

# USO DE QUERCETINA EM MEIO DE REFRIGERAÇÃO DE SÊMEN EQUINO A BASE DE LEITE EM PÓ DESNATADO

## *USE OF QUERCETIN IN EQUINE SEMEN COOLING MEDIUM BASED ON SKIMMED MILK POWDER*

**RESUMO:** A biotécnica de refrigeração de sêmen equino para o transporte de material genético está amplamente distribuída. Com a necessidade da manutenção da viabilidade espermática é indispensável a utilização e diluentes para este fim. O objetivo deste estudo foi avaliar se a adição de quercetina, que é um flavonóide anti-oxidante, em diluentes espermáticos altera a viabilidade de espermatozoides equinos refrigerados. Foram avaliados cinco ejaculos de um garanhão por meio da análise de motilidade e vigor espermático em diferentes períodos de refrigeração em quatro meios de diluição: Botu-Semen®; Botu-Semen® adicionado de 20 µg/mL de quercetina (SIGMA®); Solução aquosa com 10% leite em pó desnatado (Molico®) ou Solução aquosa com 10% leite em pó desnatado (Molico®) adicionado de 20 µg/mL de quercetina (SIGMA®). Por meio dos dados obtidos foi possível verificar que não há diferença estatística entre a motilidade espermática de sêmen de garanhão diluído em Botu-Semen® em relação ao diluído solução aquosa com 10% leite em pó desnatado (Molico®) pelo período de refrigeração avaliado (36h).

**Palavras-chave:** Antioxidante, Motilidade, Diluente, Garanhão.

**ABSTRACT:** The biotechnique of equine semen cooling for the transfer of genetic material is widely distributed. With the need to maintain sperm viability, it is indispensable to use and thinners for this purpose. The aim of this study was to evaluate whether the addition of quercetin, which is an anti-oxidant flavonoid, in spermatic diluents alters the viability of

refrigerated equine spermatozoa. Five ejacules of a stallion were evaluated by analysis of motility and spermatic vigor in different cooling periods in four dilution media: Botu-Semen®; Botu-Semen® added 20 µg/mL of quercetin (SIGMA®); Aqueous solution with 10% skim milk powder (Molico®) or Aqueous solution with 10% skim milk powder (Molico®) added 20 µg/mL quercetin (SIGMA®). Through the data obtained, it was possible to verify that there is no statistical difference between the sperm motility of diluted stallion semen in Botu-Semen® in relation to the diluted aqueous solution with 10% skimmed milk powder (Molico®) for the evaluated refrigeration period (36h).

**Keywords:** Antioxidant, Motility, Diluent, Stallion

## INTRODUÇÃO

A inseminação artificial torna possível a utilização de um macho para fertilização de várias fêmeas, possibilita o transporte da genética sem necessidade de movimentar animais, assim como limita a transmissão de algumas doenças e a incidência de traumas durante a monta natural (Prien, 2016). Entretanto, alguns obstáculos persistem nas tecnologias de reprodução equina, como é o caso da criopreservação de espermatozoides.

A criopreservação é uma biotécnica que tem como desvantagem induzir o espermatozoide ao estresse oxidativo que provoca danos a membrana celular espermática, assim como danos ao material genético (Pagl, 2006). Devido a obstáculos na utilização do sêmen que passa por congelamento, o sêmen refrigerado tem sido utilizado nas inseminações artificiais, com resultados semelhantes a monta natural, porém com a vantagem de proporcionar um maior número de éguas servidas por garanhão e aumentar a longevidade dos espermatozoides fora do sistema reprodutor (Meirelles et al., 1998; Maciel, 2016).

A redução da temperatura no resfriamento induz uma diminuição do metabolismo espermático, dessa forma, o catabolismo é reduzido, fator importante para preservação do

sêmem. Entretanto, concomitantemente ocorre estresse termico que ocasiona danos estruturais as células espermáticas, que pode comprometer funções, prejudicando a motilidade e a capacidade de fecundação dos espermatozóides (Nunes et al., 2006). Componentes celulares como proteínas, ácidos nucleicos, lípideos e açucars são alvos da ação das espécies reativas de oxigênio e da peroxidação lipídica (Monteiro, 2015).

