

**JAQUELINE MACIEL VIEIRA THEODORO**

**EFEITO DA FARINHA DE MILHETO GERMINADO (*Pennisetum glaucum* (L.)  
R. Br.) NAS ALTERAÇÕES METABÓLICAS DE RATOS ALIMENTADOS  
COM DIETA RICA EM GORDURA SATURADA E FRUTOSE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Hércia Stampini Duarte Martino

Coorientadores: Carlos Wanderlei Piler Carvalho  
Mirella Lima Binoti  
Desirrê Morais Dias  
Mariana Grancieri

**VIÇOSA- MINAS GERAIS**

**2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

T388e  
2021  
Theodoro, Jaqueline Maciel Vieira, 1993-  
Efeito da farinha de milho germinado (*Pennisetum  
glaucum* (L.) R. Br.) nas alterações metabólicas de ratos  
alimentados com dieta rica em gordura saturada e frutose /  
Jaqueline Maciel Vieira Theodoro. – Viçosa, MG, 2021.  
104 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Hércia Stampini Duarte Martino.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Resistência à insulina. 2. Adiposidade. 3. Esteatose  
hepática. 4. Antioxidantes. 5. Glicemia. 6. Inflamação.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Nutrição e  
Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição.  
II. Título.

CDD 22. ed. 616.3620654

**JAQUELINE MACIEL VIEIRA THEODORO**

**EFEITO DA FARINHA DE MILHETO GERMINADO (*Pennisetum glaucum* (L.)  
R. Br.) NAS ALTERAÇÕES METABÓLICAS DE RATOS ALIMENTADOS  
COM DIETA RICA EM GORDURA SATURADA E FRUTOSE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição para obtenção do título de *Magister Scientiae*

APROVADA: 29 de janeiro de 2021.

Assentimento:



---

Jaqueline Maciel Vieira Theodoro  
Autora



---

Hércia Stampini Duarte Martino  
Orientadora

*Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais e irmãos, a meu esposo e ao meu filho.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me capacitar, direcionar meus passos e sempre cuidar de mim em todos os detalhes.

Agradeço também aos meus pais pelo amor incondicional, meus irmãos por todo incentivo, meu esposo por todo carinho, paciência, apoio e por sonhar junto comigo e ao meu filho por ser meu incentivo maior e me fazer acreditar que posso ir mais longe por nós. À minha mãe e minha sogra Luzia, que me ajudaram muito no cuidado com meu filho. A toda minha família e amigos por sempre torcerem e acreditarem em mim.

À minha orientadora e amiga, Hércia Stampini Duarte Martino, pela orientação, aprendizado, por se deixar ser usada por Deus para abrir essas portas para mim e por acreditar e me incentivar. Muito obrigada! Aos meus coorientadores Carlos Wanderlei Piler Carvalho, Mirella Lima Binoti, Desirrê Morais Dias e Mariana Grancieri, pela disponibilidade e aprendizado. Aos colaboradores Amanda M. Dias Martins, Patrícia Cristina Lisboa, Renata Celi Lopes Toledo e Oscar David Medina Martinez por toda ajuda e companheirismo. Aos professores por todo conhecimento compartilhado.

Aos amigos do Laboratório de Nutrição Experimental pelo companheirismo e por partilharem aprendizado e momentos de descontração ao longo de todo o mestrado e principalmente, por todo auxílio e cuidado durante minha gestação. À Renata Celi, pela orientação e ajuda em todos os momentos necessários. A toda equipe do experimento, Oscar Medina, Luiza Moreira, Bárbara Nery e Rodrigo Cardoso, por toda parceria e amizade. Ao Vinícius Brilhante, pela ajuda com as análises histológicas.

Aos laboratórios: Laboratório de Nutrição Experimental (DNS); Laboratório de Análise de Alimentos (DNS) e ao técnico Ricardo, Laboratório de Análises Clínicas (DNS e Divisão de Saúde) e a técnica Solange, Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral, em especial ao professor Sergio da Matta e à aluna Bete, Laboratório de Sistemática Molecular, Laboratório de Biologia Vegetal, Laboratório de Biotecnologia e Melhoramento Vegetal e a aluna Andressa, Laboratório de química e tecnologia de cereais e laboratório de pigmentos e compostos bioativos e ao professor Frederico e Laboratório de Fisiologia Endócrina (LFE/ UERJ). Aos animais, gratidão e respeito por terem proporcionado a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa, ao programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, e a todo o Departamento de Nutrição e Saúde, pela oportunidade

de realizar o mestrado e possibilitar crescimento profissional. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa e apoio à pesquisa.

À banca examinadora pela disponibilidade, sugestões e contribuições para a melhoria deste trabalho. Minha gratidão eterna é extensiva a todos que me apoiaram, ajudaram e incentivaram de alguma forma. Muito Obrigada!

## **BIOGRAFIA**

JAQUELINE MACIEL VIEIRA THEODORO nasceu na cidade de Viçosa, Minas Gerais, em 27 de setembro de 1993, filha de Francisco Carlos Vieira e Francisca da Conceição Lopes Vieira e irmã de Gislene e Guilherme. É casada com Júnior Moreira Theodoro e mãe do Miguel Vieira Theodoro.

Em maio de 2013, ingressou no Curso de Nutrição da Universidade Federal de Viçosa, graduando-se Nutricionista em janeiro de 2018. Participou como voluntária na coleta de dados de projetos de mestrado e doutorado da área de saúde coletiva e no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa (LNE/DNS-UFV) em 2014/2015. Fez iniciação científica, como bolsista do programa PROBIC/FAPEMIG, em 2015/2016 e 2016/2017 nesse mesmo laboratório.

De abril de 2018 a agosto de 2018, realizou aprimoramento profissional e atuou como pesquisadora colaboradora no LNE/DNS-UFV, sob a coordenação da professora Hércia Stampini Duarte Martino.

Em agosto de 2018, iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição da Universidade Federal de Viçosa, na linha de Dietética e Qualidade de Alimentos, submetendo-se à defesa da dissertação em janeiro de 2021.

## RESUMO

THEODORO, Jaqueline Maciel Vieira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2021. **Efeito da farinha de milho germinado (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) nas alterações metabólicas de ratos alimentados com dieta rica em gordura saturada e frutose.** Orientadora: Hércia Stampini Duarte Martino. Coorientadores: Carlos Wanderlei Piler Carvalho, Mirella Lima Binoti, Desirre Moraes Dias e Mariana Grancieri.

Alimentos ricos em gordura saturada e frutose podem levar o indivíduo a alterações metabólicas como resistência à insulina, adiposidade, inflamação e estresse oxidativo. Portanto é necessário utilizar alimentos naturais com propriedades benéficas à saúde. O milho possui minerais e fibra alimentar que lhe confere propriedade hipoglicemiante e compostos bioativos com potencial anti-inflamatório e antioxidante. Além disso, a germinação melhora a qualidade nutricional desse grão, aumentando o conteúdo de fibra, a biodisponibilidade dos micronutrientes e sua capacidade antioxidante. Deste modo, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da farinha de milho germinado (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) na resistência à insulina, tolerância à glicose, adipogênese, função tireoidiana, inflamação, estresse oxidativo e esteatose hepática em ratos *Wistar* adultos alimentados com dieta rica em gordura saturada e frutose. O experimento foi dividido em duas fases. Na fase 1 foram induzidas as alterações metabólicas. Para isso os animais foram divididos em dois grupos: grupo controle recebendo dieta AIN-93M (n=10) e grupo high fat high fructose (HFHF) (n=20) recebendo dieta rica em gordura saturada (31%) e frutose (20%), por oito semanas. Na fase 2, intervenção, o grupo controle foi mantido com dieta AIN-93M (n=10) e o grupo HFHF foi redistribuído em dois grupos: grupo HFHF (n=10) e grupo milho (HFHF com farinha de milho germinado substituindo 43,6% de fibra alimentar, 100% de amido, 36% de proteína e 39% de óleo na dieta experimental, n=10), por 10 semanas. No final da fase 2 os animais foram eutanasiados e foram coletados sangue, fígado e tecido adiposo para análises biológicas, bioquímicas e histológicas. A farinha de milho germinada manteve ( $p>0,05$ ) os níveis plasmáticos dos hormônios tireoidianos, aumentou ( $p<0,05$ ) a expressão do mRNA AKT e a concentração da proteína fosfo-AKT1, além da expressão do mRNA PFK e mRNA AMPK, o tecido adiposo marrom, a concentração de IL-10 e PPAR- $\alpha$ , a capacidade antioxidante total do fígado e a atividade da superóxido dismutase e catalase e reduziu ( $p<0,05$ ) o índice TyG, os níveis de glicose, de insulina, de corticosterona, de alanina

aminotransferase, de triglicérideo e ácido úrico, os marcadores pró-inflamatórios (NF- $\kappa$ B, TNF, razão plaqueta/linfócito e razão neutrófilo/linfócito), a esteatose hepática, o infiltrado inflamatório e a deposição de colágeno hepático, contribuindo para redução da adiposidade, recuperação da sensibilidade à insulina e da tolerância à glicose e exercendo efeito anti-inflamatório e antioxidante. Diante disso, a farinha de milho germinado apresenta-se como um alimento com potencial efeito biológico funcional, sendo uma boa alternativa para modulação das alterações metabólicas ocasionadas pela ingestão de dieta rica em gordura saturada e frutose em ratos *Wistar* adultos, sem interferir nos hormônios tireoidianos. Por isso, recomendamos maior inserção desse cereal na alimentação humana.

**Palavras-Chave:** Adiposidade. Antioxidante. Esteatose hepática. Glicemia. Inflamação. Resistência à insulina.

## ABSTRACT

THEODORO, Jaqueline Maciel Vieira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, January, 2021. **Effect of germinated millet flour (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) on metabolic changes of rats fed with high-fat high-fructose diet.** Advisor: Hércia Stampini Duarte Martino. Co-advisors: Carlos Wanderlei Piler Carvalho, Mirella Lima Binoti, Desirrê Morais Dias and Mariana Grancieri.

Foods rich in saturated fat and fructose can lead the individual to metabolic changes such as insulin resistance, adiposity, inflammation and oxidative stress. Therefore it is necessary to use natural foods with properties beneficial to health. Millet has minerals and dietary fiber that gives it a hypoglycemic property and bioactive compounds with anti-inflammatory and antioxidant potential. In addition, germination improves the nutritional quality of this grain, increasing the fiber content, the bioavailability of micronutrients and its antioxidant capacity. Thus, the present study aimed to evaluate the effect of germinated millet flour (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) on insulin resistance, glucose tolerance, adipogenesis, thyroid function, inflammation, oxidative stress and liver steatosis in adult *Wistar* rats fed with a high-fat high-fructose diet. The experiment was divided into two phases. In phase 1, metabolic changes were induced. For that, the animals were divided into two groups: control group receiving diet AIN-93M (n = 10) and group high fat high fructose (HFHF) (n = 20) receiving diet rich in saturated fat (31%) and fructose (20 %), for eight weeks. In phase 2, intervention, the control group was maintained with AIN-93M diet (n = 10) and the HFHF group was redistributed into two groups: HFHF group (n = 10) and millet group (HFHF added with germinated millet flour replacing 43.6% dietary fiber, 100% starch, 36% protein and 39% oil in the experimental diet, n = 10), for 10 weeks. At the end of phase 2, the animals were euthanized and blood, liver and adipose tissue were collected for biological, biochemical and histological analyzes. Germinated millet flour maintained (p>0.05) the plasma levels of thyroid hormones, increased (p<0.05) the expression of AKT mRNA and the concentration of phospho-AKT1 protein, in addition to the expression of PFK mRNA and AMPK mRNA, the brown adipose tissue, IL-10 and PPAR- $\alpha$  concentration, total liver antioxidant capacity and superoxide dismutase and catalase activity and reduced (p<0.05) the TyG index, glucose levels, insulin, corticosterone, alanine aminotransferase, triglyceride and uric acid, pro-inflammatory markers (NF- $\kappa$ B, TNF, platelet/lymphocyte ratio and neutrophil/lymphocyte ratio), liver

steatosis, inflammatory infiltrate and deposition of liver collagen, contributing to the reduction of adiposity, recovery of insulin sensitivity and glucose tolerance and exerting an anti-inflammatory and antioxidant effect. Therefore, germinated millet flour presents itself as a food with potential functional biological effect, being a good alternative for modulating the metabolic changes caused by eating a high-fat high-fructose diet in adult *Wistar* rats, without interfering with thyroid hormones. Therefore, we recommend greater insertion of this cereal in human food.

**Keywords:** Adiposity. Antioxidant. Liver steatosis. Glycemia. Inflammation. Insulin resistance.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Desenho experimental..... 42

### ARTIGO 1

**Figure 1.** Experimental design.....68

**Figure 2.** Effect of germinated millet flour on food consumption (A), body weight (B) and BMI (C), brown adipose tissue (D), visceral adiposity (E), and adiposity index (F) after 10 weeks of intervention.. ..... 73

**Figure 3.** Germinated millet flour reduces hyperglycemia and insulin resistance in animals induced to insulin resistance, after 10 weeks of intervention..... 75

**Figure 4.** Germinated millet flour increases the concentration of Phospho-AKT1 [pS473] (A) and the expression of protein kinase B (AKT) mRNA (B), protein kinase activated by adenosine monophosphate (AMPK) mRNA (C), and phosphofrutokinase (PFK) mRNA (D) in animals subjected to insulin resistance, after 10 weeks of intervention.. ..... 76

### ARTIGO 2

**Figure 1.** Effect of germinated millet flour in inflammatory markers in animals induced to metabolic changes with the HFHF diet, after 10 weeks of intervention.. ..... 92

**Figure 2.** Effect of germinated millet flour in liver steatosis, inflammatory infiltrate and collagen deposition in the liver of animals induced to metabolic changes with the HFHF diet, after 10 weeks of intervention. .... 93

**Figure 3.** Effects of germinated millet flour in antioxidant capacity of the liver in animals induced to metabolic changes with the HFHF diet, after 10 weeks of intervention.. ..... 94

**Figure 4.** Schematic figure of the effects of millet germinating on metabolic changes caused by a diet rich in saturated fat and fructose.. ..... 98

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Composição das dietas experimentais..... 43

**Tabela 2.** Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para RT-qPCR..... 48

### ARTIGO 1

**Table 1:** Composition of the experimental diets ..... 68

**Table 2:** Sequence of oligonucleotides used for RT-qPCR ..... 71

**Table 3:** Chemical characterization of germinated millet flour ..... 71

**Table 4:** Effect of germinated millet flour on blood glucose, insulin, TyG index, corticosterone, and free T3 and T4 in animals induced to insulin resistance with HFHF diet after 10 weeks of intervention. .... 73

### ARTIGO 2

**Table 1:** Composition of the experimental diets ..... 86

**Table 2:** Effect of germinated millet flour on adiposity, biochemical variables, and profile of food consumption in the animals induced to metabolic changes with the HFHF diet, after 10 weeks of intervention. .... 90

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIN-93M: dieta padrão para roedores em fase de manutenção

AKT: proteína quinase B

ALT: alanina aminotransferase

AMPK: proteína quinase ativada

AST: aspartato aminotransferase

AUC: área sob a curva

CAT: catalase

CEA: coeficiente de eficiência alimentar

CEE: coeficiente de eficiência energética

CNA: comprimento nasoanal

EROs: espécies reativas de oxigênio

FoxO: fator de transcrição Forkhead box O

GAPDH: gliceraldeído-3- fosfato desidrogenase

HFHF: dieta rica em gordura saturada e frutose (do inglês: high fat high fructose diet)

iGTT: teste de tolerância intraperitoneal a glicose

IL-10: interleucina 10

IMC: índice de massa corporal

IR: resistência à insulina

ITT: teste de tolerância intraperitoneal a insulina

LDN: lipogênese de novo

MDA: Malondialdeído

NADPH oxidase: nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato oxidase

NF-kB: fator nuclear Kappa B

PFK: Fosfofrutoquinase

PPAR- $\alpha$ : receptor ativado por proliferadores peroxissomais tipo *alfa*

RNL: razão neutrófilo linfócito

RPL: razão plaqueta linfócito

SOD: superóxido dismutase

T3: tri-iodotironina

T4: tiroxina

TA: tecido adiposo

TAC: capacidade Antioxidante Total

TG: triglicérido

TNF: fator de necrose tumoral

TPO: tireoide peroxidase

TyG: índice triglicérido glicose

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
2.1. Objetivo geral.....	19
2.2. Objetivos específicos .....	19
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>20</b>
3.1. Alterações Metabólicas: Resistência à Insulina, Inflamação, Estresse Oxidativo e Esteatose Hepática.....	20
3.2. Efeito da Dieta Rica em Gordura Saturada e frutose nas Alterações Metabólicas .....	22
3.3. Milheto: Produção e Definição .....	26
3.4. Qualidade Nutricional de Grãos de Milheto .....	27
3.5. Processamento dos Grãos de Milheto .....	30
3.6. Milheto: Benefícios à Saúde .....	31
3.6.1. Efeito do milheto sobre a função hepática.....	31
3.6.2. Efeito do milheto nos hormônios tireoidianos .....	33
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
4.1. Matéria Prima.....	35
4.1.1. Farinha de Milheto Germinado.....	35
4.2. Análises Químicas da Farinha de Milheto .....	36
4.2.1. Umidade, lipídios, cinzas, proteína, carboidrato e fibra alimentar .....	36
4.2.2. Amido Resistente .....	36
4.2.3. Ácido Fítico .....	37
4.2.4. Ácidos graxos .....	38
4.2.5. Fenólicos Totais e Taninos Condensados .....	38
4.2.6. Atividade Antioxidante.....	39
4.3. Ensaio Biológico .....	40
4.4. Cálculo Amostral .....	40
4.5. Delineamento Experimental.....	41
4.6. Dietas Experimentais .....	42
4.7. Medidas Biométricas e de Consumo Alimentar.....	44
4.8. Avaliação da Tolerância Intraperitoneal de Glicose e Insulina .....	44

4.9.	Eutanásia e coleta de tecidos.....	45
4.10.	Análises Após Eutanásia .....	45
4.10.1.	Análises Bioquímicas .....	45
4.10.2.	Análises Hormonais no Plasma .....	46
4.10.3.	Quantificação de Phospho-AKT1[pS473].....	46
4.10.4.	Expressão de genes relacionados à via de resistência à insulina no fígado .....	46
4.10.5.	Análise de Potencial antioxidante.....	48
4.10.6.	Determinação da Capacidade Antioxidante Total (TAC).....	50
4.10.7.	Citocinas .....	50
4.10.8.	Quantificação do Fator Nuclear Kappa B p65 e Receptor Alfa Ativado por Proliferador de Peroxissoma.....	51
4.10.9.	Análises histomorfométricas do fígado .....	52
4.11.	Análises Estatísticas .....	52
<b>5.</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>53</b>
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>65</b>
6.1.	Artigo 1: GERMINATED MILLET FLOUR ( <i>Pennisetum glaucum</i> (L.) R. BR.) IMPROVES ADIPOGENESIS AND GLUCOSE METABOLISM AND MAINTAINS THYROID FUNCTION <i>IN VIVO</i> .....	65
6.2.	Artigo 2: GERMINATED MILLET FLOUR ( <i>Pennisetum glaucum</i> (L.) R. BR.) REDUCES INFLAMMATION, OXIDATIVE STRESS, AND LIVER STEATOSIS IN RATS FED WITH HIGH-FAT HIGH-FRUCTOSE DIET .....	82
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>103</b>
<b>8.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>103</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>104</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Alimentos com alta densidade energética, ricos em gordura saturada e monossacarídeos, principalmente glicose e frutose de adição, têm sido muito consumidos na sociedade moderna (LOZANO et al., 2016). A Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2008-2009 demonstrou excesso no teor de açúcar, em relação às calorias totais, para as famílias de cinco regiões brasileiras (variando de 13,9% na região Norte a 17,4% na região Sudeste). Nos Estados Unidos e em diversos países em desenvolvimento como China, Índia, Vietnã e Tailândia também foram observados aumentos alarmantes no consumo desses produtos (GAINO; SILVA, 2015). Este consumo exagerado se deve principalmente ao uso destes compostos em produtos industrializados (GAINO; SILVA, 2015; TER HORST; SERLIE, 2017a).

Esse tipo de dieta, considerada pró-inflamatória e oxidativa (TER HORST; SERLIE, 2017a), é reconhecida como uma das principais causas da obesidade em humanos (LOZANO et al., 2016). Além disso, esse padrão dietético pode contribuir para a progressão de alterações metabólicas, como resistência à insulina, dislipidemia, aumento do índice de adiposidade (BALAKUMAR et al., 2016; LOZANO et al., 2016), além de estresse oxidativo (LACERDA; BOCK; FUNCHAL, 2015) e inflamação (GIRIŞ et al., 2018), sendo estes últimos diretamente relacionados ao desenvolvimento e progressão de doenças, gerando, portanto, um ciclo de complicações.

Diante disso, a demanda por fontes alimentares com efeito benéfico à saúde tem aumentado, e nesse cenário o milheto (*Pennisetum glaucum*) pode ser uma alternativa, pois além de ser resistente à seca, calor, baixa fertilidade do solo e alta salinidade, essa cultura também contém proteínas, minerais e principalmente fibra alimentar em quantidades semelhantes ou até superiores aos encontrados em grãos tradicionais como arroz e milho (TAYLOR, 2015). Esse grão apresenta em sua composição química 62 a 76% de carboidratos, principalmente amido e fibra alimentar, 8 a 11% de proteína, 2 a 9% de lipídeos, além de quantidades consideráveis de minerais, como potássio, fósforo, magnésio, ferro e zinco (DIAS-MARTINS et al., 2018; PATIL; CHIMMAD; ITAGI, 2015; SINGH, NIDHI et al., 2015). O milheto contém também ácidos graxos, amido resistente e compostos bioativos, incluindo compostos fenólicos e taninos condensados, além de apresentar baixo índice glicêmico e capacidade antioxidante (ANNOR et al., 2015; SALAR; PUREWAL; SANDHU, 2017; SARITA; EKTA SINGH, 2016; SHUKLA; SRIVASTAVA, 2014a, b; SIROHA; SANDHU; KAUR, 2016). Os compostos bioativos são encontrados principalmente no pericarpo do grão, por isso

recomenda-se o consumo em sua forma integral ou farinha (CHANDRASEKARA; SHAHIDI, 2011). Em termos de produção, a Índia é o maior produtor mundial desse cereal, seguido pela China. Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), em 2018, 11,64, 1,56 e 0,50 milhões de toneladas de milho foram produzidos na Índia, na China e na África do Sul, respectivamente, com uma produção mundial de aproximadamente 31 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2020). No Brasil a área total de plantio é de cerca de 5,5 milhões de hectares, sendo uma das principais culturas de cobertura no Cerrado e na região Sul. No entanto, é classificado como uma cultura de subsistência sendo pouco consumido na alimentação humana. Alguns países em desenvolvimento da África e a Índia o utilizam como alimento básico, entretanto entre os brasileiros ele não é utilizado para esse fim (DIAS-MARTINS *et al.*, 2018).

O milho vem demonstrando propriedades funcionais como hipoglicemiante, proporcionando redução da resistência à insulina e da glicemia *in vivo* e inibição da ação de enzimas que hidrolisam o amido (alfa-amilase pancreática e alfa-glicosidase) *in vitro*, (PRADEEP; SREERAMA, 2018; PRASAD *et al.*, 2012; REN *et al.*, 2018), além de apresentar também ação antioxidante e anti-inflamatória *in vitro* e em ratos, utilizando tanto o extrato quanto a farinha de grãos não germinados (CHANDRASEKARA; SHAHIDI, 2012; RAJASEKARAN *et al.*, 2004). Além disso, existem evidências na literatura sobre o benefício da germinação desses grãos, *in vitro*, com aumento de fibra alimentar (2,5 a 8,8%) e minerais antioxidantes (OWHERUO; IFESAN; KOLAWOLE, 2019; SARITA; EKTA SINGH, 2016). Os estudos também demonstraram que a germinação transforma os compostos fenólicos durante o crescimento das plantas, tornando frações livres mais solúveis, melhorando a composição fitoquímica das sementes e conseqüentemente suas propriedades antioxidantes (GAN *et al.*, 2017; OWHERUO; IFESAN; KOLAWOLE, 2019).

Esse cereal contém também glicosil flavonas que podem inibir a enzima tireóide peroxidase (TPO) responsável pela produção dos hormônios tireoidianos (MEZZOMO; NADAL, 2016). Assim, sugere-se que os grãos sejam submetidos a processamento, como a germinação, para reduzir esses constituintes e possibilitar o consumo seguro (KRISHNAN; DHARMARAJ; MALLESHI, 2012; SARITA; EKTA SINGH, 2016). Esse tipo de processamento reduz fatores antinutricionais, como ácido fítico, que forma complexos com proteína (SARITA; EKTA SINGH, 2016) e aumenta a biodisponibilidade de minerais como cálcio, ferro, e zinco (KRISHNAN;

DHARMARAJ; MALLESHI, 2012). Porém, não existem na literatura estudos que avaliaram os grãos germinados do milho na dieta HFHF (high fat high fructose) *in vivo*. A hipótese desse estudo é que a farinha de milho germinada modula as alterações metabólicas induzidas pela ingestão de uma dieta rica em gorduras saturada e frutose em ratos *Wistar* adultos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito da farinha de milho germinado (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) na resistência à insulina, tolerância à glicose, adipogênese, função tireoidiana, inflamação, estresse oxidativo e esteatose hepática em ratos *Wistar* adultos alimentados com dieta rica em gordura saturada e frutose.

### 2.2. Objetivos específicos

- Determinar o conteúdo de umidade, lipídios, cinzas, proteínas, carboidratos, fibra alimentar, amido resistente, fenólicos totais, ácido fítico, taninos condensados, ácidos graxos e a capacidade antioxidante na farinha de milho germinado;
- Investigar o efeito da farinha de milho germinado sobre o consumo alimentar, ganho de peso e medidas biométricas em ratos submetidos a alterações metabólicas;
- Avaliar o efeito da farinha de milho germinado sobre a resistência à insulina e metabolismo da glicose;
- Avaliar o efeito da farinha de milho germinado na adiposidade em ratos induzidos a alterações metabólicas;
- Avaliar o efeito da farinha de milho germinado na função tireoidiana em ratos induzidos a alterações metabólicas;
- Investigar o efeito da farinha de milho germinado em marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo em ratos induzidos a alterações metabólicas;
- Avaliar o efeito da farinha de milho germinado na morfologia hepática em ratos induzidos a alterações metabólicas.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1. Alterações Metabólicas: Resistência à Insulina, Inflamação, Estresse Oxidativo e Esteatose Hepática

O consumo de alimentos com alta densidade energética e baixa qualidade nutricional contribui para a progressão de alterações metabólicas (MONTEIRO *et al.*, 2013; DIRETRIZES BRASILEIRAS DE OBESIDADE/ABESO, 2016). Esses alimentos são pobres em fibra alimentar e apresentam alto conteúdo de gordura, principalmente a do tipo saturada, e monossacarídeos, como glicose e frutose de adição, considerados pró-inflamatórios e oxidativos, além de apresentarem alto índice glicêmico (TER HORST; SERLIE, 2017a).

O acúmulo de gordura no organismo leva a um estado oxidativo e inflamatório crônicos que desencadeia vários eventos associados ao desenvolvimento de doenças e agravos crônicos não transmissíveis (DACNT), como obesidade, diabetes, aterosclerose, entre outros (KOYAMA; BRENNER, 2017; LONARDO *et al.*, 2018; POZZA; ISIDORI, 2018). Fatores endógenos, como genes e hormônios, atuam na regulação do gasto energético, no entanto, a deposição de gordura no tecido adiposo (TA) pode levar a alterações relacionadas à resistência desses reguladores (POZZA; ISIDORI, 2018).

Em indivíduos saudáveis, os tecidos alvos da insulina funcionam coordenadamente para sintonizar de forma precisa o metabolismo e a homeostase energética (LI *et al.*, 2017). A produção de glicose pelo fígado ocorre principalmente por meio da gliconeogênese e da glicogenólise. A glicose é absorvida pelos tecidos-alvos, incluindo o fígado, músculo esquelético e tecido adiposo (LUCAS *et al.*, 2015).

A sinalização da insulina inicia com sua ligação a um receptor de membrana, que após ser ativado fosforila vários substratos proteicos, em tirosina, como o substrato do receptor de insulina (IRS), criando sítios de reconhecimento para moléculas como a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) (PORTA; PAGLINO; MOSCA, 2014). A PI3K recruta a proteína quinase B (AKT) para a membrana plasmática e esta fosforila muitas proteínas celulares, permitindo a reprogramação metabólica e transcricional das células (LUCAS *et al.*, 2015; PORTA; PAGLINO; MOSCA, 2014).

Na resistência à insulina ocorrem distúrbios do metabolismo da glicose no fígado, incluindo aumento da gliconeogênese e redução da glicólise (LI *et al.*, 2017). A ativação da AKT é reduzida, aumentando a expressão dos genes necessários para a gliconeogênese, como fosfoenol piruvato carboxiquinase (PEPCK) e glicose-6-fosfatase

(G-6-Pase), e reduzindo os genes responsáveis pela glicólise, como glicoquinase (GK), fosfofrutoquinase (PFK) e piruvatoquinase (PK) (CORNU; ALBERT; HALL, 2013).

O aumento de triacilglicerídeos (TG) e ácido graxo livre (AGL) corporal leva a maior deposição de gordura nos tecidos, estimulando resposta inflamatória (LUCAS *et al.*, 2015; YE, 2013), por meio da ativação de vias como a do fator de necrose tumoral (TNF) e fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) (BERNARDES *et al.*, 2017; GIRIŞ *et al.*, 2018; LUCAS *et al.*, 2015). Durante o processo pró-inflamatório, há aumento da infiltração de macrófagos no tecido adiposo (BAFFY, 2009). Na obesidade, a necrose dos adipócitos, por meio da disfunção mitocondrial, ativa a fagocitose, estimulando a infiltração de macrófagos. Esses macrófagos se agregam ao redor dos adipócitos necróticos, formando estruturas semelhantes a coroas, e induzem a inflamação do tecido adiposo (WOO *et al.*, 2019). O TNF, que é um dos padrões inflamatórios característicos liberados pelos macrófagos, medeia a ativação e expressão do fator nuclear kappa-B (NF- $\kappa$ B) (KIM, SU JEONG *et al.*, 2019; WOO *et al.*, 2019). Além disso, assim como na adiposidade, o TNF se correlaciona positivamente com outros biomarcador de inflamação sistêmica, como a razão plaqueta/linfócito (RPL) e a razão neutrófilo/linfócito (RNL), já que a inflamação e o estresse oxidativo aumentam a ativação, adesão e agregação de plaquetas (MENDES; OLIVEIRA; ALCÂNTARA, 2019), elevam a contagem de neutrófilos e reduzem os linfócitos, devido a apoptose e redistribuição para órgãos linfáticos (KIM, BONG JOON *et al.*, 2016).

