

Universidade de São Paulo  
Faculdade de Saúde Pública

Influência da ingestão de erva mate (*Ilex  
paraguariensis*) sobre parâmetros relacionados ao  
diabetes mellitus e metabolismo de glicose em ratos  
Wistar

Daniela Moura de Oliveira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Saúde Pública para obtenção do  
título de Mestre em Saúde Pública.

Área de Concentração: Nutrição

Orientadora: Profa Dra Deborah Helena Markowicz Bastos

São Paulo  
2008

Influência da ingestão de erva mate (*Ilex  
paraguariensis*) sobre parâmetros relacionados ao  
diabetes mellitus e metabolismo de glicose em ratos  
Wistar

Daniela Moura de Oliveira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Saúde Pública para obtenção do  
título de Mestre em Saúde Pública.

Área de Concentração: Nutrição

Orientadora: Profa Dra Deborah Helena Markowicz Bastos

São Paulo  
2008

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

Ontem o menino que brincava me falou  
Que hoje é semente do amanhã  
Para não ter medo que esse tempo vai passar  
Não se desespere não, nem pare de sonhar  
Nunca se entregue, nasça sempre com as manhãs  
Deixe a luz do sol brilhar no céu do seu olhar  
Fé na vida, fé no homem, fé no que virá  
Nós podemos tudo  
Nós podemos mais  
Vamos lá fazer o que será

(Sementes do amanhã, Gonzaguinha)

## **AGRADECIMENTOS**

À Professora Deborah Bastos, com todo respeito e admiração, pela oportunidade, orientação, confiança e por todos os ensinamentos, fundamentais para minha formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro (Processo 2006/58019-5).

À Leão Júnior pelo fornecimento do extrato solúvel de erva mate.

Ao Professor Ubiratan Fabres Machado e equipe do Laboratório de Fisiologia e Biofísica do ICB-USP pela imensa contribuição ao trabalho, em especial à Dra Helayne Soares de Freitas.

Ao Professor Marcelo Lima Ribeiro e equipe da Universidade São Francisco pela oportunidade de realização e ajuda nas análises de PCR.

À Professora Sandra Vivolo pelas sugestões e críticas construtivas que enriqueceram a dissertação.

À Dra Simone Mendonça pela ajuda nas análises e sacrifício dos animais.

À Gianni pela orientação estatística.

Às amigas Ruth, Greisse e Carla pela maravilhosa convivência, amizade e ajuda durante o Mestrado;

Às as amigas dos Laboratórios de Bromatologia e de Bioquímica e Análises Funcionais de Alimentos FSP pela convivência e ajuda nos trabalhos.

Aos funcionários do Departamento de Nutrição e funcionários da CPG da FSP.

Aos meus pais, Nilcéia e Amado, pelo apoio e por tudo que fizeram por mim, sempre.

Ao Tio Claudio pelo cuidado, apoio e pela ajuda no experimento e em todas as fases do trabalho.

Ao André pelo companheirismo, paciência, amor e por fazer meus dias mais felizes.

## RESUMO

**Introdução:** A incidência e prevalência do Diabetes Mellitus aumentam a cada ano, alcançando proporções epidêmicas. A infusão aquosa de erva mate apresenta consideráveis teores de ácidos clorogênicos, que além de atuarem como antioxidantes, podem diminuir a produção e absorção de glicose, conforme indicado na literatura. **Objetivos:** Avaliar a influência da ingestão de infusão de erva mate sobre parâmetros bioquímicos relacionados ao diabetes mellitus e o metabolismo de glicose. **Metodologia:** Ratos Wistar (n=41) foram divididos em: não diabéticos controle (NDC, n=10); não diabéticos erva mate (NDE, n=10); diabéticos controle (DC, n=11) e diabéticos erva mate (DE, n=10). O diabetes foi induzido por aloxana. Os animais receberam extrato de erva mate (1 g/kg) ou solução fisiológica por gavagem durante 28 dias, com água e ração comercial *ad libitum*. Seus tecidos foram submetidos às análises (glicemia, insulinemia, colesterol total, atividade da enzima glicose-6-fosfatase hepática e expressão gênica do cotransportador intestinal de Na<sup>+</sup>/glicose SGLT1, sendo este responsável pela maior parte da absorção de glicose no lúmen). Os dados foram analisados por análise de variância com dois fatores (ANOVA 2-way) com ou sem medidas repetidas, de acordo com a variável. O nível de significância adotado foi 5%. **Resultados:** Não houve diferença significativa entre os grupos controle (NDC e DC) e os grupos que ingeriram erva mate (NDE e DE) para a glicemia, insulinemia, colesterol total e atividade da glicose-6-fosfatase hepática. No entanto, a expressão gênica

dos transportadores de glicose SGLT1 foi significativamente menor nos animais que receberam erva mate, tanto no duodeno ( $p=0,007$ ) quanto no jejuno ( $p<0,001$ ) **Conclusão:** A ingestão da erva mate não modificou significativamente os parâmetros bioquímicos estudados dos animais sob intervenção relativamente ao controle. No entanto, foi observada diferença significativa quanto à expressão do transportador de glicose SGLT1, sugerindo que compostos bioativos da erva mate são capazes de reduzir a absorção da glicose.

**Descritores:** *Ilex paraguariensis*, ácidos clorogênicos, diabetes mellitus, glicemia, insulina, glicose-6-fosfatase, SGLT1.



## ABSTRACT

**Introduction:** The incidence and prevalence of Diabetes Mellitus are increasing, reaching epidemic proportions. Yerba mate infusions are rich in polyphenols, especially chlorogenic acids, that are known to have antioxidant properties. Evidences suggest that dietary polyphenols could also play a role in glucose metabolism and absorption. **Objective:** The aim of this study was to evaluate if yerba mate extract could have antidiabetic properties in alloxan-induced diabetic Wistar rats. **Research design and methods:** Wistar rats (n=41) were divided in four groups: non diabetic control (NDC, n=10); non diabetic yerba mate (NDM, n=10); diabetic control (DC, n=11) and diabetic yerba mate (DM, n=10). Diabetes was induced by alloxan (38 mg/kg bw). The mate group animals received yerba maté extract diluted in saline solution in a 1g extract/kg bw dose for 28 days, controls received saline solution only. The following biochemical parameters were measured: serum glucose, insulin and total cholesterol; hepatic glucose-6-fosfatase activity and gene expression of the intestinal Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter SGLT1. **Results:** There were no significant differences in serum glucose, insulin, total cholesterol and hepatic glucose-6-phosphatase activity between the groups that ingested yerba mate extract (NDM and DM) and the controls (NDC and DC). However, the intestinal SGLT1 gene expression was significantly lower in animals that received yerba mate both in upper (p=0.007) and middle small intestine (p<0,001). **Conclusion:** These results indicate that bioactive

compounds present in yerba mate might be capable to decrease intestinal glucose absorption, by decreasing SGLT1 expression.

**Descriptors:** *Ilex paraguariensis*, chlorogenic acid, diabetes mellitus, serum glucose, insulin, glucose-6-phosphatase, SGLT1.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Composição do extrato solúvel de erva mate .....	44
<b>Tabela 2</b> - Presença e grau de cetonúria no primeiro dia de intervenção (d=1), de acordo com o grupo .....	47
<b>Tabela 3</b> - Presença e grau de cetonúria no último dia de intervenção (d=29), de acordo com o grupo .....	47
<b>Tabela 4</b> - Glicemia dos animais ao final do experimento (d=29), de acordo com o grupo .....	50
<b>Tabela 5</b> - Concentração de insulina dos animais ao final do experimento (d=29), de acordo com o grupo .....	50
<b>Tabela 6</b> - Atividade do complexo enzimático glicose-6-fosfatase no tecido hepático, de acordo com o grupo .....	51

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estrutura química do ácido clorogênico (5-O-cafeoilquínico) .....	21
<b>Figura 2</b> - Transporte acoplado de Na <sup>+</sup> /glicose pelo cotransportador SGLT1 .....	25
<b>Figura 3</b> - Sítio de ação do complexo enzimático glicose-6-fosfatase .....	26
<b>Figura 4</b> - Delineamento Experimental .....	36
<b>Figura 5</b> - Perfil cromatográfico do extrato solúvel de erva mate.....	44
<b>Figura 6</b> - Diurese de 24 horas (mL) dos animais, segundo grupo e data de coleta.....	46
<b>Figura 7</b> - Evolução da média de peso dos animais por grupo.....	48
<b>Figura 8</b> - Colesterol total dos animais ao final do experimento (d=29), de acordo com o grupo.....	49
<b>Figura 9</b> - Expressão relativa dos transportadores SGLT1 intestinais (duodeno) de acordo com o grupo. ....	52
<b>Figura 10</b> - Expressão relativa dos transportadores SGLT1 intestinais (jejuno) de acordo com o grupo.....	52

## ÍNDICE

<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1 - DIABETES E SAÚDE PÚBLICA.....	14
1.2 – DIAGNÓSTICO E ASPECTOS FISIOLÓGICOS DO DIABETES ....	16
1.3 – POLIFENÓIS E ÁCIDOS CLOROGÊNICOS .....	19
1.3.1 - Mecanismos de Ação.....	24
1.4 – ERVA MATE ( <i>Ilex paraguariensis</i> ).....	27
1.5 - JUSTIFICATIVA:.....	30
<b>2 - OBJETIVOS</b> .....	31
2.1 - GERAL .....	31
2.2 - ESPECÍFICOS.....	31
<b>3 - MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	32
3.1– BEBIDA A BASE DE <i>ILEX PARAGUARIENSIS</i> .....	32
3.1.1 – Teor de fenólicos totais, cafeína e ácido clorogênico do extrato	32
3.2 – DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	33
3.3 – ANÁLISES LABORATORIAIS.....	37
3.3.1 – Avaliação da glicemia, colesterol e insulina no sangue.....	37
3.3.2 - Avaliação da atividade da glicose-6-fostatase no tecido hepático	37
.....	37
3.3.3 - Determinação da expressão gênica dos transportadores de	39
glicose SGLT1 no intestino .....	39
3.4 - ANÁLISE DOS DADOS.....	41
3.5. - ASPECTOS ÉTICOS.....	43
<b>4 - RESULTADOS</b> .....	44
4.1 – COMPOSIÇÃO DO EXTRATO DE ERVA MATE: .....	44
4.2 - INDUÇÃO DO DIABETES E VARIÁVEIS DE CONTROLE DO	45
EXPERIMENTO.....	45
4.3 - PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E METABÓLICOS RELACIONADOS	48
AO DIABETES.....	48
<b>5 – DISCUSSÃO</b> .....	53

5.1 – COMPOSIÇÃO DO EXTRATO DE ERVA MATE: .....	53
5.2 - INDUÇÃO DO DIABETES E VARIÁVEIS DE CONTROLE DO EXPERIMENTO .....	53
5.3 - PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E METABÓLICOS RELACIONADOS AO DIABETES .....	55
<b>6 - CONCLUSÃO</b> .....	64
<b>7 - BIBLIOGRAFIA</b> .....	65
<b>ANEXOS</b> .....	75
Anexo 1 - Boxplot.....	76
Anexo 2 - Carta de aprovação no comitê de ética .....	78

## 1- INTRODUÇÃO

### 1.1 - DIABETES E SAÚDE PÚBLICA

O Diabetes Mellitus é uma síndrome de etiologia múltipla, decorrente da falta de insulina e/ou da incapacidade da insulina de exercer adequadamente seus efeitos. Como resultado ocorre a hiperglicemia, que é um importante fator no desenvolvimento e progressão da doença (SBD, 2002). É problema de importância crescente em saúde pública, pois sua incidência e prevalência estão aumentando e alcançando proporções epidêmicas. Este aumento se deve ao crescimento e ao envelhecimento populacional, à maior urbanização e à crescente prevalência de obesidade e sedentarismo (WILD *et al.*, 2004).

Em 1985 estimava-se que existissem 30 milhões de adultos com diabetes no mundo; esse número cresceu para 135 milhões em 1995, atingindo 173 milhões em 2002, com projeção de chegar a 344 milhões no ano 2030 (WILD *et al.*, 2004). Atualmente, a prevalência de diabetes é maior em países desenvolvidos e estima-se que continuará sendo, porém o aumento proporcional será maior em países em desenvolvimento, que em 2030 concentrará 2/3 dos indivíduos diabéticos. A estimativa é de 70% de aumento na prevalência em países em desenvolvimento, contra 42% nos países desenvolvidos (KING *et al.*, 1998; WILD *et al.*, 2004).

No ranking dos 10 países com maior número de casos de diabetes, a Índia aparece em primeiro lugar, seguida da China e dos Estados Unidos nas estimativas dos anos 1995, 2000 e para 2030. O Brasil aparece em

oitavo lugar nas listas de 1995 e 2000, saltando para o sexto lugar na estimativa para 2030, com aproximadamente 11,3 milhões de doentes (KING *et al.*, 1998; WILD *et al.*, 2004). Em 2005 a população de diabéticos no Brasil era estimada em 8 milhões, ou 4,5% da população (SBD, 2007). Nos Estados Unidos, aproximadamente 20 milhões de pessoas são diabéticas, o que corresponde a cerca de 7% da população total. Estima-se que outros 54 milhões apresentem pré-diabetes, muitos não diagnosticados (ADA, 2008).

No mundo, o número de mortes atribuídas ao diabetes está em torno de 800 mil. Entretanto, sabe-se que este número de óbitos é consideravelmente subestimado. Frequentemente a doença não é mencionada na declaração de óbito pelo fato de serem suas complicações, particularmente as cardiovasculares e cerebrovasculares, as causas da morte. Uma figura mais realista sugere cerca de 4 milhões de óbitos anuais relacionados à presença dessa doença, com importante contribuição de complicações cardiovasculares (SBD, 2007).

Sua natureza crônica, a gravidade de suas complicações e os meios necessários para controlá-las tornam o diabetes uma doença muito onerosa, não apenas para os indivíduos afetados e suas famílias, mas também para o sistema de saúde (SBD, 2007). Nos Estados Unidos, os gastos com indivíduos diabéticos são 2 a 3 vezes maiores que os gastos com indivíduos que não apresentam a doença, e o custo econômico total do diabetes foi estimado em 174 bilhões de dólares em 2007, sendo 27 bilhões em custos diretos (ADA, 2008). No Brasil, o custo direto está em torno de 3,9 bilhões de dólares, em comparação com 0,8 bilhão para a Argentina e 2 bilhões para o



México (BARCELÓ *et al.*, 2003). Além do problema econômico, os custos intangíveis (dor, ansiedade e perda de qualidade de vida, por exemplo) também apresentam grande impacto na vida das pessoas com diabetes e suas famílias e são difíceis de serem quantificados (SBD, 2007).

## 1.2 – DIAGNÓSTICO E ASPECTOS FISIOLÓGICOS DO DIABETES

O termo diabetes mellitus descreve um conjunto de desordens metabólicas que diferem quanto à etiologia e se caracterizam pela hiperglicemia crônica decorrente de deficiência na produção de insulina e/ou resistência à mesma (WHO, 1999). Segundo as Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2007), e a American Diabetes Association (2008) a classificação se baseia na etiologia:

- Diabetes Mellitus tipo 1: resulta primariamente da destruição das células beta pancreáticas, com perda parcial ou total da secreção de insulina. Inclui casos decorrentes de doença auto-imune (1a) e aqueles nos quais a causa da destruição das células beta não é conhecida (idiopático, 1b). Os pacientes apresentam sintomas agudos, hiperglicemia acentuada e têm tendência à cetoacidose. É diagnosticada principalmente em crianças e jovens, mas pode ocorrer também em adultos. A taxa de destruição das células beta é variável, sendo em geral mais rápida entre as crianças. A prevenção primária não tem uma base racional que possa ser aplicada a toda a população. As intervenções populacionais ainda são teóricas,

necessitando de estudos que as confirmem. Corresponde de 5 a 10% dos casos.