No equino, há uma suscetibilidade evidente a peroxidação lipídica por possuir elevada quantidade de ácidos graxos poli-insaturados na membrana celular dos espermatozoides (Pagl, 2006). Dessa forma, os lípidios podem ser desestabilizados pelos radicais livres que são gerados pelos espermatozóides como consequência do metabolismo aeróbico (Nunes et al., 2006; Lançoni, 2015). Para realizar a refrigeração é possível utilizar caixas isotérmicas nas quais o material é colocado em recipiente apropriado e acondicionado próximo a uma fonte de baixa temperatura (gelo biológico reciclável) (Castro, 2014).

Considerando que a refrigeração do sêmen provoca uma redução significativa da motilidade espermática, a utilização de diluentes se torna indispensável para manutenção das propriedades do sêmen (Pagl, 2006). Dentre os diluentes mais utilizados destacam-se a gema de ovo e o leite desnatado. Este último é rico em lipoproteínas, sendo capaz de estabilizar elementos proteicos da membrana celular dos espermatozóides por períodos suficientes para um transporte de curta duração, além de ser de baixo custo (Meirelles et al., 1998; Oliveira et al., 2014).

Os antioxidantes são utilizados para proteger os espermatozóides de possíveis lesões provocadas pelo estresse oxidativo que ocorre durante a criopreservação, estes podem ser divididos em dois tipos: enzimáticos e não enzimáticos.

A catalase, superóxido dismutase e a cisteína estão entre os principais antioxidantes endógenos enzimáticos. Enquanto a vitamina C, vitamina E e o resveratrol são classificados como não enzimáticos (Savi, 2015). A quercetina trata-se de um flavonóide que atua como

antioxidante não enzimático capaz de inibir a formação de radicais livres pela interação com íons superóxidos, através da reação com radicais peroxilipídicos e por quelação de íons ferro.

É encontrado em muitas frutas, legumes, folhas, sementes e grãos; cebolas vermelhas e couve são alimentos comuns que contêm quantidades apreciáveis de quercetina, é usada como ingrediente em suplementos alimentares, bebidas e alimentos (Restrepo, 2016). Quando adicionada ao diluidor do sêmen pode melhorar a motilidade dos espermatozóides, além de reduzir a fragmentação do DNA no sêmen sexado (Restrepo, 2016).

O objetivo deste estudo foi avaliar se a adição de quercetina (favonóide anti-oxidante) em diluentes espermáticos altera a viabilidade de espermatozoides equinos refrigerados.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O presente estudo foi aprovado no CEUA nº 8108180919 (ID 002371), posto que o experimento em questão, está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

O estudo foi conduzido no município de Umuarama, no noroeste do Paraná, utilizando-se cinco ejaculados de um garanhão comprovadamente fértil da raça Quarto de Milha, junto ao Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Estadual de Maringá (UEM – campus Umuarama).

Os ejaculados foram colhidos com vagina artificial, utilizando uma égua em estro como manequim. As colheitas foram realizadas em um período de 30 dias. Os parâmetros avaliados foram motilidade e vigor espermáticos, seguindo critérios estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

Após determinar motilidade e vigor no tempo zero, o sêmen foi centrifugado a 600 G por 10 minutos e o pellet foi ressuspenso e diluído em um destes quatro meios: Botu-Semen<sup>®</sup>;

Botu-Semen<sup>®</sup> adicionado de 20 µg/mL de quercetina (SIGMA<sup>®</sup>); Solução aquosa com 10% leite em pó desnatado (Molico<sup>®</sup>) ou Solução aquosa com 10% leite em pó desnatado (Molico<sup>®</sup>) adicionado de 20 µg/mL de quercetina (SIGMA<sup>®</sup>), constituindo 4 tratamentos.

Foi utilizado um esquema de distribuição 3x5, com três repetições e cinco etapas e 4 tratamentos. Para cada etapa realizou-se uma colheita.

