



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LUCIANA HIGACHI

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO DA QUERCETINA
MICROENCAPSULADA EM MODELO DE INDUÇÃO DE
DIABETES COM FRUTOSE EM RATOS WISTAR**

Londrina
2018

LUCIANA HIGACHI

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO DA QUERCETINA
MICROENCAPSULADA EM MODELO DE INDUÇÃO DE
DIABETES COM FRUTOSE EM RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof.Dr.Décio Sabbatini
Barbosa
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Graziela Scaliante
Ceravolo

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Higachi, Luciana .

Avaliação da ação da quercetina microencapsulada em modelo de indução de diabetes com frutose em ratos wistar / Luciana Higachi. - Londrina, 2018.
53 f. : il.

Orientador: Décio Sabbatini Barbosa.

Coorientador: Graziela Sciantti Ceravolo.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2018.
Inclui bibliografia.

1. Quercetina - Tese. 2. Estresse Oxidativo - Tese. 3. Microencapsulação - Tese. 4. Frutose - Tese. I. Sabbatini Barbosa, Décio . II. Sciantti Ceravolo, Graziela. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

LUCIANA HIGACHI

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO DA QUERCETINA MICROENCAPSULADA
EM MODELO DE INDUÇÃO DE DIABETES COM FRUTOSE EM
RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos à obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^ª. Dr^ª. Gislaine Garcia Pelosi Gomes
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^ª. Dr^ª. Francis Fregonesi Brinholi
Universidade Norte do Paraná – UNOPAR

Londrina, 02 de abril de 2018.

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as bençãos.

Aos meus pais, Lucio e Elizabeth, por todo amor, carinho e estrutura. Ao meu esposo, Ricardo, pela compreensão e apoio. A minha irmã, Adriana, pelo incentivo e amizade.

Ao professor Dr. Décio Sabbatini Barbosa por tantos anos de orientação, dedicação, disponibilidade e muita paciência.

Às professoras Dra. Gislaine Garcia Pelosi Gomes, Dra. Francis Fregonesi Brinholi, por aceitarem ser banca deste trabalho.

Às professoras Dra. Graziela Scaliante Ceravolo, Dra. Estefânia Gastaldello Moreira, Dra. Rúbia Casagrande, Dra. Francis Fregonesi Brinholi, Dra. Marcela Maria Baracat, por todo suporte e contribuições para a execução deste trabalho.

À professora Maria Emília Favero, por permitir a utilização do laboratório de pós graduação, por todo auxílio e principalmente pela amizade.

À Denise por toda ajuda, amizade e principalmente pelo carinho.

Aos amigos do laboratório de pós graduação Carine Coneglian, Kamila Landucci, Andressa Matsumoto, Laura Semeão, Ana Paula Michelin, Chiara Bortolasci, Vitor Obara, Geise Broto, Karine Boll, Antonio Carlos Mariano, Alissana lakmiu, Paulo Anizelli, Cristina de Melo, David do Vale, Thiago Balthus, Nayara Rampazzo por toda ajuda e amizade.

Ao professor Dr. Eduardo José de Almeida Araújo por todo auxílio e apoio e seus alunos que nos acolheram em seu laboratório.

À técnica da patologia Lucia e colegas que nos auxiliaram nos cortes histológicos.

Às secretárias da pós graduação, Sandra Lage e Emanoela Oliveira, por todo auxílio.

Às professoras Alessandra Okino, Vera Tatakihara, Danielle Venturini e Leda Mezzaroba por todo apoio.

Enfim, a todos que contribuíram de alguma forma para a concretização deste trabalho.

HIGACHI, Luciana. **Avaliação da ação da quercetina microencapsulada em modelo de indução de diabetes com frutose em ratos wistar**. 2018 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

O consumo de frutose aumentou de forma crescente em todo o mundo. A adição deste açúcar tem uma forte relação com doenças metabólicas como o diabetes *melittus* tipo 2, síndrome metabólica, além do estresse oxidativo (EO). Alguns antioxidantes, como por exemplo a quercetina, são efetivos na prevenção destas. O objetivo deste estudo foi avaliar a ação da quercetina livre (QL) e quercetina microencapsulada (QMC) em modelo de indução de diabetes com ração frutose. Foram utilizados de 10 – 13 animais por grupo, sendo divididos em grupo ração padrão (RP), ração com frutose (RF), tween 80 (TW), quercetina 100mg/kg (QL100), microcápsula inerte (MCIN), quercetina microencapsulada 10mg (QMC10), quercetina microencapsulada 30mg (QMC30) e quercetina microencapsulada 100mg (QMC100), tratados por gavagem por 9 semanas. Foram avaliados índices corporais como peso final, peso do fígado e peso relativo do fígado. Em nível plasmático, foi dosado a glicose, perfil lipídico, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, creatinina, ácido úrico, além de parâmetros de EO. Já no fígado foi analisado biomarcadores de EO e presença de glicogênio por meio de cortes histológicos. Os resultados desse estudo demonstraram que todos os animais que receberam ração de frutose tiveram alterações significativas, como diminuição do peso final corporal, aumento da glicemia, redução da PON-1 plasmática, aumento de SH plasmático e diminuição de SH tecidual. O grupo que recebeu QMC100 obteve redução do biomarcador LOOH em nível tecidual. Já os grupos tratados com QMC30 e QMC100 demonstraram maior proteção dos níveis de glicogênio no fígado. De acordo com os resultados obtidos, a utilização de QMC pode ser uma alternativa adjuvante no tratamento do diabetes pela proteção de glicogênio hepático e diminuição da lipoperoxidação.

Palavras-chave: Estresse oxidativo. Frutose. Glicogênio. Microencapsulação. Quercetina.

HIGACHI, Luciana. **Evaluation of the action of quercetin-loaded microcapsule in the induction model of diabetes with fructose in wistar rats.** 2018. 53 p. Dissertation (Master in Health Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

The consumption of fructose has increased all over the world. The addition of this sugar has a strong relationship with metabolic diseases such as diabetes mellitus type 2, metabolic syndrome, in addition to oxidative stress (OS). Some antioxidants, such as quercetin, are effective in preventing these. The objective of this study was to evaluate the action of free quercetin (QL) and quercetin-loaded microencapsule (QMC) in an induction model of diabetes with fructose. 10- 13 animals per group were divided into the following groups: standard ration (RP), fructose (RF), tween 80 (TW), quercetin 100mg / kg (QL100), inert microcapsule (MCIN), quercetin-loaded microencapsule 10mg (QMC10), quercetin-loaded microencapsule 30mg (QMC30) and 100mg quercetin-loaded microencapsule (QMC100), treated by gavage for 9 weeks. Body indexes were evaluated as final weight, liver weight and relative liver weight. At the plasma level, glucose, lipid profile, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, creatinine, uric acid, and OS parameters were measured. In the liver, OS biomarkers and presence of glycogen were analyzed through histological sections. The results of this study demonstrated that all animals receiving fructose ration had significant changes, such as decreased body weight, increased blood glucose, plasma PON-1 reduction, plasma SH increase and tissue SH decrease. The group that received QMC100 obtained reduction of the biomarker LOOH at the tissue level. However, the groups treated with QMC30 and QMC100 demonstrated greater protection of liver glycogen levels. According to the results obtained, the use of QMC can be an adjuvant alternative in the treatment of diabetes by protection of hepatic glycogen and decrease of lipoperoxidation.

Keywords: Fructose. Glycogen. Microencapsulation. Oxidative stress. Quercetin.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
AOPP	Produtos avançados de oxidação proteica
AST	Aspartato aminotransferase
CAT	Catalase
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DM1	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DTNB	Ácido 5,5-ditiobis 2-nitrobenzóico
EO	Estresse oxidativo
ERNS	Espécies reativas de nitrogênio
EROS	Espécies reativas de oxigênio
GPX	Glutathione peroxidase
HDL	Lipoproteína de alta densidade
ITT	Teste de tolerância à insulina
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LOOH	Hidroperóxidos lipídicos por quimiluminescência
MDA	Malondialdeído
NO	Óxido nítrico
NOx	Subprodutos do óxido nítrico
PON-1	Paraoxonase 1
RI	Resistência à insulina
SH	Grupamento Sulfidrila
SM	Síndrome metabólica
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TGL	Triacilglicerois
TRAP	Capacidade antioxidante total

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	DIABETES <i>MELLITUS</i>	11
1.2	FRUTOSE.....	13
1.3	MODELO DE HIPERGLICEMIA.....	14
1.4	ESTRESSE OXIDATIVO.....	15
1.5	POLIFENÓIS.....	16
1.6	SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS (MICROENCAPSULAÇÃO).....	18
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3	MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1	ANIMAIS.....	20
3.2	PROTOCOLO EXPERIMENTAL E PROCEDIMENTOS.....	20
3.3	PREPARO DA RAÇÃO.....	21
3.4	PREPARO DAS MICROCÁPSULAS.....	21
3.5	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	22
3.6	HOMOGENEIZADO E SOBRENADANTE.....	22
3.7	DOSAGEM DE PROTEÍNAS NO FÍGADO.....	22
3.8	TESTE DE TOLERÂNCIA A INSULINA.....	22
3.9	DOSAGEM DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	23
3.9.1	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (TRAP) DE PLASMA E FÍGADO.....	23
3.9.2	DETERMINAÇÃO DE GRUPAMENTO SULFIDRILA (SH) DE PLASMA E FÍGADO.....	23
3.9.3	DETERMINAÇÃO DE PRODUTOS AVANÇADOS DE OXIDAÇÃO PROTEICA (AOPP) DE PLASMA E FÍGADO.....	23
3.9.4	DETERMINAÇÃO DE HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS (LOOH) DE PLASMA E FÍGADO.....	23
3.9.5	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA PARAOXONASE 1 (PON-1) DO PLASMA.....	24
3.9.6	DETERMINAÇÃO DE SUBPRODUTOS DE ÓXIDO NÍTRICO (NOX) PLASMÁTICO.....	24
3.10	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA NO FÍGADO.....	24
3.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO NO FORMATO DE ARTIGO CIENTÍFICO	27
4.1	QUERCETINA MICROENCAPSULADA REESTABELECE NÍVEIS DE GLICOGÊNIO E AUXILIA NA DIMINUIÇÃO DE HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS	27
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
	REFERÊNCIAS	48
	ANEXO	53
	ANEXO I – TERMO DE APROVAÇÃO DA PESQUISA	54

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a prevalência e a incidência do diabetes aumentaram acentuadamente. Segundo a XII Diretriz da Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) (2015-2016), diabetes *mellitus* (DM) é um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos relacionados a hiperglicemia, resultante de uma falha na secreção de insulina, na ação desse hormônio ou de ambas. A Organização Mundial da Saúde e a Associação Americana de Diabetes classificam o DM em: DM tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2), outros tipos específicos de DM e diabetes gestacional (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2015-2016). De acordo com a Federação Internacional de Diabetes, cerca de 425 milhões de adultos têm a doença, sendo que de cada dois indivíduos, um permanece não diagnosticado. O Brasil está entre os dez países com maior número de pessoas com DM com cerca de 14,3 milhões de pessoas com esta doença (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017). Assim como o número de pacientes diabéticos, as taxas de mortalidade e morbidade têm aumentado, devido a sua forte associação com complicações cardiovasculares (MAHMOUD et al., 2013).

A ocidentalização da dieta resultou em aumentos significativos no consumo de produtos refinados e industrializado como açúcares, incluindo sacarose, glicose e frutose (FELICE et al., 2014), sendo facilmente absorvida e rapidamente metabolizada pelo fígado humano. Uma grande quantidade ingerida deste açúcar pode conduzir o fígado a estimulação rápida da lipogênese e acúmulo de triacilgliceróis (TGL) que futuramente favorecerá na resistência a insulina (RI), redução da sensibilidade à insulina e intolerância à glicose (BASCIANO; FEDERICO; ADELI, 2005).

A alimentação com alto teor de frutose em ratos mimetiza muitas características da DM em humanos, especialmente a RI, intolerância à glicose, dislipidemia e insuficiência renal. Diante disto, o modelo de frutose em ratos pode ser útil para definir possíveis tratamentos para a DM2 ou a síndrome metabólica (SM) (PATEL; IYER; BROWN, 2009). Da mesma forma, o alto consumo de frutose induz o estresse oxidativo (EO), desequilíbrio entre a presença de substâncias pró-oxidantes e antioxidantes, uma das causas para as complicações metabólicas do DM (DELBOSC et al., 2005).

Os flavonoides são exemplos de substâncias antioxidantes mais abundantes na natureza. Dentre elas, a quercetina é a mais consumida na dieta humana. Numerosos estudos têm utilizado a quercetina como droga antiabéctica para prevenção ou tratamento (VINAYAGAM; XU, 2015). É amplamente distribuída em diferentes tipos de frutas, chás, rabanete, bagas, cebolas, maçãs e vinho. Vários estudos relataram o efeito da quercetina no diabetes: diminuição da peroxidação lipídica, aumento das enzimas antioxidantes (como superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX) e catalase (CAT) e redução da absorção de glicose intestinal pela inibição do transportador de glicose tipo II (COSKUN et al., 2005; STEWART et al., 2008).

1.1 DIABETES MELLITUS

Dentre as doenças metabólicas, o DM2 tornou-se a mais comum em todo o mundo. Isto tem sido, em parte, devido ao crescimento do número de pessoas obesas, associada ao excesso de adiposidade visceral, além da SM cujas características são RI, hiperglicemia, dislipidemia e hipertensão (CHEN et al., 2016).