- Diabetes Mellitus tipo 2: caracteriza-se por defeitos na ação e na secreção da insulina. Em geral ambos os defeitos estão presentes quando a hiperglicemia se manifesta, porém pode haver predomínio de um deles. A maioria dos pacientes com essa forma de diabetes apresenta sobrepeso ou obesidade. A cetoacidose raramente desenvolve-se espontaneamente, ocorrendo apenas quando associada a outras condições, como infecções. Pode ocorrer em qualquer idade, mas é geralmente diagnosticado após os 40 anos. Muitos casos são diagnosticados apenas após as complicações aparecerem e estima-se que 1/3 dos casos não chegam a ser diagnosticados. Os pacientes não são dependentes de insulina exógena para sobrevivência, no entanto podem necessitar de tratamento com insulina para a obtenção de um controle metabólico adequado. Possui uma base genética mais forte que o tipo 1, depende também fortemente de fatores ambientais. É passível de prevenção. Corresponde de 90 a 95% dos casos de diabetes.

Existem ainda tipos menos comuns de diabetes, que são classificados separadamente (ADA, 2005):

- Diabetes Gestacional, que representa qualquer intolerância à glicose, de magnitude variável, com início ou diagnóstico durante a gestação. Acomete de 1 a 14% das mulheres grávidas, dependendo da população estudada.

- Outros tipos específicos de diabetes, causados por defeitos genéticos nas células beta-pancreáticas, pancreatite, fibrose cística, infecções e outras doenças.

A resistência à insulina ou sua ausência no organismo diminui a eficiência de utilização periférica da glicose e aumenta sua produção, elevando a glicemia. Ocorre ainda depleção das proteínas do organismo e aumento da utilização de gorduras para obtenção de energia e síntese de colesterol (GUYTON & HALL, 1998). A concentração elevada de colesterol e ácidos graxos livres no plasma, em conjunto com as alterações estruturais que ocorrem nos tecidos corporais em decorrência da hiperglicemia, conduzem ao desenvolvimento de lesões micro e macrovasculares, responsáveis pelo aparecimento de complicações crônicas que frequentemente estão associadas ao diabetes, como retinopatia, nefropatia, neuropatia e macroangiopatias, tendo como manifestações o infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral (GUYTON & HALL, 1998; WHO, 1999; ADA, 2005). As complicações do diabetes comprometem a produtividade, a qualidade de vida e a sobrevivência dos indivíduos.

Segundo a American Diabetes Association (2008), três critérios podem ser empregados para o diagnóstico da doença: glicemia de jejum superior a 126 mg/dL; glicemia superior a 200 mg/dL no teste de tolerância oral à glicose (TTOG), que consiste na avaliação da glicemia 2 horas após ingestão de 75 g de glicose; ou ainda glicemia casual (a qualquer hora do dia) superior a 200 mg/dL, associada a sintomas do diabetes. O método mais utilizado é a dosagem da glicemia de jejum por ser mais rápida, mais

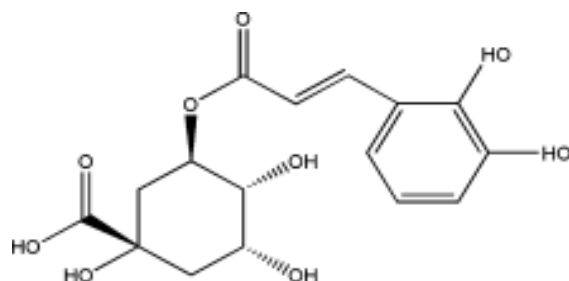
aceita pelos pacientes e ter menor custo. Caso o paciente apresente glicemia de jejum entre 100 e 125 mg/dL ou entre 140 e 199 mg/dL após o TTOG, é classificado como portador de tolerância à glicose diminuída (ADA, 2005).

### 1.3 – POLIFENÓIS E ÁCIDOS CLOROGÊNICOS

Polifenóis são um grupo complexo de substâncias químicas presentes em plantas e produtos de origem vegetal que são parte da dieta humana. Caracterizam-se pela presença de um ou mais anéis aromáticos ligados a pelo menos um radical hidroxila e/ou outros substitutos. Tais substâncias ocorrem naturalmente em frutas frescas, vegetais, nos chás e nos vinhos tintos (LINDSAY, 2000). O interesse por esses compostos aumentou nos últimos anos, uma vez que estudos epidemiológicos sugerem que o consumo de alimentos e bebidas ricas em polifenóis exerceriam efeito protetor contra doenças crônicas como as afecções coronarianas, o diabetes tipo 2 e o câncer (BLOCK *et al.*, 1992; KNERT *et al.*, 1996), o que seria, em grande parte, decorrente de suas já conhecidas propriedades antioxidantes (JOHNSTON *et al.*, 2005). O potencial antioxidante é associado à própria natureza química deste grupo de compostos: devido à sua estrutura, são em geral bons agentes redutores e juntamente com outros agentes redutores encontrados na dieta tais como vitamina C, vitamina E e carotenóides, podem proteger tecidos e estruturas celulares contra danos oxidativos (SCALBERT & WILLIAMSON, 2000).

Além da atividade antioxidante, existem evidências que alguns polifenóis apresentam efeitos sobre a produção hepática de glicose (HEMMERLE *et al.*, 1997) e também sobre o padrão de absorção intestinal da mesma (JOHNSTON *et al.*, 2003), resultando em um menor índice glicêmico do que o esperado na dieta (CLIFFORD, 2004). O principal objetivo da terapia em diabetes é normalizar o perfil glicêmico (BRAND-MILLER, 1994). A manutenção da homeostase glicêmica depende do equilíbrio entre a absorção intestinal de glicose, captação da mesma pelas células para oxidação e/ou estoque, produção hepática, reabsorção renal e a produção pancreática de insulina (OKAMOTO, 2003).

Os polifenóis mais abundantes nos alimentos podem ser divididos em dois grandes grupos: Os flavonóides e seus derivados e os ácidos fenólicos. Os ácidos clorogênicos são um grupo importante de ácidos fenólicos, biologicamente ativos, de uma família de ésteres formados pela esterificação do ácido quínico com um dos seguintes ácidos derivados do ácido cinâmico: o ácido cafeico, o ferúlico, ou o *p*-cumárico (Bastos *et al.*, 2007). Podem ser divididos de acordo com o tipo, número e posição dos resíduos acila: mono ésteres (ácidos cafeoilquínicos, CQA; cumaroilquínicos, *p*CoQA e feruloilquínicos, FQA); di (diCQA), tri (triCQA) e tetra ésteres (tetraCQA) e ainda ésteres mistos dos ácidos caféico e ferúlico (ácidos cafeoilferuloilquínicos, CFQA). (CLIFFORD, 2000). Os mais comuns e conhecidos são os mono ésteres, principalmente o ácido 5-O-cafeoilquínico (5-CQA) (Figura 1).



**Figura 1** - Estrutura química do ácido clorogênico (5-O-cafeoilquínico)

Já foram relatados vários efeitos benéficos desses ácidos fenólicos sobre parâmetros relacionados ao diabetes, tais como: redução do pico de glicemia no TTOG ( PARKER *et al.*, 1998; HERLING *et al.*, 1998; HERLING *et al.*, 2002; BASSOLI *et al.*, 2008) e redução da glicemia pós prandial, colesterol e triglicérides plasmáticos em ratos (HERLING *et al.*, 1999; SOTILLO & HADLEY, 2002); redução na resistência à insulina e melhora no “pool” de certos minerais também em ratos (SOTILLO & HADLEY, 2002); inibição *in vitro* e *in vivo* do estresse oxidativo por espécies reativas do oxigênio e nitrogênio que estão implicados na fisiopatogênese de complicações vasculares (BIXBY *et al.*, 2005; CLIFFORD, 2000), responsáveis pelo aumento da morbidade e mortalidade em pacientes com diabetes mellitus (PACHER *et al.*, 2005).

Uma das principais fontes de ácidos clorogênicos na alimentação humana é o café. Seis de nove estudos de coorte realizados na Europa e Estados Unidos relacionaram o alto consumo de café a um menor risco no desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 (VAN DAM, 2006). Em um desses estudos, o risco relativo ajustado para diabetes tipo 2 foi de 0,65

para as pessoas que consumiam mais de 6 xícaras de café/dia comparado a quem consumia 2 ou menos xícaras (VAN DAM & FESKENS, 2002).

Apesar da maioria dos efeitos fisiológicos do café estar relacionado à cafeína, a associação inversa entre o consumo de café e o diabetes mellitus tipo 2 não pode ser explicada pela presença desta. Dentre os efeitos conhecidos da cafeína, estão a diminuição da sensibilidade à insulina, da tolerância à glicose e aumento na absorção intestinal da mesma (GREENBERG *et al.*, 2006). Os ácidos clorogênicos parecem antagonizar a estimulação da cafeína sobre a absorção de glicose no intestino: estudos mostram que o café descafeinado teve resultados melhores que o café comum sobre a redução na captação intestinal de glicose (JOHNSTON *et al.*, 2003, SALAZAR-MARTINEZ, 2004) e os autores atribuíram esses efeitos à presença dos ácidos clorogênicos.

No estudo realizado por JOHNSTON *et al.*, (2003), a ingestão de café descafeinado alterou a resposta dos hormônios intestinais polipeptídeo insulínico glicose-dependente (GIP) e peptídeo glucagon-símile 1 (GLP-1), reduzindo e aumentando a liberação, respectivamente. Ambos são secretados em resposta à absorção de glicose e estimulam a liberação de insulina pelas células  $\beta$ -pancreáticas, sendo que a secreção do GIP acontece na região proximal do intestino delgado e a do GLP-1 na região distal, sugerindo assim que houve um retardo na absorção de glicose. Pelo seu efeito estimulador sobre as células  $\beta$ , o GLP-1 pode ter efeitos benéficos sobre a falta de responsividade das mesmas à glicose e alguns estudos com esse propósito vêm sendo desenvolvidos (MCCARTY, 2005).

O extrato aquoso das folhas de *Cecropia obtusifolia* (planta originária da América Central e popularmente conhecida no Brasil como embaúba), também fonte de ácido clorogênico, apresentou efeito hipoglicêmico em ratos (ANDRADE-CETTO & WIDENFELD, 2001).

As propriedades biológicas dos ácidos clorogênicos dependem da absorção intestinal e de como são metabolizados (GONTHIER *et al.*, 2003). Estudos com 5-CQA indicam que sua absorção começa no estômago, onde uma parcela é absorvida intacta (KONISHI *et al.*, 2006; LAFAY *et al.*, 2006). OLTHOF *et al.* (2001) demonstraram que 33% de um total de 2,8 mmol de ácidos clorogênicos (isômeros 3,4, e 5-CQA) foi absorvido no intestino delgado de pacientes com ileostomia. No entanto, a maior parte dos ácidos clorogênicos ingeridos são absorvidos no intestino grosso, onde sofrem metabolização por bactérias são transformados em ácido quinico e ácido cafeico, ferúlico ou cumárico (PLUMB *et al.*, 1999; OLTHOF *et al.*, 2003; GONTHIER *et al.*, 2003,). Aproximadamente 1% dos ácidos clorogênicos ingeridos são encontrados intactos na urina, o que sugere que sofram metabolização no fígado e/ou outros tecidos (OLTHOF *et al.*, 2003; GONTHIER *et al.*, 2003).



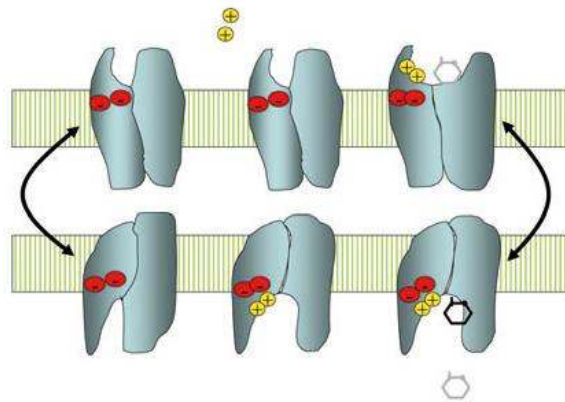
### 1.3.1 - Mecanismos de Ação

Alguns mecanismos de ação dos ácidos clorogênicos sobre parâmetros relacionados ao diabetes foram propostos, porém ainda não estão completamente definidos.

Em um estudo *in vitro*, WELSCH *et al* (1989) observaram uma redução de 80% da absorção de glicose pela membrana intestinal com a presença de 5-CQA e o mecanismo sugerido foi a dissipação do gradiente de  $\text{Na}^+$  na região apical das células. A absorção intestinal de glicose influencia a glicemia e conseqüentemente a disponibilidade da mesma para os diferentes tecidos. A quantidade de carboidratos e íons  $\text{Na}^+$  no lúmen interferem na expressão gênica do SGLT1, principal proteína transportadora de glicose no intestino (FERRARIS, 2001).

O cotransportador  $\text{Na}^+$ /glicose SGLT1 desempenha papel essencial na absorção de glicose no intestino delgado, promovendo a captação da luz intestinal para o interior da célula epitelial (WRIGHT *et al.*, 1997; KASAHARA *et al.*, 2001). Sugere-se que este transporte ocorra numa reação ordenada em que dois íons  $\text{Na}^+$  externos se ligam ao transportador, antes da glicose, induzindo uma mudança conformacional no local de ligação da molécula de glicose, aumentando a afinidade para este substrato. Em seguida ocorre nova mudança conformacional que resulta numa reorientação dos sítios de ligação do  $\text{Na}^+$  e da glicose para o interior da célula. A molécula de glicose é liberada primeiro no interior da célula e, em seguida, os dois íons  $\text{Na}^+$  (Figura 2). A força que direciona os transportadores acoplados ao  $\text{Na}^+$  é proporcionada pelo gradiente eletroquímico destes íons na passagem pela

membrana plasmática (WRIGHT *et al*, 2004; DÍEZ-SAMPEDRO *et al.*, 2000; SILVA 2007).



Extraído de: Wright *et al*, 2007.

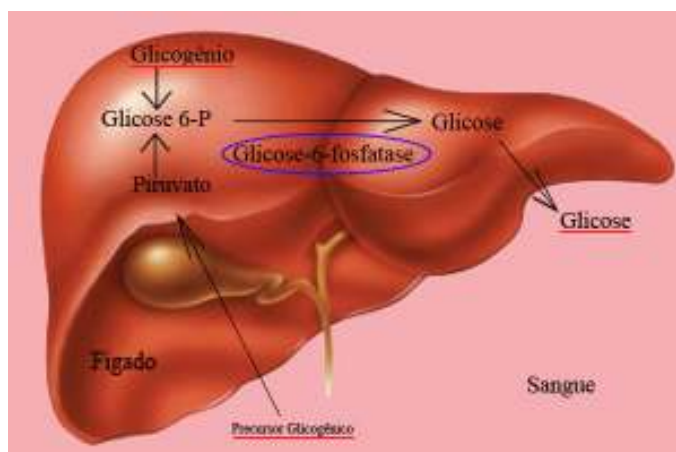
**Figura 2** - Transporte acoplado de Na<sup>+</sup>/glicose pelo cotransportador SGLT1

Sabe-se que alguns flavonóides como a quercetina, florizina e catequinas do chá verde inibem a absorção de glicose pelo SGLT1 *in vitro* por mecanismos competitivos (KOBAYASHI *et al*, 2000; WOLFFRAM *et al*, 2002). No entanto, a ação de compostos fenólicos sobre a expressão gênica do SGLT1 é desconhecida.