Adicionalmente, quando há aumento da massa gorda, a irrigação insuficiente pode levar à falta de oxigênio, progredindo para a necrose celular. O processo de fagocitose, com objetivo de eliminar as células mortas, resulta em aumento de infiltrado inflamatório e estresse oxidativo pela liberação de radicais livres, como óxido nítrico e peróxido de hidrogênio (BHATTACHARYA *et al.*, 2015; KOSACKA *et al.*, 2015). O estresse oxidativo é definido como o resultado do desequilíbrio entre substâncias oxidantes e defesa antioxidante do organismo (FRANCISQUETI *et al.*, 2017). Comumente conhecidos como radicais livres, os oxidantes incluem espécies de oxigênio e nitrogênio, que realizam a oxidação de lipídios (lipoxidação) e glicose (glicação) (DANDONA *et al.*, 2010).

O estresse oxidativo é controlado pelo sistema de defesa antioxidante endógeno, que inclui enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), entre outras, e exógenos, que inclui vitaminas (C e E), flavonóides e carotenóides, presentes principalmente em frutas, hortaliças e grãos (FRANCISQUETI *et al.*, 2017).

No entanto, quando há um excesso de radicais livres o sistema redox é prejudicado, podendo levar a perda da defesa antioxidante, com redução na atividade biológica das enzimas, acarretando em um desequilíbrio homeostático (DANDONA *et al.*, 2010; FRANCISQUETI *et al.*, 2017).

Além disso, níveis elevados de TNF hepático e sistêmico, durante o processo inflamatório, agravam a RI e aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (MENDEZ-SANCHEZ *et al.*, 2018). A RI, assim como o TG, exacerbado eleva o acúmulo de lipídio hepático, tendo um papel central no desenvolvimento da esteatose hepática (JEGATHEESAN; DE BANDT, 2017; NAPIERALA *et al.*, 2019). Além disso, quando há excesso da capacidade oxidativa nos hepatócitos, a beta-oxidação de ácidos graxos é reduzida e há acúmulo desses no tecido hepático (TER HORST; SERLIE, 2017a). Esses lipídios acumulados podem alterar os níveis das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e a aspartato aminotransferase (AST), e o aumento destas, está relacionado com lesão hepática (KALRA; TUMA, 2018).

A  $\beta$ -oxidação é um processo importante pelo qual os ácidos graxos são oxidados. Essa via metabólica representa uma importante fonte de energia em períodos de estresse catabólico e desempenha um papel central na manutenção da homeostase energética (REDDY; HASHIMOTO, 2001). A oxidação de ácidos graxos é controlada transcricionalmente pelo receptor ativado por proliferador de peroxissomo  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ). A estimulação do PPAR $\alpha$  aumenta o catabolismo dos ácidos graxos hepáticos e diminui a deposição de gordura e os níveis plasmáticos de TG (NAVIDSHAD; ROYAN, 2016). O PPAR $\alpha$  é ativado por eicosanóides, fibratos e ácidos graxos. Esses podem se ligar diretamente ao PPAR- $\alpha$  e agir como agonistas, favorecendo uma maior expressão e atividade desse receptor (HAN *et al.*, 2017).

O aumento na ingestão de açúcares e gorduras por si só é capaz de promover a RI, além de inflamação, estresse oxidativo e esteatose hepática (TAPPY *et al.*, 2006). O consumo desse tipo de alimento tem sido a principal causa da crescente epidemia das doenças crônicas, portanto a manutenção de hábitos alimentares saudáveis, com a inclusão de alimentos hipoglicemiantes, antiinflamatórios e antioxidantes é importante na redução dessas alterações metabólicas e consequentemente, redução do risco de DACNT (FRANCISQUETI *et al.*, 2017; YE, 2013).

### **3.2. Efeito da Dieta Rica em Gordura Saturada e frutose nas Alterações Metabólicas**

Alimentos e bebidas ricos em açúcar e/ou gorduras têm sido muito consumidos nas sociedades modernas. Essas dietas são reconhecidas como as principais causas do ambiente obesogênico em humanos (LOZANO et al., 2016).

Dietas hiperlipídicas, com excesso de gordura saturada (HFD, do inglês: *high fat diet*), induzem ganho de peso, resistência à insulina e hiperlipidemia em humanos e animais (HILL et al., 1992; ROMIEU et al., 1988; FESKENS et al., 1995; KROMHOUT et al., 1995). Auberval et al.,(2014) demonstraram que a administração de dieta HFD a ratos por 2 meses foi capaz de induzir a síndrome metabólica, associada a distúrbios metabólicos e oxidativos. Adicionalmente, a suplementação com frutose piora os efeitos deletérios da dieta HFD a curto prazo (CRESCENZO et al., 2014), o que torna a dieta rica em gordura saturada e frutose (HFHF) mais prejudicial, no que diz respeito a alterações metabólicas, do que uma dieta rica em gorduras ou açúcares isoladamente (BASU et al., 2013; BALAKUMAR et al., 2016).

A frutose é um açúcar simples com uma fórmula química ( $C_6H_{12}O_6$ ) semelhante à glicose. A diferença entre elas é que a frutose apresenta um grupo cetona ligado ao carbono 2 da molécula, enquanto na glicose há um grupo aldeído no carbono 1 (TAPPY et al., 2006). A frutose é utilizada comercialmente como um adoçante substituto para glicose ou sacarose (ELLIOTT *et al.*, 2002). Seu consumo aumentou, em grande parte devido a seu uso generalizado em muitos alimentos e bebidas, como geleias, frutas enlatadas, pó para bebidas e refrigerantes (GAINO; SILVA, 2015; TER HORST; SERLIE, 2017a). Na alimentação humana raramente ela é utilizada de forma isolada, geralmente é consumida junto com a glicose por meio da sacarose ou misturas industriais de frutose e glicose (xarope de milho com alto teor de frutose) (DEKKER *et al.*, 2010).

A frutose foi considerada benéfica para pacientes diabéticos devido ao menor índice glicêmico comparado à glicose (BAZZANO *et al.*, 2008; HUDGINS *et al.*, 2000). Além disso, ela não estimula a secreção de insulina, pois não necessita dela para as etapas iniciais de seu metabolismo hepático, isso permite que quantidades substanciais de frutose sejam metabolizadas anaerobiamente (ADAMS *et al.*, 2008; TEFF *et al.*, 2004). No entanto, ultimamente a frutose tem sido considerada desfavorável, pois seu consumo na dieta pode ter consequências metabólicas profundas que predisõem os indivíduos a condições crônicas. Seu consumo tem sido associado à dislipidemia (BORGES SILVA *et al.*, 2017; LE<sup>^</sup>, *et al.*, 2009), adiposidade (PEREIRA *et al.*, 2017; STANHOPE, 2016), resistência à insulina (RI) (JENSEN *et al.*, 2018a;

STANHOPE *et al.*, 2009), hipertensão arterial (TAPPY; LE; LE^DEPARTMENT, 2010) e aumento dos níveis de ácido úrico (STANHOPE, 2016). Muitas dessas associações são independentes do ganho de peso corporal ou ingestão total de energia (BIZEAU; PAGLIASSOTTI, 2005; STANHOPE, 2016).

A frutose pode ativar o SREBP-1c independentemente da insulina e esse, ativa os genes envolvidos na lipogênese de novo (LDN) (FAEH *et al.*, 2005; MATSUZAKA *et al.*, 2004; NAGAI *et al.*, 2002). É demonstrado que quando a glicose é substituída por frutose, a atividade da SREBP-1 nuclear aumenta após duas semanas de tratamento dietético (KOO *et al.*, 2009). A taxa aumentada de LDN induzida por frutose gera ácidos graxos que podem ser incorporados em triglicerídeos hepáticos ou outras espécies lipídicas, podendo resultar em dislipidemia (DEKKER *et al.*, 2010).

Dietas hiperlipídicas adicionada de frutose também são responsáveis por ocasionar o desenvolvimento de fibrose no tecido hepático, levando ao desenvolvimento da esteato-hepatite não-alcoólica (NASH) (JAHN *et al.*, 2019). A frutose e os ácidos graxos saturados são substratos altamente lipogênicos, que contribuem para o acúmulo de triglicerídeo e da VLDL nos hepatócitos, que pode levar a retenção de lipídios hepáticos, ocasionando a esteatose hepática (JENSEN *et al.*, 2018b).

Balakumar *et al.*, (2016), utilizaram ratos *Wistar* machos (10 a 12 semanas), recebendo dieta HF (65% kcal de energia da frutose), dieta HFD (50% kcal de energia da gordura) e dieta HFHF (HF + HFD), por 4 meses e observaram que os animais apresentaram níveis elevados de glicose e insulina, resistência à insulina e dislipidemia, com níveis aumentados de triglicerídeos e VLDL, bem como níveis reduzidos de HDL. Além disso, os ratos alimentados com HFD e HFHF aumentaram o índice de adiposidade, sendo que aqueles que receberam apenas dieta HF tiveram maior tendência de adiposidade. No estudo de Lozano *et al.* (2016) foi demonstrado que a dieta HFHF permitiu o desenvolvimento de distúrbios metabólicos de longa duração, como manutenção da hiperglicemia de jejum, hiperinsulinemia pré e pós-prandial, resistência à insulina, intolerância à glicose e dislipidemia (hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia). No entanto, a dieta rica somente em gordura induziu apenas resistência transitória à insulina, intolerância à glicose e hipertrigliceridemia, sem qualquer impacto no colesterol total. Ainda nesse estudo, um distúrbio metabólico transitório apareceu após 2 meses de ingestão apenas de bebidas com frutose, caracterizada por uma redução da sensibilidade à insulina, sem ganho de peso anormal, que os autores acreditavam ser devido a uma expansão das células adiposas, por

hiperleptinemia, embora a ingestão total de calorias não tenha sido diferente entre os grupos. Estes resultados estão de acordo com os estudos em humanos que relatam que os efeitos das dietas ricas em frutose, particularmente na sensibilidade à insulina, parecem ser dose-dependentes (FAEH et al., 2005; LÊ et al., 2006).

Balakumar et al., (2016) também observaram maior expressão do gene FOXO1 e PEPCK no fígado de ratos resistentes à insulina e demonstraram que a dieta rica em frutose pode aumentar a gliconeogênese hepática por meio da regulação positiva dos fatores de transcrição. Nerurkar et al., (2012), também mostraram aumento na função FOXO1, porém em camundongos alimentados com HFD na presença de hiperinsulinemia, de modo que os autores sugeriram que isso pode ser um fator contribuinte adicional para a intolerância à insulina.

Ainda no estudo de Balakumar et al., (2016), a histologia hepática revelou que os animais alimentados com dieta HFHF apresentaram esteatose hepática com aumento na deposição de colágeno ao redor da tríade portal, bem como nódulos de hepatócitos cercados por faixas de colágeno de tamanho variável. O estudo de Feillet-Coudray *et al.*, (2019), utilizando ratos *Wistar* machos recebendo dieta controle com 4% de lipídios (óleo de soja) e dieta HFHF com 35% de lipídios (1% de óleo de soja + 8,5% de banha + 17% de óleo de palma + 8,5% de manteiga de cacau) e 25% de frutose, demonstrou maior quantidade de vesículas lipídicas nos ratos alimentados com a dieta HFHF, também confirmando a presença de esteatose hepática, além de maior atividade da alanina aminotransferase plasmática (ALT), um marcador de dano hepático indicativo de vazamento celular e perda da integridade funcional da membrana.

Nas células hepáticas, a dieta HFHF também provoca respostas ao estresse e ativação de cascatas pró-inflamatórias (TAPPY et al., 2006). Concentrações aumentadas de NF- $\kappa$ B (ROGLANS *et al.*, 2007), mRNA do TNF (HAUB *et al.*, 2010; SPRUSS *et al.*, 2009), assim como do TNF plasmático em camundongos (SPRUSS et al., 2009) e hamsters (TSAI et al., 2009) foram observadas após a alimentação com frutose. Além disso, Qin, Anderson, Adeli, (2008) avaliaram o efeito da infusão de TNF e observaram que no fígado houve diminuição da fosforilação da tirosina do receptor de insulina e das moléculas sinalizadoras de insulina, IRS-1 e Akt, indicando diminuição da sensibilidade à insulina.

Os receptores ativados por proliferador de peroxissoma alfa (PPAR- $\alpha$ ) controlam a transcrição de genes que codificam enzimas de oxidação de ácidos graxos mitocondriais, como acil coenzima-A desidrogenase de cadeia longa e média

(DEKKER *et al.*, 2010). Em ratos, a administração de frutose (10% peso/volume) na água reduziu a atividade do (PPAR- $\alpha$ ) (ROGLANS *et al.*, 2007). Os níveis de mRNA dos genes alvo do (PPAR- $\alpha$ ), como a carnitina palmitoiltransferase 1 (CPT 1) (GULICK *et al.*, 1994) e o próprio (PPAR- $\alpha$ ) (GEBEL; ARAND; OESCH, 1992), diminuíram como resultado da atividade transcricional reduzida do (PPAR- $\alpha$ ) (ROGLANS *et al.*, 2007). A diminuição da atividade do (PPAR- $\alpha$ ) compromete a oxidação de ácidos graxos nas mitocôndrias, um processo catabólico controlado diretamente pela CPT I (GULICK *et al.*, 1994). O acúmulo de ácidos graxos no fígado pode induzir estresse oxidativo (ROGLANS *et al.*, 2007).

Os radicais livres gerados pelo aumento do estresse oxidativo estão ligados à resistência à insulina (ERIKSSON, 2007). No estudo de Nyby *et al.* (2007) a alimentação com frutose, por 8 semanas, em ratos aumentou a geração de peróxido de hidrogênio e marcadores inflamatórios, por isso os autores consideraram a frutose como um fator adicional associado à resistência à insulina. Além disso, Armutcu *et al.* (2005) e Song; Hutchings; Pang, (2005), observaram que o tratamento com antioxidantes, timosina  $\alpha_1$  por 10 dias e N-acetilcisteína (1,5g/Kg/dia) por 10 semanas, respectivamente, em ratos alimentados com frutose diminuiu a geração de espécies reativas de oxigênio e preveniu a resistência à insulina, reforçando ainda mais os efeitos diretos da frutose sobre o estresse oxidativo e a resistência à insulina.

### **3.3. Milheto: Produção e Definição**

Os cereais desempenham papel importante na dieta humana como principal fonte de energia. Estados Unidos, China e Brasil são os principais produtores de cereal. Em 2017 foram produzidos 360, 210 e 98 milhões de toneladas nesses países, respectivamente. Juntos, respondem por cerca de 60% da produção mundial (FAOSTAT, 2020). Porém, mudanças climáticas, principalmente o aumento das temperaturas e o déficit hídrico globais, têm sido intensas nos últimos anos e um dos setores mais afetados é a produção agrícola (ALEXANDRATOS; BRUINSMA, 2012). Essas alterações climáticas associadas ao aumento da população mundial são responsáveis pela redução das colheitas e conseqüentemente aumento dos preços, o que pode comprometer a segurança alimentar da população (AL-AMIN; AHMED, 2016; DIAS-MARTINS *et al.*, 2018; KHANAL; MISHRA, 2017).

O milho apresenta-se como uma alternativa para contornar essa situação, uma vez que seu extenso sistema radicular permite a extração de água e nutrientes das camadas mais profundas do solo, sendo resistente à seca, baixa fertilidade do solo, alta salinidade e tem alta tolerância à temperatura (DEVI *et al.*, 2014; DIAS-MARTINS *et al.*, 2018).

O termo milho inclui um grupo de cereais ou grãos pequenos com várias espécies pertencentes à família Poaceae de gramíneas. De forma geral o milho pode ser dividido em quatro tipos diferentes: milho pérola (*Pennisetum glaucum*), milho dedo (*Eleusine coracana*), milho rabo de raposa (*Setaria itálico*) e milho proso (*Panicum miliaceum*) (HAMID; HUSSAIN, 2017). A altura da planta pode variar de 0,5 a 4 metros, os grãos podem ser brancos, amarelo pálido, cinzas, marrons, azuis ardósia ou roxos e geralmente pesam entre 1,4g e 2,5g (ODUSOLA; ILESANMI; AKINLOYE, 2013). O *Pennisetum glaucum* é uma das principais culturas de milho produzidas no Brasil (DIAS-MARTINS *et al.*, 2018). Essa espécie desenvolve panículas cilíndricas compactas de 2 a 3 cm de largura e 15 a 60 cm de comprimento e são capazes de produzir entre 500 e 2000 sementes por panícula (TAYLOR, 2015). Suas sementes são ovais, semelhantes a uma pérola, por isso recebe esse nome. Os grãos têm 3 a 4 mm de comprimento e são significativamente maiores que outras espécies (DIAS-MARTINS *et al.*, 2018).

Atualmente o milho é o sexto cereal mais produzido no mundo (FAOSTAT, 2020), sendo a Índia o maior produtor mundial, seguido pela China. Em 2018, 11,64, e 1,56 milhões de toneladas de milho foram produzidos na Índia e na China, respectivamente, com uma produção mundial de aproximadamente 31 milhões de toneladas. No Brasil a área total de plantio é de cerca de 5,5 milhões de hectares e a espécie *Pennisetum glaucum* ocupa área superior a 4 milhões de hectares, sendo uma das principais culturas de cobertura no Cerrado e na região Sul (FAOSTAT, 2020). No entanto é classificado como uma cultura de subsistência e destinada para ração animal. O escasso apoio econômico e tecnológico é um dos principais impedimentos para o aumento de sua produção (MACAULEY, 2015). O milho ainda não é utilizado na alimentação humana entre os brasileiros, enquanto outros países em desenvolvimento como Índia e alguns países da África o utilizam como alimento básico (DIAS-MARTINS *et al.*, 2018).

### **3.4. Qualidade Nutricional de Grãos de Milho**

O milho pode ser uma alternativa para a diversificação de alimentos, pois possui macronutrientes e antioxidantes em quantidades semelhantes ou até superiores aos encontrados em grãos tradicionais como arroz e milho (TAYLOR, 2015).

A maior parte dos grãos de milho é constituída de carboidratos, principalmente amido, seguido de fibra alimentar. O conteúdo médio de carboidratos nesse cereal (72,2%) é inferior ao do arroz (84,9%), do milho (78,1%) e superior ao do trigo (68,8%). O teor médio de fibra alimentar total nos grãos de milho (7,8%) é superior ao do arroz (3,5%), semelhante ao do milho (8,1%) e inferior ao centeio (16,8%), cevada (14,5%) e aveia (11,8%) (DIAS-MARTINS *et al.*, 2018). A quantidade de fibra alimentar presente no milho retarda a absorção de glicose pelo organismo humano, o que promove a redução do seu índice glicêmico (SHUKLA; SRIVASTAVA, 2014a)

As proteínas são o segundo maior componente nos grãos de milho, com quantidade média (11,8%) semelhante ao sorgo (10,7%), superior ao milho (9,2%) e arroz (8,6%) e inferior a aveia (16,7%), trigo (14,0%) e centeio (13%) (DIAS-MARTINS *et al.*, 2018). As proteínas do milho são boas fontes de aminoácidos essenciais, exceto a lisina e a treonina, mas são relativamente ricas em aminoácidos contendo enxofre, como a metionina e a cisteína (SARITA; EKTA SINGH, 2016; SINGH; MISHRA; MISHRA, 2012).

A quantidade de lipídeos dos grãos de milho (6,4%) é quase o dobro do sorgo (3,4%) e do milho (3,3%) e inferior ao da aveia (7,6%). Os principais ácidos graxos do grão são o ácido linoléico (39-45%), ácido oleico (21-27%) e ácido palmítico (20-21%) (ANNOR *et al.*, 2015; TAYLOR, 2015) e em menor quantidade estão os ácidos esteárico (5%) e o linolênico (3%) (NANI *et al.*, 2015). O conteúdo lipídico desse grão pode promover efeitos negativos na estabilidade de produtos como farinhas, pois os ácidos graxos insaturados são suscetíveis à oxidação (TIWARI *et al.*, 2014). No entanto, esses ácidos graxos podem trazer benefícios à saúde humana, uma vez que, estão diretamente relacionados às propriedades hipoglicemiantes desse cereal, pois reduzem a captação de glicose e a secreção de insulina (ANNOR *et al.*, 2015).

O teor total de cinzas do milho (1,8%) é semelhante ao do trigo (1,9%), superior ao do milho (1,3%) e do arroz (0,9%) e inferior ao da aveia (2,5%) e da cevada (2,2%) (DIAS-MARTINS *et al.*, 2018). Dentre os minerais presentes, destacam-se o potássio (3,9 mg/kg), fósforo (3,3 mg/kg), magnésio (1,3 mg/kg), cálcio (300 mg/kg), zinco (43 mg/kg) e ferro (18 mg/kg) (TAYLOR, 2015). Além dos minerais, o milho

apresenta quantidades significativas de vitaminas do complexo B, como a niacina, folacina, riboflavina e a tiamina (SARITA; EKTA SINGH, 2016).

O milho é rico em compostos bioativos, incluindo compostos fenólicos e taninos condensados (SALAR; PUREWAL; SANDHU, 2017; SIROHA; SANDHU; KAUR, 2016). Apresenta maiores concentrações de ácidos fenólicos (64,8 mg/kg) comparado ao sorgo (27,3 mg/kg), com predominância dos ácidos ferúlico e p-cumárico (N'DRI *et al.*, 2013). Além disso, o flavonóide apigenina também pode ser detectado nesses grãos (NANI *et al.*, 2015). Estes compostos são encontrados principalmente no pericarpo do grão, por isso alguns autores recomendam que o milho seja consumido como grão integral ou farelo (CHANDRASEKARA; SHAHIDI, 2011).

Os compostos fitoquímicos também encontrados no milho são o ácido fítico e as C-glicosilflavonas (TAYLOR, 2015). O ácido fítico é um antioxidante natural, nas formas di, tri e tetra mio-inositolfofato. No entanto, o alto conteúdo das formas penta e hexafofato de mio-inositol pode levar a uma redução na biodisponibilidade de minerais, como ferro, zinco, cálcio e manganês, devido à capacidade quelante aos minerais bivalentes. Além disso, o fitato pode reduzir a digestibilidade proteica inibindo a ação das enzimas digestivas no trato gastrointestinal (GUPTA; GANGOLIYA; SINGH, 2013). Apesar da luteolina, que é uma flavona presente no milho, ter propriedades antioxidantes, a presença de glicosil flavonas pode promover a inibição da tireóideperoxidase (TPO), uma enzima produzida na glândula tireóide responsável pela produção dos hormônios tireoidianos (MEZZOMO; NADAL, 2016). Por isso, sugere-se que grãos de milho sejam submetidos a processamento, como a germinação, para promover a redução desses constituintes e possibilitar o consumo seguro do grão (KRISHNAN; DHARMARAJ; MALLESHI, 2012; SARITA; EKTA SINGH, 2016).

Esse cereal contém também amido resistente e fitoquímicos, como fenóis, linhanos,  $\beta$ -glucano, inulina, fitatos, esteróis, tocoferol e carotenóides (SARITA; EKTA SINGH, 2016). Os principais polifenóis são os ácidos fenólicos e taninos, enquanto os flavonóides estão presentes em pequenas quantidades (CHANDRASEKARA; SHAHIDI, 2010). Os polifenóis são os fitoquímicos mais importantes do milho devido aos seus potenciais nutracêuticos, como atividade antioxidante, antiinflamatória, anticarcinogênica e antimicrobiana (SINGH, NIDHI *et al.*, 2015). Além disso, os polifenóis também são úteis no manejo de distúrbios fisiológicos, como diabetes mellitus, hipertensão, hipercolesterolemia, prevenção da oxidação de lipoproteínas de

baixa densidade (LDLs) e manutenção da saúde do trato gastrointestinal (SINGH, NIDHI *et al.*, 2015).

Variações na composição química do milheto são possíveis devido ao genótipo, às condições climáticas, ao teor de nutrientes no solo e ao tipo de processamento aplicado ao grão (SINGH, NIDHI *et al.*, 2015).

### **3.5. Processamento dos Grãos de Milheto**

Após a colheita os grãos podem ser submetidos a diferentes processamentos como germinação, fermentação, moagem, decorticação, cozimento, torrefação, branqueamento, extrusão, estouramento e tratamento ácido. Dentre esses se destaca a germinação, uma vez que, durante esse processo as enzimas hidrolíticas promovem alterações bioquímicas, modificação estrutural e síntese de novos compostos que podem aumentar o valor nutricional e a estabilidade dos grãos (DIAS-MARTINS *et al.*, 2018).

O processo de germinação se constitui em um conjunto de eventos fisiológicos e bioquímicos que ocorrem no grão após esse ser submetido à absorção de água (LOPES; BARBOSA; CAPUCHO, 2007; MALONE *et al.*, 2007). A retomada do crescimento do embrião por causa da absorção de água, com emissão de radícula, envolve a reativação de muitas enzimas presentes nas sementes e a sínteses de outras que irão hidrolisar as substâncias de reserva, fornecer poder antioxidante, energia, entre outros (MALONE *et al.*, 2007).

Esse tipo de processamento reduz fatores antinutricionais, como ácido fítico, que formam complexos com proteínas (KRISHNAN; DHARMARAJ; MALLESHI, 2012; SARITA; EKTA SINGH, 2016) e aumenta as vitaminas do complexo B e a biodisponibilidade de minerais como cálcio, ferro e zinco (KRISHNAN; DHARMARAJ; MALLESHI, 2012), além de melhorar o conteúdo de tiamina, niacina, lisina, frações protéicas, açúcares e fibras alimentares solúveis (ARORA; JOOD; KHETARPAUL, 2011). Estudos *in vitro* também mostraram melhora da digestibilidade da proteína (HEJAZI; ORSAT, 2016) e do amido (ANNOR *et al.*, 2017). Além disso, a germinação é um processo simples e barato, que não requer equipamentos sofisticados, possui um ciclo de produção rápido (duas a três semanas no máximo), fornece rendimentos razoavelmente altos e permite a produção de alimentos saudáveis, aumentando a opção no mercado para atender a demanda do atual estilo de vida do consumidor (BENINCASA *et al.*, 2019).

A magnitude das mudanças na composição centesimal do grão pode variar entre os estudos devido a diferenças nas práticas de imersão, duração e temperatura de germinação, além da variedade na utilização de espécies de milho (DIAS-MARTINS *et al.*, 2018; SINGH, NIDHI *et al.*, 2015).

### **3.6. Milho: Benefícios à Saúde**

O milho apresenta várias propriedades funcionais como, antioxidante (DIAS-MARTINS *et al.*, 2018; ODUSOLA; ILESANMI; AKINLOYE, 2013), anti-inflamatório (DIAS-MARTINS *et al.*, 2018), hipoglicemiante (ANNOR *et al.*, 2015; DIAS-MARTINS *et al.*, 2018; SHUKLA; SRIVASTAVA, 2014a), anticarcinogênico (DIAS-MARTINS *et al.*, 2018; SINGH, NIDHI *et al.*, 2015), atuando no auxílio da redução do risco de DACNT. Esses efeitos são decorrentes do alto conteúdo de fibras, composição de ácidos graxos e compostos fitoquímicos (ANNOR *et al.*, 2015; PATEL, 2015). Além disso, esse cereal é naturalmente isento de glúten, sendo uma alternativa funcional de baixo custo para celíacos (CHANDRASEKARA; SHAHIDI, 2012a).

O milho apresenta maior conteúdo de amido de digestão lenta do que outros cereais, quantidade e tipo de ácidos graxos capazes de formar complexos com moléculas de amido e alto teor de fibras alimentares (ANNOR *et al.*, 2017). Além disso, a presença de fitoquímicos (ácidos fenólicos, flavonóides e fitatos) podem contribuir para inibir a ação de enzimas que hidrolisam o amido, reduzindo assim a glicemia (CAO; CHEN, 2012; KIM, JU SUNG; HYUN; KIM, 2011; SHUKLA; SRIVASTAVA, 2014a). No entanto, o efeito hipoglicemiante do milho pode ser significativamente afetado pelo tipo de processamento aplicado. A adoção de processos, como a fermentação e a germinação, que mantenham a baixa hidrólise do amido deve ser encorajada (ANNOR *et al.*, 2017).

#### **3.6.1. Efeito do milho sobre a função hepática**

O fígado é um dos maiores órgãos do corpo humano e desempenha várias funções vitais à saúde do organismo. Está envolvido no metabolismo dos macronutrientes, na secreção da bile, no armazenamento de substâncias, na degradação e liberação hormonal, no auxílio à resposta imune e no metabolismo de drogas (SI-TAYEB; LEMAIGRE; DUNCAN, 2010).

O fígado constitui um dos principais locais de estoque de glicogênio e atua para manter os níveis glicêmicos relativamente constantes, sendo esse processo regulado por

hormônios (SCHINONI, 2003). O alto nível de glicose induz a hiperglicemia e contribui para a geração de espécies reativas de oxigênio, danos ao DNA e distúrbios do equilíbrio pró-oxidativo/antioxidante, resultando em danos aos órgãos. O dano ao DNA mediado pelo estresse oxidativo pode induzir alterações genéticas que causam morte e apoptose das células hepáticas (NAPIERALA *et al.*, 2019). Subramaniyan e Kumar (2017) observaram que elevada concentração de glicose (50 mM) induziu citotoxicidade e estresse oxidativo na linha celular do carcinoma hepatocelular hepático humano (Hep G2). Quando as concentrações EROs excedem a capacidade antioxidante, esse desequilíbrio pode causar o desenvolvimento de distúrbios sistêmicos (NAPIERALA *et al.*, 2019).

Enzimas antioxidantes como CAT e SOD fornecem proteção contra o estresse oxidativo, uma vez que estão envolvidas no mecanismo de defesa antioxidante impedindo o acúmulo de peróxido de hidrogênio (BARBOSA *et al.*, 2010). Pang *et al.*, (2014) consideram que bloquear ou retardar a reação em cadeia da oxidação é uma estratégia para prevenir danos induzidos pelo estresse oxidativo e demonstraram que o óleo de farelo de milho tem efeitos antioxidantes e hepatoprotetores, com eliminação de radicais livres *in vitro* e inibição da depleção de SOD e redução da peroxidação lipídica induzidas por etanol, em ratos.

As enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) são utilizadas como marcadores de presença de lesão hepática. Essas enzimas são componentes dos hepatócitos e são liberadas na circulação após danos no fígado (KALRA; TUMA, 2018). ALT e AST são enzimas importantes na gliconeogênese, sendo a ALT mais específica para o fígado, uma vez que a AST é encontrada em uma variedade de tecidos (SU *et al.*, 2019). No estudo de Pang *et al.*, (2014) também foi demonstrado que o óleo de farelo de milho teve efeito preventivo contra danos induzidos pelo etanol, impedindo o aumento de ALT e AST séricas. Além disso, o etanol causou alterações morfológicas degenerativas exibidas por gotículas de gordura e os animais tratados com milho apresentaram redução dessas alterações, demonstrando que o pré-tratamento com óleo de farelo de milho suprimiu o dano hepático agudo, por isso, os autores concluíram que ele poderia ser utilizado como alimento funcional para a terapia e prevenção de danos no fígado.

### 3.6.2. Efeito do milho nos hormônios tireoidianos

A tireoide secreta dois hormônios, a tiroxina (T4) e a tri-iodotironina (T3). Ambos têm efeito no controle do crescimento, do metabolismo e do desenvolvimento corporal, agindo na produção de proteínas estruturais, enzimas e outros hormônios (MEZZOMO; NADAL, 2016). Estes hormônios promovem a diferenciação de muitos órgãos e são os principais reguladores da taxa metabólica basal, pois aumentam o metabolismo das proteínas, dos lipídeos e dos carboidratos, além de elevar o consumo de oxigênio e a produção de calor (MEZZOMO; NADAL, 2016).

