UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO

LISSA BANTIM FRAMBACH

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE QUERCETINA SOBRE O DESEMPENHO FÍSICO E O PERFIL METABÓLICO DE RATOS WISTAR

Rio de Janeiro

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO

LISSA BANTIM FRAMBACH

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE QUERCETINA SOBRE O DESEMPENHO FÍSICO E O PERFIL METABÓLICO DE RATOS WISTAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de **Mestre em Nutrição Humana**.

Orientadora: Profª. Drª. Anna Paola Trindade Rocha Pierucci

Coorientador: João Pedro Saar Werneck de Castro

Rio de Janeiro

2017

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE QUERCETINA SOBRE O DESEMPENHO FÍSICO E O PERFIL METABÓLICO DE RATOS WISTAR

LISSA BANTIM FRAMBACH

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de **Mestre em Nutrição Humana**.

Examinada por:

Profª. Drª. Anna Paola Trindade Rocha Pierucci (Orientadora)

Professora associada do INJC/UFRJ

Profª. Drª. Ana Paula Canedo Valente (Revisora)

Professora associada do IBqM/UFRJ

Profª. Drª. Fátima Lúcia de Carvalho Sardinha (Membro efetivo interno)

Professora adjunta do INJC/UFRJ

Profª. Drª. Tatiana Kelly da Silva Fidalgo (Membro efetivo externo)

Professora adjunta da FO/UERJ

Profª. Drª. Eliane Fialho de Oliveira (Membro suplente interno)

Professora adjunta do INJC/UFRJ

Profª. Drª. Luciane Cláudia Barcelos (Membro suplente externo)

Professora adjunta da EEFD/UFRJ

Frambach, Lissa Bantim

Efeitos da suplementação de quercetina sobre o desempenho físico e o perfil metabólico de ratos wistar / Lissa Bantim Frambach. – Rio de Janeiro: UFRJ/Instituto de Nutrição Josué de Castro, 2017.

83 f.: il.

Orientadores: Anna Paola Trindade Rocha Pierucci; Jõao Pedro Saar Werneck de Castro.

Dissertação (Mestrado) – UFRJ, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Programa de Pós-Graduação em Nutrição, 2017.

Referências bibliográficas: f.71 – 82.

1. Quercetina 2. Desempenho físico 3. Perfil metabólico 4. RMN – Dissertação I. Pierucci, Anna Paola Trindade. II. Werneck de Castro, João Pedro Saar. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição Josué de Castro IV. Título

Aos meus pais por todo amor, incentivo e dedicação essenciais à minha formação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, por me conceder força para seguir adiante sem desanimar e por ter colocado em meu caminho pessoas maravilhosas.

À minha orientadora profª Anna Paola Pierucci por ter aberto as portas do laboratório e da pesquisa para mim. Obrigada pela confiança, paciência e por seus ensinamentos.

Aos membros da banca por aceitarem avaliar e contribuir com meu trabalho. Em especial, à profª Ana Paula Valente, revisora da dissertação, por toda dedicação, atenção, ajuda e paciência a mim concedidas no decorrer dos últimos meses que foram de suma importância para a conclusão desse estudo.

Aos amigos do laboratório DAFEE, pessoas incríveis que tive o prazer de conhecer e partilhar meus dias nesses últimos anos, por todo auxílio quando precisei de ajuda e pelos momentos de descontração que sempre me proporcionavam boas gargalhadas. Agradeço, especialmente, à Paola Maia e Luiz Lannes pelo incentivo, carinho e inesquecíveis momentos compartilhados dentro e fora do laboratório.

Aos meus amigos da vida que, apesar da falta de tempo devido as horas dedicadas ao estudo e desenvolvimento da pesquisa, sempre se mostraram compreensivos e muito parceiros, me apoiando e ajudando a diminuir o peso das responsabilidades e tornar mais leve essa caminhada.

À Patrícia Severo Ramos, que sempre está comigo em qualquer situação, sendo ela favorável ou não, por ser uma amiga inigualável que a UFRJ me presenteou e que esteve comigo em todos os momentos desde 2009, inclusive estudando e passando juntas para o mestrado.

A todos os meus familiares, especialmente às minhas primas, por estarem sempre comigo quando preciso e por serem responsáveis pelas minhas melhores e mais sinceras risadas.

Por último, mas sem sombra de dúvidas o mais importante, aos meus pais Maurício e Lídia, e ao meu irmão Danilo pelo apoio, amor, cuidado, paciência, estímulo e carinho imensos não só nesses últimos anos, mas ao longo de toda a minha vida.

Muito obrigada.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura básica dos flavonoides 2

Figura 2. Biossíntese dos flavonoides 3

Figura 3. Estrutura da quercetina aglicona 5

Figura 4. Estruturas da isoquercitrina, quercitrina e rutina: exemplos de formas glicosiladas da quercetina 5

Figura 5. Ações biológicas atribuídas à quercetina 9

Figura 6. Esquema representativo do protocolo experimental 24

Figura 7. Espectros de ^{1}H das quercetinas e assinalamentos dos picos 30

Figura 8. Espectros de ^{1}H-^{13}C HSQC das quercetinas e assinalamentos 31

Figura 9. Ganho ponderal em g em nove dias de suplementação 32

Figura 10. Ingestão alimentar em g de ração, em nove dias de suplementação 33

Figura 11. Percentual de aumento do tempo máximo de exercício obtido no segundo teste de esforço comparado ao primeiro, após sete dias de suplementação 34

Figura 12. Concentrações sanguíneas de lactato antes (basal) e 0, 5, 10, 30 minutos após os testes 35

Figura 13. Concentrações sanguíneas de glicose antes (basal) e 0, 5, 10 e 30 minutos após os testes 36

Figura 14. Força tetânica em g desenvolvida pelo músculo sóleo *in vitro*, após nove dias de suplementação 38

Figura 15. (A) Área de secção transversa em µm do músculo sóleo, após 9 dias de suplementação; **(B)** Imagens histológicas representativas da secção transversa do músculo sóleo 39

Figura 16. Espectros de ^{1}H CPMG representativos dos soros dos animais após 9 dias de suplementação 40

Figura 17. Espectros de ^{1}H-^{13}C HSQC representativos dos soros dos animais após 9 dias de suplementação 41

Figura 18. Análise por componentes principais (PCA) dos metabólitos do soro dos animais 42

Figura 19. Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLD-DA) dos metabólitos do soro dos animais 43

Figura 20. *Box plots* representativos dos metabólitos, presentes nos soros dos animais após 9 dias de suplementação, responsáveis por diferenças entres as amostras 45

Figura 21. Análise de via metabólica 46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Conteúdo de quercetina em alguns alimentos 7

Tabela 2. Pesos relativos dos tecidos após 9 dias de suplementação 37

Tabela 3. Índices de desempenho para avaliação dos modelos PLS-DA para metabólitos sanguíneos dos ratos após 9 dias de suplementação 44

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

1D	Unidimensional
ALT	Alanina amino transferase
AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	Proteína quinase ativada por adenosina monofosfato
AST	Aspartato aminotransferase
C	Controle
CO_2	Gás carbônico
COX2	Ciclo-oxigenase – tipo 2
CPMG	Do inglês *carr-purcell-meiboom-gill*
D_2O	Água deuterada
DMSO	Dimetilsulfóxido
$DMSO_2$	Dimetilsulfona
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês *deoxyrribonucleic acid*)
EGCG	Epigalocatequina-galato
ERRO	Espécies reativas de oxigênio
FDA	Do inglês *food and drug administration*
GLUT4	Transportador de glicose tipo 4
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HSQC	Do inglês *heteronuclear single quantum correlation*

IL	Interleucinas
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LDL	Lipoproteína de baixa densidade (do inglês *low density lipoprotein*)
LPS	Lipopolissacarídeos
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
mTOR	Proteína alvo de rapamicina em mamíferos (do inglês *mammalian target of rapamycin*)
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NOS	Óxido nítrico sintase
O_2	Gás oxigênio
ON	Óxido nítrico
PCA	Análise por componentes principais (do inglês *principal componente analysis*)
PGC1-α	Do inglês *peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-γ coactivator 1 alfa*
PLS-DA	Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (do inglês *partial least square discriminant analysis*)
QGA	Quercetina grau alimentar
QPA	Quercetina padrão analítico
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês *ribonucleic acid*)

SIRT1	Sirtuina 1
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta (do inglês *transforming growth factor beta*)
TNF- α	Fator de necrose tumoral (do inglês *tumor necrosis factor*)
TOCSY	Do inglês *total correlation spectroscopy*
U.A.	Unidades arbitrárias
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade (do inglês *very low density lipoprotein*)
VO_2 máx	Volume máximo de oxigênio
Δ	Deslocamento químico

RESUMO

A quercetina é um flavonoide com ampla distribuição em alimentos de origem vegetal, principalmente na cebola e na maçã, e vem sendo relacionada a benefícios em diversas doenças, como câncer, diabetes mellitus tipo 2, obesidade, cardiopatias, hepatopatias, dentre outras. Recentemente, também tem sido estudada quanto aos efeitos sobre o desempenho físico. Os resultados são controversos, e seus mecanismos de ação não estão bem elucidados. Dentro desse contexto, para investigação de funções biológicas de compostos bioativos e identificação de vias metabólicas alteradas, a abordagem metabolômica tem recebido destaque por fazer uma análise simultânea de todos os metabólitos presentes nas amostras. O objetivo desse estudo foi investigar os efeitos da suplementação de quercetina sobre o desempenho físico e o perfil metabólico de ratos wistar. Foram utilizados no estudo 2 tipos de quercetina, que foram analisadas por ressonância magnética nuclear (RMN), e 30 animais, que foram divididos em 3 grupos: Controle (C), Quercetina padrão analítico (QPA) e Quercetina grau alimentar (QGA). Os ratos foram suplementados por 9 dias, tiveram a massa corporal e a ingestão alimentar controlados e a capacidade física avaliada por meio de teste físico em esteira. Após esse período foram avaliados os pesos dos músculos e gordura, a força tetânica *in vitro* e a área de secção transversa do músculo sóleo. Além disso, avaliou-se o perfil metabólico do sangue dos animais por abordagem metabolômica por RMN. Observou-se que o perfil das quercetinas é igual, sendo referentes à forma aglicona. A suplementação com ambas as quercetinas foi capaz de reduzir significativamente o ganho de peso (C = 19,78 ± 2,17 g; QPA = 13,10 ± 1,88 g; QGA = 11,78 ± 1,40 g) sem alterar a ingestão alimentar (C = 215,9 ± 4,3 g; QPA = 211,5 ± 4,1 g; QGA = 204,0 ± 3,3 g). Aumentou significativamente o peso do músculo sóleo, mas não do gastrocnêmio nem dos compartimentos de gordura avaliados. Houve aumento da capacidade física máxima (C = 1,41 ± 3,04 %; QPA = 11,46 ± 4,94 %; QGA = 30,40 ± 8,18 %) e da força tetânica (C = 47,03 ± 4,46 g; QPA = 70,58 ± 7,34 g; QGA = 78,83 ± 5,64 g), porém não houve mudança na área de secção transversa, indicando que a quercetina pode exercer esses efeitos por vias diferentes das vias de hipertrofia muscular. As análises estatísticas multivariadas dos dados obtidos por RMN (PCA e PLS-DA) demonstraram que as suplementações não proporcionaram diferenças no perfil metabólico sanguíneo, entretanto, a identificação do VLDL, lipídio, lactato, creatina, alanina, glutamina, glicose e acetato como os metabólitos que mais variaram entre os grupos (VIP scores), pode estar indicando uma tendência à modulação do metabolismo, principalmente do metabolismo do piruvato e da glicólise ou gliconeogênese. Conclui-se que esses resultados mostraram que a quercetina promoveu melhoras em parâmetros de desempenho físico, inferindo seu potencial como uma possível ferramenta para o aumento da *performance*.

Palavras-chave: Quercetina, desempenho físico, perfil metabólico, RMN

ABSTRACT

Quercetin is a flavonoid widely distributed in vegetable origin foods, mainly in onion and apple, and has been related to benefits in several diseases, such as cancer, diabetes, obesity, heart and liver diseases, among others. Recently, it has also been studied for effects on physical performance. The results are controversial, and it action mechanisms isn't elucidated very well. In this context, for the study of biological functions of bioactive compounds and identification of altered metabolic pathways, the metabolomic approach has been highlighted for making a simultaneous analysis of all metabolites present in samples. The aim of the study was to investigate the effects of quercetin supplementation on the physical performance and metabolic profile of wistar rats. Two types of quercetin were analyzed by nuclear magnetic resonance (NMR). 30 animals were divided into 3 groups: Control (C), Quercetin analytical standard (QAS) and Quercetin food grade (QFG). The rats were supplemented for 9 days, had body mass and food intake controlled and physical capacity assessed by physical treadmill test. After this period, the muscles and fats weights, the in vitro tetanic force and the cross-sectional area of the soleus muscle were evaluated. In addition, the metabolic profile of the animals' blood was evaluated by NMR metabolomic approach. It was observed that quercetins profile is the same, being related to the aglycone form. Supplementation with both quercetin was able to significantly reduce weight gain (C = 19,78 ± 2,17 g; QPA = 13,10 ± 1,88 g; QGA = 11,78 ± 1,40 g), without altering food intake (C = 215,9 ± 4,3 g; QPA = 211,5 ± 4,1 g; QGA = 204,0 ± 3,3 g). It increased the weight of the soleus muscle, but not of the gastrocnemius and the evaluated fat compartments. There was an increase in maximum physical capacity (C = 1,41 ± 3,04 %; QPA = 11,46 ± 4,94 %; QGA = 30,40 ± 8,18 %) and tetanic force (C = 47,03 ± 4,46 g; QPA = 70,58 ± 7,34 g; QGA = 78,83 ± 5,64 g), but there was no change in the cross-sectional area, indicating that quercetin may exert these effects through other pathways than the muscle hypertrophy. Multivariate statistical analysis (PCA and PLS-DA) of the data obtained by NMR showed that the supplements did not provide differences in the blood metabolic profile, however, the identification of VLDL, lipid, lactate, creatine, alanine, glutamine, glucose and acetate as the metabolites that most varied between the groups (VIP scores), may be indicating a possible metabolism modulation, mainly pyruvate metabolism and glycolysis or gluconeogenesis. It is concluded that these results showed that quercetin promoted improvements in physical capacity parameters, inferring its potential as a possible tool to increase performance.

Key words: Quercetin, physical performance, metabolic profile, NMR

SUMÁRIO

1. **INTRODUÇÃO** 1
2. **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** 2
   - **2.1. Quercetina: um flavonoide** 2
   - **2.2. Absorção, metabolismo e biodisponibilidade da quercetina** 7
   - **2.3. Ações biológicas da quercetina** 9
     - **2.3.1. Ação antioxidante** 9
     - **2.3.2. Ação anti-inflamatória** 10
     - **2.3.3. Ação neuroprotetora** 10
     - **2.3.4. Ação anticancerígena** 11
     - **2.3.5. Ação cardio e angioprotetora** 12
     - **2.3.6. Ação anti-obesidade** 12
     - **2.3.7. Ação antidiabética** 13
     - **2.3.8. Ação hepatoprotetora** 14
     - **2.3.9. Ação gastroprotetora** 14
     - **2.3.10. Ação antienvelhecimento** 15
     - **2.3.11. Ação antimicrobiana e antiviral** 15
     - **2.3.12. Ação anti-alérgica** 16
     - **2.3.13. Ação antidepressiva e sobre mudanças comportamentais** 16
   - **2.4. Quercetina e desempenho físico** 16
   - **2.5. Dosagem, toxicidade e tempo de suplementação da quercetina** 19
   - **2.6. Metabolômica** 19
3. **OBJETIVOS** 22
   - **3.1. Objetivo geral** 22
   - **3.2. Objetivos específicos** 22
4. **MATERIAIS E MÉTODOS** 23
   - **4.1. Análise do perfil das quercetinas** 23
   - **4.2. Animais e condições experimentais** 23
   - **4.3. Protocolo experimental** 24
   - **4.4. Administração de quercetina e veículo** 25
   - **4.5. Teste de esforço máximo** 25
   - **4.6. Avaliação do ganho ponderal** 26

4.7. Avaliação da ingestão alimentar 26
4.8. Eutanásia e obtenção de amostras biológicas 26
4.9. Função contrátil do músculo sóleo *in vitro* 27
4.10. Histomorfologia e quantificação da área de secção transversa do músculo sóleo 27
4.11. Análise metabolômica 28
4.12. Análise estatística 29
5. RESULTADOS 30
5.1. Perfil das quercetinas 30
5.2. Ganho ponderal e ingestão alimentar 32
5.3. Capacidade física máxima, lactacidemia e glicemia 33
5.4. Peso dos tecidos 36
5.5. Função contrátil do músculo sóleo *in vitro* 37
5.6. Histomorfologia e área de secção transversa do músculo sóleo 38
5.7. Perfil metabólico no sangue 39
6. DISCUSSÃO 47
7. CONCLUSÃO 53
8. PERSPECTIVAS FUTURAS 54
REFERÊNCIAS 55
ANEXO I 67

1. INTRODUÇÃO

Os flavonoides são compostos fenólicos que estão presentes em alimentos de origem vegetal e têm sido relacionados à prevenção e/ou tratamento de doenças (DIXON e PASINETTI, 2010; DI CARLO et al., 1999). Dentre os flavonoides, a quercetina é a mais comumente encontrada na natureza, tendo como principais fontes alimentares a cebola e a maçã. Ela vem sendo muito estudada quanto as suas funções biológicas, que estão relacionadas, principalmente, com a sua capacidade antioxidante e anti-inflamatória, tendo sido observadas, também, ações anticancerígenas, anti-obesidade, antidiabéticas, cardioprotetoras, dentre diversas outras (WANG et al., 2016; HUBER e RODRIGUEZ-AMAYA, 2008).

Estudos recentes têm avaliado o efeito da quercetina sobre o desempenho físico. Sua ingestão parece ter efeitos positivos sobre a biogênese mitocondrial, principalmente devido ao aumento de PGC-1α (do inglês *peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma coactivator 1 alfa)*, proteína que regula a expressão de genes mitocondriais e nucleares, o que estaria proporcionando aumento da capacidade física (HENAGAN et al., 2015; HENAGAN et al., 2014; DAVIS et al., 2009). Esses resultados ainda são controversos, devido a diferenças no tipo de amostra, treinamento, duração e suplemento utilizados. Os períodos de duração da suplementação variam muito e poucos estudos avaliaram os efeitos a curto prazo (aproximadamente uma semana). Com isso, o tema deve continuar sendo estudado para conclusões mais consistentes sobre os efeitos da quercetina sobre o desempenho físico (NIEMAN et al., 2010; DAVIS et al., 2009).

Para o estudo das funções biológicas de substâncias bioativas, a abordagem metabolômica tem recebido destaque recentemente. Ela possibilita detectar todos os metabólitos sintetizados por um organismo e presentes em fluidos biológicos, fornecendo informações essenciais sobre os efeitos de nutrientes ou compostos bioativos, tornando possível a identificação de vias metabólicas alteradas devido a intervenções na dieta, por exemplo. A técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) é bastante usada em análises de biofluidos e é a única que permite determinar as dinâmicas temporais dos perfis metabólicos (ZHANG et al., 2012; NICHOLSON e LINDON, 2008). Entretanto, foi identificado apenas um estudo que verificou os efeitos do tratamento com quercetina junto com exercício físico sobre o perfil metabólico em modelo animal (WU et al., 2012).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.Quercetina: um flavonóide

Os flavonoides (**Figura 1**) são um grupo de metabólitos secundários, pertencentes à classe dos compostos fenólicos, que ocorrem naturalmente e são comuns em todas as plantas vascularizadas. São compostos que apresentam um núcleo fundamental com 15 átomos de carbono, formando dois anéis aromáticos (A e B) ligados por um anel pirano (C) (DI CARLO et al., 1999).

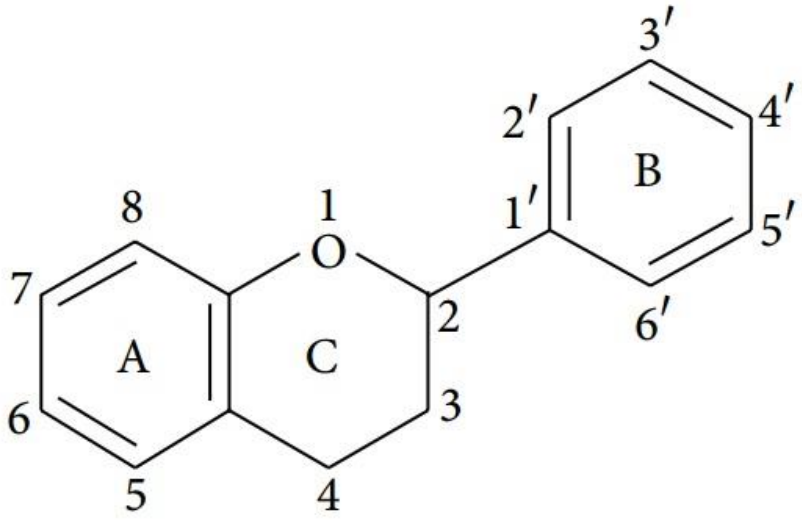

Figura 1. Estrutura básica dos flavonoides.

Fonte: KUMAR e PANDEY (2013)

A biossíntese dos flavonoides (**Figura 2**) ocorre a partir dos metabólitos derivados do ácido chiquímico e acetil-coA. O ácido chiquímico é o precursor da fenilalanina, um aminoácido aromático e composto inicial da síntese dos flavonoides. Ele é desaminado pela enzima fenilalanina-amônia-liase, produzindo o ácido cinâmico, que por ação da enzima cinamato 4-hidroxilase é convertido em ácido *p*-cumárico. Posteriormente, ocorre a adição da CoA, catalisada pela *p*-cumarato-CoA liase, originando a *p*-cumaroil-CoA, que ao reagir com três moléculas de malonil-CoA forma a chalcona, por ação da chalcona sintetase. Por fim, ocorre a ciclização do anel C, catalisada pela chalcona isomerase, para formar a flavanona, que possui o núcleo básico de todos os flavonoides. Desta forma, nos flavonoides, o anel A é formado via acetato, o B via ácido chiquímico e o anel C deriva

do fosfoenolpiruvato (KARAM et al., 2013; DIXON e PASINETTI, 2010; MARQUES, 2008).