O DM2 é influenciado por diversos fatores relacionados ao estilo de vida, incluindo a inatividade física, hábitos alimentares, estresse, tabagismo e consumo de álcool. O seu tratamento baseia-se no controle glicêmico do indivíduo juntamente com a prevenção de possíveis comorbidades que podem acometer os rins, olhos, fígado, artérias e nervos (BAGUL et al., 2012; CADE, 2008).

O DM é uma condição patológica resultando em grave desequilíbrio metabólico e alterações não fisiológicas em muitos tecidos, onde o EO desempenha um papel importante na etiologia desta doença. Os modelos experimentais em animais apresentam alto EO devido a hiperglicemia persistente e crônica, reduzindo assim a atividade do sistema de defesa antioxidante e promovendo a geração de radicais livres (COSKUN et al., 2005).

As principais características da DM2 incluem deficiência de secreção de insulina e/ou resistência a este hormônio nos tecidos hepático, adiposo e esquelético. DM e suas complicações são resultado de processos que envolvem inflamação, na qual ocorre em resposta a vários estímulos patológicos e lesões nos tecidos. A inflamação crônica e a ativação do sistema imunológico podem ser os grandes responsáveis pelo processo de doenças metabólicas relacionadas à

obesidade, como a DM2 (CHEN et al., 2016). Além da hiperglicemia, os pacientes com diabetes apresentam frequentemente um perfil desfavorável de lipídios plasmáticos com altos níveis de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e níveis baixos de lipoproteínas de alta densidade (HDL), uma combinação que pode implicar também no desenvolvimento de complicações cardiovasculares (AZEVEDO et al., 2010).

A glicose é uma importante fonte de energia para os seres humanos. O aumento da glicose plasmática estimula a liberação de insulina e, em tecidos hepático e músculo esquelético, é promovida a absorção de glicose e síntese de glicogênio, o que constitui um importante mecanismo de controle glicêmico (AZEVEDO et al., 2010). Em pacientes diabéticos, este mecanismo de depuração da glicose plasmática é menos eficiente, originando hiperglicemia (POSTIC; DENTIN; GIRARD, 2004).

A RI é definida como um estado que requer maior concentração deste hormônio para obter os efeitos biológicos alcançados por uma menor quantidade de insulina no estado normal. Assim, qualquer falha na cascata de sinalização da insulina pode causar a resistência a ela (TANIGUCHI; EMANUELLI; KAHN, 2006). O nível de insulina de jejum pode fornecer uma estimativa aproximada do grau de RI de um indivíduo e esses níveis mais elevados de insulina estão associados a um aumento do risco de uma futura DM2 em adultos pré-diabéticos (DEBOER, 2013).

Nos seres humanos, dietas com alto teor de frutose ingeridas de forma frequente, podem induzir dislipidemia e favorecer a síntese lipídica intracelular resultando no acúmulo de TGL no citoplasma de células não adiposas, como hepatócitos, fibras musculares ou células endócrinas. O hipotálamo, órgão responsável pelo controle neuroendócrino, controla a sinalização da insulina para regular a ingestão de alimentos, a sensibilidade à insulina, o metabolismo de glicose e lipídeos desempenhando um papel essencial na manutenção da homeostase energética do organismo humano como um todo. Assim, um erro de sinalização da insulina no hipotálamo pode preceder a redução da sensibilidade sistêmica deste hormônio, contribuindo para a RI e doenças metabólicas (ZHANG et al., 2014).

A utilização de medicamentos tradicionais tem sido favoráveis para a terapia do DM, no entanto, o aparecimento de efeitos adversos dos mesmos prejudica a adesão ao tratamento desses pacientes (KOSURU; SINGH, 2017). Um estudo recente

demonstrou o potencial hipoglicêmico de alguns compostos polifenólicos encontrados na dieta que podem representar uma valiosa fonte de terapias antidiabéticas, dentre elas está a quercetina (KIM; KEOGH; CLIFTON, 2016).

1.2 FRUTOSE

Os principais açúcares consumidos na dieta são glicose, frutose e sacarose. A frutose é um monossacarídeo que está naturalmente presente em muitas frutas e legumes. Embora tenha a mesma fórmula molecular ($C_6H_{12}O_6$) que a glicose, possui em sua estrutura um anel pentano com um grupo funcional cetona ligado ao segundo átomo de carbono, enquanto que a glicose tem um anel hexano com um grupo aldeído no primeiro carbono (TRAN; YUEN; MCNEILL, 2009) como pode ser observados na figura abaixo.

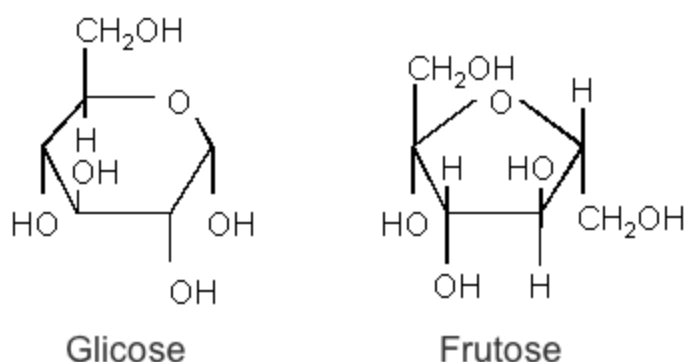


Figura 1. Estrutura da glicose e frutose
(NELSON, D.L.; COX, M.M. et al., 2006)

Comparada a glicose, a frutose é mais lipogênica e está presente em grande quantidade em bebidas industrializadas e alimentos processados. As fontes alimentares primárias de frutose são o xarope de milho com alta concentração deste açúcar. Em nível comercial, a frutose é mais barata que a sacarose e estabiliza melhor a textura de alguns alimentos processados (VOS; LAVINE, 2013). Estima-se o consumo diário 85-100 gramas de frutose por dia (BASCIANO; FEDERICO; ADELI, 2005). Desde a introdução do xarope de milho em 1967, o consumo *per capita* deste açúcar tem aumentado gradativamente, como substituto da sacarose (REN et al., 2014).

Diferentemente da glicose, o metabolismo da frutose ocorre através de um mecanismo independente da insulina. Após a ingestão, a frutose é rapidamente absorvida a partir do intestino delgado através do transportador específico para frutose, GLUT5 (RUTLEDGE; ADELI, 2007). No fígado, a frutose é fosforilada por uma enzima expressa e altamente específica para este açúcar (frutoquinase), para formar frutose1-fosfato, o qual é ainda convertido para três carbonos intermediários a saber: gliceraldeído fosfato, fosfato de di-hidroxiacetona e gliceraldeído 3-fosfato. Uma porção destes intermediários pode entrar na via gliconeogênica para ser convertida em glicose ou metabolizada em lactato ou TGL (HAVEL, 2005).

Além disso, estudos em animais mostraram também que ratos alimentados com dieta rica em frutose apresentam danos oxidativos hepáticos e metabolismo lipídico alterado devido ao EO como resultado da sobrecarga no metabolismo da frutose (REN et al., 2014).

1.3 MODELOS DE HIPERGLICEMIA

Diversos estudos com humanos e, principalmente, em diferentes linhagens de ratos e camundongos, com distintos protocolos de ingestão de frutose, são relatados na literatura. E, praticamente em todos, este açúcar tem sido utilizado para induzir comorbidades tais como hipertensão moderada, intolerância à glicose, RI, dislipidemia, aumento da gordura e peso corporal (PEREIRA et al., 2014).

Bagul et. al., (2012), alimentaram ratos com frutose 65% por 8 semanas e demonstraram um aumento significativo ($p < 0,01$) nos níveis de glicose sérico, TGL, ácido úrico, níveis de insulina e de óxido nítrico (NOx) quando comparados ao grupo controle. Teste de tolerância à glicose intraperitoneal também mostrou uma RI acentuada nos animais do grupo diabético. A utilização ineficaz da glicose em um estado alimentado de frutose leva a um aumento da quebra de proteínas proporcionando substratos para a gliconeogênese (MALLIAH et al., 2014), propiciando o aumento de níveis plasmáticos de glicose.

Kannappan e Anuradha (2010) utilizaram ratos wistar machos alimentados com frutose (60g/100g) por 60 dias e observaram que a atividade da enzima glicogênio fosforilase e o conteúdo de glicogênio foram reduzidos nesses animais, porém a utilização da quercetina (50mg/kg) restaurou a atividade desta

enzima e o conteúdo de glicogênio.

Eid et al. (2015) observaram em seu estudo que a quercetina influencia de forma positiva o metabolismo da glicose no fígado de humanos e músculo esquelético de roedores ao utilizarem quercetina (50µM) durante 18 horas, além disso, este flavonóide apresentou uma tendência em aumentar a atividade da síntese de glicogênio.

No estudo de Elbe et al. (2015), a quercetina (25mg/kg/30dias) administrada de forma intraperitoneal em ratos machos albinos preservou o teor de glicogênio nos hepatócitos desses animais em comparação aos animais diabéticos (induzida por estreptozotocina). Além disso, este tratamento aumentou as atividades de CAT e níveis de GSH e diminuiu o parâmetro malondialdeído (MDA).

1.4 ESTRESSE OXIDATIVO

Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROS/ERNS) são moléculas altamente reativas (RAJENDRAN et al., 2014). Estas possuem meia vida curta e desempenham papéis importantes em processos fisiológicos normais, tais como a expressão de genes e na transdução de sinais. Em uma condição saudável, as EROS/ERNS são mantidas em um nível ideal, devido a um equilíbrio entre a sua produção e eliminação por processo enzimático (SOD, GPX, CAT) e não enzimática por exemplo vitaminas C e E (HUTCHESON; ROCIC, 2012). Quando presente em níveis elevados ou em locais inadequados, EROS/ERNS podem danificar diretamente o endotélio vascular através da modificação oxidativa de lipídeos, proteínas e DNA e podem indiretamente intensificar a inflamação vascular (OSTROW et al., 2011).

O EO pode ser considerado uma das principais complicações do DM e de distúrbios metabólicos relacionados, sendo que a suplementação com antioxidantes, segundo alguns estudos, tem mostrado ser benéfica. EROS/ERNS causam danos ao DNA e peroxidação de lipídeos de membrana. Os radicais ânion superóxido gerados durante a oxidação da glicose reagem com o óxido nítrico (NO) liberado pelo endotélio e macrófagos formando o radical peroxinitrito altamente reativo e estes podem agravar as respostas inflamatórias que levam a complicações micro e macrovasculares diabéticas (NAYAK ET AL., 2014).

O *status* antioxidante celular determina a susceptibilidade a danos

oxidativos e é geralmente alterado em resposta ao EO. Por isso, a utilização de antioxidantes naturais como uma forma de prevenir danos oxidativos com elevado EO tem sido crescente (COSKUN et al., 2005).

Estudos experimentais e clínicos indicam que o EO desempenha papel importante no desenvolvimento e nas complicações do DM2. Radicais livres são gerados no diabetes por oxidação da glicose. O EO pode ser potencializado por estresse metabólico induzido por esta doença, danos teciduais e morte celular, levando a um aumento na produção de radicais livres e comprometimento do sistema de remoção destas espécies radicalares, exacerbando ainda mais o EO. Este, também, pode levar a danos de organelas celulares e desenvolvimento de RI (BAGUL et al., 2012; MARITIM; SANDERS; WATKINS, 2003). O NO é uma molécula gasosa importante na regulação de uma variedade de processos fisiológicos e patológicos (MANCARDI et al., 2011). O aumento dos níveis de NOx no soro têm sido relatados em pacientes diabéticos, bem como ratos diabéticos alimentados com frutose (PADIYA et al., 2011). Aumento nos níveis de NOx também pode induzir dano oxidativo através da formação de peroxinitrito (PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007).

1.5 POLIFENÓIS

Estudos têm demonstrado que compostos com forte propriedade antioxidante podem ser eficazes no tratamento de complicações relacionadas ao DM. Uma classe de compostos são os polifenóis derivados de plantas, que podem ser divididos em vários grupos, tais como flavonóis (quercetina, catequina), flavonas (luteolina) e isoflavonas (genisteína). A quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona) (figura 2) é o flavonoide mais comumente encontrado na dieta humana (frutas, vegetais e vinho tinto) (HU et al., 2006).

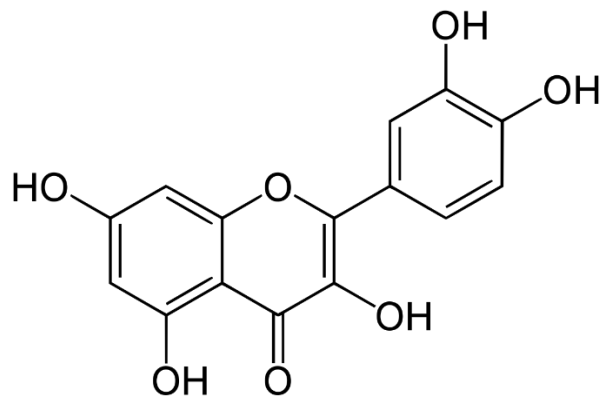


Figura 2. Estrutura molecular da quercetina
(GUAZELLI et al., 2013)

O uso da quercetina como agente terapêutico é restrito devido a três características desse composto: baixa solubilidade em água, meia-vida curta e baixa biodisponibilidade oral (HÄDRICH et al., 2016).

A ação da quercetina *in vivo* é dependente da extensão da sua absorção após a ingestão e capacidade de distribuição nos diversos tecidos corporais (KHALED; EL-SAYED; AL-HADIYA, 2003). No estudo de Hollman et al., (1997), a absorção da quercetina em 9 voluntários saudáveis foi cerca de 24% da solução administrada por via oral. Já no estudo de Gugler, Leschik, Dengler; (1975) a quercetina apresentou uma absorção menor que 1% em indivíduos que ingeriram 4 gramas do medicamento na forma de cápsulas.

