

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ISOLADO PROTEICO DO SORO DO LEITE FORTIFICADO COM FRAÇÃO DE ESTÉVIA EM RATOS DIABÉTICOS INDUZIDOS

Maria Eduarda Perina Padilha (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Paula Gimenez Milani, Antonio Sérgio Dacome, Cecília Edna Mareze da Costa, Silvio Cláudio da Costa (Orientador), e-mail: sccosta@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas / Maringá, PR.

2.08.00.00-2 Bioquímica, 2.08.03.00-1 Metabolismo e Bioenergética

Palavras-chave: *Stevia rebaudiana*, isolado proteico do soro do leite, *diabetes mellitus*.

Resumo: Folhas de *Stevia* foram extraídas com metanol e fracionadas em hexano, clorofórmio, acetato de etila e isobutanol. A fração de acetato de etila (FAE) apresentou 53% de compostos fenólicos. Esta fração foi utilizada para fortificar o isolado proteico (IPS) obtido a partir do soro do leite por processos de separação por membranas e atingiu uma concentração proteica de 89%. O IPS fortificado com 0,2% de FAE foi administrado por gavagem esofágica em ratos diabéticos, na dose de 100 mg/kg p.c/dia pelo período de 35 dias. Os resultados demonstraram que a fração foi efetiva em promover um melhor controle metabólico dos animais diabéticos e ainda apresentou efeito hipoglicêmico e redução na taxa de frutose. O IPS suplementado com FAE apresentou potencial para ser usado como fortalecedor da atividade antioxidante e antidiabética de alimentos.

Introdução

As proteínas que compõem o Isolado proteico do soro do leite (IPS) são responsáveis por efeitos antioxidantes, antiinflamatórios, insulino-trópicos e redução da glicemia, entre outros. Alguns desses efeitos também foram identificados em produtos de *Stevia*. A fração de acetato de etila (FAE) apresentou elevada atividade antioxidante. Adicionada ao IPS, a FAE pode atuar como fortificante induzindo efeitos ainda mais significativos no tratamento de diversas doenças, especialmente o *diabetes mellitus*. Sendo assim, o objetivo deste projeto foi avaliar os efeitos bioquímicos e fisiológicos da suplementação de ratos diabéticos com um isolado proteico enriquecido com FAE.

Materiais e métodos

O IPS foi obtido a partir do soro de leite desnatado e pasteurizado, fornecido pelo laticínio Flora Milk. O soro foi ultrafiltrado e diafiltrado em membrana de 10 kDa, nanofiltrado em membrana de 500 Da, e submetido ao processo de concentração em osmose reversa em membrana de 180 Da.

Uma amostra do isolado obtido nesses processos foi seca em *spray dryer* (modelo B-191) e o produto final apresentou 89,04% de proteínas e 7% de lactose.

A FAE foi obtida a partir de folhas de *Stevia*. O extrato metanólico da folha foi submetido a fracionamento com hexano, clorofórmio, acetato de etila e isobutanol. No IPS foram quantificadas as concentrações de proteínas e lipídeos totais seguindo a metodologia da AOAC 16ª edição e as concentrações de lactose foram obtidas por CLAE, utilizando um cromatógrafo líquido acoplado a um detector de índice de refração e coluna de NH₂ 5µ de dimensões 150 x 4,6mm, fase móvel de acetonitrila e água (80:20 v/v). O potencial antioxidante foi determinado de acordo a metodologia de Blios (1958). O conteúdo de fenólicos e flavonoides totais foi determinado seguindo as respectivas metodologias (SINGLETON *et al.*, 1999; JIA *et al.*, 1999).

Para o estabelecimento de grupos de animais diabéticos, foi utilizado o modelo induzido por estreptozotocina. Os animais, em jejum noturno receberam uma única aplicação intravenosa de estreptozotocina (Sigma, 40 mg/kg p.c.) dissolvida em tampão citrato (0,05 M, pH 4,5), ficando, em seguida, por mais quatro horas em jejum. Após três dias da indução do diabetes, foram selecionados apenas os animais diabéticos que apresentarem glicemia igual ou maior que 200 mg/dL. Para fortificação do IPS, a FAE foi adicionada ao IPS na concentração de 0,2%.