Em tubos cônicos de 3 mL foram colocados 1 mL de cada meio, sendo utilizados 15 tubos em cada tratamento. Em cada tubo foi adicionado  $50 \times 10^6$  espermatozoides. Os tubos foram distribuídos em cinco caixas isotérmicas comerciais (BotuFlex<sup>®</sup>), pré resfriadas por duas horas com gelo reciclável. Cada caixa recebeu três tubos de cada grupo de diluente, totalizando 12 tubos por caixa, como representado na figura 1.

As avaliações foram realizadas após quatro, oito, 12, 24 e 36 horas, considerando o horário inicial o momento que os tubos eram dispostos nas caixas. De acordo com os momentos de avaliação, uma caixa era aberta e avaliada, analisando-se motilidade e vigor em microscópio óptico, sempre pelo mesmo avaliador. Antes da avaliação os tubos eram aquecidos em banho-maria a 36 °C por 2 minutos. Os resultados obtidos foram analisados pelo teste Tukey, considerando 5% como nível de significância ( $p < 0,05$ ).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A motilidade total, expressa em percentagem, não apresentou diferença significativa nos diferentes meios avaliados até 12h pós início da refrigeração: Botu-Semen<sup>®</sup> (61,33%  $\pm$ 8,33), Leite + quercetina (56,67%  $\pm$ 10,46), Leite (58,67%  $\pm$ 12,45), Botu-Semen<sup>®</sup> + quercetina (62,00% $\pm$ 12,64) (Tabela 1).

Estes resultados foram compatíveis com os de Meirelles et al., (1998) que verificaram boa manutenção dos valores de motilidade de sêmen equino resfriado em meio a base de leite desnatado UHT. Dessa forma, observou-se a possibilidade de utilização de leite como meio de

refrigeração para sêmen de garanhão sem perdas na viabilidade seminal até 12h de refrigeração, reduzindo o custo desta biotécnica, além da facilidade em adquirir o meio em questão.

Silva (2018) ao acrescentar 20 µg de quercetina em Botu-Semen® durante a refrigeração do sêmen equino por 24 horas não verificou influência nos parâmetros de cinética espermática, assim como os dados obtidos no presente estudo que não observou diferença estatística entre a motilidade avaliada com 24h de refrigeração entre o sêmen diluído em Botu-Semen® (59,33 ±12,79) e o diluído em Botu-Semen® acrescido de 20 µg de quercetina (56,00 ±11,21).

Embora a concentração de quercetina a ser utilizada não esteja completamente definida, a concentração utilizada neste estudo (20 µg/mL) em diluente a base de leite desnatado 10% (Molico®) apresentou resultados de motilidade com 24h de refrigeração iguais estatisticamente ao sêmen refrigerado em meio comercial Botu-Semen®.

No presente trabalho não se observou diferença estatística nos valores de motilidade durante o período de refrigeração avaliado (36h) entre sêmen diluído em Botu-Semen®, Botu-Semen® acrescido de 20 µg de quercetina e em leite desnatado 10% (Molico®) acrescido de 20 µg de quercetina como descrito na Tabela 1, indicando a possibilidade de utilização de leite desnatado 10% (Molico®) acrescido de 20 µg de quercetina em substituição ao diluente comercial testado Botu-Semen®, acrescido ou não de 20 µg de quercetina, mantendo a mesma viabilidade espermática. Além disso foi possível verificar que com 36h de refrigeração houve resultados de motilidade maiores numericamente no meio de diluição a base de leite desnatado 10% (Molico®) acrescido de 20 µg de quercetina (50,00 ±11,33) em relação ao diluído em meio comercial Botu-Semen® (47,33 ±10,33).