Outra via pela qual o ácido clorogênico parece influenciar na glicemia é através da inibição da ação da glicose-6-fosfatase. Esse sistema enzimático é responsável pela regulação homeostática da glicose sanguínea e está localizado no retículo endoplasmático dos hepatócitos, córtex renal e em menores quantidades nas células  $\beta$  pancreáticas, mucosa do intestino delgado e músculo esquelético. O fígado é o órgão que apresenta maior atividade e quantidade dessa enzima, sendo o principal responsável pelo metabolismo de glicose (SCHAFTINGEN & GERIN, 2002).

A glicose-6-fosfatase atua no passo final da gliconeogênese e da glicogenólise (retirada do fosfato da glicose-6-fosfato) originando a glicose livre que é exportada para a corrente sanguínea (Figura 3). Essa enzima é, portanto, um ponto final obrigatório de controle da liberação de glicose (SCHAFTINGEN & GERIN, 2002; BAYNES & DOMINICZAK, 2000; SLOOP *et al.*, 2007). A perda completa de sua atividade, evidenciada na Doença do Armazenamento do Glicogênio tipo I, leva a graves anormalidades metabólicas, como armazenamento hepático anormal de glicogênio e gordura, hepatomegalia e hipoglicemia (SCHAFTINGEN & GERIN, 2002, SLOOP *et al.*, 2007).

No diabetes, a glicose-6-fosfatase é um fator significativo na excessiva produção endógena de glicose, que contribui para as altas taxas glicêmicas (HERLING *et al.*, 1998; ARION *et al.*, 1997, PARKER *et al.*, 1998). A redução terapêutica de sua atividade poderia então ser interessante para regular a superprodução de glicose e controlar a glicemia no diabetes (HEMMERLE *et al.*, 1997).



**Figura 3** - Sítio de ação do complexo enzimático glicose-6-fosfatase

Estudos *in vitro* demonstraram que o ácido clorogênico isolado, seus derivados sintéticos e os polifenóis do chá verde são capazes de reduzir a atividade da glicose-6-fosfatase em microsomos isolados (ARION *et al.*, 1997, 1998; HEMMERLE *et al.*, 1997; CSALA *et al.*, 2007). Em estudos *in vivo* em modelos animais os derivados sintéticos do ácido clorogênico foram capazes de reduzir a glicemia quando administrados por via intravenosa (HERLING *et al.*, 1998, 1999) e intraperitoneal (PARKER *et al.*, 1998). O 5-CQA apresentou a mesma ação quando administrado oralmente (ANDRADE-CETTO & WIEDENFELD 2001; BASSOLI *et al.*, 2008).

#### 1.4 – ERVA MATE (*ILEX PARAGUARIENSIS*)

A erva mate é uma árvore nativa da América do Sul, sendo encontrada em ervais nativos ou adensados, explorados por pequenos produtores que se reúnem em cooperativas para processá-la ou comercializá-la com grandes indústrias produtoras de erva mate. O maior produtor é a Argentina, seguida pelo Brasil e Paraguai (BASTOS *et al.*, 2007a; HECK & MEJIA, 2007). É uma planta muito consumida nesses países e no Uruguai para o preparo de chás e infusões. Utiliza-se a erva verde seca e cancheada para o preparo de chimarrão (água quente) e tererê (água fria) e a erva torrada para o preparo de chá-mate, bastante consumido na região sudeste do Brasil (BASTOS *et al.*, 2007a).

O consumo de bebidas a base de erva mate remonta de centenas de anos. Este produto era consumido pelos indígenas antes da chegada dos

européus na América do Sul. Sua utilização na medicina popular e por herboristas é recomendada para artrite, dor de cabeça, constipação, reumatismo, hemorróidas, obesidade, fadiga, retenção de líquido, hipertensão, digestão lenta e desordens hepáticas. Devido a estas propriedades, a erva mate encontra-se inclusive em importantes farmacopéias como a Martingdale e a British Herbal Pharmacopoeia (ANESINI *et al.*, 2006).

As bebidas a base de erva mate contém vários compostos bioativos, como as metilxantinas (cafeína e teobromina), as saponinas e os compostos fenólicos, dentre eles os flavonóides (quercetina e rutina) e os ácidos fenólicos. Nesta última classe de compostos os mais abundantes são os ácidos fenólicos, principalmente os ácidos clorogênicos (CQAs, FQAs e diCQAs) (MAZZAFERA,1997; BASTOS *et al.*, 2005; BASTOS *et al.*, 2006a; BASTOS *et al.*, 2007a, 2007b). O conteúdo de polifenóis da erva mate é superior ao do chá verde e equivalente ao do vinho tinto (BIXBY *et al.*, 2005). Além da reconhecida função antioxidante dos fenólicos e estimulante das metilxantinas, as saponinas presentes na erva mate também apresentam efeitos benéficos, pois interferem no metabolismo do colesterol e retardam a absorção de gorduras, via inibição da lipase pancreática (HOSTTETMANN & MARSTON 1995; HAN *et al.*, 2002, 2005, BASTOS *et al.*, 2007a).

A atenção para a erva mate e o seu potencial uso para a promoção de saúde, se avaliado através de publicações de resultados de pesquisa na forma de artigo em revistas indexadas, é relativamente recente. Em meados

da década de 90 foram publicados os primeiros trabalhos que demonstraram a atividade antioxidante *in vitro* de infusões de erva mate verde (chimarrão) (GUGLIUCCI & STAHL, 1995; GUGLIUCCI, 1996; CAMPOS *et al.*, 1996). Na seqüência, outros resultados publicados a partir de ensaios com infusões da erva mate demonstram alguns dos efeitos farmacológicos popularmente conhecidos: efeito vasodilatador *in vitro* e *in vivo* em ratos (BAISCH *et al.*, 1998; STEIN *et al.*, 2005); ação colerética e de propulsão intestinal em ratos (GORZALCZANY *et al.*, 2001); atividade quimiopreventiva *in vitro* (prevenção de danos celulares que possam levar a doenças crônicas) (BRACESCO *et al.*, 2003; RAMIREZ-MARES *et al.*, 2004); prevenção de danos oxidativos ao DNA em camundongos (MIRANDA *et al.*, 2008); inibição *in vitro* da glicação - reação na qual açúcares reagem com proteínas e lipídes plasmáticos que se acumulam formando locais propícios à formação de radicais livres (LUNCEFORD & GUGLIUCCI, 2005); diminuição da progressão da aterosclerose em coelhos (MOSIMANN *et al.*, 2006); redução do peso, gordura abdominal, LDL e VLDL em ratos obesos (PANG *et al.*, 2008); prevenção de doenças orais em ratos (FILIP *et al.*, 2007); atividade anti-inflamatória (LANZETTI *et al.*, 2008) e até mesmo melhora nos sintomas de mal de Parkinson em modelo animal (MILIOLI *et al.*, 2007) e inibição do crescimento de células cancerígenas *in vitro* (MEJIA *et al.*, 2005). Além disso, foram realizados vários trabalhos *in vitro* sobre a atividade antioxidante da erva mate relacionados ou não com a inibição do processo de oxidação da LDL, o que poderia contribuir para prevenção da aterosclerose e diversas outras doenças relacionadas à espécies reativas do

oxigênio (SCHINELLA *et al.*, 2000; GUGLIUCCI & MENINI , 2002; CHANDRA & MEJIA, 2004; BASTOS *et al.*, 2006b; MENINI *et al.*, 2007).

Um único trabalho, realizado por PANG *et al.* (2008), avaliou o efeito do consumo de erva mate suplementada na ração sobre a glicemia e insulinemia em animais obesos, encontrando redução significativa em ambos os parâmetros. Até o momento, não foram realizados trabalhos que relacionassem o uso da erva mate na forma de infusão, como é normalmente consumida, sobre parâmetros do diabetes ou sobre possíveis mecanismos de ação desta erva no metabolismo e absorção de glicose.

#### 1.5 - JUSTIFICATIVA:

O diabetes mellitus é uma doença cuja prevalência têm tendência ascendente tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento. Os dados encontrados na literatura sugerem que alimentos e bebidas ricos em ácidos clorogênicos possam exercer um papel benéfico sobre a regulação da glicemia. Sendo a erva mate *Ilex paraguariensis* (IP) um produto de fácil acesso à população e com altos teores de ácidos clorogênicos, um estudo sobre as possíveis influências de sua ingestão sobre parâmetros relacionados ao diabetes mellitus permitiria conhecer melhor o potencial funcional deste produto, com potencial de utilização da população para, se incorporado em dietas, auxiliar na prevenção de doenças degenerativas e na promoção de saúde.

## **2 - OBJETIVOS**

### **2.1 - GERAL**

Avaliar a influência da ingestão de erva mate sobre parâmetros sanguíneos relacionados ao diabetes e sobre atividade da glicose-6-fosfatase hepática e expressão do cotransportador de glicose SGLT1 intestinal em ratos Wistar.

### **2.2 - ESPECÍFICOS**

- Avaliar a influência da ingestão de erva mate sobre a glicemia, insulinemia e colesterol total em ratos Wistar machos, não diabéticos e com diabetes induzido por aloxana.
- Avaliar a influência do tratamento com erva mate sobre dois possíveis mecanismos de ação: a) sobre a produção hepática de glicose, analisando a atividade da enzima glicose-6-fosfatase. b) sobre a absorção de glicose, avaliando a expressão do cotransportador SGLT1 em células epiteliais intestinais.



### 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1– BEBIDA A BASE DE *ILEX PARAGUARIENSIS*

Utilizou-se extrato de erva mate verde na forma solúvel, cedido pela Leão Júnior S.A. Para a administração, o extrato foi diluído em solução fisiológica para a concentração de 100 mg/mL.

##### 3.1.1 – Teor de fenólicos totais, cafeína e ácido clorogênico do extrato

O teor de fenólicos totais foi determinado conforme descrito por GENOVESE *et al* (2003), que consiste em uma reação colorimétrica que utiliza como reagente o Folin-Ciocalteu e solução saturada de carbonato de sódio. O Folin-Ciocalteu reage quantitativamente com os compostos fenólicos da amostra e é medida espectrofotometricamente no comprimento de onda de 750 nm.

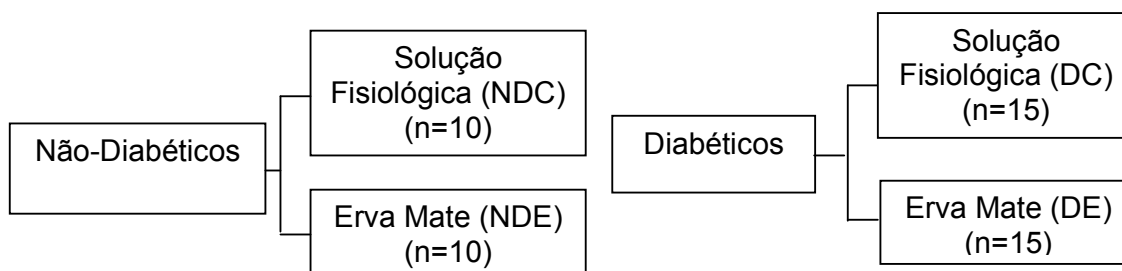
Os teores de cafeína e 5-CQA foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em aparelho da marca TSP com injetor automático, coluna C-18 (5 $\mu$  x 4,6 x 25mm, Varian, EUA) e fase móvel constituída por 74% de água, 25% metanol e 1% ácido acético. A eluição foi isocrática. A quantificação do 5-CQA foi realizada a 323 nm e da cafeína a 272 nm, por padronização externa, utilizando-se curva de calibração de 5 pontos. A identificação foi realizada pela comparação do tempo de retenção da substância de interesse na amostra com o tempo de retenção do padrão.

Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### 3.2 – DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Utilizaram-se ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) machos com 8 semanas de idade, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Os animais (n=50) adquiridos com 4 semanas de idade foram transferidos para o Biotério do Instituto de Medicina Tropical da USP (IMT/FM/USP), onde permaneceram durante o período de crescimento e adaptação e durante o período experimental.

Os animais permaneceram em gaiolas de polipropileno em grupos de 4 ou 5. Receberam ração comercial Nuvilab CR1 (Nuvital, Brasil) e água *ad libitum*, mantidos em um período claro/escuro de 12 horas, à temperatura média de 22°C. Ao completarem 8 semanas de vida o diabetes foi induzido e os grupos divididos da seguinte forma:



A indução do diabetes foi feita por meio da droga aloxana (A7413-10G, Sigma-Aldrich, EUA) em dose única de 38 mg/kg de peso do animal, em uma solução 30 mg/mL de solução salina por meio intravenoso (veia dorsal peniana), após jejum de 12 horas e anestesia por inalação de éter etílico. Os animais do grupo não-diabéticos (ND) receberam a injeção com o veículo apenas. Após 2 horas, os animais receberam solução de água com

sacarose na concentração de 50 g/L por 24 hs, a fim de evitar o dano excessivo às células pancreáticas e a morte por hipoglicemia.

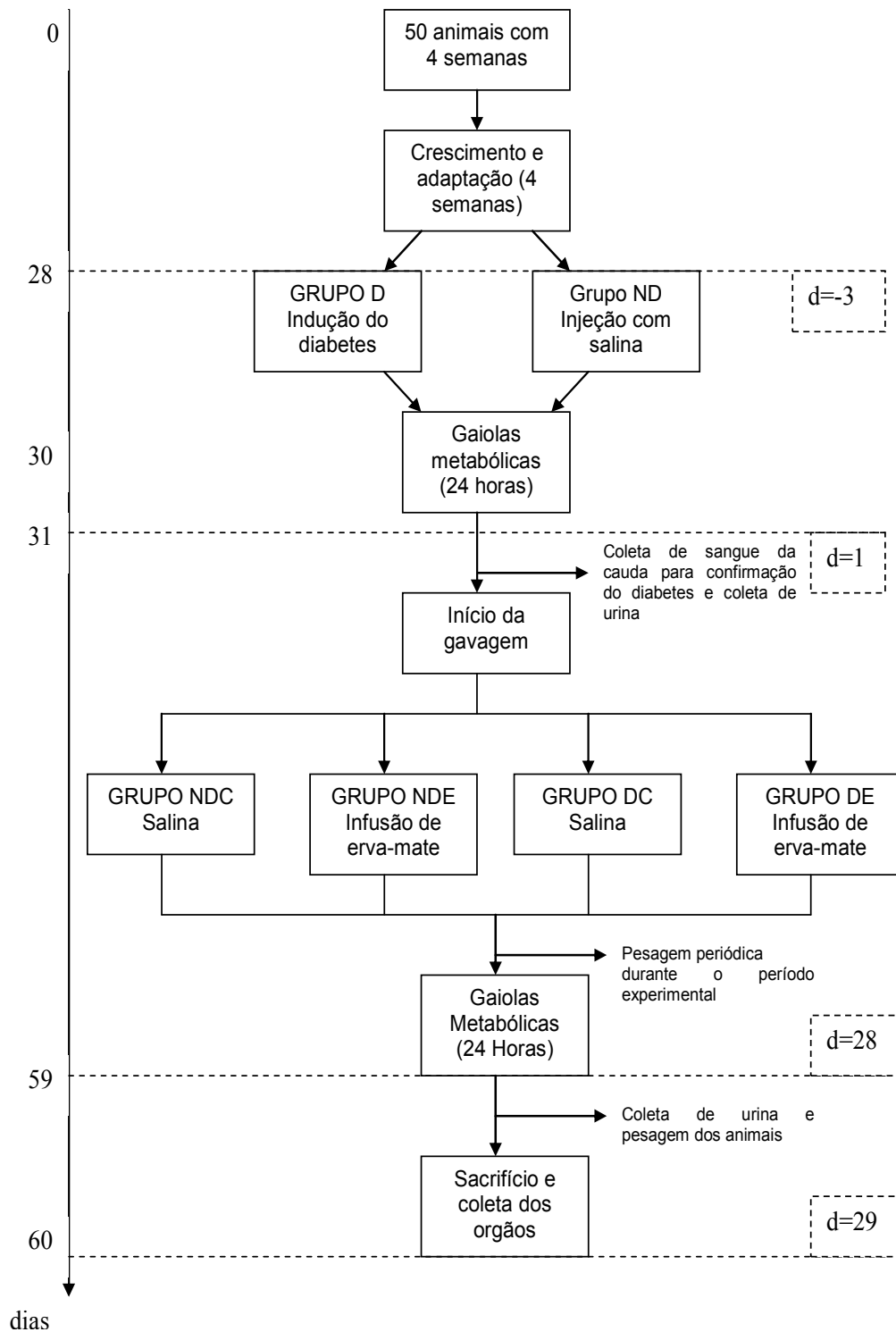
Dois dias após a indução, os animais foram alojados em gaiolas metabólicas por 24 horas para avaliação da diurese e teste de glicosúria e cetonúria por meio de fitas reagentes (Roche Diagnóstica, Alemanha). Após esse período foi recolhido sangue da cauda para análise de glicemia. Aqueles do grupo diabéticos (D) que apresentaram glicemia < 200 mg/dL não foram utilizados no experimento.

