methylenic bridge in the hepta-dienone moiety and also has a marked capacity for iron binding [47, 54], lycopene (and possible bixin) prevents lipid peroxidation via singlet oxygen quenching [55] or scavenging peroxy radicals [56]. Finally, it must be highlighted that the combined effects of curcumin and carotenoids in preventing the LDL oxidation was so effective that the ox-LDL levels of DCB and DCL rats were similar those values found in NYOG and DINS rats (Fig. 4).

In addition to the prevention of the LDL oxidation in diabetic rats, the combined therapy of curcumin with these carotenoids also showed benefits against cardiovascular complications via increase in the HDL levels (Fig. 4). HDL plays a major role in the reverse cholesterol transport, taking the excess of cholesterol from cells, including macrophage foam cells, and delivering to liver, which is responsible for the cholesterol excretion into the feces either as neutral sterols or bile acids [57]; consequently, HDL diminishes the formation of both the foam cells and the atherogenic plaques. Notwithstanding the increase in the HDL circulating content, improvement in its antioxidant functionality has been also pointed as a central strategy associated to effective therapeutic interventions having antiatherogenic properties. The antioxidant potential of HDL has been related to paraoxonase 1 [58].

Paraoxonase 1 (PON1) circulates mostly in association with HDL; its antioxidant activity is associated to its ability to hydrolyze lipid peroxides [59]. In addition to protect HDL against oxidative damage [60], it has been consistently shown that PON1 dampens LDL oxidation [61, 62]. The results of the present study showed that STZ-diabetic rats had diminished PON1 activity (Fig. 4), as previously showed by other studies, in both humans [63] and rodents [64] with diabetes. The treatment of diabetic rats with curcumin and carotenoids, isolated or in mixtures increased the activity of PON1 (Fig. 4); however, the increase in the PON1 activity after the treatments with the natural antioxidants did not reach the magnitude of the insulin treatment. Also, even without improve the HDL levels, the treatment with insulin practically prevented the fall in the PON1 activity of diabetic rats. It has been shown that modification of PON1 by glycation inhibits its activity towards paraoxon [65, 66]; therefore, the antihyperglycemic effect of insulin may explain its ability to avoid the fall in the PON1 activity due to DM. It has been consistently demonstrated that various natural antioxidants, including curcumin [67], can increase the activity of PON1 via upregulation of its expression in liver [68]. It has been also shown that lycopene supplementation increases

the PON1 activity in association with increase in the HDL levels [22]. However, the antihyperglycemic effects of these natural compounds can be also helpful in protecting PON1 activity. In addition, considering the ability of PON1 in protects LDL against oxidation, the decrease in the ox-LDL levels of diabetic rats treated with curcumin + lycopene or curcumin + bixin can be a consequence of the increase in both the HDL levels and the PON1 activity. Altogether, the bulk of improvements observed in various biomarkers related with cardiovascular events support the antiatherogenic potential of mixtures of curcumin and carotenoids.

In conclusion, the findings of the present study provided evidences for the combined effects of yoghurt enriched with curcumin in mixtures with lycopene or bixin, bringing various benefits for the treatment of the wide range of diabetic disturbances. The combined effects of the natural mixtures were mainly evidenced by the reduction in glycemia, dyslipidemia and improvement of biomarkers of oxidative stress, such as the prevention of LDL oxidation, which can be associated with the increase in the HDL levels and PON1 activity. Taken together, the current findings substantiate the need of ongoing investigations for the use of curcumin in mixtures with carotenoids into yoghurt as a natural supplementation having antiatherogenic potential, so lowering the cardiovascular risk factors in diabetic individuals.

Acknowledgements

We thank the Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq, 141998/2012-1), Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP (PADC/FCFAr/UNESP, 16/2015) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 1996/10910-7) for the financial support. We also thank Prof. Dr. José Paschoal Batistuti for the donation of lycopene.

Author Contributions and Conflict of Interest

Conceived and designed the experiments: RPA, AMB, ILB. Performed the experiments: RPA, CAA, VOG, JOO. Analyzed the data: RPA, AMB, ILB. Contributed with reagents/materials/analysis tools: PIC, AMB, ILB. Wrote the paper: RPA, AMB, ILB.

The authors declare have no conflict of interest.

References

1. M. J. Fowler, "Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes," *Clinical Diabetes*, vol. 26, pp.77-82, 2008.
2. International Diabetes Federation, "*IDF Diabetes Atlas*," 7 ed. Brussels, Belgium, 2015.
3. F. B. Hu, "Globalization of diabetes: the role of diet, lifestyle, and genes," *Diabetes Care*, vol. 34, pp.1249-1257, 2011.
4. J. Da Rocha Fernandes, K. Ogurtsova, U. Linnenkamp, L. Guariguata, T. Seuring et al., "IDF Diabetes Atlas estimates of 2014 global health expenditures on diabetes," *Diabetes Research Clinical Practice*, vol. 117, pp.48-54, 2016.
5. W. T. Cade, "Diabetes-related microvascular and macrovascular diseases in the physical therapy setting," *Physical Therapy Journals*, vol. 88, pp.1322-1335, 2008.
6. M. Laakso, "Cardiovascular disease in type 2 diabetes from population to man to mechanisms," *Diabetes Care*, vol. 33, pp. 442-449, 2010.
7. A.O. Odegaard, D. R. Jacobs Jr., O. A. Sanchez, D. C. Goff Jr., A. P. Reiner, "Oxidative stress, inflammation, endothelial dysfunction and incidence of type 2 diabetes," *Cardiovascular Diabetology*, vol. 2016, pp. 1-12, 2016.
8. W. I. Sivitz, M. A. Yorek, "Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities," *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 12, pp. 537-577, 2010.
9. I. Levitan, S. Volkov, P. V. Subbaiah, "Oxidized LDL: diversity, patterns of recognition, and pathophysiology," *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 13, pp. 39-75, 2010.
10. H. Itabe, T. Obama, R. Kato, "The Dynamics of Oxidized LDL during Atherogenesis," *Journal of Lipids*, vol. 2011, pp.1-9, 2011.
11. M. Aviram, "Modified forms of low density lipoprotein and atherosclerosis," *Atherosclerosis*, vol. 98, pp.1-9, 1993.
12. D. Steinberg, J. L. Witztum, "Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 30, pp.2311-2316, 2010.

13. M.S. Brown, J. L. Goldstein, "Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis," *Annual Review Biochem*, vol. 52, pp. 223-261, 1983.
14. J. Galle, T. Hansen-Hagge, C. Wanner, S. Seibold, "Impact of oxidized low density lipoprotein on vascular cells," *Atherosclerosis*, vol. 185, pp. 219-226, 2006.
15. B. Fuhrman, N. Volkova, M. Rosenblat, M. Aviram, "Lycopene synergistically inhibits LDL oxidation in combination with vitamin E, glabridin, rosmarinic acid, carnosic acid, or garlic," *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 2, pp. 491-506, 2000.
16. P. K. Prabhakar, A. Kumar, M. Doble, "Combination therapy: A new strategy to manage diabetes and its complications," *Phytomedicine*, vol. 21, pp. 123-130, 2014.
17. Y. J. Zhang, R. W. Gan, S. Li, Y. Zhou, A. N. Li, et al., "Antioxidant phytochemicals for the prevention and treatment of chronic diseases," *Molecules*, vol. 20, pp. 21138-21156, 2015.
18. R. H. Liu, "Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals," *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 78, pp. 517-520, 2003.
19. H. H. Gahruie, M. H. Eskandari, G. Mesbahi, M. A. Hanifpour, "Scientific and technical aspects of yogurt fortification: a review," *Food Science and Human Wellness*, vol. 4, pp. 1-8, 2015.
20. V. O. Gutierrez, C. M. Pinheiro, R. P. Assis, R. C. Vendramini, M. T. Pepato, I. L. Brunetti, "Curcumin-supplemented yoghurt improves physiological and biochemical markers of experimental diabetes," *British Journal Nutrition*, vol. 108, pp. 440-448, 2012.
21. M. Roehrs, C. G. Figueiredo, M. M. Zanchi, G. V. Bochi, R. N. Moresco, A. Quatrin, S. Somacal, L. Conte, T. Emanuelli, "Bixin and norbixin have opposite effects on glycemia, lipidemia, and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats," *International Journal of Endocrinology*, vol. 2014, pp. 1-10, 2014.
22. J. McEneny, L. Wade, I. S. Young, L. Masson, G. Duthie, et al., "Lycopene intervention reduces inflammation and improves HDL functionality in moderately

- overweight middle-aged individuals,” *The Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 24, pp. 163-168, 2013.
23. P. Trinder, “Determination of blood glucose using 4-amino phenazone as oxygen acceptor,” *Journal of Clinical Pathology*, vol. 22, pp. 158-161, 1969.
 24. J. Pilz, I. Meineke, C. Gleiter, “Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative,” *Journal of Chromatography*, vol. 742, pp. 315-325, 2000.
 25. H. I. Kohn, M. Liversedge, “On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione,” *Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics*, vol. 82, pp. 292-300, 1944.
 26. R. L. Levine, J. A. Williams, E. R. Stadtman, E. Shacter, “Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins,” *Methods Enzymology*, vol. 233, pp. 346-357, 1994.
 27. J. Sedlak, R. H. Lindsay, “Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissues with Ellmann’s reagent,” *Analytical Biochemistry*, vol. 25, pp. 192-205, 1968.
 28. L. G. Costa, B. E. McDonald, S. D. Murphy, G. S. Omenn, R. J. Richter, A. G. Motulsky, C. E. Furlong, “Serum Paraoxonase and its influence on paraoxon and chlorpyrifos-oxon toxicity in rats,” *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 103, pp. 66-76, 1990.
 29. S. Budavari, M. J. O’Neil, A. Smith, P. E. Heckelman, J. F. Kinneary. *The Merck Index (an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals)*. 12th ed. New Jersey: Merck; 2006.
 30. R. J. Richter, G. P. Jarvik, C. E. Furlong, “Determination of paraoxonase 1 status without the use of toxic organophosphate substrates,” *Circulation: Cardiovascular Genetics*, vol. 1, pp. 147-152, 2008).
 31. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall, “Protein measurement with the Folin phenol reagent,” *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 193, pp. 265-275, 1951.

32. C. Beauchamp, I. Fridovich, "Superoxide Dismutase: Improved assays and assay applicable to acrylamide gels," *Analytical Biochemistry*, vol. 44, pp. 276-287, 1971.
33. R. F. Beers Jr., I. W. Sizer, "A spectrophotometric method of measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 195, pp. 133-140, 1952.
34. J. W. Rush, S. D. Sandiford, "Plasma glutathione peroxidase in healthy young adults: influence of gender and physical activity," *Clinical Biochemistry*, vol. 36, pp. 345-351, 2003.
35. C. A. Arcaro, V. O. Gutierrez, R. P. Assis, T. F. Moreira, P. I. Costa, A. M. Baviera, I. L. Brunetti, "Piperine, a natural bioenhancer, nullifies the antidiabetic and antioxidant activities of curcumin in streptozotocin-diabetic rats," *PLoS One*, vol. 9, pp. 1-21, 2014.
36. J. Zhu, C. G. Wang, Y. G. Xu, "Lycopene attenuates endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats by reducing oxidative stress," *Pharmaceutical Biology*, vol. 49, pp. 1144-1149, 2011.
37. Y. Guo, Y. Liu, Y. Wang, "Beneficial effect of lycopene on anti-diabetic nephropathy through diminishing inflammatory response and oxidative stress," *Food Functional*, vol. 6, pp. 1150-1156, 2015.
38. O. Ozmen, S. Topsakal, M. Haligur, A. Aydogan, D. Dincoglu, "Effects of caffeine and lycopene in experimentally induced diabetes mellitus," *Pancreas*, vol. 45, pp. 579-83, 2016.
39. A. Bayramoglu, G. Bayramoglu, H. Senturk, "Lycopene partially reverses symptoms of diabetes in rats with streptozotocin-induced diabetes," *Journal of Medicinal Food*, vol. 16, pp. 128-132, 2013.
40. P. Palozza, A. Catalano, R. E. Simone, M. C. Mele, A. Cittadini, "Effect of lycopene and tomato products on cholesterol metabolism," *Annals of Nutrition and Metabolism*, vol. 61, pp. 126-134, 2012.
41. H. Etoh, Y. Utsunomiya, A. Komori, Y. Murakami, S. Oshima, T. Inakuma, "Carotenoids in human blood plasma after ingesting paprika juice," *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, vol. 64, pp. 1096-1098, 2000.