Ao contrario do verificado por Castro (2014), que obteve valores de motilidade sem diferença estatística entre o meio de diluição comercial (Botu-Semen®) em comparação ao diluente composto por leite desnatado até 24h de refrigeração, no presente experimento observou-se que com 24h a motilidade apresentou-se menor estatisticamente ( $p < 0,05$ ) para o

sêmen diluído apenas em leite desnatado 10% (Molico®) ( $46,43 \pm 14,99$ ), em relação ao diluído em Botu-Semen® ( $59,33 \pm 12,79$ ), que possui resultados estatisticamente iguais aos diluídos em leite desnatado 10% (Molico®) acrescido de 20 µg de quercetina ( $57,33 \pm 11,62$ ) e Botu-Semen® acrescido de quercetina ( $56,00 \pm 11,21$ ). Evidenciando que após 12h de refrigeração o meio de diluição apenas a base de leite desnatado 10% (Molico®) não é tão eficaz quanto os demais na manutenção da viabilidade espermática.

Os espermatozóides de mamíferos, são frequentemente criopreservados usando diluidores a base de leite desnatado ou integral, como caracterizado por Pagl (2006), a caseína é o constituinte de proteína do leite mais importante que desempenha papel fundamental na proteção dos espermatozóides do choque térmico, como demonstrado em várias outras espécies de acordo com Appiah et al., (2020).

Segundo Sicherle et al. (2020) a condição oxidativa provocada pela criopreservação induz alterações nas atividades enzimáticas e na fluidez da membrana, que resulta em redução da motilidade, viabilidade e capacidade de fertilização dos espermatozóides.

O estudo conduzido por Silva et al., (2018) concluiu, que a quercetina em altas concentrações em diluidores de semen na espécie caprina, limita as oscilações deletérias dos espermatozóides pode ser favorável à fertilidade também em outras espécies.

Silva et al., (2018) reiteraram que a adição da quercetina antioxidante ao diluente de semen de garanhões é uma ferramenta importante para reduzir os danos sofridos pelos espermatozóides durante a criopreservação, resultando em melhores taxas de gestação nas éguas inseminadas com o sêmen congelado, especialmente para garanhões cujos ejaculados são sensíveis ao processo de congelamento.

Porém, em recente experimento conduzido por Filho et al., (2017) a adição exclusiva de quercetina no extensor de congelamento de equinos, em quatro concentrações diferentes (0,25, 0,5, 0,75 ou 1 mM) não afetou a motilidade progressiva, a funcionalidade mitocondrial, a reação

do acrossoma, a integridade da membrana ou o índice de fragmentação do DNA no sêmen equino pós-degelo.

No presente estudo, foi possível observar que um mesmo diluente (solução aquosa com 10% leite em pó desnatado (Molico<sup>®</sup>) quando acrescido de um antioxidante (20 µg/mL de quercetina (SIGMA<sup>®</sup>)), apresentou resultados numericamente superiores de motilidade como descrito na Tabela 1.

Os valores médios de vigor espermático, apesar de não apresentar diferença estatística, obtiveram resultados numericamente maiores quando avaliados no meio de diluição comercial como descrito na Tabela 2. Este dado pode estar relacionado a composição química dos meios utilizados, caracterizando-se o meio comercial como um diluente com maior fornecimento de energia aos espermatozoides.

A busca por diluentes de sêmen para a espécie equina é uma necessidade, dado o aumento da aplicação das biotecnologias da reprodução, assim, o desenvolvimento de produtos inovadores para esse segmento, deve ser uma busca contínua e foco de outros estudos, a proposta do presente estudo, foi trazer o uso de insumos alternativos, que possibilitem resultados equivalentes e/ou superiores aqueles, disponibilizados por produtos comercialmente disponíveis ao país.

Desse modo, o presente estudo trouxe resultados promissores para a elaboração de um diluente de semen equinos com o uso da quercetina em meio de refrigeração de sêmen equino a base de leite em pó desnatado, o que possibilita o barateamento e facilidade de acesso ao diluente.