Foram coletadas gotas de sangue da cauda do animal semanalmente para análise da glicemia em glicosímetro portátil para fins de controle. Os animais que apresentaram glicemia abaixo de 125 mg/dL na primeira semana experimental foram excluídos do estudo.

A administração da erva mate ou solução fisiológica foi realizada a partir do d=1, durante 28 dias, com auxílio de uma cânula orogástrica que garantiu a ingestão. Para os grupos experimentais (NDE e DE), o extrato foi diluído na concentração de 100 mg/mL de solução fisiológica, que foi administrada em volume que corresponde ao peso do animal (dose de 1 g de extrato/kg de peso). Os grupos controle (NDC e DC) receberam solução fisiológica na mesma proporção utilizada para os grupos que ingeriram erva mate.

Ao término do período experimental (d=28), os animais foram alojados novamente por 24 hs em gaiolas metabólicas individuais para coleta de urina e então pesados, anestesiados com tiopental sódico para a cirurgia de

retirada de sangue, fígado e intestino delgado e sacrificados por exanguinação. O delineamento experimental está na Figura 4.



**Figura 4 - Delineamento Experimental**

### 3.3 – ANÁLISES LABORATORIAIS

#### 3.3.1 – Avaliação da glicemia, colesterol e insulina no sangue

Coletou-se sangue da cauda dos animais para análise de glicemia com uso de glicosímetro portátil para a confirmação do diabetes (t=1), semanalmente durante o experimento e no dia do sacrifício (t=29) para controle.

No dia do sacrifício coletou-se sangue da veia cava inferior dos animais previamente anestesiados, que foram centrifugadas imediatamente para a separação do soro. As amostras foram então acondicionadas em tubos Eppendorf, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a  $-70^{\circ}$  até serem analisadas.

A glicemia do t=29 foi quantificada através de kit da marca Labtest cat. 87 pelo método enzimático colorimétrico de glicose-oxidase.

O colesterol total foi determinado através de kit da marca Labtest baseado no método enzimático colorimétrico (CHOD/PAP).

A concentração de insulina foi quantificada em laboratório terceirizado (Gênese Laboratórios Ltda, São Paulo, Brasil) pelo método de radioimunoensaio e com kit específico para ratos (Linco Research, EUA).

#### 3.3.2 - Avaliação da atividade da glicose-6-fostatase no tecido hepático

Após retirado, o fígado foi lavado com solução salina pH 7.0, acondicionado em papel alumínio identificado, congelado em nitrogênio líquido e em seguida acondicionado em freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Uma alíquota (2g) do tecido hepático foi descongelada sob refrigeração e homogeneizada em 10 mL de solução de sacarose (0,25M) gelada. O homogenato foi centrifugado a 11000 x *g* por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante centrifugado a 105000 x *g* por 60 min a 4°C. O precipitado resultante (pellet microsomal) foi ressuspenso em 1 mL de solução de sacarose/EDTA (0,25 M/ 1mM), homogeneizado e congelado a -70°C. A quantidade de proteína das amostras foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), com albumina sérica bovina como padrão.

A atividade do complexo enzimático glicose-6-fosfatase foi determinada conforme método descrito por BAGINSKI *et al* (1974). Os microsomas foram incubados por 5 min a 37°C em meio contendo tampão cacodilato (0,1M), sacarose (0,25M) e glicose-6-fosfato (0,1M). A reação foi interrompida pela adição de solução de ácido tricloroacético/ ascórbico (2%/10% p/v). Ao sobrenadante foi adicionado o reagente colorimétrico molibdato de amônio (10% p/v) e o meio foi tamponado com arseito/citrato de sódio (2% p/v cada). A quantidade de fosfato inorgânico liberado foi então analisada por leitura espectrofotométrica a 700 nm. Quando necessário, as amostras foram diluídas com solução de sacarose/EDTA (0,25 M/ 1mM) na proporção 1:15. A atividade foi expressa em nmol de Pi/min de incubação/mg de Ptn.

### 3.3.3 - Determinação da expressão gênica dos transportadores de glicose SGLT1 no intestino

O intestino foi retirado e lavado com solução salina pH 7.0. Um segmento de alça intestinal de 15 cm a partir da junção estômago-intestino (piloro) foi ressecado e cerca de 2 cm da porção inicial (duodeno) e final (jejuno) foram seccionados, identificados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a  $-70^{\circ}$  C. Foram utilizados os tecidos de 5 animais de cada grupo, sorteados aleatoriamente.

#### 3.3.3.1 - *PCR real time*

##### a) Extração de RNA total

A extração do RNA total foi feita com kit RNeasy® (Uniscience). Fragmentos de cerca de 0,1 g de tecido previamente congelados foram homogeneizados com solução de TRIZOL®. Foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio a cada amostra e realizada uma centrifugação a  $10.000 \times g$  ( $4^{\circ}$  C) para recuperação da fase aquosa superior, à qual foram adicionados 0,5 mL de isopropanol. O conteúdo foi então pipetado em colunas do kit de extração de RNA e centrifugado a  $10.000 \times g$  ( $4^{\circ}$  C) por 1 min. Foram adicionados 10  $\mu$ L da solução de DNase bem no centro da coluna, que permaneceu em temperatura ambiente por 15 min. Após a adição de 0,5 mL de tampão RPE diluído com etanol, as colunas sofreram nova centrifugação  $10.000 \times g$  ( $4^{\circ}$  C) por 1 min e a operação foi repetida com adição de mais 0,5 mL de tampão RPE e centrifugação a  $10.000 \times g$  por 2 min, para eliminar qualquer resíduo de etanol. Para retirar o conteúdo das colunas, 80  $\mu$ L de



água *RNase free* foram adicionados às mesmas, um novo tubo coletor foi acoplado e novamente foi feita centrifugação centrifugadas a 10.000 x *g* por 1 min. As amostras sofreram choque térmico de 60° C por 2 minutos em banho seco e em seguida foram tratadas com *RNase out* e incubadas em estufa a 37°C por 5 min.

A concentração de RNA total foi determinada por leitura em espectrofotômetro em 260 nm. Essa leitura permite o cálculo da concentração de ácido nucléico da amostra. Uma unidade de densidade óptica (DO) corresponde a aproximadamente 40 µg/mL de fita simples e a relação  $DO\ 260/DO\ 280 > 1,65$  foi utilizada para estimar a pureza do ácido nucléico da amostra.

#### b) Quantificação da Expressão Gênica

A expressão gênica dos transportadores de glicose SGLT1 foi analisada pelo método de PCR em tempo real. A partir do RNA extraído das amostras, a síntese do cDNA foi feita utilizando-se o kit *High Capacity cDNA Archive* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As leituras foram feitas com o equipamento 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), e o  $C_t$  (*threshold cycle* - momento da reação em que a fluorescência da amostra começa a ser detectada) determinado com o auxílio do *RQ Study Software* (Applied Biosystems). O  $C_t$  de uma reação é determinado, principalmente, pela quantidade de cDNA molde presente no começo da reação de amplificação.

Para um volume final de 50  $\mu\text{L}$ , utilizou-se 25  $\mu\text{L}$  de *Platinum<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen), 10  $\mu\text{M}$  do *primer de SGLT1*, 10  $\mu\text{M}$  do *primer de  $\beta$ -actina* e 10  $\mu\text{l}$  de cDNA total (100 ng). Para amplificação foi usado o ciclo descrito a seguir: 2 min a 50°C de pré-tratamento de UDG (Uracil-DNA Glicosilase) e desnaturação de 2 min a 95°C, seguido de 45 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s, e uma extensão a 72°C por 30 s, seguida de uma análise de curva de *melting* (40 ciclos com um decréscimo de 1°C a cada 15 s iniciando-se em 95°C). Através desta análise foi possível averiguar a especificidade da reação de amplificação, uma vez que o fluoróforo usado emite luz sempre que um dímero de DNA é formado.

Todas as reações foram feitas em triplicata e a média do  $C_t$  usada para avaliação da expressão gênica. O gene SGLT1 foi analisado e sua expressão normalizada de acordo com a expressão do gene constitutivo  $\beta$ -actina. A expressão relativa foi expressa em Unidades Arbitrárias (U.A) e calculada de acordo com a fórmula  $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ , sendo que  $\Delta C_t$  corresponde ao valor do  $C_t$  do gene de constitutivo ( $\beta$ -actina) subtraído do valor do  $C_t$  do gene estudado.

### 3.4 - ANÁLISE DOS DADOS

A análise de todas as informações coletadas nesta pesquisa foi inicialmente feita de forma descritiva.

Para as variáveis de natureza quantitativa foram calculadas algumas medidas-resumo, como média, desvio-padrão, entre outras, e

confeccionados gráficos do tipo boxplot e de linhas (BUSSAB e MORETTIN, 2006). Algumas informações sobre a construção e interpretação do boxplot podem ser obtidas no Anexo 1.

As variáveis de natureza qualitativa foram analisadas através do cálculo de frequências absolutas .

As análises inferenciais empregadas com o intuito de confirmar ou refutar evidências encontradas na análise descritiva foram:

- Análise de variância (ANOVA) com dois fatores fixos (NETER et al, 1996), sendo os fatores a presença de diabetes e o tipo de tratamento (erva mate ou salina). As informações de glicemia, insulina e atividade da glicose-6-fosfatase, por não satisfazerem a suposição de homocedasticidade (igualdade de variâncias), foram transformadas em logaritmo neperiano (ln) antes da realização da ANOVA.
- Análise de variância com dois fatores para medidas repetidas, com o objetivo de avaliar a evolução do peso corporal e volume urinário, ao longo dos diversos momentos de tempo considerados.

Em todas as conclusões obtidas através das análises inferenciais foi utilizado o nível de significância  $\alpha$  igual a 5%.

Os dados foram digitados em planilhas do Excel 2003 for Windows para o adequado armazenamento das informações. As análises estatísticas foram realizadas com o software Statistical Package for Social Sciences (SPSS) versão 13.0.

### 3.5. - ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Animais do Instituto de Medicina Tropical/Faculdade de Medicina/Universidade de São Paulo, sendo aprovado em reunião realizada no dia 1º de dezembro de 2006 (Anexo 2).

## 4 - RESULTADOS

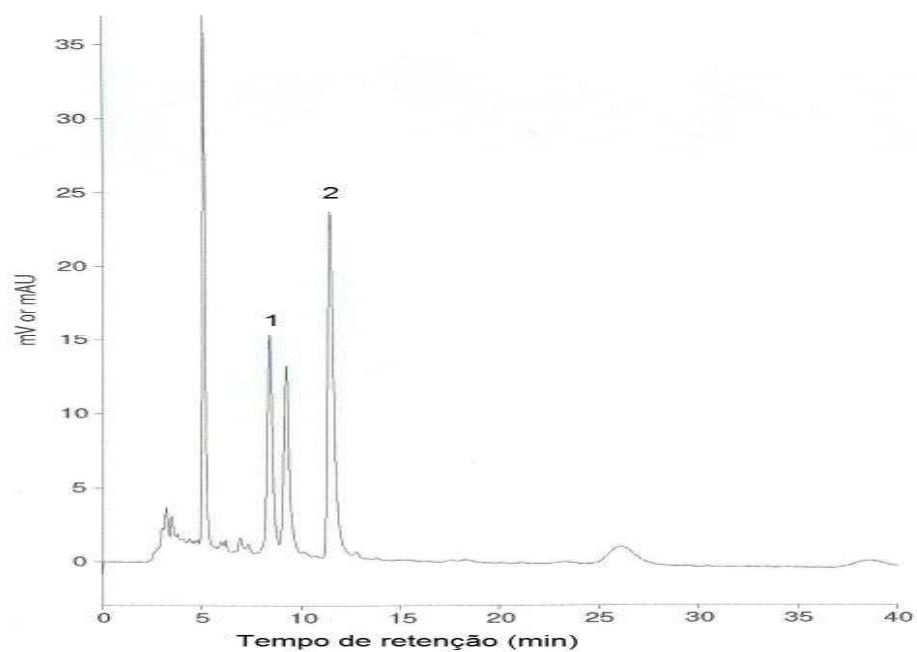
### 4.1 – COMPOSIÇÃO DO EXTRATO DE ERVA MATE:

Foram determinados os teores de fenólicos totais, cafeína e 5-CQA do extrato solúvel administrado aos animais (Tabela 1) e o perfil cromatográfico da amostra (Figura 5)

**Tabela 1** - Composição do extrato solúvel de erva mate

<b>Composto</b>	<b>Quantidade (mg/g de extrato)</b>
Fenólicos totais	420,0
Cafeína	17,5
5-CQA	60,5

Como o extrato foi administrado na dose de 1g/kg de peso do animal, a quantidade dos compostos encontrados em 1g de extrato corresponde à dose por kg de peso ingerida diariamente pelos animais.