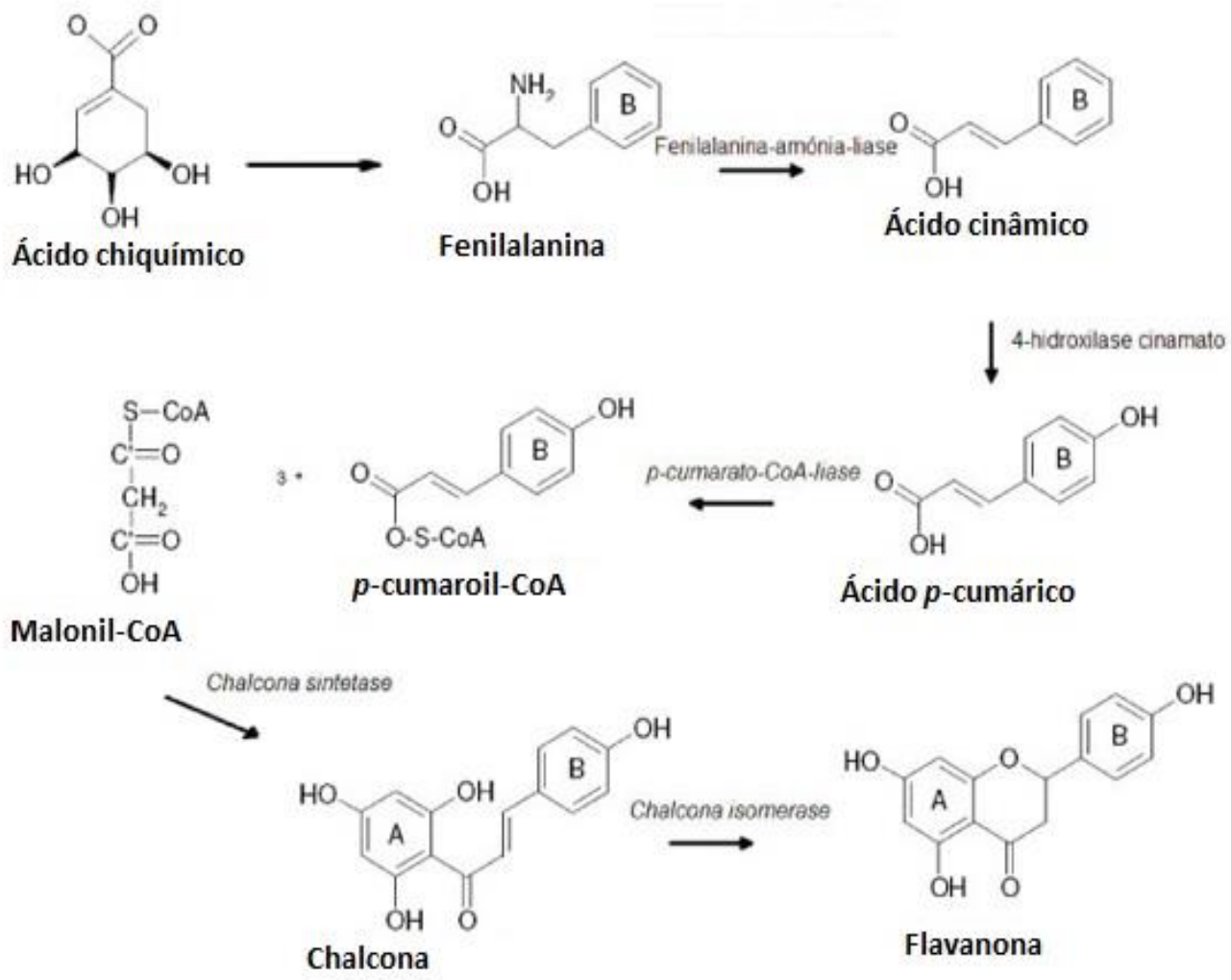

Figura 2. Biossíntese dos flavonoides.

Fonte: Adaptado de KARAM et al (2013).

De acordo com a posição da ligação do anel B ao anel C, os flavonoides são distribuídos em três classes: flavonoides, isoflavonoides e neoflavonoides. Além disso, dentro da classe dos flavonoides, esses compostos diferenciam-se pelo número e posição dos grupamentos substituintes nos anéis A, B e C, podendo ser classificados em: flavonas, flavonóis, isoflavonas, flavanol, flavanonas e chalconas (DIXON e PASINETTI, 2010; ZUANAZZI e MONTANHA, 2003).

Os flavonoides estão amplamente distribuídos no reino vegetal, tendo sido identificados mais de dez mil derivados (DIXON e PASINETTI, 2010). Das três classes, os neoflavonoides têm distribuição bastante restrita, os isoflavonoides moderada e os flavonoides têm ampla distribuição na natureza. Já entre os flavonoides, a subclasse dos flavonóis é a mais predominante e pode ser encontrada na maioria dos vegetais (ARON et al., 2008; MANACH et al., 2004).

A partir da biossíntese dos flavonoides, pode-se explicar a síntese da quercetina. A chalcona isomerase catalisa o fechamento do anel C, gerando a flavanona e encerrando a síntese dos flavonoides, conforme já descrito. O anel C é hidroxilado pela enzima flavanona-3-hidroxilase gerando o di-hidrocaempferol. Posteriormente, o anel B é hidroxilado pela flavonoide-3'-hidroxilase obtendo-se a di-hidroquercetina, a qual é desidrogenada pela enzima flavonol sintase dando origem à quercetina. Além disso, subsequentes conjugações de açúcares são realizadas pelas enzimas flavonoides glicotransferases, gerando as formas glicosiladas (DIXON e PASINETTI, 2010).

A quercetina (3,5,7,3',4'-pentahidroxi-flavona) é o flavonoide mais abundante e pertence à subclasse dos flavonóis. Sua estrutura química é uma aglicona (**Figura 3**), porém, nas plantas e alimentos está, principalmente, glicosilada, ou seja, ligada a moléculas de açúcares. Os açúcares mais comuns são D-glicose e L-ramnose, entretanto, diversos sacarídeos ou combinações destes podem se ligar aos grupos hidroxila da quercetina. As moléculas desprovidas destas ligações são denominadas agliconas. São exemplos das formas glicosiladas a isoquercitrina (quercetina-3-O-glucosídeo), quercitrina (quercetina-3-O--L-rhamnosídeo) e rutina (quercetina-3-O-rutinosídeo) (**Figura 4**) (WANG et al., 2016; HUBER e RODRIGUEZ-AMAYA, 2008).

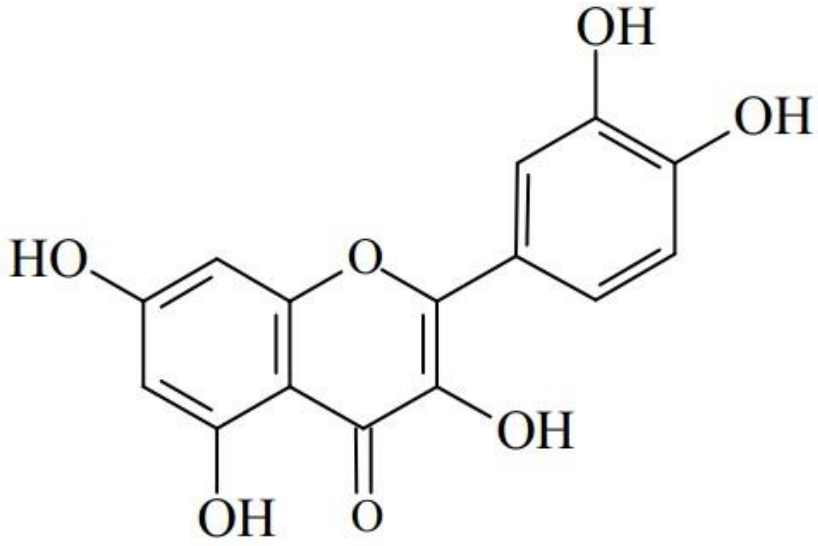

Figura 3. Estrutura da quercetina aglicona.

Fonte: WANG et al (2016).

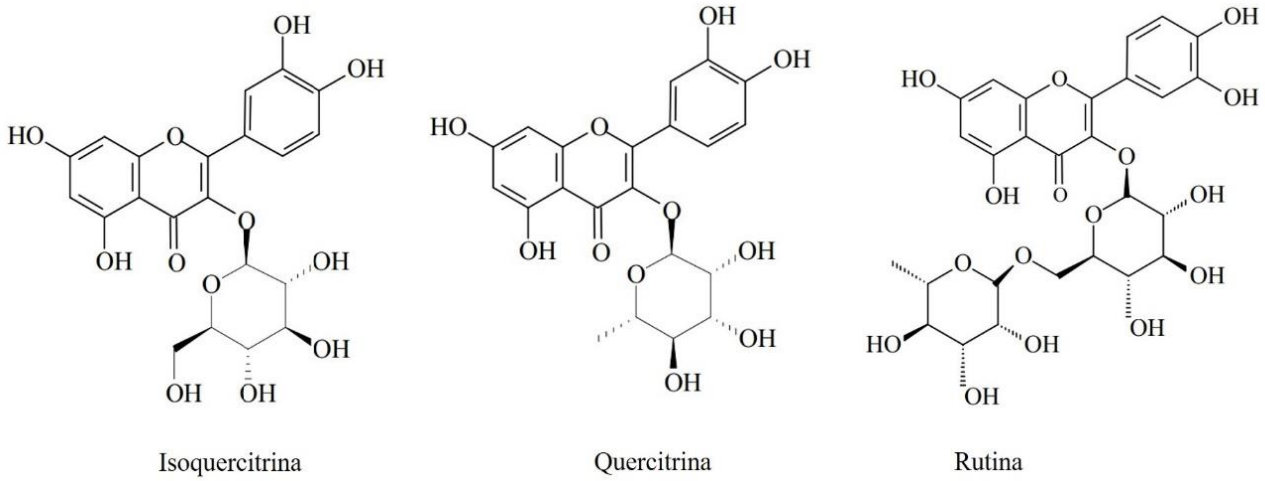

Figura 4. Estruturas da isoquercitrina, quercitrina e rutina: exemplos de formas glicosiladas da quercetina.

Fonte: Adaptado de WANG et al (2016).

A quercetina isolada é um pó amarelo-alaranjado que possui fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_7$, peso molecular de 302,24 g/mol, baixa solubilidade em água e alta solubilidade em dimetilsulfóxido (DMSO). Além disso, apresenta sensibilidade à luz, podendo sofrer

oxidação, característica comum a todos os flavonoides. Sua oxidação é dependente do pH do meio e da presença de oxidantes e se relaciona com a dissociação dos grupos hidroxila (OH), que ocorre com o aumento do pH (FINOT et al., 2015; GAO et al., 2011; MOMIC et al., 2007).

Comumente, a técnica analítica mais utilizada para a determinação do teor de quercetina em alimentos é a cromatografia líquida de alta eficiência, a qual envolve uma etapa de hidrólise no preparo das amostras, com enzimas ou ácidos, em que as formas glicosiladas são então convertidas na forma aglicona. Por isso, normalmente os dados de concentração deste flavonol disponíveis na literatura são relativos à quercetina aglicona. A análise do perfil de flavonoides em alimentos é um tanto mais complexa, necessitando técnicas mais elaboradas, como cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (HUBER e RODRIGUEZ-AMAYA, 2008).

A quercetina é encontrada em uma extensa variedade de alimentos (Tabela 1), como cebolas, maçãs, brócolis, chás, vinho tinto, couve e *berries*. Entretanto, a biossíntese de flavonoides nas plantas em geral é influenciada por diversos fatores, dentre os quais, exposição à luz solar, condições ambientais, grau de maturação da planta e variabilidade de espécies genéticas. Com isso, há grande variação da concentração e do perfil de flavonoides entre os diferentes tipos de alimentos e para o mesmo em diferentes locais de produção e época do ano. Isso dificulta o estabelecimento de padrão quantitativo e qualitativo desses compostos nos alimentos (HUBER e RODRIGUEZ-AMAYA, 2008).

No Brasil, estudo realizado com hortaliças comumente utilizadas, apontou que houve alteração sazonal na concentração de flavonóis e flavonas, com tendência de aumento dessas concentrações no verão, sendo a diferença significativa apenas para quercetina em couve (256 vs 399 μg/g) e alface crespa (7,18 vs 30,8 μg/g) (HUBER et al., 2009). Além disso, a temperatura afeta a estabilidade da quercetina. O tratamento de pasteurização (80 °C, 91 s) reduziu aproximadamente 17% desse composto no suco de toranja (IGUAL et al., 2011). Com isso, é difícil estimar a presença desse composto na dieta humana, porém já foi descrito consumo médio de 16 - 17 mg por dia (SESSO et al., 2003; HERTOG et al., 1993).

Tabela 1. Conteúdo de quercetina em alguns alimentos.

Fonte alimentar	**Conteúdo de quercetina (mg/100 g de porção comestível)**
Alcaparras, crua	233,84
Cebola vermelha, crua	39,21
Aspargos, cozido	15,16
Cranberry, crua	14,84
Lingonberry, crua	13,30
Mirtilo, cru	7,67
Alface, folha vermelha, crua	7,61
Cebola, branca, crua	6,17
Tomate, em conserva	4,12
Maçã, Red Delicious, com casca	3,86
Maçã, Gala, com casca	3,80
Maçã, Golden Delicious, com casca	3,69
Brócolis, cru	3,26
Chá verde, preparado	2,49
Cereja, crua	2,29
Chá preto, preparado	2,19
Uva, preta	2,08
Uva, branca	1,12
Vinho, vermelho, mesa	1,04
Vinho, branco, mesa	0,04

FONTE: Adaptado de USDA Database (2014)

2.2. Absorção, metabolismo e biodisponibilidade da quercetina

Apesar dos diversos benefícios à saúde que têm sido atribuídos à quercetina, a sua atividade é comprometida devido à sua baixa biodisponibilidade. A eficiência de absorção da quercetina é diretamente influenciada pela glicosilação, que confere variações em sua estrutura química, determinando a hidrofilia ou hidrofobia da molécula. A forma aglicona possui baixa solubilidade em água (hidrofóbica), enquanto as formas glicosiladas, predominante nos alimentos, são mais hidrofílicas (MANACH et al., 2004). A quercetina-

3-rutinosídeo, apesar de ser uma das formas mais encontradas nos alimentos, apresenta apenas 20% de absorção (OLTHOF et al., 2000).

A quercetina glicosilada começa a ser hidrolisada na cavidade oral por bactérias e/ou enzimas encontradas nas células epiteliais, liberando a forma aglicona. No estômago, parece não ser absorvida, já no intestino delgado, sua característica hidrofílica dificulta a difusão passiva pelos enterócitos. Então, as β-glicosidases, enzimas presentes no intestino, que possuem alta afinidade por glicosídeos de flavonoides, clivam a ligação glicosídica, liberando a aglicona, que possui a capacidade de atravessar a membrana do enterócito por difusão passiva (DAY et al., 1998). Além disso, diversas bactérias da microbiota intestinal têm a capacidade de clivar a quercetina em moléculas, como os ácidos fenólicos (KIM et al., 1998). No cólon, os glicosídeos não absorvidos no intestino delgado sofrem hidrólise por enzimas expressas pela microbiota colônica e tanto a forma aglicona quanto os produtos de degradação da quercetina podem ser absorvidos ou excretados nas fezes (AURA et al., 2002).

Após absorvida, a quercetina chega à circulação sistêmica e alcança o fígado, onde é metabolizada a conjugados glicuronizados, metilados e sulfatados. Essas moléculas retornam para a circulação sistêmica e se ligam às proteínas plasmáticas, principalmente à albumina ou são excretados na bile e podem retornar ao lúmen intestinal e serem novamente hidrolisados e reabsorvidos ou excretados nas fezes. As proteínas ligadas aos conjugados de quercetina chegam aos tecidos e por meio da ação da enzima β-glicuronidase, são deglicuronizadas, liberando a forma aglicona, a qual desempenha sua ação como composto bioativo (O'LEARY et al., 2003; PISKULA e TERAO, 1998; BOULTON, WALLE e WALLE, 1998).

Walle e colaboradores (2001) encontraram, após ingestão oral de 100 mg de quercetina aglicona, concentrações plasmáticas de 890 nmol/L, após 30 minutos, e 1160 nmol/L, após 8 horas. Informações acerca da forma melhor absorvida e mais biodisponível permanecem controversas. Estudo de Hollman e colaboradores (1995) mostrou, em pacientes ileostomizados, que a quercetina presente em cebolas, na forma glicosilada, foi mais absorvida quando comparada à forma aglicona. Em contrapartida, estudo que utilizou células de carcinoma de cólon (Caco-2), identificou que a quercetina aglicona foi transportada mais facilmente pela membrana do que a forma glicosilada (WALGREN et al., 1998).

2.3. Ações biológicas da quercetina

Diversas ações biológicas têm sido atribuídas à ingestão de quercetina, tais como antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena, cardioprotetora, dentre outras, como representado na **Figura 5**.

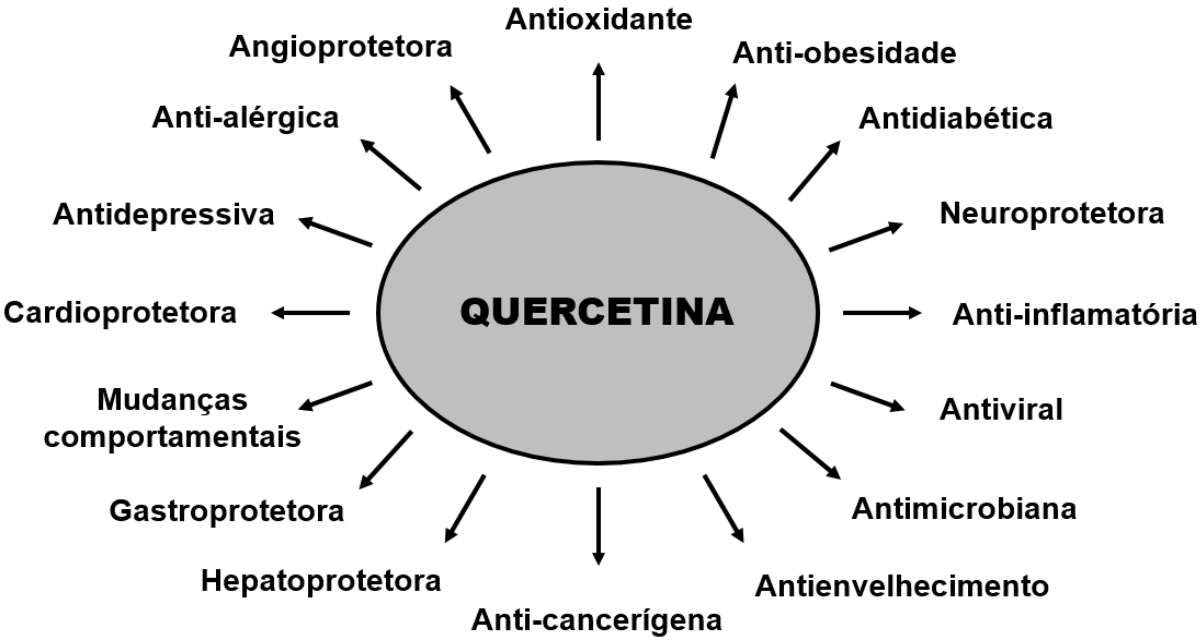

Figura 5. Ações biológicas atribuídas à quercetina.

2.3.1. Ação antioxidante

As atividades farmacológicas da quercetina estão relacionadas, principalmente, ao seu potente efeito antioxidante. Sua estrutura química confere esse efeito, pois torna possível o deslocamento de elétrons, doação de prótons e quelação de metais. A quercetina é capaz de inibir o processo de estresse oxidativo das seguintes maneiras: por quelar íons metálicos, afetando o transporte, a reatividade, a biodisponibilidade e a toxicidade desses elementos e por interagir estabilizando íons superóxido e radicais formados na peroxidação de lipídios (KIM et al., 2013).

Essa atividade antioxidante, realizada por flavonoides como a quercetina, tem sido muitas vezes associada à redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis relacionadas com estresse oxidativo, como câncer, diabetes melittus tipo 2, doença cardíaca coronária e acidente vascular cerebral (MAURYA e VINAYAK, 2015; JEONG et al., 2012; PEREZ-VIZCAINO e DUARTE, 2010).

2.3.2. Ação anti-inflamatória

A quercetina tem demonstrado possuir ação anti-inflamatória, por reduzir processos inflamatórios agudos, crônicos e subclínicos, associada à sua capacidade de induzir a produção de mediadores responsáveis pela redução de interleucinas (IL) envolvidas nos processos inflamatórios. É capaz de causar supressão da produção de TNF-α (fator de necrose tumoral alfa) e óxido nítrico (ON) em macrófagos e mastócitos e inibir as enzimas COX2 (ciclo-oxigenase – tipo 2) e NOS (óxido nítrico sintase). Além disso, inibe a formação de agentes pró-inflamatórios e regula a via do NF-κβ, o que reduz a ativação e o recrutamento de células inflamatórias (RUBIÓ et al., 2013; ROGÉRIO et al., 2010; ROGÉRIO et al., 2007).

Na inflamação, o ON atua como um mediador pró-inflamatório e é sintetizado pela enzima iNOS (óxido nítrico sintase induzível) em resposta a compostos pró-inflamatórios, como os lipopolissacarídeos (LPS). O pré-tratamento de cardiomioblastos H9c2 com quercetina, foi capaz de inibir a expressão da enzima iNOS induzida por LPS. Com isso, foi possível reduzir a produção de óxido nítrico e do estresse oxidativo induzido pela produção desregulada de ON, que contribui para a formação de peroxinitrito e outras espécies reativas (ANGELONI e HRELIA, 2012).

2.3.3. Ação neuroprotetora

As evidências sugerem que a quercetina tem efeitos protetores nas doenças neurodegenerativas. Estudo realizado com ratos jovens e idosos intoxicados com etanol, demonstrou efeitos sobre a cognição, onde a quercetina pareceu proteger as células do cérebro contra o estresse oxidativo, prevenindo as doenças neurodegenerativas (HEO e LEE, 2004). Patil e colaboradores (2003) em estudo com camundongos, demonstraram que a quercetina foi capaz de inibir o efeito de amnésia provocado pelo LPS. Os autores

sugeriram que esse efeito é devido à modulação da COX2 e da ONS, enzimas envolvidas no processo de desenvolvimento da doença de Alzheimer.

Em estudo de Naidu e colaboradores (2003), foi induzido o estresse oxidativo no cérebro de ratos com tratamento contínuo do neuroléptico haloperidol. O uso constante desse fármaco induz a peroxidação lipídica e reduz enzimas antioxidantes no cérebro, causando desordens neurológicas, como a discinesia orofacial, caracterizada por movimentos repetitivos involuntários. Posteriormente foi administrada a quercetina, que foi capaz de reverter a discinesia orofacial, por reduzir da peroxidação lipídica e aumentar algumas enzimas antioxidantes.

