



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO E SAÚDE

PRISCILA MURUCCI COELHO

**INFLUÊNCIA DO CONSUMO DE FARINHA DE CASCA E SEMENTE DE LICHIA
(*LitchiChinensis* Sonn) SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO E PERFIL
CARDIOMETABÓLICO DE RATOS OBESOS INDUZIDOS AO DIABETES**

VITÓRIA– ES

2018

PRISCILA MURUCCI COELHO

**INFLUÊNCIA DO CONSUMO DE FARINHA DE CASCA E SEMENTE DE LICHIA
(*LitchiChinensis* Sonn) SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO E PERFIL
CARDIOMETABÓLICO DE RATOS OBESOS INDUZIDOS AO DIABETES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do título de Mestre em Nutrição e Saúde.

Orientador: Profa. Dra. Ana Paula Lima Leopoldo

VITÓRIA – ES

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Espírito Santo, ES, Brasil)

C672i Coelho, Priscila Murucci, 1987 -
Influência do consumo de farinha de casca e semente de lichia (*litchi chinensis sonn*) sobre o estresse oxidativo e perfil cardiometabólico de ratos obesos induzidos ao diabetes / Priscila Murucci Coelho – 2018.
90 f. : il.

Orientador: Ana Paula Lima Leopoldo.
Coorientador: André Soares Leopoldo.

Dissertação (Mestrado em Nutrição e Saúde) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Diabetes Mellitus. 2. Obesidade. 3. Estresse oxidativo. 4. Litchi. I.
Leopoldo, Ana Paula Lima. II. Leopoldo, André Soares. III. Universidade
Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

PRISCILA MURUCCI COELHO

**INFLUÊNCIA DO CONSUMO DE FARINHA DE CASCA E SEMENTE DE LICHIA
(*LitchiChinensis* Sonn) SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO E PERFIL
CARDIOMETABÓLICO DE RATOS OBESOS INDUZIDOS AO DIABETES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do título de Mestre em Nutrição e Saúde.

Aprovada em ____ de _____ de 2017

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Paula Lima Leopoldo
Orientadora

Profa. Dra. Dra. Márcia Regina Holanda da Cunha
Membro Externo

Prof. Dr. Fabiano Kenji Haraguchi
Membro Interno

Prof. Dr. Lucas Guimarães Ferreira
Suplente Interno

Prof. Dr. Rodrigo Luiz Vancinni
Suplente Externo

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha família, vocês são minha fortaleza. A minha mãe, Maria Murucci Coelho, a mulher mais forte e guerreira que eu conheço, sempre segurou firme a minha mão, me ensinou a ser quem eu sou, me ensinou a ser justa e buscar por justiça. Ao meu pai, Valter Coelho, que me ensinou a ser independente e que tenho que trabalhar para conseguir o que quero, pois, nada nunca vem de graça. Aos meus irmãos que me incentivaram a estudar e estão sempre comigo. Minha que irmã, Tatiane Coelho, que posso contar em todos os momentos, que mesmo sem concordar comigo me apoia. Ao meu irmão, Gilvan Coelho, por seu cuidado e carinho. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo seu cuidado com minha vida. Só ele sabe as dificuldades que enfrentei. Me deu força para continuar quando eu pensei em que não havia mais condições. Obrigada meu Deus, por mesmo sem merecer, o Senhor proporcionar tantas vitórias.

A minha família, pois se estou finalizando o mestrado é graças ao apoio deles. Pela compreensão por eu não poder estar presente da forma que eu queria, em momentos essenciais. A todo o apoio para que eu estudasse e sempre fosse atrás dos meus sonhos, por sempre estarem comigo. Ao meu cunhado Arturo pelas conversas e conselhos.

A Minha orientadora, Ana Paula Lima Leopoldo, que acreditou em mim e investiu seu tempo para que conseguíssemos chegar ao final desse mestrado. Agradeço a Deus por ter colocado você na minha vida, pela oportunidade do aprendizado tanto acadêmico como de vida. Obrigada professora, pela paciência, confiança e parceria.

Ao professor André Soares Leopoldo, por toda apoio, confiança e paciência. Muito obrigada por todos os ensinamentos, por ter dedicado seu tempo para que esse projeto fosse realizado da melhor forma possível.

A minha família de coração, que me adotaram e cuidaram de mim todo esse tempo Leda Suely Almeida e minhas irmãs de coração Leandra Almeida e Livia Almeida e a prima Carol. Obrigada por cuidarem de mim, por me darem apoio nos momentos em que a vida pessoal estava desabando, por serem essas pessoas maravilhosas, sem vocês tudo seria mais difícil.

A toda a família de Lais Santos e Jeangelis Santos que me apoiaram e me acolheram no início dessa caminhada, vocês foram extremamente importantes nessa caminhada.

A minha companheira de projeto Luiza Simmer, que me ajudou e esteve presente no momento mais difícil desse projeto. Obrigada pela parceria e por enfrentar comigo esse momento difícil.

Ao Rogério que dedicou seu tempo a nos ajudar no cuidado com os animais, muito obrigada por sua ajuda, foi de extrema importância.

Ao Lucas por atenção e dedicação durante a eutanásia dos animais. Muito obrigada pela sua paciência e força de vontade para que as coisas saíssem perfeitas.

A Priscilla Spadeto, muito obrigada por você ser essa pessoa maravilhosa, que pensa nas outras pessoas e concede tanto do seu tempo para ajudar ao próximo.

Ao meu Amigo Wagner Muller, obrigada por toda ajuda e paciência, pelos chocolates nos momentos em que eu estava nervosa e conselhos quando eu estava triste.

A amiga improvável, Daniele, que com toda sua doideira ganhou meu coração, obrigada por não me abandonar quando eu desabei e precisava de alguém para me escutar e animar.

Aos colegas e amigos do LAFIBE, Amanda, Andressa, Andrecinha, Catarina, Jean, Joctan, Taynan, Daniel, Izabor, Maisa, Leonardocada um do seu jeito contribuiu para que esse projeto chegasse ao final.

Aos meus amigos e companheiros de mestrado Arthur e Larissa, obrigada por me ouvirem, pelos momentos juntos, vocês foram fundamentais nessa caminhada.

A Amiga Jéssika Butcovsky por disponibilizar seu tempo e seu apoio para que esse trabalho chegasse ao final.

Ao Alexandre Barroso Melo, pela ajuda para descascar as lichias e pelo ensino da técnica de Cardiomiócito isolado. Obrigada pelo tempo disponibilizado.

Ao laboratório LabMAP, UFES – Alegre ES, por conceder o equipamento para a secagem das lichias e ao amigo Abel Fonseca por não ter medido esforços para me ajudar, muito obrigada.

Ao laboratório de Triagem Biológica de Produtos Naturais e ao professor Rodrigo Rezende Kitagawa e ao aluno Mateus Fregona Pezzin pela ajuda.

Agradeço ao Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER) e ao agrônomo César pelo apoio na aquisição das frutas.

Agradeço a professora e Kamila e sua aluna Jéssica e a UNIPEX (Unidade de Pesquisa Experimental) da Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB, Universidade Estadual Paulista – Unesp. Pela realização das análises de estresse oxidativo.

Agradeço a todas as pessoas que conheci durante esse mestrado e que me fizeram crescer como pessoa e profissional. Aos amigos que fiz e aos caminhos que percorri que em alguns momentos foram exaltivos e me feriram emocionalmente, mas que foram essenciais para eu aprender a ser uma pessoa melhor.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho.

Esperei com paciência no SENHOR, e ele se inclinou para mim, e ouviu o meu clamor.

Salmos 40:1

Não ajunteis tesouros na terra, onde a traça e a ferrugem tudo consomem, e onde os ladrões minam e roubam;

Mas ajuntai tesouros no céu, onde nem a traça nem a ferrugem consomem, e onde os ladrões não minam nem roubam.

Porque onde estiver o vosso tesouro, aí estará também o vosso coração.

Mateus 6:19-21

RESUMO

Introdução: O sobrepeso e obesidade são importantes fatores de risco para o desenvolvimento de Diabetes tipo 2. O excesso de peso associado ao Diabetes Mellitus tipo 2 promove alto risco para desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Apesar da literatura sugerir que o estresse oxidativo (EO) está relacionado à cardiomiopatia diabética, o mecanismo de geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) ainda não é bem compreendida. Assim, alimentos com alto nível de compostos antioxidantes podem ser benéficos na prevenção e/ou reversão do EO em obesos diabéticos. Estudos têm demonstrado que tanto o extrato quanto as farinhas da casca e semente de lichia são ricas em compostos fenólicos antioxidantes. **Objetivo:** Avaliar o efeito do consumo de farinhas da casca e semente de lichia sobre o estresse oxidativo, perfil metabólico e função contrátil de cardiomiócitos de ratos obesos induzidos ao diabetes. **Metodologia:** Ratos *Wistar* foram submetidos à condição de obesidade por dieta hiperlipídica, e posteriormente, induzidos ao Diabetes Mellitus tipo 2. Em seguida foram randomizados nos grupos Obeso (Ob, n=10), Obeso diabético (ObD, n=8), Obeso diabético farinha da casca (ObDFC, n=10) e Obeso diabético farinha da semente (ObDFS, n=10). Foram realizadas análises de perfil nutricional, glicêmico, determinação do teor de água do pulmão e fígado, peso total do pâncreas e parâmetros de EO sérico. Além disso, o peso total do coração e suas respectivas relações com o comprimento da tíbia foram mensurados. A análise da função contrátil foi realizada por meio da técnica de cardiomiócito isolado. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão ou mediana \pm intervalo interquartil. As comparações foram realizadas por meio de teste de *Student's t* e ANOVA *uma via*, complementada com teste *post-hoc* de Bonferroni e Dunn's. O nível de significância adotado foi de 5%. **Resultados:** O grupo ObD apresentou menor peso corporal, depósitos de gordura e peso do pâncreas em relação ao Ob, em contrapartida houve elevação dos níveis de proteína carbonilada e superóxido dismutase (SOD). Considerando a função contrátil de cardiomiócitos, o ObD apresentou maior concentração de cálcio (Ca^{2+}) sistólico com elevação percentual do encurtamento, no entanto, houve maior tempo até 50% do pico de encurtamento. Em contrapartida, considerando os parâmetros diastólicos, embora os ratos ObD apresentaram maior velocidade máxima de relaxamento celular, houve elevação dos níveis de Ca^{2+} diastólico e maior tempo até 50% da recaptura de Ca^{2+} . Os tratamentos com as farinhas da casca e semente de lichia não foram capazes de alterar parâmetros corporais, morfológicos e biomarcadores de EO em animais ObD. O grupo ObDFC desencadeou elevação do tempo até 50% do pico de encurtamento comparado ao grupo ObD, sem alterações nos parâmetros contráteis de relaxamento. No entanto, o grupo ObDFS apresentou redução do percentual e velocidade máxima de encurtamento, com consequente aumento do tempo até 50% do pico de encurtamento comparado ao grupo ObD. Embora os níveis de Ca^{2+} diastólico sejam inferiores nos ratos ObDFS, não houve diferença significativa ($p=0,056$). Entre os tratamentos ObDFC e ObDFS, os resultados apontam que o grupo ObDFS apresentou menor velocidade máxima de relaxamento, concomitante ao maior tempo até 50% de relaxamento. **Conclusão:** As farinhas de casca e semente de lichia não revertem o dano oxidativo e o prejuízo contrátil em cardiomiócitos de ratos obesos induzidos ao diabetes. Ademais, a farinha da semente de lichia acentuou a disfunção contrátil sem modificações na cinética de Ca^{2+} intracelular.

Palavras-chave: Diabetes Obesidade. Estresse oxidativo. Farinha da casca de lichia. Farinha da semente de lichia. Função contrátil.

ABSTRACT

Introduction: Overweight and obesity are important risk factors for the development of type 2 diabetes. Excess weight associated to type 2 diabetes mellitus promotes high risk for the development of cardiovascular diseases. Although the literature suggests that oxidative stress is related to diabetic cardiomyopathy, the mechanism of generation of reactive oxygen species is still not well understood. Thus, foods with a high level of antioxidant compounds may be beneficial in preventing and/or reversing OE in obese diabetic. Studies have shown that both the extract and flour of lychee peel and seed are rich in phenolic antioxidant compounds.

Objective: To evaluate the flour consumption of seed and peel lychee on oxidative stress, metabolic and cardiomyocyte contractile function in diabetic obese rats. **Methodology:** Male *Wistar* rats were submitted to obesity condition by high-fat diet, and subsequently induced to type 2 Diabetes Mellitus. Then, the animals were randomized into groups: Obese (Ob, n=10), Diabetic obese (ObD, n=8), Diabetic obese treated with lychee peel flour (ObDPF, n=10) and Diabetic obese treated with lychee seed flour (ObDSF, n=10). Nutritional and glycemic profiles, water content of lung and liver, pancreas weight, and serum oxidative stress parameters were performed. Furthermore, the total weight of the heart and its relation to tibia length were analyzed. Cardiomyocytes contractile function was assayed. Data were expressed as mean \pm standard deviation or median \pm interquartile range. The comparisons were performed by student's t test or one-way ANOVA and complemented by Bonferroni and Dunn's *post hoc* tests. The level of significance was 5%. **Results:** ObD presented lower body weight, fat pads and pancreas weight in relation to Ob, on the other hand, there was enhanced of protein carbonylation and superoxide dismutase levels. Regarding the cardiomyocyte contractile function, ObD presented higher systolic Ca^{2+} with percentual elevation of shortening, in contrast, there was greater time to peak 50% of shortening. On the other hand, although ObD rats presented higher maximal velocity of relaxation, there was elevation of diastolic Ca^{2+} levels and greater time to peak 50% of recapture. The treatments with flour of seed and peel lychee did not able to change body and morfologic parameters, and biomarkers of oxidative stress in ObD. The ObDPF triggered elevation time to peak 50% of shortening compared to ObD rats, without modifications in relaxation contractile parameters. However, the ObDSF presented reduction of percentual and maximal velocity of shortening with consequently increased in time to peak 50% of shortening in relation to ObD. Although diastolic Ca^{2+} levels were lower in ObDFS rats, there was no significant difference ($p = 0.056$). -Between the ObDSF and ObDPF treatments, results showed that ObDSF presented lower maximal velocity of relaxation, concomitant to higher time to peak 50% of recapture. **Conclusion:** The flour of seed and peel lychee did not revert the oxidative damage and the contractile injury in cardiomyocytes of obese rats induced to diabetes. In addition, the flour of seed lychee accentuated the contractile dysfunction without changes in intracellular Ca^{2+} handling.

Keywords: Diabetes. Obesity. Oxidative stress. Lychee peel flour. Lychee seed flour. Contractile function

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA - Análise de variância	HEPES - N-2-hidroxietil Piperazina N-2-Etano Sulfônico
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária	IA - Ingestão alimentar
C - Controle	IC - Ingestão calórica
Cálcio - Ca ⁺²	IDF - International Diabetes Federation
CFT - Conteúdo de fenóis totais	MDA - Malondialdeído
Coenzima Q - Ubiquinona	Milli-Q - Água ultrapura
Complexo I - NADH-ubiquinone oxidoreductase	NCX - Trocador Na ⁺ /Ca ⁺²
Complexo II - Succinato desidrogenase	NO - óxido nítrico
Complexo III - Ubiquinol-citocromo c oxidoreductase	O₂⁻ - ânion superóxido
Complexo IV - Citocromo coxidase	Ob - Obeso
CS -Comprimento do sarcômero	ObD - Obeso diabético
DB - Digestion Buffer	ObDFC - Obeso diabético farinha da casca
DH - Dieta hiperlipídica	ObDFS - Obeso diabético farinha da semente
DH - Dieta hiperlipídica saturada	OH⁻ - hidroxila
DHFC -Dieta hiperlipídica farinha da casca	ONOO⁻ - peroxinitrito
DHFS -Dieta hiperlipídica farinha da semente.	PKA - Proteína quinase A
DNPH - Derivatizador 2,4-dinitrofenil-hidrazina	PLB - Fosfolambam
DP - dieta padrão	PN - Peso in natura
DP -Dieta padrão;	PS - ponto de separação
EA - Eficiência alimentar	PSE - Peso seco
EAG - Equivalente de ácido gálico	RCS - espécies reativas de cloro
EGTA - Ácido etileno glicol tetracético	RL - Radicais livres
EQ -Equivalente de quercetina	RNS - espécies reativas de nitrogênio
EROs - Espécies reativas de oxigênio	RS - Reticulo sarcoplasmático
FAO - Food and Agriculture Organization	SBD - Sociedade Brasileira de Diabetes
FC - Farinha da casca de lichia	SERCA - Ca ⁺² -ATPase do retículo sarcoplasmático
FMB - Faculdade de Medicina de Botucatu	SOD - superperóxido dismutase
FS - Farinha da semente de lichia	TBARS - Ácido tiobarbitúrico
GP - Ganho de peso	Unesp - Universidade Estadual Paulista
H₂O₂ - peróxido de hidrogênio	UNIPEX - Unidade de Pesquisa Experimental)
	WHO - World Health Organization

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Percentual de calorias proveniente dos macronutrientes e densidade calórica presente nas dietas.....	34
Quadro 2. Composição de macronutrientes e fibras presentes em 100g de dieta. ...	35
Quadro 3. Doseamento de polifenóis totais e flavonóides nas farinhas da casca e semente de lichia.....	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação de átomo com elétrons distribuídos em suas camadas eletrônicas, emparelhados e desemparelhados.	24
Figura 2. Processo de formação de espécies reativas de oxigênio a partir do oxigênio molecular, adaptado de Volodymyr, 2014.	25
Figura 3. Cadeia respiratória e Processo de formação de EROs, adaptado de Poyton, Ball e Castello , 2009.....	26
Figura 4. Representação esquemática do critério utilizado para composição dos grupos controle e obeso. Adaptado de LIMA-LEOPOLDO, 2010.....	31
Figura 5. Representação dos grupos experimentais.	32
Figura 6. Representação do protocolo experimental.	33
Figura 7. Representação dos pontos de mensuração da imagem dos miócitos cardíacos.....	40
Figura 8. Representação esquemática do encurtamento de cardiomiócito isolado e dos respectivos parâmetros da contração celular..	40
Figura 9. Evolução de peso corporal no período de indução à obesidade	44
Figura 10. Glicemia dos grupos nos momentos pré e pós aplicação da streptozotocina	46
Figura 11. Evolução de peso corporal no período de indução e exposição à obesidade.	47
Figura 12. Parâmetros de estresse oxidativo séricos entre animais obesos e obesos diabéticos..	50
Figura 13. Parâmetros funcionais de contratilidade de cardiomiócitos isolados estimulados a 1 Hz de animais obesos e obesos diabéticos.....	51
Figura 14. Parâmetros da cinética intracelular de Ca^{2+} de cardiomiócitos isolados estimulados a 1 Hz de animais obesos e obesos diabéticos.....	53
Figura 15. Evolução de peso corporal no período de tratamento com as farinhas da casca e semente de lichia.	55
Figura 16. Glicemia dos animais diabéticos tratados com farinhas da casca e semente de lichia..	56

Figura 17. Parâmetros de estresse oxidativo dos animais tratados com farinhas da casca e semente de lichia.	58
Figura 18. Parâmetros funcionais de contratilidade de cardiomiócitos isolados estimulados a 1 Hz de animais tratados com a farinha da casca e semente de lichia..	59
Figura 19. Parâmetros da cinética intracelular de Ca ²⁺ de cardiomiócitos isolados estimulados a 1 Hz de animais tratados com a farinha da casca e semente de lichia	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características nutricionais dos grupos nos períodos de indução e exposição à obesidade.	45
Tabela 2. Características nutricionais dos grupos experimentais.	48
Tabela 3. Características gerais dos grupos experimentais.....	48
Tabela 4. Parâmetros morfológicos.	49
Tabela 5. Percentual de umidade dos tecidos pulmonar e hepático.....	49
Tabela 6. Características nutricionais durante o período de tratamento.	55
Tabela 7. Características gerais durante o período de tratamento.	55
Tabela 8. Parâmetros morfológicos.	57
Tabela 9. Percentual de umidade dos tecidos pulmonar e hepático.	57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 ESTRESSE OXIDATIVO	23
2.2 DEFESA ANTIOXIDANTE	27
3 OBJETIVO	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL	30
4.1.1 Composição dos grupos e delineamento experimental	30
4.2 DIETAS EXPERIMENTAIS	33
4.2.1 Obtenção dos frutos e confecção das farinhas	33
4.2.2 Formulação e composição das dietas experimentais	33
4.2.3 Determinação de fenóis totais e flavonóides nas farinhas da casca e semente de lichia	35
4.3 AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL	36
4.3.1 Ingestão alimentar, ingestão calórica, eficiência alimentar	36
4.3.2 Avaliação da glicemia de jejum	37
4.4 ANÁLISES <i>PÓS-MORTEM</i>	37
4.4.1 Determinação do teor de água nos tecidos pulmonar e hepático ...	37
4.5 REMODELAÇÃO CARDÍACA	37
4.5.1 Estrutura do Coração <i>Post-mortem</i>	37
4.6 CARDIOMIÓCITO ISOLADO	38
4.6.1 Isolamento de cardiomiócito	38
4.6.2 Contratilidade cardíaca	39
4.6.3 Parâmetros funcionais	40
4.6.4 Análise do trânsito de Ca^{+2} intracelular	40
4.7 ANÁLISES DO ESTRESSE OXIDATIVO	41
4.7.1 Peroxidação lipídica	41
4.7.2 Carbonilação de Proteínas	41
4.7.3 Atividade das Enzimas Antioxidantes	42
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
5 RESULTADOS	44

5.1 INDUÇÃO E EXPOSIÇÃO À OBESIDADE	44
5.2 RECOMPOSIÇÃO DOS GRUPOS	45
5.3 INDUÇÃO AO DIABETES	46
3.4 ANIMAIS OBESO DIABÉTICOS TRATADOS COM FARINHA DA CASCA E SEMENTE DE LICHIA.....	53
5.4 TRATAMENTO DO DIABETES: EXPOSIÇÃO ÀS DIETAS EXPERIMENTAIS	54
6 DISCUSSÃO	62
7 CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
ANEXO A: TERMO DE CONSENTIMENTO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	89

1 INTRODUÇÃO

As doenças crônicas não transmissíveis acometem 38 milhões de pessoas por ano, sendo três quartos em países de baixa e média renda. Segundo a *World Health Organization* – WHO (2014)¹, 82% das mortes são causadas principalmente por doenças cardiovasculares seguidas de câncer, doenças respiratórias e diabetes². No Brasil aproximadamente 74% das mortes foram causadas por doenças crônicas não transmissíveis¹. Os fatores de risco para estas doenças são dieta inadequada, alto consumo de álcool, tabagismo e inatividade física, que podem levar a quadros de risco metabólico como hiperglicemia, hiperlipidemia, hipertensão arterial, sobrepeso e obesidade².

De acordo com a *International Diabetes Federation* - IDF (2015)³, o diabetes atinge 415 milhões de adultos, estima-se que 642 milhões de indivíduos sejam acometidos no ano de 2040. No Brasil cerca de 13 milhões de pessoas são diagnosticadas com Diabetes Mellitus, o que corresponde a 6,2% da população⁴.

O Diabetes Mellitus é um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresentam em comum a hiperglicemia, resultante de defeitos na ação e/ou secreção de insulina ou em ambas⁵. O Diabetes Mellitus tipo 2 correspondem a 90 a 95% dos casos, estando entre os diversos fatores de risco para esta doença, os hábitos alimentares^{6,7}. No Diabetes tipo 2 o organismo não utiliza adequadamente a insulina produzida pelo pâncreas; ou ainda, não é capaz de produzir insulina suficiente para controlar a taxa de glicemia. Desta forma, na fase inicial ocorre superprodução de insulina que evolui para queda devido à falha parcial das células β -pancreáticas. Este tipo da doença ocorre pela associação entre fatores genéticos e ambientais como etnia, histórico familiar, mas principalmente por sobrepeso e obesidade, concomitantes aos à alimentação inadequada e sedentarismo^{2,8}.

Diversas pesquisas mostram que o sobrepeso e obesidade são importantes fatores de risco para o desenvolvimento de Diabetes tipo 2^{9,10}. Em estudo realizado por Liu et al. (2016)¹¹ foi observado que a incidência de Diabetes tipo 2 foi maior entre os pacientes obesos quando comparados com pacientes não obesos. Além disso estudo observacional de coorte realizado durante 10 anos, demonstrou que o excesso de peso foi um fator de risco importante para o desenvolvimento de Diabetes Mellitus tipo 2¹⁰.

De acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD, 2017)⁴, o tipo 2 pode ser controlado com atividade física e planejamento alimentar. Em contrapartida, quando não tratado pode causar úlceras nos pés que podem levar à gangrena e amputação de membros inferiores, cegueira, insuficiência renal, doença cardíaca e acidente vascular cerebral⁷. Franssens e colaboradores (2016)⁹ enfatizam que pacientes com excesso de peso acometidos pelo Diabetes Mellitus tipo 2 apresentam alto risco para desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Evidências indicam que indivíduos diabéticos podem ser acometidos por doença miocárdica, não decorrente de distúrbio arterial coronariano ou hipertensão arterial. A hiperinsulinemia crônica pode acarretar hipertrofia cardíaca, a qual, pode iniciar-se muito precocemente no Diabetes tipo 2. Assim, a cardiomiopatia diabética é caracterizada por alterações na estrutura e função do miocárdio não relacionadas às patologias vasculares¹². Entre estas alterações, estão hipertrofia do ventrículo esquerdo, fibrose intersticial e perivascular, disfunção diastólica e posterior disfunção sistólica¹³.

Em trabalho realizado por Rosa (2011)¹⁴ utilizando ratos diabéticos foi observada remodelação ventricular do tipo excêntrica. A remodelação cardíaca é caracterizada por alterações moleculares, celulares e intersticiais, que se apresentam clinicamente como mudanças da massa, tamanho, geometria e função cardíaca¹⁵. A remodelação do tipo excêntrica consiste no aumento dos sarcômeros em série, levando a dilatação ventricular e pequeno espessamento da parede, enquanto na concêntrica ocorre a disposição dos sarcômeros em paralelo, aumentando a espessura da parede¹⁶. Pesquisadores detectaram correlação positiva entre diabetes associada à obesidade central, e o maior risco de remodelação cardíaca, caracterizada por hipertrofia do ventrículo esquerdo¹⁷. Okoshi e colaboradores (2007)¹² destacam que a cardiomiopatia diabética é decorrente de distúrbios metabólicos cardíacos associados aos diabetes, como hiperinsulinemia e hiperglicemia, podendo desencadear estresse oxidativo, fibrose intersticial, apoptose celular e comprometimento da homeostase do trânsito de cálcio miocárdico.

Autores afirmam ainda que apesar de se sugerir que o estresse oxidativo está relacionado à cardiomiopatia diabética, o mecanismo de geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) em corações diabéticos ainda não é bem compreendido¹³. Ainda assim, Andrews e colaboradores (2015)¹⁸ afirmam que pacientes obesos e diabéticos

do tipo 2 apresentam alto estresse oxidativo. Trabalhos apontam que indivíduos obesos apresentaram aumento de marcadores relacionados ao estresse oxidativo, como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico^{18,19}, maiores concentrações de ânion superóxido (O_2^-) e atividade da superperóxido dismutase (SOD), comparados com pacientes de peso normal, evidenciando o papel da obesidade no aumento do estresse oxidativo em pacientes com Diabetes tipo 2¹⁹.

Outra evidência indicada na literatura, é que pacientes obesos e portadores de Diabetes tipo 2 apresentaram concentrações significativamente mais elevadas de leptina, quando comparados ao grupo controle obeso¹⁹, destacando que a hiperinsulinemia e hiperleptinemia podem ser importantes fatores no desenvolvimento de estresse oxidativo em pacientes obesos com diabetes²⁰. De acordo com Stefanovic´ et al. (2008)¹⁹ a obesidade intra-abdominal pode ser a principal razão para a hiperleptinemia associada ao estresse oxidativo.

Dietas com alta densidade energética, rica em ácidos graxos saturados, além de sobrepeso e obesidade central, aumentam o risco de Diabetes tipo 2⁸. Assim, a condição de obesidade e a hiperglicemia associada ao diabetes mellitus provoca estresse oxidativo, devido à maior liberação de EROs²¹. Entre as EROs encontram-se moléculas que são radicais livres como os radicais ânion superóxido, hidroperoxila e hidroxila²². Os radicais livres em excesso podem causar danos biomoleculares que comprometem a saúde, em contrapartida, podem ser combatidos por antioxidantes produzidos pelo organismo ou absorvidos da dieta, destacando alguns compostos que podem ter papel importante na atividade anti-diabética^{21,22}.

Stefanovic´ e colaboradores(2008)¹⁹, sugerem que, em pacientes obesos portadores de Diabetes tipo 2, alimentos com alto nível de compostos antioxidantes podem ser benéficos na prevenção e/ou reversão do estresse oxidativo. Desta forma, diversas fontes naturais têm sido utilizadas como alternativas antidiabéticas, especialmente a inclusão de plantas na alimentação²⁴. Segundo Ozuna e colaboradores (2015)²⁵, com a finalidade de melhorar a saúde da população, os ingredientes e processos para o desenvolvimento de alimentos funcionais tem sido amplamente estudado.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária considera alimentos que possuem alegação de propriedade funcional aqueles que, além da função de nutrir, possuem

efeito metabólico e/ou fisiológico, e, alimentos com alegação de saúde aqueles que possuem relação com doença ou condição de saúde²⁶. Trabalhos apontam o potencial de vários alimentos como fontes de substâncias funcionais bioativas que podem melhorar a saúde humana^{27,28,29}. Entre os compostos bioativos, os mais estudados estão os relacionados à atividade antioxidante, dentre eles estão as vitaminas C e E, oscarotenóides e os compostos fenólicos, especialmente os flavonóides^{30,31}. Outros compostos bioativos funcionais presentes em alimentos têm sido descritos na literatura por seus efeitos relacionados com melhor atividade antioxidante, anti-inflamatória e resposta imune, dentre eles destacam-se os flavonóides, encontrados principalmente no azeite de oliva, cacau e na farinha de semente de uva Chardonnay^{29,32}.

A lichia (*Litchi chinensis* Sonn.) é uma fruta tropical a subtropical, proveniente do sudeste asiático, pertencente a família *Sapindaceae*, possui grande aceitabilidade por sua cor e sabor atraentes, seus subprodutos como casca e semente são geralmente descartados, no entanto, a semente dessa fruta é comumente utilizada na medicina tradicional chinesa^{21,33,34}. Essa fruta tem sido difundida como cultura econômica em diversos países e também no Brasil³⁴. Alguns estudos têm demonstrado que tanto o extrato de semente de lichia, quanto às farinhas da casca e semente desta fruta são ricas em compostos funcionais, como os compostos fenólicos antioxidantes^{33,34}. Os compostos fenólicos dividem-se em flavonóides (polifenóis) e não-flavonóides (fenóis simples e ácidos)³⁰. Trabalhos que avaliaram os polifenóis nas farinhas de casca e semente de lichia mostram maiores teores de compostos fenólicos em comparação a outros estudos que avaliaramos mesmos compostos em frutas do cerrado, como caju, guapeva, mamcadela, cagaita, baguaçu e jambolão, além de polpas de frutas congeladas de amora, uva, goiaba, morango, manga, graviola, cupuaçu e maracujá^{35,36}.

Estudo realizado por Prasad e colaboradores (2009)³³, identificou cinco flavonóides presentes no extrato de semente de lichia: ácido gálico, procianidina B2, galocatequina, epicatequina, e epicatequina-3-galato. Man e colaboradores (2016)³⁷ estudando o efeito do extrato da semente de lichia sobre ratos induzidos ao diabetes, verificaram que houve redução dos níveis de glicose sanguínea em comparação com animais diabéticos não tratados. Além disso, os animais tratados com o extrato da

semente de lichia apresentaram diminuição de glicose urinária, melhora na tolerância à glicose e resistência à ação da insulina. Os autores concluíram que o extrato acarretou melhorano metabolismo glicídico e lipídico sugerindo que o tratamento promoveu efeito protetor em ratos induzidos ao diabetes, retardando o aparecimento de lesões no fígado, pâncreas e rins³⁷. O aumento da capacidade antioxidante no fígado e redução dos índices inflamatórios foram visualizados também em *hamsters* alimentados com dieta hiperlipídica após 6 semanas de extrato aquoso da flor de lichia, rico em polifenóis³⁸. Flavonóides presentes no extrato de semente de lichia também foram capazes de retardar a liberação de glicose a partir do consumo de carboidratos, suprimindo a hiperglicemia pós-prandial³⁹. Assim, evidenciando a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos, estudo realizado por LV e colaboradores (2014)²¹, destacam correlação positiva entre o maior conteúdo de flavonóides totais, com maior potencial hipoglicemiante.

Além da utilização de extratos da polpa, semente e flor de lichia^{21,33,37-40}, estudos têm apontado que tanto a casca quanto a semente de lichia apresentam grande potencial nutricional e energético⁴¹. Queiroz e colaboradores (2015)³⁴, estudando a composição das farinhas da casca e semente de lichia, observaram que ambas apresentam em sua composição, elevada quantidade de compostos fenólicos.

Estudo mostra que o consumo de farinha da semente de lichia em animais alimentados com dieta rica em colesterol acarretou menor ganho de peso corporal, redução da glicemia plasmática, menores níveis de leptina, colesterol total e LDL, além de menor deposição de gordura no fígado, em comparação com os animais não suplementados⁴². O autor atribuiu seus achados ao elevado teor de flavonóides presentes na farinha da semente de lichia. Contudo, a farinha da casca também foi capaz de acarretar os mesmos benefícios da farinha de semente, com acréscimo da redução dos níveis de triglicerídeos séricos. Considerando a capacidade antioxidante das farinhas de semente e casca de lichia, Queiroz (2015)⁴² observou que ambas foram efetivas na redução do estresse oxidativo e, conseqüente proteção hepática. Este achado corrobora com Bhoopat (2011)⁴⁰ que mostrou que essa melhora pode manifestar-se em ratos a partir da administração de extrato da polpa de lichia.

Apesar dos efeitos benéficos relacionados à lichia, a maioria dos estudos utilizam extratos de polpa, semente e flor^{21,33,37-40}. Apenas um trabalho foi encontrado na literatura com a utilização de farinhas da casca e semente⁴².

O grande potencial das farinhas da casca e semente de lichia se sustenta na sua utilização para o preparo de rações comerciais, pães, bolos e biscoitos ou adicionadas aos alimentos com objetivo de melhorar sua constituição nutricional, energética e fonte de substâncias bioativas³⁴. Normalmente, a casca e a semente da lichia são descartadas como resíduos, entretanto, segundo a *Food and Agriculture Organization* – FAO (2013), a utilização dos resíduos alimentícios pode consistir em importante alternativa para o acesso a alimentos ricos em nutrientes e compostos bioativos. Assim, partes geralmente descartadas dos alimentos como cascas, sementes e talos podem apresentar mais nutrientes que a parte geralmente consumida⁴¹. Desta forma, a casca e semente de lichia podem ser boas alternativas de compostos bioativos na promoção de benefícios à saúde.

Além disso não foram encontrados estudos que relacionaram o efeito do consumo de farinhas de casca e semente de lichia na condição de obesidade associada ao diabetes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ESTRESSE OXIDATIVO

Os elétrons nos átomos e moléculas estão localizados em camadas eletrônicas, que possuem uma região chamada de orbitais, cada orbital é capaz de suportar no máximo dois elétrons, porém estes elétrons têm rotação oposta (Figura 1)^{22,44}. Dessa forma se em um dos orbitais houver falta de elétron, ou seja, se os elétrons estiverem desemparelhados, essa molécula é conhecida como radical livre (RL). Os elétrons desemparelhados é o que os torna altamente reativos^{22,44,45,46}.

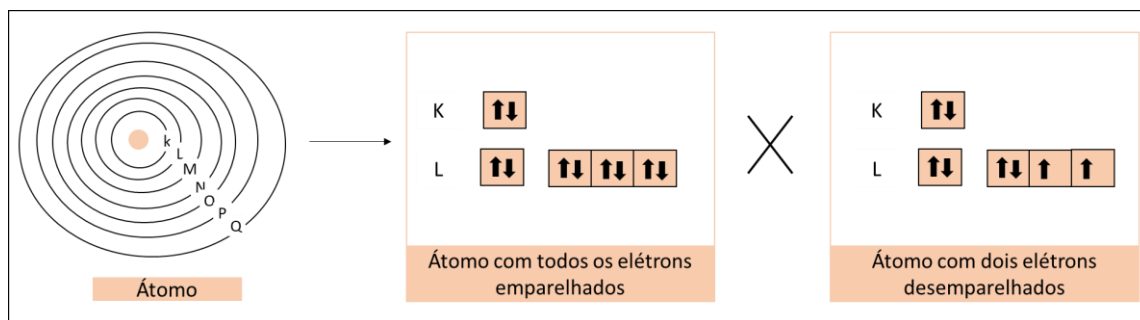


Figura 1. Representação de átomo com elétrons distribuídos em suas camadas eletrônicas, emparelhados e desemparelhados.

Os radicais livres (RL) podem ser formados a partir de diversas moléculas como oxigênio, nitrogênio e cloro. Dessa forma são divididos em espécies reativas de oxigênio (ROS), espécies reativas de nitrogênio (RNS) e espécies reativas de cloro (RCS), alguns exemplos são o superóxido (O_2^-), hidroxila (OH^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), óxido nítrico (NO) e peroxinitrito ($ONOO^-$)⁴⁵. Porém as espécies reativas além dos radicais livres, também englobam substâncias que apesar de não apresentarem elétrons desemparelhados são altamente reativas como o peróxido de hidrogênio que não possui elétrons desemparelhados, mas é uma espécie reativa de oxigênio²². As espécies reativas de oxigênio (EROS) também incluem diversos peróxidos como peróxido de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos⁴⁷.

As espécies reativas não podem ser consideradas apenas como agentes prejudiciais pois também participam de diversas reações e processos biológicos^{46,47}. No sistema imunológico, essas auxiliam na morte de bactérias após serem fagocitadas⁴⁸, além disso, podemos citar a formação do óxido nítrico que age como relaxante endotelial⁴⁹. Entretanto, entre os fatores deletérios que podem ser atribuídos aos RL, estão o envelhecimento e o surgimento de patologias como câncer⁵⁰.

Além disso, pequenas quantidades de EROs podem ser produzidas pelo retículo endoplasmático, pelas membranas plasmáticas e nucleares e por oxidases⁴⁷. No entanto, a cadeia respiratória é a principal fonte de EROs intracelular⁵¹, portanto, na cadeia transportadora de elétrons mais de 90% do oxigênio é reduzido diretamente até a formação de água pela enzima citocromo oxidase, não formando EROs⁴⁷. No entanto, durante o processo normal de respiração celular, cerca de 1 a 2% do oxigênio molecular é convertido a superóxido que é precursor da maioria das EROs⁵¹. Esse oxigênio restante, menos de 10%, sofre redução por outras vias, sendo reduzido um

elétron por vez, gerando assim os EROs⁴⁷, representado na Figura 2. Visualiza-se na Figura o processo de formação de espécies reativas de oxigênio a partir do oxigênio molecular, no qual o oxigênio recebe 1 elétron formando o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), que posteriormente recebe 1 elétron e 2 prótons formando o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual recebe 1 elétron formando o radical hidroxila (HO^{\bullet}) e o ânion hidroxila (HO^-). O radical hidroxila recebe 1 elétron e finalmente é convertida em água. Os prótons de hidrogênio nessa reação são provenientes geralmente de proteínas e lipídeos, resultando em processos em cadeia⁴⁷.

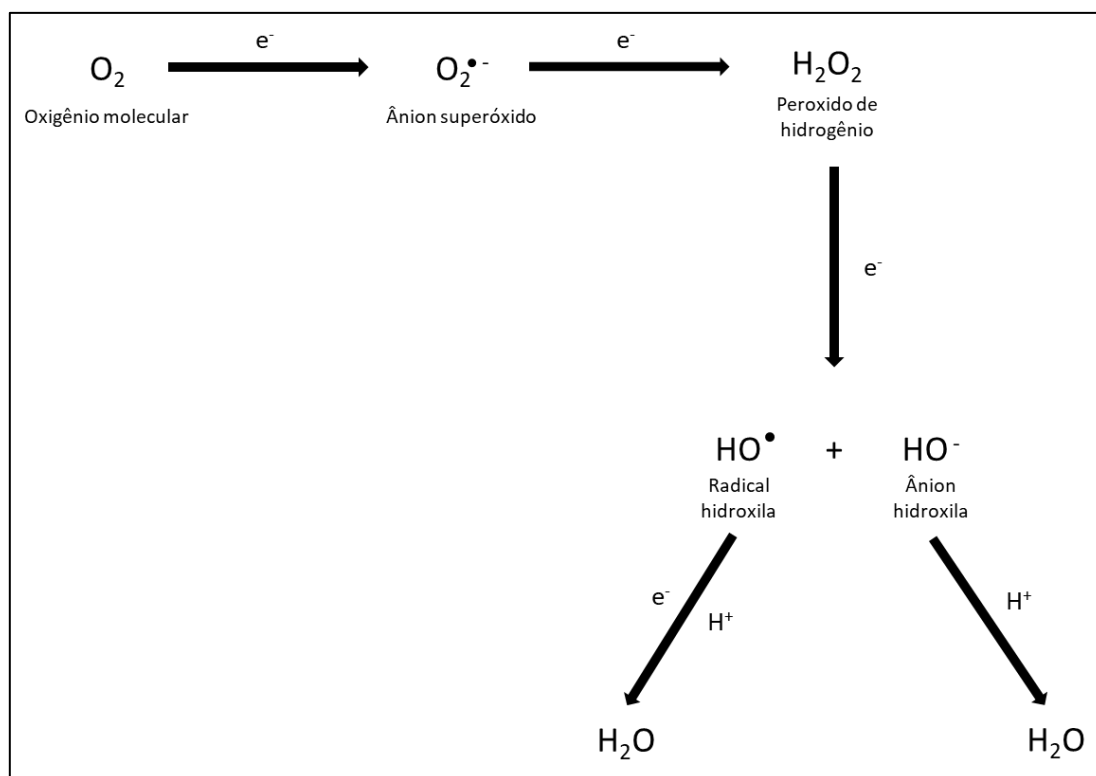


Figura 2. Processo de formação de espécies reativas de oxigênio a partir do oxigênio molecular, adaptado de Volodymyr, 2014⁴⁷.

Nesse processo destaca-se o radical hidroxila por ser um radical de alta reatividade e por não possuir um sistema antioxidante enzimático para controlar sua formação⁴⁷. Ele é formado a partir do peróxido de hidrogênio que pode ser convertido ao radical hidroxila por uma reação de Haber-Weiss ou reação de Fenton⁵¹. O radical hidroxila é formado por reação de Fenton na presença de íons de cobre ou ferro, segundo a reação: $H_2O_2 + Fe^{2+} = OH^{\bullet} + OH^- + Fe^{3+}$ ⁵².

Os elétrons para a formação de EROs, são resultantes do escape da cadeia de transporte de elétrons, principalmente da coenzima Q, no entanto, esse escape

depende do estado fisiológico do organismo⁴⁷. Na parede interna mitocondrial está localizada a cadeia respiratória celular formada pelo complexo I (NADH-ubiquinone oxidoreductase), complexo II (succinato desidrogenase), coenzima Q (ubiquinona), complexo III (ubiquinol-citocromo c oxidoreductase), citocromo c e complexo IV (citocromo coxidase)⁵³, assim, a redução do oxigênio molecular em superóxido ocorre principalmente nos complexos I e III⁵⁴. Porém os radicais livres gerados nas mitocôndrias afetam outros compartimentos celulares e não apenas as mitocôndrias⁵³. Na Figura 3 está representada a cadeia respiratória e a formação de EROs mitocondrial.

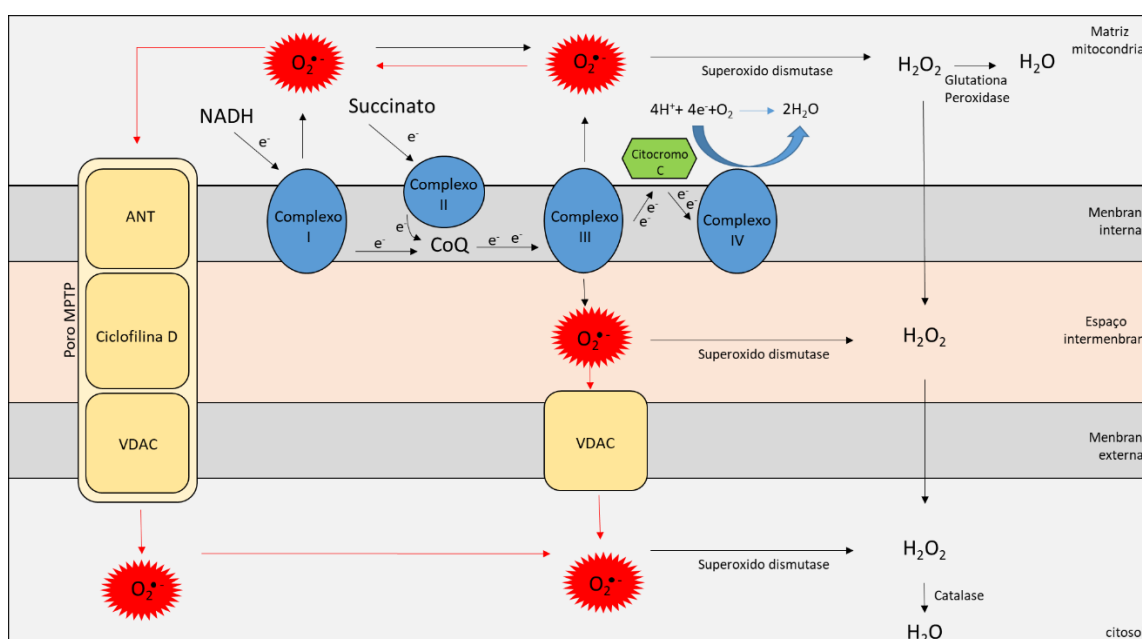


Figura 3. Cadeia respiratória e Processo de formação de EROs, adaptado de Poyton, Ball e Castello, 2009⁵³.

As EROs em excesso podem causar danos à proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos e lipídios⁵³, alterando a atividade, estrutura e propriedades físicas⁵⁵. Além desses, outros efeitos prejudiciais dos EROs, são o prejuízo da respiração celular podendo estimular ou impedir a divisão celular⁵¹. As EROs também estão relacionadas com a morte celular, sendo assim, os danos causados quando não podem ser reparados, desencadeia o processo de apoptose⁵¹.

Ademais, a membrana lipídica também é afetada pelas EROs, o radical hidroxila interage com as ligações insaturadas dos ácidos graxos desencadeando a peroxidação lipídica⁵³.

Os lipídios são os responsáveis pela composição da membrana celular, portanto, a peroxidação lipídica é responsável por diversos estados patológicos, alterando a composição, estrutura e dinâmica das membranas⁵⁵. Além disso, os peróxidos lipídicos, são importantes marcadores do estresse oxidativo, por serem muito reativos podem ainda interagir e degradar constituintes protéicos do DNA⁵⁵. Os aldeídos são substâncias secundárias da oxidação de lipídios, entre eles se destaca o malondialdeído⁵⁶.

O dano oxidativo a proteínas pode ser medido por meio grupos carbonila. A carbonilação proteica é a oxidação de proteínas, onde o radical hidroxila reage com aminoácidos de proteínas provocando sua clivagem e formação dos grupos carbonila⁵⁷.

Os RL podem ser mensurados diretamente por meio da concentração de espécies reativas, ou ainda indiretamente pelo dano oxidativo causado pelos RL, sendo este de maior relevância, pois o dano causado pelos RL, são de maior importância do que a quantidade total de RL formada⁵⁸ (HALLIWELL e WHITEMAN, 2004). Contudo, a capacidade antioxidante é utilizada determinando-se a atividade de algumas enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase além de compostos antioxidantes como ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol, β -caroteno e ácido úrico⁵⁹.

2.2 DEFESA ANTIOXIDANTE

Para controlar os níveis de EROs nas células e protege-las contra os danos causados, as células contam com o sistema de defesa antioxidante^{47,51}. Os antioxidantes podem atuar na eliminação e prevenção da formação de RL ou reparo de danos causados por esses⁶⁰. O sistema de defesa antioxidante é composto por antioxidantes endógenos que podem ser enzimáticos ou não enzimáticos e, antioxidantes exógenos provenientes da dieta ⁶¹.