A suplementação foi realizada por um período de 35 dias com 100 mg do IPS fortificado/kg de p.c./dia, via oral, por meio de sonda esofágica. Utilizaram-se 50 ratos *Wistar* machos, com 55 dias de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, os quais foram divididos em dois grupos, um grupo normal (GN; n=10) e um grupo diabético (GD; n=40). Os animais diabéticos sofreram a indução do diabetes, conforme descrito anteriormente e, após três dias, foram divididos em quatro grupos: o grupo GDI (Grupo Diabético Isolado), que recebeu apenas a suplementação com o isolado proteico; o grupo GDF (Grupo Diabético Fração), que recebeu apenas a suplementação com a fração de *Stevia*; o grupo GDIF (Grupo Diabético IPS + FAE) que recebeu o suplemento (isolado proteico fortificado com fração de *Stevia*); e por fim o grupo GDC (Grupo Diabético Controle), o qual recebeu apenas água. Todos os animais receberam água e ração (Nuvilab, Colombo - PR) *ad libitum* e ficaram acondicionados em gaiolas (46 x 24 x 20 cm) com 5 animais por gaiola.

Os dados de glicemia foram registrados semanalmente, por punção caudal e os valores de glicose sanguínea foram determinados por glicosímetro da marca MediSence Optium.

Para o sacrifício, os animais foram anestesiados (80 mg de cetamina + 15 mg de xilazina/ kg, via i.p), submetidos a uma laparotomia mediana e amostras de sangue foram colhidas através da veia cava inferior. O plasma e o soro obtidos foram armazenados em freezer -20°C e utilizados posteriormente para as dosagens bioquímicas.

A determinação da glicose, da frutossamina, das triglicérides, do colesterol total, da lipoproteína de alta densidade (HDL), da aspartato

aminotransferase (AST) e da alanina aminotranferase (ALT) foram realizadas utilizando kits da GOLD ANALISA.

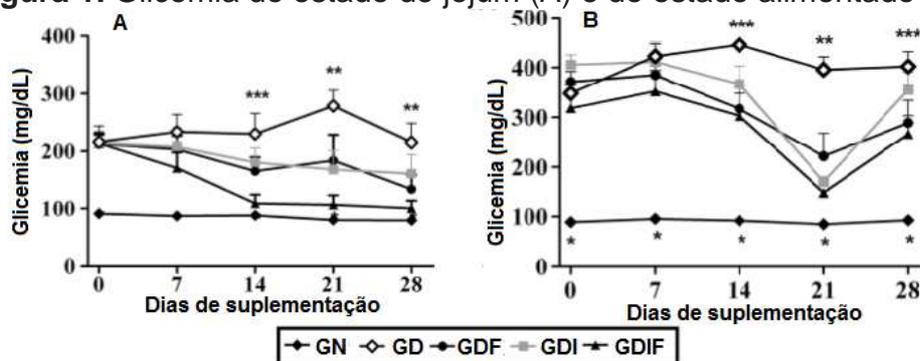
Os resultados das análises foram expressos em média \pm erro padrão da média e foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p < 0,05$). O programa estatístico usado foi o SAS (Statistical Analysis System 2006, versão 9.1).

Resultados e Discussão

O IPS obtido atingiu a concentração de proteínas de 89% e 7% de lactose atendendo às recomendações de composição padrão de 85 a 90% de proteína e pouca gordura ou lactose. A FAE apresentou valores expressivos de compostos fenólicos e de atividade antioxidante, razão pela qual tal fração foi utilizada para fortificar o IPS.

Os três grupos suplementados (grupos GDF, GDI e GDIF) apresentaram redução significativa em seus valores glicêmicos, tanto no jejum quanto no estado alimentado (Figuras 1A e 1B), o que demonstra que tanto o IPS quanto FAE possuem propriedades importantes para reduzir a hiperglicemia. O GDIF apresentou resultados ainda mais expressivos indicando que o IPS + FAE pode ser mais efetivo no controle da hiperglicemia. Após 14 dias de tratamento, os animais deste grupo apresentaram valores glicêmicos muito próximos dos animais não diabéticos (GN).

