



Universidade Estadual de Maringá
Centro de Ciências Agrárias

Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos

**ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DE RAÇÃO CONTENDO FOLHAS DE
STEVIA REBAUDIANA E AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES
FUNCIONAIS EM RATOS DIABÉTICOS.**

GISLENE BONGIOVANI

Maringá 2015

GISLENE BONGIOVANI

**ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DE RAÇÃO CONTENDO FOLHAS DE
STEVIA REBAUDIANA E AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES
FUNCIONAIS EM RATOS DIABÉTICOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos.

Orientador: Silvio Cláudio da Costa

Co-orientadora: Cecília Mareze da Costa

Maringá

2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação

(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

Bongiovani, Gislene

B713 Análises físico-químicas de ração contendo folhas de Stevia rebaudiana e avaliação de propriedades funcionais em ratos diabéticos / Gislene Bongiovani. -- Maringá, 2015.

38 f; Il. tabs.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Cláudio da Costa.

Co-orientadora: Cecilia Mareze da Costa

Dissertação (Mestrado em Ciencia de Alimentos)-
Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-graduação em Ciências de Alimento.

1. Stevia rebaudiana - ração. 2. Ratos diabéticos. 3. Estreptozotocina. I. Costa, Silvio Cláudio da, orient. II. Costa, Cecilia Mareze da, co-orient. IV. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-graduação em Ciências de Alimento. V. Título.

616.462 21.ed. **634**

Cicilia Conceição de MariaCRB9- 1066

ORIENTADOR

Silvio Cláudio da Costa

CO-ORIENTADORA

Cecília Mareze da Costa

BIOGRAFIA

Gislene Bongiovani nasceu em 21 de Outubro de 1980 na cidade de Rancharia, no estado de São Paulo, Brasil. Concluiu o Ensino Médio, no ano de 1998, na cidade de Rancharia, Estado de São Paulo, no colégio Alpha. Possui graduação em Química-Bacharelado pela Universidade Estadual de Maringá, concluída em 2009. Tem experiência profissional como Técnica de laboratório, pelo Centro Universitário Unicesumar, Auxiliar de laboratório, pela indústria de óleo Insol Intertrading do Brasil S.A. e pela indústria de nutrição animal Polinutri-Nutrição Animal. Tem experiência, participando de projetos de iniciação científica, nas áreas de fisiologia animal, química de celulose, química de alimentos e bioquímica de alimentos, com ênfase no desenvolvimento de ração animal suplementada para grupos específicos, como diabéticos tipo I.

DEDICO

Aos meus amados pais, Derly e Geralda, que sempre estão me apoiando em todos os momentos de minha vida, tanto nos mais felizes, assim como nos mais dolorosos.

Obrigado pelo amor, dedicação e por todo o sacrifício que fizeram para que eu estivesse hoje nessa fase.

A vocês meu amor incondicional e minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me abençoar diariamente com saúde e determinação para buscar a constante concretização dos meus sonhos e por me possibilitar mais essa bênção em minha vida.

A Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos por essa oportunidade única em minha vida.

Agradeço aos meus pais, Derly e Geralda por todo o amor, paciência e credibilidade que tem comigo, além do apoio integral que sempre me oferecem sem medir esforços, por acreditarem na minha capacidade e me incentivarem a correr atrás de meus objetivos não deixando que eu desanimasse em momento algum.

Agradeço ao meu namorado Rafael por ter me auxiliado inúmeras vezes com esse trabalho e pela atenção em todas as vezes em que precisei dele.

Ao professor e orientador Dr. Silvio Cláudio da Costa, pela orientação, dedicação, amizade, paciência e apoio que me deu ao longo de todo o mestrado.

À professora e co-orientadora Dra. Cecília Mareze da Costa pelo auxílio, apoio, conhecimento, dedicação, paciência e carinho com o qual foi fundamental para o trabalho.

Agradeço aos desafios que me foram impostos pelo professor Dr. Silvio, sem dúvidas foi essencial para o meu crescimento profissional.

Ao técnico de laboratório do Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais Sérgio, por todo auxílio que me prestou com perfeição, pelo conhecimento e dedicação comigo.

Ao auxiliar de laboratório Cícero que também me auxiliou em todas as vezes que precisei e as técnicas Valéria, Elizete e Márcia, que sempre estavam dispostas a me ajudar, ensinar e apoiar nessa trajetória.

Agradeço a colega Paula que foi sempre tão dedicada e prestativa comigo, me ensinando, auxiliando e apoiando em todas as etapas que decorri durante esses dois anos, sempre atenciosa e carinhosa comigo.

Agradeço a Naiana e a Deborah que me auxiliaram nos experimentos e na elaboração da ração sempre com muita dedicação e carinho comigo.

Agradeço ao meu parceiro nessa trajetória Yago, que sempre esteve ao meu lado se esforçando e se dedicando para que este trabalho fosse realizado.

Obrigada a todos de coração.

APRESENTAÇÃO

Essa dissertação de mestrado está apresentada na forma de artigo científico, que foi submetido para a revista *Journal of Clinical Biochemistry & Nutrition*, com extrato qualis B1, referente à avaliação trienal 2013, e com fator de impacto 2,245 para o mesmo ano.

BONGIOVANI, G., LIMA, Y.C., DACOME, A.S., MAREZE-COSTA, C., COSTA, S.C.

Physico-chemical analysis of ration containing *Stevia rebaudiana* leaves and functional properties evaluation in diabetic rats. Revista *journal of Clinical Biochemistry & Nutrition*.

Autores:

Gislene Bongiovani (gibongiovani@hotmail.com)

Yago Lima (yago7_lima@hotmail.com)

Antônio Sérgio Dacome (asdacome@uem.br)

Cecília Mareze da Costa (cemcosta@uem.br)

Silvio Cláudio da Costa (sccosta@uem.br)

Filiações:

Universidade Estadual de Maringá

Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos

Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Bioquímica

Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Ciências Fisiológicas

GENERAL ABSTRACT

GENERAL ABSTRACT - PHYSICO-CHEMICAL ANALYSIS OF RATION CONTAINING *STEVIA REBAUDIANA* LEAVES AND FUNCTIONAL PROPERTIES EVALUATION IN DIABETIC RATS.

INTRODUCTION: The diabetes mellitus (DM) is one of the most common chronic diseases nowadays. A better metabolic control in diabetic ones has been associated with a lower incidence of chronic complications. Owing to diabetes changes the metabolism of carbohydrates, proteins and fats, the nutrition performs important role in treatment. Diabetic patients can benefit from diets which helps in the lipid and glycemic control. The *Stevia rebaudiana*, native plant from the border between Brazil and Paraguay, is a source of natural non-caloric sweeteners and the empirical knowledge of Paraguayan natives that diabetics who were using stevia tea showed improvement in blood glucose levels, stimulated investigation of potential hypoglycemic properties. Antidiabetic properties of the total extract or isolated products of this plant were found in recent decades, but it has almost studies with the total payroll. In this study, we investigated the hypothesis that diabetic rats fed with diets supplemented with *Stevia rebaudiana* leaves could have better metabolic control.

OBJECTIVE: Formulate a ration containing *Stevia rebaudiana* leaves, know their physicochemical properties and test their chronic effects in diabetic rats.

MATERIALS AND METHODS: It was used *Stevia rebaudiana* leaves (seminal variety Stevia UEM-13), dried and milled. This product was added to the ration Nuvilab, in a proportion of 2%. After being homogenized, the mix was moistened, divided in small pellets, dehydrated in a greenhouse with air circulation. In the control ration were added 2% of carboxymethylcellulose. It was performed physic-chemical analysis of the reactions for the obtaining of total proteins, ethereal extract, fixed mineral residues (ashes), total umidity total acidity values and gross fiber values. Wistar male rats 60 days old suffered diabetes induction (streptozotocin application; Sigma; 45mg/Kg p.c.;

i.v; solved in citrate buffer 0,05M; pH 4,5). It was selected the animals which presented fast glycemia equal or higher than 200mg/dL. After two days, It was established four experimental groups, two of normal animals (NC and NT) and two of diabetic animals (DC and DT). The animals of the groups NC and DC were fed with Nuvilab ration containing 2% of carboxymethylcellulose and the animals from the NT and DT groups received the same ration containing 2% of stevia rebaudiana leaves. It was recorded the body weight gain, the food intake and several glycemia values, so as in fast as fed. By the end of the four weeks treatment, the animals were put in metabolic individual cages for the collect of urine and glycosuria evaluation. Several biochemical parameters were compared, as the weight of several organs and tissues and the amount of liver glycogen. The results were expressed as average \pm average standart error and submitted to ANOVA test – two way – Bonferroni or T test, significancy level $p < 0.05$ (GraphPad Prism 4.0 program).