A maior parte dos hormônios secretados pela glândula tireóide é de T4, no entanto, grande parte desse hormônio é convertida em T3 nos tecidos periféricos. Cerca de 80% do T3 são gerados no fígado e nos rins pela enzima 5'-deiodinase (5'D), que remove uma molécula de iodo do T4 para formar o T3 (MEZZOMO; NADAL, 2016). Apesar de manter a mesma função, a intensidade de ação destes hormônios é diferente. O T3 é mais potente que o T4, porém está presente na circulação em menor quantidade e persiste por menos tempo (MEZZOMO; NADAL, 2016).

Para síntese e função adequada destes hormônios é necessária a presença de micronutrientes como iodo, zinco e selênio. Além disso, os flavonóides também podem influenciar no funcionamento da tireóide (TRIGGIANI *et al.*, 2009). O iodo tem papel fundamental na produção dos hormônios tireoidianos. Quantidades excessivas ou deficitárias de iodo e selênio contribuem para alterações tireoidianas, entre as quais o hipotireoidismo. O zinco e o selênio agem como cofatores nas reações de deiodinação do T4 em hormônio ativo (MEZZOMO; NADAL, 2016) e os flavonóides possuem potencial para interferir no metabolismo destes hormônios *in vitro*, diminuindo as concentrações séricas de T4 e inibindo a conversão de T4 para T3 (FERREIRA *et al.*, 2006). A luteolina, um flavonoide natural, é o inibidor mais ativo da atividade da 5'D, além disso, a quercetina e a miricertina também apresentam atividade inibitória (MEZZOMO; NADAL, 2016). Ainda não está claro se esses efeitos se mantêm *in vivo*, ou ainda, se são restritos a flavonoides específicos e em quais dosagens (FERREIRA *et al.*, 2006; MEZZOMO; NADAL, 2016).

Evidências epidemiológicas indicam que uma dieta baseada em milho está associada ao hipotireoidismo e à gênese do bócio endêmico (BONCOMPAGNI *et al.*, 2018). Um estudo transversal realizado em um vilarejo da região oeste do Sudão mostrou maior frequência de hipotireoidismo juvenil em crianças acima de dois anos de idade, atribuindo isso ao consumo de milho como alimento para desmame

(MORENO-REYES *et al.*, 1993). Além disso, alterações histológicas da tireóide, semelhantes às observadas no bócio humano (KLOPFENSTEIN; HOSENEY; LEIPOLD, 1983) e níveis séricos aumentados de T4 e T3 (GAITAN *et al.*, 1989) foram observados em ratos alimentados com dietas baseadas em milheto.

O milheto apresenta antinutrientes como ácido fítico e polifenóis (BONCOMPAGNI *et al.*, 2018). O ácido fítico possui capacidade quelante e forma complexos com zinco, potássio, cálcio, ferro, magnésio e outros cátions, reduzindo sua biodisponibilidade e criando um déficit em sua absorção (BONCOMPAGNI *et al.*, 2018). Além disso, o milheto apresenta polifenóis goitrogênicos, as C-glicosilflavonas (C-GFs), como glucosilvitexina, glucosilorientina e vitexina (ELNOUR *et al.*, 1997; BOUIS *et al.*, 2011). As C-GFs são estáveis à hidrólise e são biologicamente ativas tanto nos componentes vegetais quanto na dieta (BONCOMPAGNI *et al.*, 2018). Apesar dos benefícios para a saúde das C-GFs, alguns desses compostos fenólicos interferem em sistemas enzimáticos em humanos, principalmente aqueles que controlam a síntese do hormônio tireoideano, sendo esse prejudicado (OPPENHEIMER, 1968; OPPENHEIMER; SCHWARTZ; SURKS, 1972). Isso pode levar ao desenvolvimento de hipotireoidismo e, conseqüentemente, ao bócio, que é caracterizado por um inchaço do pescoço ou laringe resultante do aumento da glândula tireóide (BONCOMPAGNI *et al.*, 2018).

No estudo de Elnour *et al.*, (1997) a fermentação do milheto resultou em um aumento no peso da tireóide, enquanto a alimentação das formas não fermentadas promoveram níveis séricos de T4 e TSH comparáveis aos observados no grupo controle, sugerindo que a fermentação poderia estar associada ao aumento no efeito goitrogênico do grão, devido a hidrólise dos C-glicosilflavanóides durante o processo de fermentação juntamente com a quebra das agliconas.

Klopfenstein, Hosene, Leipold (1983) e Elnour *et al.* (1997), sugeriram que o goitrogênio em doses normalmente presentes no milheto tem pouco ou nenhum efeito na síntese dos hormônios tireoideanos, mas possivelmente atua no metabolismo extratireoideano de T4 e T3, por exemplo, diminuindo a depuração do T4. Porém, em doses mais altas, o goitrogênio parece ter um efeito inibitório pronunciado na síntese desses hormônios (GAITAN *et al.*, 1989).

De acordo com a literatura, os efeitos do consumo do milheto nos hormônios tireoideanos podem ser variáveis e são modulados pelo cultivar, dependendo de sua composição principalmente de compostos fenólicos, e pelo tipo de processamento

exercido no grão, que pode ou não aumentar a goitrogenicidade em quantidades prejudiciais (BONCOMPAGNI *et al.*, 2018; ELNOUR *et al.*, 1997). Portanto, mais pesquisas são necessárias pois, apesar das evidências destacadas sobre os potenciais do milho na saúde, ainda são poucos os estudos e nenhum deles investigou os efeitos da germinação do grão *in vivo*.

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio biológico ocorreu no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde (DNS/UFV). A farinha de milho germinado foi preparada no Laboratório de Cereais da Embrapa Agroindústria de Alimentos (CTAA/RJ). As análises na farinha foram executadas no Laboratório de Análise de Alimentos (LAA - DNS/UFV) em parceria com o Laboratório de Nutrição Experimental (DNS/UFV). Os testes bioquímicos foram feitos no Laboratório de Análises Clínicas (LAC- DNS/UFV e da Divisão de Saúde/UFV). A histologia foi realizada no Laboratório de Biologia Geral (DBG- ECS/UFV) e os hormônios foram analisados no Laboratório de fisiologia endócrina (LFE/ UERJ). As demais análises de estresse oxidativo e expressão gênica foram conduzidas no Laboratório de Nutrição Experimental (DNS/UFV) em parceria com os Laboratórios de Metabolismo e Fermentação e de Bioquímica e Biologia Molecular de Agentes Infecciosos e Parasitários, ambos do DBB/UFV.

##### 4.1. Matéria Prima

###### 4.1.1. Farinha de Milho Germinado

O milho (*Pennisetum glaucum* L. R. Br.) cultivar BRS1502 foi plantado e colhido em 2016, no campo experimental da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, MG, e armazenados em freezer (-18°C) até o processamento.

A farinha de milho germinado foi preparada na Embrapa Agroindústria de Alimentos (RJ), conforme protocolo próprio. Para a germinação, grãos integrais com 99% de índice de germinação foram embebidos em água (razão 1: 3 grão / água) por 3 horas. Os grãos foram germinados em um armário de fermentação de oito portas (National Mfg. Co., Lincoln, EUA), sendo a temperatura ( $30^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e umidade relativa (90%) controladas. Após 24 horas de germinação, os grãos foram secos em um forno modelo DMS-G-EG (Macaduna Hauber, Joinville, Brasil) a  $50^{\circ}\text{C}$  por 4 horas, até umidade final inferior a 7%, e depois moídos em moinho de martelos LM3100 (Perten

Instruments AB, Huddinge, Suécia) equipado com uma peneira de aberturas de 1,0 mm. A farinha resultante foi armazenada em embalagem de polietileno a vácuo e enviada ao Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa (DNS/UFV), onde foi armazenada em freezer ( $-18^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) até o processamento da dieta.

## 4.2. Análises Químicas da Farinha de Milheto

### 4.2.1. Umidade, lipídios, cinzas, proteína, carboidrato e fibra alimentar

A composição centesimal foi avaliada utilizando as metodologias propostas pela *Association of official analytical chemistry*– AOAC (2016). Essas análises foram realizadas nos laboratórios de Nutrição Experimental e Análise de Alimentos (DNS/UFV). O teor de umidade foi determinado pelo método gravimétrico, calculando-se a diferença entre a amostra úmida e seca, utilizando estufa com circulação de ar (Nova Ética®, modelo 400 / 6ND, São Paulo, Brasil), por 12 horas a  $105^{\circ}\text{C}$ . O conteúdo de lipídios totais foi mensurado por extração em Soxhlet, utilizando o éter etílico como solvente, por 8 horas sob-refluxo. O total de cinzas foi determinado pela diferença de peso da amostra antes e após incineração em mufla (Quimis, modelo Q320 M, Brasil) à  $550^{\circ}\text{C}$  por 6 horas. A proteína da farinha foi determinada pelo método semimicro Kjeldhal, por meio da quantidade de nitrogênio gasto (esse valor é multiplicado pelo fator 6,25 para determinar a quantidade de proteína total). O conteúdo de carboidrato foi calculado pela diferença entre 100% da amostra e a soma dos teores de umidade, lipídio, cinzas e proteína. A análise de fibra alimentar solúvel e insolúvel foi realizada pelo método enzimático gravimétrico, sendo que para a hidrólise enzimática foram utilizadas  $\alpha$ -amilase termo resistente, protease e amiloglicosidase (Total dietary fiber assay kit, Sigma®).

### 4.2.2. Amido Resistente

O conteúdo de amido resistente foi determinado por meio da digestão simulada com  $\alpha$ -amilase pancreática e amiloglicosidase, para extração dos componentes diferentes do amido resistente (exemplo: amido solubilizado) e fez-se a leitura indireta da fração do componente de interesse por espectrofotometria a 510 nm seguindo os procedimentos recomendados pelo kit enzimático da Megazyme® (AOAC, 2016).

Para hidrólise e solubilização do amido não resistente das amostras, a farinha de milheto ( $100 \pm 5$  mg) foram pesadas em duplicata em tubos e adicionadas de 4 mL de

solução de  $\alpha$ -amilase pancreática contendo amiloglicosidase a 1%, agitadas em vórtex e incubadas em banho-maria a 37°C por 16 horas, com agitação contínua (200 rpm). Em seguida, os hidrolisados foram tratados com 4 mL de etanol 99%, agitados em vórtex e centrifugados por 10 minutos à 1.000 x g (204 NR, FANEM®, São Paulo, Brasil). Foi descartado o sobrenadante resultante desse processo e o precipitado foi resuspenso com 2 mL de etanol 50% sob agitação em vórtex, seguida da adição de mais 6 mL de etanol 50% e novamente agitação e centrifugação sob as mesmas condições descritas anteriormente. O sobrenadante gerado nessa etapa também foi descartado e as etapas de resuspensão do precipitado, centrifugação e descarte do sobrenadante foram repetidas. Após descarte os tubos foram invertidos cuidadosamente em papel absorvente para retirar o excesso de líquido.

Aos sedimentos decorrentes da centrifugação foram adicionados 2 mL de solução de KOH 2 M para dissolver o amido resistente sob agitação vigorosa em banho de gelo por 20 minutos. Seguidamente, as soluções foram neutralizadas com 8 mL de solução de acetato de sódio 1,2 M (pH 3,8) e adicionadas de 0,1 mL de amiloglicosidase, seguido de agitação em vórtex e incubação em banho-maria a 50°C por 30 minutos, com agitação também em vórtex a cada 10 minutos para hidrolisar o amido derivado do amido resistente em D-glucose. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos à 1.000 x g e o sobrenadante resultante diluído com água destilada em balões volumétricos de 50 mL. Alíquotas de 0,1 mL dos diluídos foram acrescidas de 3,0 mL do reagente de *Glucose Determination* (GOPOD) e incubadas em banho Maria a 50°C por 20 minutos para medir a D-glucose. Alíquotas do branco (acetato de sódio, pH 4,5) e do padrão (D-glucose) também foram adicionados de GOPOD e incubados sob as mesmas condições. O amido resistente foi mensurado indiretamente por leitura da absorbância da D-glucose a 510 nm em espectrofotômetro (Thermo Scientific®, Evolution 60S, EUA). Utilizou-se a planilha disponível na plataforma online do fornecedor do Kit ([www.megazyme.com](http://www.megazyme.com)) para o cálculo do conteúdo de amido resistente das amostras.

#### 4.2.3. Ácido Fítico

O conteúdo do ácido fítico foi determinado utilizando o kit K-PHYT Phytic Acid (Phytate)/Total Phosphorus (Megazyme®, Wicklow, Irlanda), seguindo as instruções do fabricante com pequenas modificações. Resumidamente, 1g de farinha de milho germinado foi adicionado a 20 mL de HCl 0,66 M e misturados por agitação à

temperatura ambiente durante a noite; 1 mL do extrato resultante foi transferido para tubos de 1,5 mL e centrifugados a 13000 rpm por 10 minutos. Imediatamente, 0,5 mL do sobrenadante foram transferidos para tubos de 1,5 mL e neutralizados com 0,5 mL de NaOH (0,75 M). Posteriormente realizou-se a desfosforilação enzimática, utilizando 1 tubo para fósforo livre e 1 tubo para fósforo total, com diluições utilizando a amostra neutralizada, obtida anteriormente, e os demais componentes do kit (enzimas). Após o tratamento enzimático, amostras de fósforo total e fosfato livre foram utilizadas para determinar colorimetricamente seu conteúdo de fósforo. Foi preparada uma curva padrão, plotada conforme indicado no folheto do fabricante, e a absorbância lida a 655 nm em espectrofotômetro Multiskan™ GO (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, EUA).

#### 4.2.4. Ácidos graxos

Inicialmente foi extraído o óleo da farinha de milho germinado. A farinha (4 g) juntamente com hexano (40 mL) foram colocados em tubos, que ficaram em agitação por 3 h. Posteriormente o conteúdo foi centrifugado e o sobrenadante, contendo óleo e hexano, foi transferido para um balão e levado ao retroevaporador, a 25 °C, para que o hexano fosse evaporado.

A análise dos ésteres metílicos de ácidos graxos foi realizada em um cromatógrafo de gás, modelo GC 2010 Plus (Shimadzu, Japão), equipado com injetor SPLIT, coluna capilar SP-2560 (75 m de comprimento x 18 mm e diâmetro 14 µm) e detector de ionização de chama (FID). A temperatura de trabalho do detector e injetor foi de 240 °C e a proporção de divisão foi de 1:50. A temperatura inicial da coluna era de 150 °C, mantida por 5 min, depois aumentada para 180 °C a uma taxa de 2 °C por minuto e mantida em isoterma por 12 min. Finalmente, a temperatura foi elevada para 220 °C a uma taxa de 4 °C por minuto e então mantida em isoterma por 9 min. Uma mistura de 37 ésteres metílicos de ácidos graxos (Supelco, EUA), de C4: 0 a C24: 1, foi usada como padrão. Os ácidos graxos foram identificados de acordo com os tempos de retenção e a quantificação foi feita pela normalização da área (%) (adaptado de SILVA *et al.*, 2019).

#### 4.2.5. Fenólicos Totais e Taninos Condensados

Para preparação do extrato foram pesados 0,5 g de farinha de milho germinado em tubos e realizou-se a suspensão em 25 mL de solução a 1% de HCl em metanol. Os

tubos foram colocados em agitador automático durante 2 horas para a extração. Posteriormente a solução foi centrifugada por 10 minutos a 1008 g. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e armazenado, sob refrigeração, até o momento das análises (AWIKA *et al.*, 2003).

O total de compostos fenólicos nas farinhas foi determinado utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999). Para análise, 500  $\mu$ L de extrato foram adicionados a 500  $\mu$ L de solução de Folin-Ciocalteu 20% e 500  $\mu$ L de solução de carbonato de sódio 7,5%. Em seguida, a solução foi agitada em vórtex e deixada em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente (25°C). A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro (Thermo Scientific, Evolution 606, USA) a 765 nm. A quantificação foi realizada por meio da curva analítica obtida por meio da leitura da absorvância de soluções com diferentes concentrações de ácido gálico. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (mg EqAG/g).

Os taninos condensados foram analisados pelo método de reação vanilina/HCl, segundo Maxsone Rooney (1972) e Price, Van Scoyoc, Butler (1978). Foi pipetado 1 mL do extrato, previamente preparado, em tubos de ensaio e adicionados 2,5 mL de solução de vanilina a 1% em metanol e 2,5 mL de solução de HCl a 8% em metanol. Os tubos foram mantidos em repouso por 20 minutos e as absorbâncias lidas a 500 nm em espectrofotômetro, Multiskan™ GO (Thermo Fisher Scientifics; Waltham, MA, EUA), contra o branco. Fez-se o branco utilizando 1 mL do extrato e 5 mL de HCl a 4% em metanol. Uma curva analítica de catequina foi construída, onde o composto foi diluído em metanol. Alíquotas de 0 mL, 0,2 mL, 0,4 mL, 0,6 mL, 0,8 mL e 1 mL foram retiradas da solução concentrada e o volume foi ajustado para 1 mL em tubos, utilizando metanol. As reações dos padrões foram preparadas da mesma forma que as amostras, sendo as diferentes concentrações de catequina adicionadas por último devido ao tempo de estabilidade da reação que é de 20 minutos. Os resultados foram expressos em miligrama equivalente de catequina por grama de amostra (mg EC/g de amostra).

#### 4.2.6. Atividade Antioxidante

Para a análise de atividade antioxidante da farinha (DPPH) o extrato foi preparado conforme citado anteriormente, porém utilizando solução de acetona 70%.

A atividade antioxidante da farinha de milho germinado foi determinada pela capacidade de sequestro do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), de acordo

com a metodologia descrita por Bloor (2001). Inicialmente fez-se a leitura da absorbância da solução de DPPH (0,1 mM), previamente preparada. Essa absorbância foi anotada para padronizar a solução controle. Foram pipetados 200 µL do extrato, previamente preparado, em tubos e adicionados 1,5mL da solução de DPPH (0,1 mM). Os tubos foram agitados e posteriormente mantidos em repouso por 60 minutos ao abrigo da luz. A solução utilizada para fazer o extrato da farinha foi utilizada como controle. Após repouso conduziu-se a leitura das amostras e do controle em espectrofotômetro Multiskan™ GO (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, EUA) a 517 nm. Os resultados foram expressos em %ARR (atividade de retirada de radical).

### 4.3. Ensaio Biológico

Foram utilizados 30 ratos machos *Wistar (Rattus norvegicus)* recém-desmamados, com 21 dias de idade, obtidos do Biotério Central, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFV.

Os animais foram distribuídos em gaiolas individuais de aço inoxidável (20 cm de largura, 18 cm de altura e 31 cm de comprimento), em ambiente com temperatura controlada,  $21\pm 1^\circ$  C, e ciclo de claro e escuro de 12 horas, controlado automaticamente. Os animais receberam dieta comercial até 40 dias de idade, quando iniciou o experimento.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/ UFV), processo n° 39/2019, em anexo, e todos os procedimentos experimentais com os animais foram realizados em consonância com os princípios éticos na experimentação animal.

### 4.4. Cálculo Amostral

Para calcular o número de repetições estimado utilizou-se o cálculo do “n” amostral para estudos descritivos conforme detalhado por Fontelles *et al.* (2010), por meio da seguinte equação:

$$n = \frac{s^2}{(\bar{x} - \mu)^2} X(z_{\frac{\alpha}{2}})^2$$

Onde:

*n*: número de animais por grupo

*s*<sup>2</sup>: variância dos dados de referência

$\bar{x} - \mu$ : diferença máxima razoável, admitida entre a média obtida da amostra e a verdadeira média da população.

$z_{\frac{\alpha}{2}}$ : Erro alfa do tipo I: Determinado por meio da tabela de valores críticos da distribuição normal gaussiana.

Não foi realizado experimento prévio para cálculo do número de repetições ideal, pois seria necessária a utilização de animais. Portanto, utilizaram-se dados de um estudo que induziu a obesidade nos ratos e o cálculo foi realizado a fim de confirmar o número de animais. A partir de um estudo prévio realizado por MARINELI et al (2015) recebendo dieta hiperlipídica e hiperglicídica em ratos, utilizou-se os valores de ganho de peso dos animais.

Considerou-se  $\alpha=5\%$ , e portanto um  $z_{\frac{\alpha}{2}}=1.96$ , conforme utilizado nos estudos de saúde (FONTELLES et al., 2010). O número de repetições calculado foi 9,42, portanto, considerando-se possíveis perdas, solicitamos 10 animais por grupo. Como trabalhamos com 3 grupos, fez-se necessário 30 animais.

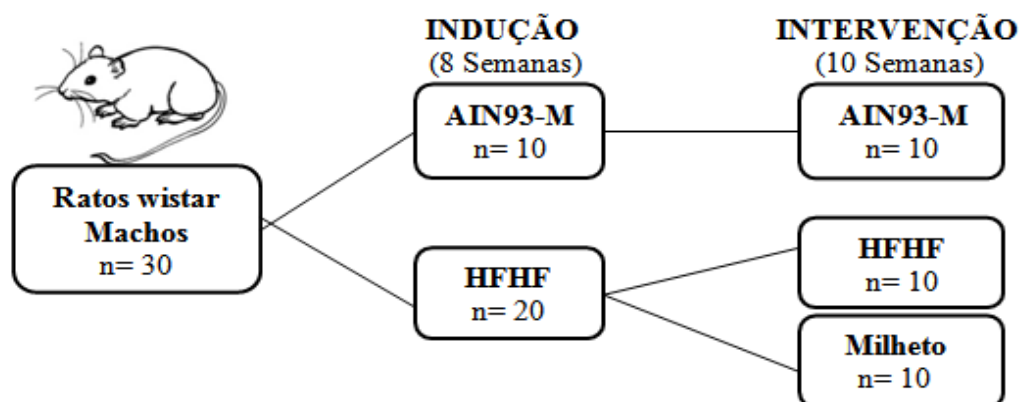
#### **4.5. Delineamento Experimental**

O experimento foi dividido em duas fases. Na primeira os animais foram divididos em dois grupos de acordo com o peso corporal: controle ( $155,98 \pm 17,05g$ ,  $n=10$ ), que recebeu dieta AIN93-M (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993) e HFHF ( $158,03 \pm 17,81g$ ,  $n=20$ ), que recebeu dieta rica em gordura saturada (31%) e frutose (20%) (*high fat high fructose diet*) (SHAPIRO et al., 2011), para indução das alterações metabólicas, por 8 semanas (adaptado de MARINELI et al., 2015). Após esse período os animais foram mantidos em jejum de 12 horas para coleta de sangue por capilaridade para analisar a concentração sérica de glicose e triglicerídeos que foram utilizadas, juntamente com as medidas biométricas, para confirmar o efeito deletério da dieta HFHF sobre esses marcadores.

Na segunda fase, os animais foram redistribuídos conforme o peso corporal e os parâmetros bioquímicos avaliados (glicose e triglicerídeos). O controle (AIN-93M;  $349,94 \pm 30,71g$ ,  $n=10$ ) foi mantido e os outros animais do grupo HFHF foram redistribuídos em dois grupos: controle HFHF ( $366,89 \pm 36,90g$ ,  $n=10$ ), mantendo dieta rica em gordura saturada e frutose, e Milheto ( $370,12 \pm 36,49g$ ,  $n=10$ ), que recebeu dieta HFHF adicionada de farinha de milho germinado, por um período de mais 10

semanas (adaptado de HAMID e HUSSAIN, 2017; MARINELI *et al.*, 2015) (**Figura 1**).

Em todas as etapas os animais receberam água e dieta *ad libitum*, que foram substituídas semanalmente.



**Figura 1.** Desenho experimental. O experimento foi dividido em duas fases. Fase 1: Os animais foram divididos em dois grupos: grupo controle que recebeu dieta padrão para roedores (AIN-93M; n=10); e grupo high fat high fructose (HFHF; n=20) que recebeu dieta AIN-93M rica em gordura saturada (31%) e frutose (20%), por oito semanas. Fase 2: Intervenção: Grupo controle (AIN-93M; n=10), mantendo dieta padrão para roedores e o grupo controle HFHF dividido em dois grupos: HFHF (n=10) e grupo Milheto (HFHF adicionada de farinha de milho germinado substituindo 43,6% de fibra alimentar, 100% de amido, 36% de proteína e 39% de óleo na dieta experimental, n=10), por um período de mais 10 semanas.

#### 4.6. Dietas Experimentais

O preparo da dieta do grupo controle, AIN93-M, seguiu as orientações de Reeves, Nielsen, Fahey (1993), a do grupo HFHF foi adaptada da AIN93-M conforme Marineli *et al.*, (2015) e a de intervenção foi elaborada conforme a HFHF adicionada de farinha de milho germinada, de acordo com a composição química do milho germinado (realizadas segundo metodologias descritas por AOAC (2016), descritas no tópico 4.2).

O grupo HFHF recebeu dieta com conteúdo aumentado de lipídios (34%), sendo 4% de óleo de soja e 31% de banha de porco, além de 20% de frutose (marca Rhoster) (MARINELI *et al.*, 2015; SHAPIRO *et al.*, 2011).

A dieta HFHF adicionada de farinha de milho germinado foi baseada na substituição de 43,6% de fibra alimentar (21,76 g), de acordo com a recomendação para roedores. Para isso utilizamos 286,3 g de farinha na ormulção de 1kg de dieta e essa proporcionou substituição de 100% de amido, 36% de proteína e 39% de óleo (**Tabela 1**).

Todos os ingredientes foram pesados em balança semi-analítica BG2000 (Gehaca, SP, Brasil), misturados manualmente e peneirados em peneiras de plástico para uma melhor homogeneização. Após o preparo, as dietas foram acondicionadas em sacos de polietileno, devidamente rotulados e armazenados em freezer ( $-18^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ).

**Tabela 1.** Composição das dietas experimentais

<b>Ingredientes (g/kg-1)</b>	<b>Dietas Experimentais</b>		
	<b>AIN93-M</b>	<b>HFHF</b>	<b>Milheto</b>
Albumina*	136,6	136,6	87,3
Amido de milho	463,5	135,0	-
Amido dextrinizado	155,0	45,0	-
Sacarose	100,0	28,6	8,6
Banha de porco	-	310,0	310,0
Óleo de soja	40,0	40,0	24,5
Farinha de milho	-	-	286,3
Frutose	-	200,0	200,0
Celulose	55,8	55,8	34,0
Mix mineral	35,0	35,0	35,0
Mix vitamínico	10,0	10,0	10,0
L-cistina	1,8	1,8	1,8
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5
<b>Composição das dietas (%)</b>			
Carboidrato	73,2	42,5	40,3
Proteína	12,0	12,0	12,0
Lipídeo	4,0	35,0	35,0
<b>Densidade calórica (cal/g)</b>	<b>3,78</b>	<b>5,33</b>	<b>5,24</b>

Composição das dietas experimentais baseada na dieta padrão para roedores (AIN-93M) (REEVS et al., 1993). HFHF: dieta rica em gordura saturada e frutose; Milheto:

dieta teste contendo HFHF adicionada de farinha de milho germinado, com substituição de 43,6% de fibra alimentar, 100% de amido 36% de proteína e 39% de óleo (as substituições foram realizadas conforme a composição centesimal da farinha de milho germinada). \*Albumina baseada no teor de 88% de proteína

#### **4.7. Medidas Biométricas e de Consumo Alimentar**

As medidas biométricas e de consumo alimentar dos animais foram obtidas semanalmente durante o período experimental, utilizando balança eletrônica digital (Marte®, Brasil). O coeficiente de eficiência alimentar (CEA) foi determinado pela relação entre o ganho de peso total dos animais (g) e o consumo total de dieta (g), enquanto que o coeficiente de eficiência energética (CEE) foi obtido pela razão entre o ganho de peso corporal final e o consumo total de energia (kcal). O comprimento nasoanal (CNA) e o perímetro abdominal foram aferidos, com fita métrica inelástica, entre a região anal até o nariz do animal e na maior circunferência abdominal, respectivamente. Para o cálculo do índice de Lee utilizou-se a seguinte equação:  $\sqrt{P(g)^3/CNA(cm)} \times 1000$  (REYNÉS *et al.*, 2014).

Para determinar a adiposidade visceral realizou-se o somatório dos tecidos adiposos mesentérico, retroperitoneal e epididimal. A porcentagem de gordura foi obtida por meio do somatório dessas gorduras dividido pelo peso corporal, multiplicado por 100. O índice de adiposidade foi calculado pela relação da porcentagem de gordura e o peso corporal multiplicado por 100 (GOMES NATAL *et al.*, 2016) e o índice hepatossomático foi computado por meio da relação entre o peso do fígado e o peso corporal multiplicado por 100 (KIM, JI HYE *et al.*, 2016).

#### **4.8. Avaliação da Tolerância Intraperitoneal de Glicose e Insulina**

O teste de tolerância intraperitoneal a glicose (iGTT) foi executado na 9ª semana do experimento, quando os animais foram mantidos em jejum de 12 h e o sangue foi coletado pela cauda, utilizando glicosímetro (ACCU-CHEK® Active), para aferir a glicemia basal. Posteriormente foi administrada solução de 50% de D-glicose (2 g/kg) na cavidade intraperitoneal e novas coletas de sangue foram feitas nos tempos basal (tempo 0), 30, 60, 90 e 120 minutos. Calculou-se a área sob a curva (AUC).

Na 10ª semana da fase 2 realizou-se o teste de tolerância intraperitoneal a insulina (ITT). Após jejum de 12 h mensurou-se a glicemia basal e em seguida injetou-se insulina humana regular, na proporção de 0,75 U/kg e a glicemia foi novamente

aferida nos tempos basal (tempo 0) e nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos. Foi calculada a média da constante do decaimento da glicemia (kITT) utilizando a fórmula:  $[0,693/(t_{1/2})]$ , sendo  $t_{1/2}$ , o tempo necessário para reduzir a glicemia basal pela metade. O  $t_{1/2}$  da glicose foi determinado a partir da inclinação da curva do decaimento da glicose durante a fase linear.

#### **4.9. Eutanásia e coleta de tecidos**

Após a 10<sup>a</sup> semana da fase 2 os animais foram anestesiados com isoflurano (Isoforine, Cristália®) e eutanasiados por punção cardíaca. Coletou-se o sangue em tubos: anticoagulante EDTA para análises hematológicas, anticoagulante heparina (plasma) para análises bioquímicas e tubo com gel separador contendo ativador de coágulo (soro). Os tubos foram centrifugados a 1008 g por 15 minutos a 4 °C para separação do plasma e soro.

O fígado foi coletado, lavado em solução salina (PBS) e pesado, sendo uma parte do tecido fixado em formaldeído a 10% e mantido à temperatura ambiente para posterior análise histológica e o restante armazenado a -80°C até o momento das análises. Foram coletados ainda os tecidos adiposos, mesentérico, retroperitoneal, epididimal e marrom. Estes foram armazenados a -80°C até o momento das análises.