A quercetina é um inibidor eficaz de lipoxigenases, e também exibe uma ampla gama de atividades farmacológicas, tais como anti-inflamatória, antioxidante, anti-tumoral, imunomodulador e vasodilatador. Também previne a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade *in vitro*. Além disso, este flavonoide pode inibir a expressão de moléculas de adesão estimuladas pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF α) em células endoteliais aórticas humanas (MAHMOUD et al., 2013).

No que se refere ao controle glicêmico, a quercetina tem sido relatada na melhora do DM em modelos animais de DM1 ou DM2 (ABO-YOUSSEF, 2015; AGUIRRE et al., 2011).

O estudo de Jeong et al., (2012) mostrou os efeitos da quercetina em animais com DM2. Camundongos C57BL que receberam quercetina (0,04%-0,08% durante 6 semanas) apresentaram menores concentrações plasmáticas de

glicose em relação ao grupo controle, porém não tiveram aumento ou diminuição nos níveis de insulina. Os animais que receberam uma porção de 0,08% de quercetina apresentaram outros aspectos positivos, incluindo aumento da adiponectina plasmática e colesterol HDL, diminuição do colesterol total plasmático e TGL plasmáticos. Nesse mesmo estudo, foi observado que animais que receberam quercetina tiveram uma redução dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), aumento da SOD, CAT e GPx no fígado.

1.6 SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACO (MICROENCAPSULAÇÃO)

Os fármacos são utilizados de maneira geral com finalidade terapêutica, profilática ou diagnóstica. A via de administração mais utilizada é a oral e de acordo com a forma farmacêutica apresentada, a liberação do fármaco pode ser convencional ou modificada. Esta última, de forma interessante, permite modular a liberação do fármaco, prolongando ou retardando a sua dissolução (PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007).

O processo de encapsulamento possui diversas funções como: modificação da densidade, cor, forma, diminuição da fotosensibilidade, proteção contra umidade ou oxidação, prevenção de reações químicas entre duas espécies ativas, aumento da estabilidade e liberação controlada de ativos (MARTINS et al., 2017). Devido a estas vantagens, as técnicas de encapsulamento têm sido amplamente empregada em diversos ramos da indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia.

Existem diversos tipos de métodos de microencapsulação que dependem da substância a ser encapsulada, do revestimento utilizado, rendimento da técnica, tamanho das cápsulas e principalmente a relação custo/processo (MARTINS et al., 2017).

De acordo com o exposto acima, a quercetina apresenta-se como uma alternativa interessante para o tratamento da DM, em particular da DM2. Entretanto, pela característica de sua baixa solubilidade em meio aquoso, o desenvolvimento de formulações que melhoram a biodisponibilidade do fármaco, como a microencapsulação, torna-se uma estratégia interessante, necessária e desafiadora.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a ação da quercetina microencapsulada administrada por via oral (gavagem) em modelo de indução de DM2 em animais que receberam ração com frutose 66%.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar os níveis de glicose, colesterol total e frações, TGL, creatinina, ácido úrico bem como a atividade enzimática plasmática das alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) no plasma.
- Dosar a capacidade antioxidante total (TRAP), atividade da paraoxonase 1 (PON-1) e grupamento sulfidrila (SH) no plasma destes animais.
- Medir os níveis plasmáticos dos produtos avançados de oxidação proteica (AOPP), hidroperóxidos lipídicos (LOOH) por quimiluminescência e NOx.
- Dosar TRAP e SH no fígado.
- Quantificar os níveis de AOPP e LOOH no fígado.
- Avaliar a reserva de glicogênio em cortes histológicos do fígado.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos utilizando ratos machos Wistar Albinos pesando 150 g (± 25 g) fornecidos pelo biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina. Os animais foram mantidos em caixas individuais de polietileno, mantidos sob um ciclo claro-escuro de 12 horas, com temperatura constante ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). Ao longo do estudo, ração e água foram fornecidos *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais previstos neste projeto foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina (CEUA nº 31855.2012.76).

3.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL E PROCEDIMENTO

Trata-se de um estudo experimental, no qual foi utilizado de 10 – 13 animais por grupo, sendo subdivididos aleatoriamente em oito grupos.

Para a indução de hiperglicemia, uma ração preparada em nosso laboratório com 66% de frutose foi fornecida aos animais por 9 semanas. Estes animais receberam por gavagem: salina, tween 80, quercetina 100 mg, microcapsulas inertes e quercetina microencapsulada (10, 30 e 100 mg) durante todo o experimento.

Grupo 1 (RP) - Controle, tratados com ração padrão para roedores (NUVILAB®), receberam solução salina por gavagem;

Grupo 2 (RF) - Animais tratados com ração frutose, receberam solução salina por gavagem;

Grupo 3 (TW) - Animais tratados com ração de frutose, receberam tween 80 (20%) (veículo da quercetina) por gavagem;

Grupo 4 (QL100) - Animais tratados com ração de frutose, receberam quercetina livre, dissolvida em tween 80, em uma dose de 100 mg/kg/dia por gavagem;

Grupo 5 (MCIN) - Animais tratados com ração de frutose, receberam microcápsulas inertes;

Grupo 6 (QMC10) - Animais tratados com ração de frutose, receberam quercetina microencapsulada em uma dose de 10 mg/kg/dia por gavagem;

Grupo 7 (QMC30) - Animais tratados com ração de frutose, receberam quercetina microencapsulada em uma dose de 30 mg/kg/dia por gavagem;

Grupo 8 (QMC100) - Animais tratados com ração de frutose, receberam quercetina microencapsulada na dose de 100 mg/kg/dia por gavagem.

Todos os animais tiveram peso corporal registrado a cada três dias para a correção das doses de quercetina livre e quercetina microencapsulada.

Utilizamos ração de frutose 66% para a indução da hiperglicemia. A frutose 60-66% foi utilizada também por autores como Ajiboye et al. (2016), Kannappan e Anuradha (2010), Veerapur et al. (2010) para o desenvolvimento de modelos em animais com alterações na RI e hiperglicemia. Para verificar o desenvolvimento de alterações metabólicas, utilizamos os parâmetros de teste de tolerância à insulina (ITT) (dados do estudo piloto, dados não apresentados) e glicemia.

Ao final do experimento, os ratos foram anestesiados com tiopental 70mg/kg (Thiopentax®) para coleta do sangue em uma seringa heparinizada por punção cardíaca para avaliar os parâmetros bioquímicos e de estresse oxidativo. O plasma foi obtido a partir de amostras de sangue após centrifugação (3000 rpm durante 10 min à temperatura ambiente). O animal foi perfundido com tampão fosfato 140mM, pH 7,4, o fígado foi dissecado e pesado. O lobo mediano foi separado para análise histológica (adicionado em 10% de formalina) até o processamento e o lobo esquerdo foi fragmentado em *eppendorfs* para os testes de EO em tecido. O plasma e os fragmentos de fígado foram congelados a -80°C para avaliações futuras descritas abaixo.

3.3 PREPARO DA RAÇÃO

A ração padrão (NUVILAB), para roedores foi triturada em liquidificador industrial e após esse processo a mesma foi peneirada. Em seguida, em uma panela do tipo “tacho”, 660 g de frutose foi derretida e acrescentou-se nela 440 g de ração padrão triturada. A partir da mistura obtida foi confeccionada a ração com 66% de frutose o qual foi fornecida aos animais por todo experimento.

3.4 PREPARO DAS MICROCAPSULAS

As microcápsulas foram obtidas seguindo o método de Baracat et al. (2004) que utilizaram o método complexo de coacervação. A caseína e a pectina

foram dispersas separadamente sob agitação mecânica constante e o pH foi ajustado para $8,0 \pm 0,1$ mediante a adição de hidróxido de sódio 4,0M. Na água deionizada, a quercetina foi dispersa durante três minutos sob agitação mecânica e foi adicionada à dispersão de pectina. Nesta dispersão, a caseína foi adicionada e as microcápsulas foram obtidas gradualmente diminuindo o pH para $4,0 \pm 0,1$ com adição de 1,0M de ácido cítrico. A proporção final de quercetina e polímero foi de 1:3. Para a preparação das microcápsulas inertes, o mesmo processo foi utilizado, no entanto, neste caso, a quercetina não foi incorporada, em vez disso foi adicionada água deionizada. As microcápsulas foram secas em Spray Dryer (Lab plant - modelo SD05), mantendo as especificações, tais como: temperatura do ar na entrada mantida constante a 180°C , taxa de alimentação de 7,75 mL/min e fluxo de ar de $1,1 \text{ m}^3/\text{min}$.

3.5 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Os testes de glicose, perfil lipídico, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, uréia e creatinina foram realizados utilizando o sistema bioquímico automatizado Dimension®RxL (Deerfield, IL, EUA).

3.6 HOMOGENEIZADO E SOBRENADANTE

Pouco antes do teste, o fragmento do fígado foi descongelado e colocado em vidro tipo Potter o qual foi macerado com tampão fosfato monobásico 10 mM pH 7,4 equivalente a 100mg/mL. O mesmo foi centrifugado a 2600 rpm a 4 graus por 10 minutos, os testes foram realizados com o sobrenadante.

3.7 DOSAGEM DE PROTEÍNA NO FÍGADO

O método de Lowry, et al. (1951) foi utilizado com modificações (MILLER, 1959) para a correção dos parâmetros do tecido por proteína.

3.8 TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA

O experimento foi realizado entre 13 e 14h. Para o ITT, os ratos foram privados de ração por 3h, foram anestesiados com tiopental sódico (4 mg/100 g,i.p.) e recebem injeção de insulina (1,5 U/Kg de peso; i.p.). Após administração de insulina, foram coletadas amostras de sangue, por punção na cauda nos tempos

10, 20, 30 e 40 minutos, sendo a glicemia determinada com uso de glicosímetro e fitas. Com os valores de glicemia foi calculada a constante de consumo de glicose ou queda de glicemia (kITT) por regressão linear do logaritmo neperiano da concentração de glicose.

3.9 DOSAGEM DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO

3.9.1 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (TRAP) DE PLASMA E FÍGADO

Esta análise foi realizada em uma adaptação do método descrito por Repetto et al. (1996). Esta metodologia avalia os níveis antioxidantes totais de plasma ou homogeneizado (fígado). Neste método, o dihidroclorato de 2,2'-azobis (2-metilpropionamida), um sistema de gerador de radical alcóxila por decomposição térmica, produz fótons amplificados por luminol e medidos em luminômetro.

3.9.2 DETERMINAÇÃO DE GRUPAMENTO SULFIDRILA (SH) DE PLASMA E FÍGADO

A quantificação de SH foi determinada em homogeneizado (fígado) e plasma por espectrofotometria usando ácido 5,5-ditiobis 2-nitrobenzóico de acordo com o método de Ellman (1959) e Francik et al. (2014) , no comprimento de onda de 412nm, e os resultados são expressos como micromol SH.

3.9.3 DETERMINAÇÃO DE PRODUTOS AVANÇADOS DE OXIDAÇÃO PROTEICA (AOPP) DE PLASMA E FÍGADO

Para a quantificação de AOPP no plasma e homogeneizado (fígado), foi utilizado o método descrito por Hanasand et al. (2012). O método baseia-se na reação das proteínas oxidadas com iodeto de potássio e ácido cítrico em meio ácido, com leitura a 340 nm.

3.9.4 DETERMINAÇÃO DE HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS (LOOH) DE PLASMA E FÍGADO

A formação de hidroperóxido foi quantificada utilizando uma metodologia descrita por Flecha, Llesuy e Boveris (1991). A quimioluminescência estimulada por t-butil foi empregada para analisar os níveis de hidroperóxidos

presentes no plasma e homogeneizado. Este teste é baseado no consumo das defesas antioxidantes e na formação de hidroperóxidos, resultando em um aumento na emissão de fótons. Este experimento foi realizado em contador da marca GLOMAX em um intervalo de contagem não coincidente com a resposta entre 300 e 620 nm. Os resultados foram expressos em unidade relativa de luz (URL).

3.9.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA PARAOXONASE 1 (PON-1) DO PLASMA

A atividade total de PON-1 no plasma foi determinada pela formação de hidrólise de fenil acetato (fenol), com base na metodologia descrita por Richter, Jarvik e Furlong (2008). A taxa de hidrólise do fenil acetato foi determinada em um leitor de microplacas Perkin Elmer®, modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA) a um comprimento de onda de 270 nm, medido em 4 minutos (16 leituras variando de 15 segundos entre leituras) com a temperatura mantida em 25°. A atividade foi expressa em U/mL com base no coeficiente de extinção molar de fenil acetato que é equivalente a 1,31mMol / Lcm-1.

3.9.6 DETERMINAÇÃO DE SUBPRODUTOS DO ÓXIDO NÍTRICO (NOx) PLASMÁTICO

Os níveis de óxido nítrico foram avaliados indiretamente através da determinação da concentração de nitrito plasmático, utilizando uma adaptação da técnica descrita por Navarro-González, García-Benayas e Arrenas (1998). O método baseia-se na redução de nitrato em nitrito mediado por reações de oxidação que ocorrem entre o nitrato presente na amostra e o sistema de cádmio-cobre dos reagentes, com subsequente diazotização e detecção colorimétrica do azocomposto formado pela complexação com o reagente de Griess no comprimento da onda de 550 nm.