2.3.4. Ação anticancerígena

Existem muitos estudos mostrando o efeito protetor da quercetina em diversos tipos de câncer. Um dos mecanismos está relacionado com a capacidade da quercetina de estabilizar espécies reativas de oxigênio (ERO), que danificam proteínas, DNA, RNA e membranas celulares, podendo levar às mutações. Ela atua eliminando os radicais livres, inibindo as enzimas envolvidas na carcinogênese, controlando a proliferação e induzindo a morte celular. É capaz de regular o ciclo celular, inibir atividade de proteínas e expressão de genes relacionados às vias de sinalização do câncer e, além disso, pode diminuir a caquexia e a resistência às drogas (MAURYA E VINAYAK, 2015; RUSSO et al, 2014; VELÁZQUEZ et al., 2014; GARELNABI e MAHINI, 2014; GIBELLINI et al., 2011; CHEN et al., 2010).

Tan e colaboradores (2003) observaram, que a quercetina diminuiu a expressão e a atividade da enzima matriz-metaloproteinase-2, que está relacionada aos processos de migração, invasão e formação de tubos nas células endoteliais. Além disso, outro estudo mostrou que a quercetina pode exercer o seu efeito anticancerígeno por inibir a atividade da mTOR (proteína alvo de rapamicina em mamíferos) por vias múltiplas (BRUNING, 2013).

As ações mais eficazes da quercetina sobre o câncer são no sangue, cérebro, pulmão, útero e glândulas salivares. Ela possui uma atividade citotóxica muito mais elevada nas células mais agressivas do que nas células de crescimento lento, sugerindo que as células mais prejudiciais são os alvos principais (SAK, 2014).

2.3.5. Ação cardio e angioprotetora

Em estudo com ratos hipertensos, a quercetina foi capaz de reduzir a pressão arterial, a hipertrofia cardíaca e renal e as alterações vasculares. Os autores relacionaram esses benefícios à redução do estado oxidante, devido às propriedades antioxidantes da quercetina (DUARTE et al., 2001). Esse flavonoide evita a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que estão relacionadas ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (TAPAS et al., 2008).

Há evidências de que a quercetina, assim como outros flavonóis, exercem efeitos protetores *in vitro* sobre o ON e a função endotelial em situação de estresse oxidativo, além dos efeitos de vasodilatação, anti-agregação de plaquetas, inibição da oxidação das LDL, redução de moléculas de adesão e marcadores inflamatórios, prevenção da oxidação neuronal e lesão inflamatória. Assim, a quercetina produz efeitos anti-hipertensivos e anti-aterogênicos, evitando a disfunção endotelial e protegendo o miocárdio do dano isquêmico (PEREZ-VIZCAINO e DUARTE, 2010). Revisão englobando estudos com animais e seres humanos hipertensos (> 140 mmHg sistólica e > 90 mmHg diastólica) indicou redução na pressão arterial sistêmica após a suplementação com quercetina (LARSON et al., 2012).

Estudo recente, demonstrou evidências que corroboram o ponto de vista de que a quercetina pode ser considerada um agente contra doenças cardiovasculares. Os resultados forneceram uma nova visão sobre os possíveis mecanismos moleculares, de modo que a quercetina parece suprimir lesões oxidativas endoteliais induzidas pela LDL oxidada e pela modulação de vias de sinalização (HUNG et al., 2015).

2.3.6. Ação anti-obesidade

Revisões foram publicadas sobre o papel dos polifenóis dietéticos na obesidade, incluindo a quercetina (KOBORI, 2014; SIRIWARDHANA et al., 2013). Neste cenário, um estudo investigou os mecanismos moleculares pelos quais ela poderia influenciar na adipogênese e apoptose de células adiposas. Foi realizada exposição de pré-adipócitos 3T3-L1 à quercetina, que resultou em diminuição da expressão de fatores e enzimas relacionados com a adipogênese. Além disso, o conteúdo de AMPK (proteína quinase ativada por AMP - adenosina monofosfato) e de seus substratos foram regulados na presença desse composto. A atividade anti-adipogênese se dá por ativação da via de

sinalização da AMPK, e a apoptose de adipócitos maduros parece ser mediada por um ajuste das enzimas ERK e JNK, que desempenham papéis importantes durante a apoptose (AHN et al., 2008).

Quanto aos mecanismos moleculares influenciados pela quercetina nos efeitos fisiológicos da hiperlipidemia, Jung e colaboradores (2013) observaram que ela regula a expressão de genes hepáticos relacionados com o metabolismo lipídico. A suplementação em camundongos foi capaz de diminuir significativamente a obesidade induzida por uma dieta rica em gordura e reduzir o peso corporal, o fígado e o tecido adiposo branco em comparação com os que receberam apenas a dieta. Além disso, o acúmulo de lipídios no fígado e o tamanho das partículas lipídicas também foram reduzidos.

Para investigar mais profundamente como pode reduzir a obesidade, os autores examinaram os genes relacionados com o metabolismo lipídico no fígado. Foi observado modificação dos perfis de diversos genes envolvidos na lipogênese, incluindo Fnta, PON1, PPARg, Aldh1b1, Apoa4, ABCG5, GPAM, CD36, Fdft1 e FASN. Conjuntamente, esses resultados indicam que a quercetina previne, em camundongos, a obesidade induzida por uma dieta rica em gordura, e esse efeito pode estar ligado com a regulação da lipogênese por transcrição de genes (JUNG et al., 2013).

2.3.7. Ação antidiabética

Quanto aos seus efeitos antidiabéticos, a quercetina foi capaz de restaurar as células β-pancreáticas, prevenir os danos oxidativos e aumentar a liberação de insulina em ratos e ratas diabéticos (BRAGA, 2011; KIM et al., 2011).

Em estudo com camundongos com diabetes mellitus tipo 2, os teores de glicose circulante foram significativamente menores quando tratados com quercetina. Além disso, mostrou aumento da adiponectina, redução do colesterol total, aumento do HDL-colesterol, diminuição dos triglicerídeos e aumento da atividade de enzimas específicas do fígado envolvidas em processos de descontaminação de espécies reativas de oxigênio (superóxido dismutase, catalase e glutationa peroxidase). Os resultados indicam que a quercetina pode ser eficiente na melhoria da hiperglicemia, dislipidemia e do status antioxidante no diabetes melittus tipo 2 (JEONG et al., 2012).

Do ponto de vista molecular, relata-se que a ação antidiabética da quercetina é cumprida estimulando a absorção de glicose por meio de um mecanismo independente de

insulina, envolvendo AMPK. A ativação da AMPK no músculo esquelético leva à translocação do transportador de glicose GLUT4 para a membrana plasmática e no fígado diminui a produção de glicose, principalmente pela regulação negativa de enzimas chaves da gliconeogênese, como fosfoenolpiruvato carboxiquinase e glicose-6-fosfatase (EID et al., 2015).

2.3.8. Ação hepatoprotetora

Estudos mostraram que a quercetina tem potencial terapêutico contra a fibrose hepática, com redução da produção de NF-κB e TGF-β (WAN et al., 2014). Estudo com administração de tetracloreto de carbono para induzir dano no tecido hepático de ratos, demonstrou que após o tratamento com quercetina houve diminuição considerável dos danos oxidativos, aumento de enzimas antioxidantes e melhora na integridade hepática (BONA, 2010).

A quercetina também diminuiu as enzimas sinalizadoras de danos hepáticos, lipoperoxidação, dano do DNA e um menor grau de processo inflamatório em camundongos com esteatose hepática não-alcoólica (MARCOLIN et al., 2013). Já em camundongos com hepatite aguda, reduziu significativamente as concentrações de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), atenuando as alterações patológicas no fígado (WAN et al., 2014).

2.3.9. Ação gastroprotetora

Alguns estudos relataram, *in vivo*, efeito protetor da quercetina contra a ulceração gástrica induzida pelo etanol, bem como contra a esofagite de refluxo (WU et al., 2015; RAO e VIJAYAKUMAR, 2008). Também, cobaias infectadas com H. pylori tratadas durante 15 dias com quercetina, apresentaram diminuição da infecção bacteriana na mucosa gástrica e resposta inflamatória reduzida (GONZÁLEZ-SEGOVIA et al., 2008).

A quercetina pode proteger as células epiteliais gástricas dos danos oxidativos e reduzir a produção de ERO durante a lesão aguda da mucosa gástrica. Em células epiteliais gástricas de humanos, pré-tratadas com esse flavonoide e, posteriormente, induzidas com H_2O_2 (peróxido de hidrogênio), foi observada redução da perda de viabilidade celular, redução de espécies reativas de oxigênio intracelulares e influxo de

cálcio, regulação positiva da expressão de PGC-1α sob o estado de estresse oxidativo e um declínio significativo da apoptose celular (HU et al., 2015).

2.3.10. Ação antienvelhecimento

Quanto as propriedades antioxidantes da quercetina e a associação entre envelhecimento e estresse oxidativo, Belinha e colaboradores (2007) observaram, em células submetidas ao estresse oxidativo, que esse composto aumentou a resistência ao peróxido de hidrogênio e ao estresse oxidativo, que é um fator limitante para a longevidade. Além disso, o flavonóide aumentou em 60% o tempo de vida das células. A quercetina foi capaz de proteger queratinócitos de agentes oxidantes exógenos, evitar os danos causados por radicais livres e a depleção de antioxidantes endógenos e inibir a peroxidação lipídica após exposição a raios ultravioleta (HATAHET et al., 2016).

Chondrogianni e colaboradores (2010) observaram influência positiva sobre a sobrevivência, a viabilidade e o tempo de vida de fibroblastos primários de humanos. Ao mesmo tempo, quando os fibroblastos senescentes foram cultivados na presença da quercetina, observou-se um efeito de rejuvenescimento.

2.3.11. Ação antimicrobiana e antiviral

Como já mencionado anteriormente, a quercetina mostrou atividade contra a bactéria H. pylori (GONZÁLEZ-SEGOVIA et al., 2008). Além disso, os compostos naturais epigalocatequina galato e quercetina, sozinhos e em combinação, foram testados como potenciais terapias clínicas antimicrobianas. Betts e colaboradores (2015) relataram uma forte atividade destes compostos isoladamente, contra *Staphylococcus aureus*, enquanto a atividade foi significativamente aumentada na presença concomitante dos dois, tendo um efeito bactericida acima de vinte e quatro horas.

Quanto à atividade antiviral, foi observado que a quercetina permitiu a interrupção do ciclo de vida do vírus da hepatite C e da replicação do genoma do vírus da hepatite B (CHENG et al., 2015; GONZALEZ et al., 2009). Em estudo com diversas cepas de vírus da gripe, foi encontrado que esse flavonoide tem ação antigripal, pois mostrou efeito inibitório na fase inicial da infecção, durante a entrada do vírus, inibindo a fusão da célula viral (WU et al., 2015).

2.3.12. Ação anti-alérgica

Foi observado que a quercetina é capaz de bloquear substâncias envolvidas em processos alérgicos e que pode atuar como inibidor da secreção de mastócitos, por meio da inibição do influxo de cálcio, liberação de histamina, leucotrienos e prostaglandinas, acarretando em redução na liberação da triptase, MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos) e IL-6 (interleucina 6) e regulação negativa do RNA mensageiro para histidina descarboxilase. Com isso, o flavonoide mostrou efeitos atenuantes nos sintomas de alergias nasais induzidos por inflamação neurogênica, por meio da supressão da produção de neuropeptídios (MLCEK et al., 2016; KASHIWABARA et al., 2016).

2.3.13. Ação antidepressiva e sobre mudanças comportamentais

Sugere-se que o efeito antidepressivo da quercetina seja dependente da inibição dos receptores de N-metil D-aspartato e/ou da síntese de ON, que estão envolvidos na fisiopatologia da depressão (HOLZMANN et al., 2015). Foi observado que o flavonoide aumenta o tempo de interação social e minimiza mudanças no comportamento animal (BHUTADA et al., 2010; PRIPREM et al., 2008).

Evidências *in vitro* e *in vivo* indicam que a quercetina pode inibir a monoamina oxidase A (CLARKE e RAMSAY, 2011), enquanto experimentos *in vivo* mostram que esse flavonoide pode diminuir os teores cerebrais de fator de liberação de corticotrofina induzido por estresse, que está associado à ansiedade e depressão (BHUTADA et al., 2010). Além disso, o composto também é capaz de reduzir, no plasma, o aumento dos hormônios corticosterona e adenocorticotrópico, induzidos por estresse (KAWABATA et al., 2010).

2.4.Quercetina e desempenho físico

Em um estudo com ratos, treinados e sedentários, foi observada tendência ao aumento da distância percorrida e do tempo até chegar à fadiga, após suplementação com quercetina (25 mg/Kg) em dias alternados por oito semanas, porém, não foi verificado aumento no volume máximo de oxigênio absorvido (VO_2 máx) (CASUSO et al., 2013).

Estes mesmos autores também mostraram que o grupo treinado e suplementado obteve o menor ganho de peso e maior eficiência alimentar, que é a capacidade do animal em transformar o alimento ingerido em ganho ponderal (CASUSO et al., 2014).

A ingestão durante 2 semanas de uma dieta contendo 0,1% de quercetina foi capaz de aumentar a lipólise em camundongos em uma sessão de natação de 60 minutos e diminuir a concentração de lactato no sangue. Estes resultados indicam que a quercetina pode ser benéfica para melhorar a resistência física e atuar como agente antifadiga no exercício prolongado (WU et al., 2012). Davis e colaboradores (2009) mostraram aumento da capacidade física aeróbia (maior resistência máxima e de tempo de atividade voluntária em esteira) de camundongos suplementados, durante sete dias, com diferentes doses de quercetina (12,5 ou 25 mg/kg), que foi associado ao aumento na expressão de mRNA do gene PGC-1α e de DNA mitocondrial no músculo esquelético.

Cureton e colaboradores (2009) mostraram que a suplementação de 1g de quercetina por dia, durante 7 a 16 dias, não foi capaz de melhorar a capacidade oxidativa do músculo nem o desempenho físico em indivíduos não treinados. Nieman e colaboradores (2010), também em indivíduos não treinados, após duas semanas de suplementação com 1g de quercetina (associada às vitaminas C e B3) por dia, verificaram aumento significativo no VO_2 máx e no tempo de fadiga. Contudo, não foram observados aumentos na expressão de DNA e mRNA de genes relacionados à biogênese mitocondrial (PGC1-α, Sirtuína 1 (SIRT1), citrato sintase, citocromo C oxidase).

Estudo com ciclistas treinados, que receberam 1000 mg de quercetina por dia durante três semanas, não demonstrou diferença significativa no desempenho físico, assim como na expressão de mRNA para os genes PGC-1α e SIRT1 (DUMKE et al., 2009). Corroborando com esses resultados, pesquisa que avaliou os efeitos da suplementação de 1000 mg de quercetina por dia no desempenho físico e no status antioxidante de corredores de longa distância, mostrou que, após 6 semanas de suplementação, ocorreu uma redução significante nos teores de malondialdeído, um indicador de peroxidação lipídica. Essa evidência sugere que a quercetina é capaz de reduzir o estresse oxidativo. Porém, os resultados de melhora no desempenho físico não foram significativos, como o VO_2 máx, economia de corrida, frequência cardíaca e percepção subjetiva de esforço (SCHOLTEN e SERGEEV, 2013).

McAnulty e colaboradores (2011) investigaram os efeitos da administração desse flavonoide em atletas de ciclismo. Os indivíduos receberam, diariamente, 1000 mg de

quercetina ou placebo, durante seis semanas e, posteriormente, foram analisadas as concentrações plasmáticas de nitrito, ferro, enzimas antioxidantes e proteína C-reativa. Os autores concluíram que o ciclismo induz aumento de estresse oxidativo e inflamação e a suplementação de quercetina em longo prazo não foi capaz de exercer qualquer efeito preventivo. Além disso, outro estudo com ciclistas treinados, suplementados por duas semanas com quercetina combinada com EGCG (epigalocatequina-galato) ou placebo, não mostrou diferença na expressão de mRNA para os genes relacionados à biogênese mitocondrial (NIEMAN et al., 2009).

Estudo com ratos suplementados com 50 ou 600 µg de quercetina por dia durante 3 ou 8 semanas, concluiu que a suplementação em baixa dose aumentou a expressão de PGC1-α (HENAGAN et al., 2014). Foi demonstrado também que a menor dose de quercetina aumenta o gasto de energia e resulta em melhora na composição corporal, benefícios esses que foram associados ao maior do número de mitocôndrias no músculo esquelético, que levaram à melhoria no metabolismo de lipídios (HENAGAN et al., 2015).

Estudo conduzido em nosso grupo de pesquisa, também em modelo animal, concluiu que a administração oral de 25 mg/kg de quercetina (padrão analítico) reduziu a gordura retroperitoneal, aumentou o desempenho físico, a produção de força muscular e a área de secção transversa do músculo sóleo, além de promover aumento da expressão do gene PGC1-α, relacionado à biogênese mitocondrial e TGF-β, à redução da atrofia muscular, com apenas 9 dias de tratamento (BOUVIERE, 2015).

Existem evidências que sustentam a hipótese de que a quercetina seja capaz de aumentar o desempenho em exercícios de *endurance*. Isso se deve a estudos que mostraram uma variedade de propriedades biológicas, conhecidas por afetar o desempenho físico e mental e aumentar a biogênese mitocondrial. Um estudo de meta-análise mostrou que a quercetina aumenta em 3% o desempenho e o VO_2 máx em relação ao grupo placebo em humanos (KRESSLER et al., 2011).

Esses efeitos ergogênicos ainda não estão bem elucidados e os resultados necessitam ser avaliados cuidadosamente, já que podem ser influenciados pelo tipo de sujeito e seu grau de treinamento, além do tipo de suplemento utilizado. Assim, mais estudos são necessários para determinar os efeitos da quercetina sobre o desempenho físico, e se eles estariam relacionados a modulações no metabolismo.

2.5. Dosagem, toxicidade e tempo de suplementação da quercetina

A toxicidade dos flavonoides é bastante reduzida em animais (HAVSTEEN, 1983). A quercetina é reconhecida como segura de acordo com o FDA (*Food and Drug Administration)* (DAVIS et al., 2009). Estudos utilizam diferentes dosagens de quercetina que varia de 10 a 500 mg/kg, sem relatos de efeitos tóxicos ou adversos. Em contrapartida, pesquisas com ratos mostraram que dosagens de quercetina acima de 500 mg/kg foram capazes de gerar compostos mutagênicos (detectados na urina e fezes) e que, por longos períodos, levaram ao aparecimento de lesões neoplásicas nos rins (CREBELLI et al., 1987; DUNNICK e HAILEY, 1992).

Estudos mostraram que o período de duração de suplementação da quercetina varia muito e existem poucos que avaliaram efeitos de curto prazo. A suplementação de sete dias é considerada curta (DAVIS et al., 2009). A quercetina quando suplementada no período de duas a seis semanas, tanto em indivíduos treinados quanto em não treinados, está relacionada com resultados inconsistentes sobre o desempenho (NIEMAN et al., 2010).

2.6.Metabolômica

A metabolômica representa um método abrangente para a avaliação global dos metabólitos presentes em amostras biológicas, incluindo soro, plasma, sangue total, urina, saliva, tecidos, líquido sinovial, etc. Esses compostos, resultantes da atividade metabólica, apresentam baixo peso molecular (< 2.000 Da), dentre os quais incluem-se lipídios, carboidratos, aminoácidos, peptídeos, ácidos nucleicos, ácidos orgânicos e vitaminas. A metabolômica fornece uma abordagem sistemática para compreender as regulações metabólicas globais dos organismos. Com isso, o método pode ser usado para identificar vias metabólicas alteradas devido a, por exemplo, intervenções farmacêuticas, no estilo de vida e na dieta (ZHANG et al., 2012; KIRWAN et al., 2009; NICHOLSON e LINDON, 2008).

Essa abordagem se mostra importante na investigação do estado fisiológico de organismos, no diagnóstico e identificação de biomarcadores para determinadas doenças. Pode ser aplicada, ainda, em estudos nutricionais, na identificação de biomarcadores de ingestão de nutrientes e compostos alimentares específicos. Com isso, estudos com intervenções dietéticas, podem fornecer informações essenciais sobre os efeitos benéficos e/ou deletérios de nutrientes ou compostos bioativos (ZHANG et al., 2012; GIBNEY et al., 2005).

Essa metodologia faz parte das ciências "ômicas", que também incluem a genômica, transcriptômica e proteômica. Enquanto essas três são consideradas fluxo da expressão gênica, avaliando características estruturais, a metabolômica reflete alterações fenotípicas e funcionais de um sistema biológico (PUTRI et al., 2013).

A determinação dos metabólitos faz-se, principalmente, por meio de duas técnicas analíticas: a ressonância magnética nuclear (RMN) e a espectrometria de massas (EM) associada a cromatografia (BHARTI et al., 2013; FITZPATRICK e YOUNG, 2013). A RMN é muito utilizada para análise em fluidos biológicos e extratos celulares e que permite a determinação das dinâmicas temporais dos perfis de metabólitos. Tem como vantagens a eficiência, ser uma técnica não destrutiva e promover análise estrutural, reduzindo ambiguidades. (ZHANG et al., 2012; XU et al., 2007).

A RMN é uma técnica baseada no conceito de que certos núcleos atômicos são intrinsecamente magnéticos, ou seja, pode ser observada em isótopos que apresentem essa propriedade, que é chamada de *spin*, como o hidrogênio (^{1}H), carbono (^{13}C) e nitrogênio (^{15}N). A RMN baseia-se na alteração do *spin* dos núcleos quando submetidos a um campo magnético e isso depende exclusivamente do tipo de núcleo e da intensidade do campo aplicado (BERG et al., 2002; SANDERS e HUNTER, 1993).

A técnica não observa um único núcleo, mas uma população de núcleos presentes na amostra examinada. Para que isso seja possível é necessário desestabilizar o sistema com a aplicação de um pulso de radiação eletromagnética (radiofrequência). Quando o núcleo absorve essa energia de radiofrequência, o vetor de magnetização é excitado, rotacionando longe do seu estado de equilíbrio, obtendo assim, a ressonância. Após essa perturbação, o sistema retorna ao seu estado inicial de menor energia, por meio de processos denominados relaxação. Nesse intervalo de tempo é emitido um sinal chamado FID, que representa o decaimento da energia absorvida pelos núcleos durante o processo de restauração do estado de equilíbrio (BERG et al., 2002; SANDERS e HUNTER, 1993).