#### **4.10. Análises Após Eutanásia**

##### **4.10.1. Análises Bioquímicas**

As concentrações plasmáticas de AST, ALT e ácido úrico foram avaliadas por métodos colorimétricos, de acordo com as instruções do fabricante (Bioclin®). Além disso, foi analisado o hemograma completo, incluindo leucócitos totais, neutrófilos, linfócitos e plaquetas. A razão plaqueta/linfócito (RPL) e a razão neutrófilo/linfócito (RNL) foram calculadas como as relações entre o número de plaquetas e o de linfócitos e entre o número de neutrófilos e o de linfócitos, respectivamente.

As concentrações séricas de glicose e triglicerídeos foram mensuradas no final do período de indução das alterações metabólicas (final da oitava semana), quando os animais foram mantidos em jejum de 12 horas. A coleta do sangue foi feita por capilaridade e por meio de tiras específicas, utilizando os aparelhos ACCU-CHEK Active e ACCUTREND GCT, ambos da marca Roche®, para obtenção dos valores de glicemia e triglicerídeos, respectivamente. Após a décima semana de intervenção, antes da eutanásia, repetiu-se esta coleta.

O índice TyG foi obtido pelo produto entre a glicemia de jejum (Fase II) e a trigliceridemia, utilizando a fórmula:  $TyG = \text{Ln} [\text{Triglicerídeos de jejum (mg / dL)} \times \text{Glicemia de jejum (mg / dL)} / 2]$ . Onde Ln é o logaritmo natural (Neperiano) (SIMENTAL-MENDÍA; RODRÍGUEZ-MORÁN; GUERRERO-ROMERO, 2008).

#### 4.10.2. Análises Hormonais no Plasma

Os hormônios corticosterona, tri-iodotironina (T3) e tiroxina (T4) foram realizadas no laboratório de fisiologia endócrina (LFE) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Os hormônios séricos foram determinados por Kits comerciais de radioimunoensaio (RIA) de acordo com as instruções do fabricante (MP Biomedicals, LLC, NY, EUA). Os níveis plasmáticos de cada hormônio foram analisados em duplicata e em um único teste com detecção entre 50 e 1000 ng/mL para corticosterona, 0,69 e 15,7 pg/mL para T3 livre e 0,3 e 11 ng/dL para T4 livre.

#### 4.10.3. Quantificação de Phospho-AKT1[pS473]

Foram pesados cerca de 200 mg de tecido em microtubos de 2 mL, o conteúdo foi macerado com pistilo e em seguida acrescidos 1 mL de tampão fosfato 50mM com 1mM de EDTA, pH 7,4, resultando em homogeneizados a 10% (p/v). Estes foram centrifugados a 10.000 g por 10 min a 4 °C e o sobrenadante resultante foi armazenado a -80 °C até o momento das análises.

A quantificação de Phospho-AKT1[pS473] foi avaliada por imunoensaio, utilizando o KIT AKT (Phospho) [pS473] Human ELISA Kit (Thermo Scientific), de acordo com as instruções do fabricante (Sigma Aldrich®). A absorbância foi lida a 450 nm em espectrofotômetro Multiskan™ GO (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, EUA). A concentração da proteína foi calculada por meio da curva padrão correspondente, em que: dosagem de AKT =  $0,1217 \cdot \text{abs} + 0,2189$ .

#### 4.10.4. Expressão de genes relacionados à via de resistência à insulina no fígado

O tecido hepático (100 mg) foi macerado utilizando gral e pistilo, sob nitrogênio líquido. Adicionou-se 1 mL de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e o homogeneizado foi transferido para um microtubo de 1,5 mL, à temperatura ambiente, sob agitação, por 5 minutos. Em seguida foram adicionados 200 µL de clorofórmio e agitado vigorosamente. Após centrifugação a 12000 g por 15 minutos a 4° C, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde foram adicionados 500 µL de

isopropanol e, em seguida, agitado por inversão. A mistura foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente e em seguida centrifugada a 12000 g por 10 minutos a 4° C, o sobrenadante foi removido por inversão, permanecendo no microtubo apenas o pellet de mRNA. Sobre o pellet, foi adicionado 1 mL de etanol 75% e a mistura foi centrifugada a 7500g por 5 minutos a 4° C. Posteriormente, o sobrenadante foi removido por inversão, e o pellet deixado à temperatura ambiente por aproximadamente 40 minutos para secar. Após a secagem, o pellet foi ressuspensão em 50 µL de água DEPC (água miliq tratada com 0,01% de dietilpirocarbonato (Invitrogen Brasil Ltda) autoclavada a 121° C/30 min) e em seguida, armazenado a -80° C.

O mRNA foi quantificado em espectrofotômetro Multiskan™ GO (Thermo Fisher Scientific®; Waltham, MA, EUA) e o grau de pureza determinado pela razão de absorvância 260/280 nm. Após a quantificação, as amostras de mRNA foram tratadas com DNase (DNase I Ampli; Promega), utilizando-se o protocolo do fabricante: 7 µL da amostra (contendo 2 µg de RNA) foram transferidos para um tubo novo e tratados com 1 µL de tampão DNase (Buffer – RQ1 DNase) mais 2 µL de DNase (Promega) para um volume final de 10 µL. A mistura foi incubada a 37° C por 30 minutos e a reação interrompida por meio da adição de 1 µL de RQ1 DNase Stop Solution e incubados a 65° C por 10 minutos, para inativação da DNase.

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir do mRNA tratado utilizando-se um Kit de transcrição reversa (MMLV Reverse Transcriptase, Invitrogen® Brasil Ltda.). Foram adicionados 2µL de um MIX 1 (1 µL de oligodT 100 µM + 1 µL de dNTPs 10 µM diluídos) em cada amostra com RNA tratado com DNase e em seguida, foram incubadas por 5 min a 65° C. A mistura foi colocada no gelo e acrescentados 7 µL de um MIX 2 (4 µL tampão 5x FF, 2µL de DTT 0,1M e 1 µL de RNase Out). Foram acrescentados em cada reação 1 µL de MMLV Reverse transcriptase (200 U/µL) e a mistura foi incubada em banho-maria a 37° C / 1 hora. Em seguida colocou-se o cDNA a 70° C por 10 minutos.

A expressão dos níveis de mRNA foi realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR), sendo a reação constituída por 1 µL de cDNA (1:3), 5 µL de Fast SYBER Green Master Mix da Applied Biosystems (Foster City, CA) e oligonucleotídeos a uma concentração final de 1 µM, em um volume de reação final de 10 µL. A quantificação foi realizada no equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System, utilizando o sistema de quantificação por fluorescência SYBR-Green e Primer Express software (Applied Biosystems, Foster

City, CA). As condições da PCR foram as seguintes: 95° C por 20 segundos, 40 ciclos de 95°C por 3 segundos e 60° C por 30 segundos, seguidos da curva de dissociação. Foram utilizadas sequências de oligonucleotídeos (Sigma-Aldrich Brasil Ltda) senso e anti-senso envolvidos na via de resistência à insulina (**Tabela 2**). Todos os oligonucleotídeos para ratos foram desenhados no programa Primer 3 Plus e obtidos da Sigma Aldrich Brasil Ltda.

A expressão relativa dos níveis de mRNA foram normalizadas pelo controle endógeno GAPDH (gliceraldeído-3- fosfato desidrogenase).

**Tabela 2.** Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para RT-qPCR

Gene	Senso (5' - 3')	Antisenso (5' - 3')
<b>AKT</b>	GGG CCA CGG ATA CCA TGA AC	AGC TGA CAT TGT GCC ACT GA
<b>PFK</b>	CCACCTGGAGGCCATTGTAGA	GGGATGACGCACATGACGA
<b>AMPK</b>	TGA AGC CAG AGA ACG TGT TG	ATA ATT TGG CGA TCC ACA GC
<b>GAPDH</b>	AGG TTG TCT CCT GTC ACT TC	CTG TTG CTG TAG CCA TAT TC

Proteína quinase B (AKT), fosfofrutoquinase (PFK), proteína quinase ativada (AMPK) e gliceraldeído-3- fosfato desidrogenase (GAPDH).

#### 4.10.5. Análise de Potencial antioxidante

O homogeneizado hepático foi utilizado para análises de atividade de enzimas antioxidantes. Foram pesado cerca de 200 mg de tecido em microtubos de 2 mL, o conteúdo foi macerado com pistilo e em seguida acrescido de 1 mL de tampão fosfato 50 mM com 1 mM de EDTA (pH 7,4) e a amostra centrifugada a 10.000 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado, e armazenado em ultra-freezer (-80 °C) até o momento da análise. As proteínas totais foram quantificadas no homogeneizado do fígado de acordo com o método de Bradford (1976).

O malondialdeído (MDA) foi mensurado pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acordo com a metodologia descrita por Buege e Aust, (1978). Foram adicionados em 400 µL de homogeneizado do fígado, 400 µL de solução de TBARS (ácido tricloroacético 15%, ácido tiobarbitúrico 0,075% e HCl 0,25 M). As misturas foram agitadas em vórtex e incubadas em banho-maria por 40 minutos a 90° C, com posterior acréscimo de 600 µL de n-butanol. Os tubos foram agitados por 2 min e centrifugados a 3500 rpm por 5 min. O sobrenadante foi coletado e transferido para placa de ELISA onde determinou-se a absorbância em 535 nm em espectrofotômetro

Multiskan™ GO (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, EUA). Os valores finais foram calculados por meio do coeficiente de absorvidade molar ( $1,56 \times 10^5$ ). O branco foi feito adicionando todos os reagentes do procedimento, exceto a amostra, que foi substituída por 400  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato. Os resultados foram expressos em nmol de MDA por miligramas de proteína (nmol MDA/mg PTN)

A superóxido dismutase (SOD) foi determinada por meio da metodologia descrita por Marklund (1985). Há geração de ânions superóxido durante a oxidação do pirogalol, porém a enzima SOD inibe sua oxidação (MARKLUND, 1985). Para cada reação foram pipetados, em placas de ELISA, 30  $\mu\text{L}$  de homogeneizado do fígado, 30  $\mu\text{L}$  de pirogalol (120 mM), 12  $\mu\text{L}$  de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2H]-2,5-difeniltetrazolio a 6,25mM) e 128  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-HCL com EDTA (pH 7,4). Preparou-se o branco a partir da combinação de 12  $\mu\text{L}$  de MTT e 188  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-HCL com EDTA (pH 7,4) e o padrão com 30  $\mu\text{L}$  de pirogalol, 12 de MTT e 158 de tampão Tris-HCL com EDTA (pH 7,4). A mistura foi incubada a 37° C por 5 minutos e a absorbância lida a 570 nm em espectrofotômetro Multiskan™ GO (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, EUA). A unidade de atividade enzimática da SOD foi expressa como U de SOD/ mg de proteína e foi definida como a quantidade necessária de enzima para inibição de 50% da auto-oxidação do pirogalol sob condições de teste.

A atividade da enzima catalase (CAT) foi determinada baseando-se na sua capacidade em clivar o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) em água e oxigênio molecular, de acordo com a descrição feita por Aebi (1984). Em uma cubeta semi-micro de quartzo (1,5 mL) foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  do homogeneizado de fígado diluído (1:5) e 1 mL de tampão fosfato 100 mM (pH 7,4) adicionado de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (25 mL de tampão fosfato 100 mM, pH 7,4, para 40  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%). Para o branco, foram utilizados 10  $\mu\text{L}$  de amostra (1:5) adicionada de 1 mL de tampão fosfato 100 mM (pH 7,4). As absorbâncias foram determinadas no tempo 0, 30, 60 segundos a 240 nm em espectrofotômetro (Modelo T70 + UV / VIS - PG Instruments Ltd) e todas as reações foram realizadas em duplicata. Uma unidade (U) de catalase corresponde à hidrólise de 1 mol de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\epsilon=39,4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) por minuto. Para o cálculo da CAT foi utilizada o delta obtido da absorbância inicial (tempo 0) menos a absorbância final (60 segundos) em espectrofotômetro e o resultado obtido foi multiplicado pela constante 2,361. Os dados foram expressos em  $\mu\text{Mol}/\text{min}/\text{ml}$ .

#### 4.10.6. Determinação da Capacidade Antioxidante Total (TAC)

A TAC do homogeneizado do fígado e do plasma foram determinadas por meio do *kit* comercial *antioxidant assay kit* (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA) de acordo com as especificações do fabricante. Na placa de Elisa foram pipetados 10 µL de cada amostra, 20 µL de solução contendo mioglobina e 150 µL da solução de ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolína)-6-sulfônico (ABTS). A placa foi incubada a temperatura ambiente e protegida da luz por 5 minutos. Posteriormente adicionou-se 100 µL da solução de parada em cada poço e em seguida a absorvância foi lida a 450 nm em espectrofotômetro Multiskan™ GO (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, EUA). Para o cálculo utilizou-se a equação da reta obtida pela construção da curva padrão com concentrações crescentes de trolox e os valores foram expressos em mM de equivalente de trolox.

#### 4.10.7. Citocinas

A concentração de IL-10 e TNF foram quantificadas no homogeneizado do fígado dos animais por meio de kits de Elisa. O TNF foi mensurado utilizando o *kit Rat TNF alpha Uncoated ELISA* (Invitrogen, Austria), seguindo as recomendações do fabricante. Para a análise, 100 µL do anticorpo de captura específico para TNF foi pipetado em uma placa de 96-poços, que foi selada para incubação *overnight* à 4 °C. Após incubação, os poços foram lavados 3 vezes com 250 µL de tampão de lavagem (PBS 1X) e secos com papel absorvente para eliminar qualquer tampão residual. Posteriormente adicionou-se 100 µL do homogeneizado do fígado a todos os poços destinados às amostras e os padrões foram pipetados em diluição seriada. Em seguida, acrescentou-se 100 µL do anticorpo de detecção, sendo a placa incubada por 2 horas. Após esse período os poços foram aspirados e lavados 3 vezes com PBS 1X. Posteriormente foram adicionados 100 µL da enzima peroxidase conjugada com avidina em cada poço e a placa incubada por 30 minutos. Os poços foram lavados cinco vezes com PBS 1X e 100 µL de substrato enzimático TMB foram adicionados à placa, sendo esta incubada por 15 minutos sob abrigo de luz. Após esse período foi adicionado o mesmo volume de solução de parada (1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) e a leitura foi realizada no espectrofotômetro Multiskan™ GO (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, EUA) a 450 nm. A quantidade de TNF foi calculada após interpolação dos valores obtidos por meio de uma curva padrão.

Para o IL-10 foi utilizado o kit *Rat IL-10(Interleukin 10)* ELISA (Elabscience, USA). Foram pipetados 100  $\mu$ L do homogeneizado do fígado em uma placa de 96-poços previamente tratada com anticorpos de captura específicos de ratos. Essa placa foi selada e incubada à 37 °C por 90 minutos. Posteriormente, removeu-se o líquido dos poços e foram adicionados 100  $\mu$ L de uma solução contendo anticorpos de detecção e a placa foi incubada à 37 °C por 1 hora. Após esse período os poços foram aspirados e lavados por três vezes com a solução de lavagem e 100  $\mu$ L da enzima peroxidase conjugada com avidina foram adicionadas, mantendo incubado por 30 minutos à 37 °C. Posteriormente lavou-se a placa por cinco vezes com a solução de lavagem e 90  $\mu$ L de substrato enzimático TMB foram adicionados e incubados por 15 minutos a 37 °C. Adicionou-se 50  $\mu$ L de solução de parada e realizou-se a leitura à 450 nm em espectrofotômetro Multiskan™ GO (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, EUA). A concentração de IL-10 foi calculada por meio de curva padrão.

#### 4.10.8. Quantificação do Fator Nuclear Kappa B p65 e Receptor Alfa Ativado por Proliferador de Peroxissoma

O Fator nuclear kappa B p65 (NF-kB-p65) e o receptor ativado por proliferador de peroxissoma tipo alfa (PPAR- $\alpha$ ) foram quantificados na fração nuclear do fígado que foi extraída por meio do kit NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Scientific). Para quantificar o NF-kB-p65 foi utilizado o *kit Rat NF-kB-p65(Nuclear Factor Kappa B p65)* ELISA (Elabscience, USA) e para o PPAR- $\alpha$  utilizou-se o kit Rat PPAR- $\alpha$  (Peroxisome Proliferator Activated Receptor Alpha) ELISA (Elabscience, USA), seguindo as recomendações dos fabricantes. Foram pipetados 100  $\mu$ L do homogeneizado do fígado (fração nuclear) em uma placa de 96-poços previamente tratada com anticorpos de captura específicos de ratos. Essa placa foi selada e incubada à 37 °C por 90 minutos. Posteriormente, removeu-se o líquido dos poços e foram adicionados 100  $\mu$ L de uma solução contendo anticorpos de detecção e a placa foi incubada à 37 °C por 1 hora. Após esse período os poços foram aspirados e lavados por três vezes com a solução de lavagem e 100  $\mu$ L da enzima peroxidase conjugada com avidina foram adicionadas, mantendo incubado por 30 minutos à 37 °C. Posteriormente lavou-se a placa por cinco vezes com a solução de lavagem e 90  $\mu$ L de substrato enzimático TMB foram adicionados e incubados por 15 minutos a 37 °C. Adicionou-se 50  $\mu$ L de solução de parada e realizou-se a leitura à 450 nm em

espectrofotômetro Multiskan™ GO (Thermo Fisher Scientifics; Waltham, MA, EUA). As concentrações dessas proteínas foram calculadas por meio de curva padrão.

#### 4.10.9. Análises histomorfométricas do fígado

Para a microtomia foi utilizado um micrótomo rotativo automático (Leica ®M2255) e navalhas de vidro (Leica). Foram obtidos cortes semi seriados de 3 µm de espessura, respeitando-se a distância de 12 cortes entre eles. O tricrômico de gomori foi usado nas análises histomorfométricas. As lâminas foram fotografadas em microscópio de campo claro (Olympus AX 70 TRF, Tokyo, Japan) e utilizadas para contagem de infiltrado inflamatório e vesículas lipídicas. Utilizou-se também a coloração de picrosirius para análise do colágeno tipo I, III e total. As lâminas foram fotografadas em microscópio de luz (Fotomicroscópio monocromático Olympus BX53) com um filtro polarizador acoplado a um analisador de imagem. Foram selecionados 10 campos do fígado para cada animal. As análises foram feitas no *software* Image J® 1.48v (National Institute of Health, USA) em um campo histológico com retículo de 266 pontos sobre as imagens até atingir o somatório de 1064 pontos por animal em um aumento de 20x (CUPERTINO *et al.*, 2013). O grau de esteatose foi avaliado semiquantitativamente de acordo com uma escala de 5 graus: grau 0, se o percentual de gordura foi ausente ou menor que 5%; Grau 1, se  $\geq 5\%$  e  $<25\%$ ; Grau 2, se  $\geq 25\%$  e  $<50\%$ ; Grau 3, se  $\geq 50\%$  e  $<75\%$ ; e grau 4, se  $\geq 75\%$  (TURLIN *et al.*, 2001).

#### 4.11. Análises Estatísticas

Os dados foram expressos em médias  $\pm$  desvio padrão. Os resultados do ensaio biológico foram submetidos aos testes de normalidade de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. Foi aplicada análise de variância *one-way* ANOVA, seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls para as variáveis paramétricas e Kruskal-Wallis seguido de *post-hoc* de Dunn's para as variáveis não-paramétricas. A área abaixo da curva (AUC), de insulina e glicemia, foi calculada utilizando a regra trapezoidal. O nível de significância estabelecido para todos os testes foi de 5%. Todas as análises do ensaio biológico foram realizadas no software *GraphPad Prism* (GraphPad Software, San Diego, CA), versão 6.0.

## 5. REFERÊNCIAS

- AEBI, Hugo. Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology*, v. 105, n. C, p. 121–126, 1 jan. 1984.
- AL-AMIN, Abul Quasem; AHMED, Ferdous. Food Security Challenge of Climate Change: An Analysis for Policy Selection. *Futures*, 2016.
- ALEXANDRATOS, N.; BRUINSMA, J. World agriculture towards 2030/2050. *Land Use Policy*, 2012.
- ANNOR, George Amponsah *et al.* Effects of the amount and type of fatty acids present in millets on their in vitro starch digestibility and expected glycemic index (eGI). *Journal of Cereal Science*, v. 64, p. 76–81, 2015.
- ANNOR, George Amponsah *et al.* Why do millets have slower starch and protein digestibility than other cereals? *Trends in Food Science and Technology*, v. 66, p. 73–83, 2017.
- AOAC. *Official Methods of Analysis of AOAC International - 20th Edition, 2016. 20th ed. Gaithersburg: AOAC. [S.l: s.n.].* , 2016
- ARMUTCU, Ferah *et al.* Thymosin alpha 1 attenuates lipid peroxidation and improves fructose-induced steatohepatitis in rats. *Clinical Biochemistry*, v. 38, n. 6, p. 540–547, 1 jun. 2005.
- ARORA, Sonia; JOOD, Sudesh; KHETARPAUL, N. Effect of germination and probiotic fermentation on nutrient profile of pearl millet based food blends. *British Food Journal*, 2011.
- AUBERVAL, Nathalie *et al.* Metabolic and oxidative stress markers in Wistar rats after 2 months on a high-fat diet. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, v. 6, n. 1, p. 130, 28 nov. 2014.
- AWIKA, Joseph M. *et al.* Screening Methods to Measure Antioxidant Activity of Sorghum (*Sorghum bicolor*) and Sorghum Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n. 23, p. 6657–6662, 6 nov. 2003.
- BAFFY, György. *Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: The emerging view. Journal of Hepatology. [S.l.]: Elsevier. , 1 jul. 2009*
- BALAKUMAR, M. *et al.* High-fructose diet is as detrimental as high-fat diet in the induction of insulin resistance and diabetes mediated by hepatic/pancreatic endoplasmic reticulum (ER) stress. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 423, n. 1–2, p. 93–104, 2016.
- BARBOSA, Kiriaque Barra Ferreira *et al.* *Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. Revista de Nutricao. [S.l: s.n.]. , jul. 2010*
- BASU, Sanjay *et al.* The Relationship of Sugar to Population-Level Diabetes Prevalence: An Econometric Analysis of Repeated Cross-Sectional Data. *PLoS ONE*, v. 8, n. 2, p. e57873, 27 fev. 2013.
- BENINCASA, Paolo *et al.* Sprouted grains: A comprehensive review. *Nutrients*, v. 11, n. 2, 1 fev. 2019.

BERNARDES, Nathalia *et al.* Excessive consumption of fructose causes cardiometabolic dysfunctions through oxidative stress and inflammation. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. [S.l.]: Canadian Science Publishing. , out. 2017

BHATTACHARYA, Indranil *et al.* Hypoxia potentiates tumor necrosis factor- $\alpha$  induced expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in white and brown adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015.

BIZEAU, Michael E.; PAGLIASSOTTI, Michael J. Hepatic adaptations to sucrose and fructose. *Metabolism*, v. 54, n. 9, p. 1189–1201, 1 set. 2005.

BLOOR, S. J. Overview of methods for analysis and identification of flavonoids. *Methods in Enzymology*, v. 335, p. 3–14, 2001.

BONCOMPAGNI, Eleonora *et al.* Antinutritional factors in pearl millet grains: Phytate and goitrogens content variability and molecular characterization of genes involved in their pathways. *PLoS ONE*, v. 13, n. 6, p. 1–30, 2018.

BORGES SILVA, Douglas DA *et al.* CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS DA FRUTOSE NA DIETA DE PACIENTES DIABÉTICOS CHARACTERIZATION OF THE EFFECTS OF FRUCTOSE IN DIABETIC PATIENTS DIET. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research-BJSCR*, v. 20, n. 2, p. 140–145, 2017.

BOUIS, Howarth E. *et al.* Biofortification: A new tool to reduce micronutrient malnutrition. *Food and Nutrition Bulletin*, v. 32, n. 1 SUPPL., mar. 2011.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.

BROETTO, Francine Naiara; BRITO, Maria do Nascimento. Tecido Adiposo Marrom e Obesidade em Humanos. *Saúde e Pesquisa*, v. 5, n. 1, 2012.

CAO, Hui; CHEN, Xiaoqing. Structures Required of Flavonoids for Inhibiting Digestive Enzymes. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2012.

CHANDRASEKARA, Anoma; SHAHIDI, Fereidoon. Bioaccessibility and antioxidant potential of millet grain phenolics as affected by simulated in vitro digestion and microbial fermentation. *Journal of Functional Foods*, v. 4, n. 1, p. 226–237, 2012a.

CHANDRASEKARA, Anoma; SHAHIDI, Fereidoon. Bioaccessibility and antioxidant potential of millet grain phenolics as affected by simulated in vitro digestion and microbial fermentation. *Journal of Functional Foods*, v. 4, n. 1, p. 226–237, 1 jan. 2012b.

CHANDRASEKARA, Anoma; SHAHIDI, Fereidoon. Bioactivities and antiradical properties of millet grains and hulls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011.

CHANDRASEKARA, Anoma; SHAHIDI, Fereidoon. Content of insoluble bound phenolics in millets and their contribution to antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010.

CORNU, Marion; ALBERT, Verena; HALL, Michael N. *MTOR in aging, metabolism,*

and cancer. *Current Opinion in Genetics and Development*. [S.l: s.n.], 2013

CRESCENZO, Raffaella *et al.* Fructose supplementation worsens the deleterious effects of short-term high-fat feeding on hepatic steatosis and lipid metabolism in adult rats. *Experimental Physiology*, v. 99, n. 9, p. 1203–1213, 1 set. 2014.

CUPERTINO, Marli C. *et al.* Long-lasting morphofunctional remodelling of liver parenchyma and stroma after a single exposure to low and moderate doses of cadmium in rats. *International Journal of Experimental Pathology*, v. 94, n. 5, p. 343–351, out. 2013.

DANDONA, Paresh *et al.* Macronutrient intake induces oxidative and inflammatory stress: Potential relevance to atherosclerosis and insulin resistance. *Experimental and Molecular Medicine*. [S.l: s.n.], 2010

DEKKER, Mark J *et al.* Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v. 299, n. 5, p. E685–E694, 2010.

DEVI, Palanisamy Bruntha *et al.* Health benefits of finger millet (*Eleusine coracana L.*) polyphenols and dietary fiber: A review. *Journal of Food Science and Technology*. [S.l: s.n.], 2014

DIAS-MARTINS, Amanda M. *et al.* Potential use of pearl millet (*Pennisetum glaucum L.*) R. Br.) in Brazil: Food security, processing, health benefits and nutritional products. *Food Research International*, v. 109, n. December 2017, p. 175–186, 2018.

DIOVANELLA, Scharlise. *Teor de biocompostos em germinados de linhaça (Linum usitatissimum L.) e painço (Panicum miliaceum L.)*. 2014. Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2014.

DIRETRIZES BRASILEIRAS DE OBESIDADE/ABESO. *Diretrizes brasileiras de obesidade 2016/ABESO*. [S.l: s.n.], 2016.

ELLIOTT, Sharon S. *et al.* Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 76, n. 5, p. 911–922, 2002.

ELNOUR, A. *et al.* The goitrogenic effect of two Sudanese pearl millet cultivars in rats. *Nutrition Research*, 1997.

ENES, Bárbara Nery *et al.* Effect of different fractions of chia (*Salvia hispanica L.*) on glucose metabolism, in vivo and in vitro. *Journal of Functional Foods*, v. 71, p. 104026, 1 ago. 2020.

ERIKSSON, Jan W. Metabolic stress in insulin's target cells leads to ROS accumulation - A hypothetical common pathway causing insulin resistance. *FEBS Letters*, v. 581, n. 19, p. 3734–3742, 31 jul. 2007.

FAEH, David *et al.* Effect of fructose overfeeding and fish oil administration on hepatic de novo lipogenesis and insulin sensitivity in healthy men. *Diabetes*, v. 54, n. 7, p. 1907–13, 1 jul. 2005.

FAOSTAT. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 7 maio 2020.

- FEILLET-COUDRAY, Christine *et al.* Long-Term Measures of Dyslipidemia, Inflammation, and Oxidative Stress in Rats Fed a High-Fat/High-Fructose Diet. *Lipids*, 2019.
- FERRAMOSCA, Alessandra *et al.* Differential effects of high-carbohydrate and high-fat diets on hepatic lipogenesis in rats. *European Journal of Nutrition*, v. 53, n. 4, p. 1103–1114, 2013.
- FERREIRA, Andrea C F *et al.* Inhibition of thyroid peroxidase by Myrcia uniflora flavonoids. *Chemical Research in Toxicology*, v. 19, n. 3, p. 351–355, mar. 2006.
- FESKENS, E J *et al.* Dietary factors determining diabetes and impaired glucose tolerance. A 20-year follow-up of the Finnish and Dutch cohorts of the Seven Countries Study. *Diabetes care*, v. 18, n. 8, p. 1104–12, 1 ago. 1995.
- FONTELLES, Mauro José *et al.* Metodologia Da Pesquisa: Diretrizes Para O Cálculo Do Tamanho Da Amostra. *Revista Paraense de Medicina*, v. 24, n. 2, p. 57–64, 2010.
- FRANCISQUETI, Fabiane Valentini *et al.* *The role of oxidative stress on the pathophysiology of metabolic syndrome*. *Revista da Associação Médica Brasileira*. [S.l.: s.n.], 2017
- GAINO, Natalia Moreno; SILVA, Marina Vieira Da. Consumo de frutose e impacto na saúde humana. *Segurança Alimentar e Nutricional*, v. 18, n. 2, p. 88, 10 fev. 2015.
- GAITAN, Eduardo *et al.* Antithyroid and goitrogenic effects of millet: Role of C-Glycosylflavones. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 68, n. 4, p. 707–714, 1989.
- GAN, Ren You *et al.* *Bioactive compounds and bioactivities of germinated edible seeds and sprouts: An updated review*. *Trends in Food Science and Technology*. [S.l.: Elsevier Ltd.], 1 jan. 2017
- GEBEL, Thomas; ARAND, Michael; OESCH, Franz. Induction of the peroxisome proliferator activated receptor by fenofibrate in rat liver. *FEBS Letters*, v. 309, n. 1, p. 37–40, 31 ago. 1992.
- GIRIŞ, Murat *et al.* Effect of betaine treatment on the regression of existing hepatic triglyceride accumulation and oxidative stress in rats fed on high fructose diet. *General Physiology and Biophysics*, 2018.
- GOMES NATAL, Dorina Isabel *et al.* Ubá mango juices intake decreases adiposity and inflammation in high-fat diet-induced obese Wistar rats. *Nutrition*, v. 32, n. 9, p. 1011–1018, 1 set. 2016.
- GRGIĆ, Josipa *et al.* Role of the Encapsulation in Bioavailability of Phenolic Compounds. *Antioxidants*, v. 9, n. 10, p. 923, 26 set. 2020.
- GULICK, T *et al.* The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 91, n. 23, p. 11012–6, 8 nov. 1994.
- GUPTA, Raj Kishor; GANGOLIYA, Shivraj Singh; SINGH, Nand Kumar. *Reduction*

of phytic acid and enhancement of bioavailable micronutrients in food grains. *Journal of Food Science and Technology*. [S.l: s.n.], , 2013

HAMID, A; HUSSAIN, J. *HYPOGLYCEMIC EFFECT OF DIETARY FIBER FEEDS MADE FROM DIFFERENT VARIETIES OF MILLET ON STREPTOZOTOCIN INDUCED DIABETIC RATS*. *Pakistan Journal of Science*. [S.l: s.n.], 2017.