3.10 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA NO FÍGADO

O lobo mediano do fígado foi acondicionado em recipientes contendo formalina 10% à temperatura ambiente até o material ser processado. Este material foi banhado em álcool, xilol e depois preparado para inclusão de parafina. Em seguida, os blocos de parafina foram cortados em um micrótomo (3-4 micras) e

estes cortes foram dispostos em lâminas de vidro e corados com Ácido Periódico de Schiff para a análise da reserva de glicogênio de acordo com Kovac et al. (2015). As lâminas foram fotografadas em microscópio óptico e analisadas por duas alunas treinadas. As seções foram examinadas para alteração histopatológica como a reserva de glicogênio em 40 campos de 5 animais de cada grupo, totalizando 200 dados de cada grupo. O achado foi classificado semiquantitativamente como discreto (1), moderado (2), acentuada (3) e muito pronunciado (4) (Figura 3).

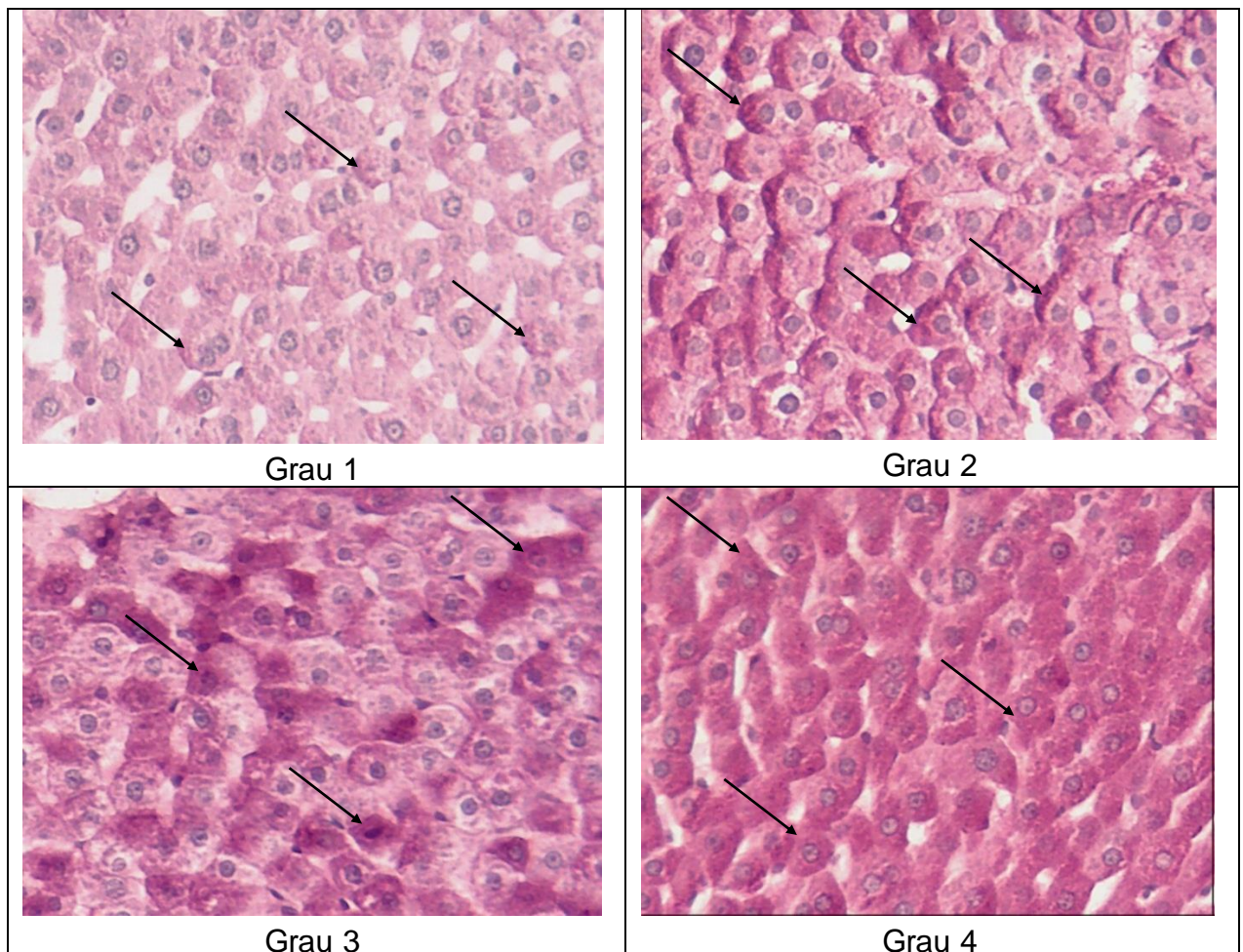


Fig. 3 Exemplos de graus de glicogênio (indicados pela seta – caracterizado pela cor magenta). Grau de glicogênio = 1: discreto; 2: moderado; 3: acentuada; 4: muito pronunciado.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram realizadas análises estatísticas para avaliar se a quercetina microencapsulada melhoraria os parâmetros bioquímicos plasmáticos e de estresse oxidativo no plasma e no fígado. Para os dados quantitativos utilizou-se a

ANOVA seguida do teste de Tukey quando os pressupostos foram atendidos (homogeneidade de variâncias e normalidade), e quando não foram atendidos utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. Para as variáveis qualitativas utilizou-se o teste Qui-quadrado seguido do teste z para comparar as porcentagens entre os grupos. O nível de significância estatística utilizado foi de 0,05, e quando o valor de p é $<0,05$, os meios (para as variáveis quantitativas) ou as porcentagens (para as variáveis qualitativas) são seguidos por letras. As letras iguais para a mesma variável indicam que não há diferenças entre os meios ou porcentagens entre os grupos, e letras diferentes para a mesma variável indicam que há uma diferença entre os meios ou as porcentagens entre os grupos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO NO FORMATO DE ARTIGO CIENTÍFICO

4.1 QUERCETINA MICROENCAPSULADA REESTABELECE NÍVEIS DE GLICOGÊNIO E AUXILIA NA DIMINUIÇÃO DE HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS ¹

Luciana Higachi¹, Carine Coneglian de Farias¹, Kamila Landucci Bonifácio¹, Ana Paula Michelin¹, Laura de Oliveira Semeão¹, Graziela Scialanti Ceravolo², Rubia Casagrande³, Estefania Gastaldello Moreira², Marcela Maria Baracat³, Eduardo José de Almeida Araújo⁴, Décio Sabbatini Barbosa¹

¹ – Laboratório de Pós Graduação, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil

² – Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil

³ – Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil

⁴ – Departamento de Histologia, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil

RESUMO

O diabetes *mellitus* (DM) é um conjunto de distúrbios metabólicos de rápido crescimento no mundo e possui uma forte associação com maiores taxas de morbidade e mortalidade relacionadas a eventos cardiovasculares. O alto consumo de frutose possui uma relação com problemas metabólicos como a hiperglicemia, síndrome metabólica e DM. Além disso, pode levar a desequilíbrios de substâncias antioxidante e oxidantes no indivíduo gerando um estado de estresse oxidativo (EO). O objetivo deste estudo foi avaliar a ação da quercetina livre (QL) e quercetina microencapsulada (QMC) em modelo de indução de diabetes com ração frutose 66%. Foram avaliados peso final, peso do fígado e peso relativo do fígado. Em nível plasmático, foi dosado glicose, perfil lipídico, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, creatinina, ácido úrico, além de parâmetros de EO. Já no fígado foi dosado marcadores de EO e cortes histológicos. Os resultados desse estudo demonstraram que todos os animais que receberam ração de frutose tiveram diminuição significativa do peso final e os grupos TW, MCIN, QMC10, QMC30 tiveram aumento significativo no peso relativo do fígado. Além disso, os grupos que receberam ração frutose apresentaram aumento significativo da glicemia, diminuição significativa da PON-1 plasmática, aumento significativo de SH plasmático e diminuição significativa de SH tecidual. O grupo QMC100 obteve diminuição de radicais livres como o LOOH em nível tecidual. Já os grupos QMC30 e QMC100 demonstraram maior proteção dos níveis de glicogênio no fígado. De acordo com os resultados obtidos, a utilização de QMC pode ser uma alternativa adjuvante no tratamento do diabetes pela proteção de glicogênio hepático e diminuição da lipoperoxidação.

Palavras-chave: Estresse oxidativo. Frutose. Glicogênio. Microencapsulação. Quercetina.

¹ O artigo será possivelmente submetido a Life Sciences

INTRODUÇÃO

O *diabetes mellitus* (DM) é uma doença de rápido crescimento no mundo, sendo o tipo 2 caracterizado por aumento da resistência à insulina, insuficiência na secreção deste hormônio ou resistência na eliminação de glicose mediada pelo mesmo [1]. Estima-se que cerca de 592 milhões de adultos se tornem pacientes diabéticos até o ano de 2035 devido ao aumento da expectativa de vida, aumento da urbanização, altas taxas de sedentarismo e obesidade, além de elevados números de *fast foods* que propagam o consumo de gorduras e calorias ricas [2].

A ocidentalização da dieta resultou em aumentos significativos no consumo de frutose, sendo que aproximadamente 85-100 gramas por dia são ingeridos [3]. A frutose é um açúcar altamente lipogênico presente em grande quantidade em alimentos processados e bebidas em todo o mundo. As fontes alimentares primárias de frutose são o xarope de milho com alta concentração deste açúcar, sacarose, mel e sucos de frutas concentradas. Em nível comercial, a frutose é mais barata que a sacarose e estabiliza melhor a textura de alguns alimentos processados [4].

A alimentação com alto teor de frutose, em ratos, mimetiza muitos dos sintomas da DM em humanos, especialmente a resistência à insulina, intolerância à glicose, dislipidemia e insuficiência renal. Da mesma forma, o alto consumo de frutose induz o estresse oxidativo (EO), que é uma das causas para as complicações metabólicas do DM [5]. No diabetes, devido a hiperglicemia, ocorre a oxidação aumentada de glicose que promove a geração de radicais livres, os quais podem danificar, por exemplo, o DNA, lipídios e proteínas [6].

Estudos têm demonstrado que compostos com propriedade antioxidante podem ser eficazes no auxílio terapêutico nas complicações relacionadas ao diabetes. Dentre estes compostos, os polifenóis são muito utilizados em pesquisas, sendo os flavonoides como a quercetina, por exemplo, a mais consumida na dieta humana [7]. Entretanto, pela característica de sua baixa solubilidade em meio aquoso, o desenvolvimento de formulações que melhoram a biodisponibilidade do fármaco, como a microencapsulação, torna-se uma alternativa tecnológica interessante.

O objetivo deste estudo foi avaliar a ação da quercetina microencapsulada administrada por via oral (gavagem) em modelo de indução de DM2 em animais que receberam ração com frutose 66%.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos utilizando ratos machos Wistar Albinos pesando 150 g (\pm 25 g) fornecidos pelo biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina. Os animais foram mantidos em caixas individuais de polipropileno de tamanho 41cm x 34cm x 16cm, foram mantidos sob um ciclo claro-escuro de 12 horas, com temperatura constante (22° C \pm 1°C). Ao longo do estudo, ração e água foram fornecidos *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais previstos neste projeto foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina (CEUA nº 31855.2012.76).

Protocolo experimental e procedimento

Trata-se de um estudo experimental o qual foi utilizado de 10–13 animais por grupo, sendo subdivididos aleatoriamente em oito grupos.

Para a indução de hiperglicemia, uma ração preparada em nosso laboratório com 66% de frutose foi fornecida aos animais por 9 semanas. Estes animais receberam por gavagem salina, tween 80, quercetina 100 mg, microcapsulas inertes e quercetina microencapsulada (10, 30 e 100 mg) durante todo o experimento.

Grupo 1 (RP) - Controle, tratados com ração padrão para roedores (NUVILAB®), recebeu solução salina por gavagem;

Grupo 2 (RF) - Animais tratados com ração de frutose, receberam solução salina por gavagem;

Grupo 3 (TW) - Animais tratados com ração de frutose receberam tween 80 (20%) (veículo de quercetina) por gavagem;

Grupo 4 (QL100) - Animais tratados com ração de frutose receberam quercetina livre, dissolvida em tween 80, em uma dose de 100 mg/kg/dia por gavagem;

Grupo 5 (MCIN) - Animais tratados com ração de frutose receberam microcápsulas inertes;

Grupo 6 (QMC10) - Animais tratados com ração de frutose receberam quercetina microencapsulada em uma dose de 10 mg/kg/dia por gavagem;

Grupo 7 (QMC30) - Animais tratados com ração de frutose receberam quercetina microencapsulada em uma dose de 30 mg/kg/dia por gavagem;

Grupo 8 (QMC100) - Animais tratados com ração de frutose receberam quercetina microencapsulada na dose de 100 mg/kg/dia por gavagem.

Todos os animais tiveram peso corporal registrado a cada três dias para a correção das doses de quercetina livre e quercetina microencapsulada.

Para verificar o desenvolvimento de alterações metabólicas utilizamos os parâmetros de ITT (dados do estudo piloto, dados não apresentados) e glicemia.

Ao final do experimento, os ratos foram anestesiados com tiopental 70 mg/kg (Thiopentax®) para coleta do sangue em uma seringa heparinizada por punção cardíaca para avaliar os parâmetros bioquímico e de estresse oxidativo. O plasma foi obtido a partir de amostras de sangue após centrifugação (3000 rpm durante 10 min à temperatura ambiente). O animal foi perfundido com tampão fosfato 140mM, pH 7,4, o fígado foi dissecado e pesado. O lobo mediano foi separado para análise histológica (adicionado em 10% de formalina) até o processamento e o lobo esquerdo foi fragmentado em *eppendorfs* para os testes de estresse oxidativo em tecido. O plasma e os fragmentos de fígado foram congelados a -80°C para avaliações futuras descritas abaixo.