Os núcleos processam a radiação eletromagnética em determinada frequência (em Hertz) denominada deslocamento químico (δ), que é normalmente expresso em partes por milhão (ppm). O deslocamento químico depende do ambiente químico em volta do núcleo, que é influenciado pela presença de grupos eletronegativos vizinhos, anéis aromáticos, etc. Uma alta densidade eletrônica atua como blindagem magnética, quanto mais próximos desses grupos mais desblindado é o núcleo, o que resulta em sinais em diferentes regiões do espectro de RMN. Isso implica que os núcleos mais blindados apresentam deslocamentos menores do que aqueles menos blindados, então, quanto mais para esquerda o sinal, menor é a blindagem do núcleo e menor é o campo magnético sobre ele. O hidrogênio é abundante em amostras biológicas, muito sensível à RMN e é o que mais sofre perturbação do campo magnético, sendo o elemento mais comumente avaliado. Além disso, os sinais podem resultar em picos únicos, chamados de singletos, ou também em dupletos, tripletos, quadripletos e etc. Isso acontece pelo fenômeno denominado acoplamento *spin-spin*, que ocorre quando os prótons estão próximos entre si (PAVIA et al., 2010; BERG et al., 2002; SANDERS e HUNTER, 1993).

É importante ressaltar que são escassos os estudos com suplementação de quercetina que tenham aplicado a metabolômica para avaliação do perfil metabólico do sangue de animais. Foi encontrado apenas um estudo, de Wu e colaboradores (2012). Entretanto, a investigação foi realizada com modelo animal, protocolo de exercício e avaliações diferentes daqueles utilizados na presente dissertação. Por esse motivo, é de grande relevância determinar possíveis alterações no perfil de metabólitos no sangue após a suplementação com esse flavonoide.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar os efeitos da suplementação de quercetina sobre o desempenho físico e o perfil metabólico de ratos wistar.

3.2. Objetivos específicos

- Investigar dois tipos de quercetina: padrão analítico e grau alimentar;
- Avaliar o ganho ponderal e o consumo alimentar dos animais durante o período de suplementação, bem como o peso de músculos e compartimentos de gordura após nove dias de intervenção;
- Determinar a capacidade física máxima dos animais antes e após sete dias de suplementação;
- Analisar a função contrátil *in vitro* e a área de secção transversa do músculo sóleo após o período experimental;
- Investigar os intermediários metabólicos presentes no sangue dos animais ao final do período de suplementação.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Análise do perfil das quercetinas

Foram utilizados dois tipos de quercetina, uma designada padrão analítico (Quercetina aglicona, Sigma Aldrich®), empregada apenas em estudos experimentais e outra denominada grau alimentar (Quercegen Pharmaceuticals©), podendo ser usada também em investigações com humanos. A comparação das quercetinas foi realizada por meio de análise metabolômica por RMN. Dez mg de quercetina padrão analítico e 10 mg de quercetina grau alimentar foram diluídas em 600 uL de DMSO deuterado e imediatamente transferidas para tubos de RMN de 5 mm e analisadas em espectrômetro de 500 MHz (Ascend™, Bruker) a 25 °C. Para os espectros unidimensionais (1D) de ^{1}H foram utilizados 32 *scans*, tempo de repetição de 2,278 s, potência de pulso de 25 kHz e tempo de 84,73 ms. Os experimentos de espectroscopia de correlação total de ^{1}H-^{13}C (HSQC) foram realizados utilizando 16 *scans* e parâmetros de aquisição de 300 x 1.024 pontos, largura spectral de 6.493 Hz em cada dimensão e tempo de bloqueio de rotação de 60 ms.

Os espectros uni e bidimensionais obtidos foram processados por meio do software Topspin 3.2. A correção da fase foi realizada manualmente de forma que os picos ficassem em fase e a linha de base também foi corrigida para ficar em zero. A análise e o assinalamento foram feitos a partir da comparação dos espectros obtidos com os disponíveis no banco de dados do metaboloma humano (*Human Metabolome Database* - http://www.hmdb.ca/).

4.2. Animais e condições experimentais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, machos, com 8 a 10 semanas de idade, pesando entre 300 e 350 gramas, provenientes do biotério de roedores do Instituto Vital Brazil, localizado na cidade de Niterói, Rio de Janeiro. Os animais foram mantidos no BIONUT, Biotério do Instituto de Nutrição Josué de Castro (INJC/UFRJ), sob condições controladas de temperatura (23±2°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de doze horas invertido, permanecendo as luzes acesas entre 19:00 e 7:00). A inversão do ciclo claro/escuro tem objetivo de viabilizar a realização dos procedimentos durante o período de vigília dos animais. Os ratos receberam água e ração

(Nuvilab®) *ad libitum*, durante todo o período experimental e foram mantidos em gaiolas coletivas (máximo de 5 animais por gaiola).

O estudo foi planejado respeitando-se as normas relativas à utilização humanitária de animais com finalidade de pesquisa científica e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro (CEUA-CCS/UFRJ) sob o número de inscrição 123/15 **(Anexo A)**.

4.3. Protocolo experimental

Foi estabelecido protocolo de suplementação de 9 dias, representado na **Figura 6**. Foram utilizados 30 animais, divididos em três grupos: Controle/DMSO (C; n = 10), Quercetina Padrão Analítico (QPA; n = 10) e Quercetina Grau Alimentar (QGA; = 10).

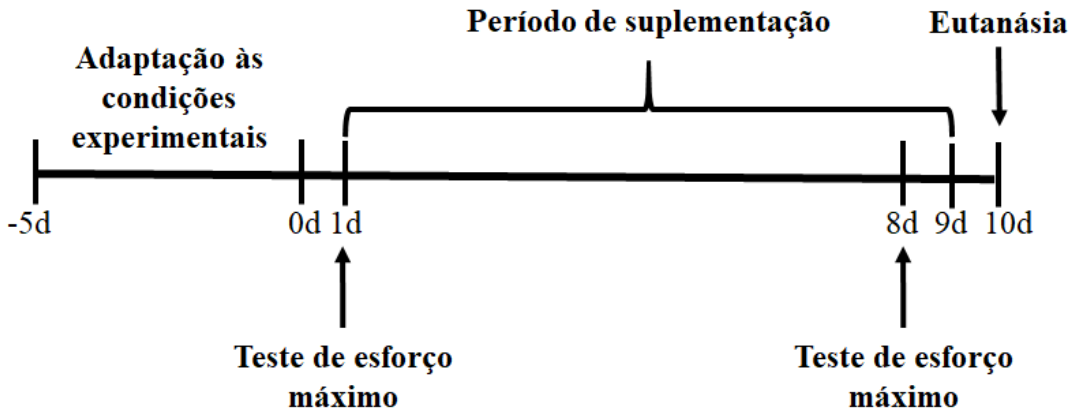

Figura 6. Esquema representativo do protocolo experimental. d = dias do protocolo.

Os animais passaram por cinco dias de adaptação às condições experimentais (gavagem e esteira) e, então, foi iniciado o período de suplementação com DMSO (C), Quercetina Padrão Analítico (QPA) ou Quercetina Grau Alimentar (QGA). No primeiro dia, primeiramente, foi realizado um teste de esforço máximo e após 4h foi iniciada a suplementação que perdurou por nove dias (1 vez ao dia, no mesmo horário). Durante esse período, os ratos foram submetidos a mais um teste de esforço máximo no oitavo dia. Terminado o período de suplementação, no décimo dia, foi realizada a eutanásia dos

animais, com coleta de amostras biológicas e realização do teste de contratilidade do músculo.

4.4. Administração de quercetina e veículo

Quercetina padrão analítico e quercetina grau alimentar foram diluídas em DMSO (Sigma Aldrich®) na concentração de 25 mg/mL. Ambas as quercetinas foram administradas aos animais na dose de 25 mg/kg de massa corporal, enquanto o veículo (DMSO) foi administrado na dose de 1 mL/kg de massa corporal (DAVIS et al., 2009).

As soluções de quercetina foram preparadas imediatamente antes da administração. A suplementação dos animais foi realizada por meio de gavagem, utilizando-se seringa com capacidade para 1 mL acoplada à agulha de gavagem. Todos os animais foram submetidos a cinco dias de adaptação aos procedimentos, quando receberam água (1mL/kg de massa corporal), por gavagem, antes do período de suplementação.

4.5. Teste de esforço máximo

Para determinação da capacidade física máxima, todos os animais passaram por um período de adaptação, de cinco dias, em esteira rolante específica para roedores (AVS, Brasil), à velocidade de 17 cm/s e inclinação de 10° por cinco minutos. Nos dias dos testes, cada rato foi submetido a testes individuais, com velocidade inicial de 17 cm/s e inclinação de 10° (mantida durante todo teste). A cada 2 minutos a velocidade era aumentada em 2 cm/s até a exaustão, caracterizada pela incapacidade do animal de sair das grades localizadas ao final da esteira, apesar do choque elétrico máximo (2 mA) e por alterações no padrão da marcha (NETO et al., 2013).

Além disso, antes do início e após o término (em 4 tempos: 0, 5, 10 e 30 minutos) do teste foram obtidas alíquotas de sangue da cauda (25 µL), colocadas em tubos contendo 50 µL de solução de fluoreto de sódio 1 % e congeladas a -20°C até as análises das concentrações de glicose (mg/dL) e lactato (mmol/L), realizadas em glicosímetro/lactímetro (Yellow Spring, 150º Sport, USA).

4.6. Avaliação do ganho ponderal

A massa corporal dos animais foi medida em balança digital de alta precisão (Digimed®) antes e após o período de suplementação com quercetina. A diferença entre os valores (final e inicial) foi considerada o ganho ponderal no período. Além disso, era realizada pesagem com intervalos de um dia para adequação da dose de quercetina a ser suplementada.

4.7. Avaliação da ingestão alimentar

A ingestão alimentar foi controlada pesando-se uma quantidade de ração em balança digital de alta precisão (Digimed®) antes de ser oferecida aos animais e o que sobrou ao final do período experimental. A diferença entre os valores (inicial e final) eram divididos pelo número de animais presentes nas gaiolas e, então, considerada a ingestão alimentar no período.

4.8. Eutanásia e obtenção de amostras biológicas

Finalizado o período de suplementação, os animais foram eutanasiados por meio de decapitação em guilhotina (Insight®), após jejum de 3 horas, para obtenção de amostras biológicas.

O sangue total foi coletado em tubos individuais e mantido à temperatura ambiente até coagulação plena. Em seguida, foi submetido à centrifugação (Sorvall®), a 3.000 rpm por 20 minutos e 4 ºC. O soro obtido foi aliquotado, adicionado de 0,5 mM de azida sódica e estocado a -80 ºC até a ocasião das análises.

Foi realizada a excisão dos músculos sóleo, que compreendeu na ressecção dos músculos posteriores da coxa (gastrocnêmio), para acesso ao sóleo, destinado às análises histológicas e da função contrátil. Após incisão longitudinal da parede abdominal e afastamento das vísceras, a cavidade retroperitonial foi acessada, tendo sido extraída a massa de tecido adiposo visceral e subcutâneo. Todos os tecidos, após remoção, foram imediatamente pesados em balança digital de alta precisão (Digimed®) e os valores obtidos foram normalizados pelo peso do animal, de modo que os resultados foram expressos como g/kg de massa corporal.

4.9. Função contrátil do músculo sóleo *in vitro*

O músculo sóleo foi dissecado, com os tendões preservados e imediatamente imerso em uma cuba contendo solução Ringer-Krebs (NaCl 116,8 mM, KCl 5,9 mM, MgSO4 1,2 mM, NaHCO3 25 mM, CaCl2 1,25 mM e glicose 5 mM). O tecido foi fixado pelas extremidades à haste fixa do eletrodo de estimulação e à haste móvel conectada ao transdutor de força (Ad Instruments MLT1030/D), para registro de abalos musculares. O tecido também foi ajustado de modo a se manter alinhado às hastes e foi alongado no seu comprimento máximo. A solução da cuba foi constantemente borbulhada com mistura carbogênica (95 % O2 e 5 % CO2) e mantida a 37 °C.

O músculo foi estimulado eletricamente e repetidamente por meio do estimulador (Grass S88X) na frequência de 0,2 Hz. Após a estabilização dos abalos musculares (+-20 minutos), a frequência de estimulação foi aumentada para 50 Hz para avaliação da força tetânica (máxima) em g. As análises ocorreram com duração de pulso de 0,00010 segundos e *delay* 0 segundos. Foi medida a variação entre a base e o pico de tensão desenvolvida, representando o máximo de força desenvolvida pelo músculo. A visualização e as análises foram realizadas com auxílio do software LabChart 7.1.

4.10. Histomorfologia e quantificação da área de secção transversa do músculo sóleo

Após dissecação, os músculos foram mantidos em solução de formaldeído 10% durante 72 horas, depois foram lavados e desidratados em concentrações crescentes de etanol (70, 80, 90 e 100%) por 30 minutos em cada. Logo após, os tecidos foram mantidos em xilol 100% por 30 minutos 3 vezes. Para impregnação, os tecidos foram submergidos em parafina a 58°C por 30 minutos 2 vezes. Após inclusão dos tecidos em parafina, os blocos foram aparados e armazenados em geladeira.

Foram obtidos cortes transversais com 5 micrômetros de espessura, seccionados em micrótomo. Os cortes foram colocados durante 1 minuto em álcool 50% e 1 minuto em banho-maria à 60ºC. Posteriormente, foram colocados em lâminas histológicas e permaneceram em estufa a 58°C por 24 horas.

Para a coloração das lâminas foi utilizada a técnica hematoxilina-eosina (HE). As lâminas contendo os cortes foram imersas em xilol 100% 1 vez por 20 minutos e 2 vezes por 5 minutos e em álcool 100% por 1 minuto. Em seguida, foram imersas em soluções com concentrações decrescentes de álcool (100, 95, 90 e 70%) por 1 minuto cada e em água destilada por 10 minutos. As lâminas foram colocadas em hematoxilina por 10 minutos, depois foram lavadas em água corrente por 1 minuto, eosina por 10 minutos, água corrente por 1 minuto e, por fim, foram desidratadas em álcool 95% por 1 minuto, álcool 100% por 1 minuto e clarificadas em xilol 100% por 5 minutos 2 vezes.

As lâminas foram montadas em Entellan e analisadas em microscópio (Leica Microsystems©), sendo obtidas imagens com aumento de 200 vezes e escala de 25 µm. Para quantificação da área de secção transversa, essas imagens foram analisadas com auxílio do programa *Image J* versão 1.4, aonde foi medida a área (µm) de 250 fibras por músculo.

4.11. Análise metabolômica

O perfil metabólico do sangue dos animais, após 9 dias de suplementação, foi estudado por abordagem metabolômica, realizada por meio de análises de RMN. As amostras foram preparadas misturando-se 300 µL de soro a 300 µL de tampão fosfato (pH 7,4 com 10% de D_2O (água deuterada) e azida sódica 0,5 mM). Os espectros uni e bidimensionais foram obtidos em espectrômetro de 500 MHz (Ascend™, Bruker) a 25 °C. Para os espectros de 1D-^{1}H, foi utilizada a sequência de pulso CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) a fim de suprimir sinais de proteínas e outras macromoléculas, usando 1.024 *scans*, tempo de repetição de 2,278 segundos, potência de pulso de 25 kHz e tempo de CPMG de 84,73 ms. Os experimentos de espectroscopia de ^{1}H-^{1}H (TOCSY) foram realizados utilizando 64 *scans* e parâmetros de aquisição de 320 x 4.096 pontos, largura espectral de 6.493 Hz em cada dimensão e tempo de bloqueio de rotação de 60 ms. Para os espectros de ^{1}H-^{13}C (HSQC) utilizou-se 156 scans e parâmetros de aquisição de 256 x 1.024 pontos, largura spectral de 6493 Hz em cada dimensão e tempo de bloqueio de rotação de 60 ms.

Os espectros dos intermediários metabólicos obtidos foram processados por meio do software Topspin 3.2. A correção da fase foi realizada manualmente de forma que os picos ficassem em fase. A linha de base também foi corrigida para ficar em zero e todos

os espectros foram alinhados e referenciados pela posição do pico da alfa-glicose em 5.23 ppm. Foi gerada a tabela de intensidade de cada pico dos espectros 1D-^{1}H (*bucket table*) por meio do programa AMIX® (Bruker Biospin), para realização das análises estatísticas. Para isso, foi utilizada a região dos espectros de 9.0 a 0 ppm, excluindo a região da água (5.0 – 4.6 ppm), regiões sem alinhamento entre todos os espectros (8.0 – 7.6, 7.45 – 7.28, 7.08 – 6.92, 6.5 – 4.8, 3.76 – 3.75, 2.69 – 2.64 e 1.3 – 1.15 ppm) e o pico referente à dimetilsulfona ($DMSO_2$) em 3.14 ppm (3.15 – 3.13 ppm).

A análise e o assinalamento dos picos foram realizados a partir da comparação dos espectros obtidos com os disponíveis no banco de dados do metaboloma humano (*Human Metabolome Database* - http://www.hmdb.ca/), na literatura (SHEN et al., 2016; WU et al., 2012) e confirmados usando o TOCSY e HSQC.

4.12. Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média. A normalidade dos dados foi testada pelo método de Shapiro-Wilk. A comparação dos resultados entre todos os grupos em um mesmo tempo foi realizada por análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA) seguido de teste de Tukey e para tempos diferentes realizou-se análise de variância de duas vias (*two-way* ANOVA) seguido de teste de Bonfferoni. Valor de $p \leq 0,05$ foi estabelecido para significância estatística. Todos os testes foram realizados por meio do programa GraphPad Prism, versão 5.01 (Graphpad Software Inc.©).

Para análise dos dados de metabolômica, a *bucket table* gerada a partir dos espectros de RMN adquiridos das amostras de soro sanguíneo foi submetida às análises estatísticas multivariadas, como análise por componentes principais (PCA, do inglês *principal componente analysis*) e análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA, do inglês *partial least square discriminant analysis*). Acurácia, R^2 e Q^2 foram os índices de desempenho utilizados para avaliação dos modelos PLS-DA e foram realizadas análise de VIP scores e de via metabólica. Todas as análises foram obtidas com auxílio do programa MetaboAnalyst 3.0 (www.metaboanalyst.ca).

5. RESULTADOS

5.1. Perfil das quercetinas

Ao comparar os espectros das quercetinas, tanto de ^{1}H (**Figura 7**) quanto de ^{1}H-^{13}C (**Figura 8**), foi possível observar que as formulações não apresentaram diferenças significativas em sua composição, apenas um pico minoritário em 3.85 ppm que está mais intenso na QPA comparado a QGA. Os assinalamentos foram realizados com base nos espectros da quercetina disponíveis no banco de dados *Human Metabolome Database*. Portanto, admite-se que ambas têm a mesma fórmula química, compatível com a quercetina aglicona.

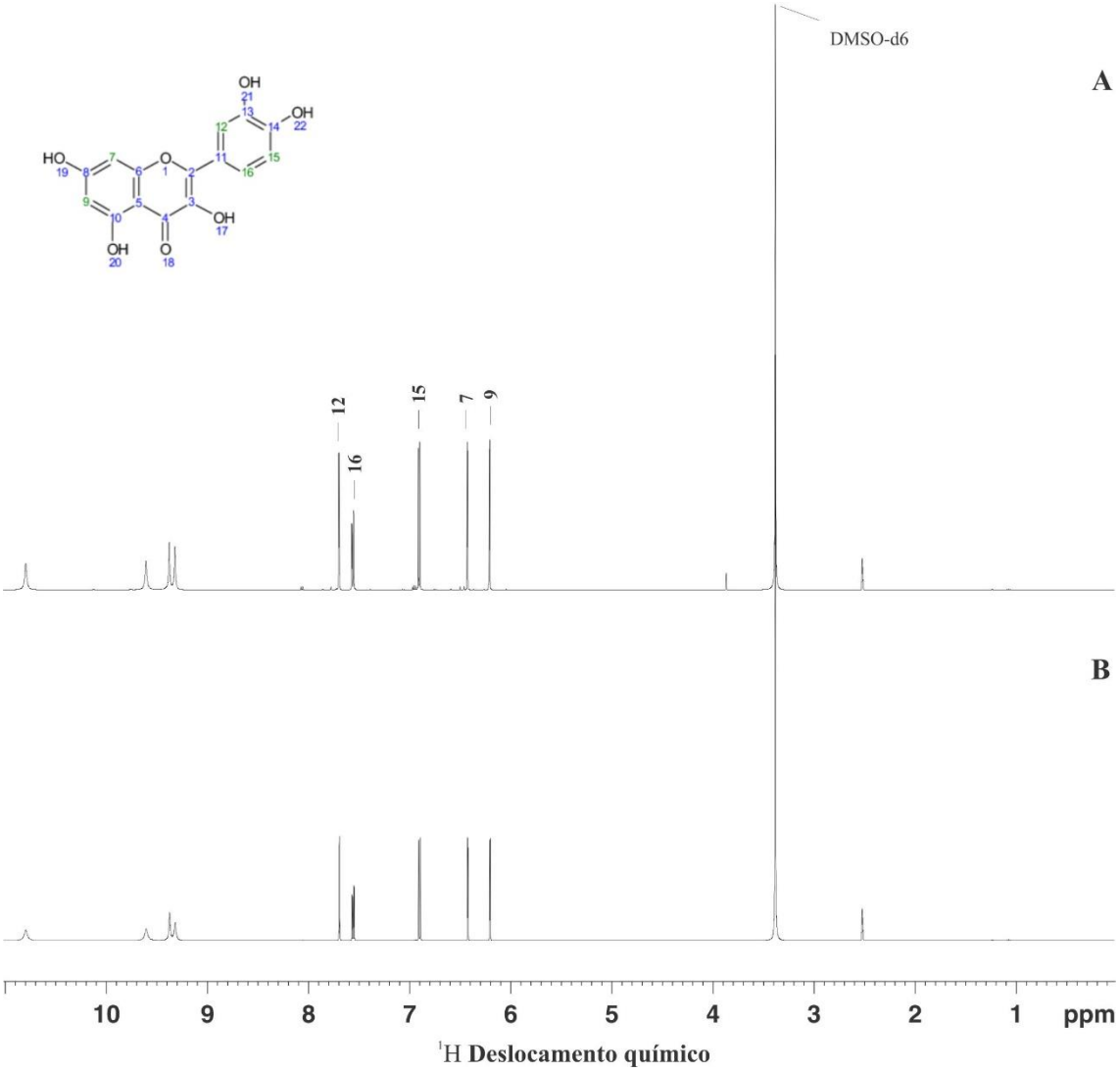

Figura 7. Espectros de ^{1}H das quercetinas e assinalamentos dos picos. **(A)** Quercetina padrão analítico. **(B)** Quercetina grau alimentar.