RESULTS AND DISCUSSION: This is the first study that has knowledge that investigate the chronic effects of the ration supplementation with *Stevia rebaudiana* leaves in the metabolic control of streptozotocin diabetic rats. The supplemented diet with stevia leaves (10%) had good acceptability by the rats, not changing the food intake. Didn't change the body weight gain in the normal rats even the weight loss in diabetic animals. The diabetic animals which received the supplemented diet with stevia leaves presented significantly reduction in glycemia, in the triglycerides concentration and of total cholesterol. The amount of liver glycogen was significantly bigger in the diabetic animals treated when compared with the control group.

CONCLUSIONS : The ration supplemented with 2% of *Stevia rebaudiana* leaves improved the glycemetic control (reduction in fast glycemia and raised in the liver glycogen) and the lipid control (reduction of tryglicerides and total cholesterol in the blood concentration) in diabetic rats, without causing effects in the food intake and body weight gain.

KEYWORDS: *Stevia rebaudiana* leaves, diabetes, streptozotocin.

RESUMO GERAL

RESUMO GERAL - ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DE RAÇÃO CONTENDO FOLHAS DE *STEVIA REBAUDIANA* E AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES FUNCIONAIS EM RATOS DIABÉTICOS.

INTRODUÇÃO: O diabetes mellitus (DM) é uma das doenças crônicas mais comuns na atualidade. Um melhor controle metabólico em diabéticos tem sido associado a uma menor incidência de complicações crônicas. Devido o diabetes alterar o metabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras, a nutrição desempenha importante papel no seu tratamento. Pessoas diabéticas podem se beneficiar de dietas que auxiliem no controle glicêmico e lipídico. A *Stevia rebaudiana*, planta nativa da região limítrofe Brasil e Paraguai, é uma fonte de edulcorantes naturais não calóricos e o conhecimento empírico de nativos paraguaios de que diabéticos que faziam uso do chá de estévia apresentavam melhora nos níveis glicêmicos, estimulou a investigação de possíveis propriedades hipoglicemiantes. Propriedades antidiabéticas do extrato total ou de produtos isolados desta planta foram constatadas nas últimas décadas, mas não se tem quase estudos com a folha total. Neste trabalho foi investigada a hipótese de que ratos diabéticos alimentados com ração suplementada com folhas de *Stevia rebaudiana* pudessem apresentar melhor controle metabólico.

OBJETIVO: Formular uma ração contendo folhas de *Stevia rebaudiana*, conhecer suas propriedades físico-químicas e testar seus efeitos crônicos em ratos diabéticos.

MATERIAIS E MÉTODOS: Foram utilizadas folhas de *Stevia rebaudiana* (variedade seminal SteviaUEM-13), secas e moídas. Este produto foi acrescentado à ração Nuvilab®, numa proporção de 2%. Depois de homogeneizada, a mistura foi umedecida, dividida em pequenos *pellets*, desidratados numa estufa com circulação de ar. Na ração controle foram acrescentados 2% de carboximetilcelulose. Foram realizadas análises físico-químicas das rações para obtenção dos valores de proteínas totais, extrato etéreo, resíduo mineral fixo (cinzas), umidade total, acidez total e fibra bruta. Ratos *Wistar* machos com 60 dias de idade sofreram a indução do diabetes (aplicação de estreptozotocina; Sigma; 45mg/Kg p.c.; dissolvida em tampão citrato 0,05M; pH 4,5, via

i.v.; veia peniana). Foram selecionados os animais que apresentaram glicemia de jejum igual ou superior a 200mg/dL. Foram estabelecidos quatro grupos experimentais, dois de animais normais (NC e NT), e dois de animais diabéticos (DC e DT). Os animais dos grupos NC e DC foram alimentados com ração Nuvilab contendo 2% de carboximetilcelulose e os animais dos grupos NT e DT receberam a mesma ração contendo 2% de folhas de *Stevia rebaudiana*. Foram registrados o ganho de peso corporal, a ingestão alimentar e diversos valores da glicemia, tanto de jejum como no estado alimentado. Ao final do tratamento de quatro semanas, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais para coleta de urina e avaliação da glicosúria. Vários parâmetros bioquímicos foram comparados, assim como o peso de diversos órgãos e tecido e quantidade de glicogênio hepático. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (epm) e submetidos ao teste ANOVA – two way – Bonferroni ou teste T, nível de significância $p < 0,05$ (programa *GraphPad Prism* 4.0).

RESULTADOS E DISCUSSÃO: Este é o primeiro trabalho que se tem conhecimento que investiga os efeitos crônicos da suplementação da ração com folhas de *Stevia rebaudiana* no controle metabólico de ratos com diabetes induzido por estreptozotocina. A dieta suplementada com folhas de Stevia teve boa aceitabilidade pelos ratos, não modificando a ingestão alimentar. Não alterou o ganho de peso corporal nos ratos normais e nem a perda de peso nos animais diabéticos. Os animais diabéticos que receberam a dieta suplementada com folhas de stevia apresentaram redução significativa na glicemia, na concentração de triglicerídeos e de colesterol total. A quantidade de glicogênio hepático foi significativamente maior nos animais diabéticos tratados quando comparado com seu controle.

CONCLUSÕES: A ração suplementada com 2% de folhas de *Stevia rebaudiana* melhorou o controle glicêmico (redução na glicemia de jejum noturno e aumento no glicogênio hepático) e o controle lipídico (redução na concentração sanguínea de triglicerídeos e de colesterol total) nos ratos diabéticos, sem causar efeitos na ingestão alimentar e no ganho de peso corporal.

Palavras- chave: folhas de *Stevia rebaudiana*, diabetes, estreptozotocina, ratos
ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is one of the most common chronic diseases nowadays. Diabetic people can benefit from diets which helps on the glycemic and lipid control. The *Stevia rebaudiana*, native plant from the border region between Brazil and Paraguay is a source of non-caloric natural sweeteners and the empirical knowledge of native Paraguayan that diabetic who were making use of stevia tea presented improvement in glycemic levels, stimulated the investigation about possible hypoglycemic and antidiabetic properties of the full extract or isolated products of this plant were found in the last few decades, but has almost no studies with the full leaf. In this work was investigated the hypothesis that diabetic rats fed with ration supplemented with stevia rebaudiana leaves could present better metabolic control. Were used streptozotocin diabetic wistar male rats fed with ration containing 2% of stevia rebaudiana leaves (seminal variety SteviaUEM-13) dried and milled for four weeks. The obtained results showed that the supplementation improved the glycemic control (fast glycemia reduction and liver glycogen rise) and lipid control (reduction of triglycerides and total cholesterol on the blood concentration) on diabetic rats, without causing changes in food intake and body weight gain.

KEYWORDS: *Stevia rebaudiana* leaves, diabetes, streptozotocin.

RESUMO

O diabetes mellitus (DM) é uma das doenças crônicas mais comuns na atualidade. Pessoas diabéticas podem se beneficiar de dietas que auxiliem no controle glicêmico e lipídico. A *Stevia rebaudiana*, planta nativa da região limítrofe Brasil e Paraguai, é uma

fonte de edulcorantes naturais não calóricos e o conhecimento empírico de nativos paraguaios de que diabéticos que faziam uso do chá de estévia apresentavam melhora nos níveis glicêmicos, estimulou a investigação de possíveis propriedades hipoglicemiantes e propriedades antidiabéticas do extrato total ou de produtos isolados desta planta foram constatadas nas últimas décadas, mas não se tem quase estudos com a folha total. Neste trabalho foi investigada a hipótese de que ratos diabéticos alimentados com ração suplementada com folhas de *Stevia rebaudiana* pudessem apresentar melhor controle metabólico. Foram utilizados ratos Wistar machos, com diabetes induzido por estreptozotocina, alimentados com ração contendo 2% de folhas de *Stevia rebaudiana* (variedade seminal SteviaUEM-13) secas e moídas por período de quatro semanas. Os resultados obtidos mostraram que a suplementação melhorou o controle glicêmico (redução na glicemia de jejum noturno e aumento no glicogênio hepático) e o controle lipídico (redução na concentração sanguínea de triglicerídeos e de colesterol total) nos ratos diabéticos, sem causar efeitos na ingestão alimentar e no ganho de peso corporal.

Palavras-chave: folhas de *Stevia rebaudiana*, diabetes, estreptozotocina, ratos.

1. INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) é uma das doenças crônicas mais comuns na atualidade. O número de pessoas portadoras dessa doença cresceu vertiginosamente nas últimas décadas, passando de 30 milhões em 1985 para 135 milhões em 1995 e atingindo 173

milhões em 2002, com projeção de chegar a 300 milhões em 2030 ⁽¹⁾. Dentre as causas para esta epidemia estão mudanças de estilo de vida, com redução da atividade física, consumo elevado de dietas ricas em gorduras e carboidratos e obesidade⁽²⁾.

O DM é causado por defeitos na secreção ou ação da insulina, um hormônio secretado pelas células β pancreáticas que atua, predominantemente, sobre o fígado, músculo e tecido adiposo, estimulando a síntese de glicogênio, lipídios e proteínas e inibindo a glicogenólise, a gliconeogênese, a lipólise e a proteólise. Além desses efeitos metabólicos, a insulina exerce um papel fundamental na captação da glicose pelas células do tecido muscular e adiposo e na liberação de glicose pelo fígado ^(3,4,5).

O DM é classificado em DM tipo 1 e 2, sendo que o tipo 1 envolve a destruição das células β pancreáticas e os indivíduos com esta forma de DM se tornam dependentes da insulino-terapia para a sobrevivência. O DM tipo 2 é a forma mais comum e é caracterizado por distúrbios da ação e/ou secreção da insulina.

As causas das complicações multissistêmicas decorrentes da ausência dos efeitos insulínicos (ou por falta do hormônio ou por resistência à sua ação) não estão totalmente esclarecidas, no entanto, tem sido alvo dos tratamentos manterem os níveis normais da glicose sanguínea, pois a hiperglicemia, além de ocasionar os sintomas clássicos desta doença (poliúria, polidipsia, polifagia, perda de peso, glicosúria, etc), pode culminar em complicações metabólicas agudas, como a cetoacidose diabética e, cronicamente, contribuir para o surgimento de alterações macrovasculares (doenças coronarianas, vasculares cerebrais e periféricas), microvasculares (falência renal e cegueira) e complicações neuropáticas (amputações) ^(6,7,8). Quando não controlada, a hiperglicemia prolongada desencadeia uma série de reações, tornando-se uma importante fonte de radicais livres. Estas moléculas, altamente reativas, também são geradas durante o processo oxidativo normal que ocorre nas células. O excesso de radicais livres cria o estresse oxidativo (uma situação de sério desequilíbrio entre a produção de radicais livres e o potencial defensivo antioxidante), que ocasiona disfunções e danos teciduais ⁽⁹⁾. Um melhor controle metabólico em diabéticos tem sido associado a uma menor incidência de complicações crônicas ^(1,2).

Devido o diabetes alterar o metabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras, a nutrição desempenha importante papel no seu controle ⁽¹⁰⁾. As estratégias nutricionais incluem redução da ingestão energética e de gorduras e limitar a ingestão de bebidas açucaradas ⁽¹¹⁾. Os edulcorantes são comumente utilizados por pessoas diabéticas e obesas, em substituição ao açúcar comum (sacarose), com a finalidade de evitar a ocorrência de picos hiperglicêmicos e reduzir o teor calórico das dietas ⁽¹⁰⁾.

Os alimentos não são apenas para saciar a fome e suprir as necessidades funcionais do organismo. Atualmente, existe o consenso de que a dieta pode também prevenir ou ajudar no tratamento de doenças crônicas não transmissíveis, como por exemplo, o diabetes. Os alimentos funcionais são caracterizados pela presença de substâncias com capacidade de modular processos metabólicos ou fisiológicos que reduzam os riscos de doenças. Pessoas diabéticas podem se beneficiar de dietas que auxiliem no controle glicêmico e lipídico ⁽¹¹⁾.

A *Stevia rebaudiana*, planta nativa da região limítrofe Brasil e Paraguai, é uma fonte de edulcorantes naturais não calóricos, com potencialidade de substituir a sacarose ou adoçantes artificiais ⁽¹²⁾. As substâncias químicas responsáveis pelo intenso poder de edulcorante das folhas da *Stevia rebaudiana* são os glicosídeos diterpênicos ou glicosídeos do esteviol ⁽¹³⁾. Foram isolados e identificados vários glicosídeos do esteviol, todos doces, mas diferem quanto à intensidade e a qualidade de dulçor. O esteviosídeo e o rebaudiosídeo A são os glicosídeos de maior importância comercial. No Japão, na Coreia, no Brasil e em outros países da América do Sul os produtos da stevia são utilizados como adoçantes há muitos anos ^(14,15,16) e, mais recentemente, o rebaudiosídeo A puro também foi aprovado nos Estados Unidos para que seja utilizado como adoçante. Segundo Shivanna et al ⁽¹⁷⁾ aproximadamente 200 fabricantes, incluindo os maiores fabricantes de alimentos, mostraram interesse em usar stevia na formulação de seus produtos. Esta aprovação veio acompanhada de uma série de trabalhos científicos, que descrevem estudos fisiológicos em humanos e em animais experimentais demonstrando a inocuidade do RebA ⁽¹⁸⁻²¹⁾. No entanto, Shivanna et al ⁽¹⁷⁾ mencionam que as informações toxicológicas disponíveis sobre stevia ainda são insuficientes para demonstrar sua segurança como aditivo alimentar ou para afirmar o seu status de GRAS (*generally recognized as safe*).

O conhecimento empírico de nativos paraguaios de que diabéticos que faziam uso do chá de estévia apresentavam melhora nos níveis glicêmicos, estimulou a investigação de possíveis propriedades hipoglicemiantes. O médico paraguaio Ovídio Miguel foi o primeiro a constatar efeitos benéficos da *Stevia rebaudiana* no tratamento de pacientes diabéticos, utilizando extrato total aquoso (800mg/dia) administrado por via oral, durante um período de 14 meses, verificou que o grau de controle glicêmico destes era semelhante ao obtido quando tratados com clorpropamida ^(22,23). Propriedades antidiabéticas do extrato total ou de produtos isolados desta planta foram constatadas nas últimas décadas. Efeitos hipoglicemiantes foram observados em estudos realizados com diferentes modelos de animais experimentais ^(24,25,26) e, também, em humanos ^(27,28). Algumas pesquisas demonstraram que os glicosídeos da *Stevia rebaudiana* (esteviosídeo, rebaudiosídeo A e a aglicona esteviol), estimularam a secreção de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos ⁽²⁹⁻³²⁾, sendo que efeitos anti-hiperglicêmicos, insulínotropicos e glucanostáticos foram observados em ratos diabéticos tratados com esteviosídeo ^(33,34). Preparações comerciais de *Stevia rebaudiana* também foram efetivas em diminuir a glicemia em camundongos diabéticos ⁽³⁵⁾ e, um estudo em humanos, comprovou que um grama de esteviosídeo acrescentado à dieta de pacientes diabéticos reduzia a glicemia pós-prandial ⁽³⁶⁾. Diversos outros estudos, no entanto, não confirmam tais propriedades. Tais discrepâncias devem ser avaliadas levando em conta os diferentes protocolos experimentais (modelos de animais, vias de administração e doses) e, principalmente, a qualidade e pureza dos extratos e isolados glicosídeos. Dados obtidos em diversos estudos realizados no Nepron (DPQ/UEM) ⁽³⁷⁻⁴⁵⁾ e, também, compilados da literatura especializada, demonstram que o extrato de estévia, além dos oito glicosídeos diterpênicos, apresenta uma série de outras substâncias, entre as quais os hormônios gibberelínicos, diterpenos do grupo labdano, bisterpenóides do tipo labdano, monoterpenos, flavonóides, esteróides glicosilados e esteróis, além de fibras com uma distribuição de massa molar e composição monomérica que poderiam apresentar efeitos biológicos importantes.

Neste trabalho foi investigada a hipótese de que ratos diabéticos alimentados com ração suplementada com folhas de *Stevia rebaudiana* pudessem apresentar melhor

controle metabólico, especialmente no que se refere ao quadro hiperglicêmico e hiperlipêmico característico desta síndrome.

2. MATERIAL E MÉTODOS

FORMULAÇÃO DA RAÇÃO

Ração suplementada

Foram utilizadas folhas de *Stevia rebaudiana* (variedade seminal SteviaUEM-13), cultivadas no NEPRON (Núcleo de Produtos Naturais) – UEM, secas e moídas. Este produto foi acrescentado à ração Nuvilab® (Colombo-PR), também moída, numa

proporção de 2%. Depois de homogeneizada, a mistura foi umedecida (800 mL de água para cada quilo de ração), dividida em pequenos *pellets*, desidratados numa estufa com circulação de ar. A ração foi armazenada em local seco e protegida de luz e umidade.

Ração controle

Para obtenção da ração controle foram realizados os mesmos procedimentos descritos no item anterior, apenas diferindo que foram acrescentados 2% de carboximetilcelulose e não folhas de stevia.

ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DAS RAÇÕES

Proteínas Totais

A quantificação de proteínas totais foi realizada no laboratório de água e alimentos (CCE/Departamento de Química) da Universidade Estadual de Maringá. A análise foi determinada segundo metodologia da AOAC 16ª Edição.

Extrato Etéreo

A quantificação do extrato etéreo total foi realizada no laboratório de água e alimentos (CCE/Departamento de Química) da Universidade Estadual de Maringá. A análise foi determinada segundo metodologia da AOAC 16ª Edição.

Resíduo Mineral Fixo (Cinzas)

A quantificação do resíduo mineral fixo foi realizada no laboratório do NEPRON da Universidade Estadual de Maringá. A análise foi determinada segundo metodologia do Instituto Adolfo Lutz, 2005 de métodos físico-químicos para análises de alimentos.

Umidade Total

Todas as análises foram feitas em triplicata e seguiu a metodologia segundo AOAC 16ª Edição. A determinação do teor de umidade total foi realizada no laboratório do NEPRON da Universidade Estadual de Maringá.

Acidez Total

O índice de acidez total titulável foi determinado no laboratório do NEPRON da Universidade Estadual de Maringá, segundo metodologia AOAC 16ª Edição.

Fibra Bruta

A matéria fibrosa bruta foi determinada no laboratório de água e alimentos (CCE/Departamento de Química) da Universidade Estadual de Maringá, segundo metodologia AOAC 16ª Edição.

AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES FUNCIONAIS

Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, com 60 dias de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas da UEM nas seguintes condições: temperatura de 24°C, fotoperíodo de 12 horas claro/ 12 horas escuro, água e ração (Nuvilab – Colombo – PR controle e suplementada com folhas de *Stevia rebaudiana*) à vontade. Os animais foram acondicionados em gaiolas coletivas (46 x 24x 30 cm), com três animais por caixa ou em gaiolas metabólicas individuais. Os procedimentos experimentais realizados foram aprovados pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de animais em Experimentação da UEM (Parecer nº 105/2014).

Indução do Diabetes

Os animais, com 60 dias de idade, em jejum noturno de 12 horas, receberam uma única aplicação de estreptozotocina (Sigma; 45mg/Kg p.c.; i.v.; veia peniana) dissolvida em tampão citrato (0,05M; pH 4,5) e, após aplicação, permaneceram em jejum alimentar por mais quatro horas. Após dois dias, foram selecionados os animais que apresentaram glicemia de jejum igual ou superior a 200mg/dL.

Grupos Experimentais

Foram estabelecidos quatro grupos experimentais, dois de animais normais (NC e NT), e dois de animais diabéticos (DC e DT). Os animais dos grupos NC e DC foram alimentados com ração Nuvilab® contendo 2% de carboximetilcelulose e os animais dos grupos NT e DT receberam a mesma ração contendo 2% de folhas de *Stevia rebaudiana*. Os valores da glicemia de jejum, da glicemia no estado alimentado e do peso corporal, registrados no segundo dia após a indução do diabetes, foram utilizados para a separação dos animais diabéticos em dois grupos homogêneos com relação ao grau de diabetes instalado.

Parâmetros avaliados

Semanalmente, foram registrados: o peso corporal, a ingestão alimentar, a glicemia de jejum e no estado alimentado. A glicemia no estado alimentado foi obtida através de amostras sanguíneas colhidas às 08:00 horas, tendo os animais livre acesso ao alimento durante a noite. Após esse procedimento, os animais ficavam em jejum por um período de 8 horas e novas amostras de sangue eram colhidas às 16:00 horas. As coletas sanguíneas foram realizadas através de punção caudal e os valores de glicemia determinados por meio de um glicosímetro (marca *MediSense Optium*). Após quatro semanas de tratamento, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais para coleta de urina e avaliação da glicosúria.

Ao final do tratamento de quatro semanas, os animais (jejum noturno de 12 horas) foram anestesiados com tiopental sódico (40mg/Kg de p.c., via i.p) e submetidos a laparotomia mediana para coleta de amostras de sangue através da veia cava inferior. O soro e o plasma obtidos foram armazenados a -20°C e utilizados posteriormente para dosagens bioquímicas. Em seguida, os animais foram sacrificados com sobrecarga do mesmo anestésico (120mg/Kg de p.c., via i.v.) para a retirada e pesagem dos depósitos de gordura retroperitoneal e periepídidimal, dos músculos gastrocnêmio e sóleo, do fígado, dos testículos, das vesículas seminais e do baço.

O fígado foi fixado na solução de Bouin por 24 horas, desidratado em uma série crescente de alcoóis (80%, 90%, 100 I, 100 II e 100 III), diafanizado em xilol, incluso em parafina para obtenção de cortes finos com 6µm de espessura. Os cortes foram distendidos em banho-maria, colocados em lâminas, desparafinizados, hidratados, corados com Reativo de Schiff e montados com permount. Foram confeccionadas duas lâminas por animal com dois cortes semi-seriados em cada, alternando-se de seis em seis. Foi utilizado um microscópio óptico Olympus América (32-0045C-721, Q Color 3, RTV- Canadá) e objetiva de 40 vezes. As imagens foram capturadas por meio do programa Q Capture pro e analisadas através de um programa de análise de imagem (Image Pro Plus, version 4.5, Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Para a quantificação do glicogênio foram selecionadas 20 imagens de cada animal e, de cada imagem, foram analisadas 10 células. Para cada célula hepática foi mensurada sua área total (µm) e a área contendo glicogênio, de modo que os resultados foram expressos como porcentagem de glicogênio celular.

Os valores plasmáticos de glicose, colesterol total, colesterol HDL, triglicerídeos e de frutamina, assim com os valores séricos de AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase) e a glicose na urina foram quantificados através de técnicas analíticas automatizadas, utilizando o espectrofotômetro da marca *Bioplus 2000* e reagentes específicos da marca *Gold Analisa*.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (epm) e submetidos ao teste ANOVA – two way – Bonferroni ou teste T, nível de significância $p < 0,05$ (programa *GraphPad Prism 4.0*).

3. RESULTADOS

A tabela 1 apresenta os resultados das análises físico-químicas da ração Nuvilab contendo 2% de carboximetilcelulose (RCO) e da mesma ração suplementada com 2% de folhas de *Stevia rebaudiana* (RSE). As porcentagens dos constituintes avaliados se enquadram na categoria de ração animal⁽³⁸⁾.

Tabela 1. Análises físico-químicas das rações controle (RCO) e suplementada com folhas de *Stevia rebaudiana* (RSE).

	RCO*	RSE**
Extrato Etéreo	5,46 ± 0,01	5,43 ± 0,01
Fibra Bruta	17,33 ± 0,01	23,24 ± 0,01#
Proteína Bruta	24,25 ± 0,01	21,97 ± 0,02
Umidade Total	10,46 ± 0,01	10,44 ± 0,01
Acidez Total	1,98 ± 0,02	1,99 ± 0,02
Cinzas(R.M.F.)	6,48 ± 0,01	6,59 ± 0,03

Dados representam média \pm epm de três experimentos independentes e são expressos em porcentagens. *Ração para roedores da marca Nuvilab® contendo 2% de carboximetilcelulose. ** Ração para roedores da marca Nuvilab® contendo 2% de folhas de *Stevia rebaudiana*. # $p < 0,05$ Teste T.

A figura 1 mostra o efeito da dieta suplementada com folhas de *Stevia rebaudiana* no ganho de peso corporal de ratos normais e diabéticos, no intervalo de quatro semanas. Conforme esperado neste modelo experimental, os animais diabéticos

perderam peso, mas nenhum efeito significativo foi constatado com relação à suplementação da dieta.

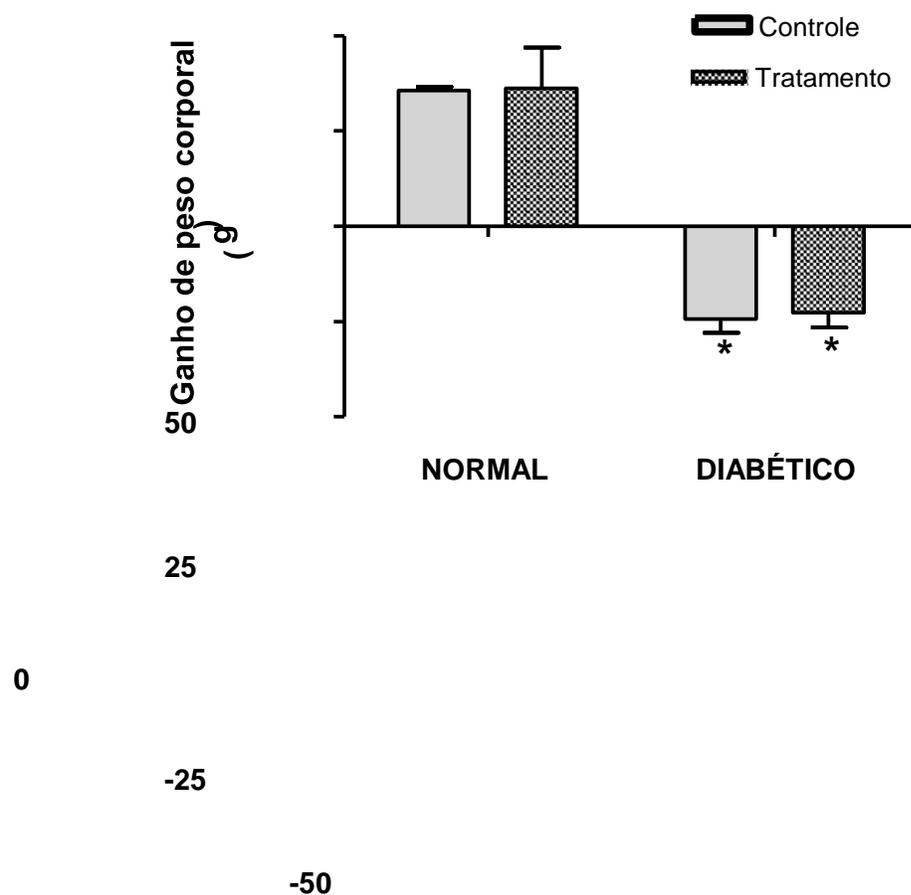


Figura 1. Efeito da dieta suplementada com folhas de *Stevia rebaudiana* no ganho de peso corporal (g) de ratos normais e diabéticos no período de quatro semanas. * $p < 0,05$ - two-way ANOVA -

Bonferroni. Dados representam média \pm epm (n = 5 para grupos de ratos normais e n = 12 - 15 para grupos de ratos diabéticos)

A ingestão alimentar (g/dia), registrada semanalmente, está demonstrada na Figura 2. Observa-se que os animais diabéticos apresentaram hiperfagia em relação aos

animais normais em todas as avaliações realizadas. A suplementação com folhas de *Stevia rebaudiana* não alterou significativamente a quantidade de ração ingerida, exceto na primeira de semana de tratamento, onde a ingestão alimentar de animais normais tratados foi significativamente maior que os animais normais controle.

Na figura 3 estão os resultados da glicemia de jejum e no estado alimentado. A hiperglicemia foi constatada nos dois grupos de animais diabéticos, isto tanto quando os animais estavam em jejum diurno de 8 horas, como quando no estado alimentado. A dieta suplementada com folhas de *Stevia rebaudiana* só modificou significativamente a glicemia de jejum de ratos diabéticos avaliados na segunda semana de tratamento, causando redução de cerca de 30%.

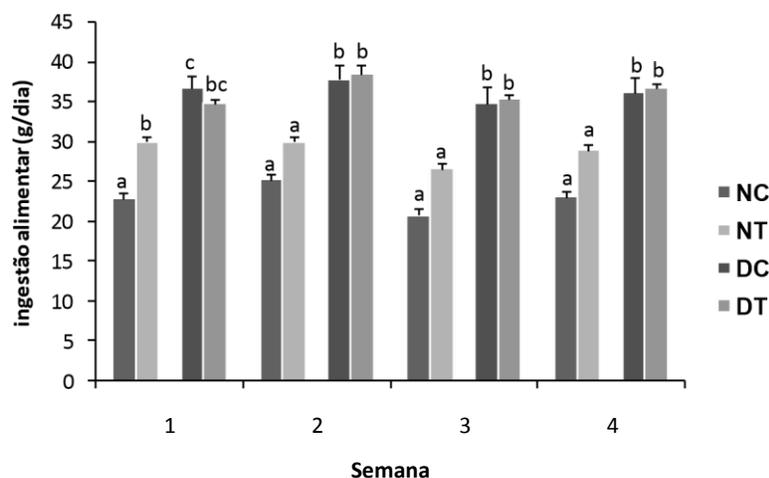


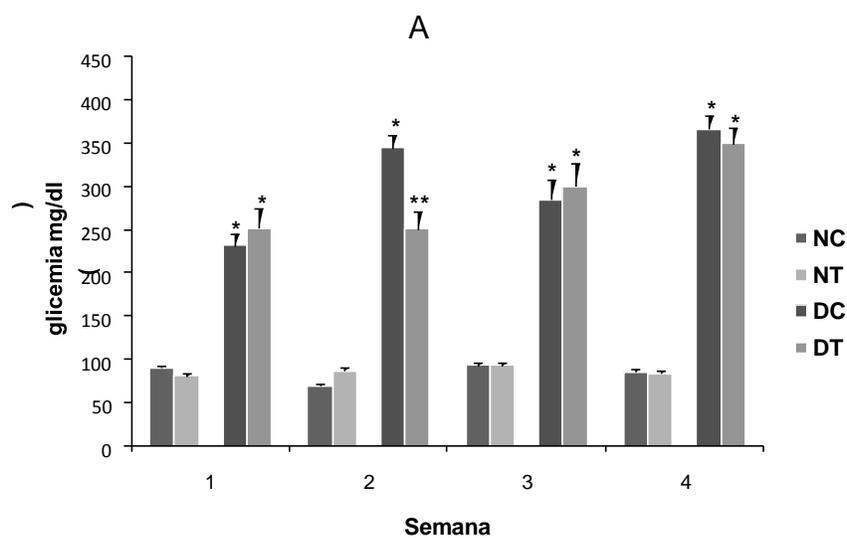
Figura 2. Efeito da dieta suplementada com folhas da *Stevia rebaudiana* na ingestão alimentar (g/dia) de ratos normais e diabéticos durante o período de quatro semanas.

Barras com mesma letra não diferem significativamente - $p > 0,05$ - two-way ANOVA -

Bonferroni. Dados representam média \pm epm. NC = normais controle; NT = normais tratados; DC = diabéticos controle; DT = diabéticos tratados (n = 5 para grupos normais

e n = 13 - 15 para grupos diabéticos).

Os resultados da glicemia, registrados as 18:00 horas (jejum diurno de 12 horas), as 22:00 horas e as 06:00 horas da manhã (estado alimentado) são mostrados na Figura 4. Ratos diabéticos estavam hiperglicêmicos nos três horários, quando comparados com ratos normais. A dieta suplementada com *Stevia rebaudiana* não causou efeito significativo em nenhuma das glicemias avaliadas.



B

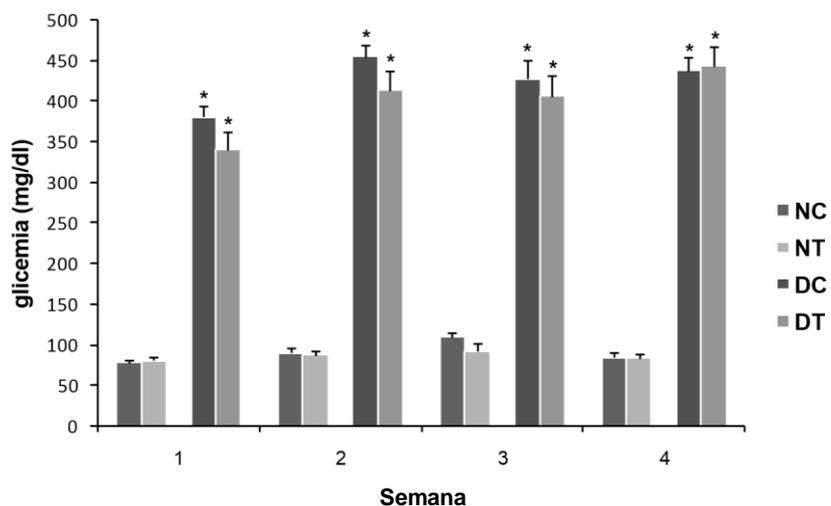
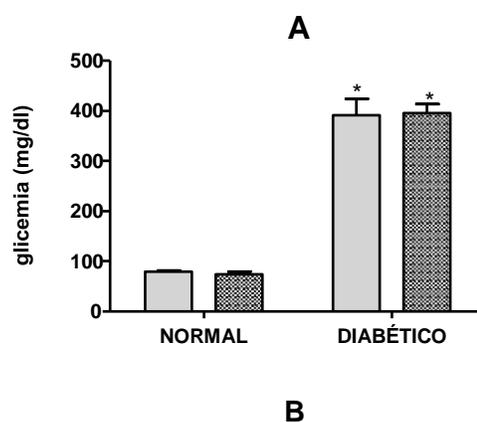


Figura 3. Efeito de dieta suplementada com folhas de *Stevia rebaudiana* na

glicemia de jejum (A) e no estado alimentado (B) de ratos normais e diabéticos durante o período de quatro semanas. * $p < 0,05$ – comparação entre ratos normais e diabéticos; ** $p < 0,05$ comparação entre DC e DT. - teste two-way ANOVA - Bonferroni. Dados representam média \pm epm. NC = normais controle; NT = normais tratados; DC = diabéticos controle; DT =

diabéticos tratados (n = 5 para grupos normais e n = 13 - 15 para grupos diabéticos).



B

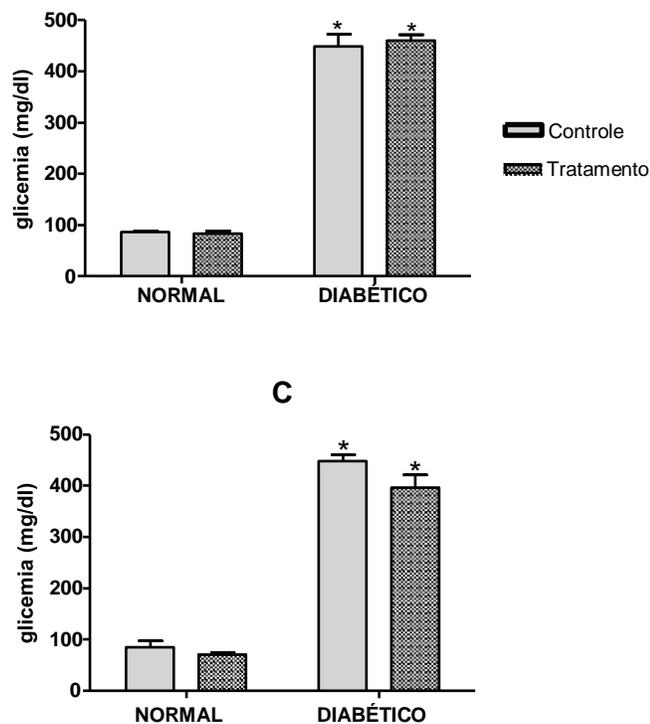


Figura 4. Efeito da dieta suplementada com folhas de *Stevia rebaudiana* na glicemia de 12 horas de ratos normais e diabéticos. A -18:00 hs; B - 22 :00 hs; C - 06:00 hs. * $p < 0,05$ - two-way ANOVA - Bonferroni. Dados representam média \pm epm (n = 5 para grupos de ratos normais e n = 12 - 15 para grupos de ratos diabéticos).

Diversos parâmetros bioquímicos, importantes para a avaliação do quadro metabólico diabético, foram registrados ao final do tratamento (animais em jejum noturno de 12 horas) e são mostrados na tabela 2. Os grupos de animais diabéticos apresentaram valores de glicemia, frutossamina, triglicerídeos, AST e ALT significativamente elevados quando comparados com ratos normais, além da presença de glicose na urina (glicosúria). A suplementação da dieta com folhas de *Stevia rebaudiana* não causou nenhum efeito significativo em ratos normais, mas em ratos diabéticos foi efetiva em reduzir a glicemia e, também, a concentração de triglicerídeos e de colesterol no sangue.

Tabela 2. Efeito da dieta suplementada com folhas de *Stevia rebaudiana* em parâmetros bioquímicos de ratos normais e diabéticos em jejum noturno de 12 horas.

Parâmetros	NC	NT	DC	DT
Glicemia (mg/dl)	105,00±10,26a*	132,00±7,45a	473,45±41,90b	354,37±30,56c
Frutosamina (mmol/l)	0,64±0,02a	0,64±0,05a	1,35±0,09b	1,34±0,06b
Triglicerídeos (mg/dl)	63,60±10,85a	66,20±9,19a	149,14±20,33b	83,00±7,53c
Colesterol total(mg/dl)	67,40±9,22a	57,60±5,82ac	69,6±4,06ab	54,86±2,72c
Colesterol HDL(mg/dl)	34,80±7,74ab	21,60±6,59a	39,41±2,76ab	42,63±3,69b
AST (U/ml)	122,40±15,62a	162,30±2,86a	171,97±15,65b	211,25±15,46b
ALT (U/ml)	54,00±4,79a	43,60±3,41a	229,45±25,14b	274,09±13,93b
Glicosúria (mg/dl)	NA	NA	453,16±37,11a	521,63±30,31a

*Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente ($p > 0,05$; two-way ANOVA - Bonferroni). Dados representam média \pm epm. NC = normais controle; NT = normais tratados; DC = diabéticos controle; DT = diabéticos tratados (n = 5 para grupos normais; n = 11 - 16 para grupos diabéticos). NA = não avaliado.

A tabela 3 apresenta o peso de diversos órgãos e tecidos e a quantidade de glicogênio hepático. Nos animais diabéticos os depósitos de gordura retroperitoneal e periepídimal estavam significativamente reduzidos, assim como o peso das vesículas seminais, do músculo gastrocnêmio e do baço. Com relação ao efeito da suplementação da ração com folhas de *Stevia rebaudiana*, nenhuma diferença estatística foi verificada entre os animais normais. Nos animais diabéticos a suplementação reduziu os depósitos de gordura retroperitoneal e aumentou o glicogênio hepático.

Tabela 3. Efeito da dieta suplementada com folhas de *Stevia rebaudiana* no peso (g) de órgãos e tecidos e na quantidade de glicogênio hepático (%) de ratos normais e diabéticos.

	NC	NT	DC	DT
G. retro	2,46±0,29a	3,66±0,49a	0,29±0,22b	0,03±0,02c
G. peri	2,43±0,09a	2,72±0,45a	0,89±0,20b	0,49±0,08b
M. gastro	1,42±0,18a	1,70±0,03a	1,12±0,06b	0,95±0,06b
M. sóleo	0,130±0,010a	0,139±0,004a	0,111±0,005a	0,100±0,003a
V. seminal	1,26±0,14a	1,31±0,07a	0,53±0,07b	0,31±0,04b
Testículos	2,69±0,10a	2,83±0,13a	2,62±0,14a	2,27±0,16a
Baço	0,81±0,04a	0,73±0,03a	0,50±0,03b	0,42±0,03b
Fígado	9,62±0,38a	9,82±0,34a	10,94±0,37a	9,58±0,33a
Rins	2,15±0,14a	2,27±0,10a	2,54±0,07a	2,32±0,06a
G. hepático	NA	NA	13,41±0,34	17,25±0,95#

*Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente ($p > 0,05$; two-way ANOVA - Bonferroni). # difere significativamente de DC ($p < 0,05$, teste T) Dados representam média \pm epm. NC = normais controle; NT = normais tratados; DC = diabéticos controle; DT = diabéticos tratados (n = 5 para grupos normais; n = 11 - 16 para grupos diabéticos). I. Lee = índice de Lee; G.retro = gordura retroperitoneal; G. peri = gordura periepididimal; M. gastro = músculo gastrocnêmio; M. sóleo = músculo sóleo; V. seminal = vesícula seminal; G. hepático = porcentagem de glicogênio celular. NA = não avaliado.

4. DISCUSSÃO

Neste trabalho foram avaliados os efeitos da ração suplementada com folhas de *Stevia rebaudiana* em parâmetros metabólicos de ratos com diabetes induzido por estreptozotocina.

A estreptozotocina (2-deoxy-2-(3-(methyl-3-nitrosoureido)-D-glucopyranose), sintetizada pela *Streptomyces achromogenes*, é uma das principais drogas utilizadas para o estabelecimento do diabetes em animais experimentais ^(46,47). Esta droga, após ser administrada ao animal, entra nas células β pancreáticas através do transportador de glicose do tipo 2 (GLUT2), causa alquilação do DNA, induzindo a morte celular e desencadeando alterações metabólicas semelhantes ao verificado no paciente portador de diabetes mellitus tipo 1 ^(48,49).

Os resultados demonstraram que os ratos diabéticos estavam hiperglicêmicos e perderam peso corporal quando comparados com ratos normais. Também apresentaram hiperfagia, glicosúria, aumento nos níveis plasmáticos de frutossamina e de triglicerídeos e nos níveis séricos de AST e ALT. A avaliação dos tecidos e órgãos mostraram perda acentuada de massa adiposa, redução de massa muscular e no peso das vesículas seminais e do baço nos animais diabéticos. Tais resultados caracterizam bem o estabelecimento do modelo de diabetes experimental induzido por esta droga.

A dieta suplementada com folhas de Stevia não alterou o ganho de peso corporal nos ratos normais e nem a perda de peso nos animais diabéticos. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas na ingestão alimentar de animais controle e tratados, tanto normais como diabéticos, havendo, no entanto, uma tendência dos animais normais ingerirem mais ração suplementada do que a ração controle, fato importante que mostra que os ratos não demonstrarem aversão pela ração contendo stevia.

Os registros semanais mostraram que os animais normais apresentaram glicemia de jejum diurno de oito horas inferior a 100 mg/dL, enquanto que nos diabéticos tal parâmetro variou de 240 a 350 mg/dL. Na segunda semana de tratamento, os animais diabéticos que receberam a dieta suplementada apresentaram redução significativa (30% menor). Nas demais semanas, a suplementação da dieta não causou efeitos significativos, tanto nos ratos normais quanto nos diabéticos. A glicemia no estado alimentado, mensurada as 8 horas da manhã (alimentação noturna *ad libitum*), também registrada semanalmente, não ultrapassou 110 mg/dL nos animais normais, enquanto

que nos diabéticos os valores obtidos ficaram entre 340-450mg/dL. Apesar dos animais diabéticos tratados apresentarem valores médios menores nas três primeiras semanas, nenhum dos resultados diferiu significativamente do grupo de diabéticos controle.

Na quarta semana de tratamento, conforme descrito anteriormente, foram colhidas amostras de sangue em três horários seguidos: as 18 horas (jejum diurno de 8 horas); as 20 horas (alimentação *ad libitum*) e as 06 horas (alimentação *ad libitum*). Os ratos diabéticos estavam hiperglicêmicos nos três horários avaliados, mas nenhum efeito da dieta suplementada foi verificado. Ratos normais permaneceram normoglicêmicos sem diferenças entre os grupos tratado e controle.

Ao final do tratamento, os parâmetros plasmáticos registrados com o animal em jejum noturno de 12 horas mostraram que os animais diabéticos que receberam a dieta suplementada com folhas de *Stevia* apresentaram redução significativa na glicemia, na concentração de triglicerídeos e de colesterol total. A quantidade de glicogênio hepático foi significativamente maior nos animais diabéticos tratados quando comparado com seu controle.

Diversos estudos foram realizados nas últimas décadas, investigando propriedade funcionais da *Stevia rebaudiana*, tanto de extratos das folhas, como de compostos isolados, especialmente os glicosídeos esteviosídeo e rebaudiosídeo A. Este, no entanto, é o primeiro trabalho que se tem conhecimento que investiga os efeitos crônicos da suplementação da ração com folhas de *Stevia rebaudiana* no controle metabólico de ratos diabéticos estreptozotocina. Shivanna et al ⁽¹⁷⁾ também utilizaram ração suplementada com folhas de stevia (4%), mas o protocolo utilizado e os objetivos diferem. Estes autores avaliaram os efeitos de um pré-tratamento de um mês, após este período os ratos foram diabetizados com estreptozotocina e sacrificados. Estes autores observaram efeitos hipoglicêmicos e protetores no fígado e nos rins.

Considerando a importância do controle glicêmico na redução das complicações crônicas do diabetes, os efeitos da dieta suplementada com folhas de stevia foram investigados em três protocolos diferentes, mas efeitos significativos só apareceram na glicemia de jejum noturno de 12 horas, realizada ao final de 30 dias de tratamento. A

quantidade de glucose no sangue depende de três eventos principais: da absorção intestinal, da glicogenólise e da gliconeogênese. O fato de não se ter observado efeitos significativos na glicemia de jejum diurno de 8 horas e nem no estado alimentado, assim como na curva glicêmica, sugere que a dieta suplementada com 10% de folhas de Stevia não tenha causado efeitos em nenhum destes eventos que interferisse significativamente no controle glicêmico. No entanto, quando os animais foram deixados em jejum noturno de 12 horas aparecem efeitos benéficos no controle glicêmico, com redução no quadro hiperglicêmico e maior quantidade de glicogênio hepático. Ferreira et al ⁽⁵⁰⁾ observaram inibição na gliconeogênese hepática de ratos tratados com o extrato de stevia. Chen et al ⁽⁵¹⁾ constataram que o esteviosídeo causava redução na expressão do gene da PEPCK (fosfoenolpiruvato carboxiquinase), enzima chave da gliconeogênese, no fígado de ratos diabéticos tratados com esteviosídeo. Portanto, há dados que sugerem que um dos possíveis mecanismos envolvidos na ação antidiabética da stevia seja sua ação em inibir a gliconeogênese. A participação da gliconeogênese na manutenção de glicemia torna-se mais importante com o aumento no tempo de jejum, o que poderia explicar que uma redução na hiperglicemia também pode ter resultado da estimulação da síntese de glicogênio e, neste trabalho, animais diabéticos alimentados com ração contendo folhas de stevia apresentaram maior quantidade de glicogênio hepático quando comparado com seu controle. Tais resultados estão em conformidade com os obtidos por Hubler et al ⁽⁵²⁾ que registraram que produtos da stevia (glicosídeo esteviosídeo) tem ação estimulante na síntese de glicogênio sob condições gliconeogênicas, como ocorre no jejum prolongado. Tais resultados sugerem que a visualização dos efeitos hipoglicemiantes da *Stevia rebaudiana* podem depender do estado metabólico em que o animal se encontra.

5. CONCLUSÃO

A ração suplementada com 2% de folhas de *Stevia rebaudiana* melhorou o controle glicêmico (redução na glicemia de jejum noturno e aumento no glicogênio hepático) e o controle lipídico (redução na concentração sanguínea de triglicerídeos e de

colesterol total) nos ratos diabéticos, sem causar efeitos na ingestão alimentar e no ganho de peso corporal.

REFERÊNCIAS

1. 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**. May;27(5):104753, 2004.
2. GUILBERT JJ. The world health report 2002 - reducing risks, promoting healthy life. **Educ Health** (Abingdon). Jul;16(2):230, 2003.
3. CUSHMAN, S. W.; WARDZALA, L. J. Potencial mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. **Journal of biological chemistry**, 255(10): 4758-4762, 1980.
4. SIMPSON, I. A.; CUSHMAN, S. W. Hormonal regulation of mammalian glucose transport. **Ann. Rev. Biochem.**, 55:1059-1089, 1986.
5. SALTIEL, A. R.; KAHN, R. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, 414 : 799-806, 2001.
6. FONTES, C.F. DIABETES. IN: DA POIAN, A.T.; CARVALHO-ALVES, P.C. **Hormônios e Metabolismo – Integração e Correlações Clínicas**. Editora Atheneu – São Paulo, p 215-267. 2002.
7. DICKINSON, P.J.; CARRINGTON, A.L.; FROST, G.S.; BOULTON, A.J.M.
Neurovascular disease, antioxidants and glycation in diabetes. **Diabetes Metab Res Rev** 18: 260-271, 2002

8. MONTENEGRO JUNIOR, R.M.; SILVEIRA, M.M.C.; NOBRE, I.P.; SILVA, C.A.B. A assistência multidisciplinar e o manejo efetivo do diabetes mellitus: desafios atuais. **RBPS** 17(4): 200-205, 2004.
9. BAYNES, J. W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. **Diabetes**, v. 40, p. 405–411, 1991.
10. LOTTENTBERG, A.M.P. Características da dieta nas diferentes fases da evolução do diabetes melito tipo 1. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 52 (2): 250-259, 2008.
11. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2013-2014/Sociedade Brasileira de Diabetes** ; [organização José Egidio Paulo de Oliveira,Sérgio Vencio]. – São Paulo: AC Farmacêutica, 2014. 382p.
12. CORRÊA, M. P. **Caá-êhe. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. 1ª edição, Ministério da Agricultura , Rio de Janeiro, vol.1, p.348, 1926.
13. GEUNS, J. M. C. Stevioside. *Phytochemistry*, 64: 913-921, 2003.
14. SAKAGUCHI, M. & KAN, T. As pesquisas japonesas com *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni e o esteviosídeo. **Ciência e Cultura**, 34 (2): 235-248, 1982.
15. TERAJ, T.; REN, H.; MORI, G.; YAMAGUCHI, Y.; HAYASHI, T. Mutagenicity of steviol and its oxidativa derivatives in *Salmonella typhimurim* TM677. **Chem. Pharm. Bull.**, 50 (7): 1007-1010, 2002.
16. GOTO, A. & CLEMENTE, E. Influência do rebaudiosídeo-A na solubilidade e no sabor do esteviosídeo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 18(1), Campinas, 1998.
17. SHIVANNA, N.; NAIKA, M.; KHANUM, F. KAUL, V. Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of *Stevia rebaudiana*. **Journal of Diabetes and its Complications**, 27: 103-113, 2013.
18. CARAKOSTAS MC, CURRY LL, BOILEAU AC, BRUSICK DJ. Overview: The history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages. **Food Chem Toxicol**. 2008 May 16. [Epub ahead of print]
19. MAKI KC, CURRY LL, REEVES MS, TOTH PD, MCKENNEY JM, FARMER MV, SCHWARTZ SL, LUBIN BC, BOILEAU AC, DICKLIN MR, CARAKOSTAS MC, TARKA SM. Chronic consumption of rebaudioside A, a steviol glycoside, in men and women with type 2 diabetes mellitus. **Food Chem Toxicol**. 2008 May 16. [Epub ahead of print]