Preparo da ração

Para a obtenção da ração de frutose 66%, em uma panela do tipo “tacho”, 660 g de frutose foi derretida e acrescentou-se nela 440 g de ração padrão (NUVILAB) triturada.

Preparo das microcápsulas

As microcápsulas foram obtidas seguindo o método de Baracat et al. [8] que utilizaram o método complexo de coacervação. As microcápsulas foram secas em Spray Dryer (Lab plant - modelo SD05).

Avaliação dos parâmetros bioquímicos

Os testes de glicose, perfil lipídico, ALT, AST, creatinina e ácido úrico foram realizados utilizando o sistema bioquímico automatizado Dimension® RxL (Deerfield, IL, EUA).

Homogeneizado e sobrenadante

Pouco antes do teste, o fragmento do fígado foi descongelado e colocado em vidro tipo Potter o qual foi macerado com tampão fosfato monobásico 10mM pH 7,4 equivalente a 100 mg/mL. O mesmo foi centrifugado a 2600 rpm a 4°C por 10 minutos, e os testes foram realizados apenas com o sobrenadante dos homogeneizados.

Dosagem de proteína no fígado

O método de Lowry, et al. [9] foi utilizado com modificações [10] para a correção dos parâmetros do tecido por proteína.

Dosagem de parâmetros de estresse oxidativo

Foram dosados no plasma e sobrenadante a capacidade antioxidante total (TRAP) de acordo com método adaptado descrito por Repetto et al. [11], grupamento sulfidril (SH) segundo método de Ellman [12] e Francik et al. [13], produtos avançados de oxidação proteica (AOPP) de acordo com método descrito por Hanasand et al. [14] e hidroperóxidos lipídicos (LOOH) segundo método de Flecha, Llesuy e Boveris [15]. Além desses, foi quantificado apenas no plasma a atividade da paraoxonase 1 (PON-1) de acordo com método de Richter, Jarvik e

Furlong [16] e subprodutos de óxido nítrico (NOx) segundo método de Navarro-González, Garcia-Benayas e Arrenas [17].

Avaliação histológica no fígado

O lobo mediano do fígado foi acondicionado em recipientes contendo formalina 10% à temperatura ambiente até o material ser processado. Este material foi preparado para inclusão de parafina, cortados (3-4 micras) e estes cortes foram dispostos em lâminas de vidro e corados com Ácido Periódico de Schiff para a análise da reserva de glicogênio. As lâminas foram fotografadas em microscópio óptico e as seções foram examinadas para verificar a presença de alteração histopatológica (reserva de glicogênio) em 40 campos de 5 animais de cada grupo, totalizando 200 dados de cada grupo. O achado foi classificado semiquantitativamente como discreto, moderado, acentuada e muito pronunciado.

Análise estatística

Foram realizadas análises estatísticas para avaliar se a quercetina microencapsulada melhoraria os parâmetros bioquímicos plasmáticos e de estresse oxidativo no plasma e no fígado. Para os dados quantitativos utilizou-se a ANOVA seguida do teste de Tukey quando os pressupostos foram atendidos (homogeneidade de variâncias e normalidade), e quando não, aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. Para as variáveis qualitativas utilizou-se o teste Qui-quadrado seguido do teste z para comparar as porcentagens entre os grupos. O nível de significância estatística utilizado foi de 0,05, e quando o valor de p é $<0,05$, os meios (para as variáveis quantitativas) ou as porcentagens (para as variáveis qualitativas) são seguidos por letras. As letras iguais para a mesma variável indicam que não há diferenças entre os meios ou porcentagens entre os grupos, e letras diferentes para a mesma variável indicam que há uma diferença entre os meios ou as porcentagens entre os grupos.

RESULTADOS

Peso corporal e peso do fígado

O peso corporal inicial dos animais nos vários grupos não foi diferente estatisticamente ($p > 0,05$). Todos os grupos que receberam ração de frutose apresentaram perda significativa de peso comparado ao grupo RP ($p < 0,0001$). Quanto ao peso do fígado dos animais, não houve diferença significativa ($p > 0,05$). Já, em relação ao peso relativo do fígado (peso do animal / peso do fígado), todos os animais hiperglicêmicos tiveram um aumento deste parâmetro com significância apenas nos grupos TW, MCIN, QMC10 e QMC30 (tabela 1).

Tabela 1: Avaliação dos parâmetros corporais de ratos tratados com frutose (66%, 9 semanas) e administração oral diária de quercetina (100 mg/kg) ou quercetina microencapsulada (10 mg, 30 mg, 100 mg)

GRUPOS	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Peso fígado (g)	Peso relativo fígado (g)
RP	134 (126-158)	321 (300-390)	10,35 (8,05-13,51)	3,08 (2,68-3,46)
RF	144 (128-162)	241* (205-268)	8,95 (6,59-11,37)	3,54 (3,22-4,70)
TW	143 (122-164)	233* (190-300)	8,98 (6,09-12,94)	3,69 * (2,89-5,03)
QL100	139 (133-161)	241* (218-286)	8,82 (7,22-10,93)	3,77 (3,03-4,03)
MCIN	142 (130-150)	237* (220-300)	9,01 (8,12-11,71)	3,88 * (3,09-4,30)
QMC10	139 (130-169)	244* (206-286)	8,99 (7,56-12,76)	3,85* (3,11-4,48)
QMC30	140 (132-156)	243* (212-302)	8,84 (7,03-11,95)	3,77* (3,32-4,43)
QMC100	142 (129-174)	234* (208-300)	8,67 (6,46-15,94)	3,67 (3,03-5,31)

Os dados são expressos em mediana (valores mínimos-máximos) de 10 - 13 ratos machos Wistar (ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

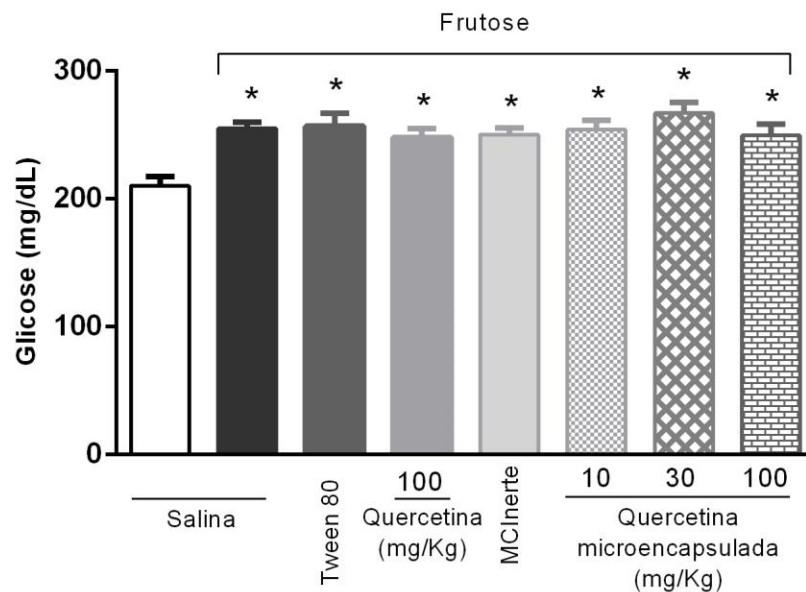
Ração padrão (RP), ração frutose (RF), Tween 80 (TW), Quercetina 100mg (QL100), microcapsula inerte (MCIN), quercetina microencapsulada 10 mg, 30 mg, 100 mg (QMC10, QMC30, QMC100 respectivamente). * $p < 0,05$ em comparação com o grupo RP.

Parâmetros bioquímicos:

Glicemia

Os animais que receberam frutose tiveram um aumento estatisticamente significativo da glicose em comparação com o RP ($p < 0,0002$), mas nenhum tratamento melhorou os níveis de glicose (figura 1).

Fig. 1 Animais alimentados com ração enriquecidas com frutose e tratados por gavagem com salina, tween 80, quercetina 100mg/kg, microcápsulas inertes, quercetina microencapsulada (10, 30 e 100 mg/Kg).



Os dados são expressos em médias \pm EPM. 10 - 13 ratos machos Wistar por grupo (ANOVA seguido pelo teste de Tukey). Ração padrão (RP), ração frutose (RF), Tween 80 (TW), Quercetina livre 100mg (QL100), microcapsula inerte (MCIN), quercetina microencapsulada 10 mg, 30 mg, 100 mg (QMC10, QMC30, QMC100 respectivamente). * $p < 0,05$ em comparação com o grupo RP.

Perfil lipídico

Em relação ao perfil lipídico, a QL e a QMC não melhoraram os níveis de triacilgliceróis (TGL), colesterol total (CHOL) e lipoproteína de alta densidade (HDL) ($p > 0,05$) (tabela 2).

Tabela 2: Níveis de triglicerídeos (TGL), colesterol total (CHOL) e níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL) no plasma de ratos tratados com frutose (66%) e administração oral diária de quercetina (100 mg/kg) ou quercetina microencapsulada (10 mg, 30 mg, 100 mg)

GRUPOS	TGL (mg/dL)	CHOL (mg/dL)	HDL (mg/dL)
RP	79,64 (±10,78)	77 (62-99)	56,00 (±2,37)
RF	108,50 (±17,05)	72 (60-84)	47,67 (±2,36)
TW	113,70 (±22,40)	70 (65-86)	49,09 (±1,88)
QL100	124,60 (±16,11)	69 (58-89)	47,40 (±2,07)
MCIN	117,60 (±17,09)	70 (59-102)	52,20 (±3,17)
QMC10	120,2 (±12,56)	75 (58-100)	49,00 (±2,40)
QMC30	111,2 (±11,64)	75 (64-92)	51,25 (±1,29)
QMC100	103,3 (±14,56)	77 (65-104)	55,08 (±2,03)

Os dados são expressos em médias ± EPM ou mediana (valores mínimos-máximos) de 10 - 13 ratos machos Wistar (ANOVA seguido pelo teste de Tukey ou Kruskal Wallis seguido pelo teste de Dunn). Ração padrão (RP), ração frutose (RF), Tween 80 (TW), Quercetina 100 mg (QL100), microcapsula inerte (MCIN), quercetina microencapsulada 10 mg, 30 mg, 100 mg (QMC10, QMC30, QMC100 respectivamente). * $p < 0,05$ em comparação com o grupo RP.

Aminotransferases, creatinina e ácido úrico

Não houve diferença significativa na ALT, creatinina e ácido úrico ($p > 0,05$) entre os grupos, já a AST apresentou diferença significativa do grupo MCIN em relação ao grupo RP (tabela 3).

Tabela 3: Aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), creatinina, níveis de ácido úrico em plasma de ratos tratados com ração de frutose (66%) e administração oral diária de quercetina (100 mg/kg) ou quercetina microencapsulada (10 mg, 30 mg, 100 mg)

GRUPOS	AST (U/L)	ALT (U/L)	Creatinina (mg/dL)	Ácido úrico (mg/dL)
RP	81,00 (63-189)	54,00 (±2,42)	0,62 (±0,02)	1,65 (±0,24)
RF	67,00 (55-119)	44,42 (±1,97)	0,64 (±0,02)	1,68 (±0,19)
TW	81,00 (55-148)	53,64 (±3,09)	0,71 (±0,02)	1,50 (±0,23)
QL100	62,00 (55-85)	46,90 (±2,85)	0,64 (±0,02)	1,68 (±0,12)
MCIN	61,00* (52-90)	47,90 (±3,12)	0,70 (±0,02)	1,82 (±0,15)
QMC10	61,00 (55-160)	48,31 (±3,15)	0,68 (±0,02)	1,46 (±0,15)
QMC30	70,00 (55-178)	50,00 (±2,97)	0,68 (±0,02)	1,86 (±0,20)
QMC100	65,50 (52-151)	48,15 (±1,68)	0,73 (0,04)	1,81 (±0,20)

Os dados são expressos em médias \pm EPM ou mediana (valores mínimos-máximos) de 10 - 13 ratos machos Wistar por grupo (ANOVA complementado pelo teste de Tukey ou Kruskal-Wallis complementado pelo teste de Dunn). Ração padrão (RP), ração frutose (RF), Tween 80 (TW), Quercetina 100 mg (QL100), microcapsula inerte (MCIN), quercetina microencapsulada 10 mg, 30 mg, 100 mg (QMC10, QMC30, QMC100 respectivamente). * $p < 0,05$ em comparação com o grupo RP.

Parâmetros antioxidantes no plasma

Houve aumento estatisticamente significativo de SH em todos os grupos que receberam ração de frutose comparado ao grupo RP, e diminuição estatisticamente significativa na PON-1 nos grupos que receberam ração de frutose comparado ao grupo RP. Porém, a QL e a QMC não influenciaram esses parâmetros. TRAP não foi significativamente diferente entre os grupos (tabela 4).

Tabela 4: Paraoxonase 1 (PON1), grupamento sulfidril (SH) e antioxidante totais (TRAP) no plasma de ratos tratados com ração de frutose (66%) e administração oral diária de quercetina (100 mg/kg) ou quercetina microencapsulada (10 mg, 30 mg, 100 mg).