HAN, Lu *et al*. *PPARs: Regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part I: PPAR- $\alpha$* . *Future Cardiology*. [S.l.]: Future Medicine Ltd. , 1 maio 2017

HAUB, Synia *et al*. Serotonin reuptake transporter (SERT) plays a critical role in the onset of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 298, n. 3, p. G335–G344, mar. 2010.

HEJAZI, Sara Najdi; ORSAT, Valérie. Malting process optimization for protein digestibility enhancement in finger millet grain. *Journal of Food Science and Technology*, 2016.

HILL, J O *et al*. Development of dietary obesity in rats: influence of amount and composition of dietary fat. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*, v. 16, n. 5, p. 321–33, maio 1992.

HUDGINS, Lisa C. *et al*. Relationship between carbohydrate-induced hypertriglyceridemia and fatty acid synthesis in lean and obese subjects. *Journal of Lipid Research*, v. 41, n. 4, p. 595–604, 1 abr. 2000.

JAHN, Daniel *et al*. *Animal models of NAFLD from a hepatologist's point of view*. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. [S.l.]: Elsevier B.V. , 1 maio 2019

JEGATHEESAN, Prasanthi; DE BANDT, Jean Pascal. *Fructose and NAFLD: The multifaceted aspects of fructose metabolism*. *Nutrients*. [S.l: s.n.], , 2017

JENSEN, Thomas *et al*. *Fructose and sugar: A major mediator of non-alcoholic fatty liver disease*. . [S.l: s.n.], 2018a.

JENSEN, Thomas *et al*. *Fructose and sugar: A major mediator of non-alcoholic fatty liver disease*. *Journal of Hepatology*. [S.l.]: Elsevier B.V. , 1 maio 2018b

KALRA, Arjun; TUMA, Faiz. *Physiology, Liver*. [S.l: s.n.], 2018.

KHANAL, Aditya R.; MISHRA, Ashok K. *Enhancing food security: Food crop portfolio choice in response to climatic risk in India*. *Global Food Security*. [S.l: s.n.], , 2017

KIM, Bong Joon *et al*. The combined impact of neutrophil-to-lymphocyte ratio and type 2 diabetic mellitus on significant coronary artery disease and carotid artery atherosclerosis. *Journal of Cardiovascular Ultrasound*, v. 24, n. 2, p. 115–122, 1 jun. 2016.

KIM, Ji Hye *et al*. Anti-obesity effect of extract from fermented *Curcuma longa* L. through regulation of adipogenesis and lipolysis pathway in high-fat diet-induced obese

rats. *Food and Nutrition Research*, v. 60, 27 jan. 2016.

KIM, Ju Sung; HYUN, Tae Kyung; KIM, Myong Jo. The inhibitory effects of ethanol extracts from sorghum, foxtail millet and proso millet on  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase activities. *Food Chemistry*, 2011.

KIM, Su Jeong *et al.* Dietary fat intake and age modulate the composition of the gut microbiota and colonic inflammation in C57BL/6J mice. *BMC Microbiology*, v. 19, n. 1, p. 1–11, 20 ago. 2019.

KLOPFENSTEIN, C.F.; HOSENEY, R.C.; LEIPOLD, H.W. Goitrogenic effects of pearl millet diets. 1983.

KOO, Hyun-Young *et al.* Replacing dietary glucose with fructose increases ChREBP activity and SREBP-1 protein in rat liver nucleus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 390, n. 2, p. 285–289, 11 dez. 2009.

KOSACKA, J. *et al.* Autophagy in adipose tissue of patients with obesity and type 2 diabetes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2015.

KOYAMA, Yukinori; BRENNER, David A. *Liver inflammation and fibrosis. Journal of Clinical Investigation*. [S.l: s.n.], , 2017

KRISHNAN, Rateesh; DHARMARAJ, Usha; MALLESHI, Nagappa G. Influence of decortication, popping and malting on bioaccessibility of calcium, iron and zinc in finger millet. *LWT - Food Science and Technology*, 2012.

KROMHOUT, D. *et al.* Dietary Saturated and transFatty Acids and Cholesterol and 25-Year Mortality from Coronary Heart Disease: The Seven Countries Study. *Preventive Medicine*, v. 24, n. 3, p. 308–315, 1 maio 1995.

LACERDA, Denise dos Santos; BOCK, Patrícia Martins; FUNCHAL, Cláudia. Consumo exacerbado de lipídeos provoca dano celular em algumas doenças metabólicas e cardiovasculares. *Nutrire*, v. 40, n. 2, p. 200–213, 2015.

LE<sup>^</sup>, Kim-Anne Le<sup>^</sup>, *et al.* Fructose overconsumption causes dyslipidemia and ectopic lipid deposition in healthy subjects with and without a family history of type 2 diabetes 1-4. *Am J Clin Nutr*, v. 89, p. 1760–1765, 2009.

LÊ, Kim-Anne *et al.* A 4-wk high-fructose diet alters lipid metabolism without affecting insulin sensitivity or ectopic lipids in healthy humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 84, n. 6, p. 1374–1379, 1 dez. 2006.

LI, Xiaopeng *et al.* Attenuated mTOR Signaling and Enhanced Glucose Homeostasis by Dietary Supplementation with Lotus Seedpod Oligomeric Procyanidins in Streptozotocin (STZ)-Induced Diabetic Mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017.

LONARDO, Amedeo *et al.* *Hypertension, diabetes, atherosclerosis and NASH: Cause or consequence? Journal of Hepatology*. [S.l: s.n.], , 2018

LOPES, José Carlos; BARBOSA, Luciana Gomes; CAPUCHO, Marilda Torres. GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE Bauhinia spp. *FLORESTA*, 2007.

- LOZANO, Iona *et al.* High-fructose and high-fat diet-induced disorders in rats: Impact on diabetes risk, hepatic and vascular complications. *Nutrition and Metabolism*, v. 13, n. 1, p. 1–13, 2016.
- LUCAS, Elisa *et al.* Molecular physiopathology of obesity-related diseases: Multi-organ integration by GRK2. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 2015.
- MACAULEY, Harold. Cereal Crops: Rice, Maize, Millet, Sorghum, Wheat. *Feeding Africa: An action plan for African Agricultural transformation*, 2015.
- MALONE, Gaspar *et al.* Expressão diferencial de isoenzimas durante o processo de germinação de sementes de arroz em grandes profundidades de semeadura. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 29, n. 1, p. 61–67, 2007.
- MARINELI, Rafaela da Silva *et al.* Chia (*Salvia hispanica* L.) enhances HSP, PGC-1 $\alpha$  expressions and improves glucose tolerance in diet-induced obese rats. *Nutrition*, v. 31, n. 5, p. 740–748, 2015.
- MARKLUND, Stefan L. Product of extracellular-superoxide dismutase catalysis. *FEBS Letters*, v. 184, n. 2, p. 237–239, 20 maio 1985.
- MATSUZAKA, Takashi *et al.* Insulin-independent induction of sterol regulatory element-binding protein-1c expression in the livers of streptozotocin-treated mice. *Diabetes*, v. 53, n. 3, p. 560–9, 1 mar. 2004.
- MAXSON, E. D. E ROONEY, L. M. Evaluation of methods for tannin analysis in sorghum grain. *Cereal Chemistry*, 1972.
- MENDES, Brena Barros; OLIVEIRA, Anniely Carvalho Rebouças; ALCÂNTARA, Keila Correia De. Comparison of the neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte ratios in normoglycemic and hyperglycemic subjects. *Einstein (Sao Paulo, Brazil)*, v. 17, n. 1, p. eAO4403, 2019.
- MENDEZ-SANCHEZ, Nahum *et al.* New Aspects of Lipotoxicity in Nonalcoholic Steatohepatitis. 2018.
- MEZZOMO, Thais Regina; NADAL, Juliana. EFEITO DOS NUTRIENTES E SUBSTÂNCIAS ALIMENTARES NA FUNÇÃO TIREOIDIANA E NO HIPOTIREOIDISMO. *DEMETERA: Alimentação, Nutrição & Saúde*, 2016.
- MONTEIRO, C. A. *et al.* Ultra-processed products are becoming dominant in the global food system. *Obesity Reviews*. [S.l: s.n.], 2013
- MOREIRA, Maria Eliza de Castro *et al.* Bacupari peel extracts (*Garcinia brasiliensis*) reduce high-fat diet-induced obesity in rats. *Journal of Functional Foods*, v. 29, p. 143–153, 1 fev. 2017.
- MORENO-REYES, R. *et al.* Endemic juvenile hypothyroidism in a severe endemic goitre area of Sudan. *Clinical Endocrinology*, v. 38, n. 1, p. 19–24, 1993.
- N'DRI, Denis *et al.* Effect of cooking on the total antioxidant capacity and phenolic profile of some whole-meal African cereals. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2013.

NAGAI, Yoshio *et al.* Amelioration of high fructose-induced metabolic derangements by activation of PPAR $\alpha$ . *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v. 282, n. 5, p. E1180–E1190, maio 2002.

NANI, Abdelhafid *et al.* Effects of polyphenols and lipids from Pennisetum glaucum grains on T-cell activation: Modulation of Ca<sup>2+</sup> and ERK1/ERK2 signaling. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 15, n. 1, p. 1–11, 2015.

NAPIERALA, Marta *et al.* The influence of tobacco smoke exposure on selected markers of oxidative stress, kidneys and liver function in the serum of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Pharmacological Reports*, ago. 2019.

NAVIDSHAD, B.; ROYAN, M. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR $\alpha$ ), a key regulator of lipid metabolism in avians. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, v. 26, n. 4, p. 303–308, 2016.

NELSON, Kristina *et al.* Germinated grains: a superior whole grain functional food? *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 91, n. 6, p. 429–441, jun. 2013.

NERURKAR, Pratibha V. *et al.* Regulation of glucose metabolism via hepatic forkhead transcription factor 1 (FoxO1) by Morinda citrifolia (noni) in high-fat diet-induced obese mice. *British Journal of Nutrition*, v. 108, n. 2, p. 218–228, 28 jul. 2012.

NYBY, Michael D. *et al.* Vascular Angiotensin Type 1 Receptor Expression Is Associated with Vascular Dysfunction, Oxidative Stress and Inflammation in Fructose-Fed Rats. *Hypertension Research*, v. 30, n. 5, p. 451–457, 1 maio 2007.

ODUSOLA, K B; ILESANMI, F F; AKINLOYE, O A. Assessment of nutritional composition and antioxidant ability of pearl millet (Pennisetum glaucum). v. 1, n. 6, p. 262–272, 2013.

OPPENHEIMER, J. H.; SCHWARTZ, H. L.; SURKS, M. I. Propylthiouracil inhibits the conversion of L-thyroxine to L-triiodothyronine. An explanation of the antithyroxine effect of propylthiouracil and evidence supporting the concept that triiodothyronine is the active thyroid hormone. *The Journal of clinical investigation*, v. 51, n. 9, p. 2493–2497, 1972.

OPPENHEIMER, Jack H. Role of Plasma Proteins in the Binding, Distribution and Metabolism of the Thyroid Hormones. *New England Journal of Medicine*, v. 278, n. 21, p. 1153–1162, 23 maio 1968.

OSMAN, A K; FATAH, A A. Factors other than iodine deficiency contributing to the endemicity of goitre in Darfur Province (Sudan). *Journal of human nutrition*, v. 35, n. 4, p. 302–9, ago. 1981.

OWHERUO, Joseph O.; IFESAN, Beatrice O.T.; KOLAWOLE, Ayodele O. Physicochemical properties of malted finger millet (Eleusine coracana) and pearl millet (Pennisetum glaucum). *Food Science and Nutrition*, v. 7, n. 2, p. 476–482, 11 fev. 2019.

PANG, Min *et al.* Physicochemical properties, antioxidant activities and protective effect against acute ethanol-induced hepatic injury in mice of foxtail millet (Setaria italica) bran oil. 2014.

PATEL, Seema. *Cereal bran fortified-functional foods for obesity and diabetes*

management: *Triumphs, hurdles and possibilities*. *Journal of Functional Foods*. [S.l.: s.n.], 2015

PATIL, Kavita B.; CHIMMAD, Bharati V.; ITAGI, Sunanda. Glycemic index and quality evaluation of little millet (*Panicum miliare*) flakes with enhanced shelf life. *Journal of Food Science and Technology*, v. 52, n. 9, p. 6078–6082, 2015.

PEREIRA, Rodrigo Martins *et al.* Fructose consumption in the development of obesity and the effects of different protocols of physical exercise on the hepatic metabolism. *Nutrients*. [S.l.]: MDPI AG., 20 abr. 2017

POLACOW, Viviane O.; LANCHI, Antonio H. Dietas hiperglicídicas: Efeitos da substituição isoenergética de gordura por carboidratos sobre o metabolismo de lipídios, adiposidade corporal e sua associação com atividade física e com o risco de doença cardiovascular. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*. [S.l.]: ABE&M., abr. 2007

PORTA, Camillo; PAGLINO, Chiara; MOSCA, Alessandra. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. *Frontiers in Oncology*. [S.l.: s.n.], 2014

POZZA, Carlotta; ISIDORI, Andrea M. What's Behind the Obesity Epidemic. *Imaging in Bariatric Surgery*. [S.l.: s.n.], 2018. .

PRADEEP, P. M.; SREERAMA, Yadahally N. Phenolic antioxidants of foxtail and little millet cultivars and their inhibitory effects on  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase activities. *Food Chemistry*, v. 247, p. 46–55, 1 maio 2018.

PRASAD, S Venkata *et al.* Antihyperglycemic and Antioxidant Effects of Pennisetum glaucum Seed Extracts in STZ Induced Diabetic Rats. *Journal of Pharmacy and Chemistry*, v. 6, n. 3, p. 1–10, 2012.

PRICE, Martin L.; VAN SCOYOC, Steve; BUTLER, Larry G. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 26, n. 5, p. 1214–1218, maio 1978.

QIN, Bolin; ANDERSON, Richard A.; ADELI, Khosrow. Tumor necrosis factor- $\alpha$  directly stimulates the overproduction of hepatic apolipoprotein B100-containing VLDL via impairment of hepatic insulin signaling. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 294, n. 5, p. G1120–G1129, maio 2008.

RAJASEKARAN, N. S. *et al.* The effect of finger millet feeding on the early responses during the process of wound healing in diabetic rats. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, v. 1689, n. 3, p. 190–201, 4 ago. 2004.

REDDY, Janardan K; HASHIMOTO, Takashi. PEROXISOMAL  $\beta$ -OXIDATION AND PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR  $\alpha$ : An Adaptive Metabolic System. . [S.l.: s.n.], 2001.

REEVES, Philip G.; NIELSEN, Forrest H.; FAHEY, George C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *The Journal of Nutrition*, v. 123, n. 11, p. 1939–1951, 1 nov. 1993.

REN, Xin *et al.* The Glucose-Lowering Effect of Foxtail Millet in Subjects with

Impaired Glucose Tolerance: A Self-Controlled Clinical Trial. *Nutrients*, v. 10, n. 10, p. 1509, 15 out. 2018.

REYNÉS, Bàrbara *et al.* Reversion to a control balanced diet is able to restore body weight and to recover altered metabolic parameters in adult rats long-term fed on a cafeteria diet. *Food research international (Ottawa, Ont.)*, v. 64, p. 839–848, out. 2014.

RODRIGUES, Sandra Campos. *EFEITOS DA PINEALECTOMIA E DO BLOQUEIO DA SINALIZAÇÃO DO RECEPTOR DE GLICOCORTICÓIDES SOBRE AS FUNÇÕES METABÓLICAS E INFLAMATÓRIAS HEPÁTICAS*. 2015. Instituto de Ciências Biomédicas, 2015.

ROGLANS, Núria *et al.* Impairment of hepatic Stat-3 activation and reduction of PPAR $\alpha$  activity in fructose-fed rats. *Hepatology*, v. 45, n. 3, p. 778–788, 1 mar. 2007.

ROMIEU, I *et al.* Energy intake and other determinants of relative weight. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 47, n. 3, p. 406–412, 1 mar. 1988.

SALAR, Raj Kumar; PUREWAL, Sukhvinder Singh; SANDHU, Kawaljit Singh. Relationships between DNA damage protection activity, total phenolic content, condensed tannin content and antioxidant potential among Indian barley cultivars. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2017.

SALEHI, Bahare *et al.* *The Therapeutic Potential of Anthocyanins: Current Approaches Based on Their Molecular Mechanism of Action*. *Frontiers in Pharmacology*. [S.l.]: Frontiers Media S.A. , 26 ago. 2020

SARITA; EKTA SINGH. Potential of Millets: Nutrients Composition and Health Benefits. *Journal of Scientific and Innovative Research JSIR*, v. 5, n. 52, p. 46–50, 2016.

SCHINONI, Maria Isabel. *issue 4-2003-*. . [S.l: s.n.], 2003.

SHAPIRO, Alexandra *et al.* Prevention and reversal of diet-induced leptin resistance with a sugar-free diet despite high fat content. *British Journal of Nutrition*, v. 106, n. 3, p. 390–397, 14 ago. 2011.

SHARMA, Bharati; GUJRAL, Hardeep Singh. Influence of nutritional and antinutritional components on dough rheology and in vitro protein & starch digestibility of minor millets. *Food Chemistry*, v. 299, p. 125115, 30 nov. 2019.

SHUKLA, Kamini; SRIVASTAVA, Sarita. Evaluation of finger millet incorporated noodles for nutritive value and glycemic index. *Journal of Food Science and Technology*, v. 51, n. 3, p. 527–534, mar. 2014a.

SHUKLA, Kamini; SRIVASTAVA, Sarita. Evaluation of finger millet incorporated noodles for nutritive value and glycemic index. *Journal of Food Science and Technology*, v. 51, n. 3, p. 527–534, 13 mar. 2014b.

SI-TAYEB, Karim; LEMAIGRE, Frédéric P.; DUNCAN, Stephen A. *Organogenesis and Development of the Liver*. *Developmental Cell*. [S.l: s.n.], , 16 fev. 2010

SILVA, Gutierrez Nelson *et al.* Air drying of macauba fruits: Maintaining oil quality for biodiesel production. *Acta Scientiarum - Agronomy*, v. 42, 24 set. 2019.

- SIMENTAL-MENDÍA, Luis E.; RODRÍGUEZ-MORÁN, Martha; GUERRERO-ROMERO, Fernando. The product of fasting glucose and triglycerides as surrogate for identifying insulin resistance in apparently healthy subjects. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 2008.
- SINGH, K. P.; MISHRA, Abhinav; MISHRA, H. N. Fuzzy analysis of sensory attributes of bread prepared from millet-based composite flours. *LWT - Food Science and Technology*, 2012.
- SINGH, Nidhi *et al.* Evaluation of antimicrobial and anticancer properties of finger millet ( *Eleusine coracana* ) and pearl millet ( *Pennisetum glaucum* ) extracts. *The pharma innovation journal*, v. 3, n. 11, p. 82–86, 2015.
- SINGLETON, VERNON L.; ORTHOFER, RUDOLF; LAMUELA-RAVENTO, M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. [S.l: s.n.], 1999. p. 152–178.
- SINGLETON, Vernon L.; ORTHOFER, Rudolf; LAMUELA-RAVENTÓS, Rosa M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, v. 299, p. 152–178, 1 jan. 1999.
- SIROHA, Anil Kumar; SANDHU, Kawaljit Singh; KAUR, Maninder. Physicochemical, functional and antioxidant properties of flour from pearl millet varieties grown in India. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2016.
- SONG, Dongzhe; HUTCHINGS, Simon; PANG, Catherine C.Y. Chronic N-acetylcysteine prevents fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *European Journal of Pharmacology*, v. 508, n. 1–3, p. 205–210, 31 jan. 2005.
- SPRUSS, Astrid *et al.* Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Hepatology*, v. 50, n. 4, p. 1094–1104, 1 out. 2009.
- STANHOPE, Kimber L. *et al.* Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *Journal of Clinical Investigation*, v. 119, n. 5, p. 1322–1334, 1 maio 2009.
- STANHOPE, Kimber L. *Sugar consumption, metabolic disease and obesity: The state of the controversy. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. [S.l: s.n.], 2016
- SU, Wen *et al.* Role of HSD17B13 in the liver physiology and pathophysiology. *Molecular and Cellular Endocrinology*. [S.l.]: Elsevier Ireland Ltd. , 1 jun. 2019
- SUBRAMANIYAN, Devi; KUMAR, Ashok. Citral Protects High Glucose Induced Oxidative Damage *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. . [S.l: s.n.], 2017.
- TAPPY, Luc *et al.* Metabolic effects of fructose. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. [S.l: s.n.], 2006
- TAPPY, Luc; LE, Kim Anne; LE<sup>^</sup>DEPARTMENT, Kim-Anne. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. , 2010, p. 23–46.
- TARDIN, F. D; RODRIGUES, J. A. S; COELHO, R. R. Cultivo do Sorgo: Cultivares. *Embrapa*, v. 2, n. 6, p. 1–7, 2018.

TAYLOR, J. R.N. Millet Pearl: Overview. *Encyclopedia of Food Grains: Second Edition*. [S.l: s.n.], 2015. .

TEFF, Karen L *et al.* Dietary Fructose Reduces Circulating Insulin and Leptin, Attenuates Postprandial Suppression of Ghrelin, and Increases Triglycerides in Women. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 89, p. 2963–2972, 2004.

TER HORST, Kasper W.; SERLIE, Mireille J. *Fructose consumption, lipogenesis, and non-alcoholic fatty liver disease*. *Nutrients*. [S.l: s.n.]. , 2017a

TER HORST, Kasper W.; SERLIE, Mireille J. *Fructose consumption, lipogenesis, and non-alcoholic fatty liver disease*. *Nutrients*. [S.l.]: MDPI AG. , 1 set. 2017b

TIWARI, Ajita *et al.* Effect of pre-milling treatments on storage stability of pearl millet flour. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2014.

TRIGGIANI, Vincenzo *et al.* Role of Iodine, Selenium and Other Micronutrients in Thyroid Function and Disorders. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*, v. 9, n. 3, p. 277–294, 18 ago. 2009.

TSAI, Julie *et al.* Inflammatory NF- $\kappa$ B activation promotes hepatic apolipoprotein B100 secretion: evidence for a link between hepatic inflammation and lipoprotein production. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 296, n. 6, p. G1287–G1298, jun. 2009.

TURLIN, Bruno *et al.* Histologic Features of the Liver in Insulin Resistance–Associated Iron Overload. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 116, n. 2, p. 263–270, 1 ago. 2001.

VICENTE, Oscar; BOSCAIU, Monica. Flavonoids: Antioxidant Compounds for Plant Defence... and for a Healthy Human Diet. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, v. 46, n. 1, p. 14–21, 1 jan. 2018.

VIEIRA-RIBEIRO, Sarah A. *et al.* The TyG index cutoff point and its association with body adiposity and lifestyle in children. *Jornal de Pediatria*, v. 95, n. 2, p. 217–223, 1 mar. 2019.

VITAGLIONE, Paola *et al.* Dietary Antioxidant Compounds and Liver Health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 44, n. 7–8, p. 575–586, 10 fev. 2005.

WANG, B. *et al.* Prevalence of Metabolically Healthy Obese and Metabolically Obese but Normal Weight in Adults Worldwide: A Meta-Analysis. *Hormone and Metabolic Research*, v. 47, n. 11, p. 839–845, 4 set. 2015.

WOO, Chang-Yun *et al.* Mitochondrial Dysfunction in Adipocytes as a Primary Cause of Adipose Tissue Inflammation. 2019.

YAHFOUFI, Nour *et al.* *The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols*. *Nutrients*. [S.l: s.n.]. , 2018

YE, Jianping. *Mechanisms of insulin resistance in obesity*. *Frontiers of Medicine in China*. [S.l: s.n.]. , 2013

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Artigo 1: GERMINATED MILLET FLOUR (*PENNISETUM GLAUCUM* (L.) R. BR.) IMPROVES ADIPOGENESIS AND GLUCOSE METABOLISM AND MAINTAINS THYROID FUNCTION *IN VIVO*

Submitted on Food and Function (Impact Factor: 4.171)

#### ABSTRACT

This study investigated the effects of germinated millet flour on adipogenesis, insulin resistance, glucose tolerance and thyroid function in *Wistar* rats fed with a high-fat high-fructose diet (HFHF). The experiment was divided into two phases. Phase 1: control group, which received AIN-93M diet (n = 10) and HFHF group (n = 20), which received a diet rich in saturated fat (31%) and fructose (20%), for eight weeks. Phase 2: intervention: the control group maintained the AIN-93M diet (n = 10) and the HFHF group was divided into two groups: the HFHF (n = 10) and the germinated millet group (n = 10), for 10 weeks. The germinated millet flour maintained ( $p > 0,05$ ) the plasma levels of thyroid hormones, increased ( $p < 0.05$ ) the protein kinase B (AKT) mRNA expression and the phospho-AKT1 protein concentration, the phosphofructokinase (PFK) mRNA and activated protein kinase (AMPK) mRNA expression, and the brown adipose tissue and reduced ( $p < 0.05$ ) the TyG index, glucose, insulin and corticosterone, compared to the HFHF group. These effects contributed to reduce the gluconeogenesis, hyperinsulinemia and adiposity. Thus, germinated millet flour is a good alternative for modulating the adipogenesis and glucose metabolism, without interfering with the thyroid hormones, in rats with an insulin resistance condition with a high-fat high-fructose diet.

**Keywords:** Adiposity; metabolic changes; blood glucose; thyroid hormones; insulin resistance; glucocorticoid.

#### 1. INTRODUCTION

The consumption of foods rich in saturated fat and fructose has increased during the last century. This type of food contributes to metabolic changes, such as adiposity and insulin resistance, which results in glucose metabolism disorders in the liver that

increase the transcription of genes required for gluconeogenesis and reduce those involved in the glycolytic pathway (CORNU; ALBERT; HALL, 2013; TER HORST; SERLIE, 2017a). Furthermore, high glycemia, in turn, can lead to adiposity and other metabolic changes, such as dyslipidemia (GIRIŞ *et al.*, 2018; POLACOW; LANCHI, 2007).

Thus, the consumption of plant foods, especially fruits, vegetables, and grains, is an alternative to maintain a balanced diet. In this context we have the millet, which is a cereal with amounts of proteins and dietary fiber similar or greater than other traditional grains, such as rice and corn. Moreover, millet contains minerals and phytochemicals, such as polyphenols and tannins (TAYLOR, 2015).

However, millet contains the compound glycosyl flavone that can inhibit the thyroid enzyme peroxidase, responsible for the production of thyroid hormones (MEZZOMO; NADAL, 2016). In view of this, it is suggested that these grains should be subjected to processing, such as germination, to reduce these compounds and enable safe consumption. Germination is a simple and inexpensive process, which has a fast production cycle and can improve the bioavailability of nutrients (BENINCASA *et al.*, 2019).

Millet has been shown to have functional properties as a hypoglycemic agent, reducing insulin resistance (REN *et al.*, 2018), inhibiting the enzymes pancreatic alpha-amylase and alpha-glycosidase, *in vitro* (PRADEEP; SREERAMA, 2018) and reducing blood glucose in diabetic rats (PRASAD *et al.*, 2012). However, the mechanisms involved in these effects are unknown. Therefore, this study aimed to investigate possible effects of germinated millet flour on adipogenesis, insulin resistance, glucose tolerance and thyroid function in *Wistar* rats with an insulin resistance condition fed a with high-fat high-fructose diet.

## **2. MATERIAL AND METHODS**

### **2.1 Germinated Millet Flour**

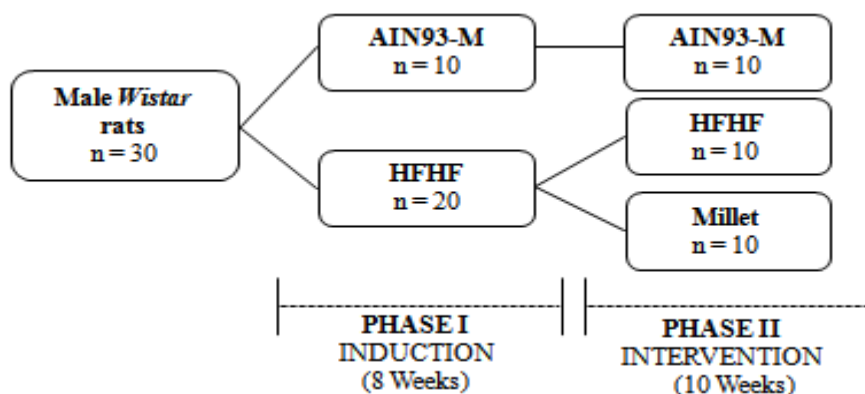
Millet grains (*Pennisetum glaucum* LR Br.), BRS1502 cultivar, were soaked in water (1:3 grain/water ratio) for 3 hours. Then, the grains were germinated at  $30^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$  and 90% humidity, during 24 hours, and dried at  $50^{\circ}\text{C}$ , for 4 hours. After, the grains were processed to obtain the flour, which was placed in vacuum polyethylene packaging and stored in a freezer ( $-18^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) until the diet was processed.

## 2.2. Chemical Analysis of Millet Flours

The composition of moisture, lipids, ash, protein and carbohydrate were determined according to the Association of Official Analytical Chemistry (AOAC, 2016), dietary fiber was determined by total dietary fiber kit (Sigma®) and resistant starch by procedures and enzyme kit (Megazyme®). The phytic acid content was determined using the commercial kit (Megazyme®), according to the manufacturer's recommendations. The Folin-Ciocalteu reagent was used to determine the total phenolic compounds (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999). The condensed tannins were analyzed by the vanillin / HCl reaction method (MAXSON, E. D. E ROONEY, 1972; PRICE; VAN SCOYOC; BUTLER, 1978). The antioxidant activity was determined by the sequestering capacity of free radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazil) (BLOOR, 2001).

## 2.3. Animals and Diet

Male *Wistar* rats (*Rattus norvegicus*), 45-50 days old, were randomized by body weight, into two groups: the control group (wt  $155.98 \pm 17.05$ g, n = 10), fed with diet AIN93-M (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993, with changes), and the HFHF group (wt  $158.03 \pm 17.81$ g, n = 20), fed with a high-fat (31%) high-fructose diet (20%) for 8 weeks (Phase I). During the intervention (Phase II), the control group (AIN-93M; wt  $349.94 \pm 30.71$ g, n = 10) was maintained, and the animals from the HFHF group were redistributed into: HFHF (wt  $366.89 \pm 36.90$ g, n = 10), which maintained the high-fat high-fructose diet, and the intervention group (millet; wt  $370.12 \pm 36.49$ g, n = 10), which received the high-fat high-fructose diet added with germinated millet flour (replacing 43.6% of dietary fiber, 100% starch, 36% protein and 39% oil in the experimental diet), for another 10 weeks (adapted from (HAMID; HUSSAIN, 2017; MARINELI *et al.*, 2015)) (**Figure 1**). The composition of the diets is shown in **Table 1**.