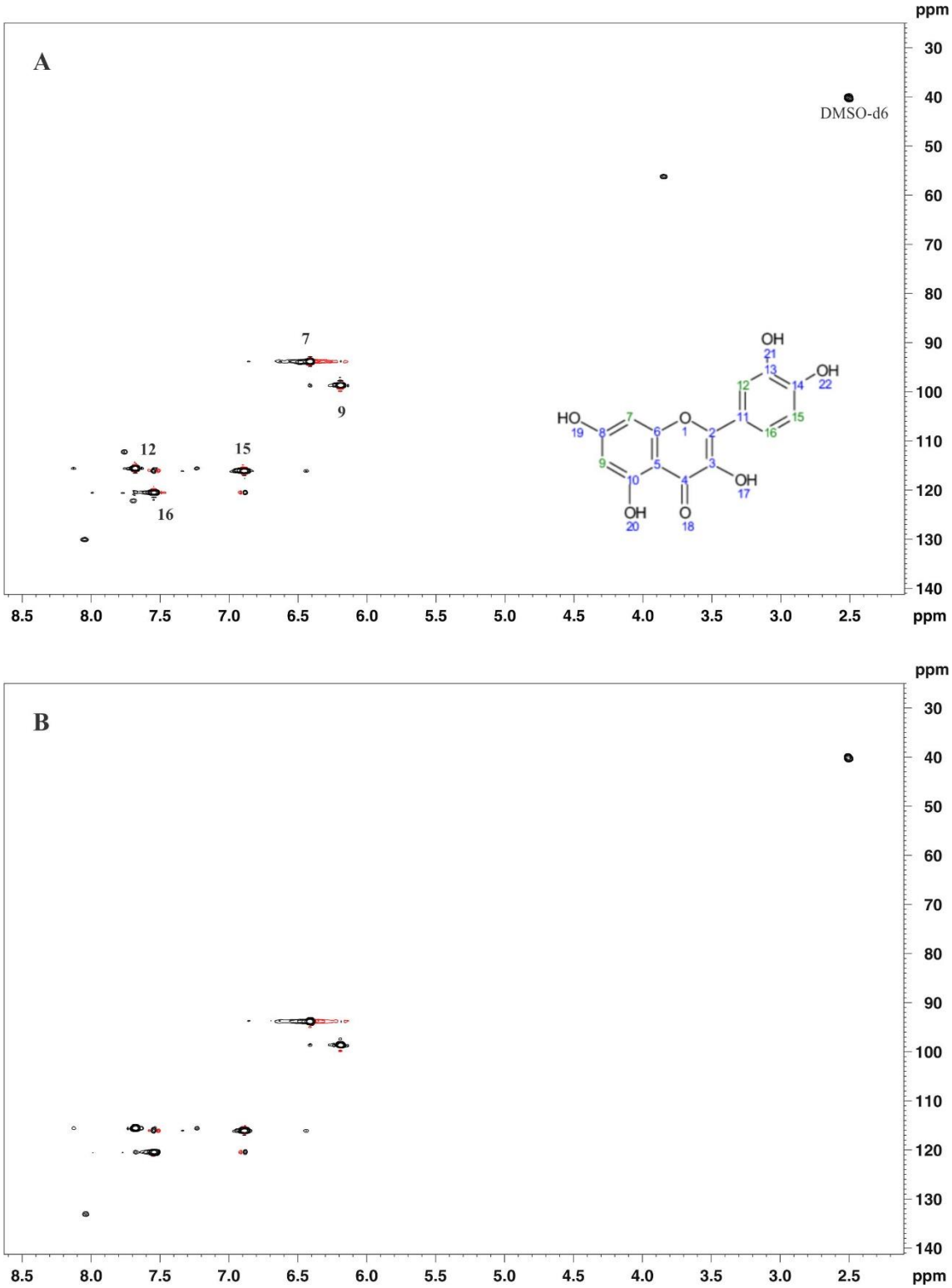

Figura 8. Espectros de ^{1}H-^{13}C HSQC das quercetinas e assinalamento. **(A)** Quercetina padrão analítico. **(B)** Quercetina grau alimentar.

5.2. Ganho ponderal e ingestão alimentar

O ganho de peso dos animais suplementados com quercetina foi menor (QPA 13,10 ± 1,88 g e QGA 11,78 ± 1,40 g) quando comparados aos que receberam DMSO (19,78 ± 2,17 g) como mostra a **Figura 9**.

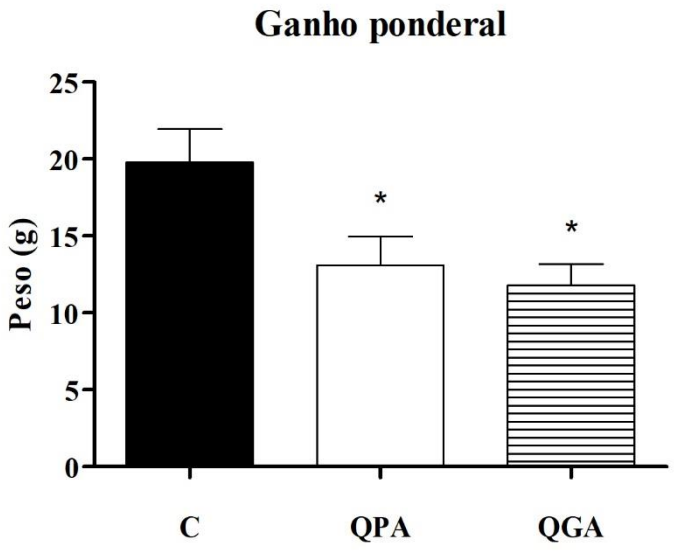

Figura 9. Ganho ponderal em g, em 9 dias de suplementação com DMSO (C, n = 10), quercetina padrão analítico (QPA, n = 10) ou quercetina grau alimentar (QGA, n = 10). Valores expressos como média ± erro padrão da média. * Indica diferença estatística em relação ao controle ($p < 0,05$) de acordo com o teste One-way ANOVA seguido de teste de Tukey.

Entretanto, a ingestão alimentar não diferiu entre os grupos C (215,9 ± 4,3 g), QPA (211,5 ± 4,1 g) e QGA (204,0 ± 3,3 g) durante os 9 dias de suplementação (**Figura 10**).

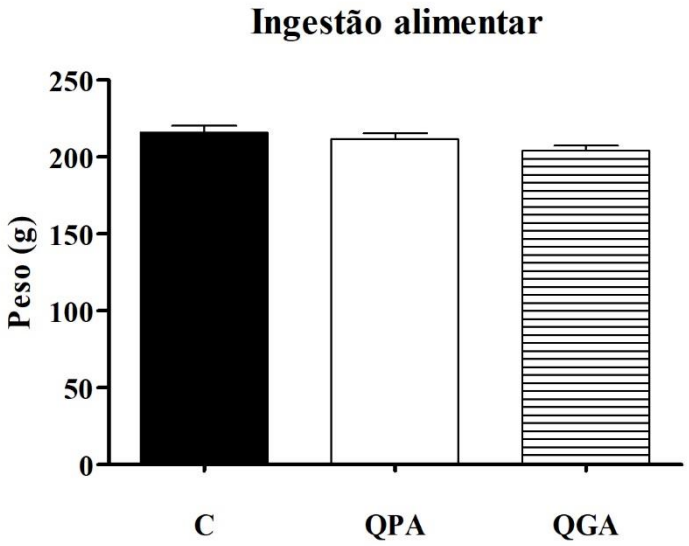

Figura 10. Ingestão alimentar em g de ração, em 9 dias de suplementação com DMSO (C, n = 10), quercetina padrão analítico (QPA, n = 10) ou quercetina grau alimentar (QGA, n = 10). Valores expressos como média ± erro padrão da média. Não houve diferença estatística de acordo com o teste One-way ANOVA seguido de teste de Tukey.

5.3. Capacidade física máxima, lactacidemia e glicemia

Ao comparar o primeiro teste físico máximo com o segundo, após 7 dias de suplementação (**Figura 11**), foi possível observar que ambos os grupos suplementados com quercetina aumentaram o tempo de exercício em esteira no segundo teste (QPA 11,46 ± 4,94 % e QGA 30,40 ± 8,18 %), porém, apenas QGA apresentou diferença significativa quando comparado ao C, que apresentou redução de 1,41 ± 3,04 % no tempo.

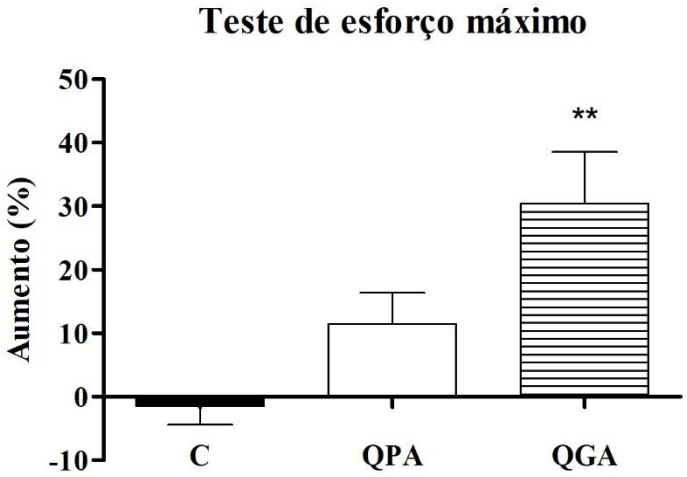

Figura 11. Percentual de aumento do tempo máximo de exercício obtido no segundo teste de esforço comparado ao primeiro, após 7 dias de suplementação com DMSO (C, n = 10), quercetina padrão analítico (QPA, n = 10) ou quercetina grau alimentar (QGA, n = 10). Valores expressos como média ± erro padrão da média. ** Indica diferença estatística em relação ao controle ($p < 0,005$) de acordo com o teste One-way ANOVA seguido de teste de Tukey.

As concentrações de lactato (**Figura 12**) e glicose (**Figura 13**) antes e após ambos os testes físicos não diferiram entre os grupos, apenas entre os tempos. O lactato está elevado logo após o exercício, mostrando que os animais praticaram exercício extenuante e, apóes 30 minutos, eles já retornaram aos teores basais. Com a glicose ocorreu o mesmo, concentrações mais elevadas logo após o término do teste e iguais à basal após 30 minutos.

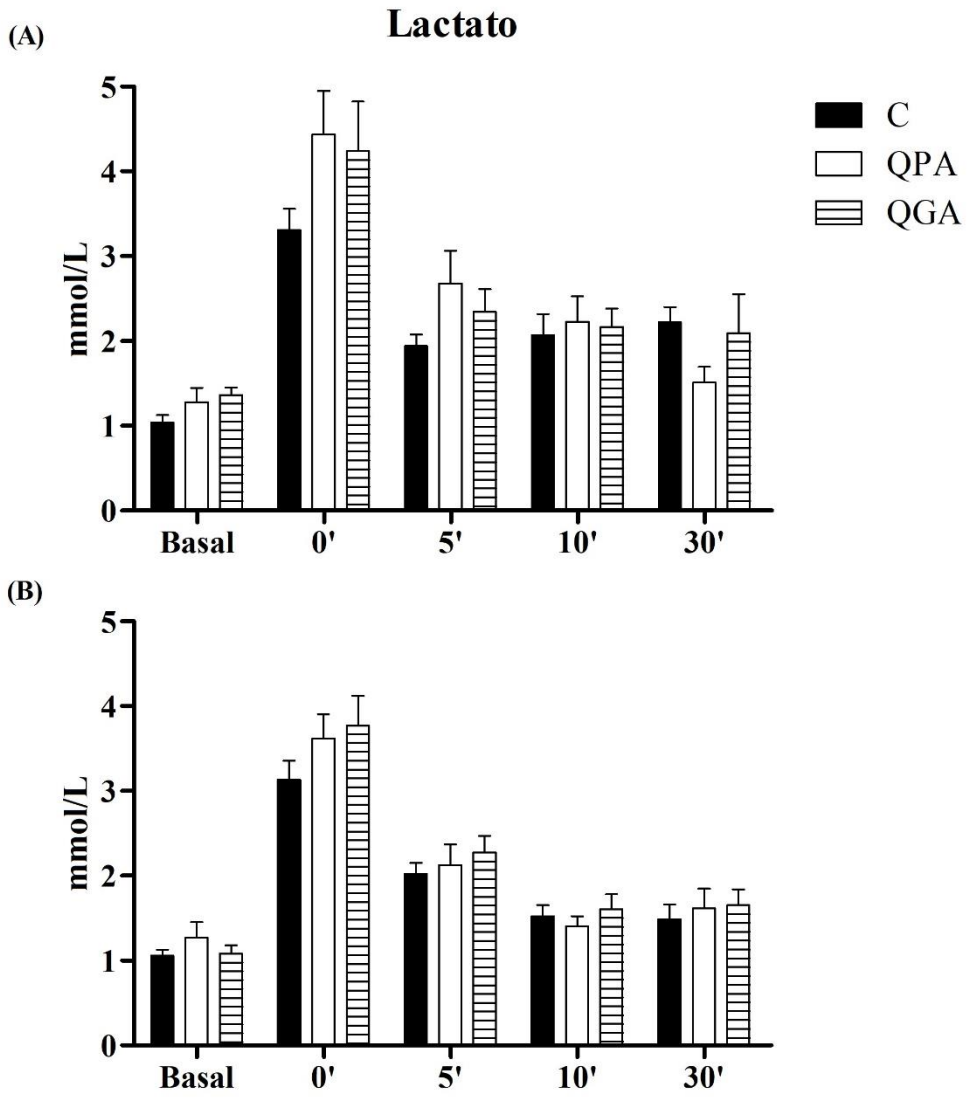

Figura 12. Concentrações sanguíneas de lactato antes (basal) e 0, 5, 10 e 30 minutos após os testes analisadas em glicosímetro lactímetro. **(A)** primeiro teste físico e **(B)** segundo teste físico. Valores expressos como média ± erro padrão da média. Não houve diferença entre os grupos de acordo com teste Two-way ANOVA seguido de teste de Bonferroni.

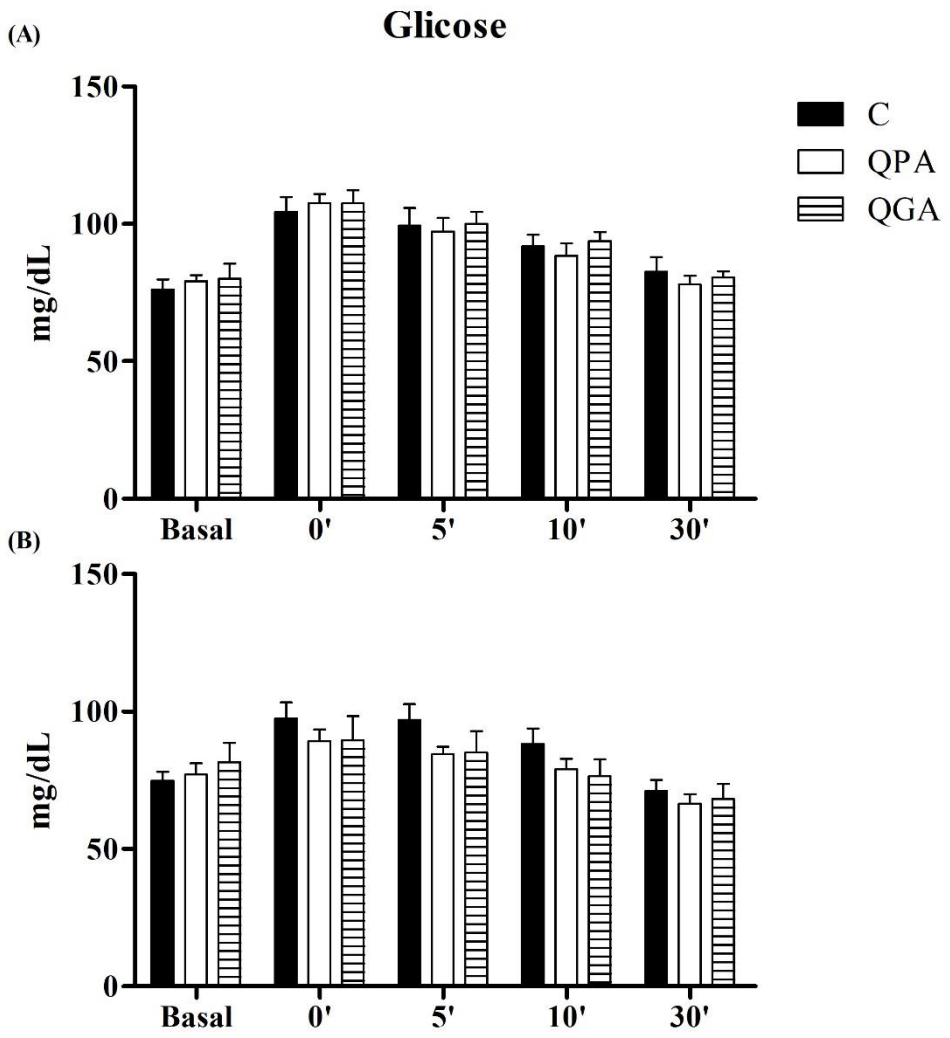

Figura 13. Concentrações sanguíneas de glicose antes (basal) e 0, 5, 10 e 30 minutos após os testes analisadas em glicosímetro/lactímetro. **(A)** primeiro teste físico e **(B)** segundo teste físico. Valores expressos como média ± erro padrão da média. Não houve diferença entre os grupos de acordo com teste Two-way ANOVA seguido de teste de Bonferroni.

5.4. Pesos dos tecidos

Os pesos relativos dos tecidos (g/kg de peso corporal) estão apresentados na **Tabela 2**. Os resultados foram analisados usando o teste One-way ANOVA, seguido de teste de Tukey. O peso do músculo sóleo foi maior nos grupos QPA e QGA quando comparados ao grupo C. Em contrapartida, os pesos relativos do músculo gastrocnêmio

e dos compartimentos de gordura visceral e subcutânea não apresentaram diferença estatística entre os grupos C, QPA e QGA.

Tabela 2. Pesos relativos dos tecidos após 9 dias de suplementação.

Grupos	Sóleo (g/kg)	Gastrocnêmio (g/kg)	Gordura visceral (g/kg)	Gordura subcutânea (g/kg)
C	0,34 ± 0,01	6,38± 0,09	5,19 ± 0,52	8,95 ± 0,36
QPA	0,39 ± 0,01 [a]	6,37 ± 0,12	3,92 ± 0,29	8,17± 0,66
QGA	0,37 ± 0,01 [b]	6,39 ± 0,08	5,04 ± 0,36	8,30 ± 0,61

C = controle (n = 10); QPA = quercetina padrão analítico (n = 10); QGA = quercetina grau alimentar (n = 10); [a] e [b] = diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,005$ e $p < 0,05$, respectivamente).

5.5. Função contrátil do músculo sóleo *in vitro*

A função contrátil do músculo sóleo *in vitro* está representada na **Figura 14**. Após 9 dias de suplementação, a força tetânica desenvolvida foi maior nos grupos QPA (70,58 ± 7,34 g) e QGA (78,83 ± 5,64 g) quando comparados ao grupo C (47,03 ± 4,46 g).

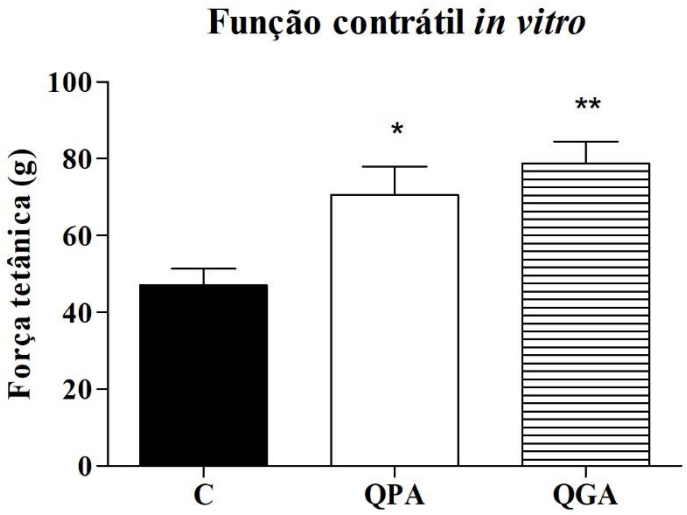

Figura 14. Força tetânica em g desenvolvida pelo músculo sóleo *in vitro*, após 9 dias de suplementação com DMSO (C, n = 10), quercetina padrão analítico (QPA, n = 10) ou quercetina grau alimentar (QGA, n = 10). Valores expressos como média ± erro padrão da média. * e ** Indicam diferença estatística em relação ao controle ($p < 0,05$ e $p < 0,005$, respectivamente) de acordo com o teste One-way ANOVA seguido de teste de Tukey.

5.6. Histomorfologia e área de secção transversa do músculo sóleo

Por meio das imagens histológicas (**Figura 15 B**) e da quantificação da área de secção transversa (**Figura 15 A**) do músculo sóleo, após 9 dias de suplementação, é possível observar que não houve diferença entre os grupos C (502,78 ± 22,84 µm), QPA (528,26 ± 24,00 µm) e QPA (513,27 ± 23,45 µm), mostrando que não houve aumento no diâmetro das fibras musculares.