GRUPOS	PON-1 (U/ml)	SH (uM)	TRAP/AU (uMTrolox)
RP	351,0 (±10,64)	109,2 (±6,99)	118,3 (±10,44)
RF	240,2* (±12,02)	161,3* (±6,61)	108,5 (±9,30)
TW	224,9* (±12,96)	187,3* (±9,47)	135,5 (±13,08)
QL100	258,5* (±10,38)	185,9* (±9,45)	112,4 (±7,91)
MCIN	233,7* (±10,60)	182,0* (±9,91)	108,2 (±8,01)
QMC10	230,7* (±9,87)	178,3* (±7,39)	130,1 (±11,78)
QMC30	238,0* (±8,31)	178,4* (±10,97)	113,3 (±10,91)
QMC100	244,3* (±7,81)	174,4* (±12,03)	111,3 (±11,35)

Os dados são expressos em média ± EPM. 10 - 13 ratos machos Wistar por grupo (Kruskal-Wallis complementado pelo teste de Dunn). TRAP/AU: TRAP corrigido pelos valores de ácido úrico. Ração padrão (RP), ração frutose (RF), Tween 80 (TW), Quercetina 100 mg (QL100), microcapsula inerte (MCIN), quercetina microencapsulada 10 mg, 30 mg, 100 mg (QMC10, QMC30, QMC100 respectivamente). * p<0,05 em comparação com o grupo RP.

Pro oxidantes no plasma

Todos os grupos que receberam ração de frutose apresentaram AOPP aumentado, mas não estatisticamente significativo. No parâmetro LOOH, o grupo QM10 apresentou aumento significativo em relação ao grupo RP. No teste de NOx, todas as diferentes concentrações de quercetina apresentaram tendência a diminuir o NOx (tabela 5).

Tabela 5: Produtos avançados de oxidação protéica (AOPP), subprodutos de óxido nítrico (NOx), hidroperóxidos lipídicos (LOOH) em plasma ratos tratados com ração de frutose (66%) e administração oral diária de quercetina (100 mg/kg) ou quercetina microencapsulada (10 mg, 30 mg, 100 mg).

GRUPOS	AOPP (μM)	NOx (μM)	LOOH (URL)
RP	62,69 ($\pm 5,18$)	5,57 ($\pm 0,69$)	$8,44 \times 10^5$ ($\pm 0,49$)
RF	69,16 ($\pm 8,26$)	5,54 ($\pm 0,85$)	$11,30 \times 10^5$ ($\pm 1,09$)
TW	78,55 ($\pm 9,98$)	5,47 ($\pm 0,67$)	$12,63 \times 10^5$ ($\pm 1,08$)
QL100	80,48 ($\pm 9,21$)	4,22 ($\pm 0,52$)	$14,52 \times 10^5$ ($\pm 1,12$)
MCIN	72,07 ($\pm 9,55$)	5,91 ($\pm 0,92$)	$14,59 \times 10^5$ ($\pm 1,95$)
QMC10	82,90 ($\pm 7,89$)	4,33 ($\pm 0,48$)	$15,76 \times 10^5$ * ($\pm 1,75$)
QMC30	74,81 ($\pm 6,77$)	4,23 ($\pm 0,39$)	$12,69 \times 10^5$ ($\pm 1,19$)
QMC100	75,94 ($\pm 9,56$)	4,08 ($\pm 0,50$)	$13,90 \times 10^5$ ($\pm 1,46$)

Os dados são expressos em médias \pm EPM. 10 - 13 ratos machos Wistar por grupo (ANOVA seguido pelo teste de Tukey). Ração padrão (RP), ração frutose (RF), Tween 80 (TW), Quercetina 100 mg (QL100), microcapsula inerte (MCIN), quercetina microencapsulada 10 mg, 30 mg, 100 mg (QMC10, QMC30, QMC100 respectivamente). * $p < 0,05$ em comparação com o grupo RP.

Parâmetros antioxidantes e pró oxidantes no fígado

Houve diminuição estatisticamente significativa no SH em todos os grupos que receberam frutose em comparação com o RP, mas a QL a QMC não melhoraram esse parâmetro. Os parâmetros TRAP e AOPP não foram significativamente diferente entre os grupos. Já com relação ao LOOH, o grupo QMC30 apresentou diferença significativa com relação ao grupo RP e o grupo QMC100 apresentou diferença significativa em relação ao grupo RP, RF e QMC30 (tabela 6).

Tabela 6: Grupamento sulfidril (SH), antioxidante totais (TRAP), produtos avançados de oxidação protéica (AOPP), hidroperóxidos lipídicos em fígado de ratos tratados com frutose (66%) e administração oral diária de quercetina (100 mg/kg) ou quercetina microencapsulada (10 mg, 30 mg, 100 mg).

GRUPOS	SH (uM)	TRAP (uM Trolox)	AOPP (µM)	LOOH (URL)
RP	75,87 (±4,08)	42,89 (±1,42)	11,97 (±0,65)	7,85x10 ⁵ (±0,35)
RF	63,97* (±2,77)	38,29 (±1,73)	12,07 (±0,73)	7,83 x10 ⁵ (±0,21)
TW	62,42* (±1,63)	42,19 (±2,23)	11,19 (±0,51)	7,05x10 ⁵ (±0,13)
QL100	62,76* (±1,72)	44,47 (±1,28)	12,15 (±1,17)	7,24x10 ⁵ (±0,24)
MCIN	64,36* (±1,63)	43,96 (±2,41)	9,57 (±0,64)	7,39x10 ⁵ (±0,44)
QMC10	65,42* (±1,19)	43,70 (±1,62)	11,71 (±0,65)	7,28x10 ⁵ * (±0,25)
QMC30	64,86* (±1,51)	40,19 (±1,86)	10,97 (±0,56)	7,99x10 ⁵ (±0,23)
QMC100	64,19* (±2,29)	38,90 (±1,64)	12,48 (±0,98)	6,69x10 ⁵ # (±0,13)

Os dados são expressos em médias ± EPM. 10 - 13 ratos machos Wistar por grupo (Kruskal-Wallis complementado com Dunn). Ração padrão (RP), ração frutose (RF), Tween 80 (TW), Quercetina 100 mg (QL100), microcapsula inerte (MCIN), quercetina microencapsulada 10 mg, 30 mg, 100 mg (QMC10, QMC30, QMC100 respectivamente). * p <0,05 em comparação com o grupo RP. # p<0,05 em comparação com os grupos ração padrão, frutose e quercetina microencapsulada 30 mg.

Histopatológico

Quanto à reserva de glicogênio, QMC (30mg e 100mg) protegeram os níveis de glicogênio, pois apresentaram maior porcentagem de grau 3 (tabela 7).

Tabela 7. Graus de glicogênio = 1+: discreto; 2+: moderado; 3+: acentuada; 4+: muito acentuado.

Grupos	Grau de Glicogênio (% entre grupos)	1	2	3	4	Total
RP	5 ^{a,b}		75 ^a	105 ^a	15 ^a	200
	2,5%	37,5%	52,5%	7,5%		
RF	14 ^b		162 ^b	24 ^b	0 ^b	200
	7,0%	81,0%	12,0%	0,0%		
TW	2 ^{a,b}		137 ^{b,c,d}	61 ^c	0 ^b	200
	1,0%	68,5%	30,5%	0,0%		
QL100	4 ^{a,b}		133 ^{c,d}	63 ^c	0 ^b	200
	2,0%	66,5%	31,5%	0,0%		
MCIN	14 ^b		157 ^{b,d}	29 ^b	0 ^b	200
	7,0%	78,5%	14,5%	0,0%		
QMC10	0 ^a		118 ^c	80 ^{a,c}	2 ^b	200
	0,0%	59,0%	40,0%	1,0%		
QMC30	0 ^a		26 ^e	174 ^d	0 ^b	200
	0,0%	13,0%	87,0%	0,0%		
QMC100	0 ^a		21 ^e	172 ^d	7 ^{a,b}	200
	0,0%	10,5%	86,0%	3,5%		
Total	39		829	708	24	1600
	2,4%	51,8%	44,2%	1,5%		

Os dados são expressos em percentuais. 10 - 13 ratos machos Wistar por grupo (Teste de Qui-quadrado). Ração padrão (RP), ração frutose (RF), Tween 80 (TW), Quercetina 100 mg (QL100), microcapsula inerte (MCIN), quercetina microencapsulada 10 mg, 30 mg, 100 mg (QMC10, QMC30, QMC100 respectivamente). * $p < 0,05$ em comparação com o grupo RP. As letras iguais para a mesma variável indicam que não há diferenças entre os meios ou porcentagens entre os grupos, e letras diferentes para a mesma variável indicam que há uma diferença entre os meios ou as porcentagens entre os grupos.

DISCUSSÃO

O melhor resultado desse estudo foi o restabelecimento dos níveis de glicogênio no fígado de ratos alimentados com 66% de frutose e tratados com quercetina microencapsulada nas concentrações 30 e 100 mg/kg. No estudo de Kannappan e Anuradha [18], a atividade da enzima glicogênio fosforilase e o conteúdo de glicogênio foram reduzidos em ratos Wistar machos alimentados com

frutose (60 g/100 g), e o tratamento com quercetina (50 mg/kg - a partir do dia 16 até completar 45 dias de tratamento) restaurou a atividade desta enzima e o conteúdo de glicogênio. Estes mesmos autores sugerem que o aumento das atividades de enzimas gliconeogênicas e a redução de enzimas glicolíticas, com o esgotamento da reserva de glicogênio no fígado de rato alimentado com frutose, foram indicativos de que o fígado está no estado gliconeogênico. A gliconeogênese acelerada em ratos alimentados com frutose pode ser atribuída à resistência à insulina. De acordo com Eid et al. [19] a quercetina também estimula a AMPK hepática, inibindo a glicose-6-fosfatase, a enzima limitante de taxa de gliconeogênese no fígado. Ajiboye et al. [20] utilizaram ração com 60% de frutose por 9 semanas e observaram que ratos Wistar apresentaram um aumento significativo da glicemia quando comparado aos animais controle. Mahmoud et al. [21] utilizaram frutose (10%) em água por 12 semanas e quercetina a 50 mg/kg/dia nas últimas 6 semanas, não observaram diminuição na glicose plasmática em ratos machos albinos. Rivera et al. [22] trabalhando com ratos Zucker machos obesos e quercetina 2 - 10 mg/kg de peso corporal durante 10 semanas também não observaram diminuição na glicemia plasmática em qualquer dose. Embora estes dois estudos tenham diferentes modelos e concentrações de quercetina, os dados obtidos corroboram com nossos resultados. Entretanto, Abo-youssef [23] que utilizou frutose 66% em ração, por 14 semanas, e quercetina 50 mg/kg/dia nas últimas 4 semanas em ratos Wistar machos albinos, encontrou uma diminuição na glicemia plasmática. Autores que encontraram efeitos benéficos da quercetina na glicemia propuseram alguns mecanismos de ação tais como efeito protetor antioxidante nas ilhotas pancreáticas [24]; aumento de transportadores GLUT4 no músculo esquelético [25] e, finalmente, redução na absorção de glicose intestinal mediada pelo transportador de glicose 2 (rGLUT2) [23]. Embora em nosso estudo não tenhamos medido a captação da glicose pelo músculo esquelético e nem observado diminuição nos níveis glicêmicos em nenhum grupo que tenha recebido quercetina, seja ela livre ou microencapsulada, uma possível via de controle glicêmico, como a deposição de glicogênio no fígado, foi encontrada. Sendo assim, a quercetina microencapsulada nas concentrações 30 – 100 mg poderia ser utilizada como adjuvante no tratamento de distúrbios relacionados a glicose como o DM2.

O segundo melhor resultado desta pesquisa foi o baixo nível de LOOH no fígado de ratos alimentados com frutose 66% e tratados com quercetina microencapsulada na concentração de 100 mg, em comparação com o grupo

frutose. Sob hiperglicemia, a produção de vários açúcares redutores, como glicose-6-fosfato e frutose, aumentam através da glicólise e da via de poliol. Durante este processo, as espécies reativas de oxigênio são produzidas e causam danos nos tecidos [24]. Prieto et al. [26] utilizaram frutose 10% em ratos Wistar por 6 semanas. Estes apresentaram níveis plasmáticos aumentados de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), sendo que os animais tratados com quercetina (20 mg/kg) apresentaram redução significativa deste marcador de oxidação lipídica. Nayak et al. [27], também trabalhando com ratos, utilizaram ração com frutose 66% durante 42 dias e em seguida trataram os animais com quercetina 10 mg/kg por 6 semanas. Neste experimento os autores perceberam que as defesas antioxidantes no fígado foram significativamente prejudicadas, fato este observado pelo aumento nos níveis de TBARS e diminuição dos níveis de tióis totais, GSH, catalase, SOD e glutathione-S-transferase (GST) sendo estes parâmetros restaurados pelo uso da quercetina. O alto consumo de frutose leva ao aumento da geração de radicais livres, o que conseqüentemente reduz as atividades de GSH e enzimas antioxidantes como a SOD e CAT [28]. Em nosso estudo, não houve diferença significativa no biomarcador TRAP em plasma e tecido. Por outro lado, todos os animais que receberam ração de frutose apresentaram SH aumentado em relação ao grupo controle em nível plasmático, enquanto que ao nível tecidual houve uma inversão deste parâmetro, o que pode indicar que a SH está sendo consumida no fígado e, ao mesmo tempo, um sistema de compensação de sangue está ocorrendo como uma forma de poupar o órgão. Os autores Nayak et al. [27] observaram em seu estudo que a quercetina aumentou o parâmetro GSH no fígado e no sangue respectivamente. Sabe-se que os flavonoides ancoram na cabeça polar dos principais fosfolipídeos. Assim, a quercetina distribuída na superfície das bicamadas lipídicas, bem como na fase aquosa, poderia eliminar os radicais livres como resultado de sua capacidade na doação de hidrogênio. Em relação a PON-1, medida apenas no nível plasmático, todos os animais alimentados com frutose apresentaram este parâmetro antioxidante reduzido, indicando um consumo do mesmo. Embora muitos estudos tenham observado o efeito positivo da quercetina em diferentes doses e, em diversos modelos, em nosso estudo somente a dose 100 mg/kg de quercetina melhorou os níveis de LOOH indicando uma proteção significativa da peroxidação lipídica em nível tecidual. Com relação ao NO plasmático, assim como no estudo de Porto et al. [29] que utilizou frutose 10% em água por 12 semanas em

ratos Wistar, níveis de NO não foram modificados pela ingestão de frutose. Esse mesmo autor encontrou um aumento significativo de AOPP nos animais que receberam frutose, já em nosso estudo, não houve diferença significativa nesse parâmetro.