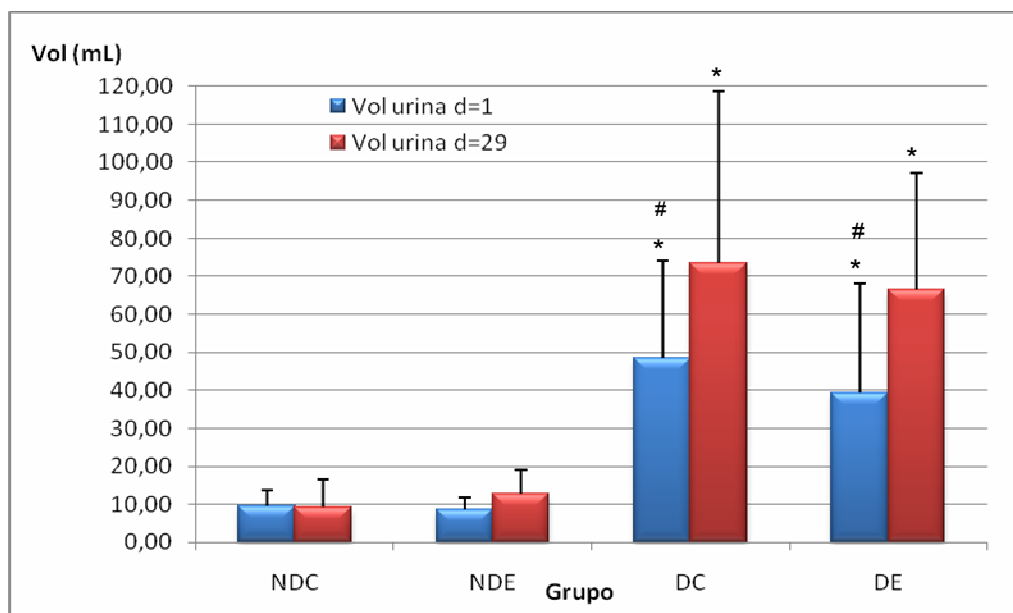
1= 5-CQA; 2= Cafeína

**Figura 5** - Perfil cromatográfico do extrato solúvel de erva mate

## 4.2 - INDUÇÃO DO DIABETES E VARIÁVEIS DE CONTROLE DO EXPERIMENTO

Dos 30 animais que receberam a injeção com aloxana, 29 (96,6%) atenderam aos critérios de seleção, conforme avaliação dois dias após a indução do diabetes. Durante a primeira semana experimental, 5 animais (16,6%) sendo 3 do grupo DE (diabético erva) e 2 do grupo DC (diabético controle) apresentaram glicemia inferior a 125 mg/dL e foram excluídos do estudo e 3 (1%) morreram em decorrência de pneumonia. A perda total foi de 9 animais (18%). Este valor é bastante inferior ao encontrado em outros estudos (CARVALHO *et al.*, 2003; SPADELLA *et al.*, 2005; SILVA 2006), que citam uma perda de aproximadamente 60% na indução do diabetes com aloxana. Não houve perdas nos grupos não diabéticos e o número total ao final do experimento foi de 41 ratos, assim divididos: 10 no grupo NDC, 10 no NDE, 11 no DC e 10 no DE.

Os ratos dos grupos diabéticos apresentaram diurese significativamente superior aos dos grupos não diabéticos nos dois momentos de avaliação ( $p < 0,001$ ) e para os grupos diabéticos houve aumento significativo da diurese ao final do experimento ( $p = 0,001$ ) em comparação ao início, o que não aconteceu nos ratos não diabéticos ( $p = 0,79$ ). A diferença entre os tratamentos (erva mate ou salina) não foi significativa ( $p = 0,99$ ) (Figura 6).



Dados expressos como média (barra) e desvio padrão (linha): \* $p < 0,001$  diabéticos (DC e DE) versus não-diabéticos (NDC E NDE). # $p = 0,001$  início (d=1) versus final do experimento (d=29). NDC= não-diabético controle (n=10); NDE= não-diabético erva mate (n=10); DC= diabético controle (n=11); DE= diabético erva mate (n=10).

**Figura 6** - Diurese de 24 horas (mL) dos animais, segundo grupo e data de coleta

Nos grupos DC e DE, todos os animais apresentaram glicosúria superior a 278 mmol/L de urina no primeiro momento de avaliação (d=1). No segundo momento (d=29) um animal do grupo DC e um do grupo DE apresentaram valores inferiores (56 mmol/l de urina), mas foram mantidos nos grupos por apresentaram glicemia superior a 200 mg/dL.

Todos os animais diabéticos (n=21) apresentaram algum grau de cetonúria no primeiro momento de avaliação (d=1) (Tabela 2). Ao final do experimento, apenas 3 animais apresentaram algum grau de cetonúria (Tabela 3).

**Tabela 2** - Presença e grau de cetonúria no primeiro dia de intervenção (d=1), de acordo com o grupo

<b>Cetonúria</b>	<b>Grupo</b>				<b>Total</b>
	NDC	NDE	DC	DE	
Ausente	10	10	1	1	<b>22</b>
+	0	0	3	1	<b>4</b>
++	0	0	3	3	<b>6</b>
+++	0	0	4	5	<b>9</b>
<b>Total</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>10</b>	<b>41</b>

NDC= não-diabético controle; NDE= não-diabético erva mate; DC= diabético controle; DE= diabético erva mate.

+= 5-40 mg/dL, ácido acetilacético ligeiramente aumentado na urina;

++= 40-100 mg/dL, ácido acetilacético aumentado na urina;

+++= mais de 100 mg/dL, ácido acetilacético muito aumentado na urina.

**Tabela 3** - Presença e grau de cetonúria no último dia de intervenção (d=29), de acordo com o grupo

<b>Cetonúria</b>	<b>Grupo</b>				<b>Total</b>
	NDC	NDE	DC	DE	
Ausente	10	10	9	9	<b>38</b>
+	0	0	2	0	<b>2</b>
++	0	0	0	1	<b>1</b>
+++	0	0	0	0	<b>0</b>
<b>Total</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>10</b>	<b>41</b>

NDC= não-diabético controle; NDE= não-diabético erva mate; DC= diabético controle; DE= diabético erva mate.

+= 5-40 mg/dL, ácido acetilacético ligeiramente aumentado na urina;

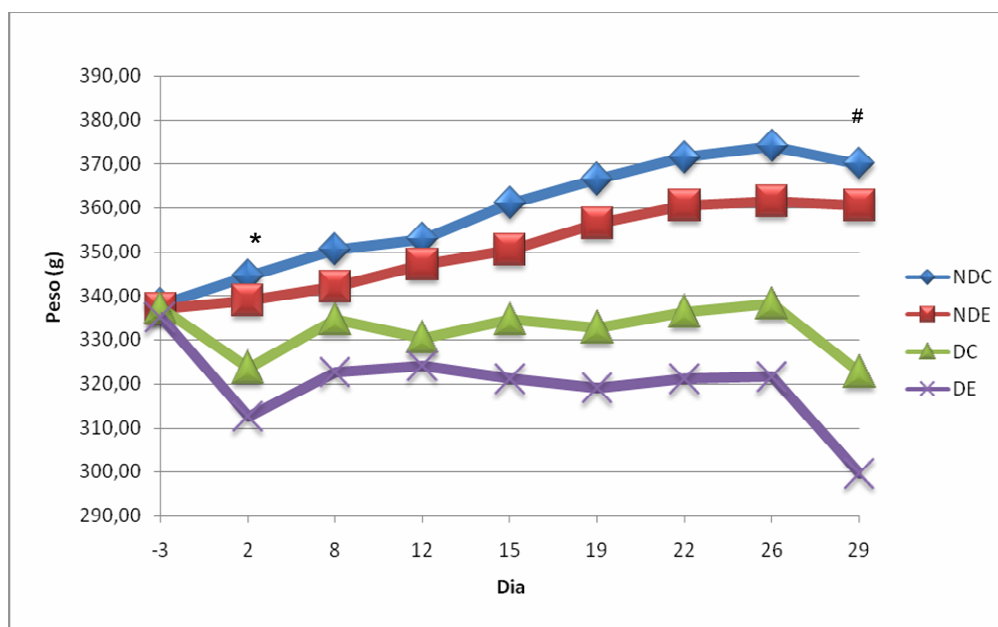
++= 40-100 mg/dL, ácido acetilacético aumentado na urina;

+++= mais de 100 mg/dL, ácido acetilacético muito aumentado na urina.

O peso dos animais foi aferido no d=-3 para o cálculo da dose de aloxana e periodicamente durante o período experimental para ajuste da quantidade da infusão de erva mate/salina administrada por gavagem. Antes da indução do diabetes o peso era semelhante em todos os grupos ( $p=0,88$ ). A ingestão de erva mate não exerceu influência sobre o peso em nenhum dos momentos ( $p=0,29$ ). A partir do 2º dia após o início da gavagem (4 dias



após a indução), a média de peso dos animais diabéticos era significativamente menor que a dos animais não-diabéticos ( $p=0,02$ ). Os animais diabéticos continuaram perdendo peso ao longo do experimento, acentuando assim a diferença (Figura 7).

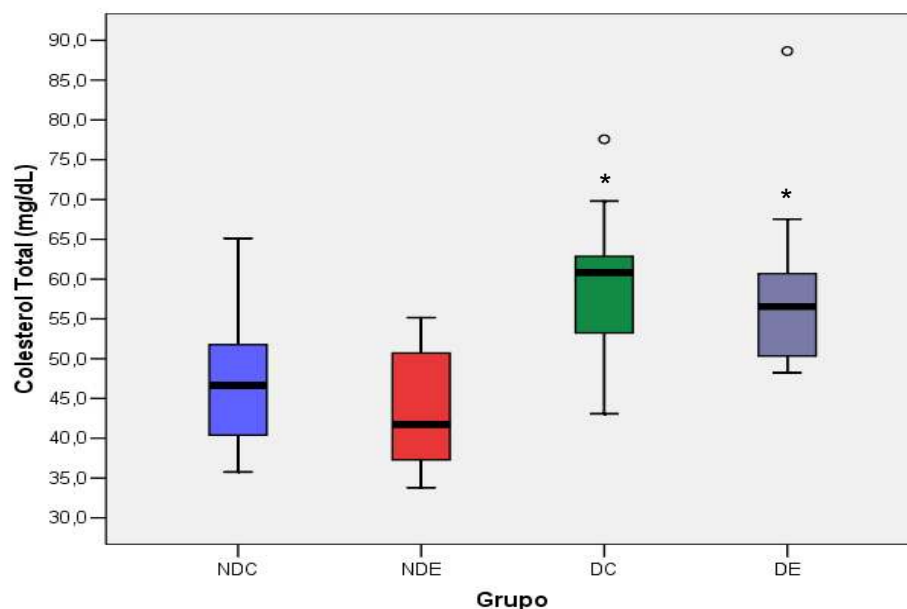


\* $p=0,02$  e #  $p<0,001$  não diabéticos (NDC e NDE) versus diabéticos (DC e DE); NDC= não-diabético controle ( $n=10$ ); NDE= não-diabético erva mate ( $n=10$ ); DC= diabético controle ( $n=11$ ); DE= diabético erva mate ( $n=10$ ).

**Figura 7** - Evolução da média de peso dos animais por grupo

#### 4.3 - PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E METABÓLICOS RELACIONADOS AO DIABETES

Não foram observadas modificações nos níveis de colesterol total em função da ingestão da erva mate ( $p=0,66$ ) e a diferença entre diabéticos e não diabéticos foi significativa ( $p<0,001$ ). (Figura 8)



○= outlier. \*  $p < 0,01$  diabéticos (DC e DE) versus não-diabéticos (NDC e NDE). NDC= não-diabético controle (n=7); NDE= não-diabético erva mate (n=8); DC= diabético controle (n=11); DE= diabético erva mate (n=10).

**Figura 8** - Colesterol total dos animais ao final do experimento (d=29), de acordo com o grupo

A glicemia (Tabela 4) e a concentração de insulina (Tabela 5) foram significativamente diferentes entre animais diabéticos e não diabéticos ( $p < 0,001$ ), porém foram semelhantes entre os grupos que ingeriram erva mate e os controles ( $p = 0,80$  para glicemia e  $p = 0,82$  para insulina). Ambas apresentaram grande variação dentro dos grupos e por isso optou-se por expressar os valores mínimos e máximos de cada grupo, além da média e desvio-padrão.

**Tabela 4** - Glicemia dos animais ao final do experimento (d=29), de acordo com o grupo

<b>Grupos</b>	<b>Glicemia (mg/dL)</b>			
	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo
NDC (n=7)	137,43 <sup>a</sup>	15,00	121,50	159,26
NDE (n=9)	127,80 <sup>a</sup>	22,80	99,00	170,61
DC (n=11)	486,66 <sup>b</sup>	173,20	215,20	694,39
DE (n=10)	521,49 <sup>b</sup>	118,35	222,13	633,70

Letras iguais indicam In das médias iguais entre grupos;  $p < 0,001$  diabéticos (DC e DE) versus não diabéticos (NDC e NDE). NDC= não-diabético controle; NDE= não-diabético erva mate; DC= diabético controle; DE= diabético erva mate.

**Tabela 5** - Concentração de insulina dos animais ao final do experimento (d=29), de acordo com o grupo

<b>Grupos</b>	<b>Insulina (ng/mL)</b>			
	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo
NDC (n=10)	0,92 <sup>a</sup>	0,76	0,24	2,43
NDE (n=10)	0,86 <sup>a</sup>	0,43	0,24	1,71
DC (n=11)	0,23 <sup>b</sup>	0,17	0,05	0,58
DE (n=10)	0,29 <sup>b</sup>	0,29	0,19	1,06

Letras iguais indicam que In das médias não diferem significativamente;  $p < 0,001$  grupos diabéticos (DC e DE) versus não-diabéticos (NDC e NDE). NDC= não-diabético controle; NDE= não-diabético erva mate; DC= diabético controle; DE= diabético erva mate.

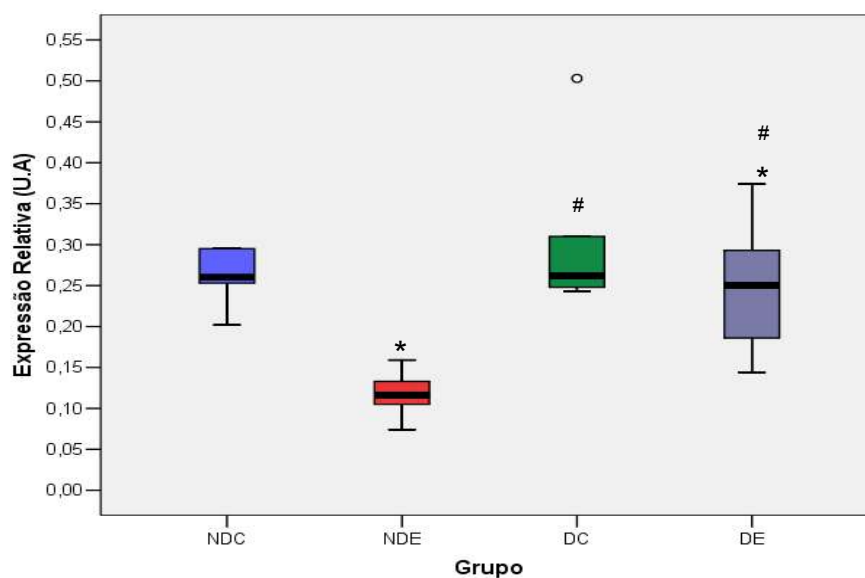
Assim como nas análises anteriores, não foi observada nenhuma diferença na atividade da glicose-6-fosfatase hepática entre os animais que ingeriram erva mate e os animais controle ( $p=0,85$ ), porém a diferença entre diabéticos e não diabéticos foi significativa ( $p < 0,001$ ). Os valores também sofreram grande variação dentro dos grupos, por isso foram apresentados em tabela e com os valores mínimo e máximo encontrados em cada grupo (Tabela 6).