## **CONCLUSÃO**

A adição de quercetina 20 µg/mL (SIGMA<sup>®</sup>) em meio de diluição seminal a base de solução aquosa com 10% leite em pó desnatado (Molico<sup>®</sup>), faz com que este obtenha resultados estatisticamente semelhantes ao meio de diluição comercial testado (Botu-Semen<sup>®</sup>), até 36h de



refrigeração, acrescido ou não de quercetina, evidenciando que a adição de quercetina auxilia na manutenção da viabilidade espermática em meio de diluição seminal a base de solução aquosa com 10% leite em pó desnatado (Molico®).

## REFERÊNCIAS

APPIAH, M.O.; LI, W.; ZHAO, J.; LIU, H.; DONG, Y.; XIANG, J.; WANG, J.; LU, W. Quercetin supplemented casein-based extender improves the post-thaw quality of rooster semen. **Cryobiology**, v. 31, n. 2, p. 252, 2020.

CASTRO, F.S. **Comparação entre diferentes tipos de leites como diluentes para semen equino refrigerado**. 2014. 36 p. Dissertação (Mestrado em Ciências veterinárias – Reprodução animal).

CBRA - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3.ed. Belo Horizonte, 2013. 104 p.

FILHO, J.S.; CORCINI, C.D.; SANTOS, F.C.C.; et al. Quercetin in equine frozen semen. **Cryo Letters**, v. 38, n. 4, p. 299-304, 2017.

LANÇONI, R.; CELEGHINI, E.C.C.; BIANCHINI-ALVES, M.R.; SANTOS, G.C.; FLOREZ-RODRIGUES, S.A.; LEITE, T.G.; ARRUDA, R.P. Use of melatonin and ferulic acid as promoters of cryopreserved equine sperm. **Anim. Reprod.**, v.12, n.3, p.559, Jul./Sept. 2015.

MACIEL, A.C.; CAMARGO, V.; MATTOS, R.C.; RECHSTEINER, S. F. Viabilidade do sêmen equino armazenado em sistema de polietileno para transporte por oito horas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, p.1429, 2016.

MEIRELLES, L.S.; MALSCHITSKY, E.; PIRES NEVES. A.; VIEIRA, M.J.; KELLER, A.; HÖTT, A.K.; MORAES, I.M.A.; GARBADE, P.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R. G. Leite em pó desnatado não inativado e leite desnatado uht para preservação e fertilidade do sêmen equino resfriado, **Ciência Rural**, v.28, n 3, p. 467-470, 1998.

MONTEIRO, J.A.B. Efeito da suplementação oral do óleo de arroz na congelabilidade do sêmen ovino. 2015. 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciência animal Tropical) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

NUNES, D.B.; ZUCCART, C.E.S.N.; SILVA, E.V.C. Fatores relacionados ao sucesso da inseminação artificial de éguas com sêmen refrigerado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.30, n.1, p.42-56, 2006.

OLIVEIRA, R.R.; RATES, D.M.; PUGLIESI, G.; KER, P.G.; ARRUDA, R.P.; MORAES, E.A.; CARVALHO, G.R. Use of cholesterol-loaded cyclodextrin in donkey semen cryopreservation improves sperm viability but results in low fertility in mares. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, p. 845–850, 2014.

PAGL, R. Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5 °C. **Theriogenology**, v. 66, n.5. p. 1115-1122, 2006

PAGL, R.; AURICH, C.; KANNOFER, M. Anti-oxidative status and semen quality during cooled storage in stallions. **Journal of veterinary medicine**, v. 53, n.9. p. 486-489, 2006.

PRIEN, S.; IACOVIDES, S. Cryoprotectants & Cryopreservation of Equine Semen: A Review of Industry Cryoprotectants and the Effects of Cryopreservation on Equine Semen Membranes. **Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research**. v.3, n 1, p. 2-8, 2016.