A defesa antioxidante endógena é composta pela defesa de primeira linha formada pelas enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase⁶⁰. A

superóxido dismutase possui 3 isoformas, superóxido dismutase citosólica CuZn, superóxido dismutase intramitocondrial de manganês e a superóxido dismutase extracelular CuZn⁵², é responsável por converter o radical superóxido em peróxido de hidrogênio, no entanto o peróxido de hidrogênio é tóxico ao organismo. Além disso, pela reação de Fenton forma-se o radical hidroxila⁶⁰. Contudo, não existe um sistema enzimático para agir no radical hidroxila, devido a sua alta reatividade, assim para prevenir contra seus danos deve-se impedir sua formação⁴⁷. Para evitar esse processo, a catalase presente nos peroxissomos é responsável por transformar o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular, porém a catalase não está presente nas mitocôndrias, portanto o peróxido de hidrogênio mitocondrial é convertido em água e oxigênio pela glutathione peroxidase⁶⁰. Já a defesa antioxidante secundária é composta pelas enzimas, glutathione redutase e glicose-6-fosfato desidrogenase, essas não agem diretamente sobre os radicais livres, mas oferecem suporte aos antioxidantes endógenos. Entre os antioxidantes endógenos não enzimáticos estão coenzima Q10, ácido úrico e glutathione⁶¹. Além da defesa antioxidante endógena a defesa antioxidante exógena, é importante para ajudar a reduzir os efeitos deletérios causados pelo dano oxidativo⁶². Esta é constituída por substâncias presentes na dieta como vitamina C e E, flavonóides, ácidos fenólicos, carotenóides e minerais, como zinco e selênio⁶¹. No entanto, quando o aumento dos níveis antioxidantes não é capaz de controlar as EROs, há um processo conhecido como estresse oxidativo crônico⁴⁷. Portanto, de acordo com VOLODYMYR (2014)⁴⁷ as consequências do estresse oxidativo dependem das quantidades e localização das EROs. Diversos estudos têm reportado que o estresse oxidativo está relacionado com o desenvolvimento do Diabetes Mellitus, assim, a utilização de antioxidantes por meio da dieta podem ser uma importante ferramenta para o tratamento da doença e suas complicações⁴⁵.

3 OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do consumo de farinha da casca e semente de lichia sobre o estresse oxidativo e função contrátil de cardiomiócitos de ratos obesos diabéticos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados ratos *Wistar* com média de peso 156 ± 25 g, fornecidos pelo Biotério Central do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de polipropileno com tampas de arame cromado forradas com maravalha de *Pinus*, em condições controladas de temperatura ($24 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade ($55 \pm 5\%$) e ciclos de iluminação invertido de 12 horas. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” publicado pelo “*U.S. National Institutes of Health*” e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Espírito Santo, sob o número de protocolo 24/2017.

4.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

4.1.1 Composição dos grupos e delineamento experimental

Após período de aclimação com oferta de água e ração *ad libitum*, os animais foram randomizados em dois grupos:

- **Controle (C):** alimentado com dieta padrão (DP) (n=16)
- **Obeso (Ob):** alimentado com dieta hiperlipídica saturada (DH) (n= 74).

Os animais alimentados com DH passaram por protocolo de indução à obesidade, e, foram considerados obesos, quando houve diferença estatística de peso corporal entre os grupos⁶³. Após estabelecida a obesidade os animais foram submetidos à 5 semanas de protocolo de exposição à obesidade.

Na experimentação biológica, em especial estudos experimentais, mesmo quando mantidas as condições laboratoriais semelhantes, não está assegurada homogeneidade de resposta. Neste sentido, os ratos alimentados com ração padrão e hiperlipídica poderiam apresentar, em maior ou menor escala, características comuns de resposta para o peso corporal. Estudo publicado previamente⁶⁴ mostrou que este fato pode conduzir a erro de classificação, ou seja, animais submetidos à ração padrão poderiam ser classificados como controle, quando na realidade, exibem características de animais obesos, assim como animais alimentados com dieta

hiperlipídica, poderiam exibir características de animais controles. Por essa razão, torna-se necessário aplicar um critério que classifique os animais em dois grupos distintos. Com essa finalidade, ao final do protocolo de exposição à obesidade, com o intuito de constituir dois grupos homogêneos, sendo o grupo C constituído apenas por animais com características de controle e o grupo Ob apenas por animais com característica de obeso, foi construído intervalo de confiança de 95%, baseado nas médias de peso corporal dos ratos C e Ob. Sendo adotado como ponto de separação (PS) entre os grupos, o ponto médio entre o limite superior do C e o limite inferior do Ob; assim, a partir deste ponto, foram excluídos do grupo C animais com peso corporal acima do PS, bem como do grupo Ob animais com peso corporal abaixo do PS, (Figura 4)⁶³.

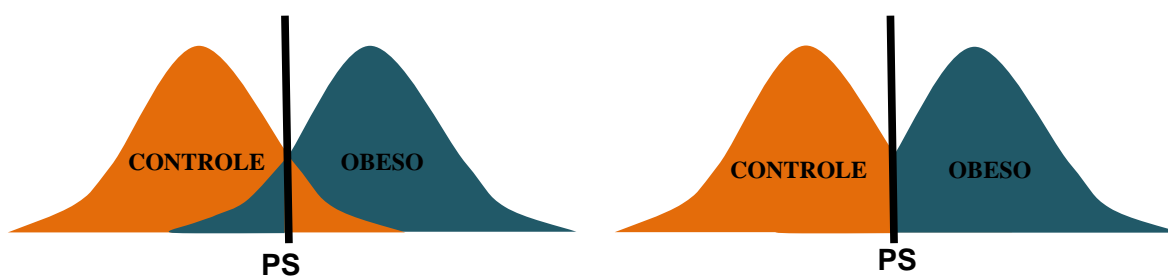


Figura 4. Representação esquemática do critério utilizado para composição dos grupos controle e obeso. Adaptado de LIMA-LEOPOLDO, 2010⁶⁵.

Posteriormente à aplicação do critério do PS, o grupo obeso foi randomizado e submetido ao protocolo de indução ao diabetes constituindo os seguintes grupos:

- **Obeso (Ob):** alimentado com dieta hiperlipídica saturada (DH)
- **Obeso diabético (ObD):** alimentado com DH
- **Obeso diabético (ObDFC):** alimentado com DH acrescida de farinha da casca de lichia
- **Obeso diabético (ObDFS):** alimentado com DH com acréscimo de farinha da semente de lichia

Na Figura 5 estão representados os grupos experimentais.

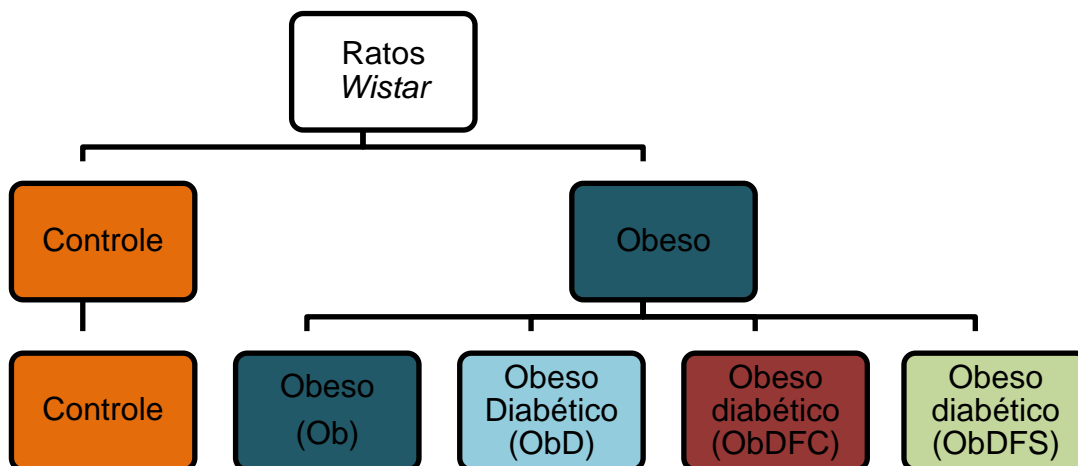


Figura 5. Representação dos grupos experimentais.

Os animais obesos passaram por indução ao Diabetes tipo 2 por meio de administração intraperitoneal de estreptozotocina (30 mg/kg de peso corporal), diluída em solução de citrato de sódio, (0,1M, pH 4,5)³⁷. Após 72h da administração da estreptozotocina, os animais que apresentaram glicemia de jejum maior que 200mg/dL, foram considerados diabéticos tipo 2^{37,66}. Os animais que não responderam positivamente à dose de estreptozotocina foram submetidos a segunda aplicação. Os animais dos grupos não diabéticos, controle e obeso, receberam a mesma dosagem de solução de citrato de sódio³⁷.

O delineamento experimental foi constituído por período de indução à obesidade de 7 semanas^{67,68}; 5 semanas de exposição à obesidade e 5 semanas de tratamento dos grupos experimentais^{29,37}. Na Figura 6 está representado o delineamento experimental.

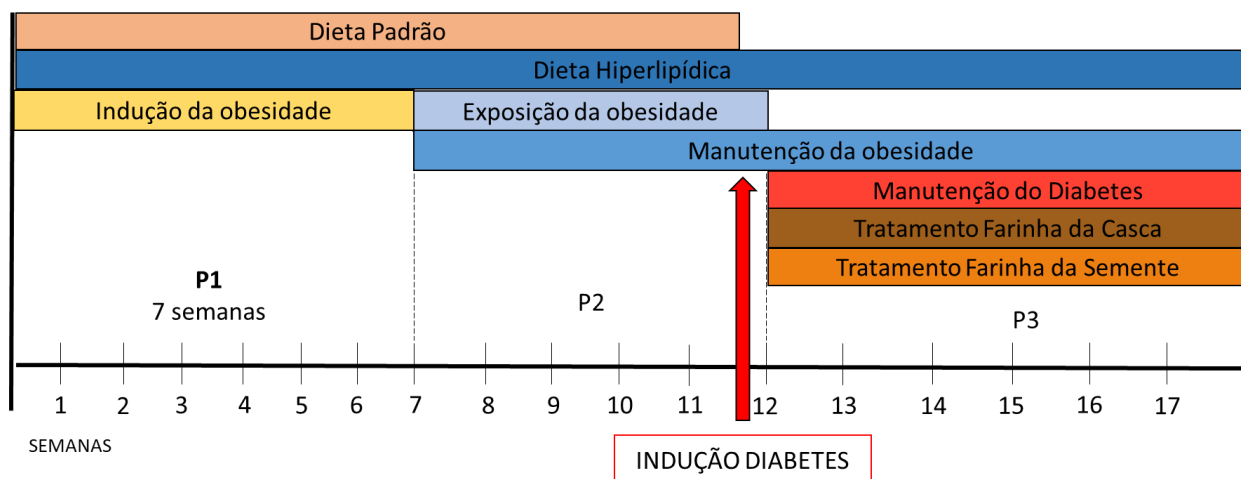


Figura 6. Representação do protocolo experimental. P1: Período de indução a obesidade; P2: Período de exposição a obesidade; P3: Período de exposição as dietas experimentais.

4.2 DIETAS EXPERIMENTAIS

4.2.1 Obtenção dos frutos e confecção das farinhas

Os frutos de lichia (100kg) foram adquiridos em propriedade rural localizada na região de Marechal Floriano/ES. Em seguida, foram lavados, sanificados com hipoclorito de sódio por 15 minutos e separados em casca, polpa e semente. A casca e a semente foram secas em estufa MA035/5, Estufa de Secagem com Circulação, Marcone, Piracicaba -. A temperatura utilizada foi de 45°C, até peso constante, sendo necessários 4 dias para a secagem da casca e 8 dias para a semente de lichia³⁴. Após a secagem, estas foram moídas separadamente, em moinho de facas MA340, Macro Moinho de Facas, Tipo Willey, Marcone, Piracicaba - obtendo-se a farinha da casca de lichia (FC) e a farinha da semente de lichia (FS), que foram armazenadas em refrigeração a abrigo da luz, até a sua utilização para a formulação das rações dos animais³⁴. Todos os procedimentos acima citados foram realizados no Laboratório de Mecanização e Agricultura de Precisão, na área experimental do campus da Universidade Federal do Espírito Santo no município de Alegre/ES,

4.2.2 Formulação e composição das dietas experimentais

A Dieta padrão Nuvilab CR-1 foi composta pelos seguintes ingredientes: milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, vitamina A, vitamina D3, vitamina E, vitamina K, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, niacina, pentotenato de cálcio, ácido fólico, cloreto de colina, sulfato de ferro, sulfato de manganês, sulfato de zinco, sulfato de cobre, iodato de cálcio, sulfato de cobalto, lisina, metionina e BHT.

As dietas hiperlipídica foram idealizadas no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Experimental, Centro de Educação Física e Desportos da Universidade Federal do Espírito Santo CEFD/UFES e foram manipuladas na empresa Nutriave Alimentos® (Viana, Espírito Santo, Brasil). As dietas experimentais hiperlipídica foram compostas por milho, arroz quirera, farinha de carne e ossos, glúten, sal, bentonita (material inerte), mix mineral, mix vitamínico e banha de porco, os ingredientes foram misturados, homogeneizados e posteriormente passaram por processo de extrusão.

A dieta hiperlipídica (DH) foi utilizada como base para formulação das dietas com adição de farinha de lichia. As dietas experimentais com farinha de lichia foram acrescidas de 10% de FC ou FS, correspondente à quantidade de farinha utilizada em outros trabalhos^{29,42}. Para equilibrar o possível efeito da quantidade de fibras presente nas farinhas FC e FS, a DH foi acrescida de fibra insolúvel durante o período de tratamento com as dietas experimentais²⁹. No Quadro 1 estão expostas a distribuição percentual de calorias provenientes de macronutrientes nas dietas experimentais, enquanto no Quadro 2 estão presentes a quantidade de macronutrientes e fibras em 100g de dieta.

Quadro 1. Percentual de calorias proveniente dos macronutrientes e densidade calórica presente nas dietas.

	Dietas			
	DP	DH	DHFC	DHFS
Proteínas (%)	30,2	24,3	22,4	20,6
Carboidratos (%)	55,9	57,6	49,7	47,3
Lipídios (%)	13,9	18,1	27,9	32
Densidade calórica (kcal/g)	2,92	3,8	3,82	4,08

DP: dieta padrão; DH: dieta hiperlipídica; DHFC: dieta hiperlipídica farinha da casca; DHFS: dieta hiperlipídica farinha da semente.

Quadro 2. Composição de macronutrientes e fibras presentes em 100g de dieta.

	Dietas			
	DP	DH	DHFC	DHFS
Proteínas (g)	22,4	23	21,4	21
Carboidratos (g)	40,8	54,7	47,4	48,2
Lipídios (g)	4,5	7,6	11,8	14,5
Fibra (g)	8	4,6	8,12	6,24

DP: dieta padrão; DH: dieta hiperlipídica; DHFC: dieta hiperlipídica farinha da casca; DHFS: dieta hiperlipídica farinha da semente.

4.2.3 Determinação de fenóis totais e flavonóides nas farinhas da casca e semente de lichia

Compostos fenólicos e flavonóides nas farinhas foram avaliados pelo Laboratório de Triagem Biológica de Produtos Naturais, no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Para determinação do conteúdo de fenóis totais (CFT) foi utilizada a metodologia de Neves et al. (2009)⁶⁹ e Singleton & Jr (1965)⁷⁰. Em microplaca foram adicionados 125µl da solução aquosa do reagente de Folin-Ciocalteau 10% e 25 µl da solução-mãe da amostra (1mg/mL diluída 1:3 em água destilada). A mistura foi deixada em repouso por 5 minutos. Após esse período foi adicionado 100µl da solução aquosa de carbonato de sódio 4%. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 750nm, em leitor de microplaca (BioRad, Washington, USA), após aproximadamente 2 horas de incubação ao abrigo da luz. O ácido gálico foi utilizado como padrão para a curva de calibração e para a expressão do resultado, que foi dado em miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (mgEAG/g).

O doseamento de flavonóides foi realizado de acordo com Marques e colaboradores (2012)⁷¹ e Perdigão (2012)⁷², com adaptações. Em microplaca foram adicionados 99µl de água destilada, 20µl de extrato (com concentração final de 100µg/ml), 6µl de ácido acético glacial, 100µl de piridina a 20% e 25µl de cloreto de

alumínio 6,5% diluído em metanol. Após 30 minutos, foi realizada a leitura espectrofotométrica em leitor de microplaca (BioRad, Washington, USA) em 415 nm. O branco da reação foi considerado pela solução com todos os reagentes, excluindo-se amostra e o cloreto de alumínio. O controle negativo foi composto por todos os reagentes excetuando o cloreto de alumínio. A quercetina (Sigma, Missouri, USA) foi utilizada como padrão para a curva de calibração e os resultados expressos em miligrama equivalente em quercetina por grama da amostra (mgEQ/g).

O Quadro 3 apresenta as dosagens de polifenóis totais e flavonóides presentes nas farinhas da casca e semente de lichia.

Quadro 3. Doseamento de polifenóis totais e flavonóides nas farinhas da casca e semente de lichia.

	Casca	Semente
Polifenóis totais (mg EAG/g)	128± 4	118± 6
Flavonóides (mg EQ/g)	42,3 ± 21,9	63,1± 18,8

EAG: Equivalente de ácido gálico EQ: equivalente de quercetina. Valores expressos em média ± desvio padrão.

4.3 AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL

O perfil nutricional foi determinado pela análise da ingestão alimentar (IA), ingestão calórica (IC), eficiência alimentar (EA), peso e gordura corporal e índice de adiposidade.

O peso corporal dos animais foi aferido semanalmente utilizando-se balança digital EduTec (Inca Tecnologia de Produtos e Serviços Ltda., Brasil). A gordura corporal foi quantificada pelo somatório dos depósitos de gordura epididimal, retroperitoneal e visceral⁷³. O índice de adiposidade foi calculado dividindo-se a gordura corporal pelo peso corporal final, multiplicado por 100^{73,74}.

4.3.1 Ingestão alimentar, ingestão calórica, eficiência alimentar

Os animais receberam 40 g de ração diariamente e água *ad libitum*. Após 24 horas a quantidade de ração não ingerida foi mensurada para cálculo da IA,

considerada pela subtração entre oferta e a sobra (IA= 40g - quantidade não consumida). A IC foi calculada pela seguinte fórmula: ingestão alimentar semanal multiplicada pelo valor calórico de cada dieta (IC= g/semana x kcal) (KOCH et al., 2014).

Para calcular a eficiência alimentar (EA), ou seja, a capacidade do animal em converter a energia alimentar consumida em peso corporal, dividiu-se o ganho total de peso (GP) dos animais pela energia total ingerida (EA= GP/ (g) Kcal) (IRVING et al., 2009; KIM et al., 2000).

4.3.2 Avaliação da glicemia de jejum

A glicemia de jejum foi mensurada com glicosímetro portátil Accu-Chek Go Kit (Roche Diagnostic Brazil Ltda., São Paulo, Brasil), na décima segunda semana de protocolo experimental, 72h após a aplicação de estreptozotocina e ao fim do protocolo experimental.

4.4 ANÁLISES PÓS-MORTEM

4.4.1 Determinação do teor de água nos tecidos pulmonar e hepático

Os pesos dos tecidos foram aferidos *in natura* (PN) e após secagem em estufa por 48 horas a temperatura de $55 \pm 5^\circ\text{C}$, foi determinado o peso seco (PSE). Para análise da retenção hídrica nos tecidos, considerou-se os valores relativos calculados pela seguinte fórmula: $[(\text{PN}-\text{PSE})/\text{PN}] \times 100\%$.

4.5 REMODELAÇÃO CARDÍACA

4.5.1 Estrutura do Coração *Post-mortem*

A determinação de hipertrofia cardíaca, de forma macroscópica, foi determinada pela mensuração do peso total do coração e sua relação com o

comprimento da tíbia. A tíbia após removida e limpa foi medida com o auxílio de paquímetro (ZAAS Precision - Amatoools Comercial e Importadora Ltda).

4.6 CARDIOMIÓCITO ISOLADO

A análise funcional cardíaca in vitro foi realizada por meio da técnica de cardiomiócito isolado⁷⁸.

4.6.1 Isolamento de cardiomiócito

A análise da função contrátil foi realizada por meio da técnica de cardiomiócito isolado descrita por Guatimosim e colaboradores(2001)⁷⁸. Ao final do protocolo experimental os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina (50mg/kg/ip; Dopalen[®], Sespo Indústria e Comércio Ltda - Divisão Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brasil) e cloridrato de xilazina (10mg/kg/ip; Anasedan[®], Sespo Indústria e Comércio Ltda - Divisão Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brasil), eutanasiados por toracotomia mediana e retirada do coração. O coração foi colocado em placa de petri contendo solução Digestion Buffer (DB) + ácido etileno glicol tetracético (EGTA - ethyleneglycol-bis (β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraaceticacid) + N-2-hidroxi-etil piperazina N-2-etano sulfônico (HEPES), responsável por manter o coração vivo e quelar o cálcio inibindo a contração. As soluções para o isolamento dos miócitos ventriculares foram feitas usando-se solução com água ultrapura (milli-Q), com a seguinte composição (em mM): NaCl (130); MgCl₂ (1); KCl (5,4); N-2-hidroxi-etil piperazina N-2-etano sulfônico (HEPES) (25); glicose (22); NAH₂PO₄ (0,33); e insulina, pH = 7,39, temperatura ambiente. Após a limpeza do coração, o mesmo foi pesado em becker contendo 20 mL da solução DB + EGTA + HEPES. Posteriormente a artéria aorta foi canulada utilizando-se a técnica de Langendorff e o coração foi perfundido com solução contendo DB+HEPES+EGTA, por 2 a 3 minutos para limpezados vasos coronários. Posteriormente o coração foi perfundido com solução enzimática contendo 1mg/mL de colagenase tipo II (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA) e Ca⁺²(1mM), durante 15 a 20 minutos para a lise da matriz extracelular. As soluções utilizadas neste processo foram previamente oxigenadas com mistura gasosa contendo 95% de oxigênio e 5% de gás carbônico e mantidas em banho maria a 37,5°C.

Após a perfusão, os átrios e o ventrículo direito foram retirados e o ventrículo esquerdo foi picotado em placa de petri contendo a solução DB, albumina, colagenase e Ca^{+2} (1mM). Os fragmentos do coração foram colocados em um Becker e ressuspendidos levemente com pipeta pasteur por 2 minutos em banho maria a $37,5^{\circ}\text{C}$. Os fragmentos foram filtrados e a solução foi mantida em repouso para a formação do pellet. Após 10 minutos, o sobrenadante foi removido e o pellet lavado a cada 10 minutos, com soluções de DB contendo Albumina e Ca^{+2} . A cada etapa o tubo contendo as células e as soluções foram mantido em repouso por aproximadamente 10 minutos e o sobrenadante descartado. Na última etapa, foi adicionado ao pellet solução Tyrode [composição (em mM): NaCl (140); HEPES (10); NaH_2PO_4 (0,33); MgCl_2 (1); KCl (5); CaCl_2 (1,8) e Glicose (10)]. As soluções utilizadas neste processo foram aquecidas previamente a $37,5^{\circ}\text{C}$.

4.6.2 Contratilidade cardíaca

A contração celular foi mensurada por meio da técnica de alteração do comprimento dos cardiomiócitos, conforme descrito previamente Guatimosim *et al.* (2001). As mensurações de contração-relaxamento celular utilizaram sistema de detecção de bordas acoplado ao microscópio invertido (IonOptix, Milton, MA, USA) com lente objetiva de 40 vezes (Nikon Eclipse - TS100, EUA). Os cardiomiócitos foram acomodados em câmara experimental com base de vidro, banhados por solução Tyrode temperatura de $37,5^{\circ}\text{C}$ e visualizados em monitor por meio de câmera (Myocam, IonOptix, Milton, MA, USA, 240 Hz) acoplada ao microscópio com programa de detecção de imagens (Ionwizard, Ionoptix).

Os cardiomiócitos foram estimulados em frequências de 1Hz com duração de 5 milissegundos e voltagem de 20V, utilizando-se par de eletrodos de aço e estimulador elétrico de campo (Myopacer, IonOptix, Milton, MA, USA). Os movimentos dos sarcômeros dos miócitos foram capturados pelo sistema de detecção de sarcômeros (Ionwizard, Ion Optix, Milton, MA, USA) e armazenados para análise posterior. As medidas de contração foram realizadas em cardiomiócitos que apresentaram as seguintes condições: bordas e estriações sarcoméricas bem definidas, relaxados em repouso e sem apresentar contrações voluntárias (Figura 7).

