



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

WANDERLEI ONOFRE SCHMITZ

**AÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS E ALIMENTOS
FUNCIONAIS NO TRATAMENTO DE RATOS WISTAR COM
RESISTÊNCIA À INSULINA INDUZIDA PELA FRUTOSE**

Londrina
2014

WANDERLEI ONOFRE SCHMITZ

**AÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS E ALIMENTOS
FUNCIONAIS NO TRATAMENTO DE RATOS WISTAR COM
RESISTÊNCIA À INSULINA INDUZIDA PELA FRUTOSE**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa.

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S355a Schmitz, Wanderlei Onofre.

Ação de extratos vegetais e alimentos funcionais no tratamento de ratos wistar com resistência à insulina induzida pela frutose / Wanderlei Onofre Schmitz. – Londrina, 2014.

90 f. il.

Orientador: Décio Sabbatini Barbosa.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Plantas medicinais – Teses. 2. Resistência à insulina – Teses. 3. Frutose – Teses. 4. Alimentos funcionais – Teses. 5. Camundongo como animal de laboratório – Teses. I. Barbosa, Décio Sabbatini. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU 615.89

WANDERLEI ONOFRE SCHMITZ

**AÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS E ALIMENTOS FUNCIONAIS NO
TRATAMENTO DE RATOS WISTAR COM RESISTÊNCIA Á
INSULINA INDUZIDA PELA FRUTOSE**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Orientador Prof. Dr. Décio Barbosa Sabbatini
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra Claudia Andréa Cardoso Lima
Universidade Estadual do Mato Grosso – UNEMAT

Prof. Dr. Wanderlei Onofre Schmitz
Centro Universitário da Grande Dourados -
UNIGRAN

Profa. Dra. Carine Coneglian Farias
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 20 de agosto de 2014.

Dedico esta tese a minha amada esposa, pois sem seu apoio não poderia concluir esta tarefa.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por abençoar toda minha jornada, por nada ter faltado à minha família e a mim e principalmente por ter colocado cada pessoa em meu caminho no momento certo.

Ao meu orientador Professor Doutor Décio Sabbatini Barbosa que aceitou o desafio de me orientar e trilhou este caminho comigo e me ajudou a não sair da trilha.

Ao amor da minha vida, Rita de Cássia Dorácio Mendes, pois ela era minha força nos momentos difíceis.

Ao meu filho, Mateus Mendes Schmitz, pois seus sorrisos e seu “papai” sempre aqueceram meu coração.

Também agradeço a minha orientanda Carine Coneglian de Farias, que acabou sendo meu braço direito nos experimentos em Londrina, muito obrigado por sua dedicação.

A todos os meus orientandos e estagiários que participaram deste projeto durante esses anos, com muito carinho e dedicação, vocês fizeram a diferença.

SCHMITZ, Wanderlei Onofre. **Ação de extratos vegetais e alimentos funcionais no tratamento de ratos wistar com resistência à insulina induzida pela frutose.** Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

A resistência à insulina (RI) é uma resposta inadequada dos tecidos a ação da insulina. O uso de alimentos funcionais e de plantas medicinais é uma forma importante de controle da resistência a insulina, modificando o metabolismo da glicose, inibindo fatores hiperglicemiantes ou ainda atenuando as complicações da RI ou seus sintomas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia da farinha da casca do *Passiflora edulis*, do ω -3, dos extratos hidroalcoólicos das folhas da *Camellia sinensis*, *Bauhinia forficata* e *Campomanesia xanthocarpa* no tratamento de ratos Wistar com resistência à insulina induzida pela frutose. 01 Experimento: Foram utilizados 28 ratos divididos em Grupo 1 – grupo controle; Grupo 2 – animais com resistência à insulina não tratados (RI); Grupo 3 – animais com resistência à insulina tratados com farinha da casca do *P. edulis* 5%; Grupo 4 – animais com resistência à insulina tratados com ω -3 (300mg/dia). 02 Experimento: Os extratos foram preparados a partir de 200g de folhas secas com álcool etílico 80%. Foram utilizados 60 ratos divididos em Grupo 1 – grupo controle; Grupo 2 – animais com resistência à insulina não tratados (RI); Grupo 3 – animais com resistência à insulina tratados com solução hidroalcoólica 2%; Grupo 4 – animais com resistência à insulina tratados com extrato de *C. sinensis*; Grupo 5 – animais com resistência à insulina tratados com extrato de *B. forficata*; Grupo 6 – animais com resistência à insulina tratados com extrato de *C. xanthocarpa*. Os animais foram submetidos à dieta com 66% de frutose. Após o tratamento, foi coletado sangue para avaliação bioquímica dos animais, em seguida à eutanásia com éter e decapitação, retirou-se o fígado dos animais para a análise histopatológica. Não houve diferença entre os parâmetros de crescimento dos animais durante o experimento. O grupo tratado com ω -3 apresentou a menor glicemia dentre todos. O grupo tratado com a farinha da casca da *P. edulis* apresentou diminuição do colesterol total, mas apresentou uma diminuição do HDL e um aumento significativo nos valores de triacilgliceróis. O grupo tratado com *C. sinensis* apresentou as menores concentrações de glicose, colesterol total, triacilgliceróis e ácido úrico, além de diminuir o quadro de esteatose hepática e conferiu o melhor perfil antioxidante. O grupo tratado com o extrato de *B. forficata* apresentou as menores concentrações de frutamina e diminuindo a esteatose hepática e o extrato de *C. xanthocarpa* diminuiu a produção de óxido nítrico. Concluiu-se que a farinha da casca do *P. edulis* não promoveu ação hipoglicemiante significativa. O ω -3 apresentou redução da glicemia e dos níveis dos triacilgliceróis plasmáticos. O grupo tratado com *C. sinensis* apresentou a melhor ação, seguido do grupo tratado com o extrato de *B. Forficata*, sendo que o extrato que apresentou menor atividade, foi o extrato de *C. Xanthocarpa*. São necessários novos estudos para esclarecer melhor a ação dos alimentos funcionais e extratos na fisiopatologia da resistência a insulina e sua possível utilização ou não por pacientes com diabetes.

Palavras-chave: Resistência à Insulina. Dislipidemia. hiperglicemia. *Passiflora edulis*. ω -3, *Camellia sinensis*. *Bauhinia forficata* e *Campomanesia xanthocarpa*.

SCHMITZ, Wanderlei Onofre. **Ação de extratos vegetais e alimentos funcionais no tratamento de ratos wistar com resistência à insulina induzida pela frutose.** Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

The insulin resistance (IR) is an inadequate response of the tissues to the action of insulin. Functional food can be useful to control the insulin resistance, because this food modify the metabolism of glucose, inhibit the hyperglycemic factors or still alleviating complications of IR or its symptoms. The objective of this study was to assess the effectiveness of the flour from the peel of the *Passiflora edulis*, the ω -3, the hydroalcoholic extracts from the leaves of *Camellia sinensis*, *Bauhinia forficata* and *Campomanesia xanthocarpa* on the treatment of Wistar rats with insulin resistance induced by fructose. 01 Experiment: were used 28 rats, divided into Group 1 - control group; Group 2 - animals with insulin resistance untreated (IR); Group 3 - animals with insulin resistance treated with flour from the peel of the *P. edulis* 5%; Group 4 - animals with insulin resistance treated with the ω -3 (300mg/day). 02 Experiment: Extracts were prepared from 200g of dry leaves with 80% ethyl alcohol. Were used 60 rats divided into Group 1 - control group; Group 2 - animals with insulin resistance untreated (IR); Group 3 - animals with insulin resistance treated with 2% of alcohol solution (alcohol 2%); Group 4 - animals with insulin resistance treated with extract of *C. sinensis*; Group 5 - animals with insulin resistance treated with extract of *B. forficata*; Group 6 - animals with insulin resistance treated with extract of *C. xanthocarpa*. The animals underwent a diet of 66% fructose. After the treatment, blood was collected for biochemical evaluation, followed by the euthanasia with ether and decapitation; the livers were withdrawn for histopathological analysis. There was no difference between the growth parameters of the animals during the experiment. The group treated with the ω -3 presented the lowest blood glucose among all. The group treated with the flour from the peel of *P. edulis* presented a decrease on the total cholesterol, but showed a decrease in HDL and a significant increase on the amounts of triacylglycerols. The group treated with *C. sinensis* had the lowest concentrations of glucose, total cholesterol, triacylglycerol and uric acid besides decreasing the hepatic steatosis and conferred the best antioxidant profile. The group treated with the extract of *B. forficata* showed the lowest concentrations of fructosamine and decreasing the hepatic steatosis and the extract of *C. xanthocarpa* decreased oxide nitric production. It was concluded that the flour from the peel of *Passiflora Edulis* did not promote a significant hypoglycemic action. The ω -3 presented a reduction on the levels of blood glucose and plasma triacylglycerols. The group treated with *C. sinensis* showed the best action, followed by the group treated with the extract of *B. forficata*, and the extract that showed lowest activity, was the extract of *C. xanthocarpa*. Further studies are needed to better clarify the action of the functional food and extracts in the pathophysiology of insulin resistance and its possible use or not for patients with diabetes.

Keywords: Insulin resistance. Dyslipidemia. Hyperglycemia. *Passiflora edulis*. ω -3. *Camellia sinensis*. *Bauhinia forficata*. *Campomanesia xanthocarpa*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DHGNA	Doença hepática gordurosa não-alcoólica
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
EC	Epicatequina
ECG	Galato-3-epicatequina
EGC	Epigallocatequina
EGCG	Galato-3-epigallocatequina
EHNA	Esteatose hepática não alcoólica
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FOX	Complexo Fe(III)-xilenol laranja
GLUT-2	Transportador de glicose 2
GLUT-4	Transportador de glicose 4
GLUT-5	Transportador de glicose 5
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HE	Hematoxilina e eosina
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de massa corporal
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
mg/dl	Miligramas por decilitro
NO	Óxido Nítrico
PAI-1	Inibidor de plasminogênio ativado-1
PCR	Proteína C Reativa
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
TRAP	Capacidade antioxidante total
UV	Ultra-violeta
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
EPA	Eicosapentaenoico
DHA	Docosahexaenóico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	Resistência Insulínica	10
1.2	Papel da Frutose na Resistência Insulínica	12
1.3	Os Fitoterápicos no Tratamento da Resistência à Insulina	14
1.3.1	Flavonóides	15
1.3.2	<i>Campomanesia xanthocarpa</i> O. Berg	16
1.4	<i>Camellia sinensis</i> (L.) KUNTEZ)	18
1.5	<i>Bauhinia forficata</i> Link.	19
1.6	<i>Passiflora edulis</i> Sims	19
1.7	ω 3	20
2	JUSTIFICATIVA DA EXECUÇÃO DO TRABALHO	22
3	OBJETIVOS	23
3.1	Objetivo Geral	23
3.2	Objetivos Específicos	23
4	MATERIAIS E METODOS	24
4.1	Considerações Éticas da Pesquisa	24
4.2	Experimento 01	24
4.2.1	Preparo da Farinha da Casca do <i>P. edulis</i>	24
4.2.2	ω -3	24
4.2.3	Protocolo Experimental	24
4.2.4	Coleta e Análise da Amostra	25
4.2.5	Preparação dos Cortes Histológicos	25
4.2.6	Análise Estatística	26
4.3	Experimento 02	26
4.3.1	Preparo dos Extratos Vegetais	26
4.3.2	Animais	27
4.3.3	Protocolo Experimental	27
4.3.4	Coleta e Análise das Amostras	27
4.3.5	Preparação dos Cortes Histológicos	28

		11
4.3.6	Avaliação do Estresse Oxidativo.....	28
4.3.6.1	Método de FOX (Complexo de Fe(III)-XILENOL Laranja)	28
4.3.6.2	Capacidade antioxidante total (total reactive antioxidant potential-TRAP)	29
4.3.6.3	Metabólitos do Óxido Nítrico (nitric oxide metabolites-NOx).....	30
4.3.7	Análise Estatística	30
5	ARTIGOS.....	33
5.1	Comparison between the flour from the peel of passion fruit and the ω-3 in the Treatment of Wistar Rats with insulin resistance induced by fructose.....	33
5.2	Action of extracts of <i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze, <i>Bauhinia forficata</i> Link and <i>Campomanesia xanthocarpa</i> (Mart.) Berg O. under the insulin resistance induced by fructose.....	55
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	81
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

1 INTRODUÇÃO

A obesidade representa um dos maiores problemas de saúde da atualidade, sendo considerada importante fator de risco para diversas doenças crônicas não transmissíveis, com destaque para a resistência a insulina e diabetes mellitus tipo 2 (MACHADO *et al.*, 2012). A obesidade é uma doença crônica associada a numerosas comorbidades, multifatorial e resultante do acúmulo de tecido adiposo, esta doença afeta praticamente todas as idades e grupos socioeconômicos. Ela promove um complexo distúrbio no metabolismo da glicose, dos lipídeos e proteínas. A sua prevalência é estimada entre 20-25 % na população geral, com um aumento crescente nas últimas décadas do número de indivíduos obesos principalmente na população mais velha (SANTOS *et al.*, 2013). De acordo com Duarte (2003), a prevalência de resistência à insulina em pessoas obesas com triglicérides elevado e HDL diminuídas é de 80%, e com hipertensão é de 60%, sendo que a maioria dos indivíduos com resistência a insulina acabam progredindo para um quadro de Diabetes.

Segundo a “American Diabetes Association” (2004), a resistência à insulina tem como principais fatores de risco o sobrepeso, o sedentarismo, aumento da medida da circunferência abdominal, casos de diabetes mellitus do tipo II pré-existentes na família, idade superior a 45 anos, entretanto, o principal fator relacionado à resistência à insulina é a obesidade (LOPES; EGAN, 2006).

A adiposidade central representa um acúmulo de gordura na região abdominal e vem sendo descrita como o tipo de obesidade que oferece maior risco para o indivíduo desenvolver o quadro de resistência a insulina. Mesmo na ausência da obesidade a resistência a insulina é citada como fator de risco importante para o desenvolvimento de diabetes, dislipidemias e posteriormente a síndrome metabólica (MACHADO *et al.*, 2012)

1.1 Resistência Insulínica

A resistência insulínica ocorre quando há uma redução da ação da insulina, o que resulta em uma menor captação de glicose pelas células do organismo, levando a um aumento da glicose no sangue, provocando uma produção compensatória deste hormônio pelas células β -pancreáticas, desencadeando o quadro de hiperinsulinemia. A resistência das células à insulina esta relacionada com a quantidade de gordura deste organismo, com isso, indivíduos obesos apresentam maior probabilidade de apresentarem resistência a insulina ocasionando níveis elevados de glicose e insulina no sangue (DEVLIN, 2002; CORRÊA *et al.*, 2007).

De acordo com o estudo de Kelley *et al.* (2000), o tecido adiposo subcutâneo abdominal abaixo da fáscia muscular contribuiu significativamente para a diminuição da sensibilidade à insulina, por isso quanto maior a quantidade de tecido adiposo, maior é a resistência a insulina, de igual modo, Chandalia *et al.* (2007), demonstraram que indivíduos com maior porcentagem de gordura corporal e principalmente, com um maior conteúdo de tecido gorduroso na região subcutânea abdominal apresentavam um perfil metabólico condizente com um quadro de resistência à insulina.

A insensibilidade das células à glicose estimula a hiperinsulinemia compensatória que provoca o aumento gradual da resistência à insulina. Concomitante a esse fato, ocorre a diminuição da tolerância à glicose, que evolui, posteriormente, para um quadro de diabetes mellitus tipo 2 (STEHOUWER; BRUIN, 2008).

Geralmente, a resistência à insulina tem como consequência o aumento da lipólise periférica, hiperinsulinemia, hiperglicemia, influxo de ácidos graxos livres para o fígado, aumento de triacilgliceróis no fígado e resistência hepática à insulina. Sobreposta à resistência periférica à insulina, essas alterações metabólicas podem promover o acúmulo de lipídios no fígado, resultando em um desequilíbrio entre a captação, síntese, transporte e oxidação de ácidos graxos, sendo que este desequilíbrio leva a um processo inflamatório e à fibrose hepática. (BUGIANESI *et al.*, 2005; BASCIANO *et al.*, 2005).

Portanto, a resistência insulínica favorece a lipólise periférica e o aumento da captação e síntese de ácidos graxos pelo fígado. Assim, os maiores níveis de insulina gerados pela resistência insulínica, interferem na baixa-oxidação mitocondrial dos ácidos graxos, o que leva os mesmos a serem acumulados, no fígado, em sua forma livre e esterificada. O acúmulo de ácidos graxos pode causar no hepatócito a indução do estresse oxidativo e consequentemente: inflamação, fibrose e esteatose hepática (LOPES, EGAN, 2006).

Com o acúmulo de gordura nos adipócitos ocorre um aumento do volume destas células que acabam comprimindo o tecido vascular adjacente, levando a um quadro crônico de hipóxia e isquemia do tecido gorduroso. Este quadro leva os adipócitos a secretarem várias substâncias, entre as quais se encontram a leptina, o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), a interleucina-6 (IL-6), o inibidor de plasminogênio ativado-1 (PAI-1) e a Proteína C Reativa (PCR). Essas substâncias são liberadas pelo tecido adiposo e têm sido relacionadas à diminuição da ação da insulina no fígado e no músculo esquelético, aumento do quadro inflamatório dos pacientes e no desenvolvimento do quadro de hipertensão. Além disso, elevadas concentrações de ácidos graxos livres são liberadas na corrente sanguínea. Os lipídeos oxidados são potentes produtora de EROS (espécies reativas de oxigênio)

umentando o estresse oxidativo hepático, contribuindo com o quadro inflamatório do paciente (MOHAMED-ALI *et al.*, 1998; WAJCHENBERG, 2000; HERMSDORFF; MONTEIRO, 2004).

1.2 Papel da Frutose na Resistência Insulínica

De acordo com Sartorelli e Cardoso (2006), uma dieta com alta concentração de carboidratos, é um dos fatores primordiais para o desenvolvimento da resistência à insulina. Dentre os carboidratos, um dos que mais contribui para a manifestação da resistência à insulina e da obesidade é a frutose, a qual tem uma alta capacidade lipogênica (BASCIANO *et al.*, 2005).

A frutose é um monossacarídeo presente no organismo humano e na maioria das plantas, sendo isolada pela primeira vez da cana-de-açúcar (BARREIROS *et al.*, 2005). Segundo Elliott *et al.*, (2002), a frutose esta comumente inserida na alimentação, sendo encontrada naturalmente não só em frutas, como também consumida em grandes quantidades pelos humanos em alimentos industrializados, refrigerantes e sucos que possuem altas concentrações de frutose, levando a um aumento do consumo de frutose de mais de 500% entre as décadas de 70 e 90 (BOTEZELLI *et al.*, 2010).

É esperado que ocorra uma ingestão normal de 27 g de frutose diária individual na população, mas com os novos hábitos alimentares, principalmente entre os jovens (15 a 18 anos) a ingestão diária pode chegar a 100g de frutose, um valor muito acima do recomendado, sendo que a maior parte desta frutose não ocorre pela ingestão de frutas frescas, mas sim de bebidas com altas concentrações de frutose oriundas de xaropes de milho (ELLIOTT *et al.*, 2002; BRAY, 2007).

Uma dieta com altas concentrações de frutose pode levar a um quadro de esteatose hepática não alcoólica (EHNA). O consumo excessivo de frutose pode provocar uma disfunção hepática transitória (esteatose) e repetidos episódios de indução do estresse hepático causados pela frutose podem levar a uma lesão hepática progressiva e sua contínua ingestão pode causar danos hepáticos que podem progredir para cirrose, falência hepática e, até mesmo a morte (GABY, 2005).

A frutose é absorvida por uma via diferente da absorção da glicose, sendo que esta via de absorção não sofre ação da insulina, a absorção de frutose do intestino para o sangue é feito através do transportador de glicose 2 (GLUT-2) presente nas vilosidades das membranas das células basais do jejuno. Esta é uma rota de absorção de grandes volumes de frutose pelo

fígado (BARREIROS *et al.*, 2005). De acordo com Cruz *et al.* (1998) e Rutledge e Adeli (2007), o metabolismo da frutose ocorre no fígado, tendo sua entrada no hepatócito carregada pelo GLUT-5, sem que haja gasto de energia ou estímulo insulínico. No hepatócito a frutose é fosforilada no carbono 1, pela enzima frutoquinase, formando frutose-1-fosfato que pode ser convertido em moléculas de três carbonos (inclusive gliceraldeído, fosfato de dihidroxiacetona e 3-fosfato gliceraldeído), que podem participar da via glicolítica, sendo reduzidos a glicerol ou são condensados à frutose 1,6-difosfato e, a partir daí formar glicose ou glicogênio, pela via metabólica da gliconeogênese.

Já a diidroxiconafosfato será convertida em glicerol 3-fosfato, que se ligará às moléculas de acil-Coa, convertendo-se em acil-glicerol que será utilizado na síntese de triacilglicerol ou, pela adição de uma molécula de ApoB, na produção do VLDL (BOTEZELLI *et al.*, 2010).

O uso de modelos animais para a investigação da patogênese da resistência a insulina e suas consequências como a diabetes e a síndrome metabólica, tem sido cada vez mais comum nos laboratórios de pesquisa, a maioria destes experimentos são realizados através de animais geneticamente modificados ou induzidos por uma dieta rica em carboidratos (ROSINI *et al.*, 2012). Segundo Hittel *et al.* (2005), a frutose é um dos carboidratos possíveis de serem utilizados nestes experimentos, pois quanto é metabolizada pode ser convertida em glicose, lipídios ou lactato. Para Moura *et al.* (2008) as principais alterações encontradas nestes modelos animais que utilizam a frutose foram: à intolerância a glicose, hipertrigliceridemia e resistência à insulina.

Lê *et al.* (2006), associaram o alto consumo de frutose por ratos, durante quatro semanas, ao aumento dos níveis plasmáticos de triacilgliceróis e VLDL, simultaneamente a estas alterações lipídicas os animais apresentaram um modesto aumento dos níveis plasmáticos de glicose com significativas alterações no peso corporal. A insensibilidade das células à glicose estimula a hiperinsulinemia compensatória que provoca o aumento gradual da resistência à insulina. Concomitante a esse fato, ocorre a diminuição da tolerância à glicose, que evolui, posteriormente, para um quadro de Diabetes Mellitus do Tipo 2 (STEHOUWER; BRUIN, 2008).

Em outro estudo Taghibiglou *et al.* (2002) demonstraram que a partir da alimentação de hamsters com frutose, houve a indução da resistência a insulina, aumento de triacilgliceróis, colesterol totais e ácidos graxos livres. Podemos assim relacionar as alterações metabólicas encontradas a partir de uma dieta rica em frutose em modelos animais, com uma

alimentação humana rica em carboidratos favorecendo alterações metabólicas e implicando no desenvolvimento de várias doenças.

1.3 Os Fitoterápicos no Tratamento da Resistência à Insulina

Não existe uma intervenção terapêutica ideal para a resistência à insulina, o uso de medicamentos que melhoram a sensibilidade à insulina são importantes para minimizar o quadro clínico apresentado pelos pacientes. Antes da descoberta da insulina exógena e dos hipoglicemiantes orais, a principal forma de controle da diabetes envolvia o uso de plantas medicinais que são importantes fontes de substâncias potencialmente terapêuticas (DORNAS *et al.*, 2009). De acordo com Silva e Chechin Filho (2002) cerca de 25% dos fármacos utilizados são de origem vegetal e 50% dos fármacos de origem sintética, possuem seus princípios ativos provenientes de plantas.

Dentre os compostos ativos antidiabéticos têm-se destacados polissacarídeos, proteínas, esteróides, alcalóides, flavonóides, glicosídeos, triterpenos, óleos essenciais, vitaminas e saponinas (HERNANDEZ-GALICIA *et al.*, 2002; DORNAS *et al.*, 2009).

Algumas espécies de plantas apresentam princípios ativos que podem ser úteis no tratamento da resistência à insulina, pois aumentam o número de receptores, bem como a sensibilidade destes a este hormônio e também diminuem a peroxidação de lipídeos (NEGRI, 2005).