**Figure 1.** Experimental design. The experiment was divided into two phases: Phase 1: induction of insulin resistance: the control group received a standard rodent diet (AIN-93M); and high fat high fructose group (HFHF) received the AIN-93M diet rich in saturated fat (31%) and fructose (20%), for eight weeks. Phase 2: Intervention: control group AIN-93M was maintained and group HFHF was divided into: HFHF group and Millet group (HFHF with germinated millet flour replacing 43.6% dietary fiber, 100% starch, 36% protein and 39% oil in experimental diet) for 10 weeks.

**Table 1:** Composition of the experimental diets

Ingredients (g / kg-1)	Experimental Diets		
	AIN93-M	HFHF	Millet
Albumin*	136.6	136.6	87.3
Maize starch	463.5	135.0	-
Dextrinized starch	155.0	45.0	-
Sucrose	100.0	28.6	8.6
Lard	-	310.0	310.0
Soy oil	40.0	40.0	24.5
Millet flour	-	-	286.3
Fructose	-	200.0	200.0
Cellulose	55.8	55.8	34.0
Mineral mix	35.0	35.0	35.0
Vitamin mix	10.0	10.0	10.0
L-cystine	1.8	1.8	1.8
Hill bitartrate	2.5	2.5	2.5

<b>Composition of the diets (%)</b>			
Carbohydrate	73.2	42.5	40.3
Protein	12.0	12.0	12.0
Lipid	4.0	35.0	35.0
<b>Caloric density (cal / g)</b>	3.78	5.33	5.24

Composition of the experimental diets based on the standard rodent diet (AIN-93M) (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). HFHF: high fat high fructose diet; Millet: test diet containing HFHF added with germinated millet flour, replacing 43.6% dietary fiber, 100% starch, 36% protein and 39% oil. \* Albumin based on 88% protein content.

At the end of Phase II, the animals were euthanized by isoflurane anesthetic (Isoforine, Cristália®), followed by cardiac puncture. Blood was centrifuged (300g; 4°C; 15 min) (Fanem-204, São Paulo, Brazil) and the plasma was stored at -80°C. The hepatic and adipose tissues were washed with saline solution (PBS), weighed and immediately stored at -80°C.

The study was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Federal University of Viçosa (CEUA / UFV), process no. 39/2019.

#### **2.4. Biometrics and Food Consumption**

The body weight and food consumption of the animals were monitored weekly. The body mass index (BMI) was calculated as  $BMI = \text{body weight (g)}/\text{body length (nose to anus) (cm)}^2$  (REYNÉS *et al.*, 2014).

The visceral adiposity was determined by the sum of the weights of mesenteric, retroperitoneal and epididymal adipose tissues. The adiposity index and the hepatosomatic index were calculated according to the one described by Gomes Natal *et al.* (2016) and Kim, Ji Hye *et al.*, (2016), respectively.

#### **2.5. Glucose and TyG Index**

The glucose concentration was measured at the end of the period of induction of metabolic changes (Phase I) and after 10 weeks of intervention (Phase II), before euthanasia. Blood collection was carried out by capillarity, using the ACCU-CHEK® Active glucometer and specific tapes (Roche) (MOREIRA *et al.*, 2017).

The TyG index was obtained by the product between fasting glucose (Phase II) and triglyceridemia, using the formula:  $TyG = \text{Ln [Fasting triglycerides (mg/dL) x$

Fasting glycemia (mg/dL)/2]. Where Ln is the natural (Neperian) logarithm (SIMENTAL-MENDÍA; RODRÍGUEZ-MORÁN; GUERRERO-ROMERO, 2008).

## **2.6. Assessment of Intraperitoneal Tolerance of Glucose and Insulin**

The intraperitoneal glucose tolerance test (iGTT) was performed in the 9<sup>th</sup> week, and the test of intraperitoneal insulin tolerance (ITT), in the 10<sup>th</sup> week of the experiment (at the end of phase II), after 12 hrs of fasting. Blood was collected from the tail, to measure the basal glycemia. Subsequently, a 50% D-glucose solution (2 g/kg body weight) was administered in the intraperitoneal cavity, and blood samples were taken at the baseline (time 0, 30, 60, 90 and 120 minutes. The area under the curve (AUC) was calculated.

The ITT was measured in animals that had fasted for 12 hrs, after the intraperitoneal injection of human insulin (0.75 U/kg of body weight). Glucose levels were measured at the baseline time (time 0) and at 5, 10, 15, 20, 25 and 30 minutes after the insulin injection. The mean of the glycemia decay constant (kTTII) was calculated, using the formula:  $[0.693/(t_{1/2})]$ , where  $t_{1/2}$  is the time needed to halve the baseline glycemia.

## **2.7. Plasma Hormonal Analysis**

The levels of corticosterone, triiodothyronine (T3) and thyroxine (T4) were determined using commercial radioimmunoassay kits (RIA), according to the manufacturer's instructions (MP Biomedicals®, NY, USA).

## **2.8. Gene Expression Related to Insulin Resistance in the Liver**

The levels of expression of genes were analyzed by the Real-Time PCR System (RT-qPCR). Briefly, the liver tissue was crushed in liquid nitrogen and homogenized in TRIzol reagent. The extracted mRNA was quantified in the spectrophotometer and the complementary DNA (cDNA) was synthesized from mRNA using an M-MLV reverse transcription kit (Invitrogen® Brasil Ltda.). For detection, the Master Mix SYBR Green Fluorescence PCR was used and sequences of sense and antisense oligonucleotides (**Table 2**). The relative expressions of mRNA levels were normalized by endogenous control GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) (ENES *et al.*, 2020).

**Table 2:** Sequence of oligonucleotides used for RT-qPCR

Gene	Sense (5'- 3')	Antisense (5'- 3')
<b>AKT</b>	GGG CCA CGG ATA CCA TGA AC	AGC TGA CAT TGT GCC ACT GA
<b>PFK</b>	CCACCTGGAGGCCATTGTAGA	GGGATGACGCACATGACGA
<b>AMPK</b>	TGA AGC CAG AGA ACG TGT TG	ATA ATT TGG CGA TCC ACA GC
<b>GAPDH</b>	AGG TTG TCT CCT GTC ACT TC	CTG TTG CTG TAG CCA TAT TC

Protein kinase B (AKT), phosphofruktokinase (PFK), activated protein kinase (AMPK) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH).

### 2.9. Quantification of Phospho-AKT1 [pS473] Protein

The protein Phospho-AKT1 [pS473] was quantified in the liver homogenate. The homogenate was carried out in a 1:5 (200 mg of tissue / 1000 µl of buffer) proportion of tissue by a 50 mm phosphate buffer, with 1 mm EDTA pH 7.4, containing protease inhibitor (Protease Inhibitor Cocktail powder, Sigma Aldrich). The concentration was measured by immunoassay, using the commercial kit AKT (Phospho) [pS473] Human ELISA Kit (Thermo Scientific).

### 2.10. Statistical Analysis

The data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Normality was assessed using Shapiro-Wilk and Kolmogorov-Smirnov tests. The one-way analysis of variance (ANOVA) and *post-hoc* of the Newman-Keuls test. The AUC, for insulin and blood glucose, was calculated using the trapezoidal rule. The 5% level of significance was established. All analyses were performed using the GraphPad Prism software system, version 6.0.

## 3. RESULTS

### 3.1. Chemical Composition of Germinated Millet Flour

The germinated millet flour contains mainly carbohydrate, following protein, total dietary fiber and lipids. In addition, it contains resistant starch, phytic acid, phenolic compounds, tannins and antioxidant activity (**Table 3**).

**Table 3:** Chemical characterization of germinated millet flour

Variable	Mean $\pm$ SD
----------	---------------

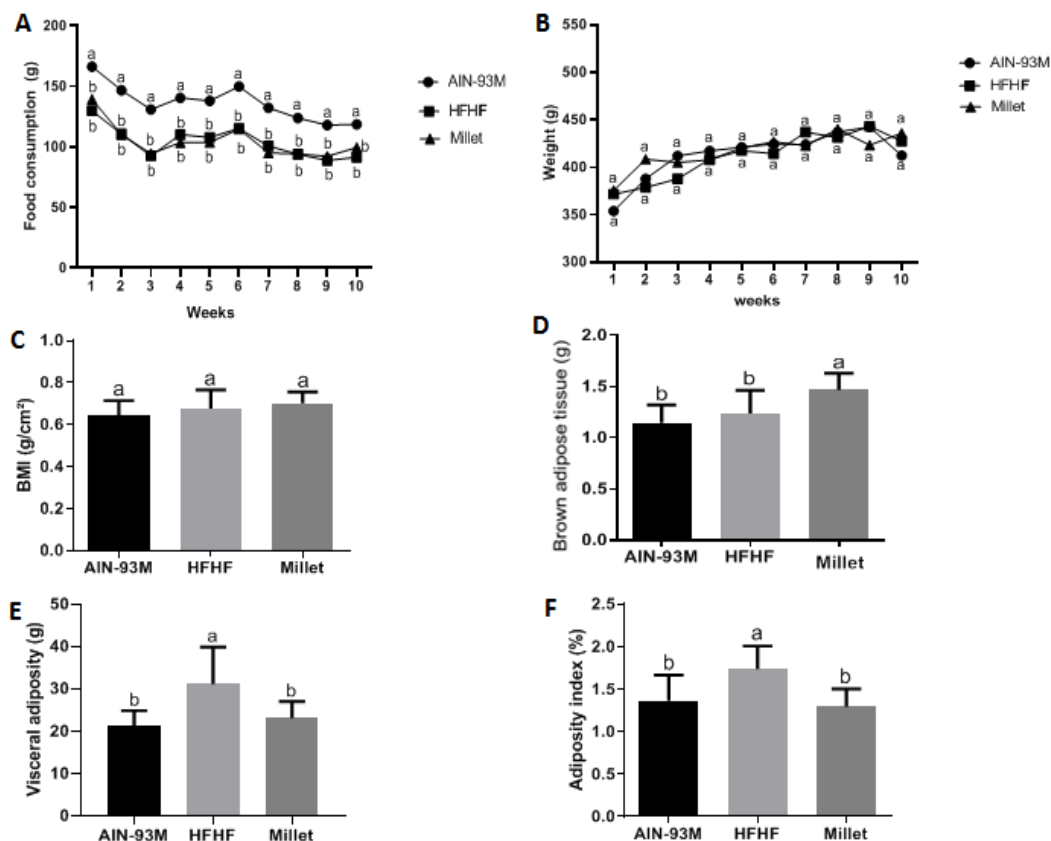
Carbohydrates (g/100g)	64.47 ± 0.31
Protein (g/100g)	15.08 ± 0.37
Total dietary fiber (g/100g)	7.60 ± 0.67
Insoluble dietary fiber (g/100g)	7.31 ± 0.58
Soluble dietary fiber (g/100g)	0.30 ± 0.09
Lipids (g/100g)	5.41 ± 0.05
Moisture (g/100g)	5.55 ± 0.22
Ash (g/100g)	1.89 ± 0.09
Resistant starch (g / 100g)	3.53 ± 0.18
Total phenolics (mg GAE / g)	2.17 ± 0.11
Phytic acid (g / 100 g)	1.22 ± 0.00
Condensed tannins (mg CE / g)	0.42 ± 0.00
DPPH (% ARR)	57.73 ± 2,15

GAE: gallic acid equivalents; CE: catechin equivalents; DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

### 3.2. Effect of Germinated Millet Flour on Biometric Measurements, Food Consumption and Adiposity

After the intervention, the animals showed no difference in body weight and BMI (**Figure 2B and 2C**). Food consumption was higher in the AIN-93M group, compared to the other groups (**Figure 2A**).

The brown adipose tissue was higher ( $p < 0.05$ ) in the millet group (**Figure 2D**) than in the AIN-93M control group and HFHF. The visceral adiposity and adiposity index were higher ( $p < 0.05$ ) in animals of the HFHF group and the germinated millet flour reduced adiposity ( $p < 0.05$ ), which was the same as the AIN-93M group (**Figure 2E and 2F**).



**Figure 2.** Effect of germinated millet flour on food consumption (A), body weight (B) and BMI (C), brown adipose tissue (D), visceral adiposity (E), and adiposity index (F) after 10 weeks of intervention. Values expressed as means and standard deviation (n = 10/group). Data analyzed by one-way ANOVA and *post-hoc* of Newman-Keuls at 5% probability. Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ). Animals fed with a standard diet (AIN-93M); high-fat high-fructose diet (HFHF) and the HFHF diet with added germinated millet flour (millet).

### 3.3. Germinated Millet Flour Reduces Hyperglycemia, TyG Index, Insulin Resistance and Hypercorticoesteronemia and Did Not Alter Thyroid Hormones

The millet group decreased blood glucose, TyG index, insulin and corticosterone compared to the HFHF group. Plasma T3 and T4 levels did not differ among the experimental groups (**Table 4**).

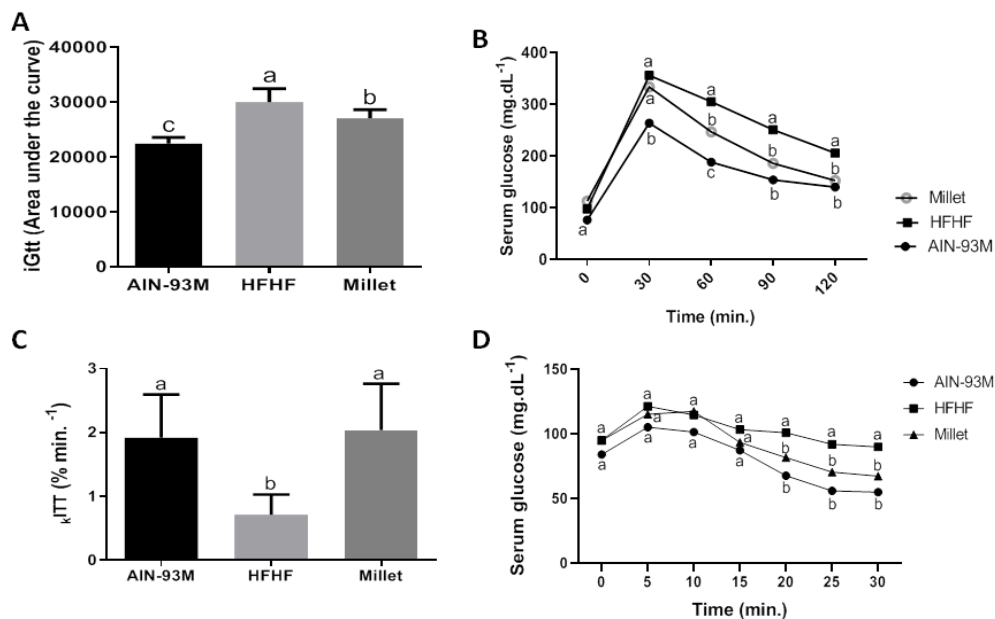
**Table 4:** Effect of germinated millet flour on blood glucose, insulin, TyG index, corticosterone, and free T3 and T4 in animals induced to insulin resistance with HFHF diet after 10 weeks of intervention.

Variables	AIN-93M	HFHF	Millet
-----------	---------	------	--------

Initial fasting glucose (mg / dL)	94.00 ± 7.68 <sup>a</sup>	103.80 ± 12.19 <sup>a</sup>	98.29 ± 13.63 <sup>a</sup>
Final fasting glucose (mg / dL)	86.00 ± 7.21 <sup>b</sup>	100.90 ± 7.82 <sup>a</sup>	87.50 ± 14.27 <sup>b</sup>
TyG index	8.33 ± 0.27 <sup>b</sup>	8.94 ± 0.16 <sup>a</sup>	8.59 ± 0.18 <sup>b</sup>
Insulin (μUI / mL)	13.74 ± 2.37 <sup>b</sup>	34.15 ± 7.84 <sup>a</sup>	16.49 ± 4.93 <sup>b</sup>
Corticosterone (ng / mL)	459.6 ± 150.5 <sup>b</sup>	841.00 ± 186.00 <sup>a</sup>	569.9 ± 156.1 <sup>b</sup>
Free T3 (pg / mL)	2.76 ± 0.56 <sup>a</sup>	3.03 ± 1.36 <sup>a</sup>	3.22 ± 1.16 <sup>a</sup>
Free T4 (ng / dL)	1.97 ± 0.68 <sup>a</sup>	1.72 ± 0.67 <sup>a</sup>	1.92 ± 0.47 <sup>a</sup>

Biochemical variables of experimental groups, after 10 weeks of intervention. The TyG index was determined by the formula: TyG= Ln [Fasting triglycerides (mg/dL) x Fasting glycemia (mg/dL)/2]. Values expressed as means and standard deviation (n = 10/group). The one-way ANOVA test was used, followed by the Newman-Keuls test, at 5% probability. Different letters indicate significant differences (p<0.05). Animals fed with a standard diet (AIN-93M); high-fat high-fructose diet (HFHF) and the HFHF diet added with germinated millet flour (millet).

In iGTT, the AUC decreased (p<0.05) in the millet group in comparison to the HFHF group (**Figure 3A**). The effect of germinated millet flour on blood glucose reduction was observed after 60 minutes of D-glucose injection. At 120 minutes, the concentration was similar to the control group (**Figure 3B**). In ITT, AUC was lower (p<0.05) in the HFHF group, which means that it presented higher insulin resistance (IR), compared to the AIN-93M group. The millet group managed to recover insulin sensitivity by equaling the AIN 93M group, after 20 minutes of the D-glucose injection (**Figure 3C and 3D**).

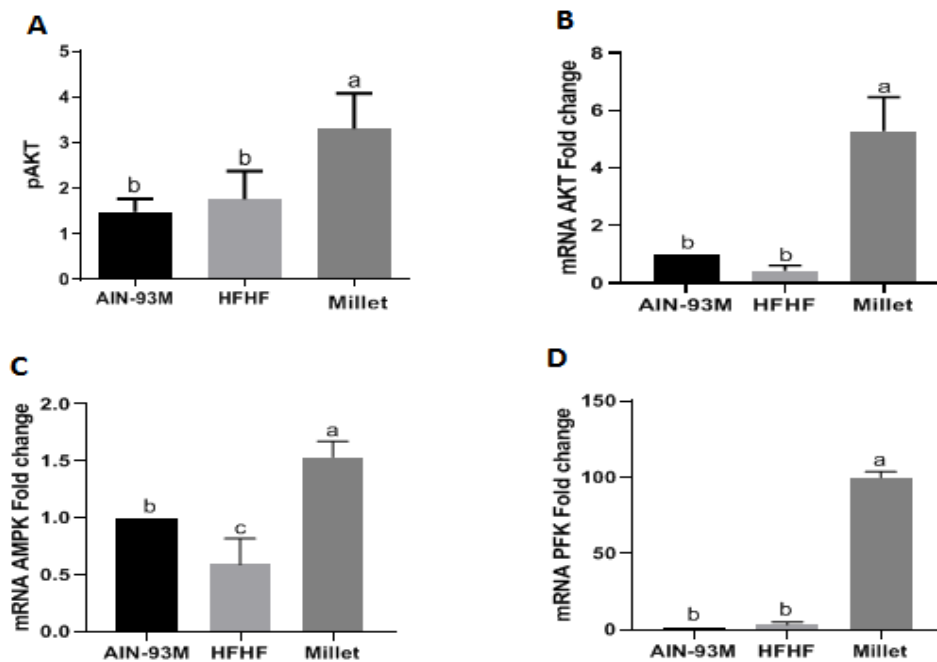


**Figure 3.** Germinated millet flour reduces hyperglycemia and insulin resistance in animals induced to insulin resistance, after 10 weeks of intervention. Glucose and insulin were measured by intraperitoneal glucose tolerance tests iGTT (A) and the insulin tolerance test ITT (C). Area below the serum glucose level curve after iGTT D-glucose administration (B), area below the capillary glucose level curve after ITT D-insulin administration (D). Values expressed as means and standard deviation (n = 10/group). Data analyzed by one-way ANOVA and *post-hoc* of Newman-Keuls at 5% probability. Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ). Animals fed with a standard diet (AIN-93M); high-fat high-fructose diet (HFHF) and the HFHF diet with added germinated millet flour (millet).

### 3.4. Germinated Millet Flour Increases the Expression of Genes Involved in Insulin and Glucose Metabolism and the Concentration of Protein Phospho-AKT1 [pS473] in the Liver

The phospho-AKT1 [pS473] protein concentration (**Figure 4A**) and the AKT mRNA expression (**Figure 4B**) were higher ( $p < 0.05$ ) in animals fed with germinated millet flour, compared to the HFHF control group.

The millet group presented higher ( $p < 0.05$ ) PFK mRNA expression (**Figure 4D**), compared to the others, and the AMPK mRNA expression was also higher ( $p < 0.05$ ) in the millet group, while animals in the HFHF group showed the lowest expression (**Figure 4C**).



**Figure 4.** Germinated millet flour increases the concentration of Phospho-AKT1 [pS473] (A) and the expression of protein kinase B (AKT) mRNA (B), protein kinase activated by adenosine monophosphate (AMPK) mRNA (C), and phosphofruktokinase (PFK) mRNA (D) in animals subjected to insulin resistance, after 10 weeks of intervention. The Phospho-AKT1 [pS473] was extracted from the liver of the rats and quantified by ELISA. The mRNA of AKT, AMPK, and PFK were extracted from the liver of rats and analyzed by RT-qPCR. Values expressed as means and standard deviation (n = 10/group). Data analyzed by one-way ANOVA and *post-hoc* of Newman-Keuls at 5% probability. Different letters indicate significant differences (p<0.05). Animals fed with a standard diet (AIN-93M); high-fat high-fructose diet (HFHF) and the HFHF diet with added germinated millet flour (millet).

#### 4. DISCUSSION

This study shows new knowledge about the properties of germinated millet flour in the reduction of adiposity and glycemia and the recovery of insulin sensitivity, without interfering with thyroid hormones, in *Wistar* rats with insulin resistance conditions fed with a high-fat high-fructose diet.

The germinated millet shows a lower percentage of carbohydrate (64%) and lipids (5%) and a higher dietary fiber (7.6%) and protein (15%) compared to non-germinated millet flour (70-79% carbohydrates, 7-9% lipids, 1-5% dietary fiber and 7-9% protein) (OWHERUO; IFESAN; KOLAWOLE, 2019). In the germination process

starch is used for plant growth, which increases the fibrous portion (OWHERUO; IFESAN; KOLAWOLE, 2019) and may promote lipid catabolism, with degradation of triglyceride-stored acids (NELSON *et al.*, 2013). The higher percentage of protein can be explained by the reduction of condensed tannins (0.42 mgEC/g) and phytic acid (1.22g/100g) that make proteins more available (SARITA; EKTA SINGH, 2016). The higher content of total phenolics (2.17mg EAG/g) and DPPH (57.73%) may occur by the activation of endogenous enzymes and biochemical metabolism of the seed that increase the synthesis of antioxidants during germination (DIOVANELLA, 2014; OWHERUO; IFESAN; KOLAWOLE, 2019).

In our study, the HFHF diet induced insulin resistance (IR); however, the germinated millet flour stimulated the hypoglycemic effect, reducing the blood glucose and insulin, in addition to improving the expression of the mRNA AKT and Phospho-AKT1 [pS473] protein. These effects are possibly due to the dietary fiber in the food matrix, which delays glucose absorption (SHUKLA; SRIVASTAVA, 2014b). In addition, the presence of phytochemicals, such as phenolic acids and flavonoids, in germinated millet flour can contribute to the reduction of glycemia, since they can inhibit the action of pancreatic alpha-amylase and alpha-glycosidase enzymes, which decrease starch hydrolysis (CAO; CHEN, 2012). Pradeep *et al.* (2018) also observed inhibition of these enzymes when using non-germinated millet *in vitro* (PRADEEP; SREERAMA, 2018). Thus, our study demonstrates millet's ability to reduce gluconeogenesis, which resulted in improved glucose tolerance and insulin sensitivity.

Germinated millet flour was effective in reducing plasma corticosterone. Excessive corticosterone is harmful because it increases blood glucose, since its function is antagonistic to that of insulin (RODRIGUES, 2015). Further, the germinated millet flour increased the expression of AMPK and PFK in the liver, which is associated with less synthesis and higher glucose oxidation and utilization. Therefore, germinated millet flour reduced gluconeogenesis, increased glycolysis, improved glucose and insulin homeostasis in animals fed with a high-fat high-fructose diet.

The lower food consumption observed in animals fed with a high-fat high-fructose diet (HFHF and millet groups) can be explained by the higher energy density of this type of diet, which increases the satiety (ENES *et al.*, 2020). Although the HFHF diet did not increase the BMI, it promoted adiposity, hyperglycemia and insulin resistance, characterizing animals in the HFHF group as metabolically obese, even

though there was no difference between their body weight and other animals receiving a balanced diet AIN-93M (WANG *et al.*, 2015).

The HFHF group increased the TyG index (index used to assess IR in humans (VIEIRA-RIBEIRO *et al.*, 2019)), blood glucose, insulin and adiposity, indicating the IR and risk of developing diabetes. The consumption of germinated millet flour was able to reduce adiposity, TyG index and increased the production of brown adipose tissue, which may increase the body's metabolism (BROETTO; BRITO, 2012) and reduce adiposity. Therefore, germinated millet flour, due to the presence of dietary fiber, polyphenols and their hypoglycemic action, increased the gene expression of AMPK, which may stimulate glucose transport, inhibit gluconeogenesis, induce oxidation of fatty acids and activate brown adipocytes.

There is evidence of an association between millet and hypothyroidism, due to goitrogenic polyphenols that affect the enzyme systems that control the synthesis of thyroid hormones (BOUIS *et al.*, 2011; OPPENHEIMER, J. H.; SCHWARTZ; SURKS, 1972). In this study, no changes in these hormones were observed when germinated millet flour was used. Therefore, we can infer that the goitrogens in doses usually presented in germinated millet do not alter the synthesis of the thyroid hormones. Elnour *et al.* (1997) observed thyroid gland increase and change in pattern of thyroid hormones in rats when using non-germinated millet (grain cooked; 10g/day) (ELNOUR *et al.*, 1997). In our study, germination may have reduced goitrogenic compounds and increased micronutrients, such as zinc, which is necessary for the synthesis and proper function of these hormones (KRISHNAN; DHARMARAJ; MALLESHI, 2012).

The amount of millet flour used in the diet of this study is equivalent to a human consumption of 142.8g per day, which corresponds to a tea-cup of flour. This flour can be used as an ingredient in culinary preparations, such as cakes, cookies and pasta, which are part of our daily food. Therefore, we consider that this amount can easily be consumed in human food.

## 5. CONCLUSION

Germinated millet flour reduces adiposity, causes a hypoglycemic effect and reduces insulin resistance conditions in *Wistar* rats fed with a high-fat high-fructose diet. In addition, it has no effect on thyroid hormones, indicating that it is safe for consumption. Thus, the germinated millet flour shows potential as a functional claim in

the modulation of the adipogenesis and glucose metabolism. Therefore, we suggest that this cereal should be added to human food intake.

## 6. REFERENCES

Ter Horst KW, Serlie MJ. Fructose consumption, lipogenesis, and non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrients*. 2017.

Cornu M, Albert V, Hall MN. MTOR in aging, metabolism, and cancer. *Current Opinion in Genetics and Development*. 2013.

Giriş M, Doğru-Abbasoğlu S, Soluk-Tekkeşin M, Olgaç V, Uysal M. Effect of betaine treatment on the regression of existing hepatic triglyceride accumulation and oxidative stress in rats fed on high fructose diet. *Gen Physiol Biophys*. 2018;

Polacow VO, Lancha AH. Dietas hiperglicídicas: Efeitos da substituição isoenergética de gordura por carboidratos sobre o metabolismo de lipídios, adiposidade corporal e sua associação com atividade física e com o risco de doença cardiovascular. Vol. 51, *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*. ABE&M; 2007. p. 389–400.

Taylor JRN. Millet Pearl: Overview. In: *Encyclopedia of Food Grains: Second Edition*. 2015.

Mezzomo TR, Nadal J. EFEITO DOS NUTRIENTES E SUBSTÂNCIAS ALIMENTARES NA FUNÇÃO TIREOIDIANA E NO HIPOTIREOIDISMO. *DEMETRA Aliment Nutr Saúde*. 2016;

Benincasa P, Falcinelli B, Lutts S, Stagnari F, Galieni A. Sprouted grains: A comprehensive review. *Nutrients*. 2019 Feb 1;11(2).

Ren X, Yin R, Hou D, Xue Y, Zhang M, Diao X, et al. The Glucose-Lowering Effect of Foxtail Millet in Subjects with Impaired Glucose Tolerance: A Self-Controlled Clinical Trial. *Nutrients*. 2018 Oct 15;10(10):1509.

Pradeep PM, Sreerama YN. Phenolic antioxidants of foxtail and little millet cultivars and their inhibitory effects on  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase activities. *Food Chem*. 2018 May 1;247:46–55.

Prasad SV, Natava R, Rao GA, Issue CV. Antihyperglycemic and Antioxidant Effects of Pennisetum glaucum Seed Extracts in STZ Induced Diabetic Rats. *J Pharm Chem*. 2012;6(3):1–10.

AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International - 20th Edition, 2016. 20th ed. Gaithersburg: AOAC. 2016. p. 3172.

Swain T, Hillis WE. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I.—The quantitative analysis of phenolic constituents. *J Sci Food Agric*. 1959 Jan;10(1):63–8.

MAXSON, E. D. e ROONEY LM. Evaluation of methods for tannin analysis in

sorghum grain. *Cereal Chem.* 1972;

Price ML, Van Scoyoc S, Butler LG. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J Agric Food Chem.* 1978 May;26(5):1214–8.

Bloor SJ. Overview of methods for analysis and identification of flavonoids. *Methods Enzymol.* 2001;335:3–14.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *J Nutr.* 1993 Nov 1;123(11):1939–51.

Hamid A, Hussain J. HYPOGLYCEMIC EFFECT OF DIETARY FIBER FEEDS MADE FROM DIFFERENT VARIETIES OF MILLET ON STREPTOZOTOCIN INDUCED DIABETIC RATS. Vol. 69, *Pakistan Journal of Science.* 2017.

Marineli R da S, Moura CS, Moraes ÉA, Lenquiste SA, Lollo PCB, Morato PN, et al. Chia (*Salvia hispanica* L.) enhances HSP, PGC-1 $\alpha$  expressions and improves glucose tolerance in diet-induced obese rats. *Nutrition.* 2015;31(5):740–8.

Reynés B, García-Ruiz E, Díaz-Rúa R, Palou A, Oliver P. Reversion to a control balanced diet is able to restore body weight and to recover altered metabolic parameters in adult rats long-term fed on a cafeteria diet. *Food Res Int.* 2014 Oct;64:839–48.

Gomes Natal DI, de Castro Moreira ME, Soares Milião M, dos Anjos Benjamin L, de Souza Dantas MI, Machado Rocha Ribeiro S, et al. Ubá mango juices intake decreases adiposity and inflammation in high-fat diet-induced obese Wistar rats. *Nutrition.* 2016 Sep 1;32(9):1011–8.

Kim JH, Kim OK, Yoon HG, Park J, You Y, Kim K, et al. Anti-obesity effect of extract from fermented *Curcuma longa* L. through regulation of adipogenesis and lipolysis pathway in high-fat diet-induced obese rats. *Food Nutr Res.* 2016 Jan 27;60.