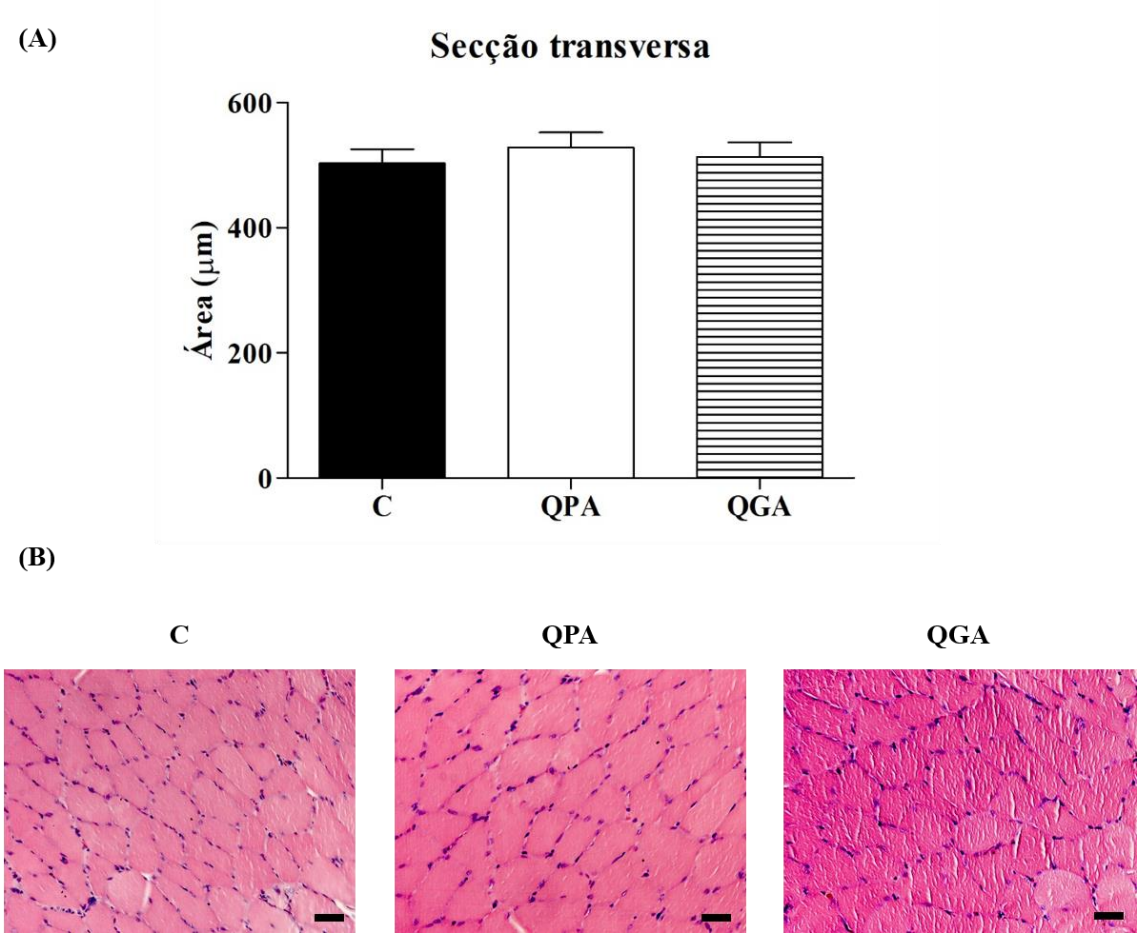

Figura 15. **(A)** Área de secção transversa em µm do músculo sóleo, após 9 dias de suplementação com DMSO (C, n = 5), quercetina padrão analítico (QPA, n = 5) ou quercetina grau alimentar (QGA, n = 5). Valores expressos como média ± erro padrão da média. Não houve diferença estatística de acordo com o teste One-way ANOVA seguido de teste de Tukey. **(B)** Imagens histológicas representativas da secção transversa do músculo sóleo obtidas em escala de 25 µm e aumento de 200 vezes.

5.7. Perfil metabólico do sangue

Primeiramente, ao analisar os espectros de 1D, representados na **Figura 16**, é possível verificar um pico bastante intenso em 3.14 ppm, identificado como dimetil sulfona ($DMSO_2$), produto do metabolismo do DMSO, que foi usado como veículo. Além disso, foi identificada a alfa-glicose em 5.23 ppm, utilizada para referenciar todos os espectros.

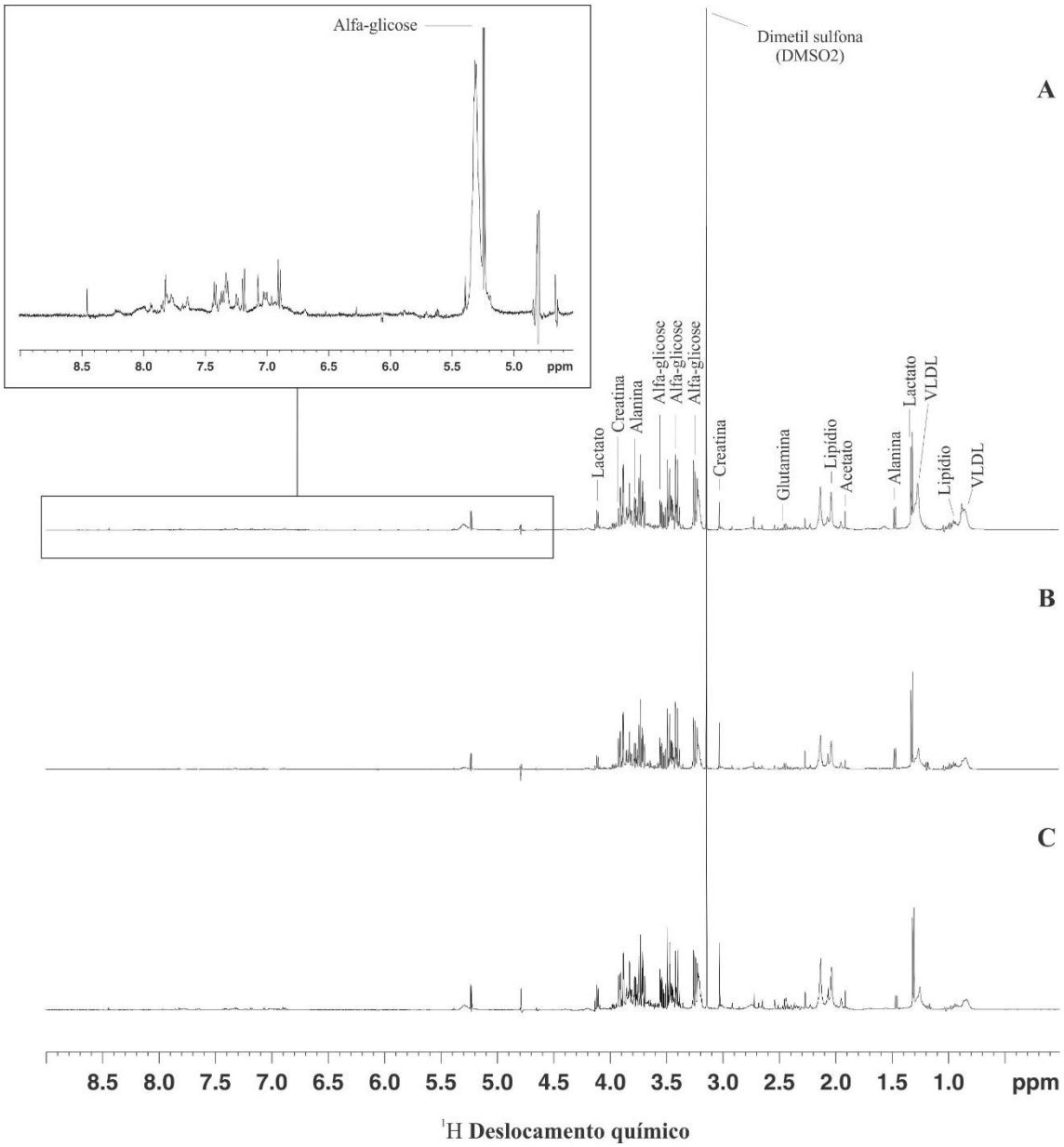

Figura 16. Espectros de ^{1}H CPMG representativos dos soros dos animais após 9 dias de suplementação. **(A)** Controle (DMSO), **(B)** Quercetina padrão analítico **(C)** Quercetina grau alimentar.

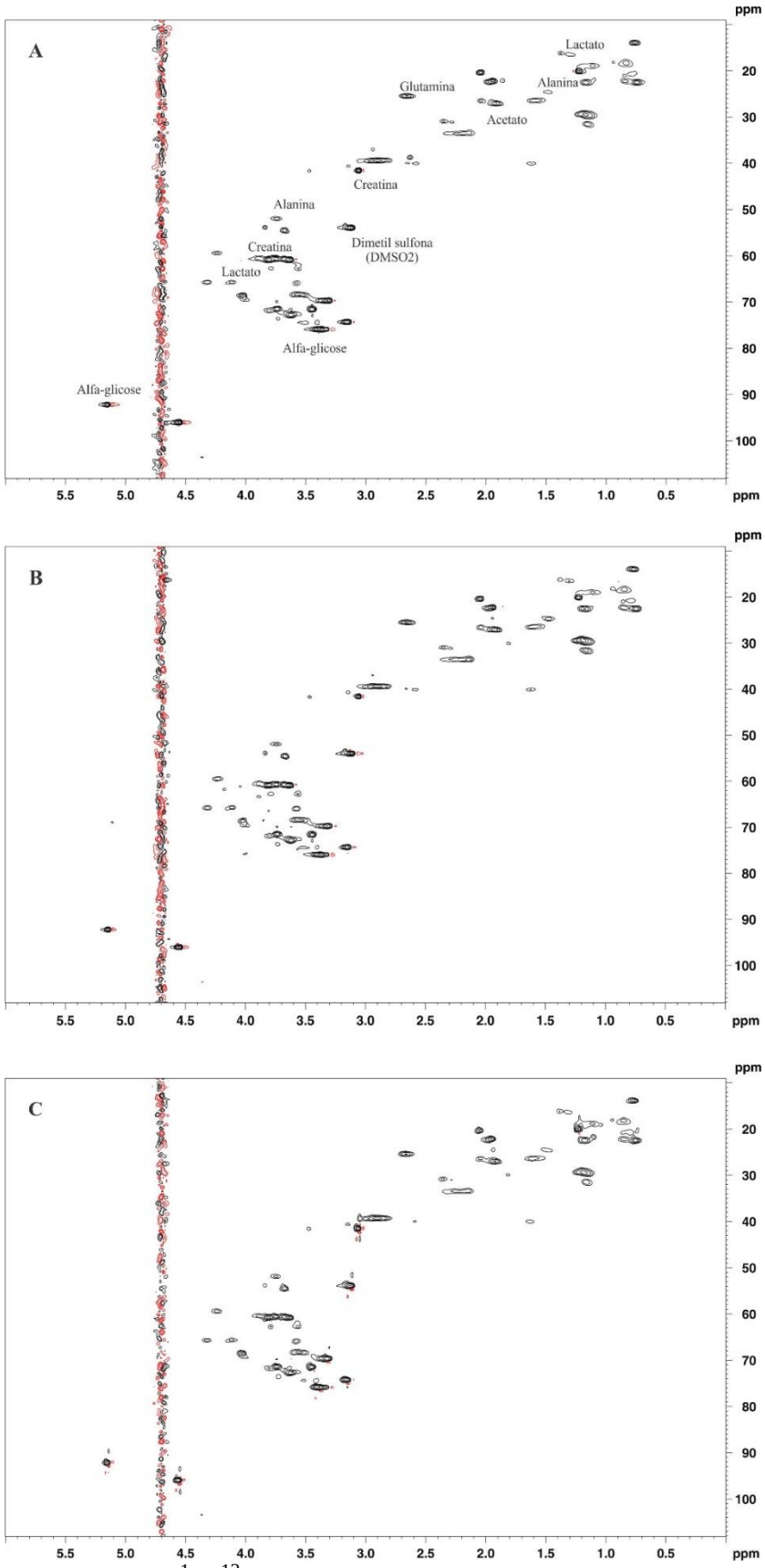

Figura 17. Espectros de ^{1}H-^{13}C HSQC representativos dos soros dos animais após 9 dias de suplementação. **(A)** Controle (DMSO), **(B)** Quercetina padrão analítico **(C)** Quercetina grau alimentar.

A análise de PCA é um método não supervisionado, no qual nenhuma informação a respeito das amostras é levada em consideração. A PCA dos metabólitos presentes no soro dos animais (**Figura 18**) mostrou que não houve separação tanto quando comparados os três grupos (A), quanto quando comparados dois grupos separadamente (B, C e D).

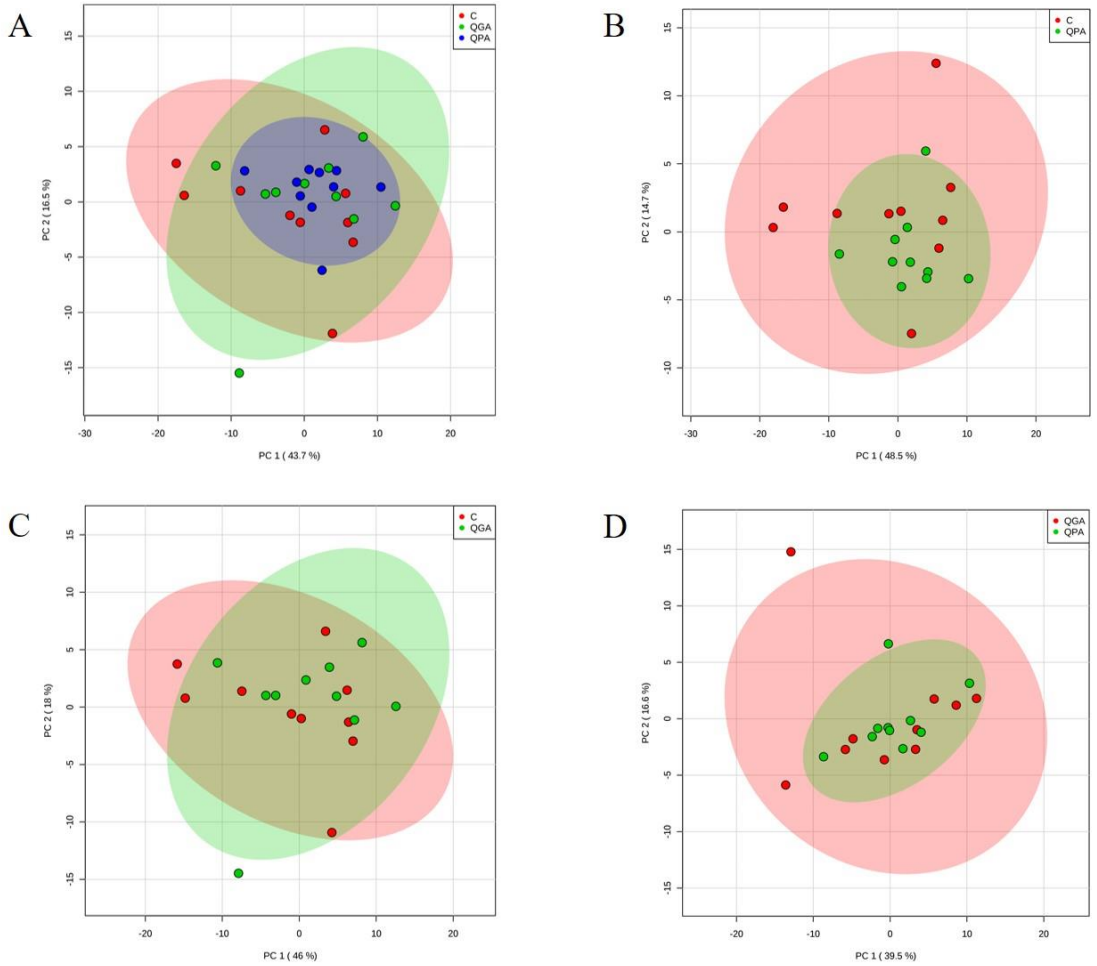

Figura 18. Análise por componentes principais (PCA) dos metabólitos do soro dos grupos controle (C; n = 10), quercetina padrão analítico (QPA; n = 10) e quercetina grau alimentar (QGA; n = 10). (A) Não houve diferença entre os 3 grupos experimentais. (B), (C) e (D) Não houve diferença entre os grupos C e QPA, C e QGA e QPA e QGA, respectivamente.

A PLS-DA é um método supervisionado, que classifica as amostras em grupos e busca aperfeiçoar a separação entre elas. Quando realizada a análise de PLS-DA (**Figura 19**), também não foi possível observar diferença nos metabólitos do soro dos três grupos

(A). Igualmente, não foi observada diferença quando comparados os pares de grupos separadamente (B, C e D), porém há uma tendência de separação nas figuras B e C.

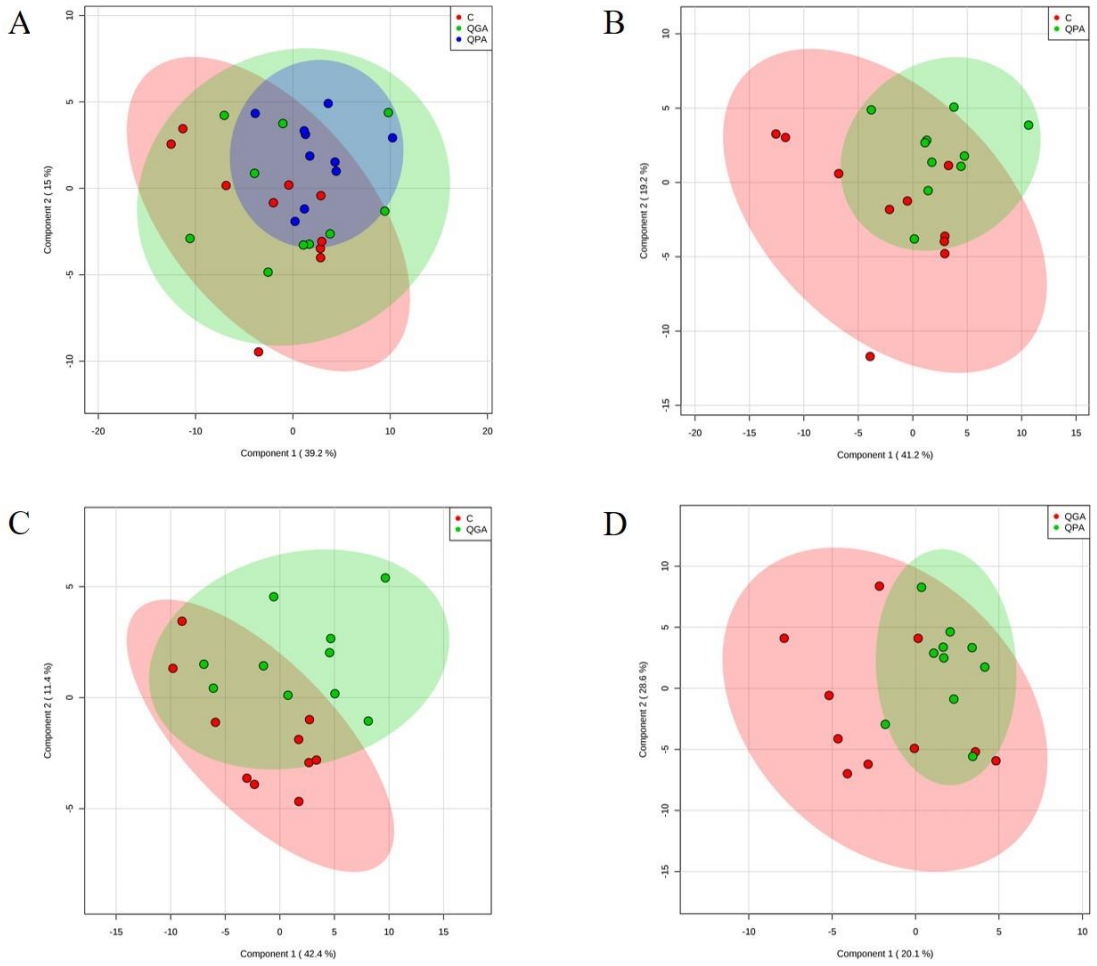

Figura 19. Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) dos metabólitos do soro dos grupos controle (C; n = 10), quercetina padrão analítico (QPA; n = 10) e quercetina grau alimentar (QGA; n = 10). (A) Não houve diferença entre os 3 grupos experimentais. (B), (C) e (D) Não houve diferença entre os grupos C e QPA, C e QGA e QPA e QGA, respectivamente.

Além disso, ao analisar os índices de desempenho dos modelos PLS-DA (**Tabela 3**), observamos que a acurácia, que mede a precisão em todos os modelos, foi baixa. Nesse índice, é desejável que o valor esteja próximo de 1,0. Isso confirma o que foi mostrado nos gráficos, que não houve diferença significativa entre os grupos.

Tabela 3. Índices de desempenho para avaliação dos modelos PLS-DA para metabólitos sanguíneos dos ratos após 9 dias de suplementação.

Modelos	C x QPA x QGA	C x QPA	C x QGA	QPA x QGA
Acurácia	0,40	0,65	0,65	0,55
R^2	0,87	0,95	0,96	0,84
Q^2	- 0,30	- 0,49	- 0,47	- 1,73

C = controle; QPA = quercetina padrão analítico; QGA = quercetina grau alimentar.

A partir do PLS-DA também foi possível verificar quais deslocamentos químicos influenciaram na diferença das amostras (VIP scores). Os metabólitos identificados a partir dos deslocamentos químicos foram: lactato (4.11 e 1.32 ppm), creatina (3.93 e 3.03 ppm), alanina (3.78 e 1.47 ppm), alfa-glicose (3.54, 3.42 e 3.24 ppm), glutamina (2.43 ppm), lipídio (2.01 e 0.93 ppm), acetato (1.92 ppm) e lipoproteína VLDL (1.29 e 0.87 ppm). A **Figura 20** mostra a análise de cada um desses metabólitos/deslocamentos, onde não houveram diferenças significativas entre os grupos para nenhum dos metabólitos.

Após a identificação dos metabólitos do VIP score, foi realizada a análise de via metabólica (**Figura 21**) por meio do MetaboAnalyst 3.0. O resultado mostrou esses metabólitos estão relacionados ao metabolismo do piruvato e à glicólise ou gliconeogênese.