As plantas medicinais são utilizadas pela população, devido a imensa biodiversidade da flora brasileira e de seu fácil acesso, ganhando popularidade no meio rural e urbano. A tradição popular no uso das plantas medicinais pode servir de base para a descoberta de novos recursos terapêuticos, medicamentos para tratamento e prevenção de morbidades que atingem o ser humano. Os fitoterápicos são uma opção terapêutica vantajosa, por somarem os seus benefícios aos da terapia convencional, levantamentos bibliográficos revelam que cerca de 11 espécies vegetais amplamente utilizadas na terapêutica hipoglicemiante, nesse grupo, destacam-se *Arctium minus* (Hill) Bernh. (bardana), *Eucalyptus globulus* Labill. (eucalipto), *Syzygium jambolanum* DC. (jambolão), *Bidens pilosa* L. (picão), *Salvia officinalis* L. (sálvia), *Urtica* spp. (urtiga), *Allium sativum* L. (alho), *Phyllanthus niruri* L. (quebra-pedra), *Baccharis trimera* DC. (carqueja), *Anacardium occidentale* L (Caju) e *Bauhinia forficata* Link. (pata-de-vaca), além das outras inúmeras espécies vegetais que carecem de estudos científicos sobre suas propriedades terapêuticas no quadro de resistência a insulina e que poderiam compor este rol (BORGES *et al.*; 2008)

A atividade farmacológica das plantas está diretamente relacionada com os tipos e a quantidade de substâncias químicas presentes, sendo que a sua concentração depende de vários fatores como, por exemplo: o tipo de organismo individual, tecido das plantas, das suas células, assim como, também dos estágios de desenvolvimento da planta e estações do ano. A principal razão para o interesse nos extratos vegetais é a possibilidade de se encontrar em plantas um produto químico com ação farmacológica e assim introduzi-lo no arsenal de drogas já existentes (DOS REIS, MARIOT *in* SIMÕES *et al.*, 2002).

1.3.1 Flavonóides

Os flavonóides possuem uma série de propriedades medicinais e muitas destas, estão sendo testadas empiricamente como a atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante, hipocolesterolemiantes, hipoglicemiantes e capacidade de se complexar com macromoléculas (SCHMITZ *et al.*, 2005).

Os flavonóides são estruturas polifenólicas encontradas em frutas, vegetais, sementes, cascas de árvores, raízes, flores e em seus produtos de preparação, tais como os chás, que são parte da dieta alimentar humana. Atualmente foram isolados mais de 4.200 estruturas de flavonóides diferentes, essa diversidade de estruturas se deve as substituições que esses compostos possuem, como: hidroxilação, metilação, acilação, glicosilação, entre outras substituições (CAZARIN; SARIDAKIS, 2007).

Estruturalmente, os flavonóides são constituídos por substâncias aromáticas com 15 átomos de carbono no seu esqueleto básico, formando-se assim uma estrutura tricíclica com dois anéis aromáticos. O esqueleto com 15 carbonos dos flavonóides é biogeneticamente derivado do fenilpropano (C_6-C_3) e três unidades de acetato (C_6). Assim, os flavonóides são derivados de benzo-gama-pirone de origem vegetal e apresentam um núcleo tricíclico característico em sua estrutura, neste composto tricíclico cada um dos núcleos recebe a denominação de **A**, **B** e **C** e podem estar na sua forma monomérica, dimérica ou oligomérica (Figura 1) (LOPES *et al.*, 2000).

Suas propriedades farmacológicas estão relacionadas com sua estrutura, por exemplo, a presença de um grupo hidroxil na posição carbono três do anel **C**, aumenta sua capacidade inibidora de lipoperoxidação. Da mesma forma, uma dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 do anel **C** também aumenta sua ação contra a formação de lipoperóxidos. O número de radicais hidroxil nos anéis **A** e **B** também são importantes na sua ação antioxidante (COOK, SAMMAN, 1996).

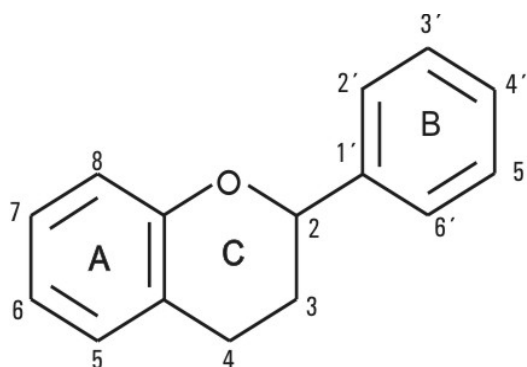


Figura 1 - Forma estrutural característica dos flavonóides ($C_{15}H_{14}O$)
Fonte: SCHMITZ et al., 2005

Os flavonóides presentes em determinadas plantas podem facilitar a translocação do receptor de glicose 4 (GLUT-4), para a superfície da membrana celular, reduzindo assim significativamente a glicose sanguínea, pois aumentaria a interiorização desta para as células. Estes compostos ativam também a fosforilação da tirosina, sugerindo que os adipócitos, o fígado e o músculo esquelético podem ser sítios alvos destes flavonóides, e que estes possam exercer seus efeitos pela ativação de vias sinalizadoras de insulina (DORNAS *et al.*, 2009).

1.3.2 *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg

A *Campomanesia sp.*, é conhecida popularmente como gabirola, guavirova, guavira, guabiroba-miúda e guabiroba-do-mato. Esta planta pertence à família *Myrtaceae*, ao gênero *Campomanesia*, é encontrada em campos de cerrado, ou seja, em regiões de solos ácidos e pobres em elementos inorgânicos (PEIXOTO *et al.*, 2007).

A guavira é encontrada em maior prevalência no Centro-Oeste e no Sudeste do Brasil e, em alguns casos, alcançam países como Uruguai, Argentina e Paraguai, no cerrado sul mato-grossense prevalece as espécies *Campomanesia adamantinum* e *Campomanesia pubescens*, mas também é encontrada a espécie *Campomanesia xanthocarpa* (VALLILO *et al.*, 2006).

Segundo o projeto Rede de Sementes do Pantanal a *C. xanthocarpa* é uma árvore de 10 a 20 m de altura com uma copa alongada e densa e folhas simples. Os frutos são arredondados de coloração verde-amarelada, com polpa amarela que envolvem as sementes, seu pico de florescimento ocorre entre setembro e novembro (PEIXOTO *et al.*, 2007).

Os frutos são consumidos por várias espécies de pássaros e mamíferos, sendo também usados na indústria de alimentos e como flavorizantes na indústria de bebidas, devido a

elevada acidez, por serem ricos em ácido ascórbico, minerais, fibras alimentares e monoterpênos (VALLILO *et al.*, 2005; VALLILO *et al.*, 2006).

As cascas e as folhas, preparadas por infusão, apresentam efeito terapêutico e são utilizadas na medicina popular como antidiabéticas, antidiarreicas, anti-reumáticas, adstringentes, anti-inflamatórias e no tratamento de úlceras crônicas (FELICIO *et al.*, 2004).

Estudos químicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), nas folhas de *C. xanthocarpa* relataram a presença de quercetina, miricetina e rutina (SCHMEDA-HIRSCHMANN, 1995).

Apesar de algumas propriedades medicinais serem indicadas pela população, há poucas pesquisas científicas, tanto na parte química como farmacológica desta planta, com o objetivo de embasar sua utilização como recursos terapêuticos (MESSIAS, 2005).

Ratos alimentados com dieta altamente calórica foram tratados com uma infusão das folhas de *Campomanesia xanthocarpa*, este tratamento levou a uma redução significativa no ganho de peso dos animais além de diminuir a sua glicemia, mas este tratamento não levou a uma redução significativa de triacilgliceróis e o colesterol total quando comparado ao grupo controle (BIAVATTI *et al.*, 2004).

Já estudos preliminares com pacientes que fizeram a ingestão de cápsulas contendo 500mg das folhas de *C. xanthocarpa*, indicaram que as folhas desta planta foram capazes de reduzir as taxas de colesterol total além de apresentar uma melhora no perfil antioxidante dos mesmos (KLAFKE *et al.*; 2010).

Segundo Kataoka e Cardoso (2013), que avaliou a atividade antioxidante e os teores de flavonóides nos extratos de folhas das espécies *C. xanthocarpa* e *C. sessiliflora*, as análises dos extratos apresentaram teores de fenóis superiores aos teores de flavonóides em ambas as espécies e não houve uma correlação linear entre o teor de fenóis e flavonóides com a atividade antioxidante encontrada nas amostras, demonstrando assim que mais estudos devem ser realizados com esta planta.

Os flavonóides mais presentes nas plantas do gênero *C. xanthocarpa* são: a quercetina, a miricetina e a rutina. A quercetina é um composto polifenólico que tem a capacidade de combater o estresse oxidativo ocasionado pela inflamação (MILTERSTEINER *et al.*, 2003).

A miricetina é um flavonóide pertencente ao subgrupo flavonol e é formada por dois grupos fenil unidos por uma cadeia de três carbonos, sendo que nesta cadeia está ligado um monossacarídeo. A presença do grupo pirrogalol (3 oxidrilas livres) é muito importante para a atividade antioxidante por sequestrar os radicais livres, pró-apoptótica, inibidora de proteínas quinases e peroxidases (MEOTTI, 2006).

A rutina é um flavonol glicosídico que atua no fortalecimento e na permeabilidade das paredes dos vasos capilares em combinação com a vitamina C, além de inibir a formação de radicais livres (PEDRIALI, 2005). Ela também atua ativando a enzima antioxidante superóxido dismutase, promovendo um aumento da lipoproteína de alta densidade (HDL) e diminuindo os fatores de risco para a aterosclerose e outras doenças cardiovasculares (RODRIGUES *et al.*, 2003).

Outros estudos mostram que uma dieta que inclua alimentos que contenham compostos como a miricetina (chá verde, chá preto, caju e pitanga) estão relacionadas a um aumento nos níveis de HDL e redução da oxidação de LDL. Portanto, o consumo de alimentos contendo miricetina pode também diminuir potencialmente o risco de aterosclerose e diminuir a concentração de lipídeos sanguíneos (YOKOMIZO; MORIWAKI, 2005).

1.4 *Camellia sinensis* (L.) KUNTEZ

As folhas da *Camellia sinensis* (chá verde), da família “Theaceae”, apresentam combinações de vários compostos químicos e metabólitos secundários, que formam substâncias como: polissacarídeos, óleos voláteis, vitaminas, alcalóides e polifenóis. Dentre essas, os polifenóis (flavonóides e catequinas) são as mais estudadas quanto ao seu efeito farmacológico (ZUANAZZI *in* SIMÕES *et al.*, 2002).

As catequinas são as unidades monoméricas básicas para a formação dos taninos, aparentemente são um dos principais componentes químicos terapêuticos da planta *C. sinensis* (ANGHILERI, THOUVENOT, 2000).

A classe das catequinas inclui as galocatequinas: epicatequina (EC), epigalocatequina (EGC), 3-galato epicatequina (ECG) e a 3-galato-epigalocatequina (EGCG). As catequinas correspondem a mais ou menos um quarto (26,7%) dos compostos derivados das folhas secas da *C. sinensis*, dos quais aproximadamente 11% destes compostos são formados por EGCG, 10% de EGC, 2% de ECG, 2,5% EC e cerca de 15% de polifenóis não identificados. O potencial antioxidante das catequinas do chá verde apresenta uma ordem decrescente de eficiência: EGCG = ECG > EGC = EC (RICE-EVANS, MILLER e PAGANGA, 1996).

Segundo Bursill *et al.* 2001, as catequinas da *C. sinensis* levaram a um aumento de expressão de receptores hepáticos de LDL e a uma aumento da síntese de RNAm, indicando uma ação no aumento da transcrição do gene responsável pela expressão destes receptores na superfície celular. Com isso possibilita o controle do colesterol sanguíneo, levando a um efeito hipolipemiante do chá verde *in vivo*.

1.5 *Bauhinia forficata* Link.

No Brasil pode-se encontrar cerca de 20% das espécies pertencentes ao gênero *Bauhinia* (Caesalpiniaceae) conhecida também como “Pata-de-vaca” ou “Unha-de-boi”. As folhas, caules e raízes das espécies de *Bauhinia*, especialmente *B. manca*, *B. rufescens*, *B. forficata*, *B. cheitantha* e *B. splendens*, são amplamente utilizadas no Brasil e em outros países em forma de chás e outras preparações fitoterápicas para o tratamento de várias enfermidades como: agente diurético, hipoglicemiante, tônico, depurativo, no combate à filariose e na redução da glicosúria (MARTINS *et al.*, 1998; SILVA, CECHINEL FILHO, 2002).

A espécie *B. forficata* têm sido relatada na literatura devido ao seu potencial no combate ao diabetes e à resistência à insulina, a *B. forficata* foi descrita como diurético, hipoglicemiante e anti-hipertensivo, estudos realizados também demonstraram um potencial de redução, não só dos níveis de glicose, mas possivelmente dos níveis de triglicédeos, colesterol total e LDL (MARTINS *et al.* 1998; SILVA; CECHINEL FILHO, 2002; NEGRI, 2005).

No estudo de Da Silva (2000) foram isolados dois componentes das folhas da *B. forficata*, denominados β -sitosterol (esteróide) e kaempferol-3,7-dirhamnoside (kaempferitrina), no qual, comparações entre as diversas partes da planta levaram a crer que estas substâncias estão presentes apenas nas folhas. Sousa *et al.* (2004) comprovaram o efeito hipoglicemiante do kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside (kaempferitrina), que é o principal componente flavonólico das folhas da *B. forficata*, foram citados ainda efeitos como a inibição da atividade da mieloperoxidase e a diminuição da peroxidação lipídica.

1.6 *Passiflora edulis* Sims

O uso de tratamentos que melhoram a sensibilidade à insulina são importantes para minimizar o quadro clínico apresentado pelos pacientes. O uso de alimentos funcionais é uma importante forma de controle da resistência a insulina, pois são grandes fontes de substâncias potencialmente terapêuticas (MIRA *et al.*, 2009).

Entre os alimentos que apresentam em sua composição nutrientes e compostos bioativos, destaca-se a farinha da casca do maracujá, rica em fibras solúveis. As fibras solúveis diminuem a disponibilidade de carboidratos e lipídeos, ajudam na redução das concentrações sanguíneas de colesterol, diminuem a captação de sais biliares e triglicédeos

no intestino delgado dificultando a absorção de gorduras, colesterol e glicose (COUTO, WICHMANN, 2011).

A família *Passifloraceae* possui aproximadamente 16 gêneros e 650 espécies, sendo considerado o mais importante o gênero *Passiflora*, com cerca de 400 espécies. A *Passiflora* é conhecida popularmente por maracujá, que é uma palavra de origem indígena que significa comida preparada em cuia (PETRY *et al.*, 2001; ROMERO-RODRIGUEZ, 1994).

A *Passiflora edulis* também chamada de maracujá amarelo ou azedo é considerada um alimento funcional, possui propriedades benéficas ao organismo pois é rica em fibras solúveis (pectina) e minerais (cálcio, sódio e ferro). A casca do *P. edulis* corresponde a 60% do fruto e tem sido considerada um resíduo que muitas vezes é desprezada. Esse resíduo pode ser aproveitado na fabricação de farinha. Obtêm-se, assim, um alimento rico em pectina (fibra solúvel) que pode promover efeitos favoráveis no metabolismo da glicose e da insulina, diminuindo a possibilidade do desenvolvimento da resistência à insulina (CÓRDOVA *et al.*, 2005; CAMARGO *et al.*, 2007; JANEIRO *et al.*, 2008).

A casca do *P. edulis* é constituída por uma parte com coloração que é o flavedo, e uma parte branca que é o albedo, que é rica em fibras solúveis (pectina) e minerais (cálcio, sódio e ferro) (CÓRDOVA *et al.*, 2005; CAMARGO *et al.*, 2007).

1.7 ω 3

Os ácidos graxos são compostos por hidrocarbonetos, constituindo uma longa cadeia contendo uma metila em uma extremidade e um grupo carboxila em outra (CALDER, 2005). A molécula pode ser saturada, tendo como principais representantes na alimentação o ácido láurico, mirístico, palmítico e esteárico, como também pode ser insaturada, como o ácido linolênico. Eles são adquiridos por meio de alguns alimentos (linhaça, sardinha e salmão), especialmente ricos em triglicérides e armazenados como reserva energética (MACHADO, 2008).

Os ácidos graxos realizam funções no organismo como reserva energética, constituição de membranas celulares, mensageiros celulares e precursores de tromboxanos, prostaglandinas e leucotrienos. Existem três tipos de ácidos graxos essenciais: ômega-3, ômega-6 e ômega-9, sendo que sua nomenclatura é dada de acordo com a posição da dupla ligação a partir do carbono α (MACHADO, 2008).

A substituição isocalórica dos ácidos graxos saturados por ácidos graxos polinsaturados reduz o colesterol total e o LDL plasmáticos. Os ácidos graxos polinsaturados

possuem o inconveniente de induzir maior oxidação lipídica e diminuir o HDL quando utilizados em grande quantidade. O ômega-3 pode diminuir os níveis de triglicerídeos reduzindo a síntese de VLDL (SPOSITO *et al.*, 2007).

O consumo freqüente de alimentos ricos em ômega-3 reduz os níveis de colesterol e triglicerídeos no sangue, e também reduz a pressão arterial. A partir da ingestão de ômega-3 há a biossíntese no organismo dos ácidos graxos EPA (eicosapentaenóico - C20:5) e DHA (docosahexaenóico - C22:6), os quais, embora tenham uma estrutura semelhante, desempenham funções fisiológicas e metabólicas muito diferentes. O EPA relaciona-se principalmente com a proteção da saúde cardiovascular, e o DHA é considerado fundamental para o desenvolvimento do cérebro e do sistema visual, associando a saúde materno-infantil (ZAMBOM *et al.*, 2004).

O ômega-3 é importante no estímulo de liberação de insulina, na ação anti-inflamatória, no desenvolvimento neural e função imunomoduladora (PERINI, 2009).

2 JUSTIFICATIVA DA EXECUÇÃO DO TRABALHO

A resistência a insulina é uma alteração metabólica que acomete um grande número de indivíduos na população mundial, se tornando um grave problema de saúde pública. No Brasil, o número de pacientes que apresentam este problema vem aumentando ano a ano, principalmente associado ao aumento da obesidade. A proposta de tratamentos complementares e até de novos tratamentos se faz necessária, principalmente por que os métodos atuais mostram-se pouco eficientes e com baixa aceitação pela população.

Um dos métodos que podem ser utilizados para complementar o tratamento é o uso de alimentos funcionais ou de fitoterápicos para o tratamento da resistência de insulina. O Brasil possui uma das maiores diversidades de plantas do mundo em variedade e variabilidade na biodiversidade brasileira, nossas plantas correspondem a 22% de todas as espécies de plantas do mundo, o que têm atraído naturalistas, desde a época do descobrimento do Brasil. Informações botânicas associadas a estudos farmacológicos têm levado os pesquisadores a descobertas de novos princípios ativos úteis a saúde humana e que estão presentes em plantas medicinais usadas pela população.

Várias plantas que são utilizadas pela população, como a *C. xanthocarpa*, *C. sinensis*, *B. forficata* e *P. edulis*, ainda não tiveram sua eficácia no tratamento da resistência a insulina, comprovada por experimentos científicos controlados. O mesmo ocorre com o ômega 3 que também é muito utilizado pela população mas tem poucos estudos demonstrando sua ação no tratamento da resistência a insulina.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a ação de alimentos funcionais e de extratos vegetais no tratamento de ratos Wistar com resistência à insulina induzida pela frutose.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar o efeito das farinha do maracujá e do ω -3 no peso total e calcular o Índice de Lee dos ratos após o tratamento.
- Determinar o efeito dos de extratos vegetais no peso total e calcular o Índice de Lee dos ratos após o tratamento.
- Determinar o efeito das farinha do maracujá e do ω -3 no peso total e relativo do fígado dos ratos após o tratamento.
- Determinar o efeito dos de extratos vegetais no peso total e relativo do fígado dos ratos após o tratamento.
- Dosar a glicose, colesterol total, HDL, triglicerídeos e AST/ALT dos ratos após o tratamento com farinha do maracujá e do ω -3.
- Dosar a glicose, frutosamina, colesterol total, HDL, triglicerídeos, ácido úrico, uréia, creatinina, amilase, LDH e AST/ALT dos ratos após o tratamento com os extratos vegetais.
- Realizar a avaliação histopatológica do fígado dos ratos após o tratamento com farinha do maracujá e do ω -3.
- Realizar a avaliação histopatológica do fígado dos ratos após o tratamento com os extratos vegetais.
- Avaliar o estresse oxidativo dos ratos após o tratamento com os extratos vegetais.

4 MATERIAIS E METODOS

4.1 Considerações Éticas da Pesquisa

O projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro Universitário da Grande Dourados – UNIGRAN e aprovado (número 097/11) de acordo com a Lei de número 11.794, de 8 de outubro de 2008, a qual regulamenta a utilização de animais em pesquisas e seguindo as diretrizes da European Community Guidelines (EEC Directive of 1986; 86/609/EEC).

4.2 Experimento 01

4.2.1 Preparo da Farinha da Casca do *P. edulis*

A farinha da casca do *P. edulis* foi preparada a partir do fruto, foram utilizados 12 kg de *P. edulis*, lavados em água corrente, desinfetados com 1 tablete de 5 gramas de Hidrosan Plus[®] efervescente (Dicloroisocianurato de Sódio concentrado a 2,7%) em 15 litros de água, onde ficaram imersos por 20 minutos e, logo após, foi retirada a polpa. Posteriormente, as cascas foram rasuradas, colocadas em uma assadeira e levadas ao forno à temperatura de 200° C, por cerca de 3 horas, agitando regularmente até secagem. Posteriormente foram trituradas e tamizadas para obter uma farinha homogênea (ROCKENBACH; ROMAN, 2007).

4.2.2 ω -3

Para o tratamento com ω -3, foi utilizado cápsulas gel de ω -3 (Nature's Bounty Inc. Boemia New York, USA) contendo 300mg de ácidos graxos poliinsaturados ω -3, sendo 26,5 a 30 % de eicosapentaenóico (EPA) e 17 a 20% de docosahexaenóico (DHA). A dose administrada foi de 01 cápsula/animal/dia por gavagem utilizando uma sonda especial para o procedimento (JORGE *et al.*, 1997).

4.2.3 Protocolo Experimental

Foram utilizados 28 ratos (*Rattus Norvegicus*) da linhagem *Wistar* machos, pesando entre 60 a 75g. Os animais foram divididos em quatro grupos e mantidos em gaiolas

individuais de polietileno com tampas de aço inox, forradas com maravalha trocada três vezes por semana, o peso foi verificado em balança Marte[®] semi-analítica modelo AL500. A temperatura ambiente foi mantida entre 20 e 25 °C, a umidade relativa e o nível de ruído foram mantidos dentro das condições ideais. O fotoperíodo foi controlado para prover luz das 06:00 às 18:00 horas. Após uma semana de adaptação, os animais foram distribuídos aleatoriamente nos grupos experimentais. Os animais foram divididos em: Grupo 1 – controle; Grupo 2 – animais com resistência à insulina (RI); Grupo 3 – animais com resistência à insulina tratados com ração contendo farinha da casca do *P. edulis* (5%) e Grupo 4 – animais com resistência à insulina tratados com -3 (300mg/dia). Para a indução da resistência à insulina, os animais foram submetidos à dieta com 66% de frutose (Galem Refines, Israel, outubro de 2011, lote 1145012) homogeneizada com ração padrão para roedores, durante 52 dias. No grupo 3 os animais foram tratados com ração padrão para a espécie com 66% de frutose e com adição de 5% da farinha da casca do *P. edulis*, sendo os animais alimentados *ad libitum*, desde sua chegada, até o final do experimento.

4.2.4 Coleta e Análise da Amostra

Para todos os procedimentos de coleta de sangue, os animais foram anestesiados com éter. Os ratos foram considerados anestesiados quando apresentaram respiração regular e superficial, flacidez da musculatura esquelética, com a ausência de reflexos a estímulos. No fim do experimento foram coletados aproximadamente 5 mL de sangue total, sem anticoagulante, por punção cardíaca dos ratos. O sangue foi centrifugado para separação do soro e a dosagem de colesterol total, HDL, triacilgliceróis e a verificação da atividade enzimática das aminotransferases AST/ALT foram realizadas com a utilização dos kits comerciais da marca Wiener[®] LTDA em equipamento automatizado Metrolab 2300 – Wiener[®]. Após a coleta do sangue foi calculado o Índice de Lee para se obter um índice de massa corpórea, que é a razão da raiz cúbica do peso corporal dos animais (em gramas) sobre o comprimento nasoanal do animal (CNA em centímetros) multiplicado por 1000 (MOURA *et al.*, 2008). Após a eutanásia dos animais por decapitação com guilhotina, ainda sob o efeito da anestesia, retirou-se o fígado para a análise histopatológica.