42. M. Hazewindus, G. R. M. Haenen, A. R. Weseler, A. Bast, "The anti-inflammatory effect of lycopene complements the antioxidant action of ascorbic acid and α -tocopherol," *Food Chemistry*, vol. 132, pp. 954-958, 2012.
43. I. Sluijs, E. Cadier, J. W. Beulens, A. D. L. Van Der, A. M. Spijkerman, "Dietary intake of carotenoids and risk of type 2 diabetes," *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, vol. 25, pp. 376-381, 2014.
44. D. W. Zhang, M. Fu, S. H. Gao, J. L. Liu, "Curcumin and diabetes: a systematic review," *Evidence Based Complementary Alternative Medicine*, vol. 2013, pp. 1-16, 2013.
45. L. Best, A. C. Elliott, P. D. Brown, "Curcumin induces electrical activity in rat pancreatic beta-cells by activating the volume-regulated anion channel," *Biochemical Pharmacology*, v.73, pp. 1768-1775, 2007.
46. V. O. Gutierrez, M. L. Campos, C. A. Arcaro, R. P. Assis, H. M. Baldan-Cimatti, et al., "Curcumin Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Evidences in streptozotocin-diabetic rats support the antidiabetic activity to be via metabolite(s)," *Evidence Based Complementary Alternative Medicine*, vol. 2015, pp. 1-13, 2015.
47. T. Ak, I. Gülçin, "Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin," *Chemico-Biological Interactions*, vol. 174, pp. 27-37, 2008.
48. A. Barzegar, A. A. Moosavi-Movahedi, "Intracellular ROS protection efficiency and free radical-scavenging activity of curcumin," *PLoS ONE*, vol. 6, pp. 1-7, 2011.
49. K. Meghana, G. Sanjeev, B. Ramesh, "Curcumin prevents streptozotocin-induced islet damage by scavenging free radicals: a prophylactic and protective role," *European Journal of Pharmacology*, vol. 577, pp. 183-191, 2007.
50. R. S. Parker, "Absorption, metabolism, and transport of carotenoids," *The FASEB Journal*, vol. 10, pp. 542-551, 1996.
51. J. S. Park, B. D. Mathison, B. P. Chew, "Uptake and immunomodulatory role of bixin in dogs," *Journal of Animal Science*, vol. 94, pp. 135-143, 2016.
52. H. G. Kim, J. H. Lee, S. J. Lee, J. H. Oh, E. Shin, et al., "The increased cellular uptake and biliary excretion of curcumin by quercetin: a possible role of albumin

- binding interaction,” *Drug Metabolism and Disposition*, vol. 40, pp. 1452-1455, 2012.
53. M. Yang, Y. Wu, J. Li, H. Zhou, X. Wang, “Binding of curcumin with bovine serum albumin in the presence of ι-carrageenan and implications on the stability and antioxidant activity of curcumin,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 61, pp. 7150-7155, 2013.
54. M. M. Mahfouz, S. Q. Zhou, F. A. Kummerow, “Curcumin prevents the oxidation and lipid modification of LDL and its inhibition of prostacyclin generation by endothelial cells in culture,” *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, vol. 90, pp. 13-20, 2009.
55. P. Di Mascio, S. Kaiser, H. Sies, “Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher,” *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 274, pp. 532-538, 1989.
56. N. J. Miller, J. Sampson, L. P. Candeias, P. M. Bramley, C. A. Rice-Evans, “Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls,” *FEBS Letters*, vol. 384, pp. 240-242, 1996.
57. W. Annema, U. J. Tietge, “Regulation of reverse cholesterol transport - a comprehensive appraisal of available animal studies” *Nutrition & Metabolism*, vol. 9, pp. 1-18, 2012.
58. D. Litvinov, H. Mahini, M. Garelnabi, “Antioxidant and anti-inflammatory role of paraoxonase 1: implication in arteriosclerosis diseases,” *North American Journal of Medical Sciences*, vol. 4, pp. 523-532, 2012.
59. A. Gugliucci, T. Menini, “Paraoxonase 1 and HDL maturation,” *Clinica Chimica Acta*, vol. 439, pp. 5-13, 2015.
60. M. Aviram, M. Rosenblat, C. L. Bisgaier, R. S. Newton, S. Primo-Parmo, et al., “Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 101, pp.1581-1590, 1998.
61. P. N. Durrington, B. Mackness, M. I. Mackness, “Paraoxonase and atherosclerosis” *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, vol. 21, pp. 473-480, 2001.
62. M. Mackness, B. Mackness, “Targeting paraoxonase-1 in atherosclerosis. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*,” vol. 17, pp. 829-837, 2013.