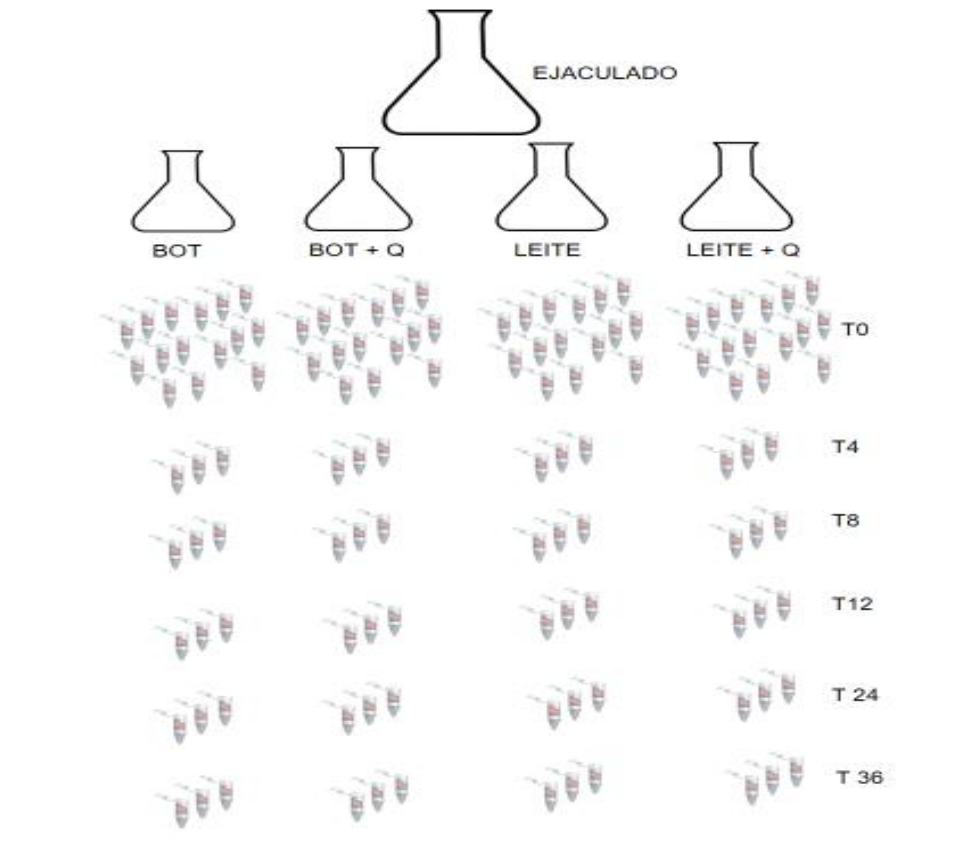
RESTREPO, G.; MONTOYA, J.D.; ROJANO, B. Capacidad antioxidante y calidad post-descongelación del semen equino criopreservado con quercetina y ergotioneina. **Rev. Med. Vet. Zoot.** v.63, n.3, 2016.

SAVI, P.A.; ZAVAREZ, P.; KIPPER, L.B.; FELICIANO, B.H.; VICENTE, M.A.R.; OLIVEIRA, W.R.R. Uso de antioxidantes em meios diluidores para sêmen ovino: revisão de literatura. **ARS VETERINARIA**, v.31, n.1, p. 012-018, 2015.

SICHERLE, C.C.; SOUZA, F.F.; FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; MOTHÉ, G.B.; PADOVANI, C.R.; PAPA, F.O.; LOPES, M. D.; et al. Effects of the cryopreservation process on dog sperm integrity. *Anim. Reprod., Belo Horizonte*, v. 17, n. 1, e20190081, 2020.

SILVA, L.F.M.C.; ARAUJO, E.A.B.; OLIVEIRA, S.N.; DALANEZI, F.M.; JUNIOR, L.R.P.A.; CARNEIRO, J.A.M.; RODRIGUESA, L.T.; HAYASHI, R.M.; CRESPILO, A.M.; DELL'AQUA, C.P.F.; DELL'AQUA, J.A. JUNIOR.; PAPAA, F. O. Quercetin promotes increase in the fertility rate of frozen semen of Stallions considered sensitive to freezing. **J Equine Vet Sci**, v. 66, p. 82, 2018.