4.2.5 Preparação dos Cortes Histológicos

Fragmentos do lóbulo hepático mediano foram fixados em formalina tamponada 10%, processados e corados por Hematoxilina e Eosina (HE). As lâminas foram examinadas, às cegas, por dois observadores e a quantificação de esteatose, bem como de outras eventuais alterações histológicas, foi realizada pela observação de 10 campos, utilizando o seguinte critério: 0 (ausente), 1+ (discreta), 2+ (moderada), 3+ (acentuada).

4.2.6 Análise Estatística

As análises foram apresentadas como média e erro padrão da média (SE). Empregando-se o programa de análise estatística computadorizada STATISTICA 6.0 (STAT SOFT), a comparação entre os grupos foi realizada por análise de variância (ANOVA), seguido pelo Teste de Tukey. Todas as conclusões estatísticas foram efetuadas em nível de 5% de significância.

4.3 Experimento 02

4.3.1 Preparo dos Extratos Vegetais

Os extratos hidroalcoólico de *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, *Bauhinia forficata* Link e *Campomanesia xanthocarpa* (Mart.) O. Berg foram preparados a partir de 200g de folhas secas de cada uma das espécies vegetais. As amostras de *C. sinensis* foram fornecidas pela empresa Yerba & Botanika LTDA e as amostras de *B. forficata* foram fornecidas pela empresa Santos Flora Comércio de Ervas LTDA, as folhas da *C. xanthocarpa* foram coletadas em Itaporã-MS (351 metros de altitude, Latitude: 22° 4' 57" Sul e Longitude: 54° 47' 21" Oeste) pela Dra. Claudia Andréa Lima Cardoso do Departamento de Química da Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul (UEMS) e sua exsicata foi identificada e depositada no Herbário da Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD. Após a secagem em estufa a 50°C durante dois dias, o material foi triturado e tamizado. A extração foi feita com 1000 ml de álcool etílico 80%, durante o período de 15 dias. O material ficou macerando em frascos âmbar e agitados diariamente por inversão, por 15 minutos. O material foi filtrado em papel de filtro Waterman 60 e o filtrado foi armazenado em frasco âmbar devidamente fechado ao abrigo da luz e refrigerado a 5°C, para a realização dos testes (SOUZA *et al.*, 2007). A concentração usada dos extratos hidroalcoólicos para os animais foi de 2% (v/v), sendo o extrato hidroalcoólico diluído em água mineral e fornecido diariamente

para os animais. O volume de água ingerido pelos animais foi aferido diariamente com proveta graduada de 100 mL, para o cálculo da dose média de extrato consumido pelos animais. As soluções dos extratos foram trocados a cada 24 horas e os bebedouros foram protegidos da luz, para evitar possível degradação dos princípios ativos dos extratos.

4.3.2 Animais

Foram utilizados 60 ratos (*Rattus Norvegicus*) da linhagem Wistar machos, pesando 300 ± 50 g que foram divididos em seis grupos contendo dez animais em cada um deles. Os ratos foram mantidos em gaiolas individuais de polietileno com tampas de aço inox, forradas com maravalha e trocada três vezes por semana, sendo os animais pesados uma vez por semana em balança Marte semi-analítica modelo AL500. A ração padrão granulada para a espécie e a água foram oferecidas “*ad libitum*”, sendo que os extratos dos grupos tratados foram oferecidos dissolvidos em água, como única forma de bebida para os animais. A temperatura ambiente foi mantida entre 20 e 25 °C, a umidade relativa e o nível de ruído foram mantidos dentro das condições ideais. O fotoperíodo foi controlado para prover luz das 07:00 às 19:00 horas.

4.3.3 Protocolo Experimental

Após uma semana de adaptação, os animais foram distribuídos aleatoriamente nos grupos experimentais. Os animais foram divididos em: Grupo 1 – grupo controle; Grupo 2 – animais com resistência à insulina (RI); Grupo 3 – animais com resistência à insulina tratados com solução hidroalcoólica 2% (Álcool 2%); Grupo 4 – animais com resistência à insulina tratados com extrato de *C. sinensis* 2%; Grupo 5 – animais com resistência à insulina tratados com extrato de *B. forficata* 2%; Grupo 6 – animais com resistência à insulina tratados com extrato de *C. xanthocarpa* 2%. A partir deste momento deu-se o início do tratamento, que durou 60 dias. Para a indução da resistência à insulina, os animais foram submetidos à dieta com 66% de frutose (Galem Refines, Israel, outubro de 2011, lote 1145012) homogeneizada com ração padrão para roedores, durante todo o experimento (BOTEZELLI *et al.*, 2010; KHANAL *et al.*, 2012).

4.3.4 Coleta e Análise das Amostras

Para todos os procedimentos dolorosos de coleta de sangue, os animais foram submetidos à anestesia com éter. Os ratos foram considerados anestesiados quando apresentarem respiração regular e superficial, flacidez da musculatura esquelética, com a ausência de reflexos a estímulos. No fim do experimento foi coletado, aproximadamente, 10 mL de sangue total sem anticoagulante. A coleta foi realizada por punção cardíaca nos ratos. O sangue, depois de coagulado, foi centrifugado durante quinze minutos a 3500 rpm para separação do soro. Após a centrifugação, uma alíquota de soro foi estocado em freezer a -70°C até seu uso. O restante do soro foi utilizado para a dosagem da glicose, frutossamina, colesterol total, HDL, triglicerídeos, ácido úrico, uréia, creatinina, amilase, desidrogenase láctica (LDH) e aminotransferases (AST/ALT). As análises foram realizadas com a utilização dos kits comerciais da marca Roche[®] LTDA, sendo as leituras feitas em equipamento automatizado Integra 400 plus – Roche[®]. Após a coleta do sangue os animais foram submetidos a eutanásia por decapitação com guilhotina, ainda sob o efeito da anestesia. Também foi calculado o Índice de Lee para se obter um índice de massa corpórea, que é a razão da raiz cúbica do peso corporal dos animais (em gramas) sobre o comprimento nasoanal do animal (CNA em centímetros) multiplicado por 1000 (MOURA *et al.*, 2008).

4.3.5 Preparação dos Cortes Histológicos

Fragmentos do lóbulo hepático mediano foram fixados em formalina tamponada 10%, processados e corados por Hematoxilina e Eosina (HE). As lâminas foram examinadas, às cegas, por dois observadores e a quantificação de esteatose, bem como de outras eventuais alterações histológicas, foi realizada pela observação de 10 campos, utilizando o seguinte critério: 0 (ausente), 1+ (discreta), 2+ (moderada), 3+ (acentuada).

4.3.6 Avaliação do Estresse Oxidativo

4.3.6.1 Método de FOX (Complexo de Fe(III)-XILENOL Laranja)

Reagentes: H₂SO₄ 250mM, metanol PA, 1,1,3,3 tetraetoxipropano (TEP) 4mM (Sigma-Aldrich, PM= 220,3), xilenol laranja (Sigma-Aldrich, PM=760.58), sulfato de ferro amoníaco hexahidratado (Sigma-Aldrich, PM=392.14), Butil hidroxitolueno (BHT) (Sigma-Aldrich, PM= 220.35). Esse teste avaliou a presença de Lipoperóxidos (LOOH), pelo método de oxidação ferrosa do alaranjado de xilenol (FOX). O método é baseado na oxidação de íons

ferrosos para íons férricos sob condições ácidas, que reagem com o corante indicador (alaranjado de xilenol) e se ligam ao íon férrico para produzir um complexo colorido. O reagente de FOX foi preparado com 10mL de H₂SO₄ 250Mm, 88mg BHT, 7,6mg de Xilenol Laranja, 9mg de sulfato de ferro amoníaco hexahidratado e 90mL metanol. Essa reagente foi armazenado ao abrigo da luz. A curva de calibração foi obtida a partir do padrão TEP. O branco foi composto de 900µL de reagente de FOX. Os Padrões (triplicata) foram diluídos de forma seriada para obter-se as concentrações de 4mM (P1 - 100 µL de TEP,) 2mM (P2 - 100µL água deionizada + 100µL de TEP), 1mM (P3 - 100µL água deionizada + 100µl P2), 0,500 mM (P4 - 100µL água deionizada + 100µl P3) e 0,250mM (P5 - 100µL água deionizada + 100µl P4), acrescidos de 900µL de FOX. O material foi incubado à temperatura ambiente durante 30 minutos e em seguida feita a leitura em espectrofotômetro UV-Visível (Helios Beta, ThermoFisher Scientific), em comprimento de onda de 560nm. Para a realização da análise da amostra (soro) triplicata, foi adicionado 100µL das amostras aos 900µL do reagente de FOX e agitados em vortex. Após esse procedimento o material foi incubado à temperatura ambiente durante 30 minutos e em seguida centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm e realizado a leitura no espectrofotômetro. A concentração de FOX foi expressa em mM/L (NOUROOZ-ZADEH *et al.*, 1994; SILVA *et al.*, 2011).

4.3.6.2 Capacidade antioxidante total (total reactive antioxidant potential-TRAP)

Reagentes: 2,2'-azobis(2-amidinopropane) (ABAP) 200mM, (Sigma-Aldrich, PM=271,2), 3-Aminoptalidrazida, 5-Amino-2,3-dihidro-1,4 ptalazinedione (Luminol) (Sigma-Aldrich, PM=177,16), 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromane-2-ácido carboxílico (trolox) (Sigma-Aldrich, PM = 250,29); glicina. O TRAP foi avaliado por quimiluminescência (QL) em uma adaptação do método da técnica descrita por Repetto *et al.* (1996). Esta metodologia detecta antioxidantes hidro e/ou lipossolúveis presentes no soro. O meio de reação consiste em 1,8 mL de tampão glicina 0,1M, pH 8,6, acrescidos de 100µl de luminol em solução aquosa, 200µM, 5 µl de soro (duplicata) e 100 µl de solução aquosa de azobis. Sabe-se que o azobis gera radicais peroxil rapidamente, via interação com radicais centrados em carbono e oxigênio molecular, causando a oxidação de lipídeos e proteínas. Estes radicais livres reagem com o luminol (que atua como um amplificador de sinal), produzindo QL. Esta reação é inibida pela superóxido dismutase, catalase e análogos da vitamina E. A adição de plasma também diminui a QL em níveis basais por um período (tempo de indução t_i) proporcional à

concentração plasmática de antioxidantes até que os radicais do luminol sejam regenerados, restituindo-se os níveis iniciais de QL. O sistema foi calibrado com análogo de vitamina E (Trolox), 100 µL na concentração de 20µM em tampão glicina pH 8,6. Uma comparação do tempo de indução depois da adição de concentrações conhecidas de Trolox e plasma permitem obter valores de TRAP em equivalentes de Trolox. Este experimento foi conduzido em um contador β marca Beckman® (EUA) modelo LS 6000, em um modo de contagem não coincidente por 30 minutos e uma faixa de resposta entre 300 a 620 nm e foi conduzido a uma temperatura de 30 °C. Os resultados foram expressos em µmol de Trolox, segundo a Equação II (REPETTO *et al.*, 1996).

$$\text{Equação II} = \text{TRAP } (\mu\text{M Trolox}) = 401 \times \frac{\text{Tempo da amostra}}{\text{Tempo de Trolox}}$$

4.3.6.3 Metabolitos do Óxido Nítrico (nitric oxide metabolites-NOx)

Reagentes: grânulos de Cádmio (Sigma-Aldrich), Sulfato de cobre (CuSO₄) 5mmol/L (Sigma-Aldrich, PM= 249.69), Glicina (Sigma-Aldrich, PM= 75.07), Sulfato de Zinco 75mmol/L (Sigma-Aldrich, PM= 287.56), Reagente 1- Sulfanilamida (Sigma-Aldrich, PM= 172.2), Reagente 2- N-naftil etilenodiamino dihidroclorídrico (NEDD) (PM= 259.17, Sigma-Aldrich), Ácido Sulfúrico PA, 100mmol/L, Hidróxido de Sódio 55mmol/L (PM= 40.00, Sigma-Aldrich), Solução estoque padrão NaNO₂ 100Mm. O óxido nítrico (NO) é muito instável e rapidamente se degrada em seus produtos os nitratos e nitritos, que podem ser detectados no soro. A estimativa da concentração de NO nas amostras foi realizada pela técnica descrita por Navarro-Gonzalvez *et al.* (1998) adaptada. O método baseia-se na redução de nitrato a nitrito, mediada por reações de óxi-redução ocorridas entre o nitrato presente na amostra e o sistema cádmio-cobre dos reagentes, com posterior diazotação e detecção colorimétrica do azocomposto formado pela adição do reagente de Griess a 540 nm. A primeira etapa, realizada em minitubos, consiste na desproteinização de 100 µL de plasma (triplicata) adicionando 60µL de sulfato de zinco 75mmol/L. Os tubos foram agitados durante 30 segundos em um agitador de tubos tipo vórtex. Em seguida foram centrifugados a 10.000 rpm por 2 minutos à temperatura ambiente e posteriormente adicionados 70µL de hidróxido de sódio 55 mmol/L. Os tubos foram novamente agitados por 30 segundos e centrifugados a 10.000 rpm por 5 minutos. Uma alíquota do sobrenadante (150µL) foi recuperada em tubos

de vidro pequenos e diluídos com 50µL de tampão glicina 45 g/L, pH 9,7. Para uma avaliação mais precisa, é necessário reduzir os íons nitratos presentes em íons nitrito. Esta transformação foi realizada por meio do tratamento da amostra com grânulos de cádmio. Os grânulos de cádmio, depois de lavados 3 vezes com água deionizada, foram colocados em contato com uma solução de sulfato de cobre 5mmol/L em tampão glicina-hidróxido de sódio (15 g/L, pH 9,7) por 5 minutos com agitação manual. Os grânulos ativados foram utilizados dentro de 10 minutos, de modo que 2 grânulos de cádmio foram adicionados a amostras desproteinizadas e previamente transferidas para os tubos de vidro pequeno. Estes então foram deixados em agitação contínua por 10 minutos em agitadores do tipo Kline. Em seguida, 100 µL da solução foram transferidos para uma microplaca para a determinação dos nitritos. Os grânulos foram lavados e armazenados em uma solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄), pois eles podem ser regenerados para repetir essas etapas. Para a determinação de nitritos utilizou-se o reagente 1, e o reagente 2. Na microplaca contendo as amostras foram adicionado 50µL do reagente 1 e 50 µL do reagente 2 e foram incubados por 10 minutos a temperatura ambiente. A curva de calibração foi obtida a partir da solução estoque NaNO₂ 100Mm (125µL de solução estoque de NaNO₂ 100mM em 100mL de água deionizada), obtendo uma solução de uso NaNO₂ 125µmol/L. O branco foi composto de 100 µL de água deionizada, 50 µL de reagente 1 e 50µL de reagente 2. Os Padrões (triplicata) foram diluídos de forma seriada para obter-se as concentrações de 125µM (P1 - 100 µL de solução de uso NaNO₂ 125µmol/L) 62,5µM (P2 - 100 µL água deionizada + 100 µL de solução de uso NaNO₂ 125µmol/L), 31,25 µM (P3 - 100µL água deionizada + 100µl P2,) 15,625 (P4 - 100µL água deionizada + 100µl P3,) e 7,8125 µM (P5 - 100µL água deionizada + 100µl P4). Após, as diferentes concentrações padrões receberam 50µL do Reagente 1 e 50 µL do Reagente 2 a cada poço e incubados por 10 minutos a temperatura ambiente. A quantificação de NO foi realizada em 540 nm, em leitora de microplacas do modelo Expert Plus da marca Asys. A concentração de óxido nítrico foi expressa emµmol/L (NAVARRO-GONZALVEZ *et al.*, 1998).

4.3.7 Análise Estatística

Inicialmente foi conduzida uma análise exploratória para avaliar se as variáveis apresentavam distribuição normal (teste de Kolmogorov-Smirnov) e se havia homogeneidade de variância entre os grupos (teste de Levene). Para os dados que apresentaram estas

características, utilizou-se o teste de análise de variância paramétrico (Tukey-Kramer) complementado pelo teste de Bartlett. Neste caso, os resultados foram apresentados sob a forma de média e erro padrão da amostra. Quando os pressupostos de normalidade e homogeneidade foram violados, a comparação entre os grupos foi realizada através do teste de análise de variância (ANOVA) não paramétrico (Kruskal-Wallis) complementada pelo teste de Dunn. Neste caso os resultados foram apresentados sob a forma de mediana, valores mínimos e máximos. Todas as conclusões estatísticas foram efetuadas em nível de 5% de significância. O programa estatístico utilizado foi o Graphpad InStat versão 3.10, E.U.A.

5 ARTIGOS

5.1 Comparison Between The Flour From The Peel of Passion Fruit And ω -3 In The Treatment Of Fructose-induced Insulin Resistance In Wistar Rats

Author: WANDERLEI ONOFRE SCHMITZ

Pharmaceutical Biochemist by the State University of Londrina - UEL / PR.

ADDRESS: Street Ranulfo Saldivar, 458

Parque Alvorada – Dourados - Mato Grosso do Sul - MS. CEP – 79823-420.

phone: 011-55-67-3426-7442 or 011-55-67-81114-4110

e-mail- wanderleischmitz@ufgd.edu.br

Comparison Between The Flour From The Peel of Passion Fruit And ω -3 In The Treatment Of Fructose-induced Insulin Resistance In Wistar Rats

WANDERLEI ONOFRE SCHMITZ¹, ALINE JANAINA GIUNCO², CARINE CONEGLIAN DE FARIAS³, RITA DE CASSIA DORÁCIO MENDES⁴, DÉCIO SABBATINI BARBOSA⁵.

¹ Doctorate in Health Sciences by the State University of Londrina - UEL / PR. Coordinator of the Clinical Laboratory of the University Hospital of the Federal University of Grande Dourados - UFGD / MS. E-mail-wanderleischmitz@ufgd.edu.br. ² Nutritionist graduated by the University of Grande Dourados (UNIGRAN); Dourados, Mato Grosso do Sul 2010. ³ Master in Health Sciences by the State University of Londrina - UEL / PR 2010. ⁴ Prof. Master in Health Sciences from the University of Brasilia - UNB. Coordinator of the Nutrition to the University of Grande Dourados - Unigran / MS. ⁵ Health Sciences Department, University Hospital of Londrina, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil.

Abstract

Insulin resistance (IR) is an inadequate tissue response to the actions of insulin. The aim of this study was to assess the effectiveness of the flour from the peel of the *Passiflora (P.) edulis*, as well as of omega-3 polyunsaturated fatty acids (ω -3) in the treatment of Wistar rats with fructose-induced insulin resistance. 28 rats were divided into 4 groups. The animals were given a diet comprising of 66% fructose. Measures of blood glucose, total cholesterol, high density lipoprotein (HDL) cholesterol and triacylglycerols, as well as aspartate and alanine aminotransferases were attained. The liver was then removed for histopathological analysis. The ω -3 treated group presented with the lowest blood glucose levels. The *P. edulis* treated group showed decreased total cholesterol and HDL, coupled to a significant increase in triacylglycerol levels. These results show that the flour from the peel of *P. edulis* did not promote a significant hypoglycemic action. In fact, although not modulating rodent blood glucose levels, the use of the passion fruit worsened their lipid profile. On the other hand, ω -3 reduced plasma glucose and triacylglycerols levels, as well as reducing the cases of hepatic steatosis.

Keywords: insulin resistance, dyslipidemia, *Passiflora edulis*, omega-3.

Introduction

Insulin resistance (IR) is defined as an inappropriate tissue response to insulin's actions. IR may arise from genetic or acquired conditions, resulting in a state where circulating insulin, by a fault in the receptor or in some post-receptor mechanism, has no physiological action in insulin-sensitive tissues, such as skeletal muscle, adipose tissue, liver and endothelium. Physiologically, insulin inhibits glucagon production in the liver, promotes the removal of circulating glucose by insulin-sensitive tissues and inhibits lipolysis (Pessin and Saltiel, 2000; Rhodes, White, 2002; Bergman et al. 2003; Cozzolino, 2009; Kalupahana et al. 2011). Hyperinsulinemia can be compensatory for IR, allowing the patient to maintain normal blood sugar levels, but when hyperinsulinemia becomes insufficient to maintain glucose homeostasis glucose intolerance occurs, resulting in Type-2 diabetes mellitus (Ascaso et al. 2001).

Concurrent to the development of IR and hyperinsulinemia stages, other comorbidities may emerge, such as systemic arterial hypertension, dyslipidemia, hyperuricemia, and hepatic steatosis, the latter being a pro-inflammatory condition that contributes to the immune inflammatory milieu. Such emergent conditions are very important in raising the risk for cardiovascular disorders. IR may also provoke oxidative stress, increasing the pro-oxidant/antioxidant ratio, resulting in the oxidation of low-density lipoprotein (LDL) due to glycated lipoproteins being more susceptible to oxidation, thereby increasing the risk of atherosclerosis (Reaven, 1997; Ford et al. 2002 Granberry and Fonseca 1999, Grundy et al. 2004; Kalupahana et al. 2011).

As a consequence of inadequate glucose utilization, increased lipolysis occurs in association with raised levels of plasma free fatty acids, increasing the accumulation of triacylglycerols and metabolites derived from fatty acids, especially in the liver but also in muscle. Increased triacylglycerols particles results in the organism generating very low density lipoprotein particles (VLDL), which are more atherogenic, and a decrease in high density lipoproteins (HDL) particles (Howard 1999, Woods et al. 1996; Panarotto et al. 2002; Stolic et al. 2002). The resultant increases in adipose tissue contribute to an elevated inflammatory process. In this context of processes contributing to the development of obesity, patient diet is an important modulatory factor (Kalupahana et al. 2011). A number of dietary factors promote obesity, including increased fructose consumption. Fructose is a monosaccharide that is found in many foods, being a substitute for glucose, given its similar chemical structure. Increased consumption of fructose-rich foods, contribute to weight gain

and consequently to IR, as well as altering the lipid profile and increasing blood pressure. As such, fructose is an important lipogenic agent, with its high intake leading to the rapid accumulation of triacylglycerols, contributing to hyperinsulinemia (Willett et al. 2002; Barreiros 2005; Silva and D'avila 2007; Teff et al. 2004).

Type of food intake is an important IR modulator and thereby the development of Type-2 diabetes. As such, appropriate food intake can be of significant therapeutic value (Mira et al. 2009).

Two such foods are those high in omega-3 polyunsaturated fatty acids (ω -3) and the flour from the peel of passion fruit (*Passiflora edulis*), which is rich in soluble fiber. ω -3 reduces the concentration of serum cholesterol and triacylglycerols by decreasing the hepatic production of VLDL. Pharmacological doses of ω -3, in addition to presenting an anti-inflammatory action, may cause a significant reduction in the plasma triacylglycerol levels (Skulas-Ray et al. 2011). The action of the ω -3 on the reduction of the triacylglycerols is well defined, but its action in preventing IR still remains to be clarified (Kalupahana et al. 2011).

In the same way, soluble fibers decrease the availability of carbohydrate and lipid, and help to reduce blood cholesterol concentrations. This is achieved by lowering the uptake of triacylglycerols bile salts in the small intestine, thereby making the absorption of fats, cholesterol and glucose more difficult (Couto and Wichmann 2011).

The flour of the peel of passion fruit has 66.37 ± 0.71 g of dietary fiber per 100g of flour. This flour has a high "Capacity of Absorption of Organic Molecules" (CAMO - 1.17 ± 0.07). CAMO measures the amount of lipid that a particular fiber is capable of absorbing, which is mediated by the ability of the fiber to combine with a variety of gut substances, including acids and bile salts, as well as cholesterol (Souza et al. 2008).

By reducing the absorption of intestinal dietary cholesterol, the liver is forced to degrade more cholesterol in order to produce new bile acid molecules. In addition, there is an enzymatic inhibition of the endogenous synthesis of cholesterol by *3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase* (HMG-CoA), which is formed from propionate that originates from the metabolism of soluble fiber in the gut (Gonçalves, 2007).

The aim of this study was to assess the effectiveness of the flour from the peel of *P. edulis* and of ω -3 in the treatment of Wistar rats with fructose-induced IR, evaluating the lipid profile, hepatic profile and glucose levels of animals during treatment.

Methods

Preparation of the flour from the peel of Passiflora edulis

12kg of the flour of the peel of *P. edulis* was washed in tap water, disinfected with 1 tablet of 5 grams of the effervescent Hidrosan Plus[®] (Sodium Dichloroisocyanurate concentrated to 2.7%) in 15 liters of water for 20 minutes, whereafter the pulp was removed. Subsequently the peels were picked, placed in a roasting tin in an oven at 200 °C, for about 3 hours, where they were regularly stirred. Once dried, the roasting tin was taken out of the oven, at which point the material was crushed and sieved to get a homogeneous flour (Rockenbach and Roman 2007).