**Tabela 6** - Atividade do complexo enzimático glicose-6-fosfatase no tecido hepático, de acordo com o grupo

<b>Grupos</b>	<b>Atividade da G-6-fosfatase (nmol de Pi/min/mg de Ptn)</b>			
	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo
NDC (n=10)	254,91 <sup>a</sup>	83,92	37,23	322,57
NDE (n=10)	262,05 <sup>a</sup>	64,17	202,76	410,69
DC (n=11)	545,74 <sup>b</sup>	206,58	272,77	829,03
DE (n=10)	518,87 <sup>b</sup>	208,96	211,05	901,45

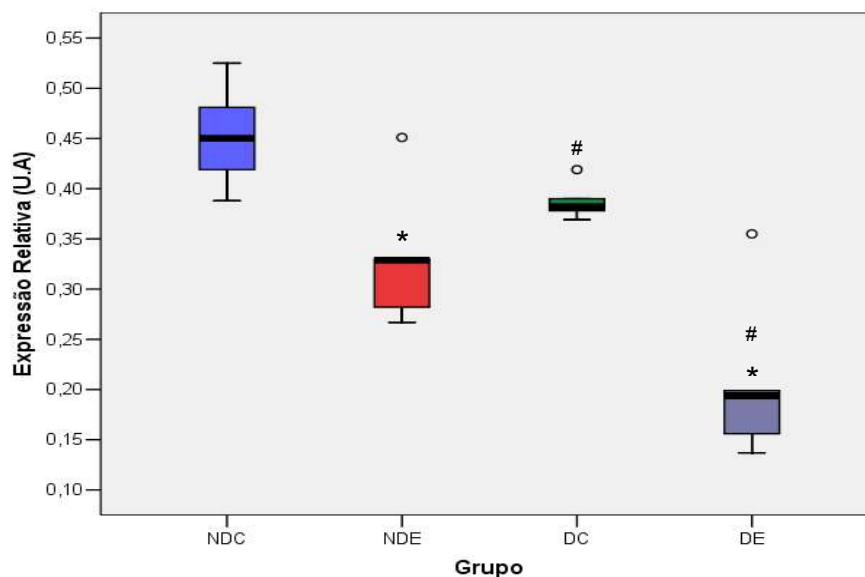
Letras iguais indicam que ln das médias não diferem significativamente;  $p < 0,001$  comparando-se ln das médias dos grupos diabéticos (DC e DE) com os não-diabéticos (NDC e NDE). NDC= não-diabético controle; NDE= não-diabético erva mate; DC= diabético controle; DE= diabético erva mate.

Avaliamos a expressão gênica do SGLT1 no duodeno (Figura 9) e jejuno (Figura 10) dos animais através de PCR em tempo real e encontramos expressão significativamente menor nos animais que ingeriram erva mate em relação aos animais controle. No grupo NDE, a expressão relativa (U.A) foi 53,8% menor no duodeno e 26,6% menor no jejuno, com relação ao grupo NDC. No grupo DE, a expressão 19,3% menor no duodeno e 46,2% menor no jejuno, relativamente ao grupo DC. A expressão gênica nos animais diabéticos foi significativamente maior que nos não-diabéticos para o duodeno, ocorrendo o contrário na análise do jejuno.



n=5 animais por grupo. ○= outlier. \*p=0,007 grupos erva mate (NDE e DE) versus grupos controle (NDC e DC). #p=0,01 grupos diabéticos (DC e DE) versus não-diabéticos (NDC e NDE). NDC= não-diabético controle; NDE= não-diabético erva mate; DC= diabético controle; DE= diabético erva mate.

**Figura 9** - Expressão relativa dos transportadores SGLT1 intestinais (duodeno) de acordo com o grupo.



n=5 animais por grupo. ○= outlier. \*p<0,001 grupos erva mate (NDE e DE) versus grupos controle (NDC e DC). #p=0,004 grupos diabéticos (DC e DE) versus não-diabéticos (NDC e NDE). NDC= não-diabético controle; NDE= não-diabético erva mate; DC= diabético controle; DE= diabético erva mate.

**Figura 10** - Expressão relativa dos transportadores SGLT1 intestinais (jejuno) de acordo com o grupo.

## 5 – DISCUSSÃO

### 5.1 – COMPOSIÇÃO DO EXTRATO DE ERVA MATE:

O extrato utilizado em nosso estudo corresponde ao total de sólidos solúveis do chimarrão. Uma cuia de chimarrão (500mL) contém aproximadamente 3,75g de sólidos solúveis, 225mg de 5-CQA e 135mg de cafeína (BASTOS *et al.*, 2005), o que corresponde a 60mg de 5-CQA e 36mg de cafeína em 1 g de sólidos solúveis. A quantidade de 5-CQA encontrada em nossa amostra foi semelhante (60,5 mg/g de extrato), porém o teor de cafeína em nossa amostra foi inferior (17,5 mg/g) (Tabela 1). Sabe-se que o teor de substâncias bioativas da erva mate difere de acordo com as condições de processamento e outros parâmetros como o gênero da planta, variabilidade genética e tipo de solo em que é cultivada (BASTOS *et al.*, 2007a).

Segundo CASTELLSAGUÉ *et al.* (2000) pessoas com o hábito de consumir chimarrão ingerem até 1,5 L da bebida por dia, o que corresponderia ao consumo de 197mg de cafeína e 681mg de 5-CQA/dia tomando como exemplo o extrato utilizado em nosso estudo.

### 5.2 - INDUÇÃO DO DIABETES E VARIÁVEIS DE CONTROLE DO EXPERIMENTO

O diabetes fo induzido com sucesso, com um percental de perda de animais de 18%, inferior ao encontrado em outros trabalhos que utilizaram o mesmo modelo animal. O efeito diabetogênico da aloxana é proveniente do

dano causado às células beta das ilhotas pancreáticas, responsáveis pela secreção de insulina. Após a administração, os níveis glicêmicos são característicos, incluindo uma breve hiperglicemia, seguida de hipoglicemia transitória e finalmente, a hiperglicemia crônica (CARVALHO *et al.*, 2003). A indução é irreversível e pode se manter por vários meses.

A presença de corpos cetônicos na urina é comum no diabetes, principalmente no tipo 1, e revela uma redução da utilização da glicose (com conseqüente aumento na utilização de lipídios como fonte energética), que pode ser decorrente de hipoglicemia e carência de insulina (GUYTON & HALL, 1998). Atribuiu-se a cetonúria apresentada pelos animais diabéticos no d=1 (Tabela 2) à hipoglicemia transitória característica da indução do diabetes por aloxana.

Os sinais clínicos e laboratoriais de poliúria (Figura 6), perda progressiva de peso (Figura 7), glicosúria e cetonúria (Tabelas 2) encontrados durante o presente estudo são característicos do diabetes mellitus e condizentes com os sintomas encontrados em outros experimentos que utilizaram o modelo de diabetes induzido por aloxana em ratos Wistar (CARVALHO *et al.*, 2003; SPADELLA *et al.*, 2005; FREITAS 2005; SILVA 2007).

### 5.3 - PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E METABÓLICOS RELACIONADOS AO DIABETES

A ingestão de erva mate não influenciou na taxa de colesterol total (Figura 8). A mesma foi maior nos animais diabéticos que nos não-diabéticos, o que era esperado, pois em decorrência do diabetes ocorre maior conversão de ácidos graxos em colesterol, que é liberado na corrente sanguínea nas lipoproteínas, aumentando assim o nível de colesterol sanguíneo e o risco de desenvolvimento de doenças cardíacas e vasculares (GUYTON & HALL, 1998).

Como esperado, a glicemia dos animais diabéticos foi significativamente superior aos animais não-diabéticos (Tabela 4) e a insulinemia foi inferior (Tabela 5). A principal característica do diabetes é a hiperglicemia decorrente da falha na produção ou no efeito da insulina. No caso do diabetes induzido por aloxana, era esperado que os níveis de insulina estivessem baixos, uma vez que a droga atua destruindo as células secretoras da mesma.

A ingestão da erva mate não exerceu ação hipoglicemiante, nem alterou a secreção de insulina nos animais. Em parte, esse resultado pode ser decorrente do modelo animal de diabetes utilizado, que apresentava altas taxas glicêmicas, não passíveis de redução através do consumo alimentar e sim por meio de medicamentos e substâncias em doses farmacológicas, como as utilizadas em outros estudos com análogos



sintéticos do ácido clorogênico (HEMMERLE *et al.*, 1997; HERLING *et al.* 1998; PARKER *et al.*, 1998).

Apenas um trabalho publicado recentemente (PANG *et al.*, 2008) avaliou os efeitos da suplementação de erva mate sobre a glicemia e os resultados se opõem aos encontrados em nosso estudo. Extrato etanólico de erva mate foi adicionado à dieta de animais normoglicêmicos obesos durante 60 dias, que tiveram a glicemia reduzida em 12%, além de 7% de redução no peso e 30% no colesterol LDL. Neste mesmo estudo, a erva mate também reduziu a insulinemia nos animais tratados, o que sugere que esta não estimula diretamente a liberação de insulina. No entanto, as diferenças no modelo animal e na forma da administração da erva mate tornam difícil a comparação entre estes resultados e os nossos.

Outros trabalhos demonstraram ação hipoglicemiante da ingestão oral de alimentos ricos em polifenóis ou de polifenóis isolados, como por exemplo: estudo em humanos com ingestão de suco de maçã, rico em florizina e ácido clorogênico (JONHSTON *et al.*, 2002) e com café enriquecido com ácidos clorogênicos (THOM, 2007); estudos em animais com ingestão de extratos de *Cecropia obtusifolia* (ANDRADE-CETTO & WIEDENFELD 2001; NICASIO *et al.*, 2005), 5-CQA isolado (BASSOLI *et al.*, 2008) e catequinas do chá verde (IGARASHI *et al.*, 2007). Estes trabalhos com animais utilizaram modelos com hiperglicemia moderada, nos quais os resultados de baixas doses de substâncias hipoglicêmicas, como as administradas através da alimentação, talvez sejam mais visíveis que em animais com glicemia muito elevada como os utilizados em nossa pesquisa.

Além disso, todos esses trabalhos avaliaram o efeito agudo através de curva glicêmica logo após o consumo e não após certo tempo de consumo diário como no presente estudo.

A ocorrência de resultados contraditórios entre o nosso estudo e os mencionados acima, talvez esteja relacionada não apenas à diferenças no modelo animal e na dose empregada, mas também na metodologia de medição da glicemia. Apesar de a dosagem única de glicemia ser o método mais utilizado por ser mais fácil, rápido e apresentar menor custo, a análise da curva glicêmica fornece uma impressão geral sobre a reatividade do organismo e o manejo da hiperglicemia na presença de um composto/alimento teste. Desta forma, os efeitos hipoglicêmicos ou anti-hiperglicêmicos poderiam ser melhor visualizados (VERSPOHL, 2002).

Corroborando essa hipótese, SOTILLO & HADLEY (2002) observaram que a infusão intravenosa diária de ácido clorogênico em modelo animal de diabetes tipo 2 não foi capaz de reduzir a glicemia de jejum após 3 semanas de intervenção, mas reduziu o pico da curva glicêmica. Os autores sugeriram que o ácido clorogênico não estimula a liberação de insulina, portanto não é capaz de sustentar a queda da glicemia, mas que deve agir como agente anti-hiperglicemiante semelhante à medicamentos como a metformina, que não estimula a liberação de insulina mas impede o aumento brusco da glicemia.

Nos animais não-diabéticos, os níveis glicêmicos são estritamente controlados e a homeostase é atingida facilmente através do equilíbrio entre a produção hepática e a liberação de insulina, sendo melhor visualizados os

efeitos de agentes anti-hiperglicêmicos por meio da curva glicêmica (VERSPOHL, 2002). Portanto, são necessários futuros estudos que avaliem a curva glicêmica para analisar a hipótese de que a erva mate possa atuar como agente anti-hiperglicêmico, tanto em animais normais quanto diabéticos.

Atualmente, um fator importante a ser considerado para reduzir o risco do diabetes é o consumo de alimentos com baixo índice glicêmico ou ricos em polifenóis, que possam ter ação redutora sobre a liberação ou absorção de glicose, reduzindo assim o índice glicêmico da dieta (CLIFFORD, 2004; MCCARTY, 2005).

Uma vez que pesquisas com polifenóis do chá verde, ácido clorogênico e seus análogos sintéticos demonstraram redução da atividade da glicose-6-fosfatase *in vitro*, decidimos avaliar se a erva mate, rica em ácidos clorogênicos, exerceria alguma ação sobre a atividade dessa enzima. Os resultados estão apresentados na Tabela 6.

A ingestão de erva mate não reduziu a atividade do complexo enzimático glicose-6-fosfatase. A diferença entre os animais diabéticos e os não-diabéticos foi significativa, o que era esperado uma vez que no diabetes, principalmente no tipo 1, ocorre aumento da atividade da glicose-6-fosfatase no fígado. Este aumento se dá em razão da falta/resistência à insulina, cuja presença causa diminuição da atividade. Sem a inibição da insulina, a atividade da glicose-6-fosfatase aumenta e causa a separação do radical fosfato da glicose armazenada no fígado ou produzida por gliconeogênese,

permitindo a difusão da glicose livre para a corrente sanguínea (GUYTON & HALL, 1998; SLOOP *et al.*, 2007).

Estudos com ácido clorogênico isolado (ARION *et al.*, 1997; HEMMERLE *et al.*, 1997, BASSOLI *et al.*, 2008) e com análogos sintéticos do ácido clorogênico (ARION *et al.*, 1998; PARKER *et al.*, 1998) demonstraram ação inibitória sobre a atividade da glicose-6-fosfatase hepática *in vitro*. Com os análogos sintéticos, estudos *in vivo* em animais demonstraram ainda que houve redução da liberação de glicose, tanto através da gliconeogênese quanto da glicogenólise, com conseqüente queda na glicemia (HEMMERLE *et al.*, 1997; HERLING *et al.*, 1998; PARKER *et al.*, 1998). As doses utilizadas desses análogos foram de 100 a 250 mg/kg, em doses únicas ou fracionadas, com administração via intravenosa ou intraperitoneal. Sabe-se que os análogos sintéticos do ácido clorogênico apresentam potência de ação por volta de 1000 vezes maior que o seu precursor (ARION *et al.*, 1998).

Com os ácidos clorogênicos, especificamente o 5-CQA, os dados sobre redução da glicemia e redução da atividade da glicose-6-fosfatase *in vivo* são mais controversos. Além de ser menos potente que seus derivados, talvez o ácido clorogênico não seja tão facilmente transportado através das membranas celulares dos hepatócitos quanto os mesmos, que conhecidamente são transportados de forma ativa pelo transportador OATP1 (SCHWAB *et al.*, 2001), e dependa do transporte por difusão passiva, como proposto por FARAH & TRUGO (2006). Com isso, não se torna disponível

em quantidades suficientes para inibir a glicose-6-fosfatase, como acontece com seus derivados sintéticos.

BASSOLI *et al.* (2008), utilizando ratos wistar, demonstraram que o 5-CQA não foi capaz de reduzir a produção de glicose como os derivados sintéticos e também não demonstrou efeitos na redução do pico glicêmico quando administrado via intravenosa, mesmo em alta dose (70 mg/kg peso), mas o efeito foi positivo quando administrado por via oral nesse e em outro estudo com diferente isômero (3-CQA) (ANDRADE-CETTO & WIEDENFELD, 2001). Estes resultados sugerem que o metabolismo do ácidos clorogênicos e seus efeitos sobre o trato gastrointestinal sejam fundamentais para que estes compostos atuem como anti-hiperglicemiantes.

Existem evidências de que alguns polifenóis tenham efeito trófico no intestino delgado, através de uma variedade de mecanismos, resultando na alteração do padrão de captação de glicose (JOHNSTON *et al.*, 2002). A taxa de absorção e a região do intestino que os açúcares são absorvidos afetam o aumento da glicemia e a disponibilidade de glicose para os diferentes tecidos do corpo (FERRARIS *et al.*, 2001) e, portanto, a possível regulação da absorção de açúcares através da ingestão de bebidas/alimentos ricos em polifenóis e a pesquisa sobre os mecanismos de ação que podem estar implicados poderiam contribuir para auxiliar no controle da hiperglicemia no diabetes.

Avaliamos a expressão gênica do cotransportador intestinal de glicose SGLT1 no duodeno (Figura 9) e jejuno (Figura 10) dos animais. O SGLT1 é expresso na borda em escova, onde é responsável pela maior parte da

absorção de glicose e galactose oriundas dos alimentos (WRIGHT *et al.*, 1997).

Comparando os animais diabéticos com os não-diabéticos, os resultados encontrados para o duodeno estão condizentes com os dados encontrados na literatura. Estudos em modelos animais de diabetes (DYER *et al.*, 1997; BURANT *et al.*, 1994) utilizando amostras de toda a extensão do intestino delgado e em amostras do duodeno de humanos com diabetes tipo 2 (DYER *et al.*, 2002) mostraram que a doença leva a um aumento da expressão gênica do SGLT1 e também ao aumento na capacidade de absorção de glicose pelos enterócitos. Estes resultados provavelmente são decorrentes de respostas adaptativas do organismo frente à ineficiência de captação de glicose pelos tecidos corporais, em consequência da falta/resistência à insulina, e podem exacerbar a hiperglicemia (BURANT *et al.*, 1994). Não foram encontrados na literatura resultados semelhantes ou mecanismos que explicassem a maior expressão gênica do SGLT1 no jejuno dos animais não diabéticos em relação aos diabéticos.

Com relação aos animais que ingeriram erva mate, os resultados indicam que os compostos bioativos presentes na erva mate podem ser capazes de interferir na absorção de glicose por reduzirem a expressão do SGLT1, uma vez que esta foi significativamente menor nos animais que ingeriram erva mate, tanto diabéticos como não diabéticos. Sabe-se que a quantidade de carboidratos e íons sódio presentes na membrana intestinal interferem na expressão gênica do SGLT1 (FERRARIS, 2001). Estudos *in vitro* demonstraram que o 5-CQA e outros polifenóis impediram a absorção

de glicose pela membrana intestinal através da dissipação do gradiente de sódio (WELSCH *et al.*, 1989) e bebidas ricas em ácidos clorogênicos diminuíram a absorção sódio-dependente de glicose (WANG *et al.*, 2008). HOSSAIN *et al.*, (2002) confirmaram, também *in vitro*, que polifenóis alteram as respostas elétricas da membrana intestinal. Neste contexto, supõe-se que a redução na expressão do SGLT1 em decorrência do tratamento com erva mate se dá de forma indireta: os compostos fenólicos presentes na infusão dissipam os íons sódio da membrana intestinal, o que por sua vez leva à diminuição da expressão do SGLT1.

A avaliação dos efeitos de polifenóis e outros bioativos presentes em alimentos sobre a expressão gênica de transportadores de glicose é uma área ainda pouco explorada. Apenas um trabalho a esse respeito foi encontrado: CAO *et al.* (2007) observaram redução significativa na expressão de transportadores de glicose da família GLUT no fígado, músculo e rim de ratos que consumiram dieta suplementada com chá-verde.

Alguns pesquisadores sugeriram que flavonóides reduzem a absorção de glicose através da inibição do SGLT1. Estas conclusões foram baseadas em experimentos *in vitro*, que demonstraram que os polifenóis do chá verde e a quercetina de alguma forma se ligam ao SGLT1, impedindo competitivamente o transporte de glicose (KOBAYASHI *et al.*, 2000; WOLFFRAM *et al.*, 2002; CERMAK *et al.*, 2004). Existe a hipótese de que as catequinas do chá e a quercetina sejam transportadas pelo SGLT1, quando conjugadas a um radical glicosídico. Porém, ainda não está claro se estes compostos apenas bloqueiam o sítio do Na<sup>+</sup> ou da glicose ou se são

realmente transportados no lugar da glicose (HOSSAIN *et al.*, 2002; WOLFFRAM *et al.*, 2002).

Apesar de pesquisas a respeito da ação dos compostos fenólicos e alimentos fontes sobre o metabolismo e absorção de glicose serem ainda escassas, os resultados encontrados em nosso estudo e na literatura indicam que os polifenóis têm ação a expressão gênica e atividade dos transportadores de glicose em diferentes partes do organismo. São necessários mais estudos que avaliem os mecanismos pelos quais os compostos fenólicos atuam e também se essas ações podem efetivamente levar à redução da glicemia e aumento da tolerância à glicose *in vivo* em animais e humanos, através da avaliação da curva glicêmica.



## 6 - CONCLUSÃO

Os resultados indicam que o tratamento com erva mate não exerceu efeitos benéficos sobre parâmetros importantes no controle do diabetes, nem promoveu diferenças significantes na glicemia e concentração de insulina dos animais tratados. A atividade da glicose-6-fosfatase hepática, enzima chave na liberação de glicose livre para a corrente sanguínea, também não foi afetada pelo tratamento com erva mate.

No entanto, a erva mate reduziu de maneira significativa a expressão gênica dos cotransportadores de glicose SGLT1 no intestino delgado tanto nos animais diabéticos quanto nos não-diabéticos, sugerindo que os compostos bioativos da erva mate sejam capazes de reduzir a absorção de glicose.

O consumo regular de erva mate interfere na absorção da glicose e isto poderia ser um fator positivo de seu consumo.

São necessários estudos que confirmem se este mecanismo de ação ocorre em humanos e se podem, efetivamente, levar à redução da glicemia e aumento da tolerância à glicose.

## 7 - BIBLIOGRAFIA

1. American Diabetes Association. All About Diabetes (Online), 2008. [acesso 2008 mar 03]. Disponível em: <http://diabetes.org/about-diabetes.jsp>
2. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2005; 28 Suppl: 37-42.
3. Andrade-Cetto A, Wiedenfeld H. Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 2001; 78:145-149.
4. Anesini C, Ferraro G, Filip R. Peroxidase-like activity of *Ilex paraguariensis*. *Food Chem* 97 (3): 459-464, 2006.
5. Arion WJ, Canfield WK, Ramos FC, Mark LS, Burger HJ, Hemmerle H, Schubert G, Below P, Herling AW. Chlorogenic acid analogue S-3483: a potent competitive inhibitor of the hepatic and renal glucose-6-phosphatase systems. *Arch Biochem Biophys* 1998; 351: 279-285.
6. Arion WJ, Canfield WK, Ramos FC, Schindler PW, Burger HJ, Hemmerle H, Schubert G, Below P, Herling AW. Chlorogenic acid and hydroxynitrobenzaldehyde: new inhibitors of hepatic glucose 6-phosphatase. *Arch Biochem Biophys*. 1997; 339(2):315-22.
7. Baginski ES, Foa PP, Zak B: Glucose-6-phosphatase. In *Methods of Enzymatic Analysis* 2nd ed. Bergmeyer HU, Karlfried G. Weinheim; Eds. New York : Verlag Chemie: Academic Press, 1974, p876-880.
8. Bussab WO, Morettin PA. *Estatística Básica*: 5. ed. São Paulo: Saraiva, 2006.
9. Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ, Wasserman W. *Applied linear statistical models*. 4 ed. Boston: Irwin, 1996.
10. Baisch ALM, Johnston FL, Stein P. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* on mesenteric arterial bed of rats. *J Ethnopharmacol* 1998; 60: 133-139
11. Barceló A, Aedo C, Rajpathak S, Robles S. The cost of diabetes in Latin America and the Caribbean. *Bull World Health Organ* 2003; 81(1): 19-27.
12. Bassoli BK, Cassola P, Bora-Murad GR, Constantin J, Salgueiro-Pagadigorria CL, Bazotte RB, Silva RSSF, Souza HM. Chlorogenic acid reduces the plasma glucose peak in the oral glucose tolerance test:

- effects on hepatic glucose release and glycaemia. *Cell Biochem Funct* 2008; 26:320-328.
13. Bastos DHM, Fornari AC, Queiroz YS, Manólio RA, Torres, EAF. The chlorogenic acid and caffeine content of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) beverages. *Acta Farm. Bonaerens* 2005; 24(1): 91-95
  14. Bastos DHM, Fornari AC, Queiroz YS, Torres EAF. Bioactive compounds content of chimarrão infusions related to the moisture of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) leaves. *Braz Arch Biol Technol* 2006a; 49(3):399-404.
  15. Bastos DHM, Ishimoto EY, Marques MOM, Ferri AF, Torres EAFS.. Essential oil and antioxidant activity of green Mate and Mate tea (*Ilex paraguariensis*) infusions. *J Food Comp Anal* 2006b; 19:538-43.
  16. Bastos DHM, Oliveira DM, Matsumoto RLT, Carvalho PO, Ribeiro ML. *Yerba maté*: Pharmacological Properties, Research and Biotechnology. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology* 2007a; 1(1):37-46.
  17. Bastos DHM, Saldanha LA, Catharino RR, Sawaya HF, Cunha IBS, Carvalho PO, Eberlin MN. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) extracts. *Molecules* 2007b; 12: 423-432.
  18. Baynes J & Dominiczak, MH *Bioquímica Medica*. Ed. Manole, São Paulo 2000, 566p.
  19. Bixby M, Spindler L, Menini T, Gugliucci A. *Ilex paraguariensis* extracts are potent inhibitors of nitrosative stress: A comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. *Life Sciences* 2005, 77 (3): 345-358.
  20. Block G, Patterson B, Subar A. fruit, vegetables and cancer prevention: a review of epidemiological evidence. *Nutr. Cancer* 1992; 18: 1-29.
  21. Bracesco N, Dell M, Rocha A, Behtas S, Menini T, Gugliucci A, Nunes E. Antioxidant activity of a botanical extract preparation of *Ilex paraguariensis*: prevention of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* and human low-density lipoprotein oxidation. *J Altern Complement Med* 2003; 9: 379-387
  22. Bradford MM. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
  23. Brand-Miller JC. importance of glycemic index in diabetes. *Am J Clin Nutr* 1994; 59: 747S-752S.

24. Campos AM, Escobar J, Lissi EA. The total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) of *Ilex paraguariensis* extracts and red wine. *J Braz Chem Soc* 1996; 7(1): 43-49.
25. Cao H, Hininger-Favier I, Kelly MA, Benaraba R, Dawson HD, Coves S, Roussel AM, Anderson RA. Green tea polyphenol extract regulates the expression of genes involved in glucose uptake and insulin signaling in rats fed a high fructose diet. *J Agric Food Chem* 2007; 55: 6372-6378.
26. Carvalho EN, Carvalho NAS, Ferreira LM. Modelo experimental de indução do diabetes mellitus em ratos. *Acta Cir Bras* 2003; 18(spe): 60-64.
27. Cermak R, Landgraf S, Wolfram S. Quercetin glucosides inhibit glucose uptake into brush-border-membrane vesicles of porcine jejunum. *Br J Nutr* 2004; 91: 849-855.
28. Chandra S, Mejia EG. Polyphenolic Compounds, Antioxidant Capacity, and Reductase Activity of an Aqueous Extract of *Ardisia compressa* in Comparison to Mate (*Ilex Paraguariensis*) and Green (Camellia sinensis) Teas. *J. Agric. Food Chem* 2004; 52: 3583-3589.
29. Clifford MN. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J Sci Food Agric* 2000; 80:1033-1043
30. Clifford MN. Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health. *Planta Med* 2004; 70:1103-1114.
31. Csala M, Margittai E, Senesi S, Gamberucci A, Banhegyi G, Mandl J, Benedetti A. Inhibition of hepatic glucose 6-phosphatase system by the green tea flavanol epigallocatechin gallate *FEBS Letters* 2007; 581: 1693-1698.
32. Díez-Sampedro A, Lostao MP, Wright EM, Hiramaya BA. Glycoside binding and translocation in Na<sup>+</sup>-dependent glucose cotransporters: Comparison of SGLT1 and SGLT3. *J Membrane Biol* 2000; 176:111-117.
33. Farah A, Trugo LC. Chlorogenic acid isomers from coffee are differentially uptaken by HepG2 human hepatocytes cell line. In ASIC 21<sup>st</sup> International Conference on Coffee Science 2006, Montpellier-France, CD-ROM ASIC Montpellier 2006;
34. Ferraris RP. Dietary and developmental regulation of intestinal sugar transport. *Biochem. J.* 2001; 360: 265-276.
35. Filip R, López P, Gilberti G, Coussio J, Ferraro G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. *Fitoterapia* 2001; 72: 774-778.

36. Filip R, Sebastian T, Ferraro G, Anesini C. Effect of Ilex extracts and isolated compounds on peroxidase secretion of rat submandibular glands. *Food Chem Toxicol* 2007; 45:649-655.
37. Freitas HS. A insulina como fator modulador da expressão gênica de GLUT2 e do SGLT2 em rim de ratos diabéticos. São Paulo, SP: USP, 2005. Tese (Doutorado em Ciências, área de concentração Fisiologia Humana) – Universidade de São Paulo, 2005.
38. Genovese MI, Santos RJ, Hassimoto NMA, Lajolo FM. Determinação do conteúdo de fenólicos totais em frutas. *Braz.J Phar Sci.* 2003; 39:167-169.
39. Gonthier MP, Verny MA, Besson C, Rémesy C, Scalbert A. Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. *J Nutr* 2003; 133:1853-1859
40. Gorzalczany S, Filip R, Alonso MR, Mino J, Ferraro GE, Acevedo C. Choleric effect and intestinal propulsion of 'mate' (*Ilex paraguariensis*) and its substitutes or adulterants. *J Ethnopharmacol* 2001 75(2-3):291-4.
41. Greenberg, JA, Boozer, CA, Geliebte, A. Coffee, diabetes, and weight control. *Am J Clin Nutr* 2006;84:682–93.
42. Gugliucci A, Menini T. Three different pathways for human LDL oxidation are inhibited in vitro by water extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureoides*, *Life Sci* 2002; (71): 693-705.
43. Gugliucci A, Stahl AJC. Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. *Biochem Mol Biol Int* 1995: 35:47-56.
44. Gugliucci A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: Induction of decreased oxidability of human LDL in vivo. *Biochem and Biophys Res*, 1996; 224:338-344.
45. Guyton AC & Hall JE. *Fisiologia humana e mecanismos das doenças*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1998: 557-577.
46. Han LK, Zheng YN, Xu B, Okuda H, Kimura Y (2002) Saponins from *Platycodonradix* ameliorate high fat diet-induced obesity in mice. *J Nutr* 2002; 132: 2241-2245
47. Han LK, Zheng YN, Yoshikawa M, Okuda H, Kimura Y (2005) Anti-obesity effects of chikusetsusaponins isolated from *Panax japonicus* rhizomes. *BMC Complement Altern Med* 2005; 6:9.