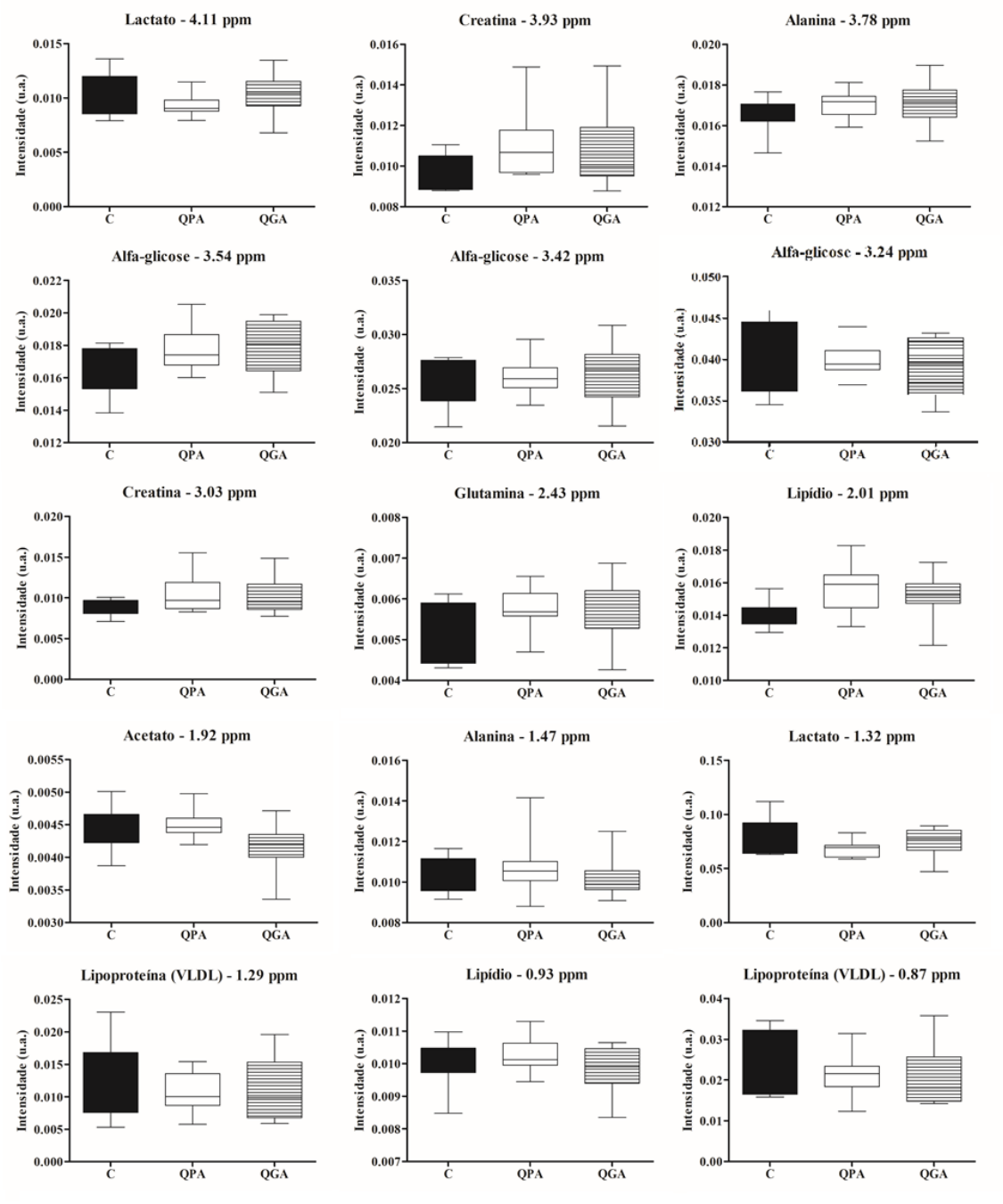

Figura 20. *Box plots* representativos dos metabólitos, presentes nos soros dos animais após 9 dias de suplementação, responsáveis por diferenças entres as amostras, nos grupos controle (C; n = 10), quercetina padrão analítico (QPA; n = 10) e quercetina grau alimentar (QGA; n = 10). Não houveram diferenças estatísticas de acordo com o teste One-way ANOVA seguido de teste de Tukey.

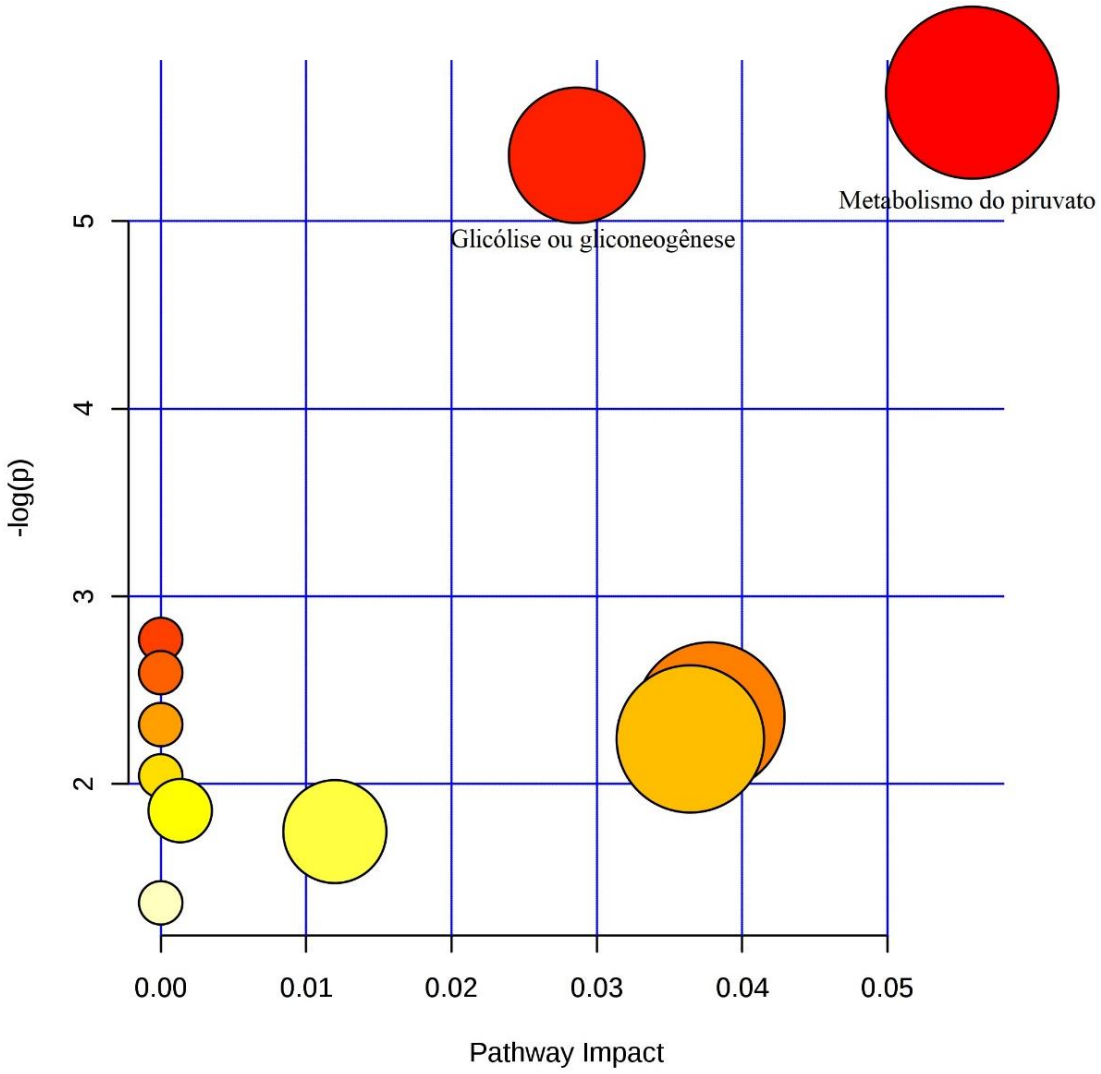

Figura 21. Análise de via metabólica.

6. DISCUSSÃO

Compostos bioativos presentes nos alimentos, como os flavonoides, estão entre os fatores nutricionais que têm capacidade de promover efeitos benéficos à saúde (JAISANKAR et al., 2014). A quercetina já foi descrita como benéfica em diversas enfermidades e também como agente ergogênico, por alterar a expressão de genes, melhorar o desempenho físico e a composição corporal (HENAGAN et al., 2015; HENAGAN et al., 2014; CASUSO et al., 2014; CASUSO et al., 2013, DAVIS et al., 2009).

No presente estudo, comparamos dois tipos de quercetina: uma padrão analítico puro (aglicona; > 95%), utilizada exclusivamente para estudos experimentais e outra grau alimentar, que pode ser usada inclusive para estudos com humanos, porém sua composição não era conhecida. A análise por RMN mostrou que ambas têm os espectros referentes à forma aglicona, com uma sutil diferença em um único pico de baixa intensidade, assumindo-se, assim, que essas quercetinas são iguais. Com isso, espera-se que essas duas suplementações promovam efeitos semelhantes ao serem comparadas entre si.

A fim de analisar possíveis mudanças na composição corporal, foram avaliados o ganho ponderal, a ingestão alimentar e o peso de músculos e de compartimentos de gordura. Com a suplementação de 25 mg/ kg de ambas as quercetinas por 9 dias foi observado redução do ganho de massa corporal, mesmo sem alterar o consumo alimentar. Kobori e colaboradores (2015) verificaram que camundongos suplementados durante 20 semanas tanto com 0,05 % quanto em 1 % de quercetina não tiveram o peso e a ingestão calórica alterados. De outro modo, Casuso e colaboradores (2014) mostraram que a administração desse composto, na mesma concentração deste estudo, em dias alternados, por seis semanas não foi capaz de modificar o peso de ratos, porém o grupo que fez exercício e foi suplementado, obteve o menor ganho de peso e melhor eficiência alimentar.

Corroborando com nossos achados, Henagan e colaboradores (2014), utilizando camundongos com resistência a insulina, viram que com 50 µg de quercetina por dia durante oito semanas, houve redução da massa corporal dos animais. Porém, quando a dose foi aumentada para 600 µg ou o tempo reduzido para 3 semanas, essa alteração não foi observada, sugerindo que a dose e o tempo de suplementação utilizados, podem justificar os diferentes efeitos do flavonoide sobre as variáveis estudadas.

Quanto a composição corporal, observamos aumento do peso do músculo sóleo nos grupos suplementados com as quercetinas, entretanto não houve alteração nos pesos do gastrocnêmio, e dos compartimentos de gordura visceral e subcutânea. Em contrapartida a esses achados, em estudos já mencionados anteriormente, não foram encontradas diferenças significativas no peso de músculos (CASUSO et al., 2014) e houve diminuição do tecido adiposo branco (HENAGAN et al., 2014).

Jung e colaboradores (2013) ao suplementar 0,025 % de quercetina junto a uma dieta rica em gordura por nove semanas, constataram que a suplementação diminuiu significativamente os efeitos da dieta, reduzindo a massa corporal e o tecido adiposo branco, que foi relacionado a modificações em genes envolvidos na lipogênese. Esses resultados reforçam que os achados são inconsistentes, assim como dose e tempo dependentes.

A capacidade física dos animais foi avaliada por meio de teste físico máximo de corrida em esteira rolante. Verificou-se que o tempo de exercício aumentou no segundo teste, quando comparado ao primeiro, nos grupos suplementados com quercetina, porém com diferença significativa apenas para QGA, quando comparada ao controle. Reforçando este resultado, Davis e colaboradores (2009) com administração de 12,5 e 25 mg/ kg de quercetina por 7 dias, observaram aumento no tempo de permanência no teste físico de camundongos suplementados. Este resultado foi associado positivamente à maior expressão dos genes PGC1-α e SIRT1, envolvidos na biogênese mitocondrial, indicando que a quercetina gera benefícios sobre a capacidade física mesmo na ausência de treinamento, sendo possível atribuir o envolvimento do PGC1-α neste processo. De outro modo, ratos treinados e sedentários que receberam doses de 25 mg/kg de quercetina em dias alternados por 6 semanas, não obtiveram alteração no tempo do teste físico, sugerindo que o efeito antioxidante do flavonoide, poderia comprometer as adaptações induzidas pelo treinamento, que são, em parte, mediadas por estresse oxidativo (CASUSO et al., 2014; CASUSO et al., 2013). Supõe-se, também, que esses achados contraditórios se devam aos diferentes protocolos experimentais, uma vez que no presente estudo, bem como no de Davis e colaboradores (2009) foi realizada suplementação diária, enquanto nos trabalhos de Casuso e colaboradores a suplementação era administrada em dias alternados, podendo comprometer a eficiência do composto.

PGC1-α é uma proteína co-ativadora que participa de diversos processos relacionados à biogênese mitocondrial. Ela é capaz de se ligar a diferentes fatores de

transcrição que regulam a expressão de genes nucleares que, por sua vez, codificam proteínas mitocondriais. O PGC1-α também induz a expressão do fator de transcrição mitocondrial que tem as funções de regular a replicação, transcrição e organização do DNA mitocondrial (PEJZNOCHOVA et al., 2010). Já foi visto que uma maior expressão de PGC1-α no músculo de camundongos aumentou a capacidade física dos animais (CALVO et al., 2008).

A biogênese mitocondrial pode ser induzida por sessões de exercício físico, que promovem elevação da capilaridade, da produção de antioxidantes e do consumo de oxigênio, além de outras adaptações como aumento da densidade mitocondrial e de enzimas relacionadas ao metabolismo dessa organela. Assim, o treinamento, em longo prazo, gera melhoria na capacidade de *endurance*, por aumentar o número de mitocôndrias além de aumentar a oxidação de lipídios e carboidratos (LITTLE E COCHRAN, 2011; PERRY et al., 2010). No entanto, estratégias nutricionais, como a suplementação com compostos fenólicos, incluindo a quercetina, também têm mostrado capacidade de aumentar a biogênese mitocondrial (DAVINELLI et al., 2013; NIEMAN et al., 2009).

Conforme esperado, as concentrações séricas de lactato aumentaram ao final do teste de esforço máximo quando comparadas aos valores antes do exercício. Estes resultados demonstram que os animais foram submetidos a um protocolo de alta intensidade e correram até a exaustão. Também esperado, os teores voltaram aos valores basais em pouco tempo, uma vez que o lactato não permanece na corrente sanguínea, retornando para a célula, onde é convertido a piruvato. Não observamos diferença significativa entre os grupos em nenhum dos tempos, nem quando comparados os testes 1 e 2. Divergindo destes achados, Casuso e colaboradores (2013) encontraram concentrações de lactato maiores no grupo suplementado com quercetina que no controle após o teste físico.

De forma semelhante, e compatível com as expectativas, as concentrações de glicose no sangue também estavam aumentadas ao final do teste, em razão da demanda energética do exercício, e reduziram até alcançar valores semelhantes à condição basal em pouco tempo. Não houve diferença significativa entre os grupos tanto quando comparados os tempos quanto os testes. Em concordância com esse resultado, Henagan e colaboradores (2014) também não observaram diferença na glicemia de jejum entre os

grupos tratados com quercetina ou placebo, bem como quando submetidos ao teste de tolerância oral à glicose.

A suplementação de quercetina no desempenho físico já foi estudada também em humanos. A suplementação de 1 g em homens não treinados durante duas semanas, gerou aumento discreto na distância percorrida no teste físico. Askari e colaboradores (2012) mostraram que a ingestão desse flavonoide associado à vitamina C (500 mg + 200 mg por dia) por 8 semanas não melhorou o desempenho do exercício, mas reduziu o dano muscular e o percentual de gordura corporal em homens atletas. Gonçalves (2014) não observou alteração no desempenho físico em teste de esteira em jogadoras de futebol suplementados com 1 g de quercetina ou placebo por dia, porém as atletas menos condicionadas, melhoraram o tempo de esteira. Já Davis e colaboradores (2010) encontraram aumento no VO_2 máx e do tempo até chegar a fadiga em teste de esforço máximo em esteira, após tratamento de homens com duas doses de 0,5 g por dia durante sete dias.

A análise conjunta destes achados sugere que permanecem controversos os possíveis efeitos desse flavonoide sobre o desempenho físico e permite supor que as diferenças observadas se devam ao fato da dose ideal de quercetina, capaz de promover efeitos benéficos, ainda não ter sido estabelecida. Ao mesmo tempo, há divergência quanto ao suplemento e o veículo utilizados, como associação com outros flavonoides e vitaminas, uso de bebida hidratante, suco e barra comestível, o que pode interferir na absorção da quercetina.

Não foram encontrados na literatura trabalhos que tivessem associado a quercetina com análises funcionais do músculo esquelético, como a produção de força e a histomorfologia com quantificação da área de secção transversa em ratos saudáveis como no presente estudo. Contudo, Goldfarb e colaboradores (2011) mostraram que um concentrado de frutas e vegetais, rico em flavonoides, não promoveu impacto na força muscular após ser administrado por 28 dias. Além disso, foi descrito que o resveratrol, composto fenólico que apresenta propriedades semelhante à quercetina, levou à ativação de vias envolvidas na miogênese, resultando redução da atrofia e em hipertrofia das células musculares C2C12 (MONTESANO et al., 2013; WANG et al., 2014).

Os resultados do presente trabalho mostraram que a suplementação de ambas quercetinas, durante nove dias, foi capaz de proporcionar aumento da função contrátil muscular, por aumentar o desenvolvimento de força pelo músculo sóleo, por meio da

análise da força tetânica. Esse resultado foi surpreendente, considerando que ao quantificar, a partir de análises histológicas, a área de secção transversa desse músculo, não foram encontradas diferenças entre os grupos. Assim, é possível supor que a ingestão de quercetina provoca aumento da força provavelmente por mecanismos independentes das vias de hipertrofia/atrofia muscular e sugerir que possam estar ocorrendo modulações no metabolismo energético.

No entanto, corroborando com esses achados, Spaulding e colaboradores (2016) ao avaliarem a associação desses parâmetros com a ingestão de quercetina em ratos com distrofia muscular, observaram que o enriquecimento da dieta com 0,2 % de quercetina por 12 meses foi capaz de preservar modestamente a força tetânica e a resistência à fadiga do músculo sóleo, porém, nos resultados histológicos relativos a este músculo não houve melhoria da distrofia com suplementação. Com isso, ainda são necessários mais estudos, a fim de esclarecer como esse flavonoide exerce seus efeitos sobre a força muscular.

Trabalhos que elucidem o perfil de metabólitos presente no sangue de animais suplementados com a quercetina ainda são escassos. Nessa temática, Wu e colaboradores (2012) avaliaram a ingestão de 0,1 % desse composto na dieta (equivalente a 5 mg/ dia) durante duas semanas em camundongos, que foram submetidos a um teste físico de natação no último dia de experimento e, em seguida, tiveram o sangue coletado para as análises. Os autores verificaram, após análise quimiométrica dos espectros de RMN de ^{1}H, que a suplementação diminuiu os teores das lipoproteínas LDL e VLDL, dos ácidos graxos insaturados, de lactato e de alanina e aumentou os de glicose após a natação, quando comparados com o grupo que nadou e não foi suplementado. Geralmente, conteúdo elevado de lactato após exercício reflete glicólise também aumentada, para compensar a falta de energia durante a atividade. Foi visto no estudo que o tratamento com o flavonoide diminuiu o lactato sérico e aumentou os ácidos graxos insaturados, o que sugere que houve mudança na produção de energia, que estaria vindo não mais da glicólise e sim da lipólise, havendo, assim, aumento do metabolismo lipídico. A redução nas concentrações de LDL e VLDL indica que a quercetina pode aumentar a depuração dessas lipoproteínas por induzir maior expressão dos genes que codificam as lipases de lipoproteínas (WU et al., 2011; DIHAL et al., 2008).

A RMN, técnica empregada no presente estudo bem como no de Wu e colaboradores (2012), é eficiente em fornecer informações acerca de perturbações metabólicas induzidas por diversos estímulos. Recebe destaque por ser uma técnica não

invasiva que permite o monitoramento simultâneo de vários pequenos metabólitos em biofluidos, como o soro. Além disso, os métodos de análise multivariada como PCA e PLS-DA são os mais comumente usados, simplificando a análise de dados (ZHANG et al., 2012).

Na presente investigação, ao avaliarmos o perfil dos metabólitos sanguíneos após nove dias de suplementação com as quercetinas e com o veículo (DMSO), não foram observadas diferenças quando os dados foram submetidos à análise quimiométrica tanto pelo método de PCA quando de PLS-DA. Em ambos os métodos não foi possível verificar separação entre os grupos, tanto quando comparados os três grupos conjuntamente quanto separados em pares. Entretanto, por meio dessas análises multivariadas é possível identificar os metabólitos que mais variaram entre as amostras a partir dos deslocamentos químicos. Neste trabalho foram identificados lactato, creatina, alanina, glicose, glutamina, lipídio, acetato e lipoproteína (VLDL). Esses compostos, quando submetidos à análise estatística, não apresentaram diferenças entre os grupos, porém podem estar indicando uma tendência à modulação metabólica, já que são metabólitos relacionados com vias do metabolismo energético como lipólise, glicólise, gliconeogênese, creatina-fosfato, entre outras. Então, com a análise de via metabólica, observamos que os metabólitos identificados no nosso estudo estão relacionados ao metabolismo do piruvato e à glicólise ou gliconeogênese, o que abre uma excelente oportunidade para investigações em novos estudos.

Sugere-se que, pelo curto tempo de suplementação (nove dias), o metabolismo ainda não teria sofrido alterações a ponto de serem identificadas diferenças entre os grupos. Também, pode-se assumir que as mudanças sejam locais, apenas dentro dos tecidos, não sendo extrapoladas para a corrente sanguínea, como modulação da expressão de genes e armazenamento de substratos energéticos

Como limitação do presente trabalho, apresentamos o uso do DMSO como veículo. Apesar de ser o solvente com maior capacidade de solubilizar a quercetina, poderia estar influenciando e mascarando certos efeitos deste composto, já tendo sido demonstrado promover ações antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas, tais quais o flavonoide utilizado neste estudo (FINOT et al., 2015; KISHIOKA et al., 2007; ALI, 2001; BRAYTON, 1986).

7. CONCLUSÃO

Por meio dos resultados obtidos na presente dissertação, é possível concluir que:

- As quercetinas utilizadas são iguais quanto a sua composição, sendo referentes à forma aglicona;
- A suplementação das quercetinas por nove dias foi capaz de promover menor ganho de peso corporal, mesmo sem alterar a ingestão alimentar, e aumentar o peso do músculo sóleo, mas não do gastrocnêmio e dos compartimentos de gordura;
- Houve aumento e tendência de aumento do desempenho físico dos animais que consumiram QGA e QPA, respectivamente;
- Ambas as quercetinas levaram ao aumento da força tetânica do músculo sóleo após nove dias de suplementação, sem gerar hipertrofia muscular;
- O perfil de metabólitos presente no soro dos animais após o período experimental foi similar;
- Mais estudos necessitam ser realizados a fim de verificar por meio de quais mecanismos a quercetina é capaz de promover seus efeitos benéficos.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Para tentar responder o que ficou em aberto com o presente estudo, temos como perspectivas futuras:

- Testar novas possibilidades de diluição da quercetina ou aplicação de processos, como o micro e nanoencapsulamento, para tornar possível sua diluição em água;
- Análise da expressão de genes que possam estar envolvidos com o aumento de força muscular e capacidade física;
- Análise metabolômica do músculo;
- Realização protocolo de suplementação longa (> 8 semanas).

REFERÊNCIAS

AHN, J. et al. The anti-obesity effect of quercetin is mediated by the AMPK and MAPK signaling pathways. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 373, n. 4, p. 545-549, 2008.

ALI, B. H. Dimethyl sulfoxide: recent pharmacological and toxicological research. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 43, n. 4, p. 228-231, 2001.

ANGELONI, C.; HRELIA, S. Quercetin reduces inflammatory responses in LPS-stimulated cardiomyoblasts. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, 2012.

ARON, P. M.; KENNEDY, J. A. Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 52, n. 1, p. 79-104, 2008.

ASKARI, G. et al. Does quercetin and vitamin C improve exercise performance, muscle damage, and body composition in male athletes? **Journal of Research in Medical Sciences: The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences**, v. 17, n. 4, p. 328, 2012.

AURA, A. M. et al. Quercetin derivatives are deconjugated and converted to hydroxyphenylacetic acids but not methylated by human fecal flora in vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 6, p. 1725-1730, 2002.

BELINHA, I. et al. Quercetin increases oxidative stress resistance and longevity in Saccharomyces cerevisiae. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 6, p. 2446-2451, 2007.

BERG, J. M. et al., Exploring proteins: nuclear magnetic resonance can reveal the structures of protein solutions. In W. H. Freeman, **Biochemistry,** 5 ed., New York, p. 77 – 115, 2002.

BETTS, J. W. et al. In vitro activity of epigallocatechin gallate and quercetin alone and in combination versus clinical isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 8, p. 2145-2148, 2015.

BHARTI, S. K. et al. Magic angle spinning NMR spectroscopic metabolic profiling of gall bladder tissues for differentiating malignant from benign disease. **Metabolomics**, v. 9, n. 1, p. 101-118, 2013.

BHUTADA, P. et al. Reversal by quercetin of corticotrophin releasing factor induced anxiety-and depression-like effect in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 34, n. 6, p. 955-960, 2010.

BONA, S. **Proteção antioxidante da quercetina em fígado de ratos cirróticos**. 2010. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2010.

BOULTON, D. W.; WALLE, U. K.; WALLE, T. Extensive binding of the bioflavonoid quercetin to human plasma proteins. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 50, n. 2, p. 243-249, 1998.

BOUVIERE, J. O. **Efeito da ingestão de quercetina sobre o desempenho muscular e vias de hipertrofia/atrofia em músculo esquelético de ratos wistar**. 2015. 73 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2015.

BRAGA, C. P; **Avaliação metabólica de ratas prenhez diabéticas tratadas com flavonóide quercetina e repercurssões na prole**. 2011. 123 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Instituro de Biociências, Universidade Estadual Paulista, São Paulo. 2011.

BRAYTON, C. F. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. **The Cornell Veterinarian**, v. 76, n. 1, p. 61-90, 1986.

BRUNING, A. Inhibition of mTOR signaling by quercetin in cancer treatment and prevention. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)**, v. 13, n. 7, p. 1025-1031, 2013.

CALVO, J. A. et al. Muscle-specific expression of PPARγ coactivator-1α improves exercise performance and increases peak oxygen uptake. **Journal of Applied Physiology**, v. 104, n. 5, p. 1304-1312, 2008.

CASUSO, R. A. et al. Ergogenic effects of quercetin supplementation in trained rats. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 10, n. 3, p. 1-7, 2013.

CASUSO, R. A. et al. Oral quercetin supplementation hampers skeletal muscle adaptations in response to exercise training. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 24, n. 6, p. 920-927, 2014.

CASUSO, R. A. et al. Quercetin effects on weight gain and caloric intake in exercised rats. **Biology of Sport**, v. 31, n. 1, p. 63-67, 2014.

CASUSO, R. A. et al. The combination of oral quercetin supplementation and exercise prevents brain mitochondrial biogenesis. **Genes & Nutrition**, v. 9, n. 5, p. 420, 2014.

CHEN, C. et al. Quercetin: a potential drug to reverse multidrug resistance. **Life Sciences**, v. 87, n. 11, p. 333-338, 2010.

CHENG, Z. et al. Inhibition of hepatitis B virus replication by quercetin in human hepatoma cell lines. **Virologica Sinica**, v. 30, n. 4, p. 261-268, 2015.

CHONDROGIANNI, N. et al. Anti-ageing and rejuvenating effects of quercetin. **Experimental Gerontology**, v. 45, n. 10, p. 763-771, 2010.

CLARKE, S. E. D.; RAMSAY, R. R. Dietary inhibitors of monoamine oxidase A. **Journal of Neural Transmission**, v. 118, n. 7, p. 1031-1041, 2011.

CREBELLI, R. et al. Urinary and faecal mutagenicity in Sprague-Dawley rats dosed with the food mutagens quercetin and rutin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 25, n. 1, p. 9-15, 1987.

CURETON, K. J. et al. Dietary quercetin supplementation is not ergogenic in untrained men. **Journal of Applied Physiology**, v. 107, n. 4, p. 1095-1104, 2009.

DAVINELLI, S. et al. Enhancement of mitochondrial biogenesis with polyphenols: combined effects of resveratrol and equol in human endothelial cells. **Immunity & Ageing**, v. 10, n. 1, p. 28, 2013.

DAVIS, J. M. et al. Quercetin increases brain and muscle mitochondrial biogenesis and exercise tolerance. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 296, n. 4, p. R1071-R1077, 2009.

DAVIS, J. M. et al. The dietary flavonoid quercetin increases VO2max and endurance capacity. **International journal of sport nutrition and exercise metabolism**, v. 20, n. 1, p. 56-62, 2010.

DAY, A. J. et al. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver β-glucosidase activity. **FEBS Letters**, v. 436, n. 1, p. 71-75, 1998.

DI CARLO, G. et al. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, v. 65, n. 4, p. 337-353, 1999.

DIHAL, A. A. et al. Transcriptome and proteome profiling of colon mucosa from quercetin fed F344 rats point to tumor preventive mechanisms, increased mitochondrial fatty acid degradation and decreased glycolysis. **Proteomics**, v. 8, n. 1, p. 45-61, 2008.

DIXON, R. A.; PASINETTI, G. M. Flavonoids and isoflavonoids: from plant biology to agriculture and neuroscience. **Plant Physiology**, v. 154, n. 2, p. 453-457, 2010.

DUARTE, J. et al. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 133, n. 1, p. 117-124, 2001.

DUMKE, C. L. et al. Quercetin's effect on cycling efficiency and substrate utilization. **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism**, v. 34, n. 6, p. 993-1000, 2009.

DUNNICK, J. K.; HAILEY, J. R. Toxicity and carcinogenicity studies of quercetin, a natural component of foods. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 19, n. 3, p. 423-431, 1992.

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

FINOT, F. et al. Treat and wash modification in Ames test for plant extract evaluation. **Toxicology Letters**, v. 2, n. 238, p. S349, 2015.

FITZPATRICK, M.; YOUNG, S. P. Metabolomics–a novel window into inflammatory disease. **Swiss Medical Weekly**, v. 143, p. w13743, 2013.

GAO, L. et al. Preparation of a chemically stable quercetin formulation using nanosuspension technology. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 404, n. 1, p. 231-237, 2011.

GARELNABI, M.; MAHINI, H. Modulation of microRNA 21, 125 b and 451 expression by quercetin intake and exercise in mice fed atherogenic diet. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 4, n. 3, p. 359-363, 2014.

GIBELLINI, L. et al. Quercetin and cancer chemoprevention. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 0-15, 2011.

GIBNEY, M. J. et al. Metabolomics in human nutrition: opportunities and challenges. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 82, n. 3, p. 497-503, 2005.

GOLDFARB, A. H. et al. Effects of a fruit/berry/vegetable supplement on muscle function and oxidative stress. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 43, n. 3, p. 501-508, 2011.

GONÇALVES, L. S. **Efeitos da suplementação da quercetina sobre o rendimento físico em esteira ergométrica e indicadores metabólicos do exercício exaustivo em atletas de futebol**. 2014. 64 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, São Paulo. 2014.

GONZALEZ, O. et al. The heat shock protein inhibitor Quercetin attenuates hepatitis C virus production. **Hepatology**, v. 50, n. 6, p. 1756-1764, 2009.

GONZÁLEZ-SEGOVIA, R. et al. Effect of the flavonoid quercetin on inflammation and lipid peroxidation induced by Helicobacter pylori in gastric mucosa of guinea pig. **Journal of Gastroenterology**, v. 43, n. 6, p. 441-447, 2008.

HATAHET, T. et al. Quercetin topical application, from conventional dosage forms to nanodosage forms. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 108, p. 41-53, 2016.

HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochemical Pharmacology**, v. 32, n. 7, p. 1141-1148, 1983.

HENAGAN, T. M. et al. Dietary quercetin supplementation in mice increases skeletal muscle PGC1α expression, improves mitochondrial function and attenuates insulin resistance in a time-specific manner. **PloS One**, v. 9, n. 2, p. e89365, 2014.

HENAGAN, T. M. et al. In vivo effects of dietary quercetin and quercetin-rich red onion extract on skeletal muscle mitochondria, metabolism, and insulin sensitivity. **Genes and Nutrition**, v. 10, n. 1, p. 1-12, 2015.

HERTOG, M. G. L. et al. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. **Nutrition and Cancer**, v. 20, n.1, p. 21-29, 1993.

HOLLMAN, P. C. H. et al. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, n. 6, p. 1276-1282, 1995.

HOLZMANN, I. et al. Antidepressant-like effect of quercetin in bulbectomized mice and involvement of the antioxidant defenses, and the glutamatergic and oxidonitrergic pathways. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 136, p. 55-63, 2015.

HU, X. T. et al. Quercetin protects gastric epithelial cell from oxidative damage in vitro and in vivo. **European Journal of Pharmacology**, v. 754, p. 115-124, 2015.

HUBER, L. S. et al. Quantitative variation in Brazilian vegetable sources of flavonols and flavones. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 1278-1282, 2009.

HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 19, n. 1, p. 97-108, 2008.

HUNG, C. et al. Quercetin is a potent anti-atherosclerotic compound by activation of SIRT1 signaling under oxLDL stimulation. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 59, n. 10, p. 1905-1917, 2015.

IGUAL, M. et al. Changes in flavonoid content of grapefruit juice caused by thermal treatment and storage. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 12, n. 2, p. 153-162, 2011.

JAISANKAR, P. et al. Flavonoid natural products: chemistry and biological benefits on human health: a review. **Asian J. of Adv. Basic Sci**, v. 3, n. 1, p. 164-178, 2014.

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

JUNG, C. H. et al. Quercetin reduces high-fat diet-induced fat accumulation in the liver by regulating lipid metabolism genes. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 1, p. 139-143, 2013.

KARAM, T. K. et al. Carqueja (Baccharis trimera): utilização terapêutica e biossíntese. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 15, n. 2, p. 280-286, 2013.

KASHIWABARA, M. et al. Suppression of neuropeptide production by quercetin in allergic rhinitis model rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 132, 2016.

KAWABATA, K. et al. Suppressive effect of quercetin on acute stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis response in Wistar rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, n. 5, p. 374-380, 2010.

KIM, B. et al. Relative antioxidant activities of quercetin and its structurally related substances and their effects on NF-κB/CRE/AP-1 signaling in murine macrophages. **Molecules and Cells**, v. 35, n. 5, p. 410-420, 2013.

KIM, D. H. et al. Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. **Archives of Pharmacal Research**, v. 21, n. 1, p. 17-23, 1998.

KIM, J. et al. Quercetin attenuates fasting and postprandial hyperglycemia in animal models of diabetes mellitus. **Nutrition Research and Practice**, v. 5, n. 2, p. 107-111, 2011.

KIRWAN, G. M. et al. Spectroscopic correlation analysis of NMR-based metabonomics in exercise science. **Analytica Chimica Acta**, v. 652, n. 1, p. 173-179, 2009.

KISHIOKA, T. et al. Effect of dimethyl sulphoxide on oxidative stress, activation of mitogen activated protein kinase and necrosis caused by thioacetamide in the rat liver. **European Journal of Pharmacology**, v. 564, n. 1, p. 190-195, 2007.

KOBORI, M. Dietary Quercetin and other Polyphenols: Attenuation of Obesity, in **Polyphenols in Human Health and Disease**, Elsevier Science, Amsterdam, p. 163-175, 2014.

KOBORI, M. et al. Chronic high intake of quercetin reduces oxidative stress and induces expression of the antioxidant enzymes in the liver and visceral adipose tissues in mice. **Journal of Functional Foods**, v. 15, p. 551-560, 2015.

KRESSLER, J. et al. Quercetin and endurance exercise capacity: a systematic review and meta-analysis. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 43, n. 12, p. 2396-2404, 2011.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.

LARSON, A. J. et al. Therapeutic potential of quercetin to decrease blood pressure: review of efficacy and mechanisms. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 3, n. 1, p. 39-46, 2012.

LITTLE, J. P.; COCHRAN, A. J. R. Regulating the regulators: the role of transcriptional regulatory proteins in the adaptive response to exercise in human skeletal muscle. **The Journal of Physiology**, v. 589, n. 7, p. 1511-1512, 2011.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MARCOLIN, E. et al. Quercetin Decreases Liver Damage in Mice with Non-Alcoholic Steatohepatitis. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 112, n. 6, p. 385-391, 2013.

MARQUES, O. C. P. **Desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas orais de Uncaria tomentosa com atividade antioxidante.** 2008. 210 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Departamento de Farmácia, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal. 2008.

MAURYA, A. K.; VINAYAK, M. Modulation of PKC signaling and induction of apoptosis through suppression of reactive oxygen species and tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1): key role of quercetin in cancer prevention. **Tumor Biology**, v. 36, n. 11, p. 8913-8924, 2015.

MCANULTY, S. R. et al. Effect of mixed flavonoids, n-3 fatty acids, and vitamin C on oxidative stress and antioxidant capacity before and after intense cycling. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 21, n. 4, p. 328-337, 2011.

MLCEK, J. et al. Quercetin and its anti-allergic immune response. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 623, 2016.

MOMIĆ, T. et al. Protolytic equilibria and photodegradation of quercetin in aqueous solution. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, v. 72, n. 11, p. 1447-1460, 2007.

MONTESANO, A. et al. Resveratrol promotes myogenesis and hypertrophy in murine myoblasts. **Journal of Translational Medicine**, v. 11, n. 1, p. 310, 2013.

NAIDU, P. S. et al. Quercetin, a bioflavonoid, attenuates haloperidol-induced orofacial dyskinesia. **Neuropharmacology**, v. 44, n. 8, p. 1100-1106, 2003.

NETO, R. A. L. et al. Decreased serum T3 after an exercise session is independent of glucocorticoid peak. **Hormone and Metabolic Research**, v. 45, n. 12, p. 893-899, 2013.

NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C. Systems biology: metabonomics. **Nature**, v. 455, n. 7216, p. 1054-1056, 2008.

NIEMAN, D. C. et al. Effects of quercetin and EGCG on mitochondrial biogenesis and immunity. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 41, n. 7, p. 1467-1475, 2009.

NIEMAN, D. C. et al. Quercetin's influence on exercise performance and muscle mitochondrial biogenesis. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 42, n. 2, p. 338-345, 2010.

O'LEARY, K. A. et al. Metabolism of quercetin-7-and quercetin-3-glucuronides by an in vitro hepatic model: the role of human β-glucuronidase, sulfotransferase, catechol-O-methyltransferase and multi-resistant protein 2 (MRP2) in flavonoid metabolism. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, n. 3, p. 479-491, 2003.

OLTHOF, M. R. et al. Bioavailabilities of quercetin-3-glucoside and quercetin-4′-glucoside do not differ in humans. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 5, p. 1200-1203, 2000.

PATIL, C. S. et al. Protective effect of flavonoids against aging-and lipopolysaccharide-induced cognitive impairment in mice. **Pharmacology**, v. 69, n. 2, p. 59-67, 2003.

PAVIA, D. L. et al**. Introdução à Espectroscopia**. 1. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PEJZNOCHOVA, M. et al. Mitochondrial DNA content and expression of genes involved in mtDNA transcription, regulation and maintenance during human fetal development. **Mitochondrion**, v. 10, n. 4, p. 321-329, 2010.

PEREZ-VIZCAINO, F.; DUARTE, J. Flavonols and cardiovascular disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 31, n. 6, p. 478-494, 2010.

PERRY, C. G. R. et al. Repeated transient mRNA bursts precede increases in transcriptional and mitochondrial proteins during training in human skeletal muscle. **The Journal of physiology**, v. 588, n. 23, p. 4795-4810, 2010.

PISKULA, M. K.; TERAO, J. Accumulation of (−)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. **The Journal of Nutrition**, v. 128, n. 7, p. 1172-1178, 1998.

PRIPREM, A. et al. Anxiety and cognitive effects of quercetin liposomes in rats. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 4, n. 1, p. 70-78, 2008.

PUTRI, S. P. et al. Current metabolomics: practical applications. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 115, n. 6, p. 579-589, 2013.

RAO, C. V.; VIJAYAKUMAR, M. Effect of quercetin, flavonoids and α-tocopherol, an antioxidant vitamin on experimental reflux oesophagitis in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 589, n. 1, p. 233-238, 2008.

ROGERIO, A. P. et al. Anti-inflammatory activity of quercetina and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma. **Inflammation Research**, v. 56, n. 10, p. 402-408, 2007.

ROGERIO, A. P. et al. Anti-inflammatory effect of quercetin-loaded microemulsion in the airways allergic inflammatory model in mice. **Pharmacological Research**, v. 61, n. 4, p. 288-297, 2010.

RUBIÓ, L. et al. Recent advances in biologically active compounds in herbs and spices: a review of the most effective antioxidant and anti-inflammatory active principles. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, n. 9, p. 943-953, 2013.

RUSSO, G. L. et al. Quercetin: a pleiotropic kinase inhibitor against cancer. In: **Advances in Nutrition and Cancer**. Springer Berlin Heidelberg, p. 185-205, 2014.

SAK, K. Site-specific anticancer effects of dietary flavonoid quercetin. **Nutrition and Cancer**, v. 66, n. 2, p. 177-193, 2014.

SANDERS, J. K. M; HUNTER, B. K. Modern NMR spectroscopy. **Angewandte Chemie-English Edition**, v. 33, n. 19, p. 1992-1993, 1993.

SCHOLTEN, S. D.; SERGEEV, I. N. Long-term quercetin supplementation reduces lipid peroxidation but does not improve performance in endurance runners. **Open Access Journal of Sports Medicine**, v. 4, p. 53, 2013.

SESSO, H. D. et al. Flavonoid intake and the risk of cardiovascular disease in women. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77, n. 6, p. 1400-1408, 2003.

SHEN, X. et al. Combining biochemical with 1 H NMR-based metabolomics approach unravels the antidiabetic activity of genipin and its possible mechanism. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 129, p. 80-89, 2016.

SIRIWARDHANA, N. et al. Modulation of adipose tissue inflammation by bioactive food compounds. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 4, p. 613-623, 2013.

SPAULDING, H. R. et al. Long-Term Quercetin Dietary Enrichment Partially Protects Dystrophic Skeletal Muscle. **PloS One**, v. 11, n. 12, p. e0168293, 2016.

TAN, W. et al. Quercetin, a dietary-derived flavonoid, possesses antiangiogenic potential. **European Journal of Pharmacology**, v. 459, n. 2, p. 255-262, 2003.

TAPAS, A. R. et al. Flavonoids as nutraceuticals: a review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 3, p. 1089-1099, 2008.

USDA, United States Department of Agriculture. USDA database for the flavonoid content of selected foods, Release 3.1. **Beltsville: US Department of Agriculture**, p. 03-1, 2013, revised 2014.

VELÁZQUEZ, K. T. et al. Quercetin supplementation attenuates the progression of cancer cachexia in ApcMin/+ mice. **The Journal of Nutrition**, v. 144, n. 6, p. 868-875, 2014.

WALGREN, R. A. et al. Transport of quercetin and its glucosides across human intestinal epithelial Caco-2 cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, n. 10, p. 1721-1727, 1998.

WALLE, T. et al. Carbon dioxide is the major metabolite of quercetin in humans. **The Journal of Nutrition**, v. 131, n. 10, p. 2648-2652, 2001.

WAN, Y. et al. Inhibitory effect of liposomal quercetin on acute hepatitis and hepatic fibrosis induced by concanavalin A. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 47, n. 8, p. 655-661, 2014.

WANG, D. T. et al. Resveratrol prevents TNF-α-induced muscle atrophy via regulation of Akt/mTOR/FoxO1 signaling in C2C12 myotubes. **International Immunopharmacology**, v. 19, n. 2, p. 206-213, 2014.

WANG, W. et al. The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 56, p. 21-38, 2016.

WU, J. et al. Quercetin alters energy metabolism in swimming mice. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 37, n. 5, p. 912-922, 2012.

WU, J. Q. et al. The metabolic changes of mice serum after loaded swimming. **Chinese Journal of Applied Physiology**, v. 27, n. 1, p. 42-45, 2011.

WU, P. et al. Protective effects of quercetin against chronic mixed reflux esophagitis in rats by inhibiting the nuclear factor-κB p65 and interleukin-8 signaling pathways. **Journal of Digestive Diseases**, v. 16, n. 6, p. 319-326, 2015.

WU, W. et al. Quercetin as an antiviral agent inhibits influenza A virus (IAV) entry. **Viruses**, v. 8, n. 1, p. 6, 2015.

XU, G. W. et al. Recent advances in metabonomics. **Zhongguo yi xue ke xue Yuan xue Bao. Acta Academiae Medicinae Sinicae**, v. 29, n. 6, p. 701-711, 2007.

ZHANG, A. et al. Recent and potential developments of biofluid analyses in metabolomics. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 4, p. 1079-1088, 2012.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMOES, C. M. O. et al. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Porto Alegre/Florianópolis: Editora Universidade da UFRGS/Editora da UFSC, 2003. p.577-614.

ANEXO I

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ
Centro de Ciências da Saúde - CCS

Rio de Janeiro, 29 de abril de 2016

Prezada Professora Anna Paola Trindade Rocha Pierucci

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em Experimentação Cientifica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro registrada no Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) sobre o número de processo 01200.001568/2013-87 certifica que o projeto intitulado: "**Avaliação do Efeito Protetor da Suplementação de Quercetina ao Estresse Oxidadtivo por Exercício Exaustivo em Wistar Machos.**", **protocolo n° 123/15**, sob sua responsabilidade que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n°11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n°6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado por esta comissão de ética, em reunião do dia **26/04/2016**.

Vigência do Projeto	**Até 29/04/2018**
Espécie/linhagem	***Rattus norvegicus*/ Wistar**
N° de animais	**80 animais**
Peso/idade	**350g / 3 meses**
Sexo	**machos**
Origem	**Instituto Vital Brasil – Niterói - RJ**

Atenciosamente;

Prof. Marcel Frajblat
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CCS

Decania do CCS. Av. Carlos Chagas Filho, 373 Prédio do Centro de Ciências da Saúde, Bloco K, 2º andar - Cidade Universitária - CEP 21941-590 – Rio de Janeiro – Brasil
Tel: (21) 2562.6705 - Fax: (21) 2270.1749 - www.ccsdecania.ufrj.br