ω-3

Gel capsules of ω-3 (Nature's Bounty Inc. Bohemia New York, USA) containing 300mg of polyunsaturated ω-3 fatty acids, being 26.5 to 30% of eicosapentaenoic acid (EPA) and 17 to 20% of docosahexaenoic acid (DHA) per capsule, were used. The dose administered was of 1 capsule/animal/day by gavage, using a specific probe for the procedure (Jorge et al., 1997).

Experimental Protocol

The experiment was approved by the committee of animal ethics of the University of Grande Dourados - UNIGRAN (number 097/11) in accordance to the law number 11.794, of October 8, 2008. 28 rats (*Rattus Norvegicus*) Wistar male rats were used, weighing 60 to 75g. These were divided into four groups and kept in individual polyethylene cages with stainless steel lids, lined with wood chips, which were replaced three times a week, at which point they were weighed. The room temperature was kept between 20 and 25 °C, relative humidity and noise levels were optimized. The photo period was controlled, providing light from 06:00 to 18:00. After a week of adaptation, the animals were randomly assigned to experimental groups. The animals were divided as follow: Group 1 – control; Group 2 - animals with insulin resistance untreated (IR); Group 3 - animals with IR treated with a diet containing flour of peel of *P. edulis* (5%); and Group 4 - animals with insulin resistance treated with ω-3 (300mg/day). For IR induction, the animals were given a 66% fructose diet (Galem Refines, Israel, outubro de 2011, lote 1145012), which was homogenized with standard rodent food for 52 days. Animals were fed once a day from their arrival until the end of the experiment.

Sample Collection and Analysis

For all painful procedures, animals were anesthetized with ether. Rats were considered anesthetized when they presented regular and shallow breathing, skeletal muscle flaccidity, with absence of reflexes to stimuli. At the end of the experiment 5ml of whole blood was collected, without anticoagulant, by cardiac puncture. Blood was centrifuged to separate the serum, upon which the *analysis* of total cholesterol, HDL, triacylglycerols and the enzymatic activity of the aminotransferases AST and ALT were performed, utilizing the commercial kits of Wiener[®] LTD in automatic equipment: Metrolab 2300 - Wiener[®]. After the blood collection the Lee Index was calculated to obtain a body mass index (BMI), which is the ratio of the cube root of the animals' body weight (in grams) over the snout-anus of the animal (CNA in centimeter) multiplied by 1000 (Moura et al. 2008). After euthanasia by guillotine decapitation, and still under the effect of anesthesia, the liver was removed for histopathological analysis.

Histological preparation of cuts

Fragments of the median liver lobe were fixed in 10% buffered formalin, processed and stained with hematoxylin and eosin (HE). The slides were examined blindly by two observers and quantification of steatosis, as well as any other histological changes were performed by observing 10 fields, using the following scale: 0 (absent), 1 + (discrete), 2 + (moderate), 3 + (accentuated).

Statistical Analysis

The analyses were presented as means and standard error of the mean (SEM). Statistical analysis utilized the STATISTIC 6.0 (STAT SOFT) program, with comparisons between groups using the Tukey test. All statistical conclusions were made at the 5% level of significance.

Results

As shown in table 1, the IR group and *P. edulis* treatment did not significantly alter developmental body weight gain versus controls. However, ω -3 treatment reduced body

weight in the rats. Liver weight was reduced in IR group and ω -3 group versus controls. The *P. edulis* group showed the highest increase in liver weight versus IR group. The relative liver weight to BMI and the Lee Index was similar among all groups.

Table 1. Evaluation the weight of rats with insulin resistance. {INSERT Table 1 here}

Figure 1 shows a increase in glucose levels in the IR group compared to the control group. The ω -3 treatment group showed a significant reduction in blood glucose (55.3 ± 5.6 mg/dL) when compared to the IR group. Animals treated with *P. edulis* showed a blood glucose of 129.8 ± 25.1 mg/dL, resulting in a reduction of 13.11% in relation to the IR group (149.4 ± 26.8 mg/dL), although this reduction was not significant.

Figure 1. Effect of treatment with *P. edulis* and ω -3 on glucose levels in IR rats. {INSERT Figure 1 here}

Figure 2 shows the values of total cholesterol in the groups. By the end of the experiment the control group had a mean total cholesterol of 34.9 ± 1.6 mg/dL, whereas the IR group showed a mean value of 55.9 ± 3.3 mg/dL, being significantly increased versus controls. The *P. edulis* treated group showed a significant reduction of 18.2% in mean total cholesterol (45.7 ± 2.9 mg/dL), when compared to the IR group. There was no significant difference in the ω -3 treatment group when compared with the IR group.

Figure 2. Effect of treatment with *P. edulis* and ω -3 on total cholesterol in IR rats. {INSERT Figure 2 here}

Figure 3 shows HDL values of the animals at the end of the experiment. This figure shows the *P. edulis* group (38.7 ± 2.3 mg/dL) to have a 35.6% reduction in HDL, compared to the control group (60.2 ± 3.9 mg/dL) and 21.43% when compared with the IR group (49.3 ± 2.7 mg/dL). The Treatment with ω -3 did not alter HDL levels (52.7 ± 3.0 mg/dL), when compared with the IR group.

Figure 3. Effect of treatment with *P. edulis* and ω -3 on HDL in IR rats. {INSERT Figure 3 here}

Figure 4 shows triacylglycerols, which were increased in the IR group compared with the control group. Adding ω -3 reduced triacylglycerols (43.0 ± 11.5 mg/dL), when compared to IR alone group. The addition of *P. edulis* (119.0 ± 19.2 mg/dL) resulted in a 19% increase, versus the IR alone group (100.1 ± 19.8 mg/dL).

Figure 4. Effect of treatment with *P. edulis* and ω -3 on triacylglycerols in IR rats. {INSERT Figure 4 here}

Figure 5 highlights the activity of the liver enzymes, AST and ALT. All groups showed a significant increase in both liver enzymes, compared to the control group.

Figure 5. Assessment of liver injury by measurement of activity of AST and ALT enzymes in the blood at the end of treatment. {INSERT Figure 5 here}

Figure 6 shows the liver histopathology evaluation results across experimental groups: Group 1 – the centre-lobular region of the control group liver, without apparent injury (0 - absent), Group 2 - region of IR group liver tissue with several areas of moderate steatosis (2 + - moderate), Group 3 – centre-lobular region of the *P. edulis* treatment liver, where several stressed areas of hepatic steatosis are evident (3 + - accentuated), Group 4 - centre-lobular region of the ω -3 treated group, showing discrete areas of hepatic steatosis (1 + - discrete), but smaller and fewer than those presented by the IR group and the group treated with *P. edulis*.

Figure 6. Liver histopathological images. {INSERT Figure 6 here}

Discussion

The intent of this experiment was to evaluate the efficacy of the flour from the peel of *P. edulis* and ω -3 in the treatment of *Wistar* rats with fructose-induced IR. At the end of treatment we found differences in the weight of the control group liver compared with the IR group liver, but found no significant difference between the control group and the group treated with *P. edulis*.

Eufrásio et al. (2009) quantified the levels of triacylglycerols, finding increased liver weight in animals treated with pectin concentration of 10%. This result suggests that consuming flour of the peel of passion fruit, rich in pectin, can decrease intestinal absorption

of lipids which may lead to an increased synthesis of hepatic triacylglycerols, leading to the development of hepatic steatosis. So this increase in the liver weight of the group treated with *P. edulis* (not significant), was probably related to the accumulation of triacylglycerols in this organ, contributing to the development of hepatic steatosis.

Rockerback and Roman (2007) treated diabetic rats with 25% flour of the peel of passion fruit over a 28 day treatment period, showing the control group to outperform the diabetes groups and diabetic group treated with 25% of flour of peel of passion fruit. But among the diabetes group and diabetic group treated with 25% of flour of peel of passion fruit there was no significant difference in weight between the animals. These results support our findings that the flour of peel of *P. edulis* was not able to reduce the body weight of the animals, who actually showed a relative gain in weight compared to other groups (Lee Index).

Few previous studies have evaluated the utility of ω -3 in reducing body weight. We found that ω -3 was the most effective treatment in attenuating body weight gain.

However, it is important to note that animal age at the beginning of the experimental protocol may modulate the nature of body mass gain, given that young animals have a different metabolism, which results in greater non-fat body mass gain. As such, alterations in diet may be interacting with such developmental processes in the regulation of metabolism and body mass gain (Rosini et al. 2012). However, the difference in the weight gain in our study is likely to be intimately involved with processes driving IR and its consequences. As circulating glucose is not utilized, the reserves of lipids become the predominant source of energy, with the animals consequently gaining less weight than the control group and concurrently showing increased lipids in the bloodstream.

Analyzing the use of the flour of the peel of *P. edulis* and the ω -3 for glycemic control, ω -3 showed the best results, lowering blood glucose unlike *P. edulis* peel flour. Previous work evaluated the effect of passion fruit fiber on glycemia in 24 adult, healthy Wistar rats over 30 days (Nunes et al. 2007). These authors found that the flour of the peel of passion fruit, at a concentration of 5% or 6.5% of dietary fiber, did not cause any hypoglycemic effects. Vieira et al. (2007) also found that the group treated with a diet of 6.5% passion fiber showed no impact on blood glucose levels in Wistar rats, supporting previous work. The study of Rockerback and Roman (2007) showed a hypoglycemic action of peel of passion fruit for the treatment of diabetes, when Wistar rats were treated with 25% flour of peel of passion fruit concentration over 28 days. However, it is important to note that a concentration of 25% of *P. edulis* peel flour is a very high and impracticable amount for a diet, therefore limiting the comparison of the Rockerback and Roman results with our

results. Previous work investigated the effect of *P. edulis* peel flour at doses of 20, 40 and 160 mg/kg in diabetic rats induced by alloxan, showing that *P. edulis* peel flour has dose-dependent hypoglycemic effects in diabetic rats, with 20 mg/kg having no effect on glucose levels (Braga et al. 2010), whilst the doses of 40 and 160 mg/kg had hypoglycemic effects after 4 hours. Once again, only high doses of *P. edulis* peel flour produced a biological effect.

The study by Medeiros et al. (2009), demonstrated that people who ingested 10 g of *P. edulis* peel flour showed a 5.2% reduction in their glucose levels. This reduction was less than the decrease found in this experiment, but indicates that intake of *P. edulis* peel flour may have relevant clinical effects.

Regarding the use of ω -3 in glucose control, Woodman et al. (2002) reported that the intake of 4g of ω -3, rich in fatty acids EPA/DHA, per day for six weeks showed a beneficial effect on IR. This report confirms the results found in our experiment, where the ω -3 reduced the glucose levels. According to Wu et al. (2012), several studies have indicated that the use of ω -3 can reduce IR by increasing leptin and adiponectin secretion, thereby contributing to a reduction in immune inflammatory activation, and associated oxidative stress, that is evident in IR and contributes to its etiology and course.

In this study, the use of *P. edulis* peel flour promoted a significant reduction in total cholesterol as did ω -3 when compared with the IR group. Similar data was found by Eufrásio et al. (2009) in a study using 36 Wistar rats for 58 days to evaluate the effect of different types of fibers on the lipid profile. They concluded that soluble fibers, pectin, and guar gum at the concentrations of 10% and 15% were efficient in lowering total cholesterol in rats that ingested hypercholesterolemia meals. Whereas the work of Queiroz et al. (2008) showed no significant change in total cholesterol levels of diabetic animals which received passion fruit peel flour as treatment.

Despite the reduction in total cholesterol, the HDL reduction in the group treated with *P. edulis* peel flour below the values found in the IR group suggests that this product may damage the lipid profile. According to Olsson et al. (2005), for every increase of 1 mg/dL HDL, there is a reduction of 1.4% on the patient's cardiac risk. This would indicate that the use of *P. edulis* peel flour could have negative cardiovascular consequences if used in the treatment of Type-2 diabetes.

The findings of Eufrásio et al. (2009) are similar, in a study in which rats were exposed to two different diets for 58 days. These two diets contained different sources of fiber (pectin and guar gum) at two different concentrations (10% and 15%), with results showing that soluble fiber dietary addition does not increase serum HDL. The same was observed by

Ramos et al. (2007) who showed that dyslipidemic women treated with *P. edulis* peel flour showed no increase in HDL. In the current study, the group treated with ω -3 not showed a significant increase in HDL compared with the IR group. Moritz et al. (2008), evaluated Wistar rats treated with ω -3 at a concentration of 0.5 g/kg/day in addition to a period of swimming, finding HDL increase. However, when administering at 1g/kg/day in association with swimming, HDL levels decreased, suggesting that high doses of ω -3 may have different effect in this experimental protocol. Rosa et al. (2004) induced dyslipidemia in male Wistar rats by subjecting them to a hyperlipidic diet containing 2g of butter/100g ration. The group treated with ω -3 showed a decrease in total cholesterol levels, but also showed a reduction in HDL compared to the other groups. Overall, previous data on ω -3 effects on cholesterol, total and HDL, have been mixed, at least partly explained by variations in the concentration used. In analyzing the values of triacylglycerols of different groups, the most efficacious effects were observed in the ω -3 treated group, where treatment probably reduced hepatic triacylglycerol synthesis. In contrast, animals treated with *P. edulis* peel flour presented values above the IR group values, likely due to the increased hepatic triacylglycerol synthesis, given that the diet contained little lipid, with the main function of pectin in the feed being to decrease intestinal lipid absorption of lipids. As a large input of fructose leads to increased synthesis of triacylglycerols, it is likely that *P. edulis* peel flour was very ineffective in the control of triglycerides metabolism.

Similar results were also found by Queiroz et al. (2008), where rats treated with passion fruit peel flour at concentrations of 50 and 100% of the recommended daily intake, had higher triacylglycerol values than either control or diabetic animals. In the experiment of Eufrásio et al. (2009) there was no significant triacylglycerol serum level changes following 10% pectin, versus controls. However, it is important to note that the animals in this experiment were healthy animals, in which diabetes had not been induced. Overall, this may indicate that normal individuals consuming flour of peel of passion fruit peel flour would not expect any major changes, but in diabetic individuals that consume large amounts of fructose, the use of passion fruit peel flour can lead to increased concentrations of triacylglycerols.

Studies carried out by Skulas-Ray et al. (2011) in humans, confirmed a hypolipemic action of ω -3. In this study the authors provided 3.4 g of ω -3 per day and found a reduction of triacylglycerols in patients. Thus, pharmacological doses of ω -3 can produce large reductions in triacylglycerols. The authors also found no significant differences in total cholesterol and HDL in treated patients in the control group. These results are similar to the ones found in this work, in which there was a 57% reduction in the plasma triacylglycerol levels.

Jorge et al. (1997) observed that rabbits treated with ω -3 (300mg/kg/day) showed a reduction in the amounts of triacylglycerols, but there were no significant variations in the values of plasma HDL. These authors also observed a significant increase in the concentration of total of plasma cholesterol, a result that was not observed in our study, despite having used the same concentration of ω -3.

The accumulation of lipids in the liver depends on the absorption of non-esterified fatty acids and the ability of the liver to oxidize these fatty acids. In obesity there is an increased intake of fatty acids leading to their accumulation in the liver, consequently increasing triacylglycerol accumulation. ω -3 reduces lipogenesis and increases the oxidation of these fatty acids, thus preventing the accumulation of lipids in the liver (Kalupahana et al. 2011).

As ω -3 acts to reduce hepatic triacylglycerols synthesis, with the increase in triacylglycerol in our experiments being due almost exclusively to fructose metabolism in the liver. The ω -3 action is due to the inhibition the metabolic pathways which increase the production of triacylglycerol, thereby controlling triacylglycerol levels.

In humans, some reports indicate that the principal effect of ω -3 is the reduction of triacylglycerols and VLDL. As VLDL are precursors of LDL, the reduction of this lipoprotein is also often reported. These observations refer to patients with hypertriglyceridemia. In patients with hypercholesterolemia and normal levels of triacylglycerols, the effects of ω -3 on LDL and HDL are less significant (Bortolozzo and Santos 2008). Recent findings indicate that ω -3 can reverse IR cases, hepatic steatosis and reduce the amount of adipose tissue, thereby leading to a reduction of inflammation that develops in the course of IR (Sposito et al. 2007, Kalupahana et al. 2011). The histopathological evaluation of the rat livers of the different experimental groups are shown in Figure 6. Group 1, as expected of controls, did not show any lesion. Group 2, diabetic controls, showed multiple areas of moderate steatosis, indicating that IR animals may develop hepatic steatosis. Histopathological evaluation of Group 3, treated with *P. edulis* peel flour, shows results that are congruous with the data on liver enzymes, with *P. edulis* peel flour treated animals having equivalent or even higher levels of hepatic damage than the IR group. The increased plasma triacylglycerols concentrations in this group may be the responsible for the great accumulation of this lipid in the animal's liver, causing a level of steatosis that is very similar to the IR group.

Group 4, treated with ω -3, showed the smallest and most discrete areas of steatosis when compared to the IR group, and much less when compared to the *P. edulis* peel flour group. Even if the injuries were caused by the accumulation of lipids within cells that lead to

steatosis cases that are reversible, the persistence of this lesion may lead to the worsening of this condition, heightening the risk of cirrhosis.

Conclusion

In this study *P. edulis* peel flour did not promote weight change nor indicate any evidence of a significant hypoglycemic action in IR rats induced by fructose. As well as failing to reduce blood glucose in rats, the use of passion fruit peel flour led to a HDL that is known to be clinically detrimental. These results strongly suggest that the use of passion fruit peel flour in the treatment of diabetic patients should be restricted. In contrast, ω -3 promoted weight reduction, reduced serum glucose and plasma triacylglycerol levels, whilst increasing the HDL fraction and reducing acute hepatic steatosis in animals.

We conclude that ω -3 may be indicated for IR and diabetic patients, whilst the use of *P. edulis* peel flour needs further studies to clarify its action, and possible utility, if any, in IR pathophysiology.

Acknowledgment

The authors would like to thank the Center for Health Sciences, University Hospital of Londrina, the University Center of Grande Dourados (UNIGRAN) and the Clinical Laboratory of the University Hospital of the Federal University of Grande Dourados - UFGD for the use of their laboratories in this experiment. The authors would also like to thank George Anderson, CRC Scotland & London, for English editing of this article.

References

- Alves NNR, Gagliardo LC, Lavinhas FC. (2008). A importância do consumo de fibras dietéticas solúveis no tratamento do diabetes. *Saúde & Amb. Rev.* 3 (2): 20-29.
- Ascaso JF, Romero P, Real JT, Priego A, Valdecabres C, Carmena R. (2001). Cuantiicación de Insulinorresistência com Los Valores de Insulina Basal e Índice HOMA em uma Población no Diabética. *Med Clin (Barc)* 117 (14): 530-533.
- Barreiros RC, Bossolan G, Trindade CEP. (2005). Frutose em Humanos: efeitos metabólicos, utilização clínica e erros inatos associados. *Rev Nutr* 18 (3): 377-389.

- Bergman RN, Zaccaro DJ, Watanabe RM, Haffner SM, Saad MF, Norris JM, Wagenknecht LE, Hokanson JE, Rotter JI, Rich SS. (2003). Minimal model-based insulin sensitivity has greater heritability and a different genetic basis than homeostasis model assessment or fasting insulin. *Diabetes* 52 (8): 2168-2174.
- Braga A, Medeiros TP, Araújo BV. (2010). Investigação da atividade antihiperlipemiante da farinha da casca de *Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae, em ratos diabéticos induzidos por aloxano. *Rev bras farmacogn* 20 (2): 186-191.
- Couto AN, Wichmann FMA. (2011). Efeitos Da Farinha da Linhaça no Perfil Lipídico e Antropométrico de Mulheres. *Alim Nutr* 22 (4): 601-608.
- Cozzolino SMF. (2009). Biodisponibilidade de nutrientes. 3º ed. Barueri, SP: Manole.
- Eufrásio MR, Barcelos MFP, Sousa RV, Abreu WC, Lima MAC, Pereira MCA. (2009). Efeito de diferentes tipos de fibras sobre frações lipídicas do sangue e fígado de ratos wistar. *Ciênc Agrotec* 33 (6): 1608-1614.
- Ford ES, Giles WH, Dietz WH. (2002). Prevalence of the metabolic syndrome among US adults – findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA* 287 (3): 356-359.
- Gonçalves MCR, Costa MJC, Ascitti LSR, Diniz, MFFM. (2007) Fibras dietéticas solúveis e suas funções nas dislipidemias. *Rev Bras Nutr Clin*, 22 (2): 167-73.
- Granberry MC, Fonseca VA. (1999). Insulin resistance syndrome: options for treatment. *South Med J* 92 (1): 2-15.
- Grundy SM, Brewer HBJr, Cleeman JI, Smith SCJr, Lenfant C. (2004). Definition of metabolic syndrome: report of the national heart, lung, and blood institute/ American Heart Association Conference on Scientific issues related to definition. *Circulation* 109 (3): 433-438.
- Howard BV. (1999). Insulin resistance and lipid metabolism. *Am J Cardiol* 84 (1): 28-32.
- Janebro DI, Queiroz MSR, Ramos AT, Sabaa-Srur AUO, Cunha MAL, Fátima MF, Diniz M. (2008). Efeito da farinha da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) nos níveis glicêmicos e lipídicos de pacientes diabéticos tipo 2. *Rev. bras. Farmacogn* 18: 724-732.
- Jorge PAR, Neyra LC, Ozaki RM, Almeida E. (1997). Efeito dos Ácidos Graxos Ômega-3 sobre o Relaxamento-Dependente do Endotélio em Coelhos Hipercolesterolêmicos. *Arq Bras Cardiol* 69 (1): 13-18.

- Kalupahana NS, Claycombe KJ, Moustaid-Moussa N. (2011). (n-3) Fatty Acids Alleviate Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance: Mechanistic Insights. *Adv Nutr* 2: 304–316.
- Medeiros JS, Diniz MFFM, Srur AUOS, Pessoa MB, Cardoso MAA, Carvalho DF. (2009). Ensaio toxicológico clínico da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*, f. flavicarpa), como alimento com propriedade de saúde. *Rev. bras. Farmacogn* 19 (2): 394-399.
- Mira GS, Graf H, Cândido LMB. (2009). Visão retrospectiva em fibras alimentares com ênfase em beta-glucanas no tratamento do diabetes. *Braz J Pharm Sci* 45 (1): 11-20.
- Moritz B, Wazlawik E, Minatti J, Miranda RCD. (2008). Interferência dos ácidos graxos ômega-3 nos lipídeos sanguíneos de ratos submetidos ao exercício de natação. *Rev Nutr* 21(6) :659-669.
- Moura RF, Cambri LT, Quadros Junior AC, Crispim Nascimento CM, Arantes LM, Sebastião E, Tanaka K, Papini CB, Oliani MM, Mota CSA, Ribeiro C, Melo MAR. (2008). Capacidade aeróbia de ratos alimentados com dieta rica em frutose. *Rev Bras Med Esporte* 14 (5): 422-426.
- Nunes DV, Helbig E, Moura FA, Lameiro M, Amaral AS, Costa MD. (2007). Efeito da farinha da casca de maracujá amarelo (*Passiflora alata*) na glicemia de ratos. XVI Congresso de Iniciação Científica 1-5, UFPel Pelotas- RS.
- Olsson AG, Schwartz GG, Szarek M, Sasiela WJ, Ezekowitz MD, Ganz P et al. (2005). High-density lipoprotein, but not low-density lipoprotein cholesterol levels influence short-term prognosis after acute coronary syndrome: results from the MIRACL trial. *Eur Heart J* 26: 890-896.
- Panarotto D, Rémillard P, Bouffard L, Maheux P. (2002). Insulin resistance affects the regulation of lipoprotein lipase in the postprandial period and in an adipose tissue-specific manner. *Eur J Clin Invest* 32 (2): 84-92.
- Pessin JE, Saltiel AR. (2000). Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest* 106 (2): 165-169.
- Queiroz RF, Maximiano FP, Nunes TDS, Moreira DAC, Azevedo L, Silva LBC. (2008). Avaliação do perfil lipídico, glicêmico, conteúdo de glicogênio hepático e cardíaco em ratos diabéticos suplementados com farinha de casca de maracujá (*Passiflora edulis*). *Rev Bras Nutr Clin* 23 (3): 173-177.