Moreira ME de C, Natal DIG, Toledo RCL, Ramirez NM, Ribeiro SMR, Benjamin L dos A, et al. Bacupari peel extracts (*Garcinia brasiliensis*) reduce high-fat diet-induced obesity in rats. *J Funct Foods.* 2017 Feb 1;29:143–53.

Simental-Mendía LE, Rodríguez-Morán M, Guerrero-Romero F. The product of fasting glucose and triglycerides as surrogate for identifying insulin resistance in apparently healthy subjects. *Metab Syndr Relat Disord.* 2008;

Enes BN, Moreira L de PD, Toledo RCL, Moraes ÉA, Moreira ME de C, Hermsdorff HHM, et al. Effect of different fractions of chia (*Salvia hispanica* L.) on glucose metabolism, in vivo and in vitro. *J Funct Foods.* 2020 Aug 1;71:104026.

Owheruo JO, Ifesan BOT, Kolawole AO. Physicochemical properties of malted finger millet (*Eleusine coracana*) and pearl millet (*Pennisetum glaucum*). *Food Sci Nutr.* 2019 Feb 11;7(2):476–82.

Nelson K, Stojanovska L, Vasiljevic T, Mathai M. Germinated grains: a superior whole

grain functional food? *Can J Physiol Pharmacol.* 2013 Jun;91(6):429–41.

Sarita; Ekta singh. Potential of Millets: Nutrients Composition and Health Benefits. *J Sci Innov Res JSIR.* 2016;5(52):46–50.

Diovanella S. Teor de biocompostos em germinados de linhaça (*Linum usitatissimum* L.) e painço (*Panicum miliaceum* L.). IDissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2014. Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas; 2014.

Shukla K, Srivastava S. Evaluation of finger millet incorporated noodles for nutritive value and glycemic index. *J Food Sci Technol.* 2014 Mar 13;51(3):527–34.

Cao H, Chen X. Structures Required of Flavonoids for Inhibiting Digestive Enzymes. *Anticancer Agents Med Chem.* 2012;

Rodrigues SC. EFEITOS DA PINEALECTOMIA E DO BLOQUEIO DA SINALIZAÇÃO DO RECEPTOR DE GLICOCORTICÓIDES SOBRE AS FUNÇÕES METABÓLICAS E INFLAMATÓRIAS HEPÁTICAS. Instituto de Ciências Biomédicas; 2015.

Correia-Santos AM, Suzuki A, Anjos JS, Rêgo TS, Almeida KCL, Boaventura GT. Indução de Diabetes Tipo 2 por dieta hiperlipídica e baixa dose de estreptozotocina em ratas wistar. *Med.* 2012 Oct 30;45(4):432–40.

Wang B, Zhuang R, Luo X, Yin L, Pang C, Feng T, et al. Prevalence of Metabolically Healthy Obese and Metabolically Obese but Normal Weight in Adults Worldwide: A Meta-Analysis. *Horm Metab Res.* 2015 Sep 4;47(11):839–45.

Broetto FN, Brito M do N. Tecido Adiposo Marrom e Obesidade em Humanos. *Saúde e Pesqui.* 2012;5(1).

Bouis HE, Hotz C, McClafferty B, Meenakshi J V., Pfeiffer WH. Biofortification: A new tool to reduce micronutrient malnutrition. *Food Nutr Bull.* 2011 Mar;32(1 SUPPL.).

Oppenheimer JH, Schwartz HL, Surks MI. Propylthiouracil inhibits the conversion of L-thyroxine to L-triiodothyronine. An explanation of the antithyroxine effect of propylthiouracil and evidence supporting the concept that triiodothyronine is the active thyroid hormone. *J Clin Invest.* 1972;51(9):2493–7.

Elnour A, Liedén SÅ, Bourdoux P, Eltom M, Khalid SA, Hambraeus L. The goitrogenic effect of two Sudanese pearl millet cultivars in rats. *Nutr Res.* 1997;

Krishnan R, Dharmaraj U, Malleshi NG. Influence of decortication, popping and malting on bioaccessibility of calcium, iron and zinc in finger millet. *LWT - Food Sci Technol.* 2012;

## 6.2. Artigo 2: GERMINATED MILLET FLOUR (*Pennisetum glaucum* (L.) R. BR.) REDUCES INFLAMMATION, OXIDATIVE STRESS, AND LIVER STEATOSIS IN RATS FED WITH HIGH-FAT HIGH-FRUCTOSE DIET

Submitted on Journal of Cereal Science (Impact Factor: 2.938)

### ABSTRACT

This study investigated the effects of germinated millet flour on inflammation, oxidative stress, adiposity, and liver steatosis in Wistar rats fed with a high-fat high-fructose diet. In phase 1 of the experiment (8 weeks) the animals were separated into a control group with an AIN-93M diet (n = 10) and a high-fat high-fructose group (HFHF) (n = 20) with a diet rich in saturated fat (31%) and fructose (20%). In phase 2 (10 weeks), the control group was maintained on the AIN-93M diet (n = 10) and the HFHF group was divided into HFHF group (HFHF diet, n = 10) and the Millet group (HFHF with germinated millet flour replacing 43.6% dietary fiber, 100% starch, 36% protein and 39% oil in the experimental diet, n = 10). The germinated millet flour reduced ( $p < 0.05$ ), in comparison with HFHF group, the adiposity (24.18±4.45g to millet and 32.89±8.46g to HFHF), triglycerides (100.00±17.93g to millet and 147.8±21.57g to HFHF), uric acid, ALT, NF- $\kappa$ B (131.9±97.14pg/ml to millet and 346.3±58.88pg/ml to HFHF), TNF $\alpha$  (98.80±19.90pg/ml to millet and 141.4±25.12pg/ml to HFHF), platelet/lymphocyte and neutrophil/lymphocyte ratio, liver steatosis, inflammatory infiltrate (0.1880±0.07pg/ml to millet and 1.269±0.17pg/ml to HFHF), MDA levels, and liver collagen deposition. Besides, germinated millet increased ( $p < 0.05$ ) IL-10 (1511±528.50pg/ml to millet and 483.8±91.59pg/ml to HFHF), PPAR $\alpha$  protein, total antioxidant capacity of the liver (0.2825±0.04pg/ml to millet and 0.2075±0.05pg/ml to HFHF) and the activity of SOD and catalase, compared to HFHF group. Thus, germinated millet flour was able to reduce adiposity and liver steatosis and presented anti-inflammatory and antioxidant effects, which highlight its functional biological effects.

**Keywords:** Adiposity; antioxidant activity; IL-10; millet; PPAR- $\alpha$ ; TNF $\alpha$ .

### 1. INTRODUCTION

The consumption of simple carbohydrates, especially fructose, and saturated fat have increased since the past century, because of its use in processed foods, such as

jellies, fast-foods, and soft drinks. The consumption of foods rich in fructose and saturated fat can lead to inflammation and oxidative stress, owing its pro-inflammatory and oxidative characteristics (TER HORST; SERLIE, 2017b). Inflammation contributes to the overproduction of liver triglyceride (TG) that increase fat deposition in tissues and inflammatory response through the activation of pathways, such as tumor necrosis factor (TNF) and nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) (Giriş et al., 2018). The inflammation can be related to platelet/lymphocyte ratio (RPL) and the neutrophil/lymphocyte ratio (RNL), since inflammation increases platelet activation, adhesion and aggregation, increase the neutrophil count, and reduce lymphocytes, because of apoptosis and redistribution to lymphatic organs (Kim et al., 2016).

The accumulation of liver lipid and inflammation contribute to synthesis of reactive oxygen species (ROS), culminating in oxidative stress and less antioxidant capacity (Giriş et al., 2018). These changes induce the hyperuricemia, due to a compensatory mechanism to neutralize ROS, and can lead to greater production of superoxide anion through the activation of enzymes xanthine oxidase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NADPH oxidase), causing increase in oxidative stress. Oxidative stress is controlled by the endogenous antioxidant defense system, which includes antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), and exogenous vitamins (C and E), flavonoids, and carotenoids (FRANCISQUETI *et al.*, 2017). This explains the search for natural foods, rich in bioactive compounds. In this context, millet can be a choice, since it has dietary fibers and bioactive phytochemicals with antioxidant capacity (SHARMA; GUJRAL, 2019).

Millet has shown antioxidant and anti-inflammatory effects as non-germinated grain, once is a source of proteins, lipids, vitamins, minerals, and bioactive compounds, like phenolic acids, flavonoids, gallic acid, syringic acid, p-coumaric and ferulic acid (Chandrasekara and Shahidi, 2012). However, millet contains the compound glycosyl flavone that can inhibit the thyroid enzyme peroxidase (TPO), responsible for the production of thyroid hormones and also phytates that decrease the bioavailability of nutrients. In view of this, it is suggested that these grains be subjected to processing, such as germination, to reduce these compounds and enable safe consumption. Germination is a simple and inexpensive process in which hydrolytic enzymes promote biochemical changes, structural modification and synthesis of new compounds that can increase the nutritional value and stability of the grains. This type of processing reduces

antinutritional factors, such as phytic acid, increasing the bioavailability of vitamins, proteins, minerals and fibers (DIAS-MARTINS et al., 2018).

Owheruo et al. (2019) demonstrated that germinated millet improves the phytochemical composition of the grains and, consequently, their antioxidant properties. However, any studies have evaluated the effects of germinated millet on metabolic changes *in vivo*. Our hypothesis was that germinated millet flour, as a source of fiber and phenolic compounds, can reduce the inflammation, oxidative stress, adiposity and liver fat in adult rats fed with high-fat high-fructose diet. Thus, the objective of this study was to investigate the effects of germinated millet flour on inflammation, oxidative stress, adiposity, and liver fat in rats, fed with high-fat high-fructose diet.

## **2. MATERIAL AND METHODS**

### **2.1. Germinated Millet Flour**

Millet grains (*Pennisetum glaucum* LR Br.), cultivar BRS1502, with 99% germination rate, were soaked in water (1:3 grain/water ratio) for 3 h for germination. The grains were germinated at  $30^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$  and 90% of relative humidity during 24 h, and dried at  $50^{\circ}\text{C}$ , for 4 h. The germination rate was calculated as (total numbers of seed germinated/ total number of seeds) x100. Then, the grains were grinding in a hammer mill LM3100 (Perten Instruments AB, Huddinge, Suécia) to pass through 1.0 mm screens.

This flour consists of 64.5% carbohydrate, 15.1% protein, 7.6% dietary fiber, 5.4% lipids and 3.5 g/100 g of resistant starch (Unpublished data). These data were used to calculate the experimental diet.

### **2.2. Chemical analysis**

The analysis of fatty acid methyl esters was carried out in a gas chromatograph, model GC 2010 Plus (Shimadzu, Japan), equipped with SPLIT injector, capillary column SP-2560 (75 m long  $\times$  18 mm, and diameter 14  $\mu\text{m}$ ) and flame ionization detector (FID). The working temperature of the detector and injector was  $240^{\circ}\text{C}$  and the split ratio was 1:50. The initial temperature of the column was  $150^{\circ}\text{C}$ , maintained for 5 min, then raised to  $180^{\circ}\text{C}$  at a rate of  $2^{\circ}\text{C}$  per minute and maintained in isotherm for 12 min. Finally, the temperature was raised to  $220^{\circ}\text{C}$  at a rate of  $4^{\circ}\text{C}$  per minute and then kept in isotherm for 9 min.

A mixture of 37 fatty acid methyl esters (Supelco, USA), from C4:0 to C24:1, was used as standard. The fatty acids were identified according to retention times and quantification was done by normalizing the area (%) (adapted from Silva *et al.*, 2019).

The resistant starch content (RS) was determined through simulated digestion with pancreatic  $\alpha$ -amylase and amyloglucosidase, using a commercial kit (Resistant star assay kit AACC 32-40, Megazyme, Sydney, Australia), as instructions of manufacturer. The content of total phenolic compounds in the sorghum extract was determined using the Folin-Ciocalteu method (Singleton; Orthofer; Lamuela-Ravento, 1999). The determination of the total tannin content was performed by the vanillin/HCl reaction method, according to Price; Van Scoyoc; Butler (1978).

### 2.3. Animal study

Thirty male Wistar rats (*Rattus norvegicus*), 21 days old, received a commercial diet for 19 days. Then, the experiment was divided into two phases. In the first phase, to induce metabolic changes, the animals were randomly divided into two groups, according to body weight (wt): control group (wt  $155.98 \pm 17.05$ g, n = 10), which received AIN93-M (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993) diet and HFHF group (wt  $158.03 \pm 17.81$ g, n = 20), which received a diet rich in saturated fat (31%) and fructose (20%) (high-fat high-fructose diet), during 8 weeks (adapted from Marineli *et al.*, 2015). After this period, the animals were fasted for 12 hours to collect blood by capillarity for the analysis of the triglycerides concentration, using the commercial kit Accutrend GCT (Roche, Santo Andre, Brazil) device according the manufacturer's instructions. Triglycerides levels were used together with morphometric measurements to confirm the effects of the HFHF diet.

The second phase of the experiment consisted of intervention. The control group (AIN-93M; wt  $349.94 \pm 30.71$ g, n = 10) kept receiving normal diet AIN-93M and the animals from previous HFHF group were redistributed into two groups: HFHF control (wt  $366.89 \pm 36.90$ g, n = 10), which maintained a high-fat high-fructose diet, and millet group (wt  $370.12 \pm 36.49$ g, n = 10) with HFHF diet added with germinated millet flour, for more 10 weeks (adapted from Marineli *et al.*, 2015). In all stages, the animals received water and diet *ad libitum*.

The millet diet had replacement of 43.6% of dietary fiber (21.76g), according to recommendation for rodents (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993), from germinated millet flour. In this way, 286.3g of flour/kg diet were used, which provided the

replacement of 100% starch, 36% protein, and 39% oil. The HFHF group received a diet with high lipid content (4% soy oil and 31% lard), in addition to 20% fructose (Marineli et al., 2015) (**Table 1**).

**Table 1:** Composition of the experimental diets

<b>Ingredients (g/kg-1)</b>	<b>AIN93-M</b>	<b>HFHF</b>	<b>Millet</b>
Albumin*	136.6	136.6	87.3
Corn starch	463.5	135.0	-
Dextrinized starch	155.0	45.0	-
Sucrose	100.0	28.6	8.6
Lard	-	310.0	310.0
Soy oil	40.0	40.0	24.5
Cellulose	55.8	55.8	34.0
Mineral mix	35.0	35.0	35.0
Vitamin mix	10.0	10.0	10.0
L-cystine	1.8	1.8	1.8
Choline Bitartrate	2.5	2.5	2.5
Resistant starch	-	-	10.1
Germinated millet flour	-	-	286.3
Fructose	-	200.0	200.0
Total phenolics	-	-	0.6
Condensed tannins	-	-	0.1
<b>Composition of diets (%)</b>			
Carbohydrate	73.2	42.5	40.3
Protein	12.0	12.0	12.0
Lipid	4.0	35.0	35.0
<b>Caloric density (kJ)</b>	<b>158.99</b>	<b>221.75</b>	<b>217.57</b>

Composition of the experimental diets based on standard rodent diet (AIN-93M) (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). HFHF: high-fat high-fructose diet; Millet: test diet containing HFHF added of germinated millet flour, replacing 43.6% dietary fiber, 100% starch, 36% protein and 39% oil. \* Albumin based on 88% protein content.

After the 10<sup>th</sup> week, the animals were anesthetized with isoflurane and euthanized by cardiac puncture. Blood was collected in a heparin tube and centrifuged at 1008 g for 15 minutes at 4°C to collect plasma. The adipose tissues (mesenteric, retroperitoneal, and epididymal) were washed with saline solution (PBS), weighed, immersed in liquid nitrogen, and later stored at -80° C. The liver was also removed, washed in saline solution (PBS), part of which was fixed in 10% formaldehyde and kept

at room temperature for later histological analysis, and the remaining was stored at -80°C until the time of analysis

The study was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Federal University of Viçosa (CEUA / UFV), process n ° 39/2019. All the experimental procedures with animals were performed in accordance with Directive 86/609/EEC of November 24, 1986, in compliance with the ethical principles for animal experimentation

#### **2.4. Feed Efficiency Ratio, Energy Efficiency Ratio, and Biometric Measures**

Food consumption and animal weight were obtained weekly. The feed efficiency ratio (FER) was obtained through the relationship between body weight gain (g) and the amount of diet (g) consumed by the animals. The energy efficiency ratio (EER) was obtained by the final body weight gain (g) divided by the total energy consumption (kcal) multiplied by 100.

An inelastic measuring tape was used to measure waist circumference and naso-anal length, which were used to calculation of Lee index. The total body fat was obtained by sum of mesenteric, retroperitoneal, and epididymal adipose tissue fat.

#### **2.5. Biochemical Analysis**

Plasma concentrations of aspartate aminotransferase (AST; code k048-6, Bioclin, Belo Horizonte, Brazil), alanine aminotransferase (ALT; code k049-6, Bioclin, Belo Horizonte, Brazil), and uric acid (code k139-2, Bioclin, Belo Horizonte, Brazil) were evaluated by colorimetric methods. In addition, the platelet/lymphocyte ratio (RPL) and neutrophil/lymphocyte ratio (RNL) were calculated as the ratio between the number of platelets and neutrophils with lymphocytes, respectively.

The concentration of triglycerides was measured at the end of the period of induction of metabolic changes (phase 1) and after 10 weeks of intervention, before euthanasia (phase 2). The blood collection was done by capillarity, using the ACCUCHEK Active and Accutrend GCT (Roche, Santo Andre, Brazil) device according to the manufacturer's instructions.

#### **2.6. Quantification of p65-Nuclear Factor Kappa B and Peroxisome Proliferator-activated receptors alpha and Cytokines in liver tissue**

The liver homogenate was prepared using a 50 mM phosphate buffer with 1 mM EDTA (pH 7.4), containing protease inhibitor (Protease Inhibitor Cocktail powder, code P2714; Sigma Aldrich, St. Louis, USA), in a 1:10 (wt:v) proportion of tissue and buffer. The concentrations of IL-10 and TNF $\alpha$  were quantified in liver homogenates using Rat IL-10 kit ELISA (code E-EL-R0016, Elabscience, Houston, USA) and Rat TNF alpha Uncoated ELISA kit (code #88-7340-88, Invitrogen, Vienna, Austria), respectively, as recommended by manufacturers.

The p65-NF- $\kappa$ B and PPAR- $\alpha$  were quantified in the nuclear fraction of liver tissue, which were extracted using NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents kit (code 78835; Thermo Scientific, Vienna, Austria). To quantify p65-NF- $\kappa$ B was used the commercial kit Rat NF- $\kappa$ B-p65 ELISA (code E-EL-R0674; Elabscience, Houston, USA) and for PPAR- $\alpha$ , the kit Rat PPAR- $\alpha$  ELISA (code E-EL-R0725; Elabscience, Houston, USA), following manufacturers' recommendations. The concentrations of IL-10, TNF $\alpha$ , p65-NF- $\kappa$ B, and PPAR- $\alpha$  were calculated by comparison to the corresponding standard curves.

## **2.7. Antioxidant Enzymes and Total Antioxidant Capacity**

The total protein concentrations were quantified in liver homogenates by Bradford (1976). The quantification of Superoxide Dismutase (SOD) was performed in relative units, and one unit was defined as the amount of SOD enzyme that inhibits the auto-oxidation of pyrogallol. The analysis was carried out on a spectrophotometer (Multiskan GO, Thermo Scientific; Vienna, Austria) at 570 nm, and the results were expressed as units of SOD per milligram of protein (Marklund, 1985).

Catalase (CAT) was determined in liver by the ability to cleave hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in water. Catalase activity was analyzed at 0, 30, and 60 s after the reaction was initiated and the absorbance was read at 240 nm on a spectrophotometer (T70+UV/VIS Spectrometer) (Aebi, 1984).

The Total Antioxidant Capacity (TAC) was measured in the liver homogenate and plasma using the commercial antioxidant assay kit (code MAK187; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), according to the manufacturer's specifications. Malondialdehyde (MDA) was measured by the method of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), according to the methodology described by Buege e Aust (1978).

## **2.8. Histological analysis in liver tissue**

The liver tissue was fixed in 10% formaldehyde and later embedded in resin. The gomori trichrome was used for counting inflammatory infiltrate and lipid vesicles and the slides were photographed under a bright field microscope (Olympus AX 70 TRF, Tokyo, Japan). Picrosirius staining was used to quantify type I, III and total collagen and the slides were photographed under a light microscope (Olympus BX53 monochrome photomicroscope) with a polarizing filter coupled to an image analyzer. The analyses were performed using the Image J® 1.48v software system (National Institute of Health, USA) in a histological field with a reticule of 266 points on the images until reaching the sum of 1064 points per animal, using a 20x objective. The degree of steatosis was assessed semi-quantitatively, according to a scale of 5 degrees: grade 0, if the percentage of fat was absent or less than 5%; Grade 1, if  $\geq 5\%$  and  $<25\%$ ; Grade 2, if  $\geq 25\%$  and  $<50\%$ ; Grade 3, if  $\geq 50\%$  and  $<75\%$ ; and grade 4, if  $\geq 75\%$  (TURLIN *et al.*, 2001).

## 2.9. Statistical Analysis

The results were expressed as means  $\pm$  standard deviation. The data were submitted to normality tests of Shapiro-Wilk and Kolmogorov-Smirnov. The one-way analysis of variance (ANOVA) was applied, followed by the Newman-Keuls test, at 5% of significance. The statistical analysis and graphic were performed using the GraphPad Prism software system, version 6.0.

## 3. RESULTS

### 3.1. Germinated millet flour reduced adiposity and biochemical variables, increase the phenolics and fatty acids consumption, and had any effects biometric measurements

It was observed that the intake of the HFHF diet, in phase I of the experiment, caused an increase of 58.92% of the animals' weight. The animals in the control group (standard diet) had a 55.42% increase in body weight in phase 1. After 18 weeks of the experiment (the end of phase 2), there was no difference in body weight (**Table 2**), waist circumference, and Lee index among the experimental groups. However, the total body fat was higher ( $p < 0.05$ ) in animals from the HFHF group. Germinated millet flour reduced ( $p < 0.05$ ) adiposity in comparison to the HFHF group, which was similar to the AIN-93M control group (**Table 2**). Besides, the animals fed with the germinated millet

flour decreased ( $p < 0.05$ ) triglycerides, uric acid, and ALT relative to group HFHF, however, AST levels did not differ between the experimental groups (**Table 2**).

The control group AIN-93M had higher ( $p < 0.05$ ) food consumption and lower ( $p < 0.05$ ) food efficiency ratio (FER), compared to the HFHF and millet groups. However, the energy efficiency ratio (EER) did not differ between the experimental groups.

The germinated millet flour consists of 2.17mg GAE/g of total phenolics, 0.42mg CE/g of condensed tannins, and 3.5 g/100 g of resistant starch. In the total diet consumed, throughout the intervention, the animals of the millet group consumed 10.39g of resistant starch, 0.64g of total phenolics, 0.12g of condensed tannins, 132.06mg of linoleic acid, 63.87mg of oleic acid, 52.42mg of palmitic acid, 17.80mg of stearic acid and 12.68mg of lauric acid from the flour (**Table 2**).

**Table 2:** Effect of germinated millet flour on adiposity, biochemical variables, and profile of food consumption in the animals induced to metabolic changes with the HFHF diet, after 10 weeks of intervention.

Variables	AIN-93M	HFHF	Millet
<b>Adiposity</b>			
Total body fat (g)	20.08 ± 2.67 <sup>b</sup>	32.89 ± 8.46 <sup>a</sup>	24.18 ± 4.45 <sup>b</sup>
<b>Biochemical variables</b>			
Triglycerides (mg/dL)	117.8 ± 20.37 <sup>b</sup>	147.8 ± 21.57 <sup>a</sup>	100.0 ± 17.93 <sup>b</sup>
Uric acid (mg/dL)	1.17 ± 0.51 <sup>b</sup>	2.13 ± 0.56 <sup>a</sup>	1.17 ± 0.47 <sup>b</sup>
ALT (U/L)	31.13 ± 9.67 <sup>b</sup>	52.14 ± 11.26 <sup>a</sup>	39.29 ± 4.82 <sup>b</sup>
AST (U/L)	120.9 ± 17.19 <sup>a</sup>	130.3 ± 11.81 <sup>a</sup>	120 ± 25.35 <sup>a</sup>
<b>Biometric Measurements</b>			
Initial weight (g) *	349.90 ± 30.71 <sup>a</sup>	366.90 ± 36.90 <sup>a</sup>	370.10 ± 36.49 <sup>a</sup>
Final weight (g)	415.00 ± 34.52 <sup>a</sup>	438.10 ± 66.65 <sup>a</sup>	443.50 ± 28.21 <sup>a</sup>
Weight gain (g)	68.00 ± 10.71 <sup>a</sup>	64.96 ± 18.07 <sup>a</sup>	75.79 ± 21.46 <sup>a</sup>
Waist circumference (cm)	18.85 ± 0.78 <sup>a</sup>	19.02 ± 0.64 <sup>a</sup>	19.41 ± 0.51 <sup>a</sup>
Lee index (g/cm <sup>3</sup> )	292.80 ± 14.55 <sup>a</sup>	297.90 ± 13.79 <sup>a</sup>	303.20 ± 8.87 <sup>a</sup>
<b>Food Consumption **</b>			

Total food consumption(g)	1367.00 ± 69.07 <sup>a</sup>	990.10 ± 59.44 <sup>b</sup>	1028.00 ± 23.78 <sup>b</sup>
FER (%)	4.73 ± 0.96 <sup>b</sup>	7.23 ± 2.04 <sup>a</sup>	8.13 ± 1.03 <sup>a</sup>
EER (%)	1.40 ± 0.30 <sup>a</sup>	1.41 ± 0.50 <sup>a</sup>	1.59 ± 0.20 <sup>a</sup>
Resistant starch (g)	-	-	10.39
Total phenolics (g)	-	-	0.64
Condensed tannins (g)	-	-	0.12
Linoleic acid (mg)	-	-	132.06
Oleic acid (mg)	-	-	63.87
Palmitic acid (mg)	-	-	52.42
Stearic acid (mg)	-	-	17.80
Lauric acid (mg)	-	-	12.68

\* Initial weight: measured at the beginning of the Phase II (intervention). \*\* Food consumption: Sum of all consumption during the intervention. Values expressed as means and standard deviation (n = 10/group). Different letters in line indicate significant differences by the Newman-Keuls test, at 5% probability. AIN-93M group: Animals fed with standard diet; HFHF group: high-fat high-fructose diet; millet: HFHF diet added of germinated millet flour. ALT: Alanine aminotransferase; AST: Aspartate aminotransferase; FER: Food efficiency ratio; EER: Energy efficiency ratio.

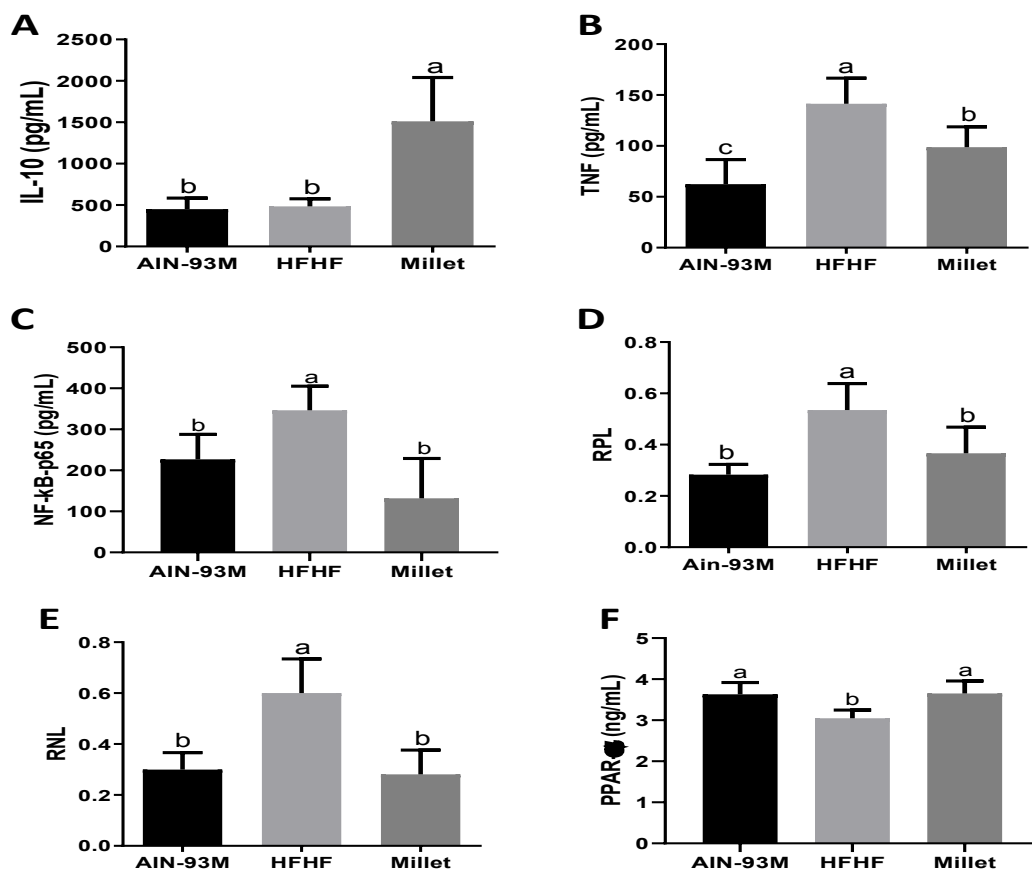
### 3.2. Germinated millet flour increases anti-inflammatory cytokine and reduces the inflammatory markers, collagen deposition, and liver steatosis

The millet group presented higher ( $p < 0.05$ ) concentrations of anti-inflammatory cytokine IL-10 compared to the HFHF group and AIN-93M control (**Figure 1A**). Also, germinated millet flour reduced ( $p < 0.05$ ) TNF $\alpha$  concentrations compared to the HFHF group but remained higher than AIN-93M control (**Figure 1B**). Furthermore, the millet group had the lowest values of p65-NF- $\kappa$ B (**Figure 1C**), RPL (**Figure 1D**), and RNL (**Figure 1E**) ( $p < 0.05$ ) than the HFHF group, which was similar ( $p > 0.05$ ) to the AIN-93M group. The germinated millet flour increased ( $p < 0.05$ ) the concentration of PPAR- $\alpha$  protein, which was similar to the AIN-93M control group (**Figure 1F**).

