

EFEITO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA EXTRAÍDA DAS FOLHAS DA *STEVIA REBAUDIANA* NA PROTEÇÃO DO DIABETES INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA EM RATOS.

João Paulo Gonçalves da Costa Silva (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Silvano Piovan, Paula Gimenez Milani, Silvio Claudio da Costa, Cecília Edna Mareze da Costa (Orientadora), e-mail: cemcosta@uem.br.

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

Ciências Biológicas II – Fisiologia Geral

Palavras-chave: antioxidante, *Stevia rebaudiana*, glicemia.

Resumo

A fração a acetado de etila (FAE) obtida das folhas de *Stevia rebaudiana* é isenta de glicosídeos do esteviol e rica em compostos fenólicos. Foi demonstrado, recentemente, que a FAE possui efeito insulínico na presença de concentrações altas de glicose, diante destes resultados, este trabalho avaliou se ratos tratados previamente com a FAE desenvolvem proteção contra o diabetes induzido por estreptozotocina. Ratos com 30 dias de idade foram submetidos ao tratamento com a FAE (5mg/Kg/dia), por sonda esofágica, durante 60 dias. A indução do diabetes experimental (estreptozotocina-40 mg/kg p.c. i.v.) foi realizado no 30º dia de tratamento. Foram estabelecidos quatro grupos experimentais: NC = normais controle (n=5); NT = normais tratados (n=5); DC = diabéticos controle (n=20) e DT = diabéticos tratados (n=20). Parâmetros avaliados foram peso corporal, ingestão alimentar e hídrica, urina de 24 horas, teste oral de tolerância a glicose, glicemia sanguínea, concentração de glicose, frutossamina, colesterol total, HDL e triglicerídeos e concentração plasmática de insulina. Os resultados mostraram que o grupo DT apresentou redução ($p < 0,01$) na área sob a curva dos valores glicêmicos, registrados durante o teste de tolerância à glicose, em relação ao DC. A insulinemia de jejum de DT foi duas vezes maior ($p < 0,01$) que do DC e a concentração plasmática de frutossamina estavam menores ($p < 0,05$). Portanto, a FAE apresenta propriedades funcionais que foram capazes de amenizar os efeitos diabetogênicos da estreptozotocina, melhorando a tolerância à glicose e a insulinemia e diminuindo a glicação de proteínas plasmáticas.

Introdução

Os extratos da *Stevia rebaudiana* apresentam mais de 100 compostos, entre eles: flavonóides, alcalóides, clorofilas hidrossolúveis, xantofilas e compostos fenólicos, como os ácidos caféico e clorogênico (MILANI, et al.

2015). Recentemente, nosso grupo de pesquisa realizou o fracionamento com diferentes solventes e avaliou a capacidade antioxidante de várias frações do extrato de folhas de stevia. Este estudo demonstrou que o extrato etanólico e as frações metanólica e de acetato de etila apresentaram grande potencial antioxidante, com destaque para a fração acetado de etila (FAE), que é isenta de glicosídeos do esteviol e constituída essencialmente por compostos fenólicos (52,42%) e proteínas (34,5%) (MILANI, et al. 2015). O efeito da FAE na secreção de insulina em ilhotas isoladas foi investigado e observamos importante efeito insulínico na presença de altas concentrações de glicose (PIOVAN, et al. 2018). Diante de tais resultados, o objetivo deste trabalho foi dar continuidade às investigações, avaliando possíveis propriedades desta fração na proteção do diabetes induzido por estreptozotocina.

Materiais e métodos

Obtenção da fração de acetato de etila: A FAE foi obtida no Nepron (DBQ-UEM), conforme metodologia estabelecida (MILANI, et al. 2015).

Animais Experimentais: Os protocolos experimentais utilizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (Parecer CEUA 9076141116) da UEM. Foram utilizados 50 ratos *Wistar* machos com 30 dias de idade, recebendo ração (Nuvital®) e água *ad libitum*, mantidos em temperatura de 23 °C e fotoperíodo de 12hs claro/12 hs escuro. Foram estabelecidos quatro grupos experimentais: NC = normais controle (n=5); NT = normais tratados (n=5); DC = diabéticos controle (n=20) e DT = diabéticos tratados (n=20).