63. B. Mackness, P. N. Durrington, B. Abuashia, A. J. Boulton, M. I. Mackness, "Low paraoxonase activity in type II diabetes mellitus complicated by retinopathy," *Clinical Science*, vol. 98, pp. 355-63, 2000.
64. R. R. Pereira, I. C. M. E. de Abreu, J. F. C. Guerra, N. N. Lage, J. M. M. Lopes, M. Silva, W. G. Lima, M. E. Silva, M. L. Pedrosa, "Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) Upregulates Paraoxonase 1 Gene Expression and Activity with Concomitant Reduction of Hepatic Steatosis in High-Fat Diet-Fed Rats," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2016, pp.1-13, 2016.
65. G. Ferretti, T. Bacchetti, C. Marchionni, L. Caldarelli, G. Curatola, "Effect of glycation of high density lipoproteins on their physicochemical properties and on paraoxonase activity," *Acta Diabetologica*, vol. 38, pp. 163-9, 2001.
66. M. Mastorikou, B. Mackness, Y. Liu, M. Mackness, "Glycation of paraoxonase-1 inhibits its activity and impairs the ability of high-density lipoprotein to metabolize membrane lipid hydroperoxides," *Diabetic Medicine*, vol. 25, pp.1049-55, 2008.
67. R. Varatharajalu, M. Garige, L. C. Leckey, K. Reyes-Gordillo, R. Shah, M. R. Lakshman, "Protective Role of Dietary Curcumin in the Prevention of the Oxidative Stress Induced by Chronic Alcohol with respect to Hepatic Injury and Antiatherogenic Markers," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2016, pp. 1-10, 2016.
68. J. M. Lou-Bonafonte, C. Gabás-Rivera, M. A. Navarro, J. Osada, "PON1 and Mediterranean Diet," *Nutrients*, vol. 7, pp. 4068-4092, 2015.

Figure legends

Figure 1: Body weight (A) and weights of white adipose tissues (B) and skeletal muscles (C) of STZ-diabetic rats treated for 50 days with yoghurt enriched with curcumin and carotenoids, isolated or in mixtures.

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

Figure 2. Glycemia of STZ-diabetic rats treated for 50 days with yoghurt enriched with curcumin and carotenoids, isolated or in mixtures.

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

Figure 3. Triglycerides (A) and total-cholesterol (B) plasma levels of STZ-diabetic rats treated for 50 days with yoghurt enriched with curcumin and carotenoids, isolated or in mixtures.

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

Figure 4. HDL-cholesterol (A), oxidized-LDL (B) and PON1 activity (C) in plasma levels of STZ-diabetic rats treated for 50 days with yoghurt enriched with curcumin and carotenoids, isolated or in mixtures.

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

Figure 5. Plasma levels of MDA (A), hepatic levels of MDA (B) and carbonyl protein (C) of STZ-diabetic rats treated for 50 days with yoghurt enriched with curcumin and carotenoids, isolated or in mixtures.

Values are expressed as means \pm SEM, n=10. Differences between groups were considered with $p < 0.05$ and were analyzed with One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test. a, differences with NYOG; b, differences with DYOG; c, differences with DINS; d, differences with DC; e, differences with DB; f, differences with DCB; g, differences with DL ($p < 0.05$). Differences in a same group relative to day 0 were analyzed with Paired Student's t test. #, differences with day 0 ($p < 0.05$).

Figure 6. Hepatic activities of SOD (A), CAT (B) and GSH-Px (C) and GSH levels (D) of STZ-diabetic rats treated for 50 days with yoghurt enriched with curcumin and carotenoids, isolated or in mixtures.

Values are expressed as means \pm SEM, n=10. Differences between groups were considered with $p < 0.05$ and were analyzed with One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test. a, differences with NYOG; b, differences with DYOG; c, differences with DINS; d, differences with DC; e, differences with DB; f, differences with DCB; g, differences with DL ($p < 0.05$). Differences in a same group relative to day 0 were analyzed with Paired Student's t test. #, differences with day 0 ($p < 0.05$).

Figure 1

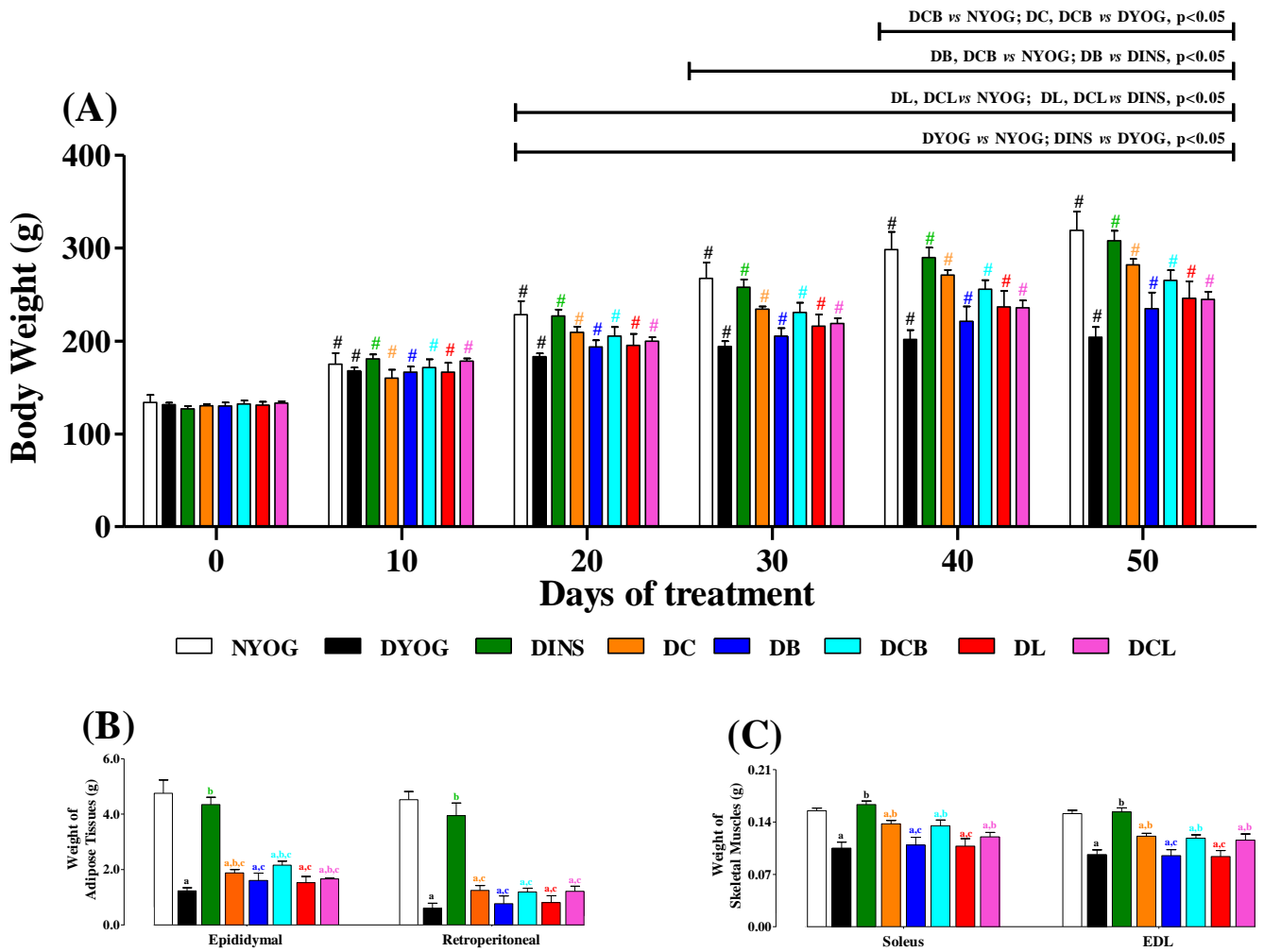


Figure 2

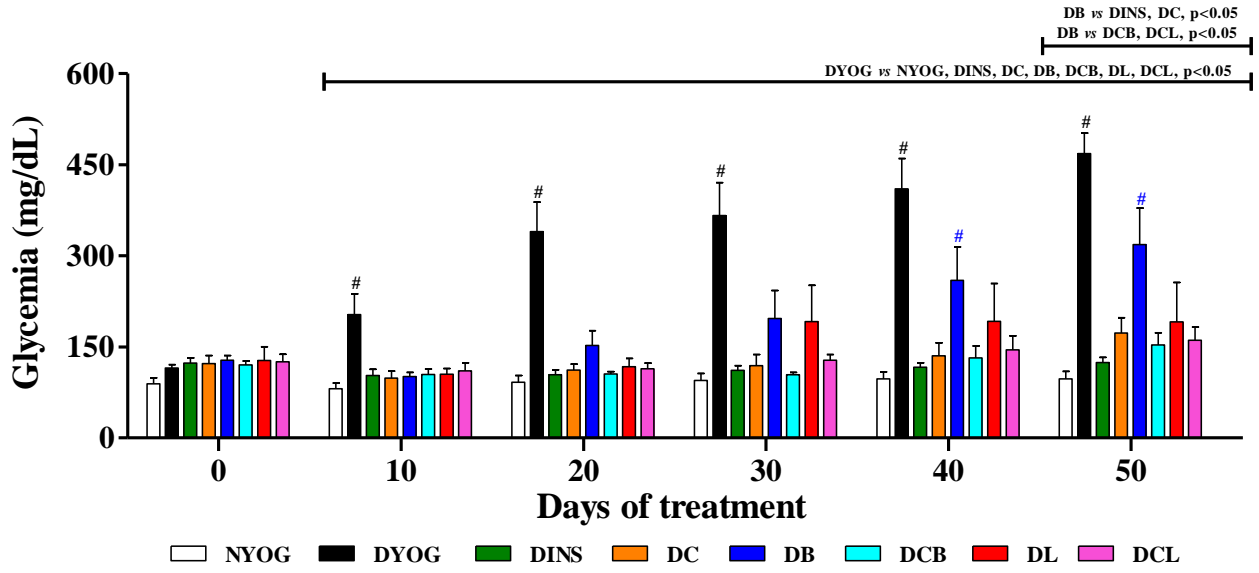


Figure 3

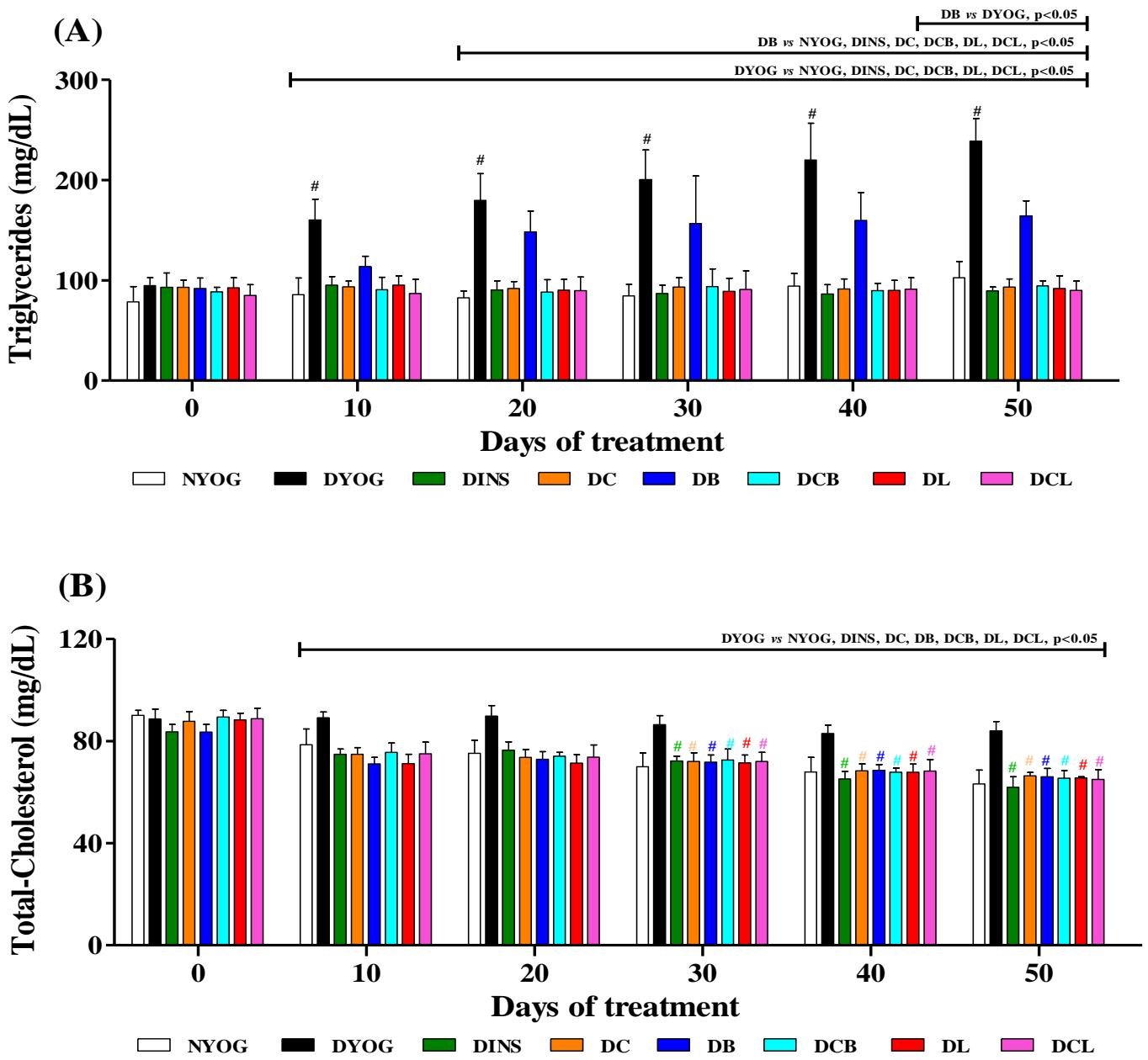


Figure 4

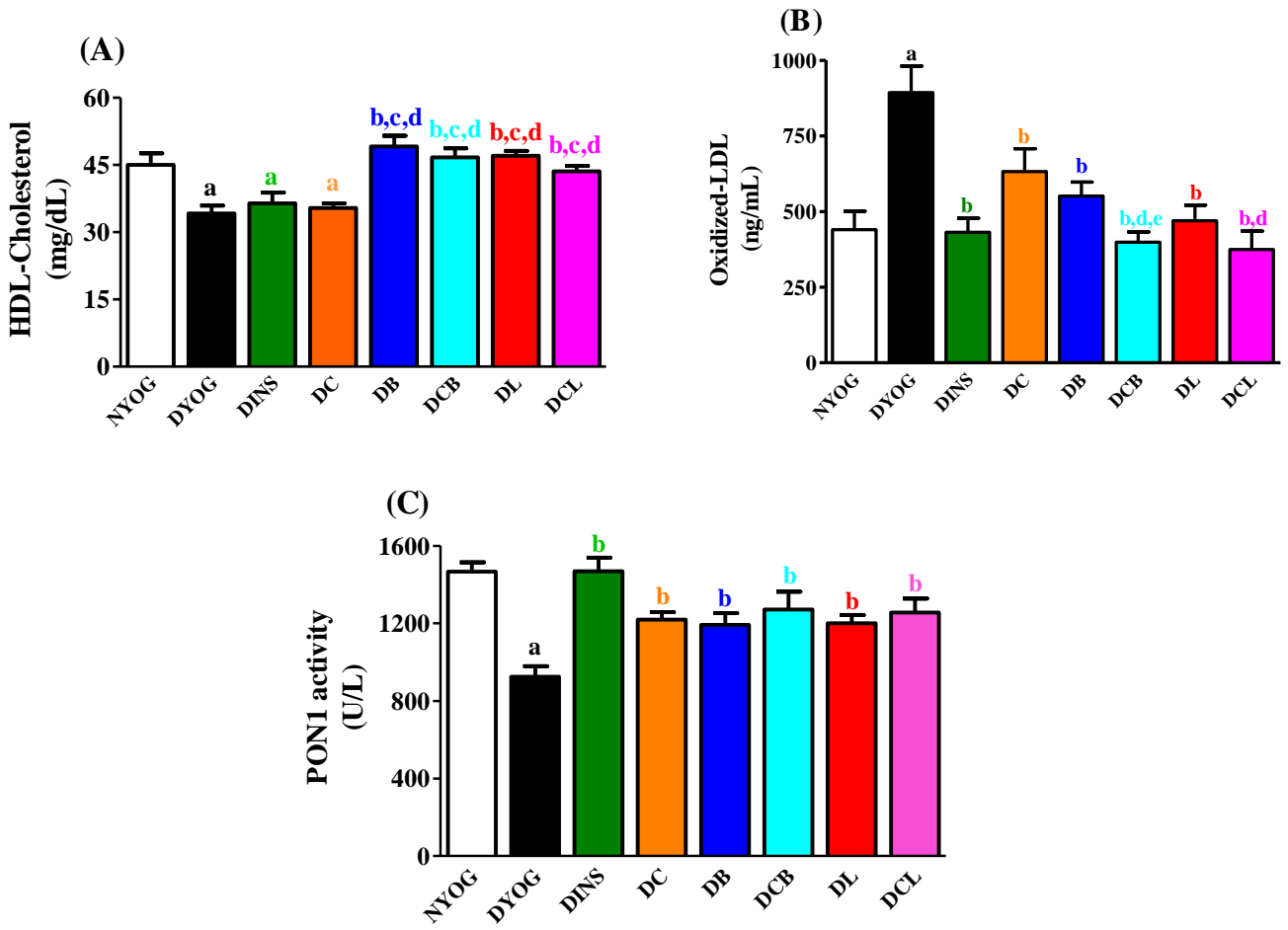