Em nível de perfil lipídico, as microcápsulas de quercetina e quercetina livre não reduziram as concentrações dos TGL ou do colesterol total (CT) além de não aumentarem a concentração da HDL dos animais. Por outro lado, Nayak et al. [27] observaram redução significativa nos níveis dos lipídeos séricos e melhora na relação CT/ HDL (índice de Castelli I). Diferentemente dos dois estudos citados anteriormente, Yamamoto e Oue [30], usaram ração com sacarose 40% durante 4 semanas e trataram com quercetina 0,02%, 0,07% e 0,5% e nenhuma dessas concentrações melhorou o perfil lipídico dos animais. Arias et al. [31] utilizaram uma dieta comercialmente obesogênica com sacarose (20%) e gordura (24%) durante 6 semanas e 30 mg de quercetina / kg de peso corporal / dia, porém os níveis de TGL e CT não melhoraram com o tratamento. Para Abo-Youssef [23] um excesso de ingestão de frutose pode sobrecarregar o fígado e modificar a via de absorção de glicose e metabolismo, levando à síntese de TGL e lipogênese. Aparentemente, a utilização da quercetina (microencapsulada ou não) para melhora do perfil lipídico é um assunto com debate em aberto. Em relação a atividade de enzimas que indicam lesão hepática (mais especificamente a AST), embora tenha ocorrido diferença significativa entre o grupo RP e o grupo MCIN, este não é um resultado clinicamente relevante. Arias et al. [31] não encontraram diferenças significativas nas transaminases séricas entre os grupos experimentais. Em nosso estudo, também não foi observado diferenças significantes nos parâmetros creatinina e ácido úrico. Abo-Youssef [23] encontrou em seu estudo um aumento significativo na creatinina e ácido úrico em comparação ao controle, e também observou que quercetina (50 mg/kg) reduziu os níveis séricos destes biomarcadores. De acordo com este mesmo autor, esses resultados refletem em uma possível disfunção renal ou perda na taxa de filtração glomerular em ratos alimentados com frutose e que a hiperinsulinemia pode elevar os níveis de ácido úrico no soro pela reabsorção de urato e reduzindo a excreção deste pelos rins.

Quanto ao peso dos animais, o peso corporal inicial dos animais nos vários grupos não foi diferente estatisticamente. No final do estudo, o peso corporal médio dos animais no grupo RP foi maior que os demais grupos. Provavelmente, isso foi

devido ao valor calórico da dieta de frutose, que era maior em comparação com a dieta padrão. Mathur et al. [32] encontraram em seu estudo que o peso corporal no grupo controle era maior que os animais que receberam frutose (15% p/v) durante 12 semanas. No estudo de Arias et al. [31], a quercetina não causou redução significativa no peso corporal. Esses estudos corroboram nossos resultados. Nayak et al. [27] encontraram um aumento significativo no peso corporal (1,25 vezes) em comparação com ratos controle, porém a quercetina não melhorou esse parâmetro. Ajiroye et al. [20]. Utilizaram ração com 60% de frutose por 9 semanas e observaram que esses animais (Wistar) apresentaram um aumento significativo do peso corporal quando comparado aos animais controle.

Em relação ao peso do fígado dos animais, não houve diferença significativa, porém o peso relativo do fígado foi maior em todos os grupos que receberam a frutose, sendo apenas significativa nos grupos TW, MCIN, QMC10 e QMC30 quando comparado ao grupo RP. Embora o fígado dos animais que receberam frutose estejam aumentados, os níveis de AST e ALT mostram que esses animais não tiveram a função hepática comprometida.

CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho mostraram que a quercetina microencapsulada pode ser um adjuvante farmacológico interessante para o tratamento do diabetes tipo 2, uma vez que verificamos o reestabelecimento dos níveis de glicogênio no fígado de ratos alimentados com frutose a 66% e tratados com quercetina 30 mg – 100 mg, e diminuição na formação de LOOH em nível tecidual tratado com quercetina 100 mg.

REFERÊNCIAS

- [1] DEVENDRA, D.; LIU, E.; EISENBARTH, G. S. Type 1 diabetes: recent developments. **British Medical Journal**. (2004) 750 - 754.
- [2] VINAYAGAM, R.; XU, B. Antidiabetic properties of dietary flavonoids: a cellular mechanism review. **Nutrition & Metabolism**. (2015) 12 - 60.
- [3] BASCIANO, H.; FEDERICO, L.; ADELI, K. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. **Nutrition & metabolism**. (2005)
- [4] VOS, M. B.; LAVINE, J. E. Dietary fructose in nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**. (2013) 2525–2531.
- [5] DELBOSC, S. et al. Involvement of oxidative stress and NADPH oxidase activation in the development of cardiovascular complications in a model of insulin resistance, the fructose-fed rat. **Atherosclerosis**. (2005) 43–49.
- [6] KOSURU, R.; SINGH, S. Pterostilbene ameliorates insulin sensitivity, glycemic control and oxidative stress in fructose-fed diabetic rats. **Life Sciences**. (2017) 112–121
- [7] ALAM, M. M.; MEERZA, D.; NASEEM, I. Protective effect of quercetin on hyperglycemia, oxidative stress and DNA damage in alloxan induced type 2 diabetic mice. **Life Sciences**. (2014) 8–14.
- [8] BARACAT, M. M. et al. Microcapsule Processing in a Spouted Bed. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**. (2004) 134–141.
- [9] LOWRY, O. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**. (1951) 265–275.
- [10] MILLER, G. L. Protein Determination of large Numbers of Samples. **Analytical Chemistry**. (1959) 964 - 964.
- [11] REPETTO, M. et al. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. **Clinica chimica acta**. (1996) 107–117.
- [12] ELLMAN, G. L. Tissue Sulphydryl Groups. **Archives of biochemistry and biophysics**. (1959) 70–77.

- [13] FRANCIK, R. et al. Aronia melanocarpa treatment and antioxidant status in selected tissues in wistar rats. **BioMed Research International**. (2014).
- [14] HANASAND, M. et al. Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. **Clinica Chimica Acta**. (2012) 901–906.
- [15] FLECHA, G. B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. **Free Radical Biology & Medicine**. (1991) 93–100.
- [16] RICHTER, R. J.; JARVIK, G. P.; FURLONG, C. E. Determination of paraoxonase 1 status without the use of use of toxic organophosphate substrates. **Circ. Cardiovasc. Genet**. (2008) 147–152.
- [17] NAVARRO-GONZÁLVEZ, J. A.; GARCÍA-BENAYAS, C.; ARENAS, J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. **Clinical Chemistry**. (1998) 679–681.
- [18] KANNAPPAN, S.; ANURADHA, C. V. Naringenin enhances insulin-stimulated tyrosine phosphorylation and improves the cellular actions of insulin in a dietary model of metabolic syndrome. **European Journal of Nutrition**. (2010) 101–109.
- [19] EID, H. M. et al. The molecular basis of the antidiabetic action of quercetin in cultured skeletal muscle cells and hepatocytes. **Pharmacognosy magazine**. (2015) 74–81.
- [20] AJIBOYE, T. O. et al. Hibiscus sabdariffa calyx palliates insulin resistance, hyperglycemia, dyslipidemia and oxidative rout in fructose-induced metabolic syndrome rats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. (2015) 1522–1531.
- [21] MAHMOUD, M. F. et al. Quercetin Protects against Diabetes-Induced Exaggerated Vasoconstriction in Rats: Effect on Low Grade Inflammation. **PLoS ONE**. (2013).
- [22] RIVERA, L. et al. Quercetin ameliorates metabolic syndrome and improves the inflammatory status in obese Zucker rats. **Obesity**. (2008) 2081–2087.
- [23] ABO-YOUSSEF, A. M. Protective effect of rosiglitazone, quercetin, and their combination on fructose-induced metabolic syndrome in rats. **Indian Journal of Pharmacology**. (2015) 620–626.
- [24] COSKUN, O. et al. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. **Pharmacological research**. (2005) 117–123.
- [25] ANHÊ, G. F. et al. Quercetin decreases inflammatory response and increases insulin action in skeletal muscle of ob/ob mice and in L6 myotubes. **European Journal of Pharmacology**. (2012) 285–293.
- [26] PRIETO, M. A. V. et al. Catechin and quercetin attenuate adipose inflammation

in fructose-fed rats and in 3T3-L1 adipocytes. **Molecular Nutrition & Food Research.** (2015) 622-633.

[27] NAYAK, Y. et al. Antidiabetic activity of 3-hydroxyflavone analogues in high fructose fed insulin resistant rats. **EXCLI Journal.** (2014) 1055–1074.

[28] VEERAPUR, V. P. et al. Antidiabetic effect of *Dodonaea viscosa* (L). Lacq. aerial parts in high fructose-fed insulin resistant rats: A mechanism based study. **Indian Journal of Experimental Biology.** (2010) 800–810.

[29] PORTO, M. L. et al. Increased oxidative stress and apoptosis in peripheral blood mononuclear cells of fructose-fed rats. **Toxicology in Vitro.** (2015) 1977–1981.

[30] YAMAMOTO, Y.; OUE, E. Antihypertensive effect of quercetin in rats fed with a high-fat high-sucrose diet. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry.** (2014) 933–939.

[31] ARIAS, N. et al. Liver delipidating effect of a combination of resveratrol and quercetin in rats fed an obesogenic diet. **Journal of Physiology and Biochemistry.** (2015) 569–576.

[32] MATHUR, R. et al. *Psidium guajava* Linn. leaf extract affects hepatic glucose transporter-2 to attenuate early onset of insulin resistance consequent to high fructose intake: An experimental study. **Pharmacognosy research.** (2015) 166–175.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando que o DM2 pode ser evitado ou possa ocorrer a reversão de processos metabólicos que a mesma causa através de mudanças no estilo de vida ou hábitos alimentares, a quercetina microencapsulada pode ser uma alternativa interessante para o tratamento do DM2, uma vez que verificamos em nosso estudo a diminuição na formação de LOOH em nível tecidual de ratos alimentados com frutose 66% tratados com quercetina microencapsulada 100 mg e o reestabelecimento dos níveis de glicogênio no fígado tratados com quercetina microencapsulada 30 mg - 100 mg. Novos estudos devem ser realizados a fim de esclarecer possíveis mecanismos de ação em que a quercetina atua nesses parâmetros.

REFERÊNCIAS

ABO-YOUSSEF, A. M. Protective effect of rosiglitazone, quercetin, and their combination on fructose-induced metabolic syndrome in rats. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 47, p. 620–626, 2015.

AGUIRRE, L. et al. Beneficial Effects of Quercetin on Obesity and Diabetes. **The open nutraceuticals journal** n. 1, p. 189–198, 2011.

AJIBOYE, T. O. et al. Hibiscus sabdariffa calyx palliates insulin resistance, hyperglycemia, dyslipidemia and oxidative rout in fructose-induced metabolic syndrome rats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 5, p. 1522–1531, 2015.

ALAM, M. M.; MEERZA, D.; NASEEM, I. Protective effect of quercetin on hyperglycemia, oxidative stress and DNA damage in alloxan induced type 2 diabetic mice. **Life Sciences**, v. 109, n. 1, p. 8–14, 2014.

ANHÊ, G. F. et al. Quercetin decreases inflammatory response and increases insulin action in skeletal muscle of ob/ob mice and in L6 myotubes. **European Journal of Pharmacology**, v. 689, n. 1–3, p. 285–293, 2012.

ARIAS, N. et al. Liver delipidating effect of a combination of resveratrol and quercetin in rats fed an obesogenic diet. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 71, n. 3, p. 569–576, 2015.

AZEVEDO, M. F. et al. Ursolic Acid and Luteolin-7-Glucoside Improve Lipid Profiles and Increase Liver Glycogen Content through Glycogen Synthase Kinase-3. **Phytotherapy research**, v. 24, p. 2201-224, 2010.

BAGUL, P. K. et al. Attenuation of insulin resistance, metabolic syndrome and hepatic oxidative stress by resveratrol in fructose-fed rats. **Pharmacological research**, v. 66, p. 260–268, 2012.

BARACAT, M. M. et al. Microcapsule Processing in a Spouted Bed. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 82, p. 134–141, 2004.

BASCIANO, H.; FEDERICO, L.; ADELI, K. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. **Nutrition & metabolism**, v. 2, 2005.

CADE, W. T. Diabetes-related microvascular and macrovascular diseases in the physical therapy setting. **Physical therapy**, v. 88, n. 11, p. 1322–1335, 2008.

CHEN, S. et al. Therapeutic Effects of Quercetin on Inflammation, Obesity, and Type 2 Diabetes. **Mediators of inflammation**, v. 2016, 2016.