**Figura 1.** Esquema representativo da distribuição dos meios avaliados: Botusemen (BOT); Botusemen + quercetina (BOT+Q); Leite desnatado (LEITE); Leite desnatado + quercetina (LEITE+Q); para diferentes momentos de avaliação: quatro horas após a colheita (T4), oito horas após a colheita (T8), 12 horas após a colheita (T12), 24 horas após a colheita (T24) e 36 horas após a colheita (T36).



**Tabela 1.** Valores médios de motilidade espermática, em porcentagem, de sêmen de um garanhão da raça Quarto de Milha, avaliados imediatamente após a colheita (T0), quatro horas após a colheita (T4), oito horas após a colheita (T8), 12 horas após a colheita (T12), 24 horas após a colheita (T24) e 36 horas após a colheita (T36), refrigerado em diferentes diluentes.

Tratamento	Tempos					
	T0	T4	T8	T12	T24	T36
BOT	58,00	63,33 <sup>a±</sup>	60,00	61,33	59,33	47,33 <sup>a</sup>
	<sup>a±</sup> 7,74	8,99	<sup>a±</sup> 9,25	<sup>a±</sup> 8,33	<sup>a±</sup> 12,79	<sup>±</sup> 10,33
BOT+Q	58,0	63,33 <sup>a±</sup>	62,86	62,00	56,00	50,67
	<sup>a±</sup> 7,74	10,46	<sup>a±</sup> 10,69	<sup>a±</sup> 12,64	<sup>a±</sup> 11,21	<sup>a±</sup> 10,99
LEITE	58,0	58,67 <sup>a±</sup>	56,00	58,67	46,43	44,67
	<sup>a±</sup> 7,74	9,15	<sup>a±</sup> 10,55	<sup>a±</sup> 12,45	<sup>b±</sup> 14,99	<sup>a±</sup> 9,90
LEITE+Q	58,0	61,33 <sup>a±</sup>	56,67	56,67	57,33	50,00
	<sup>a±</sup> 7,74	9,90	<sup>a±</sup> 14,47	<sup>a±</sup> 10,46	<sup>a±</sup> 11,62	<sup>a±</sup> 11,33

*Síglas:* BOT: Botusemen; BOT+Q: Botusemen + quercetina; LEITE: Leite desnatado; LEITE+Q: Leite desnatado + quercetina.

**Tabela 2.** Valores médios de vigor espermático de sêmen de um garanhão da raça Quarto de Milha, avaliados imediatamente após a colheita (T0), quatro horas após a colheita (T4), oito horas após a colheita (T8), 12 horas após a colheita (T12), 24 horas após a colheita (T24) e 36 horas após a colheita (T36), refrigerado em diferentes diluentes.

Meio	Tempos					
	T0	T4	T8	T12	T24	T36
BOT	3,40 <sup>a</sup>	3,13 <sup>a</sup>	3,07 <sup>a</sup>	2,87 <sup>a</sup>	2,53 <sup>a</sup>	2,27 <sup>a</sup>
	±0,50	±0,83	±0,70	±0,74	±0,63	±0,45
BOT+Q	3,40 <sup>a</sup>	3,27 <sup>a</sup>	3,07 <sup>a</sup>	2,93 <sup>a</sup>	2,67 <sup>a</sup>	2,47 <sup>a</sup>
	±0,50	±0,79	±0,73	±0,59	±0,48	±0,51
LEITE	3,40 <sup>a</sup>	2,87 <sup>a</sup>	2,67 <sup>a</sup>	2,40 <sup>a</sup>	2,14 <sup>a</sup>	1,93 <sup>a</sup>
	±0,50	±0,63	±0,81	±0,63	±0,86	±0,59
LEITE+Q	3,40 <sup>a</sup>	3,07 <sup>a</sup>	2,67 <sup>a</sup>	2,40 <sup>a</sup>	2,27 <sup>a</sup>	2,00 <sup>a</sup>
	±0,50	±1,03	±0,89	±0,63	±0,70	±0,65

*Síglas:* BOT: Botusemen; BOT+Q: Botusemen + quercetina; LEITE: Leite desnatado; LEITE+Q: Leite desnatado + quercetina.