Figure 5

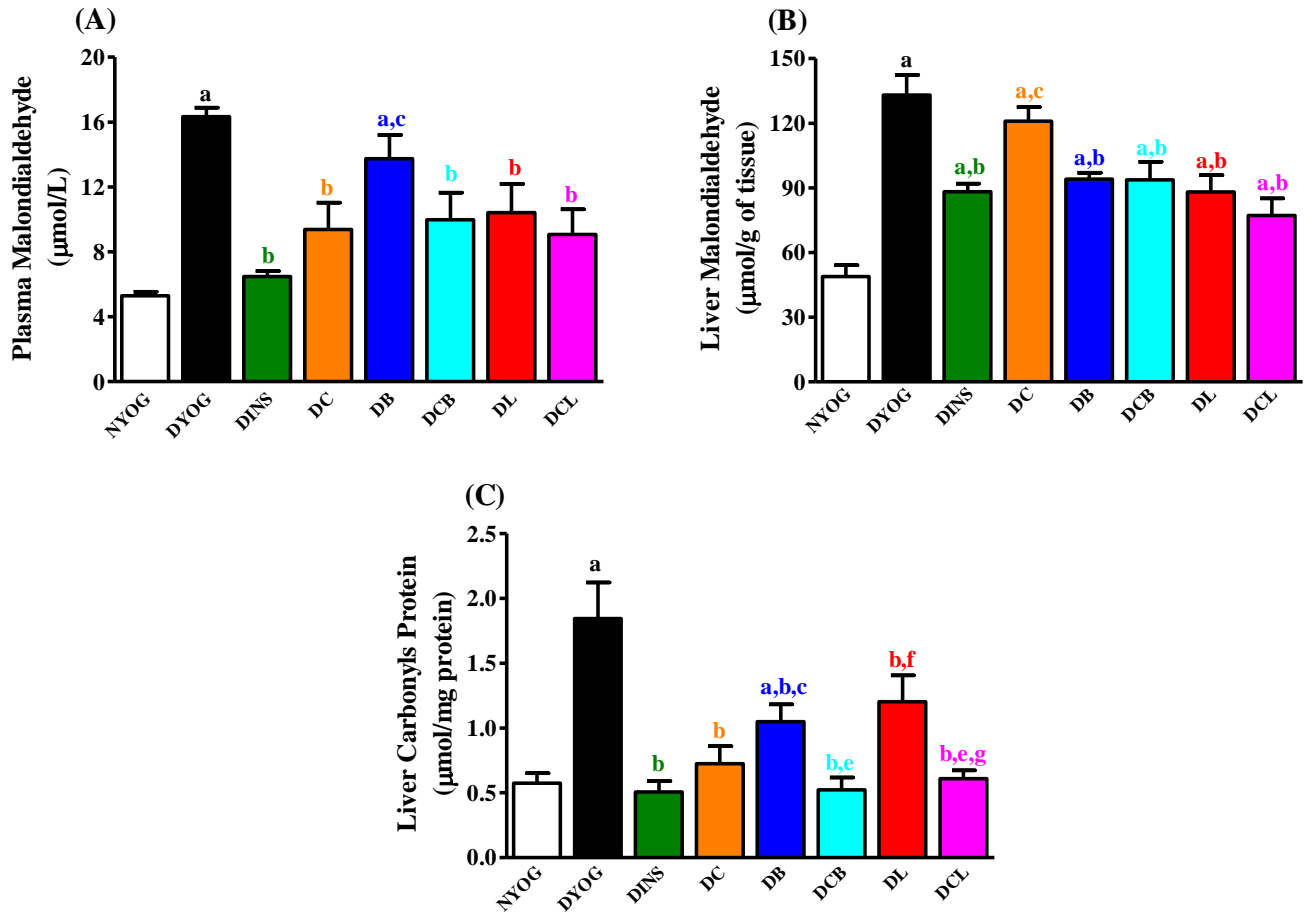
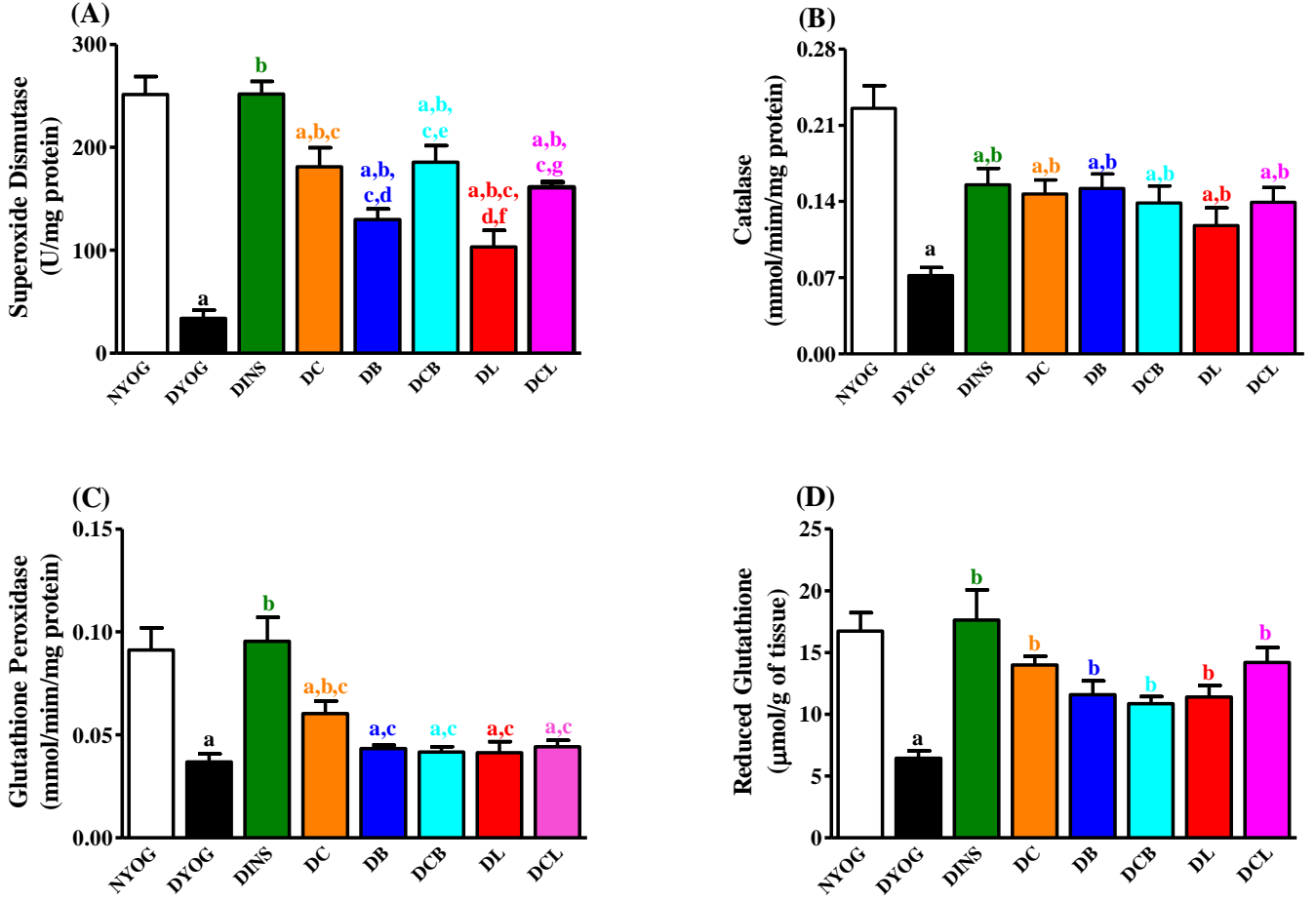