Tratamento com FAE: Ratos com 30 dias de idade foram submetidos ao tratamento com a FAE (5mg/Kg/dia), por via oral (sonda esofágica), durante 60 dias consecutivos (30 dias antes da indução do diabetes e 30 dias depois da indução).

Indução do diabetes experimental: Animais com 60 dias de idade foram anestesiados (tiopental 40 mg + lidocaína 10 mg/Kg, i.p.) e, em seguida, receberam uma única aplicação intravenosa de estreptozotocina (Sigma; 40 mg/kg p.c.) dissolvida em tampão citrato (0,05M; pH 4,5).

Parâmetros avaliados: O peso corporal, ingestão alimentar e hídrica foram registrados semanalmente. A urina de 24 horas foi coletada e utilizada para medir o volume e realizar as dosagens de glicose. Ao final do tratamento os animais foram submetidos ao Teste oral de Tolerância à Glicose (GTT), estando em jejum noturno de 12 horas. Após receberam uma solução de glicose (1,5g/kg) por via oral, amostras de sangue foram colhidas por punção caudal nos tempos: 0, 5, 15, 30 e 60 minutos. Os valores de glicemia sanguínea foram determinados em um glicosímetro (*MediSence Optium*). A eutanásia dos animais foi realizada por sobrecarga anestésica (tiopental sódico, 120 mg/kg, i.p.). Após laparotomia mediana, foram retirados e pesados tecidos e órgãos. A quantificação das concentrações sanguíneas de glicose, frutossamina, colesterol total, HDL e triglicerídeos foi por kits

específicos (Gold Analise). A concentração plasmática de insulina foi determinada por radioimunoensaio.

Análise Estatística: Os resultados, apresentados como média \pm epm, foram submetidos à análise de variância, seguido de teste de Tukey ($p < 0,05$) ou Teste t. Foi utilizado o programa *GraphPad Prism* versão 6.0.

Resultados e Discussão

Efeito da FAE no teste oral de tolerância à glicose: Os valores glicêmicos registrados durante o GTT dos ratos normais não diferiram entre os grupos controle e tratados, mas foram, como esperado, significativamente menores que aqueles observados nos animais diabéticos. Os animais DT apresentaram redução significativa ($P < 0,01$) na glicemia registrada no tempo 15, quando comparados com DC. Quando calculada a área sob a curva (ASC), ao comparar os grupos diabéticos separadamente, observou-se diferença significativa ($P < 0,01$), de forma que o DT apresentou menor ASC em relação à DC (Tabela 1).

Efeito da FAE na glicemia e na insulinemia de jejum: Conforme dados apresentados na Tabela 1, os valores glicêmicos dos grupos diabéticos foram significativamente mais elevada que os grupos de animais normais ($P < 0,05$). As reduções de glicemia de DT não foram significativas quando comparados com seu controle (GDC), mas também não diferiram estatisticamente dos animais normais. A insulinemia de DT foi significativamente maior que a de DC ($P < 0,01$ – teste T). Alguns trabalhos mostram que produtos com atividade antioxidante possuem a capacidade de proteger a célula β dos efeitos da STZ (GUPTA, et al. 2012). Nossos resultados apontam um possível efeito protetor da FAE sobre a ação diabetogênica da estreptozotocina.

Efeito da FAE nos níveis de frutossamina: Verifica-se que nos grupos DT e DC as concentrações de frutossamina plasmática estavam mais elevadas que dos animais normais (Tabela 1). Avaliando o efeito do tratamento, observa-se que o grupo DT apresentou valores reduzidos em comparação com DC ($P < 0,05$). Já está bem estabelecido que as complicações do *diabetes mellitus* são, em parte, decorrentes do estresse oxidativo causado pela elevação na glicemia e permanência deste quadro durante tempo prolongado. Esta condição pode levar à glicação de proteínas e perda de funcionalidades (DICKINSON, et al. 2002). Segundo Zatalia e Sanusi (2013), o uso de produtos antioxidantes pode auxiliar na redução de reações causadas por radicais livres formados durante períodos prolongados de glicemia elevada.

Os demais parâmetros avaliados como, peso, ingestão alimentar (Tabela 1) e ingestão hídrica, volume de urina, glicosúria e lipidemia (dados não mostrados) não apresentaram diferença significativa entre os grupos controles e os grupos de animais que receberam o tratamento com FAE.

Tabela 1. Efeito da fração acetato de etila das folhas da *Stevia rebaudiana* em parâmetros fisiológicos de ratos normais e diabéticos.

Grupo	Peso (g)	Ingestão alimentar semanal (g)	AUC	Glicemia jejum (mg/dL)	Insulina Jejum (ng/mL)	Frutosamina (mmol/L)
NC	347±2,32*	122,5±3,57*	1082±8,34*	138,2±6,17	0,85±3,44*	1,23±2,31*
NT	338±3,47*	118,8±2,41*	1034±12,65*	135,5±8,06	0,91±2,91*	1,18±6,7*
DC	267±4,12	85,4±5,75	1432±8,15*	336±5,79*	0,25±5,12*	1,68±3,29*
DT	274±5,35	91,8±4,03	1210±6,71	234±7,14	0,51±2,32	1,49±4,21

* Difere significativamente do grupo DT.

NC: Normal Controle; NT: Normal Tratado; DC: Diabético Controle; DT: Diabético Tratado.

Conclusões

A fração acetato de etila das folhas da *Stevia rebaudiana* apresenta propriedades funcionais capazes de amenizar os efeitos diabetogênicos da estreptozotocina, melhorando a tolerância à glicose e a insulinemia e diminuindo a glicação de proteínas plasmáticas de ratos diabéticos.

Referências

DICKINSON, P.J. CARRINGTON, A.L.; FROST, G.S.; BOULTON, A.J. Neurovascular disease, antioxidants and glycation in diabetes. **Diabetes Met. Res. Rev.**, v. 18, n. 4, p. 260-72, 2002.

GUPTA, R., SHARMA, A. K., SHARMA, M. C., GUPTA, R. S. Antioxidant activity and protection of pancreatic β -cells by embelin in streptozotocin-induced diabetes. **Journal of diabetes**, v. 4, n. 3, p. 248-256, 2012.

MILANI, P.; FORMIGONI, M.; LIMA, Y.; PIOVAN, S.; PEIXOTO, G.; MONTOIA, D.; RODRIGUES, W.; SILVA, J.; AVINCOLA, A.; PILAU, E.; COSTA, C.E.M.; COSTA, S.C. Fortification of the whey protein isolate antioxidant and antidiabetic activity with fraction rich in phenolic compounds obtained from *Stevia rebaudiana* (Bert.). Bertoni leaves. **Journal of food science and technology**, v. 54, n. 7, p. 2020-2029, 2017.

PIOVAN, S. PAVANELLO, A.; MARTINS, I.; PEIXOTO, G.; MATIUSSO, C.; DE MORAES, A.M.; MALTA, A.; PALMA-RIGO, K.; FRANCO, C.; MILANI, P.G.; DACOME, A.S.; DA COSTA, S.C.; MATHIAS, P.C.; MAREZE-COSTA, C. *Stevia* Nonsweetener Fraction Displays an Insulinotropic Effect Involving Neurotransmission in Pancreatic Islets. **International journal of endocrinology**, v. 2018, 2018.

27º Encontro Anual de Iniciação Científica
7º Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior



2 e 3 de outubro de 2018

ZATALIA, S.R.; SANUSI, H. The role of antioxidants in the pathophysiology complications, and management of diabetes mellitus. **Acta Med Indones**, v.45, n. 2, 141-7, 2013.