COSKUN, O. et al. Quercetin , a flavonoid antioxidant , prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. **Pharmacological research** v. 51, p. 117–123, 2005.

DEBOER, M. D. Obesity, systemic inflammation, and increased risk for cardiovascular disease and diabetes among adolescents: A need for screening tools to target interventions. **Nutrition**, v. 29, n. 2, p. 379–386, 2013.

DELBOSC, S. et al. Involvement of oxidative stress and NADPH oxidase activation in the development of cardiovascular complications in a model of insulin resistance, the fructose-fed rat. **Atherosclerosis**, v. 179, p. 43–49, 2005.

EID, H. M. et al. The molecular basis of the antidiabetic action of quercetin in cultured skeletal muscle cells and hepatocytes. **Pharmacognosy magazine**, v. 11, n. 41, p. 74–81, 2015.

ELBE, H. et al. Melatonin, quercetin and resveratrol attenuates oxidative hepatocellular injury in streptozotocin-induced diabetic rats. **Human and Experimental Toxicology**, v. 34, n. 9, p. 859–868, 2015.

ELLMAN, G. L. Tissue Sulphydryl Groups. **Archives of biochemistry and biophysics**, p. 70–77, 1959.

FELICE, J. I. et al. Effects of a metabolic syndrome induced by a fructose-rich diet on bone metabolism in rats. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 63, p. 296–305, 2014.

FLECHA, G. B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 10, n. 4, p. 93–100, 1991.

FRANCIK, R. et al. Aronia melanocarpa treatment and antioxidant status in selected tissues in wistar rats. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

GUAZELLI, C. F. S. et al. Quercetin-Loaded Microcapsules Ameliorate Experimental Colitis in Mice by Anti-inflammatory and Antioxidant Mechanisms. **Journal of Natural Products**, v. 76, p. 200–208, 2013.

GUGLER, R.; LESCHIK, M.; DENGLER, H. J. Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 9, n. 2–3, p. 229–234, 1975.

HÄDRICH, G. et al. Lipid-based nanocarrier for quercetin delivery: system characterization and molecular interactions studies. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 42, n. 7, p. 1165–1173, 2016.

HANASAND, M. et al. Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. **Clinica Chimica Acta**, v. 413, n. 9–10, p. 901–906, 2012.

HAVEL, P. J. Dietary Fructose: Implications for Dysregulation of Energy Homeostasis and Lipid/Carbohydrate Metabolism. **Nutrition Reviews**, v. 63, n. 5, p. 133–157, 2005.

HOLLMAN, P. C. H. et al. Bioavailability of the dietary antioxidant flavonol quercetin in man. **Cancer Letters**, v. 114, n. 1–2, p. 139–140, 1997.

HU, J. et al. The effects of natural flavonoids on lipoxygenase-mediated oxidation of compounds with a benzene ring structure - A new possible mechanism of flavonoid anti-chemical carcinogenesis and other toxicities. **International Journal of Toxicology**, v. 25, n. 4, p. 295–301, 2006.

HUTCHESON, R.; ROCIC, P. The metabolic syndrome, oxidative stress, environment, and cardiovascular disease: The great exploration. **Experimental Diabetes Research**, v. 2012, 2012.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF DIABETES ATLAS Eighth edition 2017**.

JEONG, S. M. et al. Quercetin ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia and improves antioxidant status in type 2 diabetic db/db mice. **Nutrition Research and Practice**, v. 6, n. 3, p. 201–207, 2012.

KANNAPPAN, S.; ANURADHA, C. V. Naringenin enhances insulin-stimulated tyrosine phosphorylation and improves the cellular actions of insulin in a dietary model of metabolic syndrome. **European Journal of Nutrition**, v. 49, n. 2, p. 101–109, 2010.

KHALED, K. A.; EL-SAYED, Y. M.; AL-HADIYA, B. M. Disposition of the flavonoid quercetin in rats after single intravenous and oral doses. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 29, n. 4, p. 397–403, 2003.

KIM, Y. A.; KEOGH, J. B.; CLIFTON, P. M. Polyphenols and glycemic control. **Nutrients**, v. 8, n. 1, 2016.

KOSURU, R.; SINGH, S. Pterostilbene ameliorates insulin sensitivity, glycemic control and oxidative stress in fructose-fed diabetic rats. **Life Sciences**, v. 182, p. 112–121, 2017.

KOVAC, R. et al. Acrylamide alters glycogen content and enzyme activities in the liver of juvenile rat. **Acta Histochemica**, v. 117, n. 8, p. 712–717, 2015.

LOWRY, O. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

MAHMOUD, M. F. et al. Quercetin Protects against Diabetes-Induced Exaggerated Vasoconstriction in Rats: Effect on Low Grade Inflammation. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, 2013.

MALLAIAH, P. et al. Preventive effect of Phyllanthus amarus on high fructose diet induced renal damage in male wistar rats. **Journal of Experimental and Applied Animal Science**, v. 1, n. 2, p. 186–198, 2014.

MARTINS, E. et al. Oil encapsulation techniques using alginate as encapsulating agent: applications and drawbacks. **Journal of Microencapsulation**, v. 34, n. 8, p. 754-771, 2017.

MATHUR, R. et al. Psidium guajava Linn. leaf extract affects hepatic glucose transporter-2 to attenuate early onset of insulin resistance consequent to high

fructose intake: An experimental study. **Pharmacognosy research**, v. 7, n. 2, p. 166–75, 2015.

MILLER, G. L. Protein Determination of large Numbers of Samples. **Analytical Chemistry**, p. 964 - 964, 1959.

NAVARRO-GONZÁLVZ, J. A.; GARCÍA-BENAYAS, C.; ARENAS, J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 3, p. 679–681, 1998.

NAYAK, Y. et al. Antidiabetic activity of 3-hydroxyflavone analogues in high fructose fed insulin resistant rats. **EXCLI Journal**, v. 13, p. 1055–1074, 2014.

NELSON, David L.; COX, Michael M.; **Lehninger: Princípios de Bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

OSTROW, V. et al. Association between oxidative stress and masked hypertension in a multi-ethnic population of obese children and adolescents. **The Journal of Pediatrics**, v. 158, p. 628–633, 2011.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiological reviews**, v. 87, p. 315–424, 2007.

PADIYA, R. et al. Garlic improves insulin sensitivity and associated metabolic syndromes in fructose fed rats. **Nutrition & metabolism**, v. 8, n. 53, 2011.

PATEL, J.; IYER, A.; BROWN, L. Evaluation of the chronic complications of diabetes in a high fructose diet in rats. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 46, n. 1, p. 66–72, 2009.

PEREIRA, C. D. et al. Relevance of a Hypersaline Sodium-Rich Naturally Sparkling Mineral Water to the Protection against Metabolic Syndrome Induction in Fructose-Fed Sprague-Dawley Rats: A Biochemical, Metabolic, and Redox Approach. **International journal of endocrinology**, v. 2014, 2014.

PEZZINI, B. R.; SILVA, M. A. S.; FERRAZ, H. G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, 2007.

PORTO, M. L. et al. Increased oxidative stress and apoptosis in peripheral blood mononuclear cells of fructose-fed rats. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 8, p. 1977–1981, 2015.

POSTIC, C.; DENTIN, R.; GIRARD, J. Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis. **Diabetes & Metabolism**, v. 30, n. 5, p. 398–408, 2004.

PRIETO, M. A. V. et al. Catechin and quercetin attenuate adipose inflammation in fructose-fed rats and in 3T3-L1 adipocytes. **Molecular Nutrition & Food Research**. v. 59, n. 4, p. 622-633, 2015.

RAJENDRAN, P. et al. Antioxidants and human diseases. **Clinica Chimica Acta**, v. 436, p. 332–347, 2014.

REN, D. et al. Chemical composition of *Pleurotus eryngii* polysaccharides and their inhibitory effects on high-fructose diet-induced insulin resistance and oxidative stress in mice. **Food & function**, v. 5, n. 10, 2014.

REPETTO, M. et al. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. **Clinica chimica acta**, v. 255, n. 2, p. 107–117, 1996.

RICHTER, R. J.; JARVIK, G. P.; FURLONG, C. E. Determination of paraoxonase 1 status without the use of use of toxic organophosphate substrates. **Circ. Cardiovasc. Genet.**, v. 1, n. 2, p. 147–152, 2008.

RIVERA, L. et al. Quercetin ameliorates metabolic syndrome and improves the inflammatory status in obese Zucker rats. **Obesity**, v. 16, n. 9, p. 2081–2087, 2008.

RUTLEDGE, A. C.; ADELI, K. Fructose and the Metabolic Syndrome: Pathophysiology and Molecular Mechanisms. **Nutrition Reviews** p. 13–23, 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes Sociedade Brasileira de Diabetes**.(2015-2016).

STEWART, L. K. et al. Quercetin transiently increases energy expenditure but persistently decreases circulating markers of inflammation in C57BL / 6J mice fed a high-fat diet. v. 57, n. **Metabolism: clinical and experimental**, p. 39–46, 2008.

TANIGUCHI, C. M.; EMANUELLI, B.; KAHN, C. R. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v.7, p. 85–96, 2006.

TRAN, L. T.; YUEN, V. G.; MCNEILL, J. H. The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 332, p. 145–159, 2009.

VEERAPUR, V. P. et al. Antidiabetic effect of *Dodonaea viscosa* (L). Lacq. aerial parts in high fructose-fed insulin resistant rats: A mechanism based study. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 48, n. 8, p. 800–810, 2010.

VINAYAGAM, R.; XU, B. Antidiabetic properties of dietary flavonoids: a cellular mechanism review. **Nutrition & Metabolism**, p. 12–60, 2015.

VOS, M. B.; LAVINE, J. E. Dietary fructose in nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 57, p. 2525–2531, 2013.

YAMAMOTO, Y.; OUE, E. Antihypertensive effect of quercetin in rats fed with a high-fat high-sucrose diet. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 70, n. 4, p. 933–939, 2014.

ZHANG, Q. Y. et al. Quercetin inhibits AMPK/TXNIP activation and reduces inflammatory lesions to improve insulin signaling defect in the hypothalamus of high fructose-fed rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25, n. 4, p. 420–428, 2014.

ANEXO

ANEXO I – TERMO DE APROVAÇÃO DA PESQUISA



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA N° 026/2013

Londrina, 20 de Fevereiro de 2013.

Prezado Pesquisador,

A CEUA/UEL reunida em 15 de Janeiro de 2013 avaliou o projeto de pesquisa intitulado "Avaliação dos efeitos do uso de microcápsulas de quercetina em ratos com síndrome metabólica induzida por frutose" processo CEUA n° 31855.2012.76, pesquisa do Centro de Ciências da Saúde desenvolvido sob sua responsabilidade. O projeto está aprovado para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 160 ratos machos Wistar com peso entre 125-175 g provenientes do Biotério do Centro de Ciências da Saúde. O projeto tem como objetivo investigar o efeito terapêutico da microcápsula de quercetina no modelo experimental de síndrome metabólica induzida por ração a base de frutose. Para isto os animais serão divididos em 8 grupos: G1 animal controle tratado com ração padrão. G2 animais com síndrome metabólica induzida pelo fornecimento de uma ração com 66% de frutose por 8-8 semanas, tratados com água. G3 síndrome metabólica tratados com salina, tween 80 e água. G4 Síndrome metabólica tratados com quercetina (100 mg/kg dissolvida em tween). G5 síndrome metabólica tratados com microcápsula inerte. G6 síndrome metabólica tratados com microcápsula de quercetina (10 mg/kg). G7 síndrome metabólica tratados com microcápsula de quercetina (30 mg/kg). G8 síndrome tratados com microcápsulas de quercetina (100 mg/kg). O tratamento será realizado por gavagem durante 4 semanas, e a glicemia será avaliada no primeiro dia de experimento e a cada 15 dias para acompanhamento. Ao término dos tratamentos, os ratos serão eutanasiados com éter etílico e o sangue será coletado para avaliação de parâmetros inflamatórios (função renal, hepática, perfil lipídico, insulina e PCR), estresse oxidativo (Superóxido Desmutase, Catalase, Sistema Glutaciona, Hidroperóxidos lipídicos plasmáticos, Metabólitos do óxido nítrico plasmático, Capacidade antioxidante total, produtos avançados de oxidação proteica, níveis de malondialdeído plasmático). Os órgãos serão retirados para análise histológica e avaliação da atividade da Mieloperoxidase, Glutaciona Peroxidase tecidual, Glutaciona redutase tecidual, Superóxido dismutase tecidual e Catalase tecidual. O projeto está previsto para ser desenvolvido em 12 meses.

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações. Sem mais para o momento, subscrevo-me. Cordialmente,

Waldiceu Ap. Vain Junior
Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Vain Junior
Coordenador da CEUA/UEL

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa

Coordenador do Projeto

Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas

Centro de Ciências da Saúde

Com cópia para Sra Egle Maria de Sousa (Chefe da DCA/PROPPG), Diretor do Biotério do Centro de Ciências da Saúde e Diretora do Centro de Ciências da Saúde.

Universidade Estadual de Londrina - Caixa Postal 6001 - Londrina, Paraná - CEP 86051-900 - Fone: (51) 3363-4000 - Fax: (51) 3363-4001 - E-mail: cep@uel.br
Hospital Universidade - Centro de Ciências da Saúde - Rua Nelson de Souza, 10 - Vila Operária - Caixa Postal 6001 - Londrina, Paraná - Fone: (51) 3363-4000 - Fax: (51) 3363-4001 - CEP 86051-900