20. PRAKASH I, DUBOIS GE, CLOS JF, WILKENS KL, FOSDICK LE. Development of rebiana, a natural, non-caloric sweetener. **Food Chem Toxicol**. 2008 May 16. [Epub ahead of print]
21. RENWICK AG, TARKA SM. Microbial hydrolysis of steviol glycosides. **Food Chem Toxicol**. 2008 May 16. [Epub ahead of print]
22. MIGUEL, O. Um nuevo hipoglicemiante oral. **Revista Médica del Paraguay**, 7 : 200202, 1966.
23. MIGUEL, O. Studios sobre el steviosideo. **Tribuna Universitária**, 18 : 34 –35, 1953.
24. OVIEDO, C. A.; FRONCIANI, G.; MORENO, R.; MAAS, L. C. Action hipoglicemiante de la *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Excepta Médica*. **The international Medical Abstracting Service. Seventh Congress of the International Diabetes Federation**, p. 93, 1971.
25. SCHMELING, G. A. V.; CARVALHO, F. V.; ESPINOSA, A. D. *Stevia rebaudiana* Bertoni. Avaliação do efeito hipoglicemiante em coelhos aloxanizados. **Ciência e Cultura**, 29 (5): 599 – 601, 1977
26. SUZUKI, H.; KASAI, T.; SUMIHARA, M. SUGISAWA, H. Influence of oral administration of stevioside on levels of blood glucose and liver glycogen of intact rats. **Nippon Nogei Kagaku Kaishi**, 51(3): 171-173, 1977.
27. CURI, R., ALVAREZ, M., BAZOTTE, R.B., BOTION, L.M., GODOY, J.L., BRACHT, A. Effect of *Stevia rebaudiana* on glucose tolerance in normal adult humans. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 19: 771-774, 1986.
28. BOECKH HAEBISCH, E. M. A. Pharmacological trial of a concentrated crude extract of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni in healthy volunteers. **Arq. Biol. Technol**, 35 (2): 299314, 1992.
29. MALAISSE, W. J.; VANONDERBERGEN, A.; LOUCHAMI, K.; JIJAKLI, H.; MALAISSELAGE, F. Effects of artificial sweeteners on insulin release and cationic fluxes in rat pancreatic islets. **Cell Signal**, 10(10): 727-733, 1998.
30. JEPPENSEN, P. B., GREGERSEN, S.; POULSEN, C. R.; HERMANSEN, K. Stevioside acts directly on pancreatic β cells to secret insulin: actions independent of cyclic adenosine monophosphate and adenosine triphosphate-sensitiv K^+ -channel activity. **Metabolism**, 49 (2): 208-214, 2000.
31. COSTA, C.E.M.; COSTA; S.C.; ROCHA, M.; PERES, S.; DACOME, S.; PICINATO, C.; CARPINELLI, A.; LIMA, F.B. Rebaudioside A, glycoside of the *Stevia rebaudiana*,

- stimulates insulin secretion in rat isolated pancreatic islets. **Diabetes**, 52 (supp 1): A370, 2003b
32. ABUDULA R, JEPPESEN PB, ROLFSEN SED, XIAO J, HERMANSEN K:
Rebaudioside A potently stimulates insulin secretion from isolated mouse islets:
Studies on the dose-glucose and calcium-dependency. **Metabolism**, 53(10):1378-1381, 2004.
33. JEPPESEN, P. B.; GREGERSEN, S.; ROLFSEN, S. E.; JEPSEN, M. COLOMBO, M.;
AGGER, A.; XIAO, J.; KRUIHOFFER, M.; ORNTOFT, T.; HERMANSEN, K.
Antihyperglycemic and blood pressure-reducing effects of stevioside in the diabetic GotoKakizaki rat. **Metabolism**, 52 (3): 372-378, 2003.
34. JEPPESEN, P.B.; GREGERSEN, S.; ALSTRUP, K. K.; HERMANSEN, K. Stevioside induces antihyperglycaemic, insulinotropic and glucanostatic effects in vivo: studies in the diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. **Phytomedicine**, 9: 9-14, 2002
35. RASKOVIC, A; GAVRILOVIC, M.; JAKOVLJEVIC, V.; SABO, J. Glucose concentration in the blood of intact and alloxan-treated mice after pretreatment with commercial preparations of *Stevia rebaudiana* (Bertoni). **Eur J Drug Metab Pharmacokinet**, 29(2): 87-90, 2004.
36. GREGERSEN, S.; JEPPESEN, P. B.; HOLST, J. J.;
HERMANSEN, K.
Antihyperglycemic effects of stevioside in type 2 diabetic subjects. **Metabolism**, 53(1): 73-76, 2004.
37. DACOME, S. A. **Isolamento, caracterização cromatográfica e espectroscópica de glicosídeos diterpênicos foliares de uma nova cultivar de *Stevia rebaudiana* (Bert) Bertoni**. Tese de mestrado. Departamento de Química. Universidade Estadual de Maringá, 2003.
38. LOPES, D. C. **Caracterização dos polissacarídeos e determinação dos compostos não glicosídeos constituintes da *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni – amostras uem-320 e selvagem**. Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia Química da UEM. 2007.
39. BUNHAK, E.J.; MENDES, E. S.; PEREIRA, N. C.; COSTA, S. C. **aplicação de polieletrólitos sintéticos na clarificação do extrato aquoso de estévia**. *Acta Scientiarum*, 24(6):1643-1648, 2002.

40. ANANI, E. **Cultura de tecido de *Stevia rebaudiana* (Bert) Bertoni com elevada proporção de rebaudiosídeo A / esteviosídeo**. Tese de mestrado. Departamento de Agronomia. Universidade Estadual de Maringá, 2001.
41. PAULA, S. L. **Clarificação do Extrato Aquoso de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni utilizando Polímeros Naturais**. Dissertação de Mestrado. Departamento de Engenharia Química. 2006.
42. FERNANDES, L. M. **Processos de clarificação de edulcorantes de stevia – estudo de caso projeto *Stevia/UEM***. Tese de doutorado. Departamento de Engenharia Química. Universidade Estadual de Maringá, 2004.
43. BUNHAK, E.J.; MENDES, E. S.; PEREIRA, N. C.; COSTA, S. C. Avaliação do efeito do polieletrólito aniônico na clarificação do extrato aquoso de *Stevia rebaudiana*. **Cienc. Technol. Aliment.** 24(4): 587-590, 2004.
44. DACOME, S. A.; SILVA, C.C; COSTA, C.E.M.; FONTANA, J.D.; ADELMANN, J.; COSTA, S.C. Sweet diterpenic glycosides balance of a new cultivar of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: Isolation and quantitative distribution by chromatographic, spectroscopic and electrophoretic methods. **Process Biochemistry** ,40 3587-3594 , 2005.
45. FERNANDES, L. M.; PEREIRA, N.C.; MENDES, E.S.; MOTTA LIMA, O.C. COSTA, S. C. Clarificação do extrato aquoso de *Stevia rebaudiana* (Bert) Bertoni utilizando cacto *Cereus piruvianus*. **Acta Scientiarum**, 23: 1369-1397, 2001.
46. REUSSER, F. Mode of Action of Streptozotocin. **Journal of Bacteriology**, v. 105, n. 2, p. 580-588, 1971.
47. SZKUDELSKI, T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. **Physiological Research**, v. 50, p. 536-546, 2001.
48. DELANEY, C. A.; DUNGER, A.; Di MATTEO, M.; CUNNINGHAM, J. M.; GREEN, M. H.; GREEN, I. C. Comparison of inhibition of glucose-stimulated insulin secretion in rat islets of Langerhans by streptozotocin and methyl and ethyl nitrosoureas and methanesulphonates. Lack of correlation with nitric oxide-releasing or O6-alkylating ability. **Biochemical Pharmacology**, v. 50, n 12, p. 2015-2020, 1995.
49. ELSNER, M.; GULDBAKKE. B.; TIEDGE, M.; MUNDAY, R.; LENZEN, S. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. **Diabetologia**, v. 43, p. 1528-1533, 2000.
50. FERREIRA, E.B; NEVES, F.A.R.; COSTA, M.A.D.; ALVES-DO-PRADO, W.; FERRI, L.A.F.; BAZZOTE, R.B. Comparative effects of *Stevia rebaudiana* leaves and stevioside on glycaemia and hepatic gluconeogenesis. **Plant Med** , 72 (8): 691-696, 2006.

51. CHEN, T.H.; CHEN, S.C.; CHAN, P.; CHU, Y.L.; YANG, HY; CHENG, J.T. Mechanism of the hypoglycemic effect of stevioside, a glycoside of *Stevia rebaudiana*. **Planta Med.**, 7(2):108-113, 2005.
52. HUBLER, M.O.; BRACHT, A.; KELMER-BRACHT, A.M. Influence of stevioside on hepatic glycogen levels in fasted rats. **Res. Commun Chem Pathol Pharmacol.** 84(1):111-118, 1994.