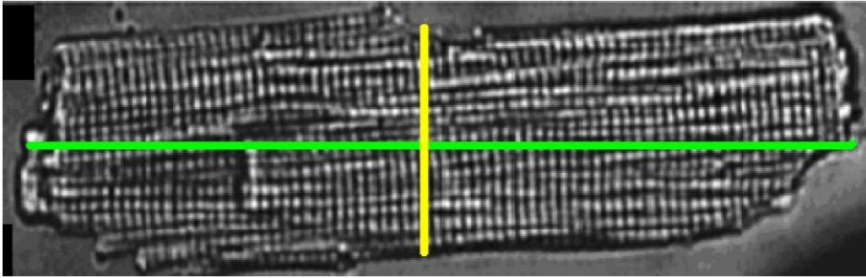


Figura 7. Representação dos pontos de mensuração da imagem dos miócitos cardíacos.

4.6.3 - Parâmetros funcionais

Foram avaliados o comprimento dos sarcômeros e os seguintes parâmetros contráteis: percentual de encurtamento, velocidades máximas de encurtamento e relaxamento, tempos até 50% do encurtamento e tempo até 50% do relaxamento (Figura 8).

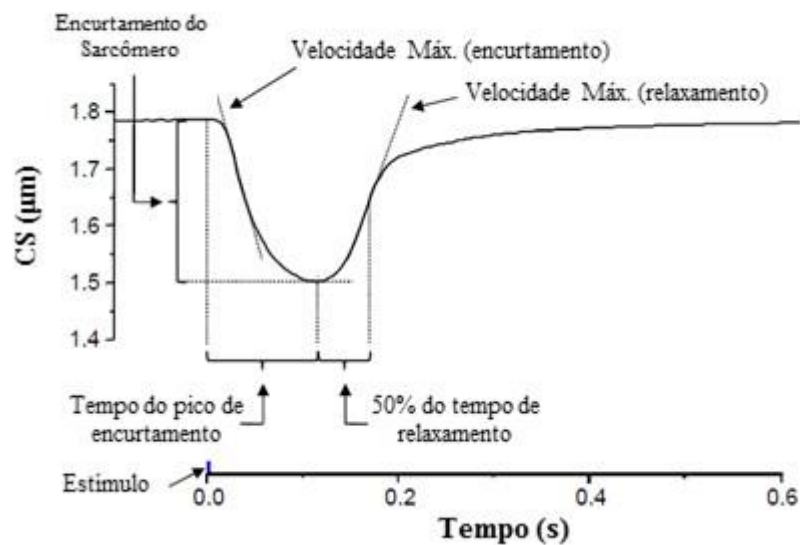


Figura 8. Representação esquemática do encurtamento de cardiomiócito isolado e dos respectivos parâmetros da contração celular. CS: comprimento do sarcômero.

4.6.4 - Análise do trânsito de Ca^{+2} intracelular

As medidas do transiente da Ca^{+2} em cardiomiócitos isolados foram realizadas por sistema de medição de fluorescência (IonWizard, IonOptix, EUA) que sincroniza o controle da luz de excitação com a coleta a partir de sensores de emissão. Os cardiomiócitos foram incubados com Fura 2AM (Molecular Probes®, Eugene, OR, USA) $1\mu\text{M}$, indicador de fluorescência para cálcio intracelular, por 20 minutos, lavados com solução *Tyrodee* mantidos em temperatura ambiente. Posteriormente os cardiomiócitos foram estimulados a 1 Hz (Myopacer 100, Ionoptix Inc.) com as seguintes configurações: duração: 2 ms; estimulação contínua pulso bifásico; voltagem: ajustada a 120% da tensão de limiar que induz as cinéticas de Ca^{2+} . As imagens de fluorescência foram obtidas usando excitação de 340 nm a 380 nm e emissão de intensidade de fluorescência detectada em aproximadamente 510 nm. As seguintes variáveis foram analisadas: amplitude de Ca^{+2} , Ca^{+2} sistólico, velocidade de liberação de Ca^{+2} , velocidade de recaptura de Ca^{+2} , tempo até o pico de Ca^{+2} e tempo para 50% do decaimento de Ca^{+2} .

4.7 ANÁLISES DO ESTRESSE OXIDATIVO

4.7.1 Peroxidação lipídica

Foram quantificadas as concentrações de malondialdeído (MDA), uma das principais substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), importante produto da peroxidação lipídica no soro. O MDA reage com TBARS formando a substância 1:2 MDA-TBA que possui absorvância de 532nm, dessa forma a quantidade de TBARS foi calculada usando a curva padrão de MDA sendo expressa em nmol/mg de proteína⁷⁹. A concentração foi determinada de acordo com método de Uchiyama and Mihara⁸⁰.

4.7.2 Carbonilação de Proteínas

As proteínas carboniladas foram mensuradas utilizando método inespecífico que consiste na utilização do derivatizador 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) e detecção espectrofotométrica de quaisquer proteínas modificadas pelo processo de

carbonilação⁸¹. As concentrações de proteínas carboniladas foram expressas em nmol de DNPH/mg de proteína. As concentrações de proteínas totais foram mensuradas por método de Bradford. Este método foi realizado nas instalações da UNIPEX (Unidade de Pesquisa Experimental) da Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB, Universidade Estadual Paulista – Unesp.

4.7.3 Atividade das Enzimas Antioxidantes

4.7.3.1 SOD

A atividade de SOD foi determinada pelo método adaptado de S. Marklund e G. Marklund (1974)⁸², baseado na inibição da reação do radical superóxido com o pirogalol. O superóxido é gerado pela auto-oxidação do pirogalol em meio básico (pH 8,5). A SOD presente na amostra analisada compete pelo radical superóxido com o sistema de detecção. A oxidação do pirogalol foi detectada espectrofotometricamente a 420 nm. Assim, a atividade de SOD foi determinada no soro medindo a velocidade de formação do pirogalol oxidado. O meio de reação foi montado com 15 uL de soro, tampão tris 50 mmol/L (pH 8,5) e pirogalol 24 mmol/L. Os resultados foram expressos em unidades por miligramas de proteína por minuto. Este método foi realizado nas instalações da UNIPEX (Unesp, Faculdade de Medicina de Botucatu, Botucatu, São Paulo, Brasil).

4.7.3.2 Catalase

A atividade da Catalase foi diretamente proporcional à taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio, sendo assim, é possível medir sua atividade através do consumo do H₂O₂. Este teste consiste em avaliar a redução da absorvância no comprimento de onda de 240 nm, onde ocorre maior absorção pelo peróxido de hidrogênio. De acordo com o método adaptado de Aebi (1984)⁸³ e modificado por Pieper e colaboradores (1995)⁸⁴, para realização deste ensaio foram utilizados: 15 uL de soro, solução tampão-fosfato a 50 mmol/L (pH=7,0) e peróxido de hidrogênio 25 mmol/L. Os resultados foram expressos em picomoles por miligramas de proteína por

minuto. Este método foi realizado nas instalações da UNIPEX (Unesp, Faculdade de Medicina de Botucatu, Botucatu, São Paulo, Brasil).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram exibidos por meio de medidas descritivas de posição e variabilidade. A comparação da evolução do peso corporal e níveis glicêmicos foi realizada por ANOVA no modelo de medidas repetidas para modelo de dois fatores e complementada com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Para comparação entre dois grupos foram utilizados teste *t de Student's'* para dados paramétricos e *Mann-Whitney* para dados não paramétricos. As comparações entre três grupos foram realizadas por ANOVA *uma via*, complementada com teste *post-hoc* de Bonferroni ou Dunn's, quando apropriado. O nível de significância considerado para todas as variáveis foi de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 INDUÇÃO E EXPOSIÇÃO À OBESIDADE

No início do protocolo experimental os grupos C e Ob possuíam médias de peso corporal semelhantes, porém na 7ª semana os animais do grupo Ob apresentaram peso significativamente maior, sendo considerado o momento de início da obesidade. Posteriormente os grupos seguiram por 5 semanas de exposição a obesidade (Figura 9), porém durante o período de exposição houve perda de 27 animais do grupo Ob e 6 animais do grupo C, devido a aplicação do ponto de separação e 9 animais por mortes sem causas determinadas do grupo Ob. Dessa forma os grupos foram compostos por Ob (n = 38) e C (n = 10).

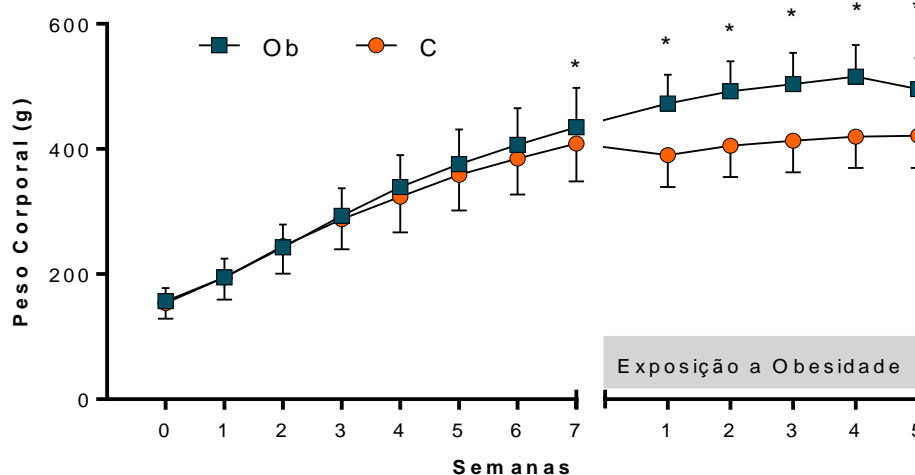


Figura 9. Evolução de peso corporal no período de indução à obesidade de 7 semanas, grupo obeso (Ob, n = 74) e grupo controle (C, n = 16) e exposição a obesidade de 5 semanas, Ob, (n = 38) e C (n = 10). Dados expressos em média \pm desvio padrão. $p < 0,05$; *(Ob vs C). ANOVA *duas vias* para medidas repetidas, complementada com teste *post-hoc* de Bonferroni.

A Tabela 1 mostra as características dos grupos C e Ob nos períodos de indução e exposição à obesidade (semanas 0 a 12ª). Ao fim do protocolo de indução e exposição à obesidade, o grupo Ob apresentou peso corporal final e ganho de peso significativamente maiores que o grupo C. O grupo obeso apresentou menor consumo

alimentar, em contrapartida, obteve maior ingestão calórica e eficiência alimentar comparado ao grupo controle.

Tabela 1. Características nutricionais dos grupos nos períodos de indução e exposição à obesidade.

Variáveis	Grupos	
	C (n=10)	Ob (n=38)
PCF (g)	420± 50	516± 50*
Ganho de peso (g)	277± 40	352± 46*
Consumo alimentar (g/dia)	23,4± 3,7	20,0± 1,9*
Ingestão calórica (kcal/dia)	68,3± 10,8	78,11± 7,5*
Eficiência Alimentar (%)	5,31± 0,61	5,84± 0,38*

Ob: obeso e ObD: Obeso diabético; PCF: peso corporal final. Período de exposição à obesidade (semanas 0 a 12^a). Dados expressos em média ± desvio-padrão. p<0,05; *(Ob vs C). Teste *t de Student's*.

5.2 RECOMPOSIÇÃO DOS GRUPOS

Após período de indução e exposição à obesidade, os animais obesos foram redistribuídos quanto à presença ou ausência do diabetes e tratamento com as farinhas da casca e semente de lichia. Desta forma os grupos foram compostos por:

- Obeso (Ob); n= 10
- Obeso Diabético (ObD); n= 8
- Obeso Diabético (ObDFC); n=10
- Obeso Diabético (ObDFS); n= 10

5.3 INDUÇÃO AO DIABETES

Foram considerados diabéticos os animais obesos que 72h após aplicação da estreptozotocina apresentaram glicemia de jejum maior que 200 mg/dL (MAN et al., 2016; IRONDI et al., 2015). Os animais obesos que não foram induzidos ao diabetes, receberam dose equivalente de solução de citrato. Foram mensuradas a glicemia de jejum de ambos os grupos antes e 72 após a aplicação da droga (Figura 10). Não houve diferença estatística no grupo Ob no momento pré e pós aplicação da droga, e, entre o grupo Ob e ObD no momento pré-droga. No entanto, os animais ObD apresentaram maior nível glicêmico entre os momentos pré e pós aplicação da droga; o mesmo resultado foi visualizado entre os grupos ObD e Ob pós estreptozotocina/citrato, caracterizando a instalação do diabetes no grupo ObD.

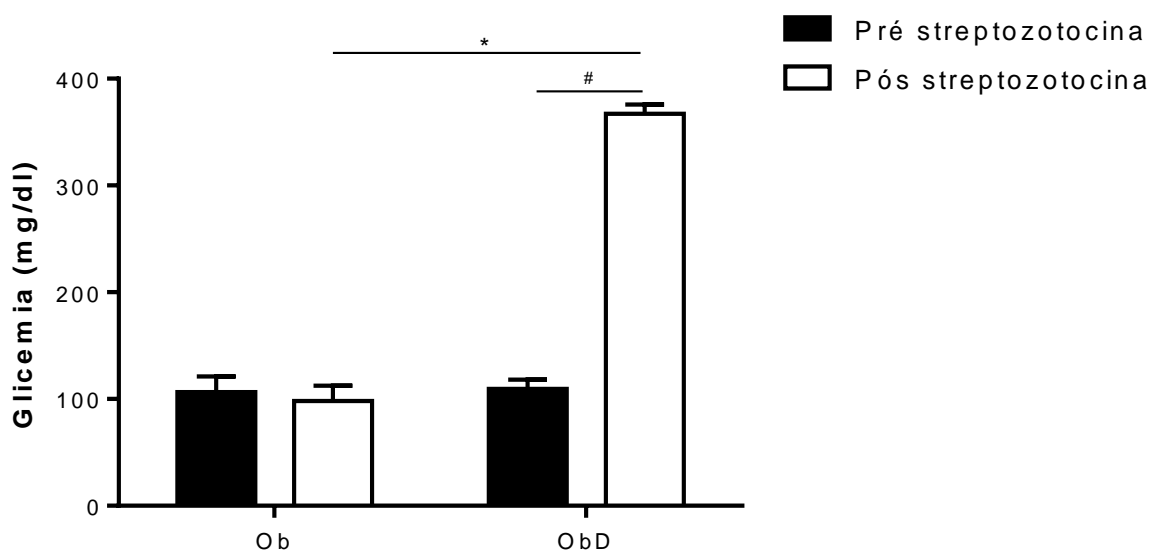


Figura 10. Glicemia dos grupos nos momentos pré e pós aplicação da streptozotocina ou solução citrato. Grupo obeso (Ob, n = 10) e grupo obeso diabético (ObD, n = 28). Dados expressos em média \pm desvio padrão. $p < 0,05$ *(Ob pós vs ObD pós), #(ObD pré vs pós). ANOVA *duas vias* para medidas repetidas, complementada com teste *post-hoc* de Bonferroni.

A Figura 11 ilustra a evolução do peso corporal e a redistribuição do grupo Ob em 2 grupos, quanto a presença ou ausência de indução do diabetes (Ob; ObD). Assim, as últimas 5 semanas visualizadas na Figura 3, foram caracterizadas como período de exposição ao diabetes. Embora os animais do grupo Ob e ObD tenham sido randomizados com médias de peso corporal semelhantes, após a

indução do diabetes os animais do grupo ObD iniciaram processo de perda de peso, mantendo diferença significativa de peso corporal durante todo o protocolo de exposição ao diabetes (Figura 3).

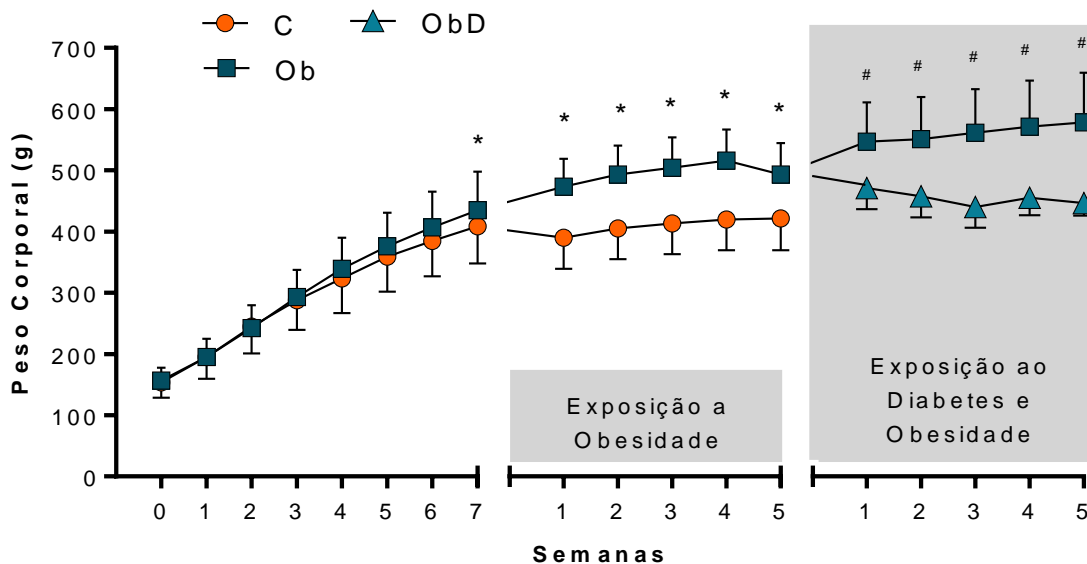


Figura 11. Evolução de peso corporal no período de indução e exposição à obesidade. Período de indução à obesidade de 7 semanas, grupo obeso (Ob, n = 74) e grupo controle (C, n = 16), exposição a obesidade de 5 semanas, Ob, (n = 38) e C (n = 10). e exposição ao diabetes representado pelas últimas 5 semanas da 13ª a 17ª Semana. Ob (n = 10) e obeso diabético (ObD: n = 8). Dados expressos em média ± desvio padrão. $p < 0,05$ *(Ob vs C), #(Ob vs ObD). ANOVA *duas vias* para medidas repetidas, complementada com teste *post-hoc* de Bonferroni.

A Tabela 2 ilustra as características nutricionais dos grupos. Apesar do grupo ObD apresentar maior ingestão alimentar e calórica durante o período de exposição ao diabetes, a eficiência alimentar na condição de diabético foi significativamente menor comparado com o grupo obeso.

Tabela 2. Características nutricionais dos grupos experimentais.

Variáveis	Grupos	
	Ob (n=10)	ObD (n=8)
Consumo alimentar (g/dia)	19,8± 3,1	23,4 ± 3,1*
Ingestão calórica (kcal/dia)	75,7± 11,7	89,2 ± 12*
Eficiência Alimentar (%)	1,46 ± 0,62	-1,36 ± 0,69*

Período de exposição ao diabetes (semanas 13^a a 17^a). Ob: obeso e ObD: Obeso diabético. Dados expressos em média ± desvio-padrão. p<0,05; *(Ob vs ObD). Teste *t de Student's*.

Na Tabela 3 estão expostas as características gerais dos grupos Ob e ObD. Inicialmente, antes da indução ao diabetes, os grupos apresentavam peso corporal semelhante, no entanto, o peso corporal final dos animais ObD foi menor comparado ao grupo Ob. O grupo ObD apresentou menor ganho de peso corporal, menores depósitos de gordura epididimal, visceral, retroperitoneal e somatório de gordura corporal e índice de adiposidade comparado ao grupo Ob.

Tabela 3. Características gerais dos grupos experimentais.

Variáveis	Grupos	
	Ob(n=10)	ObD (n=8)
PCI	530 ± 64	499 ± 42
PCF	579 ± 81	447 ± 21*
Ganho de Peso (g)	48,3 ± 27,7	-52,6 ± 30,7*
Gordura Epididimal (g)	11,0 ± 3,4	6,45 ± 1,41*
Gordura Visceral (g)	12,4 ± 4,7	4,98 ± 1,60*
Gordura Retroperitoneal (g)	23,6 ± 7,4	11,2 ± 4,3*
Somatório de Gordura Corporal (g)	47,0 ± 15	22,6 ± 6,6*
Índice de Adiposidade (%)	7,98 ± 1,66	5,05 ± 1,40*

Ob: obeso e ObD: Obeso diabético; PCI: peso corporal inicial; PCF: peso corporal final; Dados expressos em média ± desvio-padrão. p<0,05; *(Ob vs ObD). Teste *t de Student's*.

Quanto aos parâmetros morfológicos, observa-se na Tabela 4 que o grupo ObD apresentou menor peso total de pâncreas e comprimento de sarcômero em relação do grupo Ob. No entanto, não houve diferença significativa entre o peso total do

fígado, pulmão e coração, bem como, no comprimento da tíbia e na relação coração/tíbia.

Tabela 4. Parâmetros morfológicos.

Variáveis	Grupos	
	Ob (n=10)	ObD (n=8)
Fígado (g)	13,8 ± 2,5	13,3 ± 1,3
Pâncreas (g)	0,98 ± 0,11	0,82 ± 0,17*
Pulmão (g)	2,00 ± 28	1,95 ± 0,14
Tíbia (cm)	4,39 ± 0,14	4,30 ± 0,13
Coração Total (g)	2,03 ± 0,55	1,94 ± 0,34
Coração/Tíbia (g/cm)	0,46 ± 0,11	0,45 ± 0,09
Comprimento do sarcômero (µm) [§]	1,74 ± 0,08	1,71 ± 0,09*

Ob: obeso e ObD: Obeso diabético. Dados expressos em média ± desvio-padrão. p<0,05; *(Ob vs ObD).§: Ob (n=126 células) e ObD (n=114 células). Teste *t de Student's*

Na Tabela 5 estão apresentados os percentuais de umidade dos tecidos hepático e pulmonar. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos Ob e ObD.

Tabela 5. Percentual de umidade dos tecidos pulmonar e hepático.

Variáveis	Grupos	
	Ob (n=10)	ObD (n=8)
Fígado (%)	65,3 ± 1,4	66,2 ± 1,7
Pulmão (%)	80,8 ± 2,4	79,9 ± 0,9

Ob: obeso e ObD: Obeso diabético. Dados expressos em média ± desvio-padrão. Teste *t de Student's*.

Os parâmetros de estresse oxidativo sérico estão expostos na Figura 12. Não foi observada diferença estatística entre os grupos Ob e ObD para a dosagem de MDA e catalase. No entanto, o grupo ObD apresentou aumento significativo na carbonilação protéica e atividade da SOD comparado ao grupo Ob.

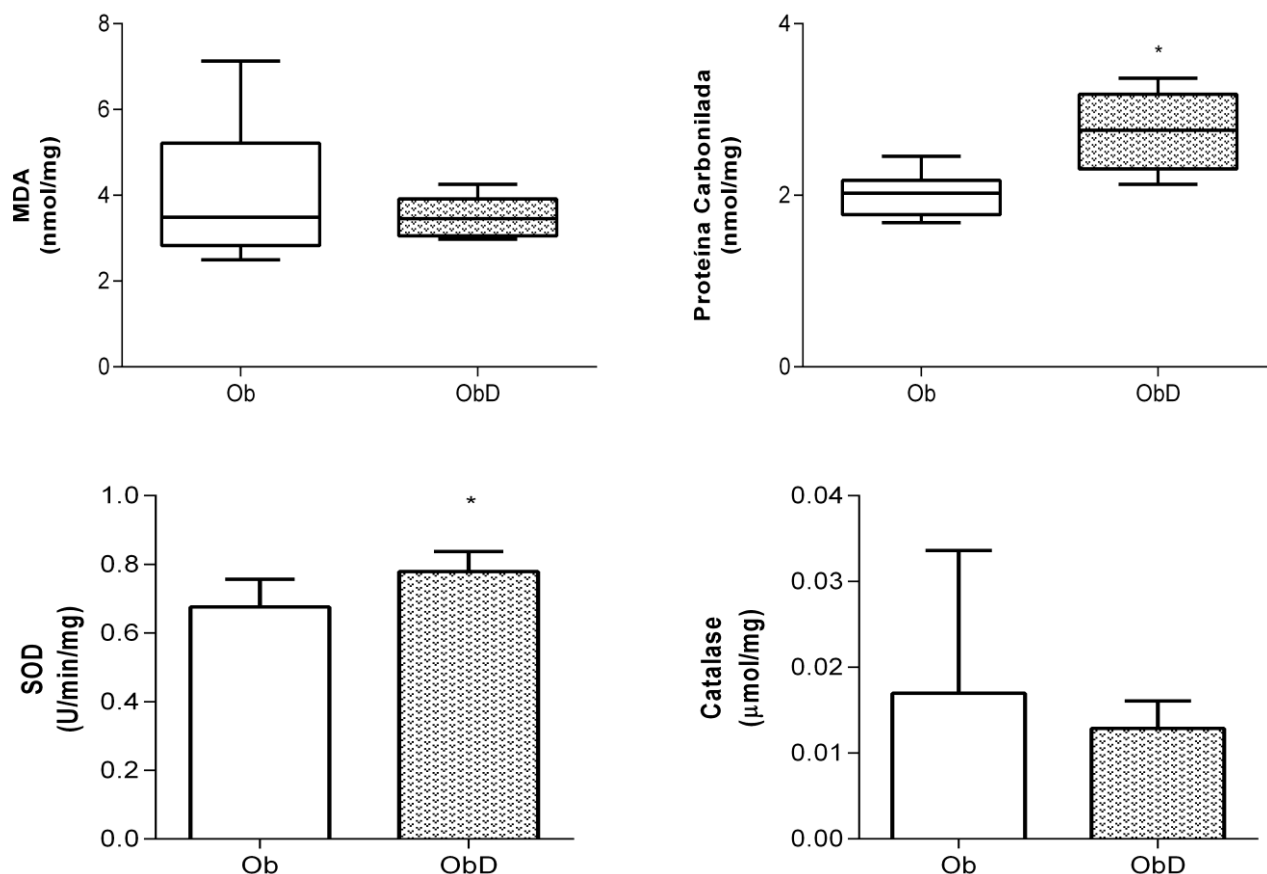


Figura 12. Parâmetros de estresse oxidativo séricos entre animais obesos e obesos diabéticos. MDA: Malondialdeído, SOD: superóxido dismutase. Ob: obeso (n = 8) e ObD: Obeso diabético (n = 8). Dados expressos em mediana \pm intervalos interquartíis. $p < 0,05$; *(Ob vs ObD). Teste *t* de Student's e Mann-Whitney.

A Figura 13 ilustra os parâmetros de contratilidade cardíaca de cardiomiócitos isolados estimulados a 1 Hz. O grupo ObD demonstrou valores significativamente maiores para as variáveis de percentual de encurtamento, tempo até 50% do encurtamento e velocidade máxima de relaxamento. No entanto, não foram observadas diferenças significativas nos demais parâmetros.

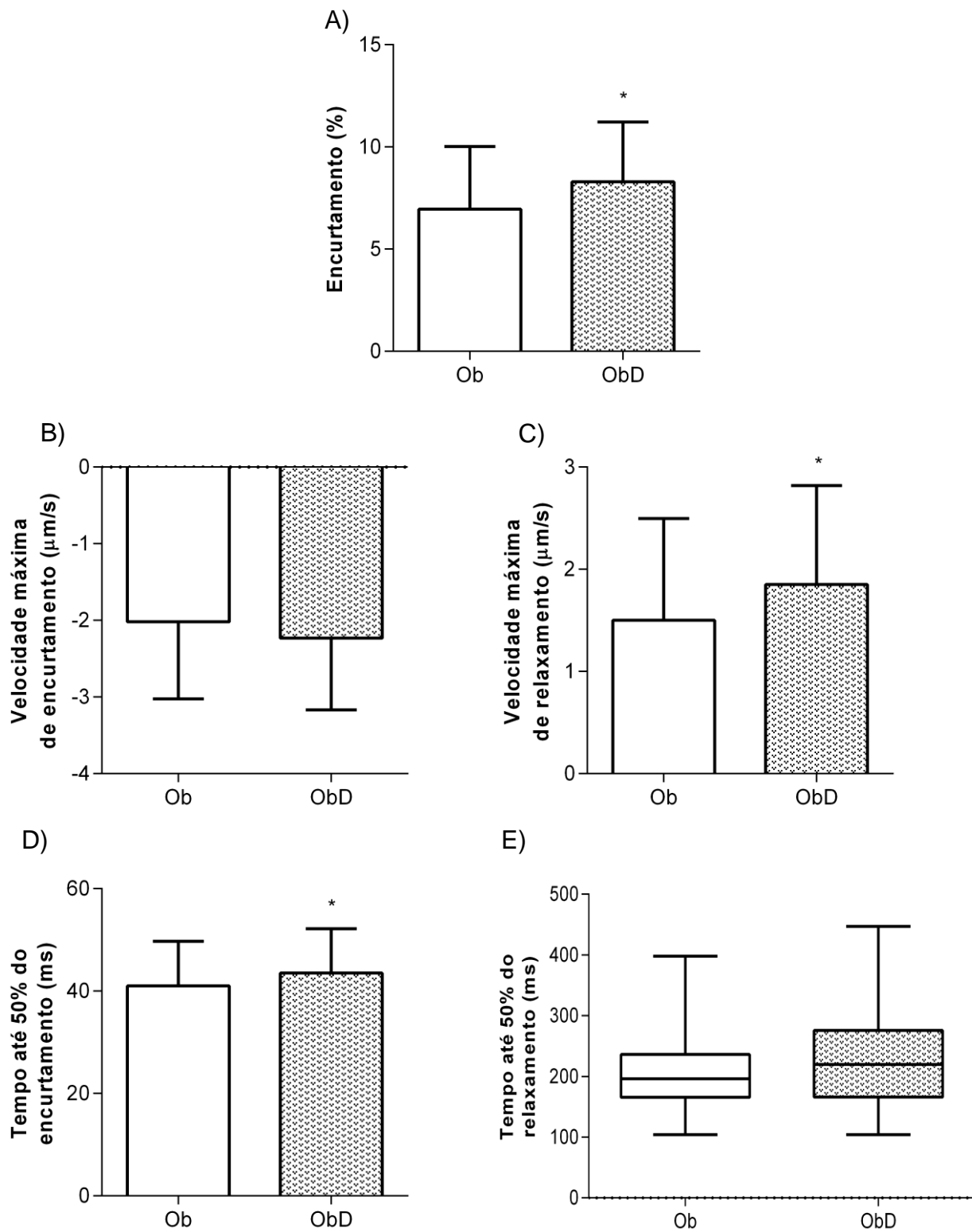


Figura 13. Parâmetros funcionais de contratilidade de cardiomiócitos isolados estimulados a 1 Hz de animais obesos e obesos diabéticos. Ob: Obeso (n = 6, células = 126) e ObD: Obeso diabético (n = 5, células = 114). Dados expressos em média \pm desvio-padrão ou em mediana \pm intervalos interquartíis. $p < 0,05$; *(Ob vs ObD). Teste *t* de Student's e Mann-Whitney.

Na Figura 14 estão expostos os parâmetros da cinética intracelular de Ca^{2+} . O grupo ObD apresentou maiores concentrações de Ca^{2+} durante a sístole e diástole, além de maior tempo até 50% da recaptura de Ca^{2+} .

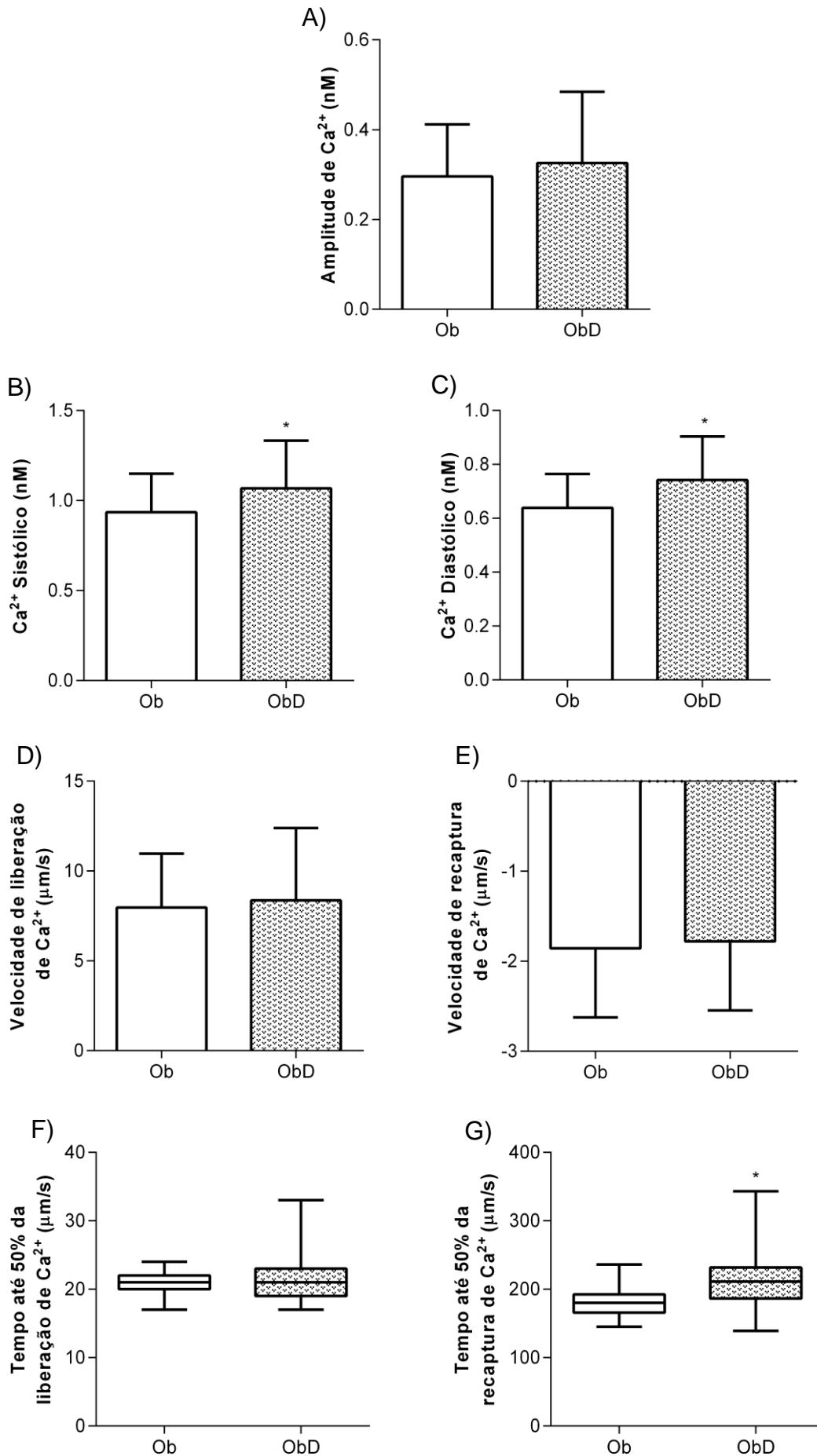


Figura 14. Parâmetros da cinética intracelular de Ca^{2+} de cardiomiócitos isolados estimulados a 1 Hz de animais obesos e obesos diabéticos. Ob: Obeso (n = 4, células = 50) e ObD: Obeso diabético (n = 4, células = 40). Dados expressos em média \pm desvio-padrão (Figura: A, B, C, D e E) ou expressos em mediana \pm intervalo interquartil (Figura: F e G). $p < 0,05$; *(Ob vs ObD). Teste *t* de Student ou *Mann-Whitney*.

5.4 TRATAMENTO DO DIABETES: EXPOSIÇÃO ÀS DIETAS EXPERIMENTAIS

Após a indução do diabetes, 2 grupos de animais obesos portadores de diabetes, receberam dietas contendo 10% de farinha da casca ou semente de lichia. A Figura 15 ilustra a evolução de peso corporal dos animais ao longo das 5 semanas de tratamento com a dieta experimental. Não foram observadas diferenças significativas no peso corporal entre os grupos durante período de tratamento.

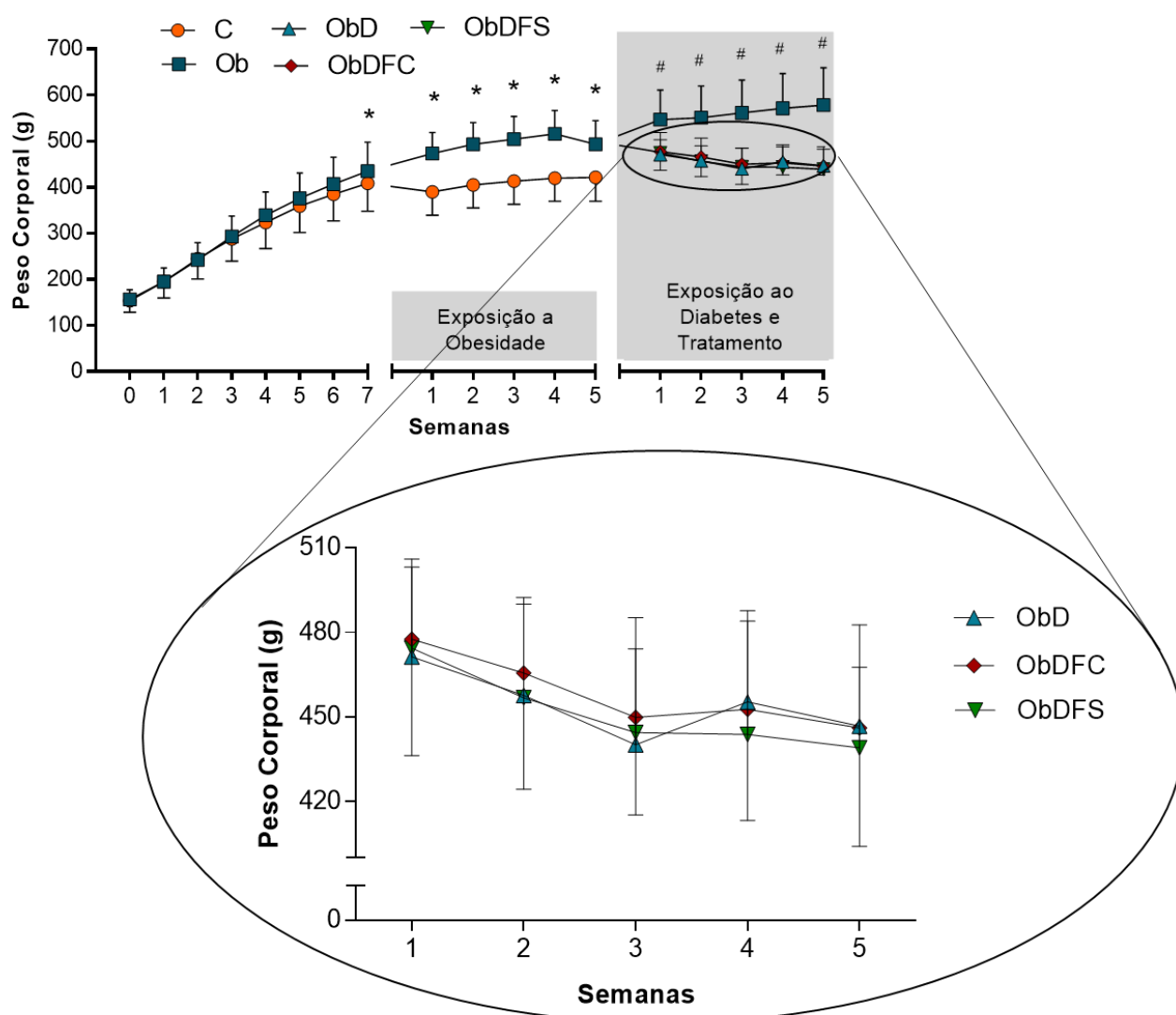


Figura 15. Evolução de peso corporal no período de tratamento com as farinhas da casca e semente de lichia durante 5 semanas. Período de indução à obesidade de 7 semanas, grupo obeso (Ob, n = 74) e grupo controle (C, n = 16). Período de exposição a obesidade de 5 semanas, Ob, (n = 38) e C (n = 10). Período de exposição ao diabetes e tratamento, representado pelas últimas 5 semanas da 13ª a 17ª Semana. Ob (n = 10), ObD: Obeso diabético (n = 8), ObDFC: Obeso diabético farinha da casca (n = 10) e ObDFS: Obeso diabético farinha da semente (n=10). Dados expressos em média \pm desvio padrão. $p < 0,05$ * (Ob vs C), # (Ob vs ObD). ANOVA *duas vias* para medidas repetidas, complementada com teste *post-hoc* de Bonferroni.

As características nutricionais dos grupos estão expostas na Tabela 6. O grupo ObDFS apresentou maior consumo alimentar comparado aos grupos ObD e ObDFC, porém não foram observadas diferenças quanto à ingestão calórica e eficiência alimentar.

Tabela 6. Características nutricionais durante o período de tratamento.

Variáveis	Grupos		
	ObD (n=8)	ObDFC (n=10)	ObDFS (n=10)
Consumo alimentar (g/dia)	23,4 ± 3,1	25,1 ± 4,4	20,5 ± 2,0 ^{&}
Ingestão calórica (kcal/dia)	89,2 ± 12,0	96,0 ± 16,7	83,1 ± 8,1
Eficiência Alimentar (%)	-1,36 ± 0,69	-1,41 ± 1,29	-2,41 ± 1,74

ObD: Obeso diabético, ObDFC: Obeso diabético farinha da casca e ObDFS: Obeso diabético farinha da semente. Dados expressos em média ± desvio-padrão. p<0,05; *(ObDFC vs ObD); #(ObDFS vs ObD); &(ObDFC vs ObDFS). ANOVA uma via, complementada com teste post-hoc de Bonferroni.

Os grupos iniciaram o período de tratamento com peso corporal semelhante. Contudo, não houve efeito pós tratamento relacionados ao peso corporal final, depósitos de gordura corporal e índice ao índice de adiposidade (Tabela 7).

Tabela 7. Características gerais durante o período de tratamento.

Variáveis	Grupos		
	ObD (n=8)	ObDFC (n=10)	ObDFS (n=10)
PCI	499 ± 42	509 ± 55	523 ± 36
PCF	447 ± 21	446 ± 42	439 ± 44
Ganho de Peso (g)	-52,6 ± 30,7	-62,5 ± 52,4	-84,2 ± 57,5
Gordura Epididimal (g)	6,45 ± 1,41	6,44 ± 2,57	6,96 ± 1,80
Gordura Visceral (g)	4,98 ± 1,60	4,47 ± 1,74	5,91 ± 2,43
Gordura Retroperitoneal (g)	11,2 ± 4,3	9,54 ± 4,71	11,9 ± 5,7
Gordura Total (g)	22,6 ± 6,6	20,5 ± 8,4	24,8 ± 9,7
Índice de Adiposidade (%)	5,05 ± 1,40	4,54 ± 1,64	5,52 ± 1,57

ObD: Obeso diabético, ObDFC: Obeso diabético farinha da casca e ObDFS: Obeso diabético farinha da semente. Dados expressos em média ± desvio-padrão. ANOVA uma via.

Na Figura 16 estão representadas as glicemias dos animais ao fim do protocolo experimental. Não ocorreu diferença significativa entre os grupos.

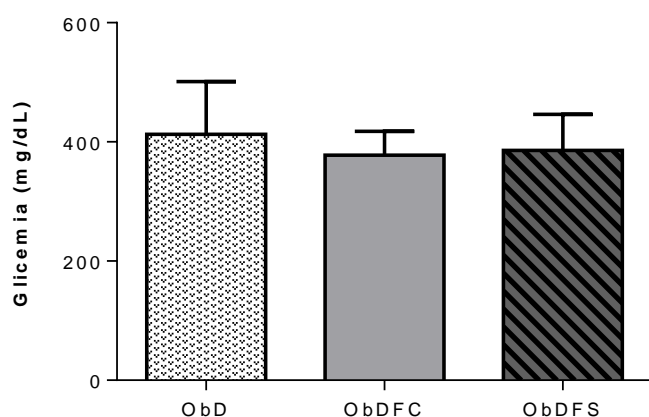


Figura 16. Glicemia dos animais diabéticos tratados com farinhas da casca e semente de lichia. ObD: Obeso diabético (n = 8), ObDFC: Obeso diabético farinha da casca (n = 10) e ObDFS: Obeso diabético farinha da semente (n = 10). Dados expressos em média \pm desvio-padrão. ANOVA *uma via*.

Quanto aos parâmetros morfológicos exibidos na Tabela 8, os grupos não apresentaram diferença entre os pesos do fígado, pâncreas, pulmão e coração total, bem como na relação coração/tíbia. O grupo ObDFS apresentou menor comprimento de sarcômero em relação ao grupo tratado com farinha de casca. Os grupos apresentaram percentuais de umidade do fígado e pulmão semelhantes, como demonstrado na Tabela 9.

Tabela 8. Parâmetros morfológicos.

Variáveis	Grupos		
	ObD (n=8)	ObDFC (n=10)	ObDFS (n=10)
Fígado (g)	13,3 ± 1,3	14,4 ± 2,3	13,3 ± 1,8
Pâncreas (g)	0,82 ± 0,17	0,88 ± 0,16	0,92 ± 0,11
Pulmão (g)	1,95 ± 0,14	1,92 ± 0,27	1,89 ± 0,10
Tíbia (cm)	4,30 ± 0,13	4,30 ± 0,09	4,32 ± 0,14
Coração Total (g)	1,94 ± 0,34	1,79 ± 0,51	2,09 ± 0,11
Coração/Tíbia (g/cm)	0,45 ± 0,09	0,42 ± 0,12	0,48 ± 0,03
Comprimento do sarcômero (µm) [§]	1,71 ± 0,09	1,73 ± 0,08	1,69 ± 0,13 ^{&}

ObD: Obeso diabético, ObDFC: Obeso diabético farinha da casca e ObDFS: Obeso diabético farinha da semente. §: ObD (n= 114 células), ObDFC (n= 109 células), ObDFS (n= 112 células). Dados expressos em média ± desvio-padrão. p< 0,05; *(ObDFC vs ObD); #(ObDFS vs ObD);&(ObDFC vs ObDFS). ANOVA *uma via*, complementada com teste *post-hoc* de Bonferroni

Tabela 9. Percentual de umidade dos tecidos pulmonar e hepático.

Variáveis	Grupos		
	ObD (8)	ObDFC (10)	ObDFS (10)
Fígado (%)	66,2 ± 1,7	65,1 ± 5,1	65,6 ± 4,51
Pulmão (%)	79,9 ± 0,9	80,8 ± 4,4	79,8 ± 1,0

ObD: Obeso diabético, ObDFC: Obeso diabético farinha da casca e ObDFS: Obeso diabético farinha da semente. Dados expressos em média ± desvio-padrão. ANOVA *uma via*.

Na Figura 17 estão representados os resultados relacionados aos parâmetros de estresse oxidativo. Os tratamentos com as farinhas da casca e semente de lichia não foram capazes de alterar as concentrações de MDA, proteína carbonilada, SOD e catalase entre os grupos.

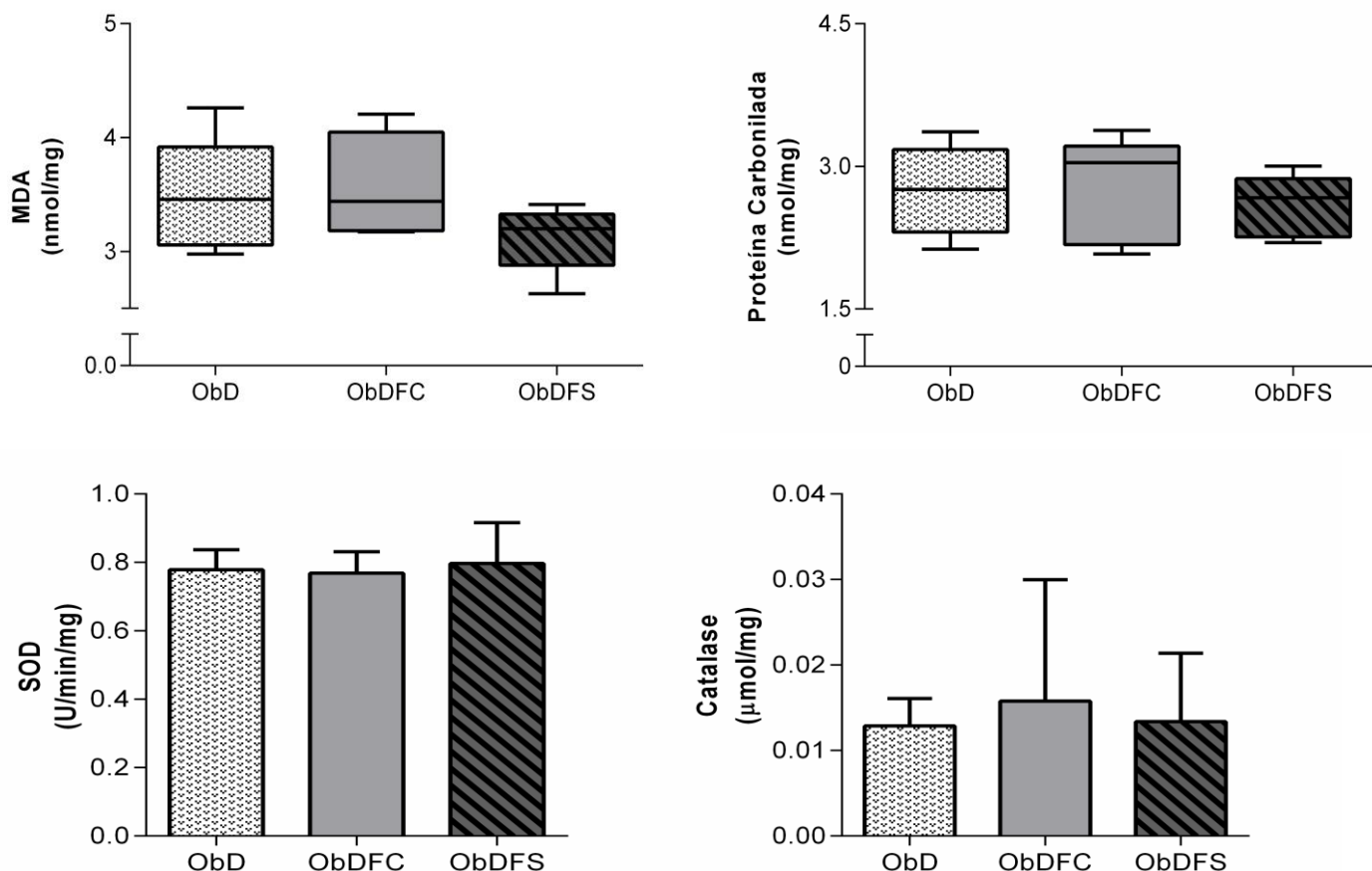


Figura 17. Parâmetros de estresse oxidativo dos animais tratados com farinhas da casca e semente de lichia. MDA: Malondialdeído, ObD: Obeso diabético (n = 8), ObDFC: Obeso diabético farinha da casca (n=7) e ObDFS: Obeso diabético farinha da semente (n = 8). Dados expressos em mediana \pm intervalo interquartil. ANOVA *uma via*.

Os parâmetros funcionais de contratilidade de cardiomiócitos isolados estimulados a 1 Hz estão expostos na Figura 18. O grupo ObDFC apresentou maior tempo até 50% do encurtamento em comparação ao grupo ObD. Entretanto o grupo ObDFS apresentou menor percentual de encurtamento e velocidade máxima de encurtamento, no entanto, demonstrou maior tempo até 50% do encurtamento em comparação com o grupo ObD. Na comparação entre os tratamentos, o grupo ObDFS apresentou menor velocidade máxima de relaxamento e maior tempo até 50% do relaxamento comparado ao grupo ObDFC.

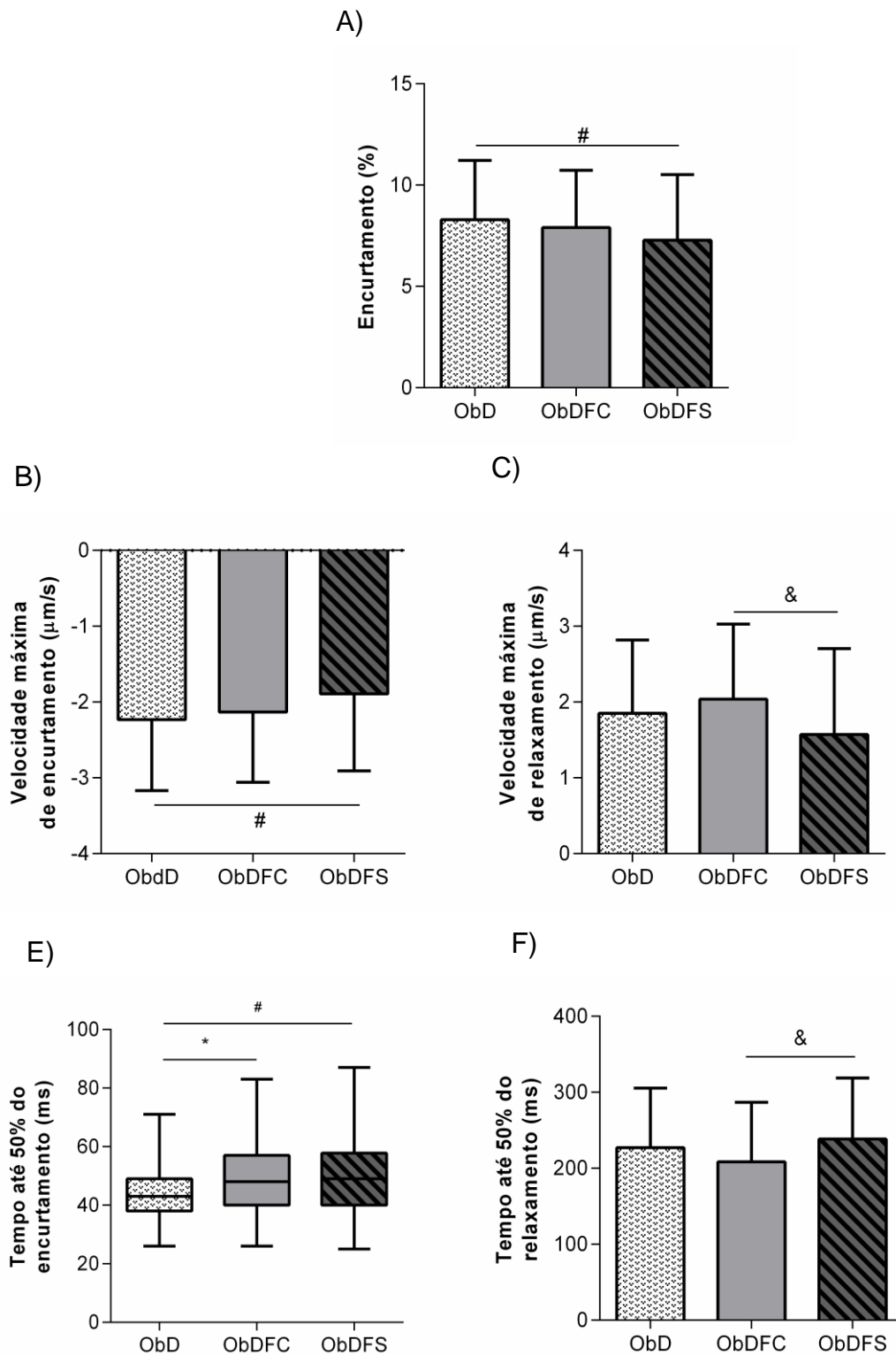


Figura 18. Parâmetros funcionais de contratilidade de cardiomiócitos isolados estimulados a 1 Hz de animais tratados com a farinha da casca e semente de lichia. ObD: Obeso diabético (n= 5, células = 114), ObDFC: Obeso diabético farinha da casca (n= 5, células = 109) e ObDFS: Obeso diabético farinha da semente (n= 7, células= 112). Dados expressos em média \pm desvio-padrão (Figura: A, B, C, D, F) ou expressos em mediana \pm intervalo interquartil (Figura: E). $p < 0,05$; *(ObDFC vs ObD); #(ObDFS vs ObD); &(ObDFC vs ObDFS). ANOVA *uma via*, complementada com teste *post-hoc* de Bonferroni.

Na Figura 19 estão demonstrados os parâmetros da cinética de Ca^{2+} em cardiomiocitos isolados. Embora os níveis de Ca^{2+} diastólicos sejam inferiores nos ratos ObDFS, não houve diferença significativa quando comparado ao grupo ObD ($p=0,056$). Para nenhum dos outros parâmetros foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos.

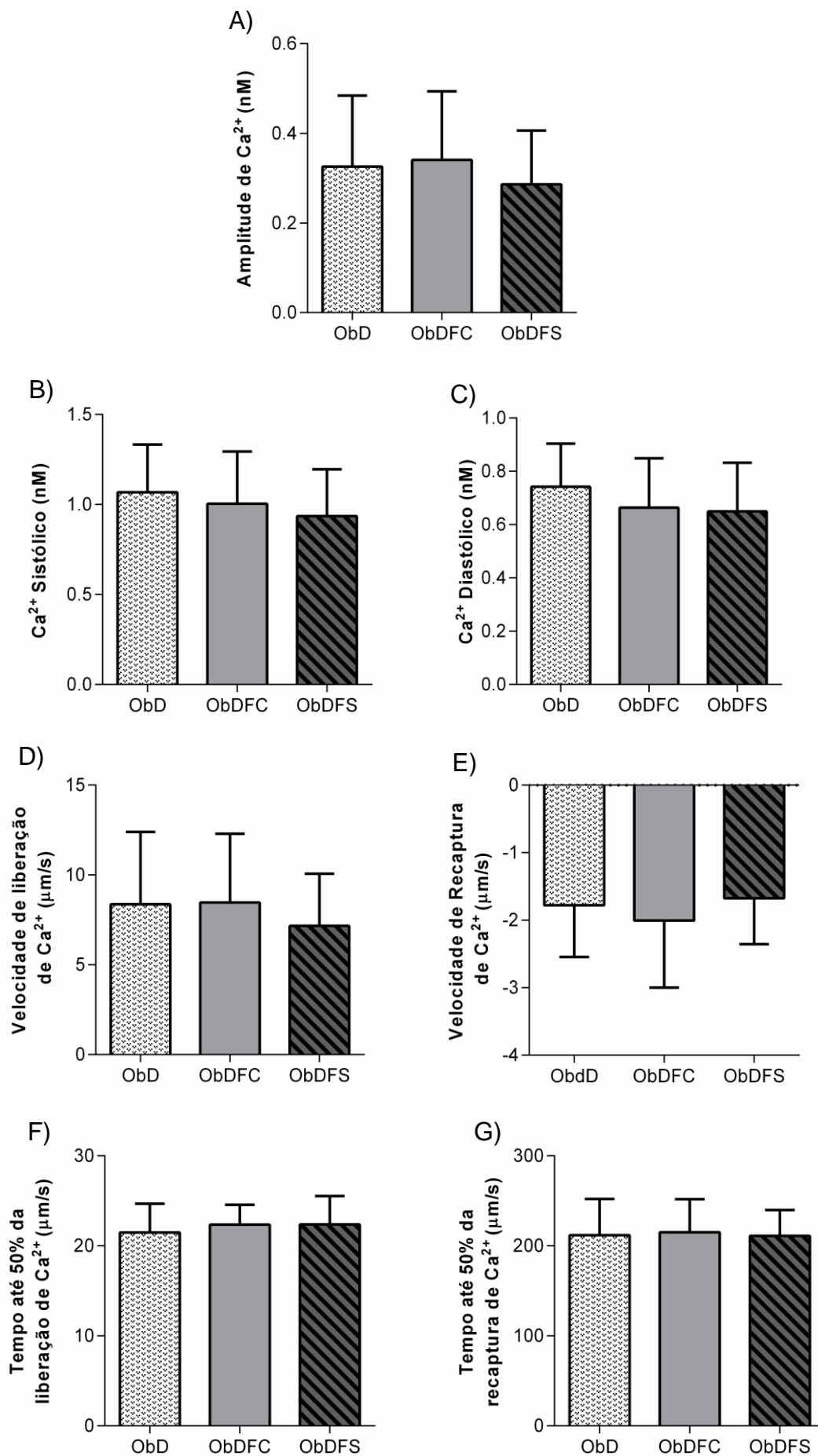


Figura 19. Parâmetros da cinética intracelular de Ca^{2+} de cardiomiócitos isolados estimulados a 1 Hz de animais tratados com a farinha da casca e semente de lichia. ObD: Obeso diabético (n= 4, células = 40), ObDFC: Obeso diabético farinha da casca (n=5, células = 39) e ObDFS: Obeso diabético farinha da semente (n= 4, células = 45). Dados expressos em média \pm desvio-padrão. $p < 0,05$; * (ObDFC vs ObD); # (ObDFS vs ObD); & (ObDFC vs ObDFS). ANOVA *uma via*, complementada com teste *post-hoc* de Bonferroni.

6 DISCUSSÃO

Devido ao maior aporte calórico ofertado por dieta hiperlipídica saturada oferecida ao grupo Ob, na 7ª semana de indução à obesidade os animais apresentaram diferença de peso corporal significativa em relação ao grupo C, diferença que se manteve por todo o período de exposição a obesidade. Outros trabalhos demonstraram que dietas hiperlipídicas são eficientes na indução à obesidade, levando à diferença de peso entre os grupos Ob e C^{63,68}.

Mesmo com maior consumo calórico o grupo Ob apresentou menor ingestão alimentar comparada ao grupo C, esse fato pode ser atribuído à regulação do apetite proporcionada pela leptina. A leptina é hormônio produzido pelas células adiposas e outros tecidos periféricos⁸⁵, que possui função de reduzir a fome⁸⁶, em contrapartida outros trabalhos mostram a resistência à ação da leptina em obesos^{63,87}. Outro mecanismo que pode explicar a diminuição do consumo alimentar no grupo Ob é o consumo de dieta hiperlipídica, uma vez que o consumo de dieta rica em gordura leva a contração da vesícula biliar com consequente maior liberação de bile no intestino, que possui entre os seus componentes os ácidos biliares⁸⁸. Estudo com roedores mostraram que os ácidos biliares agem em receptor responsável por estimular a secreção de hormônios reguladores do apetite⁸⁹. A neurotensina é um neuropeptídeo que possui a ação central de suprimir a alimentação, podendo contribuir para a regulação do balanço energético⁹⁰. Além disso, o PYY é hormônio peptídeo produzido no intestino no período pós-prandial e tem a função de aumentar a saciedade⁹¹. No entanto os animais do grupo Ob apresentaram maior eficiência alimentar comparado ao grupo C, resultante de uma melhor capacidade metabólica em converter a energia consumida em ganho de peso, resultado similar também foi encontrado por outros autores^{63,92}.

Após ser estabelecida a obesidade os animais foram induzidos ao diabetes tipo 2 pela aplicação de estreptozotocina (30 mg/kg de peso), denominado grupo ObD. Segundo Reuter (2007)⁹³, ratos alimentados com dieta hiperlipídica, desenvolvem resistência à insulina, no entanto, raramente desenvolvem hiperglicemia, sendo o grau dependente do conteúdo de gordura na dieta e do tempo de exposição. Outros estudos feitos por este grupo com a administração de dietas hiperlipídicas por longos períodos não foram capazes de detectar diabetes^{63,68,92}. Assim, com o intuito de

estabelecer um modelo experimental obeso diabético, utilizou-se protocolo semelhante ao proposto por Holmes e colaboradores (2015)⁹⁴ e Man e colaboradores (2016)³⁷ em que animais são submetidos à dieta hiperlipídica e posteriormente induzidos ao diabetes pela mesma dose de estreptozotocina. Os modelos experimentais de indução a diabetes são mais utilizados do que os modelos espontâneos, por serem mais facilmente obtidos, dessa forma estes animais induzidos são direcionados ao estudo da hiperglicemia, obesidade e síndrome metabólica e não ao processo auto-imune⁹⁵. A estreptozotocina age por afinidade nas células β pancreáticas, causando danos ou até mesmo necrose por seu efeito tóxico, resultando na inibição da secreção de insulina⁹⁶. Estudos elucidam que dose única elevada de estreptozotocina, entre 60 e 80 mg/kg^{97,98}, é capaz de promover diabetes tipo 1 em roedores, no entanto doses baixas utilizadas repetidas vezes (40mg/kg – 45 mg/kg, por 5 dias), também são capazes de promover o diabetes tipo 1^{99,100}. Em contrapartida, trabalhos mostram que baixa dose de estreptozotocina (30 mg/kg) aplicada 1 ou 2 vezes é capaz de induzir o diabetes tipo 2 em ratos submetidos à dieta hiperlipídica^{37,101}. O modelo de indução por estreptozotocina possui as vantagens do custo baixo, fácil aplicação e o consequente dano seletivo nas células β pancreáticas, mantendo as demais intactas, mimetizando as características metabólicas e história natural do diabetes tipo 2 desenvolvido em humanos^{93,95}. Desta forma, pesquisadores demonstraram que a aplicação da mesma dose de estreptozotocina associada ao consumo de dieta hiperlipídica foram capazes da indução do diabetes tipo 2^{37,101}. Reuter (2007)⁹³ reitera que o consumo de dieta hiperlipídica é fundamental para a instalação do diabetes tipo 2 em baixas doses de estreptozotocina, uma vez que animais alimentados com dieta padrão, tratados com a mesma dose, não desenvolvem diabetes.

No presente estudo, os animais do grupo ObD apresentaram maior consumo alimentar comparado ao grupo Ob, fato este atribuído à polifagia causada pelo diabetes⁴. Apesar do maior consumo alimentar e calórico no grupo ObD, os animais apresentaram perda de peso corporal significativa. Trabalhos com ratos diabéticos corroboram nossos achados, em que animais alimentados com dieta hiperlipídica e induzidos ao diabetes por estreptozotocina apresentam perda de peso apesar do maior consumo alimentar^{37,101}. O diabetes tipo 2 é geralmente assintomático, porém,

com menores frequências são relatados sintomas como, poliúria, polidipsia e emagrecimento, sintomas atribuídos à hiperglicemia⁴.

Considerando a composição corporal na condição de diabetes, incluindo o processo de emagrecimento, o grupo ObD apresentou quantidade significativamente menor de depósito de gordura corporal, concomitante com menor índice de adiposidade comparado ao grupo Ob. Apesar do maior consumo calórico, esses animais apresentaram menor capacidade em transformar energia consumida em ganho de peso corporal, em consequência de menor eficiência alimentar apresentada no diabetes. A redução dos depósitos de gordura corporal pode ser atribuída à resistência da ação da insulina no grupo ObD, pois, segundo Vergès (2010)¹⁰², a resistência à insulina promove lipólise no tecido adiposo visceral. A insulina tem a função de inibir a lipase hormônio sensível no tecido adiposo, dessa forma, possui ação antilipolítica, promovendo armazenamento de triglicerídeos nos adipócitos e diminuindo a liberação de ácidos graxos livres do tecido adiposo para a circulação¹⁰². O modelo experimental de obesidade acompanhado de diabetes proposto no presente estudo é análogo ao humano, a queda da hiperinsulinemia passa a não ser capaz de superar a resistência à insulina, sendo assim os animais desenvolvem hiperglicemia, portanto a obesidade colabora na resistência à insulina presente no diabetes tipo 2⁹⁴. Desta forma a resistência à insulina reduz o efeito inibitório da insulina sobre a lipase hormônio sensível no tecido adiposo, levando ao aumento da lipólise na gordura visceral intra-abdominal¹⁰², com consequente diminuição nos depósitos de gordura e perda de peso corporal no grupo ObD. Outros trabalhos corroboram esses achados, visualizando perda de peso e redução dos depósitos de gordura após a indução do diabetes^{37,94,101}.

No grupo ObD foi notado menor peso do pâncreas em comparação ao grupo Ob. Estudo com animais induzidos ao diabetes por estreptozotocina não demonstrou diferença no peso do pâncreas entre animais diabéticos e não diabéticos³⁷. No entanto outros trabalhos com modelo animal observaram diminuição no volume do pâncreas e massa de células β em animais induzidos ao diabetes^{103,104}. Em contrapartida em diversos estudos realizados com humanos são encontrados menor volume de pâncreas¹⁰⁵⁻¹⁰⁸. Estudo realizado com humanos em estágio inicial de diabetes tipo 2, demonstrou diminuição de 33% do volume do pâncreas e aumento de 23% nos

triglicerídeos pancreáticos, comparado com indivíduos normais¹⁰⁵. Rahier e colaboradores (2008)¹⁰⁸ também encontraram menor peso de pâncreas em indivíduos com diabetes tipo 2 com redução da massa de células β . O volume do pâncreas pode ser alterado após o defeito na secreção de insulina, fato este que ainda necessita de mais estudos¹⁰⁵. Estudo observou que o volume do pâncreas se relaciona positivamente ao índice insulinogênico, enquanto o conteúdo de gordura se relaciona positivamente ao índice de resistência à insulina¹⁰⁶. Philippe e colaboradores (2011)¹⁰⁷ afirmam que a falta de insulina endógena pode ser uma causa para a atrofia do pâncreas no diabetes crônico¹⁰⁷. Pesquisadores mostraram que quanto maior tempo de exposição ao diabetes há menor volume de pâncreas e maior conteúdo de gordura, é possível que a insuficiência de células β leve à diminuição do volume pancreático. Os autores enfatizam que o dano na função de células β pode ser causado pelo acúmulo de gordura no pâncreas, portanto dietas ricas em gordura aumentam os níveis de ácidos graxos circulantes levando à apoptose em virtude do maior estresse oxidativo na condição de diabetes¹⁰⁶. Desta forma, a obesidade é uma causa do declínio de função e massa de células β , causado provavelmente pelo acúmulo de gordura no pâncreas¹⁰⁹. Metanálise realizada por Garcia e colaboradores (2017)¹¹⁰, demonstrou que diminuição no tamanho do pâncreas e o aumento no conteúdo de gordura são considerados características da doença, porém mais estudos são necessários para a compreensão das causas e efeitos das condições morfológicas pancreáticas no diabetes, podendo gerar novas formas de prevenção e tratamento da doença.

Quanto aos parâmetros de estresse oxidativo o grupo ObD apresentou maior valor de proteína carbonilada e atividade da enzima SOD comparada ao grupo Ob. De acordo com BOLLINENI e colaboradores (2014)¹¹¹, a hiperglicemia presente no diabetes tipo 2 aumenta os níveis de carbonilação. A carbonilação é uma modificação oxidativa não enzimática de proteínas, considerada como biomarcador do estresse oxidativo, podendo levar à morte celular quando as proteínas danificadas não conseguem ser removidas¹¹¹. O estresse oxidativo aumentado no diabetes tipo 2 é atribuído à hiperglicemia crônica¹¹², causando glicosilação de macromoléculas, levando a modificações e perda de função biológica. A glicose em excesso pode ainda sofrer auto oxidação, formando ânion superóxido e carbonila¹¹³. Assim, as espécies

reativas de oxigênio (EROS) podem reagir com aminoácidos de proteínas susceptíveis à oxidação, gerando derivados de carbonil¹¹⁴.

Estudos com ratos diabéticos têm demonstrado estresse oxidativo decorrente de aumento carbonilação protéica. Diversos pesquisadores relatam aumento da carbonilação protéica nos tecidos pancreático, hepático, renal, cerebral e cardíaco de ratos diabéticos^{104,115}. Em contrapartida em trabalho realizado por Casoinic e colaboradores (2016)¹¹⁶ em indivíduos diabéticos, não apresentam diferença entre proteína carbonilada em comparação ao grupo controle.

Quando a molécula de glicose sofre enolização devido à autooxidação há aumentada produção de radicais livres de oxigênio, os quais podem resultar em peroxidação lipídica¹¹³. A lipoperoxidação consiste na reação em cadeia de ácidos graxos poliinsaturados de membrana, gerando radicais livres, com consequente produção de malondilaldeído (MDA), produto secundário, considerado um importante biomarcador desse processo¹¹⁷. Em trabalho realizado por Sayantan e colaboradores (2017)¹⁰⁴, houve aumento na peroxidação lipídica, no fígado, coração e rins de ratos diabéticos. Além disso, estudos realizados com animais induzidos ao diabetes mostram maior concentração sérica de MDA^{118,119}. A elevação das concentrações de MDA também foi visualizada em indivíduos diabéticos, os autores salientam que a terapia antioxidante poderia ser utilizada como ferramenta de tratamento na condição de Diabetes Mellitus tipo 2¹¹⁶. No entanto no presente estudo não foi possível verificar alteração nos níveis séricos de MDA. Enquanto os animais do presente estudo foram submetidos à 5 semanas de diabetes, outros autores mostram maior concentração de MDA em animais expostos à maior tempo de diabetes, 12 semanas¹¹⁹, demonstrando que o tempo de exposição pode influenciar as concentrações séricas de MDA.

As enzimas antioxidantes estão presentes nas células e consistem na primeira linha de defesa contra as EROS¹²⁰. A enzima SOD tem a função de converter o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, enquanto a enzima catalase converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular^{113,120}. Assim, enquanto a elevação das concentrações da enzima antioxidante SOD ocorre em resposta ao aumento do estresse oxidativo a alta produção de catalase está consequentemente ligada à maior produção de peróxido de hidrogênio¹¹⁴. No presente estudo, observamos elevação dos níveis séricos de SOD, não concomitante ao aumento dos

níveis de catalase. Dessa forma, a maior produção de SOD pode significar uma tentativa do organismo em combater a maior produção do radical superóxido, transformando esse radical em peróxido de hidrogênio. No entanto, esse aumento não foi proporcional ao aumento de catalase, sugerindo a não conversão total de peróxido de hidrogênio em água. Este desbalanço, pode ser o motivo para o maior dano oxidativo observado no grupo ObD. Outra enzima similar à catalase, e que pode estar aumentada quando há altas concentrações de peróxido de hidrogênio é a glutathione peroxidase¹¹⁴, entretanto, no presente trabalho não foi avaliada as concentrações dessa enzima.

Quando há formação de peróxido de hidrogênio e o mesmo não é neutralizado pela catalase ou glutathione peroxidase, há formação do radical hidroxila⁴⁷. A literatura destaca que esse é o radical mais reativo e lesivo, no entanto, não existe uma enzima capaz de neutralizar a hidroxila, causando assim danos em enzimas, proteínas, lipídeos e no DNA¹¹⁷. Em ratos induzidos ao diabetes foi observado aumento na formação das espécies reativas de oxigênio nos tecidos¹²¹. A condição de diabetes está associada à diminuição da SOD e catalase, em tecidos e no soro¹¹⁸, desta forma, a redução dos níveis de enzimas antioxidantes em animais diabéticos não tratados sugere aumento do estresse oxidativo¹²². Contudo, outro trabalho demonstrou aumento de SOD e catalase em tecido cerebral, o que também foi atribuído a maior estresse oxidativo, os autores destacam que o aumento da síntese pode ocorrer como resposta orgânica em virtude da maior produção de EROS¹²². No presente trabalho houve aumento na atividade da SOD, não acompanhado de alterações nos níveis de catalase. Sullivan-Gunn e Lewandowski (2013)¹²³, destacam que o aumento da atividade da SOD é acompanhado da elevação dos níveis de peróxido de hidrogênio, suportando em contrapartida, que o declínio da catalase prejudica a defesa antioxidante.

Quanto aos parâmetros funcionais contráteis de cardiomiócitos e cinética intracelular de cálcio, o grupo ObD apresentou maior concentração de Ca^{2+} sistólico, o que pode ter contribuído para aumento do encurtamento de miócitos cardíacos desses animais, refletindo melhor sensibilidade ao Ca^{2+} , no entanto, houve maior tempo até 50% do pico de encurtamento. A contratilidade cardíaca está diretamente relacionada à homeostase de Ca^{2+} celular¹²⁴. Nos miócitos cardíacos o Ca^{2+} está

envolvido no acoplamento excitação-contração e modulação da função contrátil¹²⁵. Wisløff e colaboradores (2001)¹²⁶ demonstraram maior encurtamento celular, em virtude de maior sensibilidade ao Ca^{2+} . No presente estudo a maior contratilidade dos cardiomiócitos foi associada à maior concentração de Ca^{2+} sistólico, possivelmente por maior atividade dos canais de Ca^{2+} do tipo L e/ou receptores de rianodina. Os canais de Ca^{2+} do tipo L permitem o influxo intracelular de cálcio para o citosol, a elevação da concentração Ca^{2+} ativa os receptores de rianodina localizados no retículo sarcoplasmático (RS), essa ativação por sua vez, causa a liberação de grande quantidade de Ca^{2+} do RS para o citoplasma, assim o Ca^{2+} liga-se a troponina C, ocorrendo o encurtamento celular^{125,127}. Em contrapartida trabalho realizado com animais diabéticos, mostra menor contratilidade cardíaca e amplitude de Ca^{2+} ¹²⁸. Condizente com a literatura, na condição de diabetes tipo 2 o coração apresenta alterações no trânsito de Ca^{2+} , levando ao prejuízo de contração e relaxamento com consequente disfunção sistólica e diastólica¹²⁹. Portanto, o melhor encurtamento e maior concentração de Ca^{2+} sistólico visualizado no presente estudo pode estar relacionado a uma fase inicial do diabetes nos animais do grupo ObD, pois o dano oxidativo a proteínas ocorre no início da doença e tende a aumentar nos próximos estágios do diabetes¹³⁰. Dessa forma, provavelmente com maior tempo de exposição ao diabetes os animais poderiam apresentar alteração dos parâmetros sistólicos. Essa afirmação pode ser corroborada pelo maior tempo até 50% do pico de encurtamento, visualizado no grupo ObD.

Em contrapartida, considerando os parâmetros diastólicos. Embora ratos ObD apresentaram maior velocidade máxima de relaxamento celular, houve elevação dos níveis de Ca^{2+} diastólico e maior tempo até 50% da recaptura de Ca^{2+} . Esse prejuízo sugere possível disfunção no relaxamento celular, o que pode estar relacionado à menor atividade da Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA), fosfolambam (PLB) ou trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX). Este resultado está de acordo com estudo de coorte que mostra disfunção diastólica decorrente de aumento do Ca^{2+} no citosol, o qual poderia explicar o prejuízo no relaxamento frequentemente visualizado na condição de Diabetes¹³¹. Para que ocorra o relaxamento celular a concentração de Ca^{2+} intracelular deve retornar aos níveis basais¹²⁷. Portanto a redução dos níveis de Ca^{2+} ocorre de duas formas, pela SERCA presente no RS que recaptura Ca^{2+} do meio

citoplasmático para o interior do RS e pelo NCX responsável pela extrusão de Ca^{2+} do meio intracelular para o extracelular, ambos permitem a diminuição de Ca^{2+} do meio citoplasmático promovendo o relaxamento celular^{125,127}. A PLB é um regulador da SERCA, em condições basais ele impede que a SERCA recapture Ca^{2+} , no entanto, após ser fosforilada pela PKA (proteína quinase A) e/ou calmodulina quinase II a PLB se separa da SERCA, permitindo que ela recapture Ca^{2+} ¹³². Diversos estudos mostram prejuízo das proteínas envolvidas no relaxamento miocárdico de animais induzidos ao diabetes por estreptozotocina¹³³⁻¹³⁵. Ademais, efeito inibitório na oxidação de ácidos graxos pode reduzir a disponibilidade de ATP no diabetes tipo II. A mensuração de carnitina, um substrato essencial do metabolismo de ácidos graxos no miocárdio, está diminuída na cardiomiopatia diabética. Desde que é bem conhecido que a contratilidade é regulada por processos de fosforilação das proteínas envolvidas na homeostase do trânsito de Ca^{2+} , a menor síntese de ATP pode influenciar no processo de recaptura de Ca^{2+} via SERCA2a/PLB^{131,133,136,137}.

Riojas-Hernandez e colaboradores (2015), apresentaram aumento de Ca^{2+} diastólico e maior tempo para 50% do decaimento de Ca^{2+} em ratos com diabetes tipo 2, os autores atribuíram os resultados de disfunção diastólica pelo aumento de espécies reativas de oxigênio e menor síntese de ATP, o que provavelmente alterou a atividade da SERCA prejudicando a sinalização de Ca^{2+} . O estresse oxidativo pode causar distúrbio no funcionamento de proteínas relacionadas ao Ca^{2+} como a SERCA2a¹³⁹. Xu e colaboradores (1997)¹⁴⁰ mostram que as EROs podem inibir de forma direta a função de recaptura de Ca^{2+} da Serca2a. Dessa forma, a disfunção diastólica do presente estudo visualizada no grupo ObD pode ser decorrente de maior estresse oxidativo na condição de diabetes mellitus tipo 2. Autores mostram que a avaliação de carbonilação proteica é fundamental para visualização do dano oxidativo em proteínas cardíacas, sendo alteradas em cardiomiócitos de ratos geneticamente obesos¹⁴¹. Dong e colaboradores (2007)¹³⁹ salientam que o estresse oxidativo permanente acarreta disfunção cardíaca, particularmente na recaptura de Ca^{2+} pela Serca2a. Assim, o estresse oxidativo pode contribuir para a patogênese de diversas doenças cardiovasculares, incluindo a hipertensão arterial, hipertrofia miocárdica, insuficiência cardíaca, dentre outras¹⁴², os autores sugerem o uso de antioxidantes na tentativa de amenizar a disfunção cardíaca associada à obesidade¹⁴¹.

Quanto aos grupos tratados com as farinhas da casca e semente de lichia, os grupos ObDFC e ObDFS não apresentaram diferença de consumo alimentar comparado ao grupo ObD, no entanto o grupo ObDFC apresentaram maior consumo alimentar comparado ao grupo ObDFS. Apesar disso a ingestão calórica não foi diferente entre os grupos, portanto o maior consumo alimentar pode ser atribuído a uma regulação no volume alimentar para atingir um mesmo consumo calórico. Sendo assim o hormônio PYY é secretado pelo intestino no período pós-prandial em proporção à quantidade de calorias ingeridas e possui a função de reduzir a motilidade intestinal e aumentar a saciedade, regulando a ingestão de alimentos em roedores e humanos^{143,144}. Man e colaboradores (2016)³⁷ atribuiu o menor consumo alimentar, menor ingestão de água e menor volume urinário, a melhoras nos sintomas de hiperfagia, polidipsia e poliúria nos animais tratados com extrato da semente de lichia. Como os grupos mantiveram ingestão calórica semelhante, não houve diferença na eficiência alimentar, peso corporal e depósitos de gordura. Os grupos ObD, ObDFC e ObDFS apresentaram perda de peso corporal similares, caracterizando que as dietas com farinhas da casca e semente de lichia, não foram capazes de afetar o peso corporal e depósitos de gordura dos animais. Trabalhos ressaltam que todos os animais na condição de diabetes apresentaram redução de peso corporal semelhante, independente do tratamento com lichia^{37,145}.

No presente trabalho não foram notadas diferenças nas glicemias dos grupos, ObDFC e ObDFS em comparação com o grupo ObD, apesar dos grupos tratados apresentarem leve diminuição dos níveis glicêmicos ($p= 0,09$), não foi suficiente para demonstrar significância. Trabalhos com extratos de semente de lichia administrados à animais diabéticos observaram diminuição na glicemia, insulina e no índice de resistência à insulina^{37,145}. Além disso Queiroz e colaboradores (2018)¹⁴⁶ observaram menor glicemia em animais que receberam a farinha da casca, seus resultados foram atribuídos a fibra presente nessa farinha.

O presente trabalho também não foi capaz de demonstrar diferenças no peso e percentual de umidade dos órgãos analisados. Corroborando com achados de Man e colaboradores (2016)³⁷ que também não encontram diferenças nos pesos de fígado, pâncreas e pulmão de ratos diabéticos tratados com extrato da semente de lichia. Em contrapartida, Queiroz e colaboradores (2018)¹⁴⁶ encontraram diminuição dos

marcadores de disfunção e lesão hepática, com redução da esteatose grave, em animais que receberam farinha da casca de lichia.

Quanto aos parâmetros de dano oxidativo e enzimas antioxidantes não houve diferenças entre os grupos tratados ObDFC e ObDFS em comparação ao grupo ObD. No entanto estudo realizado com animais hipercolesterolêmicos, mostra que o tratamento com farinha da casca de lichia acarretou diminuição dos níveis de TBARS no fígado, o que foi atribuído possivelmente a presença de antioxidantes na farinha¹⁴⁶. Kilari e Putta, (2016)¹⁴⁷ demonstraram que a administração de extrato da casca de lichia reduziu a glicose sanguínea, apresentaram aumento das enzimas antioxidantes SOD e catalase e diminuição da proteína carbonilada, os autores atribuíram os resultados aos polifenóis presentes no extrato da casca. Pesquisadores afirmam que a casca da lichia é importante fonte de compostos bioativos, como flavonóides, dessa forma o extrato da casca de lichia tem demonstrado efeito antitumoral¹⁴⁸. O extrato etanólico de semente de lichia também possui boa atividade antioxidante¹⁴⁹. Apesar de diversos trabalhos ressaltarem a boa capacidade antioxidante da casca e semente de lichia^{146,147,148,149}, o presente trabalho não foi capaz de identificar melhora no estresse oxidativo de animais induzidos a obesidade e diabetes, que receberam farinha da casca ou semente de lichia. Esses resultados podem ser atribuídos a doses baixas de compostos antioxidantes na quantidade de farinha oferecida aos animais e/ou menor disponibilidade de compostos fenólicos desses nutrientes em comparação aos extratos de casca e semente de lichia.

Os polifenóis são metabólitos secundários das plantas, responsáveis por diversas funções, atuando como antivirais, antimicrobianos, antioxidantes e ainda modulam processos fisiológicos das plantas. Nos alimentos são responsáveis pelas características nutricionais e organolépticas¹⁵⁰. Os polifenóis ficam localizados em vacúolos das células vegetais protegidos pela parede celular. A parede celular é rompida durante a mastigação deixando essas substâncias disponíveis para absorção, no entanto nem todas as células são rompidas¹⁵¹. No presente trabalho considerando o consumo alimentar dos animais e a concentração de polifenóis nas farinhas da casca e semente de lichia, a quantidade de polifenóis na farinha de semente representou apenas 3.5% da quantidade presente na dose ofertada por Man e colaboradores (2016)³⁷ em extrato de semente. Além disso, em estudo realizado por

Kilari e Putta (2016)¹⁴⁷ o tempo de administração de extrato de casca de lichia foi de 12 semanas, enquanto que no presente trabalho os animais receberam a ração com as farinhas durante período de 5 semanas. Tang e colaboradores (2018)¹⁴⁵ salientam ainda que alguns resultados encontrados pelo extrato da semente como índice de resistência à insulina é dose dependente, portanto, quanto maior a dose melhor o resultado. No presente trabalho foi administrada a dose de farinha sugerida por Queiroz e colaboradores (2018)¹⁴⁶, no entanto o tempo de administração das farinhas foi superior. Apesar disso, a mesma dose e o maior tempo de tratamento não foram eficientes em animais obesos em condição de diabetes, resultado divergente do encontrado por Queiroz e colaboradores (2018)¹⁴⁶ avaliando ratos hipercolesterolemicos.

Como provavelmente não foi possível a absorção de quantidade suficiente dos polifenóis presentes na casca e semente de lichia, os resultados para estresse oxidativo e glicemia foram nulos. LV e colaboradores (2014)²¹ discutem que o conteúdo de flavonóides influencia o potencial hipolicemiante. Além disso, Kilari e Putta (2016)¹⁴⁷ atribuem a redução da glicemia ocasionada pela administração de extrato de casca de lichia ao atraso na absorção intestinal de glicose, enquanto, Queiroz e colaboradores (2018)¹⁴⁶ atribuem ao conteúdo de fibras presentes na farinha da casca.

Considerando os parâmetros funcionais para células cardíacas nos animais ObDFS a farinha da semente de lichia não foi capaz de atuar na manutenção da função contrátil dos cardiomiócitos, visualizados pelo menor percentual e velocidade máxima de encurtamento, com conseqüente maior tempo até 50% do pico de encurtamento. Embora, os níveis de Ca^{2+} diastólico sejam inferiores nos ratos ObDFS não houve diferença significativa quando comparado ao grupo ObD ($p=0,056$). O grupo ObDFC apresentou achado pontual referente ao maior tempo de até 50% do encurtamento em relação ao grupo ObD. Em relação ao relaxamento celular, as farinhas da casca e semente de lichia apresentaram comportamentos similares nos parâmetros diastólicos em relação ao grupo ObD. Contudo, entre os tratamentos, a farinha da semente de lichia prejudicou o relaxamento miocárdico, visualizado pela menor velocidade máxima de relaxamento e maior tempo até 50% do relaxamento em relação ao grupo ObDFC. Apesar das alterações na contratilidade dos miócitos

cardíacos, não foi observada diferença no transiente de Ca^{2+} entre os grupos tratados com farinha da casca ou semente de lichia, sugerindo que essas alterações não estejam relacionadas à cinética de Ca^{2+} e suas proteínas. Não foram encontrados estudos que avaliaram a influência dos tratamentos com farinha e/ou extrato de semente e casca de lichia sobre a função cardíaca de animais obesos ou diabéticos.

Tang e colaboradores (2018) salientam que apesar dos efeitos benéficos no perfil glicêmico associado ao consumo do extrato de semente de lichia por ratos diabéticos do tipo 2, mais estudos são necessários para avaliar sua toxicidade a longo prazo. A toxicidade presente na semente da lichia está ligada a presença da hipoglicina A (metileno ciclopropil-alanina) e seu análogo metileno ciclopropil-glicina¹⁴⁸, Das e colaboradores (2015)¹⁵² identificaram a presença desse composto na semente de lichia.

Segundo Schulz (1987)¹⁵³ a hipoglicina é responsável pela inibição da oxidação de ácidos graxos e secundariamente pelo prejuízo na gliconeogênese. A atividade da hipoglicina A na inibição do complexo acil-CoA - carnitina aciltransferase, pode ser responsável por deprimir a oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, e conseqüentemente aumentar os níveis de triglicerídeos no miocárdio¹⁵⁴. O músculo cardíaco possui grande capacidade de se adaptar e produzir energia de acordo com o substrato disponível¹⁵⁵, no entanto, o principal substrato energético do coração são os ácidos graxos livres, por meio da β -oxidação¹⁵. A diminuição da oxidação de ácidos graxos e maior uso de glicose para a produção de energia pelo coração é um mecanismo que provoca deficiência de oxigênio para o músculo cardíaco¹⁵⁵. Como consequência da diminuição da β -oxidação pode ocorrer depósito celular anormal de triglicerídeos acarretando lipotoxicidade no coração¹⁵.

Assim, a perda de capacidade de oxidação de ácidos graxos de acordo com a disponibilidade dos mesmos leva à deposição de lipídios no cardiomiócito e disfunção contrátil¹⁵⁶. Zhou e colaboradores (2015)¹⁵⁷ também associam o acúmulo de lipídios miocárdicos e disfunção cardíaca, devido à apoptose e fibrose, reduzindo assim a contratilidade miocárdica. A condição de possível lipotoxicidade miocárdica ocasionada pelo consumo de farinha e/ou extrato de semente de lichia não está documentada na literatura. Futuros estudos são necessários para compreender a

provável ação tóxica da semente de lichia sobre os mecanismos da beta-oxidação, morfologia e desempenho miocárdico.

7 CONCLUSÃO

As farinhas de casca e semente de lichia não revertem o dano oxidativo e o prejuízo contrátil em cardiomiócitos de ratos obesos induzidos ao diabetes. Ademais, a farinha da semente de lichia acentuou a disfunção contrátil sem modificações na cinética de Ca^{2+} intracelular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO – World Health Organization. **Noncommunicable Diseases Country Profiles 2014**. 2014.
2. WHO – World Health Organization. **Noncommunicable Diseases**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs355/en/>>. Acesso em: 26 jun. 2016.
3. IDF – International Diabetes Federation. **Diabetes Atlas Seventh Edition 2015**
4. Sociedade Brasileira de Diabetes – Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/para-o-publico/diabetes/o-que-e-diabetes>>. Acesso em: 27 jan. 2017.
5. Sociedade Brasileira de Diabetes. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2015-2016**. São Paulo: AC Farmacêutica, 2016.
6. Sociedade Brasileira de Diabetes. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2014-2015**. São Paulo: AC Farmacêutica, 2015.
7. WHO – World Health Organization. **Global report on diabetes**. 2016.
8. WHO – World Health Organization. **Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: report of a joint WHO/FAO expert consultation**, Geneva, 2003.
9. FRANSSENS, B. T. et al. Metabolic consequences of adipose tissue dysfunction and not adiposity per se increase the risk of cardiovascular events and mortality in patients with type 2 diabetes. **International Journal of Cardiology**, v. 222, p. 72-77, 2016.
10. SANADA, H. et al. High body mass index is an important risk factor for the development of type 2 diabetes. **Internal Medicine**, v. 51, n. 14, p. 1821-1826, 2012.
11. LIU, J. et al. Comparison of β -cell dysfunction and insulin resistance correlating obesity with type 2 diabetes: A cross-sectional study. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 30, n. 5, p. 898-902, 2016.
12. OKOSHI, K. et al. Diabetic cardiomyopathy. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 51, n. 2, p. 160-167, 2007.
13. BOUDINA, S.; ABEL, E. D. Diabetic cardiomyopathy, causes and effects. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 11, n. 1, p. 31-39, 2010.
14. ROSA C. M. **Influência do diabetes mellitus no coração de ratos senescentes espontaneamente hipertensos**. 2011. 75 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia em clínica médica) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Botucatu, 2011.
15. AZEVEDO, P. S.; POLEGATO, B. F.; MINICUCCI, M. F.; PAIVA, S. A.; ZORNOFF, L. A. **Remodelação Cardíaca: Conceitos, Impacto Clínico, Mecanismos**

Fisiopatológicos e Tratamento Farmacológico. **Arq. Bras. Cardiol**, v. 106, n. 1, p. 62-69, 2015.

16. PONTES, M. R. N.; LEÃES, P. E. Remodelamento ventricular: dos mecanismos moleculares e celulares ao tratamento. **Rev Soc Cardiol Rio Grande do Sul**, v. 13, n. 3, p. 1-7, 2004.

17. EGUCHI, K. et al. Association between diabetes mellitus and left ventricular hypertrophy in a multiethnic population. **The American journal of cardiology**, v. 101, n. 12, p. 1787-1791, 2008.

18. ANDREWS, M.; SOTO, N.; ARREDONDO-OLGUÍN, M. Association between ferritin and hepcidin levels and inflammatory status in patients with type 2 diabetes mellitus and obesity. **Nutrition**, v. 31, n. 1, p. 51-57, 2015.

19. STEFANOVIC, A. et al., The influence of obesity on the oxidative stress status and the concentration of leptin in type 2 diabetes mellitus patients. **Diabetes Reserach and Clinical Practice**, v.79, p. 156-163, 2008.

20. HAMED, Enas A. et al. Circulating leptin and insulin in obese patients with and without type 2 diabetes mellitus: relation to ghrelin and oxidative stress. **Diabetes research and clinical practice**, v. 94, n. 3, p. 434-441, 2011.

21. LV, Qiang et al. Effects of phenolic-rich litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) pulp extracts on glucose consumption in human HepG2 cells. **Journal of Functional Foods**, v. 7, p. 621-629, 2014..

22. FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997

23. BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, Juceni P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química nova**, v. 29, n. 1, p. 113, 2006.

24. KAZEEM, M. I.; DAVIES, T. C. Anti-diabetic functional foods as sources of insulin secreting, insulin sensitizing and insulin mimetic agents. **Journal of functional foods**, v. 20, p. 122-138, 2016.

25. OZUNA, C. et al. Innovative applications of high-intensity ultrasound in the development of functional food ingredients: Production of protein hydrolysates and bioactive peptides. **Food Research International**, v. 77, p. 685-696, 2015.

26. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 19, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. **Diário Oficial da União**, Brasil 03 mai. 1999.

27. GANDHI, G. R.; IGNACIMUTHU, S.; PAULRAJ, M. G.. Solanum torvum Swartz. fruit containing phenolic compounds shows antidiabetic and antioxidant effects in

streptozotocin induced diabetic rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 11, p. 2725-2733, 2011.

28. SREERAMA, Y. N.; SASHIKALA, V. B.; PRATAPE, V. M. Phenolic compounds in cowpea and horse gram flours in comparison to chickpea flour: Evaluation of their antioxidant and enzyme inhibitory properties associated with hyperglycemia and hypertension. **Food Chemistry**, v. 133, n. 1, p. 156-162, 2012.

29. SEO, K. et al. Flavonoid-rich Chardonnay grape seed flour supplementation ameliorates diet-induced visceral adiposity, insulin resistance, and glucose intolerance via altered adipose tissue gene expression. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 881-891, 2015.

30. SILVA M. L. C. et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, jul.-set., 2010.

31. PAZ M. et al. Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds. **Food Chemistry**, v. 172, p. 462–468, 2015.

32. BOER A. DE, URLINGS M. J. E., BAST A. Active ingredients leading in health claims on functional foods. **Journal of Functional Foods**, v. 20, p. 587-593, 2015.

33. PRASAD K. N. et al. Identification of phenolic compounds and appraisal of antioxidant and antityrosinase activities from litchi (*Litchi sinensis* Sonn.) seeds. **Food Chemistry**, v.116, p. 1-7, 2009.

34. QUEIROZ, E. R.; ABREU, C. M. P.; SANTOS, C. M.; SIMÃO, A. A. Composição química e fitoquímica das farinhas da casca e da semente de lichias (*Litchi chinensis* Sonn.) cultivar 'Bengal'. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.45, n.2, p.329-334, 2015.

35. ROCHA W. S. et al. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal** - SP, v. 33, n. 4, p. 1215-1221, dez. 2011.

36. KUSKOSKI E. M. et al. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.4, p. 1283-1287, jul.-ago., 2006.

37. MAN S. et al. Chemical composition and hypoglycaemic effect of polyphenol extracts from *Litchi chinensis* seeds. **Journal of Functional Foods**, v. 22, p. 313-324, 2016.

38. CHANG Y. et al. Antioxidative and anti-inflammatory effects of polyphenol-rich litchi (*Litchi chinensis* Sonn.)-flower water-extract on livers of high-fat-diet fed hamsters. **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 44-52, 2013.

39. REN S. et al. Two flavanone compounds from litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) seeds, one previously unreported, and appraisal of their α -glucosidase inhibitory activities. **Food Chemistry**, v. 127 p. 1760–1763, 2011.

40. BHOOPAT L. et al. Hepatoprotective effects of lychee (*Litchi chinensis* Sonn.): A combination of antioxidant and anti-apoptotic activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 55–66, 2011.
41. QUEIROZ, E. R.; ABREU, C. M. P.; OLIVEIRA, K.S. constituintes químicos das frações de Lichia in natura e submetidas à secagem: Potencial nutricional dos subprodutos. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 34, n. 4, p. 1174-1179 Dez. 2012.
42. QUEIROZ, E. R. **Farinhas da casca e semente de lichias (*litchi chinensis* sonn) e respostas metabólicas em ratos wistar, na dislipidemia induzida**. 2015. 155 f. Tese (Doutorado em agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.
43. FAO – WHO – Food and Agriculture Organization. **Utilization of fruit and vegetable wastes as livestock feed and as substrates for generation of other value-added products**. 2013. Farmacêuticas de Araraquara, Araraquara, 2010.
44. Halliwell, B. Reactive Oxygen Species and the Central Nervous System. **Journal of Neurochemistry**, v. 59, n. 5., 1992.
45. POP-BUSUI, R., A. SIMA, e M. STEVENS. Diabetic neuropathy and oxidative stress. **Diabetes/Metabolism Research And Reviews**. v. 22, p. 257 - 273, , 2006.
46. COMMONER, B., J. TOWNSEND, e G. E. PAKED. Free Radicals in Biological Materials. **Nature**, v. 174, n. 4432, , 1954.
47. VOLODYMYR, I. L.,. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 164-175, , 2014.
48. BABIOR, B. M.; KIPNES, R. S.; CURNUTTE, J. T. “Biological Defense Mechanisms. The Production by Leukocytes of Superoxide, A Potential Bactericidal Agent. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 52,, , 1973.
49. PALMER, R. M. J., D. D. REES, D. S. ASHTON, e S. Moncada. L-Arginine is The Physiological Precursor for the Formation of Nitric Oxide in Endothelium-Dependent Relaxation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 135, n. 3, p. 1251-1256., ,1988.
50. HARMAN, D. Aging: A Theory Based On Free Radical And Radiation Chemistry. **Journal Gerontol**, v. 11, p. 298-300, , 1956.
51. OTT, M., V. GOGVADZE, S ORRENIUS, e B. ZHIVOTOVSKY. Mitochondria, oxidative stress and cell death. **Apoptosis**, v. 12, p. 913-922, , 2007.
52. RAHA, S., e B. H. ROBINSON. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. **Trends in Biochemical Sciences**. v. 25, n. 10, p. 502-508., , 2000.
53. POYTON, R. O., K. A. BALL, e P. R. CASTELLO. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. **Trends in Endocrinology and Metabolism**. v. 20, n. 7, p. 332 - 340., , 2009.

54. ST-PIERRE, J., J. A. Buckingham, S. J. Roebuck, e M. D. Brand. Topology of Superoxide Production from Different Sites in the Mitochondrial Electron Transport Chain. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 277, n. 47, p. 44784 - 44790., , 2002.
55. GASCHLER, M. M., e B. R. STOCKWELL. Lipid peroxidation in cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 482, p. 419-425, , 2017.
56. LIU, J, H., C. YEO, S., J. DONIGER, e B., N. AMES. Assay of Aldehydes from Lipid Peroxidation: Gas Chromatography–Mass Spectrometry Compared to Thiobarbituric Acid. **Analytical Biochemistry**, n. 245, p. 161–166, , 1997.
57. Møller, I., M., A. Rogowska-Wrzesinska, e R., S., P. Rao. Protein carbonylation and metal-catalyzed protein oxidation in a cellular perspective. **Journal Of Proteomics**, n. 74, p. 2228 – 2242, , 2011.
58. HALLIWELL, B., e M. WHITEMAN. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231-255., , 2004.
59. REYES, G. C., I. R. SÁNCHEZ, C. C. CALZADAMENDONZA, e I. M. OLIVARES-CORICHI. Disfunción endotelial y estrés oxidativo. **Revista de Endocrinología y Nutrición**, v. 14, n. 4, p. 233-236., , 2006.
60. IGHODARO, O.M., e O.A. AKINLOYE. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, 2017.
61. CARACHO, M., e I.,C., F., R. FERREIRA. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v.51, p. 15–62, , 2013.
62. PIETTA, P. Flavonoids as Antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, , 2000.
63. FERRON, A. J. et al. Cardiac Dysfunction Induced by Obesity is Not Related to B-Adrenergic System Impairment at the Receptor-Signalling Pathway. **Plos One**, San Francisco, v. 10, n. 9, p. 1-18, 2015.
64. NASCIMENTO, A. F. et al. Misclassification probability as obese or lean in hypercaloric and normocaloric diet. **Biological research**, v. 41, n. 3, p. 253-259, 2008.
65. LIMA-LEOPOLDO, A. P. **Influência do tempo de exposição à obesidade sobre a expressão gênica e protéica do sistema regulador do trânsito de cálcio miocárdico**. 2010. 164 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia em Clínica Médica) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

66. IRONDI, E. A. et al. Phenolics composition and antidiabetic property of *Brachystegia eurycoma* seed flour in high-fat diet, low-dose streptozotocin-induced type 2 diabetes in rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5, p. S159-S165, 2015
67. LEOPOLDO, A. S. et al. Involvement of L-type calcium channel and SERCA2A in myocardial dysfunction induced by obesity. **Journal of Cellular Physiology**, Philadelphia, v. 226, n. 11, p. 2934-2942, 2011.
68. LIMA-LEOPOLDO, A.P. et al. Long-term obesity promotes alterations in diastolic function induced by reduction of phospholamban phosphorylation at serine-16 without affecting calcium handling. **Journal Applied Physiology**, Bethesda, v. 117, n. 6, p. 669-78, 2014.
69. Neves, L. C., Alencar, S. M., Carpes, S. T. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonóides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 7, p. 107-110, 2009.
70. Singleton, V. L., Joseph, A., Rossi, J. Colorimetry of total phenolic with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144- 149, 1965.
71. Marques, G. S., Monteiro, R. P. M., Leão, W. F., Lyra, M. A. M., Peixoto, M. S., Rolim-Neto, P. J., Xavier, H. S., Soares, L. A. L. Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonóides totais em folhas de *Bauhinia fortificata* Link. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 517-522, 2012.
72. Perdigão, T. L. **Avaliação morfofisiológica, fitoquímica e mutagênica de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Derg exposta a diferentes concentrações de alumínio**. Vitória. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2012.
73. TAYLOR, B.A.; PHILLIPS, S.J. Detection of obesity QTLs on mouse chromosomes 1 and 7 by selective DNA pooling. **Genomics**, San Diego, v. 34, n. 3, p. 389-98, 1996.
74. ROLLS, B. J.; SHIDE D. J. The influence of dietary fat on food intake and body weight. **Nutrition Revist.** v. 50, n. 10, p.283-90, 1992.
75. KOCH, C. E. et al. High-fat diet induces leptin resistance in leptin-deficient mice. **Journal of Neuroendocrinology**. v. 26, n. 2, p. 58-67, 2014.
76. IRVING, B. A.; WELTMAN, J. Y.; PATRIE, J. T.; DAVIS, C. K.; BROCK, D. W.; SWIFT, D.; BARRETT, E. J.; GAESSER, G. A.; WELTMAN, A. Effects of exercise training intensity on nocturnal growth hormone secretion in obese adults with the metabolic syndrome. **Journal Clinical Endocrinology Metabolism**. v. 94, n. 6, p. 1979-86, 2009.
77. KIM, C. H.; YOUN, J. H.; PARK, J. Y.; HONG, S. K.; PARK, K. S.; PARK, S. W.; SUH, K. I.; LEE, K. U. Effects of high-fat diet and exercise training on intracellular

glucose metabolism in rats. **American Journal Physiology and Endocrinology Metabolism**. v. 278, n. 6, p. 977-84, 2000.

78. GUATIMOSIM, S. et al. Molecular identification of a TTX-sensitive Ca²⁺ current. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 280, n. 5, p. C1327-C1339, 2001

79. SAMARGHANDIAN, S. et al., Protective Effects of Carvacrol against Oxidative Stress Induced by Chronic Stress in Rat's Brain, Liver, and Kidney. **Biochemistry Research International**, 2016.

80. M. Uchiyama and M. Mihara, "Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test," **Analytical Biochemistry**, vol. 86, no. 1, pp. 271–278, 1978.

81. MESQUITA, C.S., et al., Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. **Anal Biochem**, v. 71, p. 458-469, 2014.

82. Marklund S, Markfund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **Eur. J. Biochem.**, v.47, 1974.

83. Aebi, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v.105, p. 121-126, 1984.

84. Pieper, G. M., et al. Peroxidative stress in diabetic blood vessels. **Diabetes**, v. 44, p. 884-889, 1995.

85. SWEENEY, G. Cardiovascular effects of leptin. **Nature Reviews**, v. 7, p. 22-29, 2010.

86. AHIMA, R. S.; FLIER, J. S. Leptin. **Annu. Rev. Physiol**, v. 62, p. 413–437, 2000.

87. KNIGHT, Z. A., et al., Hyperleptinemia Is Required for the Development of Leptin Resistance. **Plos One**, v. 5, n. 6, 2010.

88. MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.; MEDINA, F. S. Intestinal bile acid physiology and pathophysiology. **World J Gastroenterol**, v. 14, n. 37, p. 5630-5640, 2008.

89. KUHRE, R. E., et al., Bile acids are important direct and indirect regulators of the secretion of appetite- and metabolism-regulating hormones from the gut and pancreas. **Molecular Metabolism**, 2018.

90. SCHROEDER, L. E., LEINNINGER, G. M. Role of central neurotensin in regulating feeding: Implications for the development and treatment of body weight disorders. **BBA - Molecular Basis of Disease**, v. 1864, p. 900 – 916, 2018.

91. LAFFERTY, R. A.; FLATT, P. R.; IRWIN, N. Emerging therapeutic potential for peptide YY for obesity-diabetes. **Peptides**, v. 100, p. 269-274, 2018.

92. JACOBSEN, B. B., et al., Perfis Cardíaco, Metabólico e Molecular de Ratos Sedentários no Momento Inicial da Obesidade. **Arq Bras Cardiol.** v. 109. n. 5, p. 432-439, 2017.
93. REUTER, T. Y. Diet-induced models for obesity and type 2 diabetes. **Drug Discovery Today: Disease Models**, v. 4, n. 1, 2007.
94. HOLMES, A., et al., Rat Models of Diet-Induced Obesity and High Fat/Low Dose Streptozotocin Type 2 Diabetes: Effect of Reversal of High Fat Diet Compared to Treatment with Enalapril or Menhaden Oil on Glucose Utilization and Neuropathic Endpoints. **Journal of Diabetes Research**, 2015
95. BRITO-CASILLAS, Y.; MELIÁN, C.; WÄGNER A. M. Study of the pathogenesis and treatment of diabetes mellitus through animal models. **Endocrinología y Nutrición**, v.63, n. 7, p. 345-353, 2016.
96. LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v.51, p.216-226, 2008.
97. ZHANG, S. et al., Effects of troxerutin on cognitive deficits and glutamate cysteine ligase subunits in the hippocampus of streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus rats. **Brain Research**, 2017.
98. KUREK, K. et al., Myriocin treatment affects lipid metabolism in skeletal muscles of rats with streptozotocin-induced type 1 diabetes. **Advances in Medical Sciences**, v. 62, p. 65-67, 2017.
99. REES, D. A.; ALCOLADO, J. C. Animal models of diabetes mellitus. **Diabetic Medicine**, v. 22, p. 359-370, 2004.
100. VIEIRA, F. S., et al., P2X7 receptor knockout prevents streptozotocin-induced type 1 diabetes in mice. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 419, p. 148-157, 2016.
101. JIANG, S., et al., Effects of compound K on hyperglycemia and insulin resistance in rats with type 2 diabetes mellitus. **Fitoterapia**, v. 95, p. 58-64, 2014.
102. VERGÈS, B. Abnormal hepatic apolipoprotein B metabolism in type 2 diabetes. **Atherosclerosis**, v. 211, p.353-360, 2010.
103. SAISHO, Y., et al., Ongoing β -Cell Turnover in Adult Nonhuman Primates Is Not Adaptively Increased in Streptozotocin-Induced Diabetes. **Diabetes**, v. 60, p. 848-856, 2011.
104. SAYANTAN, N.; GHOSH, S. K.; CHOUDHURY, Y. A murine model of type 2 diabetes mellitus developed using a combination of high fat diet and multiple low doses of streptozotocin treatment mimics the metabolic characteristics of type 2 diabetes mellitus in humans. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 84, p. 20-30, 2017.

105. MACAULEY, M., et al., Altered Volume, Morphology and Composition of the Pancreas in Type 2 Diabetes. **Plos One**, v. 10, n. 5, 2015.
106. LIM, S. et al., Differences in pancreatic volume, fat content, and fat density measured by multidetector-row computed tomography according to the duration of diabetes. **Acta Diabetol**, v. 51, p. 739-748, 2014.
107. PHILIPPE, M. F. et al., Pancreatic Volume and Endocrine and Exocrine Functions in Patients With Diabetes. **Pancreas Journal**, v. 40, n. 3, 2011.
108. RAHIER, J. et al., Pancreatic b-cell mass in European subjects with type 2 diabetes. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 10, n. 4, p. 32-42, 2008.
109. SAISHO, Y. Pancreas Volume and Fat Deposition in Diabetes and Normal Physiology: Consideration of the Interplay Between Endocrine and Exocrine Pancreas. **The Review of Diabetic Studies**, v. 13, n. 2, 2016.
110. GARCIA, T. S.; RECH, T. H.; LEITÃO, C. B. Pancreatic size and fat content in diabetes: A systematic review and meta-analysis of imaging studies. **Plos One**, v. 12, n. 7, 2017.
111. BOLLINENI, R. C.; FEDOROVA, M.; HOFFMANN, R. Carbonylated Plasma Proteins As Potential Biomarkers of Obesity Induced Type 2 Diabetes Mellitus. **Journal of Proteome Research**, v. 13, p. 5081-5093, 2014.
112. ROBSON, R.; KUNDUR, A. R.; SINGH, I. Oxidative stress biomarkers in type 2 diabetes mellitus for assessment of cardiovascular disease risk. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 12, p. 455-462, 2018.
113. NOGUEIRA, F. N. **Sistema Antioxidante e Peroxidação Lipídica em Glândulas Salivares de Ratos Diabéticos**. 2004. 74 f. Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
114. TROMM, C. B., et al. Efeito de diferentes frequências semanais de treinamento sobre parâmetros de estresse oxidativo. **Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum.**, v. 14, n. 1, p. 52-60, 2012.
115. RAZA, H., et al. Impaired Mitochondrial Respiratory Functions and Oxidative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 12, p. 3133-3147, 2011.
116. CASOINIC, F., et al. Serum Levels of Oxidative Stress Markers in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus and Non-alcoholic Steatohepatitis. **Rom. J. Intern. Med.**, v. 54, n. 4, p. 228-236, 2016.
117. FRANÇA, B. K., et al. Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **GE J Port Gastreenterol.**, v. 20, n. 5, p. 199-206, 2013.


118. CHUKWUMA, C. I.; ISLAM, S. Xylitol Improves Anti-Oxidative Defense System in Serum, Liver, Heart, Kidney And Pancreas of Normal And Type 2 Diabetes Model of Rats. **Acta Poloniae Pharmaceutica ñ Drug Research**, v. 74, n. 3, p. 817-826, 2017.
119. QUJEQ, D.; ALIAKBARPOUR, H. R.; KALAVI, K. Relationship between malondialdehyde level and glutathione peroxidase activity in diabetic rats. **Clinica Chimica Acta**, v. 340, p. 79-83, 2004.
120. MIKI, S., et al. Divergent antioxidant capacity of human islet cell subsets: A potential cause of beta-cell vulnerability in diabetes and islet transplantation. **Plos One**, v,15, n.5, 2018.
121. RAZA, H., et al. Exercise-induced alterations in pancreatic oxidative stress and mitochondrial function in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. **Physiological Reports**, v. 4, n. 8, 2016.
122. ERUKAINURE, O., et al. Modulatory effect of fibre-enriched cake on alloxan-induced diabetic toxicity in rat brain tissues. **Toxicology Reports**, v. 1, p. 445-449, 2014.
123. SULLIVAN-GUNN, M.; LEWANDOWKI, P. A. Elevated hydrogen peroxide and decreased catalase and glutathione peroxidase protection are associated with aging sarcopenia. **BMC Geriatrics**, v. 13, n. 104, 2013.
124. QUINTÃO-JÚNIOR, J., et al., Morfologia e Contratilidade em Cardiomiócitos de Ratos com Baixo Desempenho para o Exercício Físico. **Arq Bras Cardiol.**, v. 98, n. 5, p. 431-436, 2012.
125. BERS, D. M. Calcium Cycling and Signaling in Cardiac Myocytes. **Annu. Rev. Physiol**, v. 70, p. 23-49, 2008.
126. Wisløff, U., et al. Increased contractility and calcium sensitivity in cardiac myocytes isolated from endurance trained rats. **Cardiovascular Research**, v. 50, p. 495-508, 2001.
127. Gavioli, M., et al. Sinalização de Cálcio em cardiomiócitos. In: Rodrigo Ribeiro Resende, Maria de Fátima Leite e Silvia Guatimosim. **Sinalização de cálcio: bioquímica e fisiologia celulares**. 1ed.São Paulo: Sarvier, v. 1, p. 420-423, 2012.
128. ZHANG, X., et al. Improvement of cardiomyocyte function by in vivo hexarelin treatment in streptozotocin-induced diabetic rats. **Physiological Reports**, v. 6, n. 4, 2018.
129. MISHRA, P. K., et al., Diabetic Cardiomyopathy: An immunometabolic Perspective. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, n. 72, 2017.

130. DALLE-DONNE, I., et al. Protein carbonylation in human Diseases. **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, n. 4, 2003.
131. JWEIED, E. E., et al. Depressed cardiac myofilament function in human diabetes mellitus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 289, p. 2478-2483, 2005.
132. MACLENNAN, D. H.; KRANIAS, E. Phospholamban: A Crucial Regulator Of Cardiac Contractility. **NATURE REVIEWS**, v. 4, 2003.
133. FANG, Z. Y.; PRINS, J. B.; MARWICK, T. H. Diabetic Cardiomyopathy: Evidence, Mechanisms, and Therapeutic Implications. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 4, p. 543-567, 2004.
134. TROST, S. U., et al. Overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase improves myocardial contractility in diabetic cardiomyopathy. **Diabetes**, v. 51, p. 1166–1171, 2002.
135. NORBY, F. L., et al. IGF-I attenuates diabetes-induced cardiac contractile dysfunction in ventricular myocytes. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.283, p. 658–666, 2002.
136. GUSTAVSSON, M.; TRAASETH, N. J.; VEGLIA, G. Activating And Deactivating Roles Of Lipid Bilayers On The Ca²⁺-Atpase/Phospholamban Complex. **Biochemistry**, v. 50, n. 47, p. 10367-10374, 2011.
137. STAMMERS, A. N., et al. The regulation of sarco(endo)plasmic reticulum calcium-ATPases (SERCA). **Can. J. Physiol. Pharmacol**, v. 93, p. 1-12, 2015.
138. RIOJAS-HERNANDEZ, A., et al. Enhanced oxidative stress sensitizes the mitochondrial permeability transition pore to opening in heart from Zucker Fa/fa rats with type 2 diabetes. **Life Sciences**, v. 141, p. 32-43, 2015
139. DONG, F., et al., Chromium (D-Phenylalanine)₃ Improves Obesity-Induced Cardiac Contractile Defect in ob/ob Mice. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 15, n. 11, 2007.
140. XU, K. Y.; ZWEIER, J. L.; BECKER, L. C. X. Hydroxyl Radical Inhibits Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ - ATPase Function by Direct Attack on the ATP Binding Site. **Circulation Research**, v. 80, p. 76-81, 1997.
141. LI, S. Y., et al. Cardiac contractile dysfunction in Lep/Lep obesity is accompanied by NADPH oxidase activation, oxidative modification of sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and myosin heavy chain isozyme switch. **Diabetologia**, v.49, p. 1434-1446, 2006.
142. LI, S. Y., et al. Aging induces cardiac diastolic dysfunction, oxidative stress, accumulation of advanced glycation endproducts and protein modification. **Ageing Cell**, v.4, p. 57-64, 2005.

143. BATTERHAM, R. L., Inhibition of Food Intake in Obese Subjects by Peptide YY₃₋₃₆. **The new england jornal of medicine**, v. 8, p. 349-941, 2003.
144. SETIAN, N. Efeitos Anoréticos do Pyy na Obesidade. **Rev Assoc Med Bras.**, v. 50, n. 3, p. 229-251, 2004.
145. TANG, Y., et al. Lychee seed extract protects against neuronal injury and improves cognitive function in rats with type II diabetes mellitus with cognitive impairment. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 41, p. 251-263, 2018.
146. QUEIROZ, E. R., et al. Lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) peel flour: effects on hepatoprotection and dyslipidemia induced by a hypercholesterolemic diet. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.90, n. 1, p. 267-281, 2018.
147. KILARI, E. K.; PUTTA, S. Delayed progression of diabetic cataractogenesis and retinopathy by *Litchi chinensis* in STZ-induced diabetic rats. **Cutaneous and Ocular Toxicology**, 2016.
148. EMANUELE, S., et al. *Litchi chinensis* as a Functional Food and a Source of Antitumor Compounds: An Overview and a Description of Biochemical Pathways. **Nutrients**, v. 9, 2017.
149. WANG, L., et al., Chemical constituents with antioxidant activities from litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) seeds. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1081-1087, 2011.
150. CHEYNIER, V.; TOMAS-BARBERAN, F. A.; YOSHIDA, K. Polyphenols: From Plants to a Variety of Food and Nonfood Uses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 7589-7594, 2015.
151. PADAYACHEE, A., et al. Binding of polyphenols to plant cell wall analogues – Part 2: Phenolic acids. **Food Chemistry**, v. 135, p. 2287-2292.
152. DAS, M., et al., Litchi fruit contains methylene cyclopropyl-glycine. **Current Science**, v. 109, n. 12, 2015.
153. SCHULZ, H. Inhibitors of Fatty Acid Oxidation. **Pergamon Journals**, v. 40, p. 1443-1449, 1987.
154. ENTMAN, M.; BRESSLER, R. The Mechanism of Action of Hypoglycin on Long-Chain Fatty Acid Oxidation. **Mol. Phainacol**, v. 3, p. 333-340, 1967.
155. GRYNBERG, A.; Demaison, L. Fatty Acid Oxidation in the Heart. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.28, p. 11-17, 1996.
156. YOUNG, M. E., et al. Impaired Long-Chain Fatty Acid Oxidation and Contractile Dysfunction in the Obese Zucker Rat Heart. **Diabetes**, v. 51, 2002.

157. ZHOU, Y. T., et al. Lipotoxic heart disease in obese rats: Implications for human obesity. **Medical Sciences**, v. 97, n. 97, 199.

ANEXO A: Termo de consentimento do comitê de ética



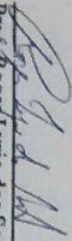
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Influência do consumo de farinha de casca e semente de lichia(LITCHI CHINENSIS SONN) sobre o estresse oxidativo e perfil cardiometabólico de ratos obesos induzidos ao diabetes", **Protocolo n.º 24/2017, sob a** responsabilidade de Ana Paula Lima Leopoldo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata(excepto o homem), para fins de pesquisa científica(ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n.º 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal(CONCEA), e pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS(CEUA) DO(A) Centro de Ciências da Saúde-Maruipé-Vitória-ES em 04-08-2017.**

Vigência do Projeto	Início: Setembro/2017 Término: Agosto/2018
Espécie/Linhagem	Ratus norvegicus albinus(linhagem Wistar)
Nº de Animais	Experimento Piloto:0 Protocolo Experimental:90 Total:90
Peso/Idade	Peso:100g Idade:30 dias
Sexo	Macho
Origem	Mamíferos

Vitória (ES), 04 de agosto de 2017.



Prof. Roger Lyrio dos Santos
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/CCS/UFES