48. Heck CI and Mejia EG. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. *J Food Sci* 2007; 72(9):138-151.
49. Hemmerle H, Burger HJ, Below P, Schubert G., Rippel, R., Schindler PW, Paulus E, Herling AW. Chlorogenic acid and synthetic chlorogenic acid derivatives: novel inhibitors of hepatic glucose-6-phosphate translocase. *J. Med. Chem.* 1997; 40, 137–145.
50. Herling AW, Burger H, Schubert G, Hemmerle H, Schaefer H, Kramer W. Alterations of carbohydrate and lipid intermediary metabolism during inhibition of glucose-6-phosphatase in rats. *Eur J Pharmacol.* 1999; 386(1):75-82.
51. Herling AW, Burger H, Schwab D, Hemmerle H, Below P, Schubert G. Pharmacodynamic profile of a novel inhibitor of the hepatic glucose-6-phosphatase system. *Am J Physiol* 1998; 274:G1087-G1093.
52. Herling AW, Schwab D, Burger H, Maas J, Hammerl R, Schmidt D, Strohschein S, Hemmerle H, Schubert G, Petry S, Kramer W. Prolonged blood glucose reduction in mrp-2 deficient rats (GY/TR) by the glucose-6-phosphatase translocase inhibitor S 3025. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1569: 105-110.
53. Hossain SJ, Kato H, Aoshima H, Yokoyama T, Yamada M, Hara Y. Polyphenol-induced inhibition of the response of Na/glucose cotransporter expressed in *Xenopus* oocytes. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 5215–5219.
54. Hostettmann KK, Marston AA. Saponins. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1995; pp 548.
55. Igarashi K, Honma K, Yoshinari O, Nanjo F, Hara Y. Effect of dietary catechins on glucose tolerance, blood pressure and oxidative status on Goto-Kakizaki rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 2007; 53: 496-500.
56. Johnston K, Sharp P, Clifford M, Morgan L. Dietary polyphenols decrease glucose uptake by human intestinal Caco-2 cells. *FEBS Letters* 2005; 579:1653-1657
57. Johnston KL, Clifford MN, Morgan LM. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. *Am. J. Clin. Nutr.* 2003; 78: 728-733.
58. Johnston KL, Clifford MN, Morgan LM. Possible role for apple juice Phenolic compounds in the acute modification of glucose tolerance and gastrointestinal hormone secretion in humans. *J Sci Food Agric* 2002; 82:1800-1805.

59. Kasahara M, Maeda M, Hayashi S, Mori Y, Abe T. A missense mutation in the Na(+)/glucose cotransporter gene SGLT1 in a patient with congenital glucose-galactose malabsorption: normal trafficking but inactivation of the mutant protein *Biochim Biophys Acta*. 2001 *Maio* 31;1536(2-3):141-7
60. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025. *Diabetes Care* 1998; 21: 1414-31.
61. Knert P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *Br Med J* 1996; 312: 478-481
62. Kobayashi Y, Suzuki M, Satsu H, Arai S, Hara Y, Suzuki K, Miyamoto Y, Sjimizu M. Green tea polyphenols inhibit the sodium-dependent glucose transporter of intestinal epithelial cells by a competitive mechanism. *J Agric Food Chem*. 2000; 48:5618-5623.
63. Konishi Y, Zhao Z, Shimizu M. Phenolic acids are absorbed from the rat stomach with different absorption rates. *J Agric Food Chem* 2006; 54:7539-7543.
64. Lafay S, Gil-Izquierdo A, Manach C, Morand C, Besson C, Scalbert A. Chlorogenic acid is absorbed in its intact form in the stomach of rats. *J Nutr* 2006; 136:1192-1197.
65. Lanzetti M, Bezerra FS, Romana-Souza B, Brando-Lima AC, Koatz VLG, Porto LC, Valença SS. Mate tea reduced acute lung inflammation in mice exposed to cigarette smoke. *Nutrition* 2008; 24:375–381.
66. Lindsay DG. The nutritional enhancement of plant foods in Europe “Neodiet”. *Trends Food Sci. Technol.* 2000; 11: 145-151.
67. Lunceford N & Gugliucci A. *Ilex paraguariensis* inhibit AGE formation more efficiently than green tea. *Fitoterapia* 2005; 76:419-427.
68. Mazzafera P. Maté drinking: caffeine and phenolic acid intake. *Food Chem* 1997; 60(1): 67-71.
69. McCarty MF. A chlorogenic acid-induced increase in GLP-1 production may mediate the impact of heavy coffee consumption on diabetes risk. *Med Hypotheses* 2005: 64:848-853.
70. Mejia EG, Song Y, Ramirez-Mares MV, Kobayashi H. Effect of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Tea on Topoisomerase Inhibition and Oral Carcinoma Cell Proliferation. *J. Agric. Food Chem* 2005; 53:1966-1973

71. Menini T, Heck C, Shulze J, Mejia E, Gugliucci A. Protective action of *Ilex paraguariensis* extract against free radical inactivation of paraoxonase-1 in high density lipoprotein. *Planta Med* 2007; 73: 1141-1147.
72. Milioli EM, Cologni P, Santo CC, Marcos TD, Yunes VM. Effect of Acute Administration of Hydroalcohol Extract of *Ilex paraguariensis* St Hilaire (Aquifoliaceae) in Animal Models of Parkinson's Disease. *Phytother. Res.* 2007; 21:771-776.
73. Miranda DDC, Arçari DP, Pedrazzoli Jr J, Carvalho PO, Cerutti SM, Bastos DHM, Ribeiro ML. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage and DNA repair in mice. *Mutagenesis* 2008;
74. Mosimann AL, Wilhelm-Filho D, Silva EL. () Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Biofactors* 2006; 26: 59-70
75. Nicasio P, Aguilar-Santamaría L, Aranda E, Ortiz S, González M. Hypoglycemic effect and chlorogenic acid content in two *Cecropia* species. *Phytother Res* 2005; 19: 661-664.
76. Okamoto MM. O teor de sódio da dieta modula a expressão gênica dos transportadores de glicose em diferentes territórios do organismo. São Paulo, SP: USP, 2003. Tese (Doutorado em Ciências, área de concentração Fisiopatologia Experimental) – Universidade de São Paulo, 2003.
77. Olthof MR, Hollman PCH, Buijsman MCNP, Amelvoort, JMM, Katan, MB. Chlorogenic acid, Quercetin-3-Rutinoside and Black Tea Phenols are Extensively Metabolized in Humans. *J. Nutr* 2003; 133: 1806-1814.
78. Olthof MR, Hollman PCH, Katan MB. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J. Nutr* 2001; 131: 66-71.
79. Pacher P, Obrosova IG, Mabley JG, Szabo C. Role of Nitrosative Stress and Peroxynitrite in the Pathogenesis of Diabetic Complications. *Emerging New Therapeutical Strategies. Curr Med Chem* 2005; 12: 267-275.
80. Pang J, Cho Y, Park T. *Ilex paraguariensis* extract ameliorates obesity induced by high-fat diet: Potential role of AMPK in the visceral adipose tissue. *Arch Biochem Biophys* 2008; in press
81. Parker JC, Van Volkenburg MA, Levy CB, Martin WH, Burk SH, Kwon Y, Giragossian C, Gant TG, Carpino PA, McPherson RK, Vestergaard P, Treadway JL Plasma glucose levels are reduced in rats and mice treated



- with an inhibitor of glucose-6-phosphate translocase. *Diabetes* 1998; 47:1630-1636.
82. Plumb GW, Garcia-Conesa MT, Kroon PA, *et al.* Metabolism of chlorogenic acid by human plasma, liver, intestine and gut microflora. *J Sci Food Agric* 1999; 79:390-392.
  83. Ramirez-Mares MV, Chandra S, Mejia EG. In vitro chemopreventive activity of *Camellia sinesis*, *Ilex paraguariensis* and *Adisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. *Mutat Res* 2004; 554: 53-65.
  84. Salazar-Martinez E, Willet WC, Ascherio A, Manson JE, Leitzmann, MF, Stampfer, MJ *et al.* Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 2004; 140:1-8.
  85. Scalbert A, Williamson G. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *J Nutr* 2000; 130: 2073S-2085S.
  86. Schaftingen, E.V, Gerin, I. The glucose-6-phosphatase system. *Biochem J* 2002; 362:513-532.
  87. Schinella GR, Troiani G, Dávila V, Buschiazzo PM, Tournier HA. antioxidant effects o an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. . *Biochem and Biophys Res Commun* 2000: 269:357-360.
  88. Schwab D, Herling AW, Hemmerle H, Schubert G, Hagenbuch B, Burger HJ. Hepatic uptake of synthetic chlorogenic acid derivates by the organic anion transport proteins. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 296:91-98.
  89. Silva MC. Análise histológica e radiográfica das alterações periodontais provocadas pela indução do diabetes em ratos. Bauru, SP: USP, 2006. Dissertação (Mestrado em Odontologia, área de concentração Biologia Oral) – Universidade de São Paulo, 2006.
  90. Silva RS. Alterações da expressão gênica e localização celular do co-transportador Na<sup>+</sup>/Glicose (SGLT1) em glândulas salivares parótida e submandibular de ratos diabéticos. Tese (Mestrado em Ciências, área de concentração Fisiologia Humana) – Universidade de São Paulo, 2007.
  91. Sloop KW, Showalter, AD, Cox AL, Cao JXC, Siesky AM, Zhang HY, Irizarry AR, Murray SF, Booten SL, Finger EA, McKay RA, Monia BP, Bhanot S, Michael MD. Specific Reduction of Hepatic Glucose 6-Phosphate Transporter-1 Ameliorates Diabetes while Avoiding Complications of Glycogen Storage Disease. *J Biol Chem* 2007; 282(26):19113-19121.
  92. Sociedade Brasileira de Diabetes. Diabetes: Consenso da Sociedade Brasileira de Diabetes - CSBD, 2002 (Online), 2007. [acesso 2007 jun

- 14]. Disponível em:  
[http://diabetes.org.br/educacao/docs/Consenso\\_atual\\_2002.pdf](http://diabetes.org.br/educacao/docs/Consenso_atual_2002.pdf)
93. Sociedade Brasileira de Diabetes. Tratamento e Acompanhamento do Diabetes Mellitus - Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2007 (Online), 2008. [acesso 2008 mar 03]. Disponível em:  
<http://diabetes.org.br/politicas/diretrizesonline.php>
94. Sotillo DYR. & Hadley M. Chhlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of: colesterol, triacylglycerol, and minerals in (fa/fa) Zucker rats. *J Nutr Biochem*. 2002 13: 717-726.
95. Spadella CT, Macedo CS, Machado JLM, Schellini SA, Padovanni CR. Estudo comparativo entre cinco diferentes tratamentos sobre as alterações clínicas e laboratoriais do rato diabético induzido pela aloxana. *Acta Cir Bras* 2005; 20(1): 46-54.
96. Stein FLP, Fellow BS, Furlong EB, Soares AAS Soares MCF, Vaz MRC, Baisch ALM. Vascular responses to extractable fractions of *Ilex paraguariensis* in rats fed standard and high-cholesterol diets. *Biol Res Nurs* 2005; 7(2):146-156.
97. Thom E. Chlorogenic acid enriched coffee and glucose absorption. *J Int Med Res* 2007; 35:900-908.
98. Van Dam RM & Feskens EJM. Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus. *Lancet* 2002; 360:1477-1478.
99. Van Dam RM. Coffee and type 2 diabetes: from beans to beta-cells. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2006 Jan;16(1):69-77
100. Verspohl EJ. Recommended testing in diabetes research. *Planta Med* 2002; 68:582-590.
101. Wang Z, Clifford MN, Sharp P. Analysis of chlorogenic acids in beverages prepared from Chinese health foods and investigation, in vitro, of effects on glucose absorption in cultured Caco-2 cells. *Food Chem* 2008; 108:369-373.
102. Welsch CW, Lachance PA, Wasserman, B.P. Dietary Phenolic Compounds: Inhibition of Na<sup>+</sup> dependent D-Glucose Uptake in Rat Intestinal Brush Border Membrane Vesicles. *J Nutr* 1989; 119: 1698-1704.
103. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004; 27(5): 1047-53.

104. Wolfram S, Block M, Ader P. Quercetin-3-glucoside is transported by the glucose carrier SGLT1 across the brush border membrane of rat small intestine. *J Nutr* 2002; 132: 630–635.
105. World Health Organization. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Report of WHO consultation 1999; 66.
106. Wright EM, Hirsch JR, Loo DDF, Zampigui GA. Regulation of Na<sup>+</sup>/glucose cotransporters. *J Exp Biol*. 1997; 200:287-293.
107. Wright EM, Loo DDF, Hirayama BA, Turk E. Surprising versatility of Na<sup>+</sup>-glucose cotransporters: SLC5. *Physiology* 2004; 19:370-376.
108. Wright EM, Hirayama BA, Loo DDF. Active sugar transport in health and disease. *J Intern Med* 2007; 261:32–43.
109. Burant CF, Flink S, DePaoli AM, Chen J, Lee WS, Hediger MA, Buse JB, and Chang EB. Small intestine hexose transport in experimental diabetes. Increased transporter mRNA and protein expression in enterocytes. *J Clin Invest* 1994; 93: 578–585.
110. Dyer J, Garner A, Wood IS, Sharma AK, Chandranath I, Shirazi-Beechey SP. Changes in the levels of intestinal Na<sup>+</sup>/glucose co-transporter (SGLT1) in experimental diabetes. *Biochem Soc Trans* 1997; 25: 479S.
111. Dyer J, Wood IS, Palejwala A, Ellis A, Shirazi-Beechey SP. Expression of monosaccharide transporters in intestine of diabetic humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282: G241–8.

## **ANEXOS**

Anexo 1 - Boxplot

Anexo 2 - Carta de aprovação no comitê de ética

## Anexo 1 - Boxplot

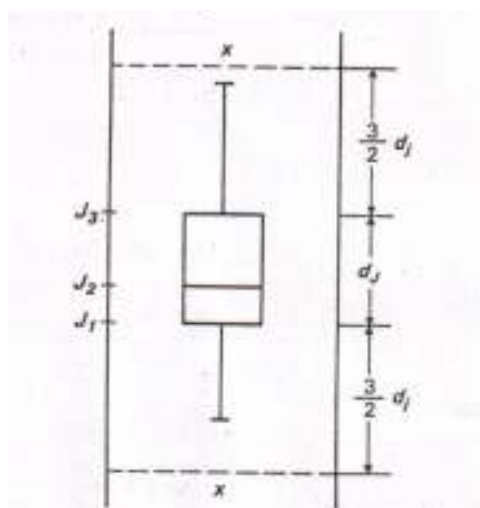
O *Boxplot* é uma representação gráfica que nos fornece uma idéia da posição, dispersão, assimetria e dados discrepantes.

A construção é feita a partir de algumas medidas de posição:

- Primeiro quartil ( $J_1$ )
- Mediana ( $J_2$ )
- Terceiro quartil ( $J_3$ )

Definimos inicialmente aqueles valores que estão muito distantes do primeiro ou do terceiro quartis, como sendo observações discrepantes.

Para construir o *Boxplot*, consideraremos um retângulo onde estão representados os quartis e a mediana. A partir do retângulo, para cima e para baixo, seguem linhas até o ponto mais remoto que não seja uma observação discrepante. Obteremos, então, uma figura que representa o conjunto dos dados, com exceção dos *outlier*. Estes serão representados individualmente por X.



A posição central dos valores é dada pela mediana e a dispersão pela diferença entre o terceiro e o primeiro quartis. As posições relativas de  $J_1$ ,  $J_2$  e  $J_3$  dão uma noção da assimetria da distribuição.

## Anexo 2 - Carta de aprovação no comitê de ética



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO  
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470  
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil  
Telefone: (55-11) 3066-7066 e 3064-5132 FAX: (55-11) 3064-5132 e 3062-2174



## COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Em reunião realizada em 01 de dezembro de 2006 o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo analisou e **aprovou**, no que diz respeito aos aspectos de natureza ética, o projeto catalogado como no.006/06 "**Avaliação da influência da erva mate (*Ilex paraguariensis*) sobre parâmetros relacionados ao diabetes mellitus e metabolismo de glicose em ratos Wistar**", encaminhado por **Daniela Moura de Oliveira**.

Prof. Dr. Pedro Paulo Chieffi  
Coordenador do CEP-IMT