Figura 1. Glicemia do estado de jejum (A) e do estado alimentado (B).



Grupo normal (GN); grupo diabético (GD); grupo GDI (Grupo Diabético Isolado); grupo GDF (Grupo Diabético Fração); grupo GDIF (Grupo Diabético Isolado Fração); grupo GDC (Grupo Diabético Controle).

Os animais diabéticos dos grupos GDI, GDF e GDIF apresentaram os melhores perfis lipídicos e maiores valores de HDL (Tabela 1). Os valores de triglicerídeos nos grupos GDI e GDIF foram significativamente reduzidos. As concentrações séricas de AST e ALT diminuíram em todos os grupos diabéticos que receberam suplementação mostrando redução ou possível ausência de dano hepático..

Tabela 1. Resultados das dosagens bioquímicas.

Análises	GN	GD	GDF	GDI	GDIF
GLI (mg/dL)	96.8 ± 2.5*	395.6 ± 43.0**	240.7 ± 24.0	213.3 ± 11	192.9 ± 9.80#
FTA (mmol/L)	1.00 ± 0.06	1.8 ± 0.06**	1.3 ± 0.10	1.12 ± 0.15	1.1 ± 0.07
COL (mg/dL)	75.4 ± 2.70	65.7 ± 3.40	71.1 ± 4.20	73.8 ± 2.90	73.6 ± 3.40
HDL (mg/dL)	39.8 ± 1.50	35.3 ± 0.90**	42.4 ± 2.20	45.6 ± 1.30	45.5 ± 1.70
TGS (mg/dL)	43.7 ± 1.50	70.1 ± 8.70**	65.8 ± 7.70***	36.3 ± 2.50	34.7 ± 4.50
ALT (U/L)	34.5 ± 0.90*	67.4 ± 3.20**	49.4 ± 1.10	49.4 ± 1.00	45.2 ± 1.00
AST (U/L)	16.9 ± 0.50*	75.5 ± 3.20**	39.0 ± 3.80	33.1 ± 5.60	37.2 ± 2.90

Grupo normal (GN); grupo diabético (GD); grupo GDI (Grupo Diabético Isolado); grupo GDF (Grupo Diabético Fração); grupo GDIF (Grupo Diabético Isolado Fração); grupo GDC (Grupo Diabético Controle).

Glicose (GLI); Frutosamina (FLA); Colesterol total (COL); Colesterol HDL (HDL); Triglicerídeos (TGS); Alanina aminotransferase (ALT); Aspartato aminotransferase (AST).

* difere de outro grupo ($p < 0,05$); ** difere de GDE, GDI e GDIE ($p < 0,05$); *** difere de GDI e GDIE ($p < 0,05$); # difere dos outros grupos ($p < 0,05$).

Conclusões

Os testes mostraram que os três suplementos (FAE, IPS e IPS + FAE) foram benéficos para melhorar o controle metabólico de ratos diabéticos, sendo que este último apresentou resultados ainda mais expressivos. A fortificação do IPI com FAE na concentração de 0,2% promoveu aumento do efeito hipoglicêmico e ainda resultou na redução na taxa de frutossamina nos animais que receberam tal suplemento. A FAE foi eficiente em fortificar o IPS e apresenta potencial para ser usada como um fortalecedor da atividade antioxidante e antidiabética de alimentos.

Agradecimentos

Agradeço à Fundação Araucária pela bolsa concedida.

Referências

AOAC INTERNATIONAL. **Official methods of analysis of AOAC International**. 16 ed. Arlington, VA, USA: Association of Analytical Communities, 1995.

BLIOS, M. S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. **Nature**, v. 181, p. 1199-1200, 1958.

JIA, Z; TANG, M.; WU, J. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, p. 555–559, 1999.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidant means folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152–178, 1999.