Figure 6



ANEXOS

ANEXO I

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 22/2013

Interessado: RENATA PIRES DE ASSIS

Orientador: Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti

Projeto: Avaliação de parâmetros fisiológicos e bioquímicos em animais diabéticos tratados com iogurte suplementado com pigmentos: curcumina e/ou quercetina e/ou rutina e/ou bixina e/ou licopeno

Parecer nº 44/2013 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, reunida em 14 de Agosto de 2013, considerou que o protocolo para uso de animais na pesquisa: "Avaliação de parâmetros fisiológicos e bioquímicos em animais diabéticos tratados com iogurte suplementado com pigmentos: curcumina e/ou quercetina e/ou rutina e/ou bixina e/ou licopeno", apresentado pela Pós-graduanda Renata Pires de Assis, sob orientação do Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti, do Departamento de Análises Clínicas desta Faculdade, está estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

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

Araraquara, 15 de agosto de 2013.



Prof. Dr. CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA

ANEXO II



Demande d'autorisation d'utiliser des animaux vivants (VRR-10)
Comité de protection des animaux
 Philippe St-Pierre

2016-05-25

1. Identification

2015100-1

1.1 CHERCHEUR PRINCIPAL

Dr MARETTE, André

Département : Médecine

Courriel : andre.marette@criucpq.ulaval.ca

Adresse postale : IUCPQ - Université Laval
 Pav. Marguerite D'Youville, local Y4308
 2725 ch. Ste-Foy, Québec, G1V 4G5

Téléphone : 418 656-8711 #3781

Télécopieur : 418 656-4749

1.2 IDENTIFICATION DU PROJET
 Nouveau protocole Renouvellement n° autorisation Étude pilote

Titre du projet :

Phytocomposés: Effets de composés phytothérapeutiques sur la résistance à l'insuline induite par une diète riche en gras et en sucrose chez la souris.

Mots clés :

souris, diète HFHS, résistance à l'insuline, obésité, tolérance au glucose, yogourt, curcumine, lycopène, bixine.

Catégorie d'utilisation des animaux :

- Recherche Faune
 Animaux conventionnels Animaux de la ferme
- Formation Identifier le cours ou l'activité : _____
- Enseignement Indiquer le numéro du cours Mérite pédagogique (dans l'affirmative, fournir la lettre d'attestation) : _____
- Autre préciser : _____
- Reproduction Pour produire des animaux pour transferts sur des protocoles approuvés
 N° protocoles approuvés : _____
- Pour produire des animaux pour d'autres utilisations, décrire

Organisme subventionnaire : Évaluation pairs (soumis au CEIPUL)

Numéro(s) SIRUL : N/A

 Nouvelle subvention : En attente Subventionné

Titre de la subvention : _____

Révision par un comité de pairs :¹ Oui Non

Code budgétaire per diem (CHUL et Hôtel-Dieu seulement) : _____

Date prévue pour le début du projet (manipulation des animaux) Novembre 2015

Date prévue d'achèvement :² Novembre 2016

¹ Si la subvention provient d'un organisme non reconnu par le Conseil Canadien de Protection des Animaux (fondation privée, entreprise, etc.), indiquer l'adresse et la composition du comité de pairs ayant préalablement évalué la valeur scientifique du projet.

² Une demande de renouvellement devra être déposée à chaque année. La présente demande étant acceptée pour un an seulement.



Demande d'autorisation d'utiliser des animaux vivants (VRR-10)

Comité de protection des animaux

Philippe St-Pierre

2016-05-25

CERTIFICAT DE BONS SOINS AUX ANIMAUX

IDENTIFICATION

Titulaire du projet :

MARETTE, André

Unité de recherche :

Médecine

Adresse :

IUCPQ - Université Laval

Pav. Marguerite D'Youville, local Y4308

2725 ch. Ste-Foy, Québec, G1V 4G5

Titre du projet :

Phytocomposés: Effets de composés phytothérapeutiques sur la résistance à l'insuline induite par une diète riche en gras et en sucrose chez la souris.

Organisme subventionnaire :

Évaluation pairs (soumis au CEIPUL)

Le Comité de protection des animaux de l'Université Laval (CPAUL) ou du Centre hospitalier universitaire de Québec (CPA-CHUQ) certifie, conjointement avec le titulaire du permis, que les animaux utilisés pour ce projet seront traités conformément aux principes énoncés par le Conseil canadien de protection des animaux dans son document intitulé "Manuel sur le soin et l'utilisation des animaux d'expérimentation, volume I et II", ainsi que selon les directives additionnelles émanant du CPA.

USAGE RÉSERVÉ AU CLPA

CPAUL CPA-CHUQ

Numéro d'autorisation : 2015100-1

Catégorie d'inconfort :

But de l'utilisation des animaux :

Période de validité :