- Ramos AT, Cunha MAL, Sabaa-Srur AUO, Pires VCF, Cardoso MAA, Diniz MFM, Medeiros CCM. (2007). Uso de *Passiflora edulis* f. flavicarpa na redução do colesterol. Rev bras farmacogn 17 (4): 592-597.
- Reaven GM. (1988). Role of insulin resistance in human disease 1988. *Diabetes*37 (12): 1595-1607.
- Rhodes CJ, White MF. (2002).Molecular insights into insulin action and secretion. Eur J Clin Invest 32 (3): 3-13.
- Rockerbach C, Roman JA. (2007). Efeitos hiperglicêmico de farinha de casca de maracujá (*Passiflora edulis flavicarpa*) em ratos induzidos a diabetes. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição). Faculdade Assis Gurgacz- FAG, Cascavel.
- Rosa GP, Oliveira E, Paiva RC. (2004). Influência do ácido graxo ômega – 3 e do urucum (*bixaorellana*) nos níveis de colesterol em ratos com dieta hiperlipídica. Anais da 56ª Reunião Anual da SBPC Cuiabá-MT.
- Rosini TC, Silva ASR, Moraes C. (2012). Diet-induced obesity: rodent model for the study of obesity-related disorders. Rev. Assoc. Med. Bras. 58 (3): 383-387.
- Santos, LES, Bortolozo EAFQ. (2008). Ingestão de ômega 3: considerações sobre potenciais benefícios no metabolismo lipídico. Ci Agr Eng: 14 (2): 161-170.
- Silva RJ, D'avila KAL. (2007). Aumento no consumo de frutose como fator de risco para o desenvolvimento de síndrome metabólica. Revista Eletrônica 1 (1): 73-76.
- Skulas-Ray AC, Kris-Etherton PM, Harris WS, Heuvel JPV, Wagner PR, West SG. (2011). Dose-response effects of omega-3 fatty acids on triglycerides, inflammation, and endothelial function in healthy persons with moderate hypertriglyceridemia. Am J Clin Nutr 93: 243–252.
- Souza MWS, Ferreira TBO, Vieira IFR. (2008). Composição centesimal e propriedades funcionais tecnológicas da farinha da casca do maracujá. Alim Nutr 19 (1): 33-36.
- Sposito AC, Caramelli B, Fonsec FAH, Bertolami MC. (2007). IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose: Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. Arq. Bras. Cardiol 88 (1): 2-19.
- Stolic M, Russell A, Hutley L, Fielding G, Hay J, Macdonald G, Whitehead J, Prins J. (2002).Glucose uptake and insulin action in human adipose tissue - influence of BMI, anatomical depot and body fat distribution. Int J Obes Relat Metab Disord 26 (1): 17-23.
- Teff KL, Elliott SS, Tschöp M, Kieffer TJ, Rader D, Heiman M, Townsend RR, Keim NL, D'alessio D, Havel PJ. (2004).Dietary Fructose Reduces Circulating Insulin and Leptin,

Attenuates Postprandial Suppression of Ghrelin, and Increases Triglycerides in Women. *J Clin Endocrinol Metab* 89 (6): 2963-2972.

Vieira SV, Zibetti SR, Silva DO, Lameiro MG, Helbig E, Buchweitz MD. (2007). Atuação da fibra de maracujá na glicemia e ganho de peso de ratos Wistar. Congresso de Iniciação Científica: 1 -119. UFPel Pelotas- RS.

Willett WC, Manson J, Liu S. (2002). Glycemic index, glycemic load, and risk of type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr* 76 (1): 274-280.

Woodman RJ, Mori TA, Burke V, Puddey IB, Watts GF, Beilin LJ. (2002). Effects of purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on glycemic control, blood pressure, and serum lipids in type 2 diabetic patients with treated hypertension. *Am J Clin Nutr* 76: 1007-1015.

Woods SC, Chavez M, Park CR, Riedy C, Kaiyala K, Richardson RD, Figlewicz DP, Schwartz MW, Porte DJr, Seeley RJ. (1996). The evaluation of insulin as a metabolic signal influencing behavior via the brain. *Neurosci Biobehav Rev* 20 (1): 139-144.

Wu JH, Micha R, Imamura F, Pan A, Biggs ML, Ajaz O (2012) Omega-3 fatty acids and incident type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Br J Nutr* 107 (2): 214-227.

Table 1. Evaluation the weight of rats with insulin resistance.

Groups	Initial weight (g)	Final weight (g)	Liver weight (g)	Weight rel. Liver (%)	Lee Index
Control (7)	61.7±6.1 ^a	213.7±5.4 ^a	8.2±0.5 ^a	3.9±0.2 ^a	307.9±3.7 ^a
IR (7)	71.3±6.3 ^a	192.0±4.6 ^a	6.8±0.3 ^b	3.5±0.1 ^a	313.4±7.0 ^a
<i>P. edulis</i> (7)	67.0±6.2 ^a	221.3±13.9 ^a	9.5±0.8 ^a	4.3±0.4 ^a	314.4±5.2 ^a
ω-3 (7)	72.6±6.0 ^a	181.4±4.4 ^b	6.7±0.6 ^b	3.7±0.4 ^a	308.7±3.5 ^a

Notes: () number of animals per group, mean ± SEM; IR - animals with insulin resistance untreated; means followed by different letters differ significantly at the level of $p < 0.05$ (Tukey test).

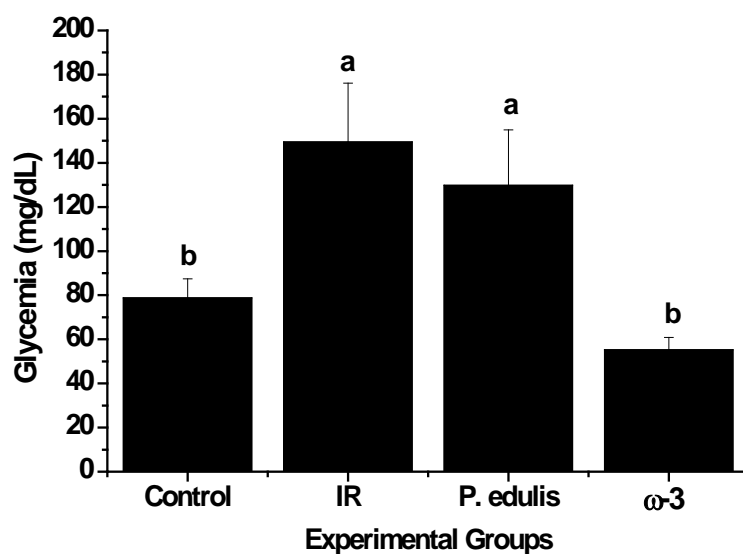


Figure 1. Effect of treatment with *P. edulis* and ω-3 on glucose levels in rats with insulin resistance. Mean ± SEM; IR - animals with insulin resistance untreated; Means followed by different letters differ significantly at the level of $p < 0.05$ (Tukey test) ($n = 7$).

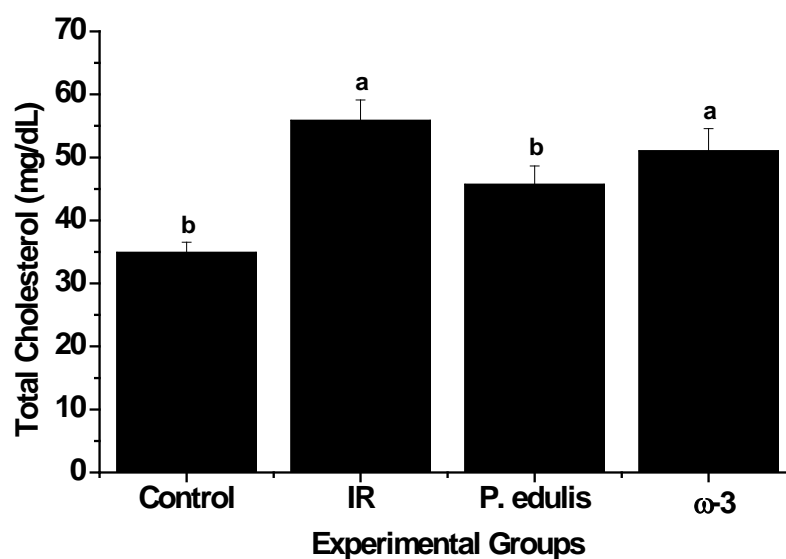


Figure 2. Effect of treatment with *P. edulis* and ω -3 on total cholesterol in rats with insulin resistance. Mean \pm SEM; IR - animals with insulin resistance untreated; Means followed by different letters differ significantly at the level of $p < 0.05$ (Tukey test) ($n = 7$).

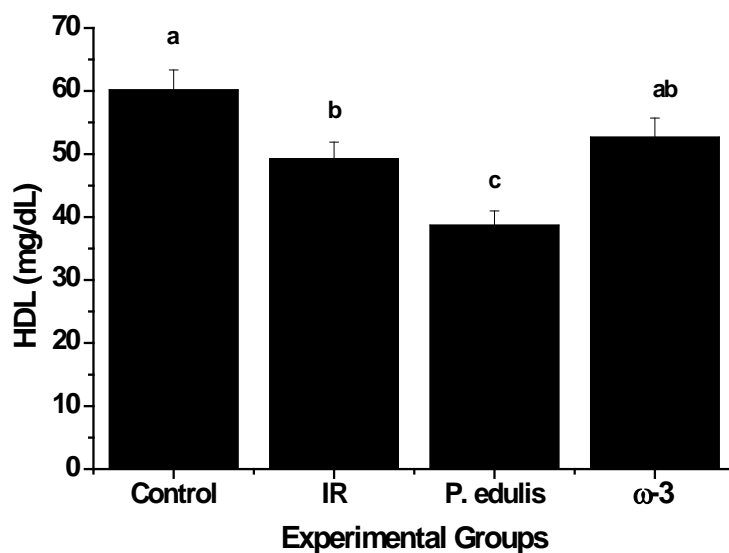


Figure 3. Effect of treatment with *P. edulis* and ω -3 on HDL in rats with insulin resistance. Mean \pm SEM; IR - animals with insulin resistance untreated; Means followed by different letters differ significantly at the level of $p < 0.05$ (Tukey test) ($n = 7$). HDL - high density lipoprotein.

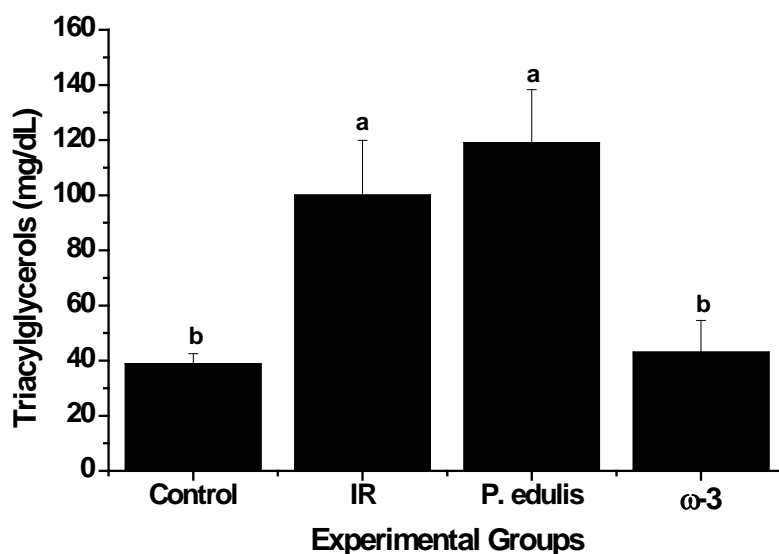


Figure 4. Effect of treatment with *P. edulis* and ω -3 on triacylglycerols in rats with insulin resistance. Mean \pm SEM; IR - animals with insulin resistance untreated; Means followed by different letters differ significantly at the level of $p < 0.05$ (Tukey test) ($n = 7$).

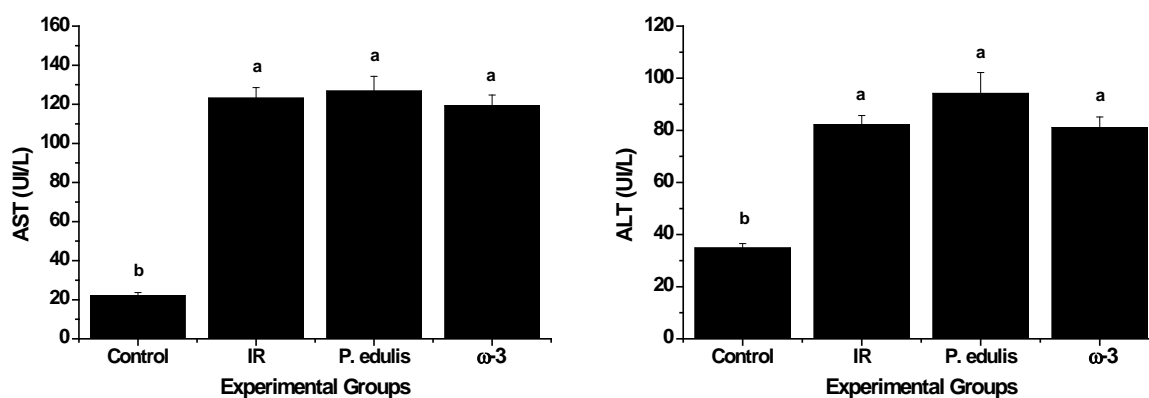


Figure 5. Assessment of liver injury by measurement of activity of AST and ALT enzymes blood of the rats at the end of treatment. Mean \pm standard error; IR - animals with insulin resistance untreated; Means followed by different letters differ significantly at the level of $p < 0.05$ (Tukey test) ($n = 7$). AST - aspartate aminotransferase, ALT - alanine aminotransferase.

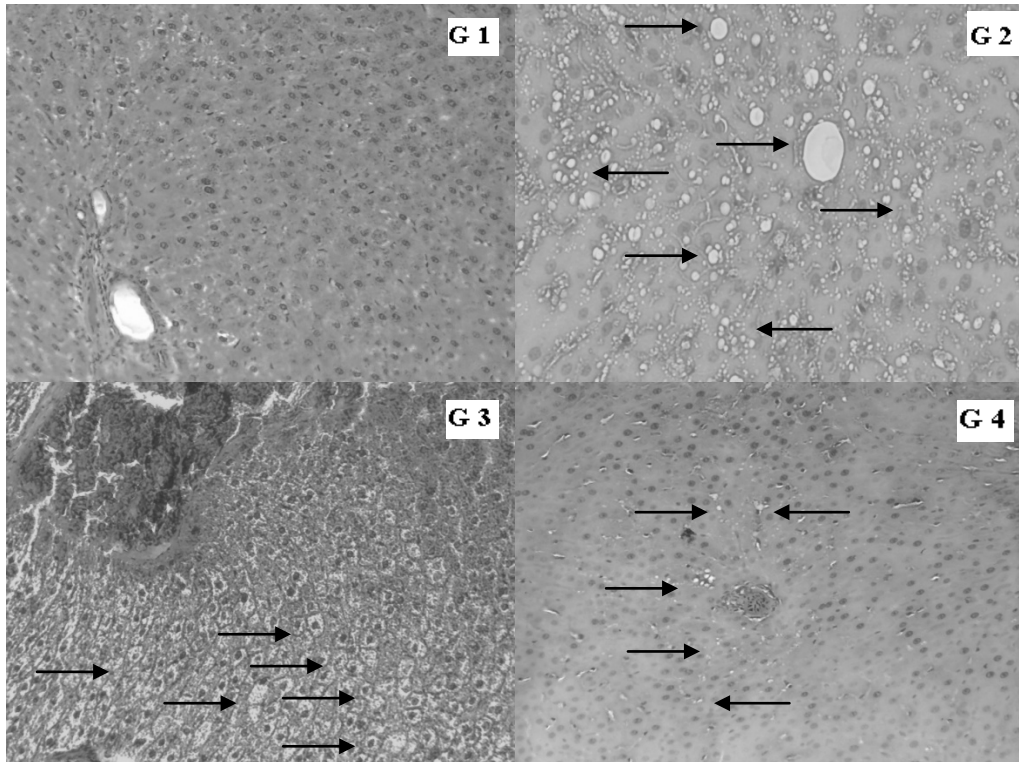


Figure 6. Histopathological study. Liver fragments of the median lobe of the animals were processed and stained with hematoxylin and eosin, 400 X increases in optic microscope, arrows indicate foci of steatosis in tissues; (n = 7).G-1 Normal control; G 2 - animals with insulin resistance untreated; G 3 - animals with insulin resistance treated with diet containing flour from the peel of *P. edulis* (5%) and G 4 - animals treated with insulin resistance ω -3 (300mg/day).

LETTER OF SUBMISSION

To the International Journal of Food Sciences and Nutrition

Letter of Copyright

We the authors; Wanderlei Onofre Schmitz, Aline Janaina Giunco, Carine Coneglian Farias, Rita de Cassia Mendes Dorácio, Sabbatini Decio Barbosa of the paper titled, **Comparison Between The Flour From The Peel of Passion Fruit And ω -3 In The Treatment Of Fructose-induced Insulin Resistance In Wistar Rats** , which we submit for the Appreciation of the Editorial Board of the journal, agreeing that the copyrights related to it shall become exclusive property of the Journal and any total or partial reproduction is prohibited, in any other form or means of printed publication, without prior permission of the International Journal of Food Sciences and Nutrition.

We declare that the article is original and it is not under review in any other form of scientific periodical nor has it been published in another journal in whole or in part. We certify, likewise, that the authors mentioned in the article participated in the concept, production or the experiments that resulted in this article.

We further declare that we have no conflict neither of interest within the investigated theme nor with the products mentioned.

Dourados, October 25, 2013.

Wanderlei Onofre Schmitz

Aline Janaina Giunco

Carine Coneglian Farias

Rita de Cassia Mendes Dorácio

Decio Barbosa Sabbatini

5.2 Action of extracts of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, *Bauhinia forficata* Link and *Campomanesia xanthocarpa* (Mart.) Berg O. in fructose-induced insulin resistance

SCHMITZ, Wanderlei Onofre ¹; FARIAS, Carine Coneglian ²; CARDOSO, Claudia Andrea Lima ³; BARBOSA, Décio Sabbatini ⁴

¹ PhD in Health Sciences by the State University of Londrina - UEL / PR. Coordinator of the Laboratory of Clinical analysis University of the Hospital, Federal University of Grande Dourados - UFGD / MS. E-mail-wanderleischmitz@ufgd.edu.br

² Master in Health Sciences by the State University of Londrina - UEL / PR.

³ Prof. Dr. of the Chemistry Department at the State University of Mato Grosso do Sul (UEMS)

⁴ Prof. Dr. Department of Health Sciences, University Hospital of Londrina, Londrina State University, Londrina, Brazil

Corresponding Author: WANDERLEI ONOFRE SCHMITZ

Pharmaceutical Biochemist by the State University of Londrina - UEL / PR.

ADDRESS: Street Ranulfo Saldivar, 458

Parque Alvorada – Dourados - Mato Grosso do Sul - MS. CEP – 79823-420.

phone: 011-55-67-3426-7442 or 011-55-67-81114-4110

e-mail - wanderleischmitz@ufgd.edu.br

Action of extracts of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, *Bauhinia forficata* Link and *Campomanesia xanthocarpa* (Mart.) Berg O. in fructose-induced insulin resistance

SCHMITZ, Wanderlei Onofre ¹; FARIAS, Carine Coneglian ²; CARDOSO, Claudia Andrea Lima ³; BARBOSA, Décio Sabbatini ⁴

¹ PhD in Health Sciences by the State University of Londrina - UEL / PR. Coordinator of the Laboratory of Clinical analysis University of the Hospital, Federal University of Grande Dourados - UFGD / MS. E-mail-wanderleischmitz@ufgd.edu.br

² Master in Health Sciences by the State University of Londrina - UEL / PR.

³ Prof. Dr. of the Chemistry Department at the State University of Mato Grosso do Sul (UEMS)

⁴ Prof. Dr. Department of Health Sciences, University Hospital of Londrina, Londrina State University, Londrina, Brazil

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: Insulin resistance (IR) is an inadequate tissue response to the actions of insulin. Some species of plants have pharmacologically useful components that may provide utility in the treatment of insulin resistance, including by modifying the metabolism of glucose, inhibiting hyperglycemic factors or by alleviating IR complications or symptoms. **Aim of the study:** The aim of this study was to assess the efficacy of the hydroalcoholic extracts from the leaves of *Camellia sinensis*, *Bauhinia forficata* and *Campomanesia xanthocarpa* in the treatment of Wistar rats with fructose-induced IR. **Materials and Methods:** Extracts were prepared from 200 g of dried leaves of each plant species, with the extraction was carried out using 80% ethanol. 60 rats were divided into 6 groups: Group 1 - control group; Group 2 - animals with untreated IR; Group 3 - IR animals treated with 2% alcohol solution (alcohol 2%); Group 4 - IR animals treated with the extract of *C. sinensis*; Group 5 - IR animals treated with the extract of *B. forficata*; Group 6 - IR animals treated with the extract of *C. xanthocarpa*. The animals were given a diet containing 66% fructose. After 60 days of treatment, blood was collected by cardiac puncture giving measures of glucose, fructosamine, total cholesterol, high density lipoprotein cholesterol (HDL), triacylglycerol, uric acid, urea, creatinine, amylase, lactate dehydrogenase, aspartate and alanine aminotransferases and evaluation of oxidative stress. Euthanasia with ether and decapitation then followed, with animals livers being removed for histopathological analysis. **Results:** Differences in growth parameters occurred across groups over the course of the experiment. The group treated with *C. sinensis* had the lowest concentrations of glucose, total cholesterol, triacylglycerol and uric acid, as well as having decreased levels of hepatic steatosis and the best antioxidant profile. The group treated with the extract of *B. forficata* showed the lowest concentrations of fructosamine, as well as decreased hepatic steatosis, whilst the extract of *C. xanthocarpa* showed reduced nitric oxide production. **Conclusion:** Future studies are needed to further clarify the mode of action of these extracts in IR pathophysiology and their potential clinical utility for diabetic patients.

Keywords: Insulin resistance, dyslipidemia, hyperglycemia, *Camellia sinensis*, *Bauhinia forficata* and *Campomanesia xanthocarpa*.

1. Introduction

Insulin resistance (IR) is associated with hyperinsulinemia, hyperglycemia, obesity, dyslipidemia and systemic hypertension, which can all contribute to the development of metabolic syndrome (Nakagawa et al., 2006; Neto and Tambascia, 2006). This clinical outlook is worse in obese patients with accumulations of intra-abdominal fat (central obesity), which contributes to heightened immune inflammatory processes (Elliott, 2002). Fat accumulation in adipocytes increases the volume of these cells, resulting in their compression of adjacent vascular tissue, leading to chronic conditions of hypoxia and ischemia in fat tissue. Such processes lead adipocytes to secrete various inflammatory substances, including tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and C-reactive protein (CRP). On being released by adipose tissue such substances increase patients' inflammatory status. Furthermore, high concentrations of free fatty acids are released into the bloodstream, with resultant increased lipid oxidation being a potent producer of reactive oxygen species (ROS), thereby increasing oxidative stress in patients, further contributing inflammatory processes (Mohamed-Ali et al., 1998; Wajchenberg, 2000; Hermsdorff; Monteiro, 2004). Diets rich in glucose and fructose can result in metabolic disorders such as IR, hyperglycemia, dyslipidemia, and diabetes (Barros et al., 2007; Moura et al., 2008).

According to Basciano et al. (2005) and Rutledge and Adeli (2007), fructose metabolism occurs in the liver and has facilitated entry into hepatocytes by glucose transporter-2 (GLUT-2), without energy expenditure, or insulin stimulation. In hepatocytes, fructose is phosphorylated at carbon 1 by the enzyme fructokinase forming fructose-1-phosphate, which can be converted to three-carbon molecules (glyceraldehyde, dihydroxyacetone phosphate and glyceraldehyde 3-phosphate). These three-carbon molecules can participate in the glycolytic pathway, being reduced to glycerol or phosphorylated to fructose 1,6-diphosphate and thereby forming glucose or glycogen for the metabolic pathway of gluconeogenesis.

Therapeutic interventions for IR need to be improved. The best available treatments enhance insulin sensitivity. Before the advent of exogenous insulin and oral hypoglycemic agents, the use of medicinal plants was one of the main means of controlling diabetes. As such, plants are important sources of potential therapeutic substances. The flavonoids present in certain plants may facilitate the translocation of the GLUT-4 to the cell membrane, thereby significantly reducing blood glucose, by increasing its internalization into cells. Flavonoids also activate similar signalling pathways as insulin, including tyrosine phosphorylation,

suggesting that adipocytes and the liver may be important flavonoid targets (Dornas et al., 2009).

Catechins are the main chemical therapeutic components of *C. sinensis*, including epicatechin (EC), epigallocatechin (EGC), epicatechin-3-gallate (ECG) and epigallocatechin-3-gallate (EGCG). Catechins account for 26.7% of the compounds derived from the dried leaves of *C. sinensis*, of which approximately 11% is comprised of EGCG, 10% being EGC, 2% being ECG, 2.5% being EC and 15% being of other unidentified polyphenols (Schmitz et al., 2005; Schmitz et al., 2009). According to Bursill et al. 2001, the catechins of *C. sinensis* increase protein and mRNA expression of hepatic low density lipoprotein (LDL) receptors, thereby contributing to decreased cholesterol in the circulation *in vivo*.

Some species of plants of the genus *Bauhinia* have been long-studied, phytochemically and pharmacologically, with *B. forficata* showing the greatest variety of flavonoid compounds (including kaempferitrin and kaempferol) and steroids (including sitosterol). Although most studies show *B. forficata* to have antidiabetic and hypoglycemic activities, some mixed results are also evident, possibly as a consequence of different experimental protocols, including models used, extract and/or fraction preparation, as well as different doses and routes of administration (Marques et al., 2012).

The *Campomanesia sp.* is popularly known as gabirola, guavirova, guavira, small guabiroba and guabiroba-do-mato. Its bark and leaves, prepared by infusion, have therapeutic effects, being used in folk medicine as an antidiabetic, antidiarrheal, antirheumatic, astringent and anti-inflammatory, as well as in the treatment of chronic ulcers (Piva, 2002; Vallilo et al., 2006; Peixoto et al., 2007). The main flavonoids in plants of the genus *Campomanesia sp.* are quercetin, myricetin and rutin. Quercetin is a polyphenolic compound that inhibits oxidative stress caused by inflammation (Miltersteiner et al., 2003). Myricetin is formed by two phenyl groups joined by a chain of three carbons, to which a monosaccharide is attached. The presence of the pyrogallol group is important for the antioxidant activity through the neutralization of free radicals, as well as the inhibition of protein kinases and peroxidases (Meotti, 2006). Studies have shown that a diet based on myricetin associates with increased high density lipoproteins (HDL) levels and decreased LDL oxidation (Yokomizo and Moriwaki, 2005). Rutin acts on capillaries, strengthening and regulating permeability, in addition to inhibiting the formation of free radicals, in part by increasing the antioxidant enzyme superoxide dismutase, thereby promoting an increase in serum HDL cholesterol and reducing the risk factors for atherosclerosis and cardiovascular disease (Rodrigues et al., 2003; Pedriali, 2005).

The aim of this study was to evaluate the benefits of these herbal extracts in the treatment of fructose-induced IR in Wistar rats, by evaluating their impact on rodent lipid profile, hepatic profile, oxidative stress and glycemia.

2 Materials and Methods

2.1. Ethical Considerations in Research

The project was submitted to the Ethics Committee (CEP) of the University Center of Grande Dourados-UNIGRAN and approved (number 097/11) in accordance with law number 11.794, of October 8, 2008, which regulates the use of animals in research and following the guidelines of the European Community Guidelines (EEC Directive of 1986, 86/609/EEC).

2.2 Preparation of Plant Extracts

The hydroalcoholic extracts of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, *Bauhinia forficata* Link and *Campomanesia xanthocarpa* (Mart.) O. Berg were prepared from 200g of dried leaves of each plant species. The samples of *C. sinensis* were provided by Yerba & Company LTD Botanika and the samples of *B. forficata* were provided by the company Santos Flora Trade LTDA Herbs, with the leaves of *C. xanthocarpa* being collected in Itaporã-MS (351 meters of altitude, Latitude: 22 ° 4 '57' South and Longitude: 54 ° 47 '21' West) by Dr. Claudia Andrea Lima Cardoso, Department of Chemistry of the State University of Mato Grosso do Sul (UEMS) and its voucher specimen was identified and deposited in the Herbarium of the Federal University of Grande Dourados–UFGD (number 506890). The extraction was done with 80% ethanol for a period of 15 days. The material macerated in amber glass bottles, being shaken by inversion daily, for 15 minutes. The material was filtered through paper filter (Waterman 60) and the filtrate was stored in an sealed amber bottle, protected from light and refrigerated at 5 °C before its experimental use (Souza et al., 2007).

2.3 Concentration of utilized extracts

A concentration of 2% (v/v) hydroalcoholic extracts was used, diluted in mineral water and provided daily to the animals. Water volume consumed by the animals was measured daily with a measuring cylinder of 100 mL, calculating the average dose of extract

consumed. The extract solution were changed every 24 hours and the troughs were protected from light to avoid deterioration of the active extract ingredients.

2.4. Experimental Animals

Sixty (60) Wistar male rats were used, weighing 300 ± 50 g, which were divided into six groups of ten animals each. The rats were kept in individual cages, lined with wood shavings that were replaced three times per week. The animals were weighed once a week on a scale (Marte[®] semi-analytical model AL500). The granulated standard feed for the species and water "*ad libitum*" were provided, with the extracts of the treated groups being given dissolved in water that was the only source of drinking for the animals. The environment temperature was kept between 20 to 25 °C, with relative humidity and noise levels optimized. The photoperiod was controlled by light provided from 07:00 a.m to 7:00 p.m.

2.5 Experimental Design

A week after environment adaptation, the animals were randomly assigned to experimental groups. The animals were divided into 6 groups: Group 1- control group; Group 2- animals with untreated IR; Group 3- animals with IR treated with 2% alcohol solution (alcohol 2%); Group 4- animals with IR treated with extract of *C. sinensis* 2%; Group 5- animals with IR treated with extract of *B. forficata* 2%; Group 6- animals with IR treated with extract of *C. xanthocarpa* 2%. Treatment in groups lasted 60 days. For IR induction, animals were submitted to a 66% fructose diet (Galem Refines, Israel, October 2011, Lot 1145012) that was homogenized with standard rodent diet throughout the experiment (Nakagawa et al., 2005; Khanal et al, 2012).

2.6 Collection and Analysis of Samples

For all painful procedures, including blood collection, the animals were anesthetized with ether. The rats were considered anesthetized when regular and shallow breathing, skeletal muscle flaccidity and absence of reflexes to stimuli were evident. At the end of the experiment approximately 10 ml of whole blood, without anticoagulant, was collected by cardiac puncture. After the blood coagulated, it was centrifuged for fifteen minutes at 3500 rpm to separate the serum. After centrifugation, an aliquot of serum was stored in the freezer

at -70 °C until its use. The rest of the serum was used to test for the levels of glucose, fructosamine, total cholesterol, HDL, triacylglycerol, uric acid, urea, creatinine, amylase and LDH, as well as aspartate and alanine aminotransferases (AST/ALT). The analysis were performed with the use of commercial kits from Roche LTD[®] in automatic equipment Integra 400 plus - Roche[®]. After blood collection the animals were euthanized by guillotine decapitation, still under the effect of anesthesia. The liver was removed for the measurement of weight and the collection of material collection for histopathologic evaluation. Fragments of the median liver lobe of each animal were fixed in 10% buffered formalin, processed and stained with hematoxylin and eosin (HE). The slides were examined, blindly, by two observers and quantification of steatosis, as well as any other histological changes, were performed by observing 10 fields, using the following scale: 0 (absent), 1 + (discrete), 2 + (moderate), 3 + (accentuated). The Lee Index was calculated to obtain body mass index, which is the ratio of the cubic root of the animals' body weight (in grams) over the length of the snout-anus of the animal (in centimeters) multiplied by 1000 (Bernardis and Petterson, 1968).

2.7 Evaluation of Oxidative Stress

2.7.1 Method of FOX (complex of Fe (III)-xylenol orange)

The FOX reagent was prepared with 10mL of 250mM H₂SO₄, 88mg BHT, 7.6 mg of Xylenol Orange, 9.8mg of ammonium iron sulfate hexahydrate and 90ml methanol. This reagent was stored under Light. The calibration curve was obtained from the standard TEP. The blank consisted of 900μL of reagent FOX. Standards (triplicate) were serially diluted to obtain the concentrations of 4mM (P1 - 100μL PTE) 2mM (P2 - 100μL deionized water + 100μL PTE), 1mM (P3 - 100μL deionized water 100μL + P2), 0.500mM (P4 - 100μL deionized water + 100μL P3) and 0.250mM (P5 - 100μL deionized water + 100μL P4), plus 900μL FOX. The material was incubated at room temperature for 30 minutes and then read in a spectrophotometer, UV-Visible (Helios Beta ThermoFisher Scientific), at a wavelength of 560nm. To perform the analysis of the sample (serum) triplicate samples of 100mL were added to 900μL of FOX reagent and vortexed. After this procedure the material was incubated at room temperature for 30 minutes and then centrifuged for 10 minutes at 3000 rpm and held at the reading spectrophotometer. The concentration of FOX was expressed in mM/L (Nourooz-zadeh et al., 1994; Silva et al., 2011).

2.7.2. Total Reactive Antioxidant Potential (TRAP)

Total reactive antioxidant potential (TRAP) was assessed by chemiluminescence (QL) in an adaptation of the technique described by Repetto et al. (1996). This method detects dihydro antioxidants soluble in the serum. The reaction medium consisted of 1.8mL of 0.1M glycine buffer, pH 8.6, plus 100µL of luminol in aqueous solution, 200µM, 5µL of serum (duplicate) and 100µL of azobis aqueous solution. Peroxyl radical generating azobis rapidly interact with carbon and molecular oxygen, causing oxidation of lipids and proteins. These free radicals react with luminol (which acts as a signal amplifier), producing QL. This reaction is inhibited by superoxide dismutase, catalase and analogs of vitamin E. The addition of plasma also decreases QL to basal levels for a period of time (induction time t_i) proportional to the plasma concentration of antioxidants, until luminol radicals are subsequently regenerated, thereby restoring the initial QL levels. The system is calibrated by an analog of vitamin E (Trolox) 100µL, with a 20µM glycine buffer concentration at pH 8.6. A comparison of the induction time after the addition of known concentrations of Trolox allows plasma values of TRAP to be measured in Trolox equivalents. This experiment was conducted on a Beckman β counter brand (USA) LS 6000 model for 30 minutes with a response range from 300 to 620nm, conducted at a temperature of 30 °C. The results were expressed as µmol Trolox, following Equation II (Repetto et al., 1996):

$$\text{Equation II} = \text{TRAP (mM Trolox)} = 401 \times \frac{\text{Sample time}}{\text{Time Trolox}}$$

2.7.3. Nitric Oxide Metabolites (NOx)

The first stage, in minitubes, consists of the deproteinization of 60µL of plasma (triplicate) by adding 60µL of zinc sulphate at 75mmol/L. The tubes were shaken on a vortex shaker tube for 30 seconds. After that, they were centrifuged at 10,000 rpm for 2 minutes at room temperature, with 70µL of sodium hydroxide at 55mmol/L then added. The tubes were again shaken for 30 seconds and centrifuged at 10,000 rpm for 5 minutes. An aliquot of the supernatant (150µL) was retrieved in small glass tubes and diluted with 50µL of glycine at 45g/L, pH 9.7. For a more accurate assessment, it is necessary to reduce nitrate ions present to nitrite ions. This transformation was performed by treating the sample with cadmium beads. The granules of cadmium, after being washed 3 times with deionized water, were placed in contact with a solution of copper sulfate (5mmol/L) and glycine-sodium hydroxide (15g/L,

pH 9.7) for 5 minutes, with manual shaking. The activated beads must be used within 10 minutes, so two beads were added to cadmium deproteinized and samples transferred to small glass tubes. These are left under agitation for 10 minutes in agitators of the Kline type. Following the process, 100 μ L of the solution was transferred to a microplate for the determination of nitrites, and the beads were washed and stored in a solution of sulfuric acid (H₂SO₄), as they can be regenerated to repeat these steps. For the determination of nitrites reagent 1 and 2 were used. 50 μ L of the reagent 1 and 50 μ L of the reagent 2 were added to the microplate containing the samples and incubated for 10 minutes at room temperature. The calibration curve was obtained from 100mM (125 μ L of stock solution of NaNO₂ 100mM in 100mL of water deionized), obtaining a solution of NaNO₂ 125 μ mol/L. The white was composed of 100 μ L of deionized water, 50 μ L of reagent 1 and 50 μ L of reagent 2. The patterns (triplicate) were serially diluted to obtain concentrations of 125 μ M (P1 - 100 μ L of solution of use NaNO₂ 125 μ mol/L) 62.5 μ M (P2 - 100 μ L deionized water + 100 μ L solution of NaNO₂ use 125 μ mol/L) 31.25 μ M (P3 - 100 μ L deionized water + 100 μ L P2) 15.625 (P4 - 100 μ L deionized water + 100 μ L P3,) and 7.8125 μ M (P5 - 100 μ L deionized water + 100 μ L P4). After that, the patterns received 50 μ L of reagent 1 and 50 μ L of reagent 2 in each well and were incubated for 10 minutes at room temperature. The quantification of NO was performed in a microplate reader (model ASYS Expert Plus) and the readings made at 540nm. The concentration of NO was expressed in μ mol/L (Navarro Gonzalvez et al., 1998).

2.8 Statistical Analysis

Initially an exploratory analysis was carried out to assess whether the variables had a normal distribution (Kolmogorov-Smirnov) and whether there was homogeneity of variance between groups (Levene's test). For the data showing these characteristics, we used the parametric analysis of variance (Tukey-Kramer) complemented by the Bartlett test, allowing results to be given as sample averages and pattern error. Otherwise, non-parametric tests were used: analysis of variance test (ANOVA) nonparametric (Kruskal-Wallis) complemented by the Dunn test. In this case of non-parametric analysis, the results are given as median, minimum and maximum values. Results were judged to be statistically significant when $p < 0.05$. The statistical program used was Graphpad InStat version 3.10, USA.

3. Results

Table 1 presents growing parameters of the animals during the experiment. Initially, all groups started with similar weights, showing no significant weight differences.

Table 1 - Effect of Treatment with the Hydroalcoholic Extracts on Parameters of Growth in IR Rats.

Groups	Initial weight (g)	Final Weight (g)	Liver weight (g)	Relative Liver Weight (%)	Lee Index	H2O /day (ml)	Conc./day (mg)	Total/rat (mg)
Control	371.2a (±14.0)	455.4a (±13.7)	12.13b (±0.37)	2.67b (2.39-2.86)	300.9b (±1.0)	39.9a (±0.9)	*	*
IR	379.6a (±10.5)	437.3a (±13.3)	15.42a (±0.51)	3.54a (3.1-4.2)	307.1a (±1.9)	40.5a (±1.0)	*	*
Alcohol 2%	383.4a (±9.5)	429.1a (±11.3)	14.70a (±0.62)	3.43a (3.12-3.88)	305.1a (±1.6)	37.3b (±1.0)	*	*
<i>C. sinensis</i>	367.0a (±8.4)	416.5b (±10.5)	14.70a (±0.44)	3.57a (3.21-3.72)	296.5b (±1.3)	33.4b (±1.0)	2.57a (±0.08)	154.2a (±4.8)
<i>B. forficata</i>	360.2a (±8.6)	416.6b (±10.0)	13.38b (±0.46)	3.18a (2.93-3.49)	298.1a (±1.1)	29.3c (±0.7)	1.08b (±0.01)	64.8b (±0.6)
<i>C. xanthocarpa</i>	379.4a (±8.6)	424.7a (±9.2)	13.21b (±0.44)	3.16a (2.58-3.48)	298.2a (±0.9)	29.3c (±0.7)	0.15c (±0.00)	9.0c (±0.00)

(10) number of animals per group; IR - animals with insulin resistance untreated; * Group of untreated animals; mean ± standard error; average and medians followed by different letters indicating significance differences: b - significance level of $p < 0.05$. Median with minimum and maximum range.

Table 1 shows that animals treated with *C. sinensis* and *B. forficata* had lower weights at the end of the experiment, compared with the control group. Rat liver weights in the *B. forficata* and *C. xanthocarpa* groups were lower when compared to IR group. Comparing the relative liver weight in relation to body weight, no differences were noted between treated groups, versus the IR group. The IR group had the highest Lee Index (307.1 ± 1.9) when compared with the control group, indicating a higher body mass gain. Among the treated groups only the group treated with *C. sinensis* (296.5 ± 1.3) showed a difference in the Lee Index, indicating a lower body mass gain.

The IR animals drank 40.5 ± 1.0 mL of water and the control group drank 39.9 ± 0.9 mL, with no differences evident. The treated animals consumed less water than the control group and between the treated groups *B. forficata* and *C. xanthocarpa* drank less water (29.3 ± 0.7 mL) when compared with the group treated with *C. Sinensis*. This difference was significant, and consequently these groups consumed less extracts (1.08 ± 0.01 and 0.15 ± 0.00 mg/day) than the group treated with *C. sinensis* (2.57 ± 0.08 mg/day).

The group treated with 2% alcohol showed no significant differences across all measures, versus the IR group.

The IR group and the treated groups showed no differences in comparisons of their growth curves, with all these groups showing significant differences when compared to the control group growth curve, which showed an increase over the course of the experiments. Table 2 shows an analysis of blood glucose. The IR group showed a glucose level of 155.5 mg/dL, which was higher than the control group glucose level (96 mg/dL). Among the treated groups, the *C. sinensis* (110.5 mg/dL) and *B. forficata* (120.0 mg/dL) groups showed a reduction in blood glucose levels, compared with the IR group. These glucose values represent a reduction of 28.9% and 22.8%, respectively, representing a real difference in IR control. The animals treated with *C. xanthocarpa* (130.5 mg/dL) showing no difference when compared to the IR group.

The alcohol 2% group showed a glucose level (158.5 mg/dL) that was similar to that of the diabetic control group (155.5 mg/dL). Analysis of fructosamine levels produced results similar to those of glucose, with animals of the IR group showing higher values, versus control and treated groups, indicating that the extracts decreased protein glycation in animals.

Table 2 - Effect of Treatment with the Hydroalcoholic Extracts on Biochemical Parameters in IR Rats.

Groups	Glucose (mg/dL)	Fructosamine (mg/dL)	Uric Acid (mg/dL)	Urea (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	Amylase (UI/L)
Control	96.0b (81-113)	77.4b (±2.3)	1.05b (0.8-1.4)	29b (23-33)	0.8b (0.7-0.8)	845.0a (±31.8)
IR	155.5a (133-237)	116.4a (±4.5)	1.85a (1.6-2.7)	40a (34-43)	1.0a (0.8-1.2)	835.9a (±18.0)
Alcohol 2%	158.5a (134-235)	117.4a (±4.1)	1.80a (1.5-2.8)	43a (40-49)	0.9a (0.8-1.2)	787.0a (±36.2)
<i>C. sinensis</i>	110.5b (97-149)	96.3b (±5.0)	1.15b (1.0-2.0)	28b (21-41)	0.9a (0.8-0.9)	817.7a (±33.0)
<i>B. forficata</i>	120.0b (90-144)	94.8b (±5.4)	1.45a (1.1-2.0)	26b (21-35)	0.8a (0.6-1.0)	774.0a (±22.0)
<i>C. xanthocarpa</i>	130.5a (120-196)	95.0b (±4.1)	1.70a (0.9-2.1)	22c (17-28)	0.7b (0.6-0.8)	772.0a (±15.6)

(10) number of animals per group; mean ± standard error; IR - animals with insulin resistance untreated; average and medians followed by different letters differ significantly. (b - significance level of $p < 0.05$). Median with minimum and maximum range.

Uric acid levels in the IR group (1.85 mg/dL) versus the control group (1.05 mg/dL), indicates hyperuricemia in the IR group. Similarly with the 2% alcohol group (1.80 mg/dL). Animals treated with the extracts of *C. sinensis* showed a significant 37.8% reduction in uric acid (1.15 mg/dL), when compared to IR group. Animals treated with the extracts of *B. forficata* and *C. xanthocarpa* did not show a reduction in serum uric acid, when compared to the IR group. Increases in urea are also evident in the IR (40 mg/dL) and 2% alcohol (43

mg/dL) groups, when compared to control group. Animals treated with the extracts of *C. sinensis* (28 mg/dL); *B. forficata* (26 mg/dL) and *C. xanthocarpa* (22 mg/dL) showed a reduction in this uremia when compared to the IR group. Similar results are observed with creatinine, with the IR group showing increased creatinine when compared to the control group, with only animals treated with *C. xanthocarpa* showing a reduction in creatinine when compared to the IR group. Amylase showed no difference among all groups (Table 2).

Analysis of serum total cholesterol levels (Table 3), showed that the IR group (60.7 ± 1.9 mg/dL) had increased values versus the control group (44.6 ± 1.0 mg/dL). The groups treated with *C. sinensis* (51.3 ± 1.3 mg/dL) and *C. xanthocarpa* (53.0 ± 2.1 mg/dL) showed a reduction in total cholesterol levels, versus the IR group, with the *B. forficata* treated group (55.2 ± 1.5 mg/dL) showing a trend reduction that failed to reach statistical significance, versus the IR group.

Table 3 - Effect of Treatment with the Hydroalcoholic Extracts on Biochemical Parameters in IR Rats.

Groups	Cholesterol (mg/dL)	HDL (mg/dL)	Triglycerides (mg/dL)	AST (UI/L)	ALT (UI/L)	LDH (UI/L)
Control	44.6c (± 1.0)	24.9b (± 0.9)	93b (79-123)	136.3b (± 3.6)	43.8b (± 2.8)	2849c (± 220)
IR	60.7a (± 1.9)	26.6a (± 0.4)	288,5a (264-347)	196.8a (± 5.3)	55.3b (± 1.7)	5507a (± 379)
Alcohol 2%	60.2a (± 1.0)	26.1a (± 0.9)	295a (252-389)	191.6a (± 4.1)	53.7b (± 2.3)	6014a (± 373)
<i>C. sinensis</i>	51.3b (± 1.3)	29.5a (± 1.0)	185b (123-340)	159.7b (± 6.5)	50.5b (± 3.3)	4482b (± 283)
<i>B. forficata</i>	55.2a (± 1.5)	28.0a (± 0.9)	203,5b (112-275)	216.1a (± 7.3)	76.4a (± 4.0)	6341a (± 198)
<i>C. xanthocarpa</i>	53.0b (± 2.1)	28.3a (± 1.4)	262a (210-337)	148.8b (± 7.6)	52.8b (± 4.0)	4054b (± 243)

(10) number of animals per group; IR - animals with insulin resistance untreated; average \pm standard error; average and medians followed by different letters differ significantly among itself (b - significance level of $p < 0.05$). Median with minimum and maximum range.

Animals in the IR group exhibited an increase in HDL compared to the control group, but not in comparison to the treated groups. Extract treated groups showed a slight increase in HDL compared to the IR group. Control group triacylglycerol levels had a median of 93 mg/dL, with the IR group showing a median of 288.5 mg/dL, indicating hypertriglyceridemia in the IR group. Among treated groups, the groups treated with *C. sinensis* and *B. forficata* showed a reduction in triacylglycerol levels, 185 mg/dL and 203.5 mg/dL respectively, when compared to the IR group. The group treated with *C. xanthocarpa* did not show a reduction in triacylglycerol levels (262 mg/dL).

Enzymatic assessment of the degree of liver injury was done by analyzing the activity of the AST, ALT and LDH enzymes (Table 3). The IR group showed an increase in the activity of the AST and LDH enzymes, but no increase in ALT, compared to the control group. The group treated with *B. forficata* showed an increase in the activity of AST, ALT and LDH enzymes, unlike the groups treated with *C. sinensis* and *C. Xanthocarpa*, which did not show any differences in AST, ALT and LDH enzymes, in comparison to the control group.

Table 4 - Effect of Treatment with the Hydroalcoholic Extracts on Parameters of Oxidative Stress in IR Rats.

Groups	FOX (mmol/L)	TRAP (μ M trolox)	Nitric Oxide (μ mol/L)
Control	1.35b (0.84-2.24)	320.6a (228.6-548.9)	3.36a (1.56-6.18)
IR	1.80a (1.51-2.35)	150.5b (117.0-203.8)	6.03a (4.65-9.37)
Alcohol 2%	1.33b (1.02-1.96)	190.5b (171.0-330.0)	4.59a (2.98-6.97)
<i>C. sinensis</i>	0.94b (0.54-1.01)	275.5a (156.7-385.4)	3.57a (3.11-5.75)
<i>B. forficata</i>	1.53a (1.05-1.93)	284.6a (156.6-378.8)	5.21a (2.40-9.20)
<i>C. xanthocarpa</i>	1.65a (0.97-1.92)	229.0b (162.7-399.0)	3.05b (2.06-4.58)

(10) number of animals per group; IR - animals with insulin resistance untreated; medians with minimum and maximum range; medians followed by different letters differ significantly (b - significance level of $p < 0.05$). * AOPP μ mol/L equivalent of chloramine-T.

Analysis of animals FOX values (Table 4), showed a difference between the control group (1.35 mmol/L) and the IR group (1.80 mmol/L), demonstrating that IR increases processes of lipid peroxidation. Among the treated groups only *C. sinensis* (0.95 mmol/L) showed a difference when compared to the IR group, indicating animal protection. As can be seen in Table 4, TRAP values in the control group (320.6 μ MTrolox) show a difference, versus the IR group (150.5 μ MTrolox), indicating therefore, a lower antioxidant capacity of the IR group. Animals of *C. sinensis* and *B. forficata* groups showed an overall higher antioxidant value, versus the IR group, indicating increased antioxidant profiles in these treatment groups. The group treated with *C. xanthocarpa* (229.0 μ MTrolox) showed no differences when compared to the IR group. Analysis of NO is also shown in Table 4. The control group (3.36 μ mol/L) showed a value 44.3% lower than the IR group (6.03 mmol/L), which, although not statistically significant, indicates a trend increase in NO production in IR animals. Only the *C. xanthocarpa* group (3.05 μ mol/L) showed a significant reduction in NO values, versus the IR group, although the decrease evident in the *C. sinensis* group (3.57 mmol/L), approached significance.

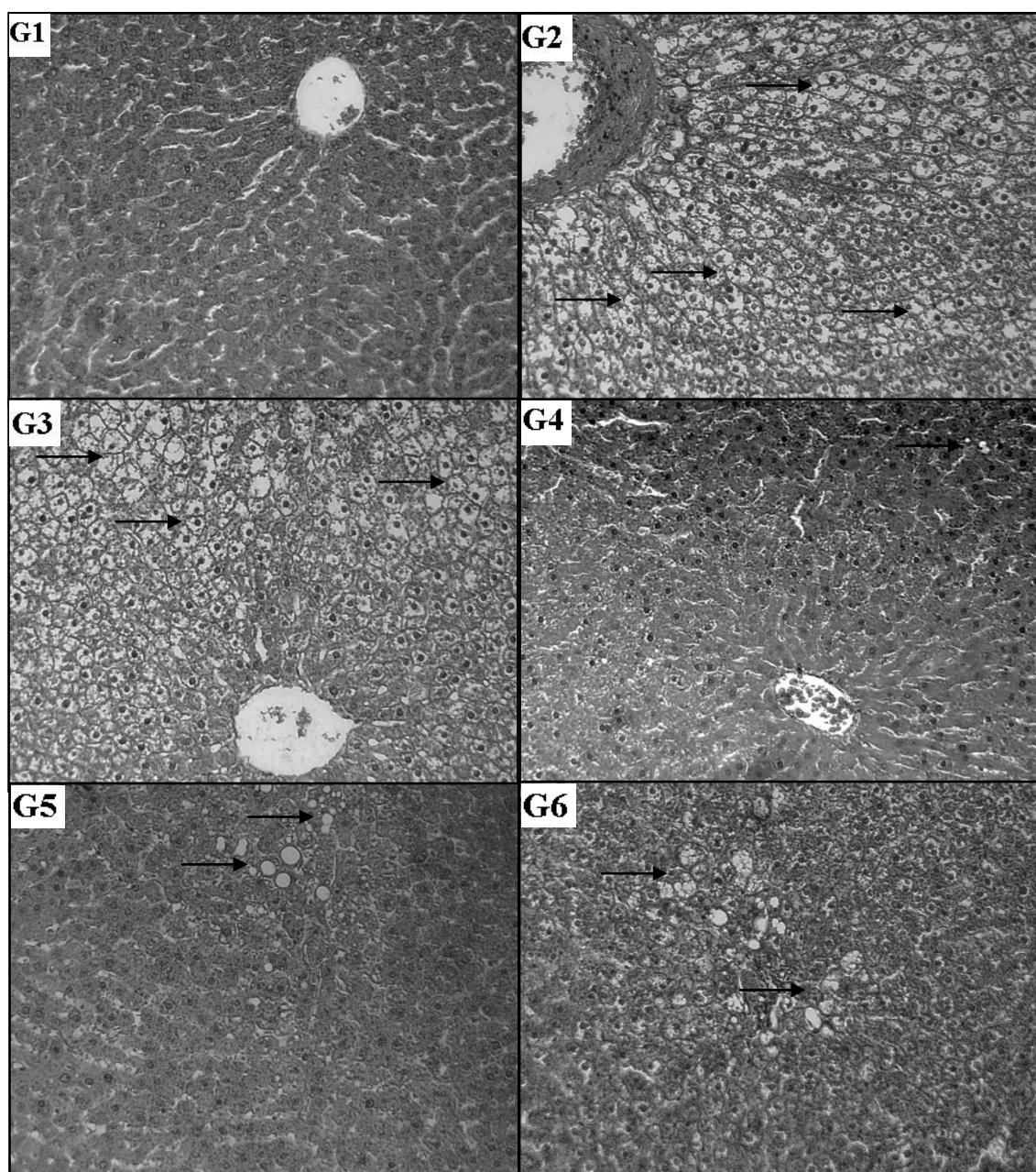


Figure 1 - Histopathological study of rat liver tissue. Liver fragments of the median lobe of the animals were processed and stained with hematoxylin and eosin; magnification at 400 X by optical microscope. Arrow indicates steatosis foci in the tissues; (N = 10).

Figure 1 shows the images of the liver histological sections of rats across groups: Group 1- centrilobular region of the control group liver, which presented with no apparent injury (0 - absent); Group 2- IR group liver, which showed multiple steatosis foci (3 + - accentuated); Group 3- 2% alcohol group liver section showing showing multiple steatosis foci (3 + - accentuated); Group 4- centrilobular region of the liver of the *C. sinensis* treated group, which showed almost no evidence of hepatic steatosis (1 + - discrete); Group 5- *B.*

forficata treated group liver, which showed discrete hepatic steatosis foci that were smaller and fewer than those presented by the diabetic control group, with these lesions indicating an accumulation of lipids within cells (1 + -discrete); Group 6- *C. xanthocarpa* treated group liver, which shows several hepatic steatosis foci, at a moderate level (2 + - moderate) in comparison to the IR group, indicating some lipid accumulation.

4. DISCUSSION

By analyzing liver weights and their relative changes, we found that the animals from the IR and the 2% alcohol groups showed the highest liver weight, versus the animals in the control group. The relative weight of the liver is an important indicant of steatosis, which is associated with increased liver weight.

The Lee Index represents the body mass index of the animal. The IR group had the highest significant body mass gain, which is in accordance with the data of Moura et al. (2008), who used a 60% fructose diet in 16 male Wistar rats from weaning (21 days) until adulthood (90 days). This study also found an increase in the Lee Index of the diabetic group, paralleling the results of our study. Here, among the groups treated with the plant extracts, we found that the *C. sinensis* treated group showed the lowest Lee Index. This result is supported by a previous study (Vera-Cruz et al., 2010). The *C. sinensis* treated group ingested more water and consequently increased levels of the active extracts. Such higher intake of active extract may have contributed to the lower final body weight and the lower Lee Index evident in these animals. This links to data showing that green tea polyphenols increase metabolism and burn fat, in turn contributing to a lower body mass gain (Monteiro et al., 2008).

A group divergence in weight gain only emerged after the third weighing, at approximately day 15, suggesting that this a likely time point for the development of IR. Our results are supported by previous research, where *B. forficata* treated animals and diabetic control animals also showed decreased weight, versus normal controls (Curcio et al., 2012).

This difference in weight gain of rats is related to IR onset, as rats are unable to utilize circulating glucose, using lipids and proteins as an energy source instead, with the animals consequently gaining less weight and showing increased circulating blood lipids. Concomitant to smaller weight gain and lower growth, adipose tissue accumulates, evidenced by the IR group, who gained least weight, but had the highest Lee Index (307.1 ± 1.9). This suggests a propensity to obesity in these animals. Other factors, such as those controlled for in our study, including rodent age and diet, can affect the genesis of obesity (Rosini et al., 2012),

and may have contributed to some of the mixed results in previous studies. According to Mayes (1993), metabolised fructose can be converted into glucose, lipids and lactate, with fructose supply interfering with the utilization of glucose "*in vivo*", contributing to IR, lipogenesis and dyslipidemia (Basciano, 2005).

The IR group shows a clinical state of hyperglycemia, as well as an increase in fructosamine levels, indicating plasma protein glycation (in this case, specifically, albumin). There is a close relationship between the metabolism of fructose and glucose. Fructose influx, especially to the liver, results in its catabolism to simple carbohydrates, thereby inhibiting the metabolism of glucose and its uptake. This stimulates lipogenesis and the synthesis of triacylglycerols, being the reason for the increase flow of acetyl-CoA and glycerol 3-phosphate, as a consequence of fructose catabolism. These metabolic changes are intimately related to IR onset (Elliot, 2002; Basciano, 2005). Previous research has highlighted the primary consequence of high fructose intake as being glucose intolerance and hypertriglyceridemia, as well as IR (Moura et al., 2008).

Previous work supports this. Rats treated with a 69% fructose diet for four weeks showed increased glucose levels as well as IR emergence (Thorburn et al., 1989). Similarly, a 60% fructose diet for 15 days can increase serum glucose (Kelley et al., 2004). These results are supportive of our findings, where a fructose-based diet increased glucose and the glycation of proteins.

Vera-Cruz et al. (2010) performed an oral glucose tolerance test in rats treated with *C. sinensis*, showing a significant reduction in blood glucose levels at 1 and 2 hours after this test. Similar results were found by Curcio et al. (2012), where animals were treated with the aqueous extract of *B. forficata*, showing a significant reduction in glucose concentration from 364.2 ± 27.43 mg/dL to 235.4 ± 20.58 mg/dL. These experiments support our data, where *B. forficata* and *C. sinensis* extracts showed the best hypoglycemic action in IR animals. These results therefore, strongly support the hypoglycemic action of both *B. forficata* and *C. Sinensis* extracts.

As shown by Lino et al. (2004), the leaf extract of *B. forficata* has chemical constituents that decrease blood glucose. This may be mediated by a number of mechanisms, including a reduction in intestinal glucose absorption or gluconeogenesis inhibition. Reduced gluconeogenesis is more likely, as the absorption of fructose from the gut is mediated by the GLUT-5, which is a different transporter than that utilized by glucose. Because of this, it is possible that *C. sinensis* and *B. forficata* extracts can act on both gluconeogenesis and/or fructose metabolism.

According Lanaspá et al. (2012), fructose can stimulate the synthesis of uric acid by the purine degradation pathway, which is linked to a rapid phosphorylation of fructose by fructokinase generating adenosine monophosphate (AMP), which is degraded by activating AMP Deaminase, resulting in the production of uric acid. Therefore, a high intake of fructose can lead to a state of hyperuricemia, as observed in the IR group. The animals treated with the extracts of *C. sinensis* showed a reduction in serum uric acid. This suggests that *C. sinensis* extract may be able to reduce the phosphorylation of fructose, thereby leading to a lower AMP concentration and thus lowering uric acid synthesis.

The increase in urea and creatinine in the IR group suggests a loss of renal function. As the *C. sinensis* and *B. forficata* extracts were able to reduce blood glucose, and thereby the glycation of proteins, it is possible that the reduction in glycation also reduces kidney injury, as well as decreasing urea levels.

As there was no significant difference in the amount of amylase among all groups, it is unlikely that treatment induced pancreas damage, which, if evident, may also interfere with insulin secretion. As such, any changes in glucose are driven solely by metabolic changes and not due to decreased insulin secretion as a consequence of pancreatic injury.

The lipid profile changes in our study are very similar to those of Kelley et al. (2004), who also found fructose diet induced increases in serum cholesterol levels. Our results show a 36% increase in total cholesterol in the IR group compared to the control group. *C. sinensis* and *C. xanthocarpa* extracts led to the largest reduction in total cholesterol, which may have significant consequences for reducing the cardiac risk in patients. Not unimportantly, extract treated animals showed a slight increase in HDL (about 4 mg/dL), versus controls. It is estimated that for each 1 mg/dL decrease in HDL there is a 1.4% increase in cardiac risk, suggesting that extracts may decrease cardiac risk by 5.6% (Olsson et al., 2005).

Our results showed that a fructose diet increased triacylglycerols by 307%, which is very similar to the data of Kelley et al. (2004) who found a 277% increase after 15 days on a 60% fructose diet. Our data also highlights the utility of *B. forficata* and *C. sinensis* extracts in reducing triacylglycerol levels, suggesting clinical value for hypertriglyceridemia patients. A recent meta-analysis (Zheng et al., 2011) shows *C. sinensis* extract to have a hypocholesterolemic action, reducing LDL and increasing HDL levels. As with our results, this effect is not always significant, and again related to the increased metabolism and altered lipid oxidation that catechin extracts promote. AST, ALT and LDH are often used in the assessment of liver injury. *B. forficata* extract treated animals showed increases in these variables, including in comparison to the IR group. Such increases may indicate that the

alcoholic extract of *B. forficata* has a hepatotoxic action when ingested at doses and for the duration (60 days) used in this experiment.

The antioxidant activity of flavonoids found in *C. sinensis*, *B. forficata* and *C. xanthocarpa* extracts is related to the presence of hydroxyl groups in their phenolic structure. Such hydroxyl groups have the property of giving hydrogens, thereby acting as reducing agents and enabling the elimination of free radicals. As such, the flavonoids are responsible for inhibiting the oxidation of LDL, as well as the peroxidation of a number of structures, including: membrane phospholipids, microsomal lipids and mitochondrial lipids, as well as erythrocyte photo-oxidation (Schmitz, 2005; Morais et al., 2009).

The Fox method is used to evaluate lipid membrane peroxidation, by measuring the hydroperoxides in the plasma. This method is based on the oxidation of ferrous ions to ferric ions under acidic conditions, which react with the dye indicator (xylenol orange), which binds to the ferric ion to produce a colored complex. This method allows an assessment of the degree of oxidative stress and peroxidation of cell membranes (Nourooz-Zadeh et al., 1994; Silva et al., 2011). The IR group showed a difference versus controls, with the data indicating a higher production of hydroperoxides and greater oxidative stress in the IR group. The *C. sinensis* extract treated group showed the lowest concentration of FOX among the treated groups, when compared with IR group, thereby showing enhanced ability to reduce lipid peroxidation.

The TRAP method detects plasma total antioxidant capacity, including both water- and fat-soluble antioxidants. During IR development, animals show evidence of oxidative stress as a consequence of free radicals generation, driven by the production of superoxide, hydroxyl radical, hydrogen peroxide and peroxynitrite (Repetto, 1996). Increased oxidants deplete the antioxidant resources of animals, which is evidenced in the data here by the significant reduction in the antioxidant capacity of the IR group, versus controls. The total antioxidant capacity of the *C. sinensis* and *B. forficata* extract treated animals at the end of the experiment, was far superior to the IR group, suggesting their utility in maintaining the antioxidant status of animals during IR development.

NO is very unstable, being quickly degraded to nitrites and nitrates, which can be detected in the serum. The method of measuring NO is based on the reduction of nitrate to nitrite, which is mediated by oxidation-reduction reactions and is then subsequently detectable by colorimetric measurement (Navarro-Gonzalvez et al. 1998). In pathological conditions, such as diabetes, increased synthesis of NO is evident, with resultant nitrosative stress being an important contributor to the inflammatory environment. Consequently, the decreased NO

production in the *C. xanthocarpa* extracts treated group indicates a reduction in wider inflammatory processes. (Navarro-Gonzalvez et al., 1998).

The induction of steatosis in animals is driven by the stimulated synthesis of triacylglycerol in the high-fructose diet group, with triacylglycerol accumulation then occurring in the liver, in turn triggering hepatic steatosis. This increase in triacylglycerol can reduce hepatic insulin sensitivity and lead to increased formation of liver VLDL (Elliott 2002; Basciano, 2005). Previous work also observed increased hepatic fat accumulation, indicative of steatosis (Kelley et al., 2004).

The degree of fatty liver associates with triacylglycerol levels, with high blood triacylglycerol positively associating with enhanced indicants of hepatic steatosis. Therefore, the reduction of triacylglycerol by *C. sinensis* and *B. forficata* extracts contributes to lower hepatic steatosis. In the histopathological evaluation, *C. sinensis* extracts produced lower hepatic lipid accumulation, likely as a consequence of the *C. sinensis* extract reducing lipogenesis and increasing fatty acid oxidation (Dulloo et al., 1999). This finding is in agreement with the experiments of Vera-Cruz et al. (2010) in obese rats, which, when treated with *C. sinensis* extracts, showed a reduction in acute hepatic steatosis.

The *C. xanthocarpa* extract group showed the highest level of steatosis, although this histopathologic change was smaller than that occurring in the diabetic group. Also, the *B. forficata* extracts treated group had a minor impact on the lipid profile, with *B. forficata* acting primarily by decreasing glucose synthesis. Although many articles cite *B. forficata* as an antidiabetic agent, reports as to its efficacy in the treatment of hyperlipidemia are rare (Pizziolo et al., 2011). The *C. xanthocarpa* extract had little action in the reduction of acute hepatic steatosis or on the lipid profile.

Also the group treated with *C. xanthocarpa* extracts showed no significant difference in triacylglycerols when compared to IR group. As there was no reduction in the levels of triacylglycerol in this group, the *C. xanthocarpa* extracts group had the highest level of steatosis among the extract treated groups.

5. CONCLUSION

In conclusion, the *C. sinensis* extract conferred the most significant hypoglycemic action in Wistar rats with fructose-induced IR. Moreover, it promoted improvements in the lipid profile, reduced hepatic steatosis and increased the antioxidant profile. *B. forficata* extracts showed a hypoglycemic action, with less impressive effects on the lipid profile,

although also decreasing hepatic steatosis. Finally, *C. xanthocarpa* extract proved ineffective in the regulation of blood glucose and in control of dyslipidemia, therefore having little impact on levels of hepatic steatosis. However, *C. xanthocarpa* extract showed good anti-inflammatory action, reducing NO production. Overall, these extracts provided indications of possible clinical utility in the course of the many human conditions that associate with increased IR, especially diabetes. Further studies are required to clarify their particular clinical utilities.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Center for Health Sciences, University Hospital of Londrina, the University Center of Grande Dourados (UNIGRAN) and the Clinical Laboratory of the University Hospital of the Federal University of Grande Dourados-UFGD for the use of their laboratories for this experiment. We would also like to thank the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel- CAPES grant Doctoral scholarship. The authors would like to thank George Anderson, CRC Scotland & London for English editing services.

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

Barros, C.M.M.R; Lessa, R.Q; Grechi, M.P; Mouço, T.L.M; Souza, M.G.C; Wiernsperger, N.; Bouskela, E., 2007. Substitution of drinking water by fructose solution induces hyperinsulinemia and hyperglycemia in hamsters. *Clinics*. São Paulo, 62, 327-334.

Basciano, H.; Federico, L.; Adeli, K., 2005. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutrition & Metabolism* 2, 1-14.

Bernardis, L.L.; Petterson, B.D., 1968. Correlation between "Lee index" and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *J Endocrinology* 40, 527-528.

Bursill, C.; Roach, P.D.; Bottema, C.D.K.; Pal, S., 2001. Green tea upregulates the low-density lipoprotein receptor through the sterol-regulated element binding protein in HepG2 liver cells. *J Agric Food Chem.* 49, 5639-5645.

Curcio, S.A.F.; Stefan, L.F.B.; Randi, B.A.; Dias, M.A.; Silva, R.E.; Caldeira, E.J., 2012. Hypoglycemic effects of an aqueous extract of *Bauhinia forficata* on the salivary glands of diabetic mice. *Pak. J. Pharm. Sci.* 25, 493-499.

Dornas, W.C.; Oliveira, T.T.; Dores, R.G.R.; Fabres, M.H.A.; Tanus J. Nagem, T.J., 2009. Efeitos antidiabéticos de plantas medicinais *Rev. Bras. Farmacogn* 19, 488-500.

Dulloo, A.G.; Duret, C.; Rohrer, D.; Girardier, L.; Mensi, N.; Fathi, M.; Chantre, P.; Vandermander, J., 1999. Efficacy of a green tea extract rich in catechinpolyphenols and caffeine in increasing 24-h energy expenditure and fat oxidation in humans. *Am J Clin Nutr* 70, 1040-1045.

Elliott, S.S.; Keim, N.L.; Stern, J.S; Teff, K.; Havel, P.J., 2002. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *Am J Clin Nutr.* 76, 911-922.

Hernsdorff, H.H.M.; Monteiro, J.B.R., 2004. Gordura Visceral, Subcutânea ou Intramuscular: Onde Está o Problema? *Arq Bras Endocrinol Metab* 48 (6), 803-811.

Kelley, G.L.; Allan, G.; Azhar, S., 2004. High Dietary Fructose Induces a Hepatic Stress Response Resulting in Cholesterol and Lipid Dysregulation. *Endocrinology* 145, 548-555.

Khanal, R.C.; Howard, L.R.; Wilkes, S.E.; Rogers, T.J.; Prior, R.L., 2012. Effect of Dietary Blueberry Pomace on Selected Metabolic Factors Associated with High Fructose Feeding in Growing Sprague–Dawley Rats *Journal of Medicinal Food* 15 (9), 802–810.

Lanaspa, M.A.; Sanchez-Lozada, L.G.; Choi, Y.J.; Cicerchi, C.; Kanbay, M.; Roncal-Jimenez, C.A.; Ishimoto, T.; Li, N.; Marek, G.; Duranay, M.; Schreiner, G.; Rodriguez-Iturbe, B.; Nakagawa, T.; Kang, D.H.; Sautin, Y.Y.; Johnson, R.J., 2012. Uric Acid Induces Hepatic Steatosis by Generation of Mitochondrial Oxidative Stress Potential Role in Fructose-Dependent and -Independent Fatty Liver. *J. Biol. Chem.* 287, 40732-40744.

Lino, C.D.; Diogenes, J.P.L.; Pereira, B.A.; Faria, R.A.P.G.; Neto, M.A.; Alves, R.S.; Queiroz, M.G.R.; Sousa, F.C.F.; Viana, G.S.B., 2004. Antidiabetic activity of *Bauhinia forficata* extracts in alloxan-diabetic rats. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 125-127.

Marques, G.S.; Rolim, L.A.; Alves, L.D.S.; Silva, C.C.A.R.; Soares, L.A.L.; Rolim-Neto, P.J., 2013. Estado da arte de *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae) como alternativa terapêutica para o tratamento do diabetes mellitus. *Rev Ciênc Farm Básica Apl* 34 (3): 313-320.

Mayes, P.A., 1993. Intermediary metabolism of fructose. *Am J Clin Nutr.* 58, 754-765.

Meotti, F. C. Análise dos Mecanismos de Ação Antinociceptiva e Antiinflamatória do Flavonóide Miricitrina: Estudos *In Vivo* e *In Vitro*. 2006. 131f. Dissertação (Doutorado em Bioquímica Toxicológica) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2006.

Milstersteiner, A.; Milstersteiner, D.; Filho, N.P.; Frota, A.R.; Ely, P.B.; Zettler, C.G.; Marroni, C.A.; Marroni, N.P., 2003. Uso de quercetina a longo prazo em ratos cirróticos. *Acta Cir. Bras.* 18, 232 – 237.

Mohamed-Ali, V.; Pinkney, J.H.; Coppack, S.W., 1998. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int J Obes* 22, 1145-1158,

Monteiro, R.; Assunção, M.; Andrade, J.P.; Neves, D.; Calhau, C.; Azevedo, I., 2008. Chronic Green Tea Consumption Decreases Body Mass, Induces Aromatase Expression, and Changes Proliferation and Apoptosis in Adult Male Rat Adipose Tissue *J. Nutr.* 138, 2156-2163.

Morais, S.M.; Cavalcanti, E.S.B.; Costa, S.M.O.; Aguiar, L.A., 2009. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. *Rev. Bras. Farmacogn* 19, 315-320.

Moura, R.F.; Cambri, L.T.; Quadros, A.C.J.; Nascimento, C. M. C.; Arantes, L.M.; Sebastião, E.; Tanaka, K.; Papini, C.B.; Oliani, M.M.; Mota, C.S.A.; Ribeiro, C.; Melo, M.A.R., 2008. Capacidade aeróbia de ratos alimentados com dieta rica em frutose. *Rev.Bras. Med. Esporte* 14, 422-426.

Nakagawa, T.; Hu, H.; Zharikov, S.; Tuttle, K.R.; Short, R. A.; Glushakova, O.; Ouyang, X; Feig, D.I.; Block, E.B.; Herrera-Acosta, J.; Patel, J.M.; Richard J. Johnson, R.J., 2006. A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol.* 290, 625-631.

Navarro-Gonzalvez, J.A.; Garcia-Benayas, C.; Arenas, J., 1998. Semiautomated Measurement of Nitrate in Biological Fluids, *Clinical Chemistry* 44, 679-681.

Neto, G.B.; Tambascia, M.A., 2006. Avaliação laboratorial e diagnostico da resistência insulínica. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 50, 208-215.

Nourooz-Zadeh, J.; Tajaddinisarmadi, J.; Wolff, S.P., 1994. Measurement of Plasma Hydroperoxide Concentrations by the Ferrous Oxidation-Xylenol Orange Assay in Conjunction with Triphenylphosphine. *Anal Biochem.* 220, 403-409.

Olsson, A.G.; Schwartz, G.G.; Szarek, M.; Sasiela, W.J.; Ezekowitz, M.D.; Ganz, P.; Oliver, M.F.; Waters, D.; Zeiher, A., 2005. High-density lipoprotein, but not low-density lipoprotein cholesterol levels influence short-term prognosis after acute coronary syndrome: results from the MIRACL trial. *Eur Heart J.* 26, 890-896.

Pedriali, C.A., 2005. Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes. 127f.

Dissertação (Mestrado em Farmácia Bioquímica) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

Peixoto, N.; Silva, E.; Teixeira, F.G.; Moreira, F.M. Avaliação de crescimento inicial de populações de gabioba em Ipameri. In: Seminário de Iniciação Científica, Jornada de Pesquisa e Pós-Graduação, 2005, Anais. Anápolis.

Piva, M. G. O Caminho das Plantas Medicinais: Estudo Etnobotânico. Rio de Janeiro: Mondiran, 2002.

Pizziolo, V.R.; Brasileiro, B.G; Oliveira, T.T; Nagem, T.J. 2011. Plantas com possível atividade hipolipidêmica: uma revisão bibliográfica de livros editados no Brasil entre 1998 e 2008. Rev. Bras. Plantas Med. 13, 98-109.

Repetto, M., 1996. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. Clin Chim Acta, 107-117.

Rodrigues, H.G.; Diniz, Y.S.; Faine, L.A.; Jeane Alves Almeida, J.A.; Fernandes, A.A.H.; Novelli, E.L.B., 2003. Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rotina na concentração do colesterol –HDL. Rev. Nutr. 16, 315-320.

Rosini, T.C.; Silva, A.S.R.; Moraes, C., 2012. Diet-induced obesity: rodent model for the study of obesity-related disorders. Rev. Assoc. Med. Bras. 58, 383-387.

Rutledge, A.C.; Adeli, K., 2007. Fructose and the metabolic syndrome: pathophysiology and molecular mechanisms Nutr. Rev. 65, 13-23.

Schmitz, W.O.; Cecchini, R.; Estevão, D.; Saridakis, H.O., 2009. Atividade hepatoprotetora do extrato alcoólico da *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (chá-verde) em ratos Wistar tratados com dietilnitrosamina. Rev. Bras. Farmacogn. 19, 702-709.

Schmitz, W.O.; Saito, A.Y.; Estevão, D.; Saridakis, H.O., 2005. O chá verde e suas ações como quimioprotetor. Semina 26, 119-130.

Silva, W.T.; Santos, J.G.; Watanabe, M.; Vattimo, M.F.F., 2011. Efeito renoprotetor dos flavonoides do vinho na nefrotoxicidade do imunossupressor Tacrolimus Acta Paul Enferm 24, 388-392.

Souza, C.R.F.; Bott, R.F.; Oliveira, W.P., 2007. Optimization of the Extraction of Flavonoids Compounds from Herbal Material using Experimental Design and Multi-response Analysis. Lat. Am. J. Pharm. 26, 682-690.

Thorburn, A.W.; Storlien, L.H.; Jenkins, A.B.; Khouri, S.; Kraegen, E.W., 1989. Fructose-induced in vivo insulin resistance and elevated plasma triglyceride levels in rats. *Am J Clin Nutr.* 49, 1155-1163.

Vallilo, M.I.; Lamardo, L.C.A.; Gaberlotti, M.L.; Oliveira, E.; Moreno, P.R.H. 2006. Composição química dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O.Berg. *Ciência e Tecnologia de Alimentos.* 26, 805-810.

Vera-Cruz, M.; Nunes, E.; Mendonça, L.; Chaves, E.; Fernandes, M.L.L.A., 2010. Efeito do chá verde (*Camelia sinensis*) em ratos com obesidade induzida por dieta hipercalórica. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 46, 407-413.

Wajchenberg, B.L., 2000. Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue: Their Relation to the Metabolic Syndrome. *Endocr Rev* 21 (6), 697-738.

Yokomizo, A.; Moriwaki, M., 2005. Myricitrin degraded by simulated digestion inhibits oxidation of human low-density lipoprotein. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, 69, 693-699.

Zheng, X.X.; Xu, Y.L.; Li, S.H.; Liu, X.X.; Hui, R.; Huang, X.H., 2011. Green tea intake lowers fasting serum total and LDL cholesterol in adults: a meta-analysis of 14 randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* 94, 601–610.

LETTER OF SUBMISSION

Journal of Ethnopharmacology

Letter of Copyright

We, the authors, Wanderlei Onofre Schmitz, Carine Coneglian Farias, Claudia Andrea Lima Cardoso, Sabbatini Decio Barbosa of the work entitled: **Action of extracts of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, *Bauhinia forficata* Link and *Campomanesia xanthocarpa* (Mart.) Berg O. in fructose-induced insulin resistance**, submit this article to the examination of the Editorial Board of the Journal. In doing so, we agree that copyrights related thereto shall become the sole property of the Journal and it is prohibited for any total or partial reproduction to occur, in any part or media print, without prior permission of the Journal of *Ethnopharmacology*. We declare that the article is original and is not under review in any other vehicle of scientific communication or has been published in another journal in whole or in part. We also certify that the authors cited in the article participated in the design, conduct or the experiments that resulted in this article.

We further declare that we have no conflict of interest with the theme dealt with or the products listed.

Dourados, February 17, 2014.

Wanderlei Onofre Schmitz

Carine Coneglian Farias

Claudia Andrea Cardoso Lima

Decio Barbosa Sabbatini

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Resultados obtidos nesses estudos sugerem que a alta ingestão de frutose pode causar quadros de resistência à insulina, desencadear quadros de dislipidemia e acúmulo de gordura em tecido hepático, levando à esteatose e futuras lesões mais graves no fígado. Além disso, este modelo de indução de resistência à insulina em animais, demonstrou que muitos dos sintomas observados em indivíduos com quadros de resistência à insulina pode ter sido desencadeado pela ingestão de altas concentrações de frutose e não necessariamente de ingestão de glicose. Mais ainda, este modelo animal pode ser utilizado como alternativa de estudo da resistência à insulina e suas alterações metabólicas. Essa dieta influencia nas funções hepáticas e de outros tecidos respondendo com resistência à insulina e desordem lipídica. A relação é diretamente proporcional, pois quanto maior a ingestão da frutose maior as alterações metabólicas.

A farinha da casca do *P. edulis* não promoveu ação hipoglicemiante significativa em ratos *Wistar* com resistência à insulina induzida pela frutose. Além de não diminuir a glicemia dos ratos, o uso da casca do maracujá alterou o perfil lipídico dos animais, levando a uma piora deste. Isso por si só já contra indicaria o uso da casca do maracujá no tratamento de pacientes diabéticos.

O ômega-3 apresentou melhor desempenho na redução de glicemia e dos triglicerídeos plasmáticos, além de diminuir o quadro de esteatose hepática dos animais, quando comparado com a farinha da casca do maracujá.

O extrato de *C. sinensis* tem a melhor ação hipoglicemiante nos ratos *Wistar* com resistência à insulina induzida pela frutose, promovendo também a melhora no perfil lipídico, reduzindo o quadro de esteatose hepática, além de melhorar o perfil antioxidante dos animais.

O extrato de *B. forficata* apresentou uma boa ação como agente hipoglicemiante, mas não teve uma ação efetiva na dislipidemia nos animais, além de diminuir pouco o quadro de esteatose hepática, mas o uso do extrato de *B. forficata* levou a um aumento das transaminases hepáticas indicando uma ação hepatotóxica quando consumido por um longo período.

O extrato de *C. xanthocarpa* se mostrou pouco eficiente sobre a glicemia dos animais e também não foi muito eficiente no controle da dislipidemia, principalmente por mostrar pouca ação sobre os triglicerídeos sanguíneos e o quadro de esteatose hepática.

São necessários novos estudos para investigar melhor as propriedades dos alimentos funcionais e dos extratos vegetais, esclarecendo melhor sua ação na fisiopatologia da resistência à insulina e sua possível utilização ou não por este tipo de paciente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGHILERI, L.J.; THOUVENOT, P. Natural polyphenols-iron interaction: its biological importance. **Biol Trace Elem Res**, v. 73, p. 251-58, 2000.

BARREIROS R. C.; BOSSOLAN G.; TRINDADE C. E. P. Frutose em humanos: efeitos metabólicos, utilização clínica e erros inatos associados. **Rev de Nutrição**, v. 18, n.3, 2005.

BASCIANO, H. *et al.* Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. **Nutr. Metab.** v.2, n.5, p. 1-14, 2005.

BIAVATTI, M.W. *et al.* Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J. F. Macbr. aqueous extract: Weight control and biochemical parameters. **J Ethno.**, v.93, n.2-3, p.385-389, 2004.

BORGES, K.B.; BAUTISTA, H.B.; GUILERA, S. Diabetes – Utilização de Plantas Medicinais Como Forma Opcional de Tratamento **Revista Eletrônica de Farmácia** v. 5, n. 2, p. 12-20, 2008.

BOTEZELLI, J. D. *et al.* Consumo de frutose e exercício físico, impacto na Síndrome Metabólica **Motriz**, v.16 n.1 p.231-239, 2010.

BRAY, G. A. How bad is fructose? **Am J Clin Nutr** v. 86, p. 895– 896, 2007.

BUGIANESI, E.; MCCULLOUGH, A.J.; MARCHESINI, G. Insulin Resistance: A Metabolic Pathway to Chronic Liver Disease. **Hepatology**, v.42, n.5, p. 987-1000, 2005.

BURSILL, C. *et al.* Green tea upregulates the low-density lipoprotein receptor through the sterol-regulated element binding protein in HepG2 liver cells **J Agric Food Chem.** v. 49, n. 11, p. 5639-5645, 2001.

CALDER, P.C . Polyunsaturated fatty acids and inflammation. **Biochem Soc Trans.** v.33, n. 2, p. 424-427, 2005.

CAMARGO, P. *et al.* Rendimento da pectina da casca do maracujá em seus estádios diferentes de maturação: verde, maduro e senescência. **Série em Ciência e Tecnologia de Alimentos: agroindústria, energia e meio ambiente**. v. 2, n. 9, p.1-8, 2007.

CAZARIN, M.; SARIDAKIS, H. O. Ação dos antioxidants na lesão por isquemia e reperusão. **Interbio**, v. 1, n.1, p. 27-33, 2007.

CHANDALIA, M. *et al.* Insulin Resistance and Body Fat Distribution in South Asian Men Compared to Caucasian Men. **PLoS ONE**, v.8, p. 1-7, 2007.

COOK, N.C.; SAMMAN, S. Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources **Nutr Biochem**, v. 7, p. 66-76, 1996.

CÓRDOVA, K. R. V. *et al.* Características físico-químicas da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa* degener) obtida por secagem. **B.CEPPA**, v. 23, n. 2, p. 221-230, 2005.

CORRÊA M.P.; **Dicionário de Plantas úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**, v.2, 1926.

COUTO, A. N., WICHMANN, F.M.A. Efeitos Da Farinha da Linhaça no Perfil Lipídico e Antropométrico de Mulheres **Alim. Nutr.**, v. 22, n. 4, p. 601-608, 2011.

CRUZ, V. D. *et al.* Production and action pattern of inulinase from *Aspergillus Niger*-245: hydrolysis of inulin from several sources. **Revista de Microbiologia**. São Paulo, v. 29, n. 4, Oct. 1998.

DA SILVA, K. L. *et al.* Phytochemical and pharmacognostic investigation of *Bauhinia forficata* Link (Leguminosae). *Journal Zeitschrift fur Naturforschung*, v. 55, n. 5/6, p. 478-480.

DEVLIN, T.M. **Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas**. 5.ed. São Paulo: Edgard Blücher, p. 786-787, 2002.

DORNAS, W. C. *et al.* Efeitos antidiabéticos de plantas medicinais. **Braz. J. Pharmacog.** v. 19, p. 488-500, 2009.

DOS REIS, M.S.; MARIOT, A. Diversidade natural e aspectos agronômicos de plantas medicinais in SIMÕES M.O. *et al.* **Farmacognosia da Planta ao Medicamento** Editora UFSC, Capítulo 3 ISBN 85-7025-617-5, 2002.

DUARTE, S. Insulino-resistência e alteração do metabolismo glicídico. **Manual de insulino-resistência.** GEIR- grupo de estudo da insulina resistência as sociedade portuguesa de endocrinologia, diabetes e metabolismo. 3.ed, 2003.

ELLIOTT, S.S. *et al.* Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. **Am J Clin Nutr.** v. 76, p. 911-922, 2002.

GABY, A.R. Adverse Effects of Dietary Fructose. **Altern Med Rev.** v.10, n.4, p. 294-306, 2005.

HERMSDORFF, H.H.M.; MONTEIRO, J.B.R. Gordura Visceral, Subcutânea ou Intramuscular: Onde Está o Problema? **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v.48, n.6, p. 803-811, 2004.

HERNANDEZ-GALICIA, E. *et al.* Studies on Hypoglycemic Activity of Mexican Medicinal Plants. **Proc. west. pharmacol.** v. 45, n. 118-124, 2002.

HITTEL D.S.; KRAUS W.E.; TANNER C.J.; HOUMARD J.A.; HOFFMAN E.P.; Exercise training increases electron and substrate shuttling proteins in muscle of overweight men and women with the metabolic syndrome. **J Appl Physiol.** v.98, n.1, p. 168-179, 2005.

JANEIRO, D.I. *et al.* Efeito da farinha da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) nos níveis glicêmicos e lipídicos de pacientes diabéticos tipo 2. **Rev. bras. Farmacogn.** v. 18, p. 724-732, 2008.

JORGE, P.A.R. *et al.* Efeito dos Ácidos Graxos Ômega-3 sobre o Relaxamento-Dependente do Endotélio em Coelhos Hipercolesterolêmicos. **Arq Bras Cardiol.** v. 69, n. 1, p. 13-18, 1997.

KATAOKA, V.M.F.; CARDOSO, C.A.L. Avaliação do perfil cromatográfico obtidos por CLAE-DAD e da atividade antioxidante das folhas de espécies *Campomanesia sessiliflora* (O. Berg) Mattos e *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. **Rev. bras. plantas med.** v.15, n.1, p. 121-129, 2013.

KELLEY, D. *et al.* Subdivisions of subcutaneous abdominal adipose tissue and insulin resistance. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 278, p. 941-948, 2000.

KHANAL R C. *et al.* Effect of Dietary Blueberry Pomace on Selected Metabolic Factors Associated with High Fructose Feeding in Growing Sprague–Dawley Rats **J Med Food** v.15, n. 9, 802–810, 2012.

KLAFKE, J.Z. *et al.* Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on biochemical, hematological and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic patients. **J Ethno.**, v.127, p.299-305, 2010.

LÊ, K. *et al.* A 4-wk high-fructose diet alters lipid metabolism without affecting insulin sensitivity or ectopic lipids in healthy humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 84, p. 1374-1379, 2006.

LOPES, F.H.; EGAN, B.M. Desequilíbrio Autonômico e Síndrome Metabólica: Parceiros Patológicos em uma Pandemia Global Emergente. **Arq. Bras. Cardiol.** v.87, p. 538-547, 2006.

LOPES, R.M. *et al.* Flavonóides: farmacologia de flavonóides no controle hiperlipidêmico em animais experimentais. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 17, p. 18-22, 2000.

MACHADO, A. F. **Estabelecimento de modelo animal de diabetes tipo II: Efeito da suplementação com óleo de peixe sobre a sensibilidade e responsividade à insulina.** 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

MACHADO, S.P. *et al.* Correlação entre o índice de massa corporal e indicadores antropométricos de obesidade abdominal em portadores de diabetes mellitus tipo 2. **Rev Bras Promoç Saúde**. v. 25, n. 4, p. 512-520, 2012.

MARTINS R. E.; CASTRO D.M.; CASTELLANI D. C.; DIAS J.E. **Plantas Mediciniais**, Editora: UFV, Viçosa, 1998.

MEOTTI, F. C. **Análise dos Mecanismos de Ação Antinociceptiva e Antiinflamatória do Flavonóide Miricitrina: Estudos *In Vivo* e *In Vitro***. 2006. 131f. *Dissertação* (Doutorado em Bioquímica Toxicológica)- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2006.

MESSIAS, K. L. S. **Estudo Fitoquímico e farmacológico da folhas e caules da *Marlierea tomentosa* Camb.** 2005. 62f. *Dissertação* (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, SC, 2005.

MILTERSTEINER, A. *et al.* Uso de quercetina a longo prazo em ratos cirróticos. **Acta Cir Bras**. v.18, n.3, p. 232 – 237, 2003.

MIRA, G. S. *et al.* Visão retrospectiva em fibras alimentares com ênfase em beta-glucanas no tratamento do diabetes. **Braz. J. Pharm. Sci.** v.45, n.1, 2009.

MOHAMED-ALI, V.; PINKNEY, J.H.; COPPACK, S.W. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. **International Journal of Obesity**, v. 22, p. 1145-1158, 1998.

MOURA R.F.; CAMBRI L.T.; QUADROS A.C.J.; NASCIMENTO C. M. C.; ARANTES L.M.; SEBASTIÃO E.; TANAKA K.; PAPINI C.B.; OLIANI M.M.; MOTA C.S.A.; RIBEIRO C.; MELO M.A.R.; Capacidade aeróbia de ratos alimentados com dieta rica em frutose. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 14, n. 5, 2008.

MOURA, R.F. *et al.* Capacidade aeróbia de ratos alimentados com dieta rica em frutose. **Rev Bras Med Esporte**. v. 14, n. 5, p.422-426, 2008.

NAVARRO-GONZALVEZ, J. A. *et al.* Semiautomated Measurement of Nitrate in Biological Fluids. **Clin. Chem**. v. 44, n. 3, 1998.

NEGRI, G. Diabetes Melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** v.41, n.2, p. 121-142, 2005.

NOUROOZ-ZADEH, J. *et al.* Measurement of Plasma Hydroperoxide Concentrations by the Ferrous Oxidation-Xylenol Orange Assay in Conjunction with Triphenylphosphine. **Anal Biochem.** v. 220, p. 403-409, 1994.

PEDRIALI, C. A. **Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes.** 2005. 127f. Dissertação (Mestrado em Farmácia Bioquímica) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

PEIXOTO, N. *et al.* **Avaliação do crescimento inicial de populações de Gabiroba em Ipameri.** Disponível em: <[http://www.prp.ueg.br/06v1/ctd/pesq/inic_cien/eventos/sic2005/](http://www.prp.ueg.br/06v1/ctd/pesq/inic_cien/eventos/sic2005/>)> <[arquivos/agrarias/avaliacao_gabiroba.pdf](#)>. Acesso em: 22 de Setembro de 2007.

PERINI, J. A. L. **Incorporação de ácidos graxos ômega-3 em tecido muscular de camundongos alimentados com ração enriquecida com óleo de linhaça.** 2009. 61f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Maringá - UEM, Maringá, 2009.

PETRY, R.D. *et al.*, Comparative pharmacological study of hidroethanol extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* leaves. **Phytother Res.** v.15, p.162-167, 2001.

REPETTO, M. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. **Clin Chim Acta**, 107-117, 1996.

RICE-EVANS, C.A. *et al.* Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids **Free Radic Biol Med**, v. 20, p. 933-56, 1996.

ROCKERBACH, C.; ROMAN, J. A. **Efeitos hiperglicêmico de farinha de casca de maracujá (*Passiflora edulis flavicarpa*) em ratos induzidos a diabetes.** 2007. 30f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) -. Faculdade Assis Gurgacz- FAG, Cascavel, 2007.

RODRIGUES, H. G. *et al.* Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rotina na concentração do colesterol –HDL. **Rev de Nutr**, v.16, n.3, p. 315-320, 2003.

ROMERO-RODRIGUEZ, M.A.; *et al.*, Composition of babaco, feijoa, passion-fruit and tamarillo produced in Galicia. **Food Chem**. v. 49, p. 521-255, 1994.

ROSINI, T. C.; SILVA, A. S. R.; MORAES, C. Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados com a obesidade **Rev Assoc Med Bras**. v. 58, n. 3, p. 383-387, 2012.

RUTLEDGE, A.C.; ADELI, K. Fructose and the metabolic syndrome: pathophysiology and molecular mechanisms **Nutr. Rev.** v. 65, p. 13-23, 2007.

SANTOS, H.C.M. *et al.* Síndrome Metabólica e outros fatores de risco para doença cardiovasculares em população de obesos. **Rev. Bras. Cardiol.** v. 26, n. 6, p. 442-449, 2013.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Flavonoids from *Calycorectes*, *Campomanesia*, *Eugenia* and *Hexachlamys* species. **Fitoterapia** , v 66, p. 373-374, 1995.

SCHMITZ, W.O. *et al.* O chá verde e suas ações como quimioprotetor. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 26, n. 2, p.119-130, 2005.

SILVA, K. L. e CECHINEL FILHO, V. Plantas do gênero *bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. **Quim. Nova**, v. 25, n. 3, p. 449-454, 2002.

SILVA, W.T. *et al.* Efeito renoprotetor dos flavonoides do vinho na nefrotoxicidade do imunossupressor Tacrolimus **Acta Paul Enferm.** v. 24, n. 3, p. 388-392, 2011.

SOUSA, E. *et al.* Hypoglycemic effect and antioxidant potential of kaempferol-3,7-*O*-(α)-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* leaves. **J Nat Prod.** v. 67, n. 5, abr. 2004.

SOUZA, J. N. S. *et al.* . Identification and antioxidant activity of several flavonoids of *Inga edulis* leaves. **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo, v. 18, n. 6, 2007.

SPOSITO, A. C. *et al.* **IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da**

Aterosclerose: Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq. Bras. Cardiol.* 2007, vol.88, suppl.1, pp. 2-19. ISSN 0066-782X.

STEHOUWER, C.D.A.; BRUIN, T.W.A. **Novel insights in the pathophysiology of insulin resistance:** A molecular genetics approach. Tese de Doutorado – Universidade de Maastricht, Alemanha, 2008.

STEHOUWER, C.D.A.; BRUIN, T.W.A. **Novel insights in the pathophysiology of insulin resistance:** A molecular genetics approach. Tese de Doutorado – Universidade de Maastricht, 2008.

TAGHIBIGLOU C. *et al.* Hepatic Very Low Density Lipoprotein-ApoB Overproduction Is Associated with Attenuated Hepatic Insulin Signaling and Overexpression of Protein-tyrosine Phosphatase 1B in a Fructose-fed Hamster Model of Insulin Resistance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n.1, p. 793-803, 2002.

VALLILO, M. I. *et al.* Características físicas e químicas dos frutos do cambucizeiro (*Campomanesia phaea*). **Rev. Bras. Frutic.** v. 27, n. 2, p. 241-244, 2005.

VALLILO, M. I. *et al.* Composição química dos frutos de *Campomanesia adamantium* (*Cambessédes*) O.Berg. **Food Sci. Technol.** v. 26, n.4, p. 805-810, 2006.

WAJCHENBERG, B.L. Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue: Their Relation to the Metabolic Syndrome. **Endocrine Reviews**, v.21, n.6, p. 697-738, 2000.

YOKOMIZO, A.; MORIWAKI, M. Myricitrin degraded by simulated digestion inhibits oxidation of human low-density lipoprotein. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** v. 69, p. 693-699, 2005

ZAMBOM, M.; SANTOS, G.; MODESTO, E. Importância das Gorduras Poliinsaturadas na Saúde Humana. **R. Bras. Zootec.** v. 547, p. 553-557, 2004.

ZUANAZZI, J.A.S. Flavonóides in SIMÕES M.O. *et al.* **Farmacognosia da Planta ao Medicamento** Editora UFSC, Capítulo 23 ISBN 85-7025-617-5, 2002.