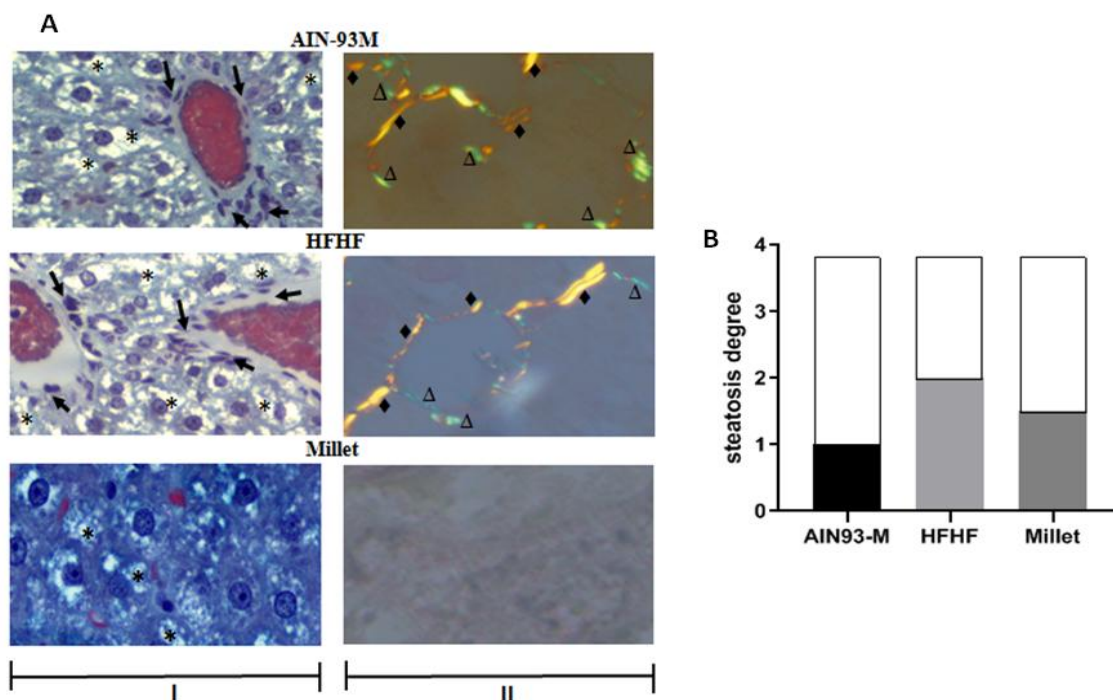
The germinated millet flour increased ( $p < 0.05$ ) the concentration of PPAR- $\alpha$  protein, which was similar to the AIN-93M control group (**Figure 1F**).

As for liver histomorphometry, the animals in the AIN-93M group presented 14.1% lipids into liver, which was classified as grade 1 steatosis. The HFHF diet

increased ( $p < 0.05$ ) this percentage to 30.2% and was classified as grade 2 steatosis. The germinated millet flour reduced this percentage ( $p < 0.05$ ) to 23.7%, thus reverting steatosis back to grade 1 (**Figure 2**). The millet group presented a lower ( $p < 0.05$ ) amount of inflammatory infiltrates and collagen deposition (type I, type III, and total collagen), compared to the AIN-93M and HFHF groups (**Figure 2**).



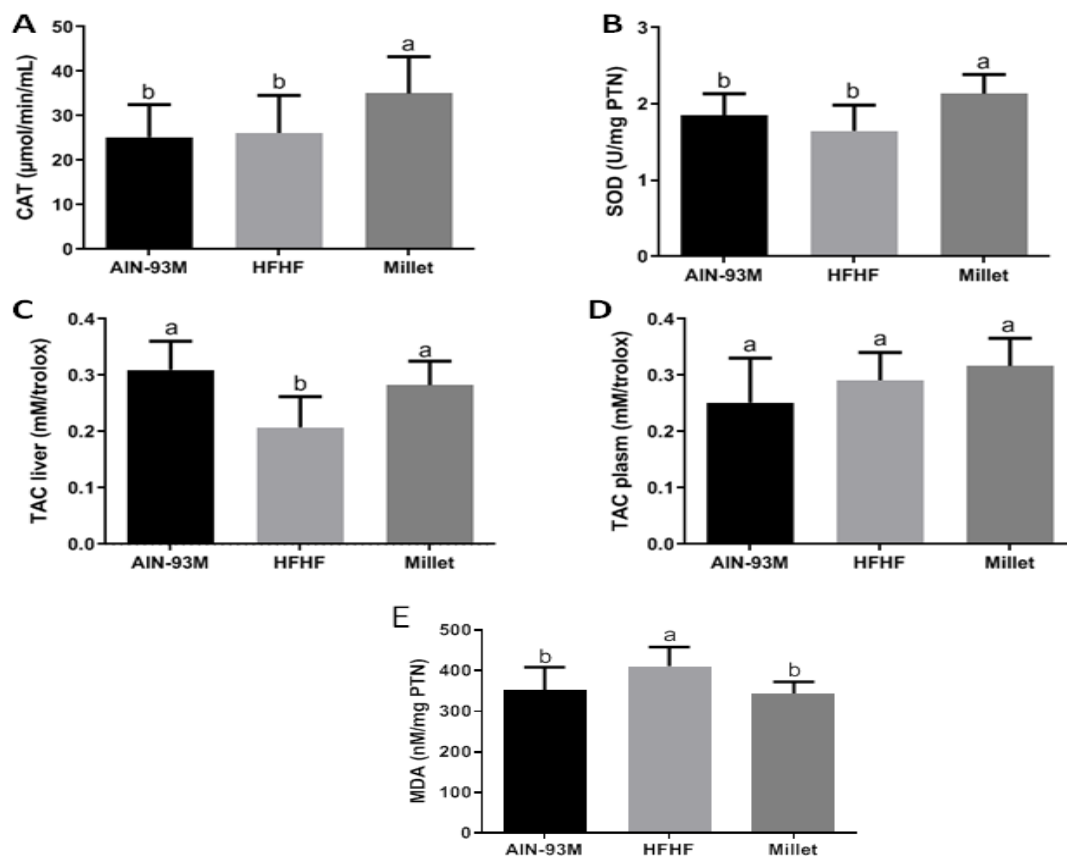
**Figure 1.** Effect of germinated millet flour in inflammatory markers in animals induced to metabolic changes with the HFHF diet, after 10 weeks of intervention. Quantification of interleukin 10 (IL-10) (A); tumor necrosis factor ( $\text{TNF}\alpha$ ) (B); nuclear factor kappa B (p65-NF- $\kappa$ B) (C); platelet/lymphocyte ratio (RPL) (D); neutrophil/lymphocyte ratio (RNL) (E) and peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR $\alpha$ ) (F). The concentration of IL-10,  $\text{TNF}\alpha$ , p65-NF- $\kappa$ B and PPAR- $\alpha$  were measure in liver tissue by ELISA test. The RPL and RNL were analyzed using a leukogram-calorimetric tests. Values expressed as means and standard deviation (n = 10/group). Different letters indicate significant differences by Newman-Keuls test at 5% probability. AIN-93M group: Animals fed with standard diet; HFHF group: high-fat high-fructose diet; millet: HFHF diet added with germinated millet flour.



**Figure 2:** Effect of germinated millet flour in liver steatosis, inflammatory infiltrate and collagen deposition in the liver of animals induced to metabolic changes with the HFHF diet, after 10 weeks of intervention. Representative photomicrographs of liver cuts. AIN-93M group: Animals fed with standard diet; HFHF group: high-fat high-fructose diet; millet: HFHF diet added with germinated millet flour (A). The percentage of fat was classified in degrees of liver steatosis, according to the classification proposed by Turlin et al., (2001) (B). (\*): Lipid vesicles; (→): Inflammatory infiltrate; (◆): Type I collagen; (Δ): Type III collagen. Staining was carried out with gomori (I- steatosis) and picrosirius trichrome (II-collagen). Bar: 20  $\mu$ m. Objective: 20x.

### 3.3. Germinated millet flour increases SOD, CAT, and total liver antioxidant capacity

The consumption of germinated millet flour increased ( $p < 0.05$ ) the antioxidant enzymes CAT (**Figure 3A**) and SOD (**Figure 3B**) in relation to the AIN-93M and HFHF groups. In addition, the TAC of the liver was higher in the millet group, compared with the HFHF group and similar to the control group AIN-93M (**Figure 3C**). The plasmatic TAC did not differ between the experimental groups (**Figure 3D**). However, the MDA levels reduced in comparison with the HFHF group ( $p < 0.05$ ) and became similar to the AIN-93 group (**Figure 3E**).



**Figure 3.** Effects of germinated millet flour in antioxidant capacity of the liver in animals induced to metabolic changes with the HFHF diet, after 10 weeks of intervention. Catalase (CAT) (A); superoxide dismutase (SOD) (B) Total antioxidant capacity (TAC) in liver (C); TAC in plasma (D); Malondialdehyde (MDA) (E). Values expressed as means and standard deviation ( $n = 10/\text{group}$ ). The CAT, SOD, TAC, and MDA were measured using colorimetric analysis. Different letters indicate significant differences by Newman-Keuls test at 5% probability. AIN-93M group: Animals fed with standard diet; HFHF group: high-fat high-fructose diet; millet: HFHF diet added with germinated millet flour.

#### 4. DISCUSSION

The present study demonstrated that germinated millet flour increased anti-inflammatory cytokine and reduced inflammatory markers, in addition to presenting antioxidant activity, and reduced adiposity and liver steatosis, thus minimizing the metabolic changes induced by HFHF diet in adult Wistar rats.

The germinated millet flour reduced the concentration of ALT, triglycerides and adiposity and increased PPAR- $\alpha$  concentration, compared to the animals fed with

HFHF diet. The presence of fatty acids, dietary fiber (7.6%) and resistant starch (3.5%) in the millet flour may have provided these effects, increasing lipid oxidation and reducing body fat and triglycerides. Fatty acids, such as palmitic acid, oleic acid and linoleic acid, can bind directly to PPAR- $\alpha$  and act as agonists, which increases the expression and activity of this receptor (HAN *et al.*, 2017), as observed in our study. Thus, increasing the concentration of PPAR- $\alpha$  may have increased the expression of the genes involved in the peroxisomal and mitochondrial  $\beta$ -oxidation pathways, thus playing an important role in the oxidation of fatty acids. Therefore, the germinated millet flour was able to recover the concentration of PPAR- $\alpha$  and increase the oxidation of fatty acids, which reduced the deposition of fat in tissues and liver and adiposity, besides reverting steatosis to grade 1.

The HFHF diet induced inflammation and oxidative stress without affecting the weight, waist circumference, Lee index and EER of the animals. The lower food consumption in groups fed a high fat high fructose diet (HFHF and Millet) probably was owing to the higher caloric density, which increases the satiety and control food intake. These results corroborate with the study of Stanhope (2016), that also does not observe any difference either in weight gain or total energy intake in animals fed with HFHF diet. The non-change in AST concentration between the experimental groups can be explained by its short half-life (12h) and rapid normalization in blood.

The germinated millet flour was able to reduce inflammation by activating the anti-inflammatory cytokine IL-10 and reducing TNF $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, RPL and RNL, which consequently reduced the inflammatory infiltrate into liver tissue. These effects can be related with the polyphenols and prebiotics (dietary fiber and resistant starch) present in the millet, which gave it an anti-inflammatory and antioxidant potential. In our study, germinated millet flour provided a consumption of 0.72g/kg/day of dietary fiber and 0.33g/kg/day of resistant starch. These effects may have been improved with the consumption of 20mg/kg/day of total phenolics and 4mg/kg/day of condensed tannins, which are effective in reducing inflammation (YAHFOUFI *et al.*, 2018).

In addition, germinated millet flour increased the activity of SOD and CAT, recovered the total antioxidant capacity of the liver and reduced uric acid concentration. The bioactive compounds and prebiotics present in the germinated millet flour may also have reduced oxidative stress, by modulating inflammation, mainly phenolic compounds. These compounds are able to inhibit enzymes responsible of ROS generation, such as NADPH oxidase (NOX) and xanthine oxidase, and increase

endogenous antioxidant enzymes like SOD, CAT, and glutathione (YAHFOUFI *et al.*, 2018), contributing to improving the antioxidant activity in cells, reducing the lipid peroxidation since MDA levels were reduced by germinated millet, as we observed in this study. Plasmatic TAC did not increase in the millet group, probably due to the low half-life of phenolic compounds in plasma, preventing them from being detected in the analyzes (Grgić *et al.*, 2020).

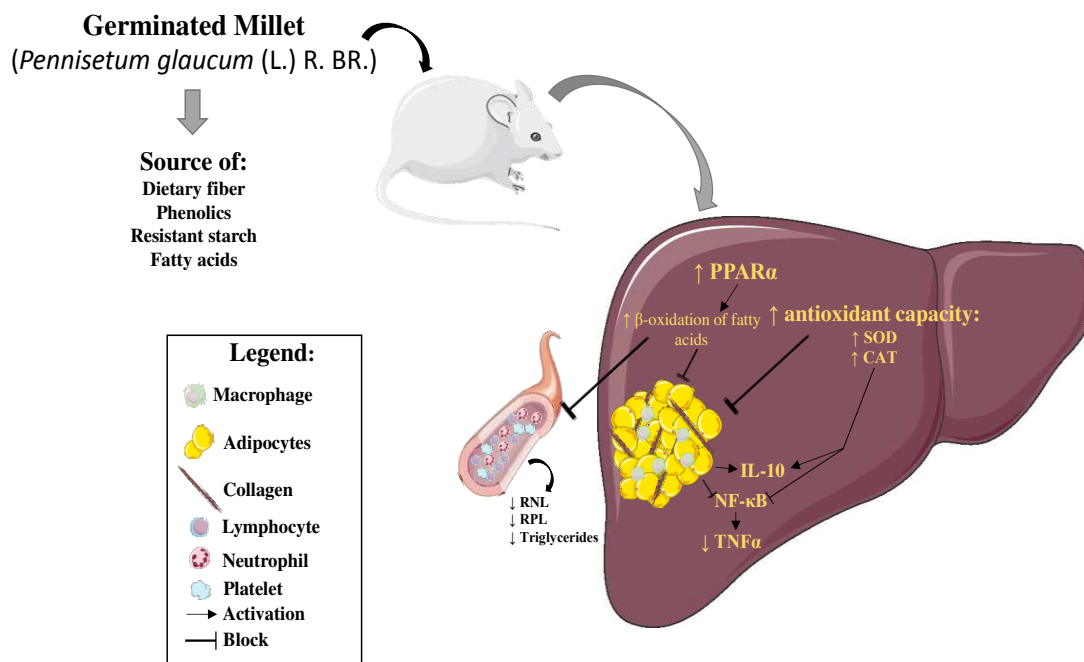
The oxidative stress, in addition to being related to inflammation, can also be caused by liver damage, which in turn produces more ROS, generating a vicious circle. The imbalance of oxidative stress affects the transcription of numerous biochemical mediators, such as cytokines, mainly TNF $\alpha$  and Transforming Growth Factor (TGF- $\beta$ ), which are able to modulate the tissue and cellular events that characterize different types of chronic liver damage, such as apoptosis, necrosis, fibrosis, cholestasis and regeneration (VITAGLIONE *et al.*, 2005). These evidences were observed in our study, in which the HFHF induced high inflammation with high levels of TNF $\alpha$ , and decreasing antioxidant defenses, and caused liver damage.

The HFHF diet promoted grade II steatosis, which led to a redox imbalance, with local inflammation and collagen deposition. The same was observed by Feillet-Coudray *et al.*, (2019), who demonstrated the presence of steatosis, while Balakumar *et al.*, (2016) observed an increased collagen deposition around the portal triad in the animals fed with HFHF diet. Although liver damage markers AST and ALT did not increase, the control group AIN-93M presented fat and collagen deposition in the liver, in addition to inflammatory infiltrate. These results may have occurred from the increased synthesis of liver fatty acids, by means of the activation of the *de novo* lipogenesis pathway, because of the large amount of carbohydrate (73%) present in the AIN-93M diet (Ferramosca *et al.*, 2013). Furthermore, the reduction of steatosis and inflammation by germinated millet flour probably prevented the formation of collagen into liver tissue and reduced its damage in animals fed with this germinated grain.

Millet is considered a subsistence crop, which is consumed in human food only in developing countries (Dias-Martins *et al.*, 2018). In the present study, an amount equivalent to a cup of tea of germinated millet flour was used, which corresponds to a human consumption of 142.8g per day. This amount can be achieved through use of this flour in the preparation of cakes, cookies and pasta, increasing the supply of nutrients and bioactive compounds with beneficial effects on the body. The use of millet in culinary preparations may involve the use of dry heat (roasting), pressure cooking, use

of microwaves, among other methods. These processes can be related to changes in the concentration and even in the bioaccessibility of nutritional compounds. It was demonstrated that roasting millet (150 °C, 5min) there was an increase in the total number of polyphenols and flavonoids in the cereal, but the use of microwave (300, 450, and 600 W for 3 min) and open-pan boiling (excess of water in an open-pan at 5, 10 and 15 min) reduced the total of these compounds compared to the raw grain. However, all the processes used in the study, as roasting, germinating (48 h to germination), open-pan boiling, or pressure-cooking (triple distilled water for 15–20 min), led to an increased bioaccessibility of polyphenols and flavonoids. Therefore, although some culinary processes can reduce the content of bioactive compounds, it also makes them more accessible for use by intestinal bacteria and intestinal absorption (Hithamani, Srinivasan, 2014). In addition, a study by our research group showed that cooking in an open-pan boiling did not reduce macronutrients (carbohydrates, proteins, fibers, and lipids) and mineral content (potassium, magnesium, calcium, manganese, iron, zinc, copper, and phosphor) (unpublished data).

Therefore, in view of our results, we propose that the consumption of germinated millet is able to increasing the expression of PPAR $\alpha$ , which increased the  $\beta$ -oxidation of fatty acids, thus reducing the levels of triacylglycerol and accumulation of lipids into adipocytes, reducing fat boy and consequently hepatic steatosis. With less adipose tissue, the migration of macrophages into it is reduced, leading to less activation of NF- $\kappa$ B and consequently less pro-inflammatory factors were formed, such as TNF $\alpha$ , in addition to better functionality of the blood immune cells, improving the values of RPL and RNL. On the other hand, anti-inflammatory factors were stimulated, such as IL-10. Furthermore, the phenolic compounds present in millet stimulated the expression of antioxidant enzymes, such as CAT and SOD in the liver, reducing oxidative stress with consequent less inflammatory stimulation in the liver tissue, reducing inflammatory infiltrates and collagen deposition. All of these changes helped to reverse the metabolic damage caused by a diet rich in saturated fat and fructose (**Figure 4**).



**Figure 4.** Schematic figure of the effects of millet germinating on metabolic changes caused by a diet rich in saturated fat and fructose. The germinated millet increased the expression of PPAR $\alpha$ , which induced the  $\beta$ -oxidation of fatty acids and reduced the levels of triacylglycerol. Therefore, less fat deposition occurred in the liver, reducing hepatic steatosis, which reduced the expression of NF- $\kappa$ B and the production of pro-inflammatory factors, such as TNF $\alpha$ , in addition to stimulating a better blood cellular immune response. In addition, the germinated millet increased the production of antioxidant enzymes, such as catalase and superoxide dismutase, which reduced oxidative stress and helped reduce inflammation. PPAR $\alpha$ : Peroxisome Proliferator Activated Receptor Alpha; SOD: Superoxide Dismutase; CAT: catalase; IL-10: Interleucina-10; NF- $\kappa$ B: Nuclear fator kappa B; TNF $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor Alpha; RNL: Neutrophil/lymphocyte ratio; RPL: Platelet/lymphocyte ratio.

## 5. CONCLUSION

The germinated millet flour showed anti-inflammatory, antioxidant action in high-fat and high-fructose fed rats, besides reducing adiposity and liver steatosis, which opening a new field of investigation against the chronic diseases. Given the results, we must promote the insertion of millet in human food, since it worked as a functional food in the present study and can be easily inserted into suitable culinary preparations. However, technological properties of this flour and the impact of food processing must

be further investigated to guarantee the preservation of the functional outcomes observed in this study.

## 6. REFERENCES

Aebi, H., 1984. Catalase in Vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)

Balakumar, M., Raji, L., Prabhu, D., Sathishkumar, C., Prabu, P., Mohan, V., Balasubramanyam, M., 2016. High-fructose diet is as detrimental as high-fat diet in the induction of insulin resistance and diabetes mediated by hepatic/pancreatic endoplasmic reticulum (ER) stress. *Mol. Cell. Biochem.* 423, 93–104. <https://doi.org/10.1007/s11010-016-2828-5>

Buege, J., A.; Aust, S., D., 1978. Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods in Enzymology.* 52, 302–310.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Chandrasekara, A., Shahidi, F., 2012. Bioaccessibility and antioxidant potential of millet grain phenolics as affected by simulated in vitro digestion and microbial fermentation. *J. Funct. Foods* 4, 226–237. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.11.001>

Dias-Martins, A.M., Pessanha, K.L.F., Pacheco, S., Rodrigues, J.A.S., Carvalho, C.W.P., 2018. Potential use of pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) in Brazil: Food security, processing, health benefits and nutritional products. *Food Res. Int.* 109, 175–186. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.023>

Feillet-Coudray, C., Fouret, G., Vigor, C., Bonafos, B., Jover, B., Blachnio-Zabielska, A., Rieusset, J., Casas, F., Gaillet, S., Landrier, J.F., Durand, T., Coudray, C., 2019. Long-Term Measures of Dyslipidemia, Inflammation, and Oxidative Stress in Rats Fed a High-Fat/High-Fructose Diet. *Lipids.* <https://doi.org/10.1002/lipd.12128>

Ferramosca, A., Conte, A., Damiano, F., Siculella, L., Zara, V., 2013. Differential effects of high-carbohydrate and high-fat diets on hepatic lipogenesis in rats. *Eur. J. Nutr.* 53, 1103–1114. <https://doi.org/10.1007/s00394-013-0613-8>

Francisqueti, F.V., Chiaverini, L.C.T., Dos Santos, K.C., Minatel, I.O., Ronchi, C.B., Ferron, A.J.T., Ferreira, A.L.A., Corrêa, C.R., 2017. The role of oxidative stress on the pathophysiology of metabolic syndrome. *Rev. Assoc. Med. Bras.* <https://doi.org/10.1590/1806-9282.63.01.85>

Giriş, M., Doğru-Abbasoğlu, S., Soluk-Tekkeşin, M., Olgaç, V., Uysal, M., 2018. Effect of betaine treatment on the regression of existing hepatic triglyceride accumulation and oxidative stress in rats fed on high fructose diet. *Gen. Physiol. Biophys.* [https://doi.org/10.4149/gpb\\_2018005](https://doi.org/10.4149/gpb_2018005)

Grgić, J., Šelo, G., Planinić, M., Tišma, M., Bucić-Kojić, A., 2020. Role of the Encapsulation in Bioavailability of Phenolic Compounds. *Antioxidants* 9, 923. <https://doi.org/10.3390/antiox9100923>

Hamid, A., Hussain, J., 2017. HYPOGLYCEMIC EFFECT OF DIETARY FIBER FEEDS MADE FROM DIFFERENT VARIETIES OF MILLET ON STREPTOZOTOCIN INDUCED DIABETIC RATS, *Pakistan Journal of Science*.

Han, L., Shen, W.J., Bittner, S., Kraemer, F.B., Azhar, S., 2017. PPARs: Regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part I: PPAR- $\alpha$ . *Future Cardiol.* <https://doi.org/10.2217/fca-2016-0059>

Hithamani, G., & Srinivasan, K. 2014. Effect of domestic processing on the polyphenol content and bioaccessibility in finger millet (*Eleusine coracana*) and pearl millet (*Pennisetum glaucum*). *Food Chem.* 164, 55-62.

Kim, B.J., Cho, S.H., Cho, K.I., Kim, H.S., Heo, J.H., Cha, T.J., 2016. The combined impact of neutrophil-to-lymphocyte ratio and type 2 diabetic mellitus on significant coronary artery disease and carotid artery atherosclerosis. *J. Cardiovasc. Ultrasound* 24, 115–122. <https://doi.org/10.4250/jcu.2016.24.2.115>

Lucas, E., Cruces-Sande, M., Briones, A.M., Salaices, M., Mayor, F., Murga, C., Vila-Bedmar, R., 2015. Molecular physiopathology of obesity-related diseases: Multi-organ integration by GRK2. *Arch. Physiol. Biochem.* <https://doi.org/10.3109/13813455.2015.1107589>

Marineli, R. da S., Moura, C.S., Moraes, É.A., Lenquiste, S.A., Lollo, P.C.B., Morato, P.N., Amaya-Farfan, J., Maróstica, M.R., 2015. Chia (*Salvia hispanica* L.) enhances HSP, PGC-1 $\alpha$  expressions and improves glucose tolerance in diet-induced obese rats. *Nutrition* 31, 740–748. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2014.11.009>

Marklund, S.L., 1985. Product of extracellular-superoxide dismutase catalysis. *FEBS Lett.* 184, 237–239. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(85\)80613-X](https://doi.org/10.1016/0014-5793(85)80613-X)

Melo Goulart, S. DE, 2014. UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA SAMUEL DE MELO GOULART AMADURECIMENTO PÓS-COLHEITA DE FRUTOS DE MACAÚBA E QUALIDADE DO ÓLEO PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL VIÇOSA MINAS GERAIS-BRASIL 2014.

Mendes, B.B., Oliveira, A.C.R., Alcântara, K.C. de, 2019. Comparison of the neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte ratios in normoglycemic and hyperglycemic subjects. *Einstein (Sao Paulo)*. 17, eAO4403. [https://doi.org/10.31744/einstein\\_journal/2019AO4403](https://doi.org/10.31744/einstein_journal/2019AO4403)

Polacow, V.O., Lancha, A.H., 2007. Dietas hiperglicídicas: Efeitos da substituição isoenergética de gordura por carboidratos sobre o metabolismo de lipídios, adiposidade corporal e sua associação com atividade física e com o risco de doença cardiovascular. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* <https://doi.org/10.1590/s0004-27302007000300006>

Price, M. L., Van Scoyoc, S., & Butler, L. G. 1978. A critical evaluation of the vanillin

reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J Agricult Food Chem*, 26(5), 1214-1218.

Rajasekaran, N.S., Nithya, M., Rose, C., Chandra, T.S., 2004. The effect of finger millet feeding on the early responses during the process of wound healing in diabetic rats. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1689, 190–201. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2004.03.004>

Reeves, P.G., Nielsen, F.H., Fahey, G.C., 1993. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *J. Nutr.* 123, 1939–1951. <https://doi.org/10.1093/jn/123.11.1939>

Salehi, B., Sharifi-Rad, J., Cappellini, F., Reiner, Z., Zorzan, D., Imran, M., Sener, B., Kilic, M., El-Shazly, M., Fahmy, N.M., Al-Sayed, E., Martorell, M., Tonelli, C., Petroni, K., Docea, A.O., Calina, D., Maroyi, A., 2020. The Therapeutic Potential of Anthocyanins: Current Approaches Based on Their Molecular Mechanism of Action. *Front. Pharmacol.* <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01300>

Shapiro, A., Tümer, N., Gao, Y., Cheng, K.Y., Scarpace, P.J., 2011. Prevention and reversal of diet-induced leptin resistance with a sugar-free diet despite high fat content. *Br. J. Nutr.* 106, 390–397. <https://doi.org/10.1017/S000711451100033X>

Sharma, B., Gujral, H.S., 2019. Influence of nutritional and antinutritional components on dough rheology and in vitro protein & starch digestibility of minor millets. *Food Chem.* 299, 125115. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125115>

Silva, G.N., Grossi, J., A., S., Carvalho, M., S., Kuki, K., N., Goulart, S., M., Pimentel, L.D., 2020. Air drying of macauba fruits: maintaining oil quality for biodiesel production. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 42. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v42i1.43451>

Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folinciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178.

Stanhope, K.L., 2016. Sugar consumption, metabolic disease and obesity: The state of the controversy. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* <https://doi.org/10.3109/10408363.2015.1084990>

TARDIN, F.D., RODRIGUES, J.A.S., COELHO, R.R., 2018. Cultivo do Sorgo: Cultivares. *Embrapa* 2, 1–7. <https://doi.org/ISSN 1679-012X>

Ter Horst, K.W., Serlie, M.J., 2017. Fructose consumption, lipogenesis, and non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrients.* <https://doi.org/10.3390/nu9090981>

Turlin, B., Mendler, M.H., Moirand, R., Guyader, D., Guillygomarc'h, A., Deugnier, Y., 2001. Histologic Features of the Liver in Insulin Resistance–Associated Iron Overload. *Am. J. Clin. Pathol.* 116, 263–270. <https://doi.org/10.1309/WWNE-KW2C-4KTW-PTJ5>

Vicente, O., Boscaiu, M., 2018. Flavonoids: Antioxidant Compounds for Plant Defence... and for a Healthy Human Diet. *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca* 46, 14–21. <https://doi.org/10.15835/nbha46110992>

Vitaglione, P., Morisco, F., Caporaso, N., Fogliano, V., 2005. Dietary Antioxidant Compounds and Liver Health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44, 575–586. <https://doi.org/10.1080/10408690490911701>

Yahfoufi, N., Alsadi, N., Jambi, M., Matar, C., 2018. The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. *Nutrients*. <https://doi.org/10.3390/nu10111618>

## 7. CONCLUSÃO GERAL

A farinha de milho germinado é composta principalmente de carboidratos, seguido por proteína, fibra alimentar total e lipídios. Além disso, contém amido resistente, ácidos graxos, maior teor de fenólicos totais e atividade antioxidante (DPPH), e redução de fitoquímicos, como taninos condensados e ácido fítico, comparado ao milho não germinado descrito na literatura.

O consumo desta farinha não alterou o ganho de peso, mas reduziu a adiposidade, a gliconeogênese e a hiperinsulinemia, modulando o metabolismo da glicose nos ratos, reduziu triglicerídeos, ácido úrico, esteatose hepática e marcadores inflamatórios e melhorou a defesa antioxidante, demonstrando ação anti-inflamatória e antioxidante. Além disso, não interferiu nos hormônios tireoidianos dos animais, demonstrando ser segura para o consumo.

Diante disso, concluímos que a farinha de milho germinado modula as alterações metabólicas ocasionadas em ratos adultos alimentados com dieta rica em gordura saturada e frutose e demonstra ter potencial como alimento funcional. Por isso sugerimos maior inserção desse cereal na alimentação humana.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, projetamos simular um consumo alimentar rico em alimentos ultraprocessados, semelhante ao observado principalmente nas dietas ocidentais. Com isso, mais estudos são necessários a fim de explorar outras vias e mecanismos moleculares envolvidos nas alterações metabólicas ocasionadas por esse tipo de dieta, além de outros tipos de processamento para o milho que possam agir benéficamente na melhora e ou prevenção dessas alterações no organismo humano.

Ainda precisamos explorar a saúde intestinal. Portanto, estudos avaliando o efeito do milho germinado na permeabilidade, fisiologia e morfologia intestinal e composição da microbiota intestinal *in vivo* são necessários.

Além disso, é preciso especular as possíveis formas de inserção do milho no consumo humano, a fim de diversificar a alimentação e trazer os benefícios desse grão para a saúde.

## 9. ANEXOS

**CERTIFICADO**

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 39/2019, intitulado “**Efeitos da farinha de milho germinado (*Pennisetum glaucum* L. R Br.) em alterações metabólicas de ratos alimentados com dieta rica em gordura saturada e frutose**”, coordenado pela professora Hércia Stampini Duarte Martino do Departamento de Nutrição e Saúde, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 03/09/2019, com validade de 12 meses.

**CERTIFICATE**

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 39/2019, named “**Effects of germinated millet flour (*Pennisetum glaucum* L. R Br.) On metabolic alterations of rats fed a high saturated fat and fructose diet**”, is in agreement with the actual Brazilian legislation ( Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on September 03, 2019 valid for 12 months.

  
Prof. Sílvia Almeida Cardoso

Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV