



Encontro Internacional  
de Produção Científica  
24 a 26 de outubro de 2017

ISBN 978-85-459-0773-2

## EFEITO INSULINOTRÓPICO EM RATOS DIABÉTICOS TRATADOS COM WHEY PROTEIN ISOLADO E FORTIFICADO COM FRAÇÃO DE STEVIA

Cler Antônia Jansen da Silva<sup>1</sup>; Maria Eduarda Perina Padilha<sup>2</sup>; Silvano Piovan<sup>3</sup>; Maria Rosa Trentin Zorzenon<sup>4</sup>; Paula Gimenez Milani Fernandes<sup>5</sup>; Silvio Cláudio da Costa<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica do Curso de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR. Bolsista PIBITI/CNPq – UEM. clerjansen@gmail.com

<sup>2</sup>Acadêmica do Curso de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá. Bolsista PIBIC/FA – UEM. eduardapp@gmail.com

<sup>3</sup>Doutorando em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Ciências Biológicas, UEM, Maringá, PR. silvanopiovan23@gmail.com

<sup>4</sup>Acadêmica do Curso de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá. Bolsista PIBIC/CNPq – UEM. mariarosazorzenon@gmail.com

<sup>5</sup>Doutora, Departamento de Bioquímica, Núcleo de Estudos em Produtos Naturais, Universidade Estadual de Maringá – UEM. pgmfarnandes2@uem.br

<sup>6</sup>Orientador, Doutor, Departamento de Bioquímica, Núcleo de Estudos em Produtos Naturais, Universidade Estadual de Maringá – UEM. sccosta@uem.br

### RESUMO

Diabetes mellitus é uma doença característica da disfunção do metabolismo de carboidratos e a sua principal característica é o índice elevado de glicose no sangue, conhecido como hiperglicemia. Estudos demonstraram que a *Stevia rebaudiana* é uma planta rica em glicosídeos de esteviol com alto poder edulcorante e que possuem propriedades importantes. Além disso, alguns estudos vêm demonstrando que esta planta é fonte de antioxidantes naturais que podem ser importantes para o controle e tratamento da doença, dentre esses compostos estão compostos fenólicos e flavonoides. O suplemento proteico conhecido como whey, na forma isolada ou concentrada, possui diversas propriedades que podem atuar como adjuvantes no tratamento de síndromes metabólicas diabetes mellitus. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação insulínica do whey protein isolado fortificado com uma fração de *S. rebaudiana* (0,2%), rica em compostos antioxidantes e livre de glicosídeos, em ratos diabéticos induzidos por estreptozocina suplementados por gavagem esofágica durante 35 dias. Foram atribuídos cinco grupos experimentais, ND (não diabético), DC (diabético controle), DI (diabético suplementado com o isolado), DF (diabético suplementado com a fração), DIF (diabético suplementado com o isolado+fração). A secreção de insulina foi determinada por radioimunoensaio. Os resultados mostraram que houve aumentos significativos do hormônio insulina nos grupos tratados, sendo o grupo DF o que apresentou resultados significativamente mais expressivos. Nos valores do grupo DIF pode ser observado que houve um incremento do efeito insulínico do isolado. Esse estudo revelou que frações de estévia apresentam potencial de efeito aditivo ou fortificador de suplementos alimentares para pacientes diabéticos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Diabetes; Fração antioxidante de estévia; Insulina; *Stevia rebaudiana*; Whey protein isolado.

### 1 INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus é caracterizada por uma disfunção no metabolismo de carboidratos, gordura e de proteínas. O tipo 1 é causado por reações autoimunes do organismo, em que os próprios anticorpos atuam contra a produção de insulina pelas células  $\beta$  do pâncreas. Desse modo, estas células  $\beta$  são destruídas e, conseqüentemente, a insulina não é suficientemente produzida. (NELSON; COX, 2014; ATKINSON; MACLAREN, 1994).

De maneira geral, a insulina é um dos principais reguladores das vias metabólicas dos organismos e a sua principal função é a homeostase dos níveis de glicose sanguínea. Este hormônio atua no mecanismo de sinalização de captação do açúcar, presentes em diversos tecidos, e dirigindo-o para o interior das células para ser utilizado na síntese de glicogênio, lipídios e proteínas. O diabetes não controlado se caracteriza por altos níveis de glicose no sangue, denominado hiperglicemia, e também a distúrbios como poliúria, glicosúria, podendo levar até a falência de alguns órgãos (NELSON; COX, 2014).

O diabetes requer insulínica, uso contínuo de medicamentos e um controle cuidadoso de uma alimentação balanceada. A ingestão de alimentos, aditivos ou suplementos pode atuar de forma significativa como adjuvantes nesse tratamento (ASIF, 2014; MILANI *et al.*, 2016; GAUDEL *et al.*; 2013).



A *Stevia rebaudiana* Bertoni (Bert.) é uma planta da família *Asteraceae* nativa da América do Sul, que é cultivada em diversos países para fins de pesquisa, industrialização e comercialização de seus principais produtos, os glicosídeos de esteviol (rebaudiosídeo A e esteviosídeo). (DACOME *et al.*, 2005; FERRI *et al.*, 2006). Além dos glicosídeos, as folhas desta planta apresentam compostos antioxidantes como fenólicos e flavonoides que podem atuar de maneira benéfica em diversas síndromes ou doenças metabólicas (MILANI *et al.*, 2017; JEPPESEN, *et al.*, 2002).

O isolado proteico obtido a partir do soro do leite é conhecido como whey protein. Suas proteínas possuem propriedades como efeitos insulíntrópicos, antioxidantes, antimicrobianos, antivirais, aumento da digestibilidade, atividade na úlcera e anti-câncer. Essas proteínas são principalmente  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbumina, imunoglobulinas, peptídeos, albumina sérica bovina, lactoferrina e lactoperoxidasas. (SGARBIERI, 2004; MCINTOSH e LEU, 2001).

Segundo Milani *et al.*, 2017, uma fração de *Stevia* obtida pelo fracionamento com acetato de etila, quando adicionada ao whey protein isolado (0,2%), apresentou um incremento de 80% na atividade antioxidante do whey. A suplementação desse produto em ratos diabéticos resultou na redução da hiperglicemia, frutossamina e melhores resultados no teste de tolerância à glicose (GTT).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho é mostrar os efeitos insulíntrópicos de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, suplementado com fração de estévia e isolado proteico do soro do leite.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAIS

A fração de stevia (F) foi obtida a partir de folhas de *S. rebaudiana* (variedade seminal: Stevia UEM-13) cultivadas na Universidade Estadual de Maringá (UEM, Maringá, Paraná, Brasil). Do soro de leite desnatado e pasteurizado, adquirido da leiteria Flora Leite (Flórida, Paraná, Brasil) foi obtido o whey protein isolado (I). A estreptozotocina foi adquirida da Sigma. A concentração plasmática de insulina foi determinada por radioimunoensaio (kit RI-13 K, reagentes e anticorpos específicos para ratos, Linco Research Inc.). O alimento para roedores (ração) foi obtido de Nuvilab (Colombo, Paraná, Brasil).

### 2.2 SUPLEMENTO DE WHEY PROTEIN ISOLADO COM ADIÇÃO DE FAS (WPI + FAS)

De acordo com Milani *et al.* (2017), uma fração de *Stevia* (0.2%) foi adicionada ao whey protein isolado, e a sua proporção foi determinada de acordo com os resultados obtidos por Shivanna *et al.* (2013) que observaram efeitos antidiabéticos em animais experimentais alimentados com ração contendo 4% de folhas de *S. rebaudiana*.

### 2.3 INDUÇÃO DO DIABETES

Para a indução da Diabetes Mellitus, foi administrado única aplicação, via intraperitoneal, de estreptozotocina na dose de 40 mg/kg p.c, após jejum noturno de 12 horas dos animais. Após a aplicação, os animais permaneceram em jejum por mais quatro horas. Após três dias, foram selecionados apenas os animais diabéticos que apresentarem glicemia igual ou maior que 200 mg/dl. A estreptozocina foi dissolvida em tampão citrato (0,05M; pH 4,5).





## 2.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os 50 animais (ratos *Wistar* machos), com 55 dias de idade, foram divididos em dois grupos, sendo um grupo normal (ND, n=10) e outro diabético. O grupo diabético será dividido em 4 subgrupos, caracterizando os seguintes tratamentos: Grupo DC (n=10): ratos diabéticos controle, com dieta padrão; Grupo DF (n=10): ratos diabéticos suplementados com fração estévia; Grupo DI (n=10): ratos diabéticos suplementados com whey isolado; E grupo DIF (n=10): ratos diabéticos suplementados com o whey isolado fortificado com a fração stévia. O grupo DC foi submetido ao mesmo tipo de procedimento, recebendo apenas água.

A suplementação foi realizada por via oral, por meio de sonda esofágica, durante 35 dias. A quantidade de suplemento foi de 100 mg do respectivo produto/ kg de peso corporal/ dia. Após o período de tratamento, foi realizada a eutanásia.

## 2.5 ANÁLISE DE GLICEMIA SEMANAL

Semanalmente, uma gota de sangue foi retirada por uma punção caudal para o controle sanguíneo da glicemia por meio do glicosímetro da marca MediSence Optium.

## 2.6 TESTE ORAL DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (GTT)

No final do tratamento, após o jejum noturno de 12h, os animais foram submetidos ao GTT oral. Após a amostragem de sangue (punção caudal) para a glicemia no tempo zero, os animais receberam uma sobrecarga de glicose (1,5 g / kg/ gavagem). Novas amostras de sangue foram coletadas 15, 30, 60, 90 e 120 min após a sobrecarga de glicose e a glicemia foi determinada usando um glicosímetro da MediSence Optium.

## 2.7 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS INSULINOTRÓPICOS

Na eutanásia, o sangue foi retirado e centrifugado a 3000 rpm, durante 10 min. A concentração de insulina no meio de incubação foi determinada por radioimunoensaio. Este método é baseado na competição entre a insulina marcada com radioisótopo  $^{125}\text{I}$  e a insulina não marcada pelo anticorpo anti-insulina, que é produzido em cobaias. Considerando que as quantidades de hormônio radioativo e do anticorpo são constantes, a formação do complexo (insulina marcada/anticorpo) depende da quantidade de insulina fria presente na solução (PUPO e MARREIRO, 1970). Foram utilizados 100 $\mu\text{L}$  da amostra + 200 $\mu\text{L}$  de insulina radioativa (quente) contendo o anticorpo.

## 2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram submetidos à análise de variância usando o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). O programa estatístico SAS (Statistical Analysis System 2006, versão 9.1) e GraphPad Prism versão 5.0 foram utilizados.

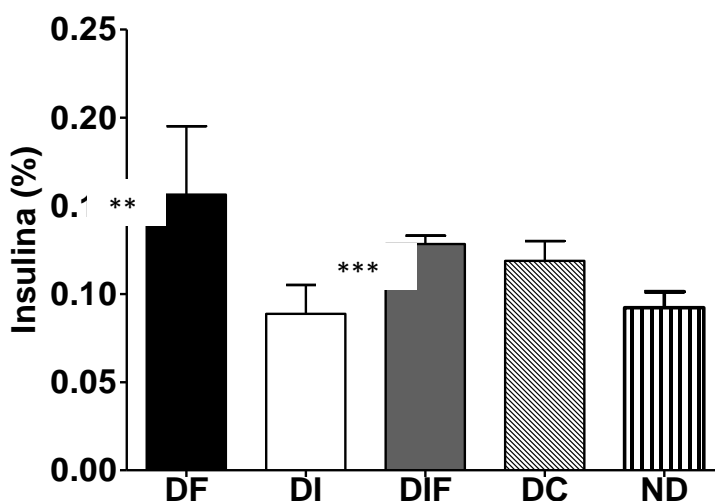


### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com Milani *et al.* (2017), os testes fisiológicos revelaram que os três suprimentos (fração *Stevia*, whey protein isolado e whey protein isolado fortificado com *Stevia*) contribuíram para melhorar o controle metabólico de ratos diabéticos. Um parâmetro muito importante para indicar o controle da diabetes, é o índice glicêmico. Este parâmetro foi analisado semanalmente e pelo teste do GTT. Os resultados mostraram que em ambos a fração de estévia fortificou os efeitos do isolado e ainda no grupo DF os valores foram ainda mais expressivos.

A suplementação de diferentes dietas aos animais de experimentação propiciaram respostas insulínótropas diferentes, conforme pode ser observado na Figura 1. Observando-se as diferenças significativas sobre as respostas do aumento de secreção de insulina, representados pelos asteriscos, é possível notar que os animais não diabéticos (ND) suplementados com dieta padrão produzem uma resposta menor do que o grupo diabético suplementado com fração de *Stevia* (DF), com ( $p < 0,05$ ). A análise de outros grupos diabéticos mostrou que a suplementação do whey fortificado (DIF) possui um incremento significativo na secreção de insulina em comparação ao diabético suplementado somente com whey isolado (DI), mostrando o potencial insulínótropo combinado. Entretanto, a produção de insulina pelo grupo suplementado com fração (DF) difere significativamente do grupo suplementado somente com whey isolado (DI), tendo o DF uma maior secreção de insulina, em comparação ao DI, ( $p < 0,05$ ). Assim, pode-se afirmar que o potencial insulínótropo está associado mais fortemente à fração de *Stevia*.

Os resultados das glicemias semanais e do GTT são em grande parte justificados pelo efeito da secreção de insulina mostrado neste trabalho.



**Figura 1:** Insulina (%) secretada em ratos diabéticos e não diabéticos. ND não diabético, DC diabético controle, DF diabético suplementado com fração de *Stevia*, DI diabético suplementado com whey Isolado, DIF diabético suplementado com whey Isolado fortificado com fração de *Stevia*. \* difere do grupo DI ( $p < 0,05$ ); \*\* difere do grupo DI ( $p < 0,05$ ); \*\*\* difere do DF ( $p < 0,05$ ).

### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises de insulina revelaram que os três suplementos (WPI, FAS e WPI+FAS) contribuíram para aumentar a secreção de insulina nos ratos diabéticos.



Encontro Internacional  
de Produção Científica  
24 a 26 de outubro de 2017

ISBN 978-85-459-0773-2

No entanto o efeito mais pronunciado foi observado no grupo suplementado com a fração e que esta fortificou esse efeito no whey. Esses resultados corroboram com as propriedades hipoglicemiantes descritas em Milani *et al.*, 2017, e mostram que a fração de estévia tem alto potencial para ser utilizada como um aditivo em suplementos alimentares com funcionalidades satisfatórias.

## REFERÊNCIAS

ASIF, M. The prevention and control the type-2 diabetes by changing lifestyle and dietary pattern. **Journal of Education and Health Promotion**, [s.l.], v. 3, n. 1, p.1-8, 2014.

ATKINSON, M. A.; MACLAREN, N. K.. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. **N Engl J Med**, [s.l.], v. 331, n. 21, p.1428-1436, 24 nov. 1994.

DACOME, A.S. et al. Sweet diterpenic glycosides balance of a new cultivar of *Stevia rebaudiana* (Bert.)Bertoni: Isolation and quantitative distribution by chromatographic, spectroscopic, and eletrophoretic methods. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 40, p. 3587–3594, 2005.

FERRI, L. A. F. et al. Investigation of the antihypertensive effect of oral crude stevioside in patients with mild essential hypertension. **Phytotherapy Research**, [s.l.], v. 20, n. 9, p.732-736, 2006.

GAUDEL, C. et al. A Whey Protein Hydrolysate Promotes Insulinotropic Activity in a Clonal Pancreatic -Cell Line and Enhances Glycemic Function in ob/ob Mice. **Journal Of Nutrition**, [s.l.], v. 143, n. 7, p.1109-1114, 8 maio 2013.

JEPPESEN, P.B. et al. Stevioside induces antihyperglycaemic, insulinotropic and glucagonostatic effects in vivo: studies in the diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. **Phytomedicine**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.9-14, jan. 2002.

MCINTOSH, G. H.; LEU, R. K. L. The influence of dietary proteins on colon cancer risk. **Nutrition Research**, [s.l.], v. 21, n. 7, p.1053-1066, jul. 2001.

MILANI, P.G. et al . Functional properties and sensory testing of whey protein concentrate sweetened with rebaudioside A. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 29, n. 1, p. 125-137, Feb. 2016.

MILANI, P.G. et al. 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**, [s.l.], v. 54, n. 7, p.2020-2029, jun. 2017.

NELSON, D.L.; COX, M.M.; **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2011. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

PUPO, A. A.; MARREIRO, D. Dosagem de insulina pelo radioimunoensaio com duplo anticorpo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, [s.l.], v. 16, p. 153, 1970.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, [s.l.], v. 17, n. 4, p.397-409, dez. 2004.





Encontro Internacional  
de Produção Científica  
24 a 26 de outubro de 2017

ISBN 978-85-459-0773-2

SHIVANNA, N. et al. Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of Stevia rebaudiana. **Journal Of Diabetes And Its Complications**, [s.l.], v. 27, n. 2, p.103-113, mar. 2013.