



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

BRUNA KEMPFER BASSOLI

**BIOENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES
FISIOLOGICAMENTE FUNCIONAIS DO ÁCIDO
CLOROGÊNICO E DO EXTRATO DE CAFÉ SOLÚVEL COM
ALTOS TEORES DE ÁCIDOS CLOROGÊNICOS.**

Londrina
2006

BRUNA KEMPFER BASSOLI

**BIOENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES
FISIOLOGICAMENTE FUNCIONAIS DO ÁCIDO
CLOROGÊNICO E DO EXTRATO DE CAFÉ SOLÚVEL COM
ALTOS TEORES DE ÁCIDOS CLOROGÊNICOS.**

Dissertação submetida ao Mestrado em
Ciência de Alimentos da Universidade
Estadual de Londrina como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Rui Sérgio dos Santos
Ferreira da Silva

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Helenir Medri de
Souza

Londrina
2006

BRUNA KEMPFER BASSOLI

**BIOENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES
FISIOLOGICAMENTE FUNCIONAIS DO ÁCIDO
CLOGÊNICO E DO EXTRATO DE CAFÉ SOLÚVEL COM
ALTOS TEORES DE ÁCIDOS CLOGÊNICOS.**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rui Sérgio dos Santos Ferreira da
Silva
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Cássia Thaís Bussamra Vieira Zaia
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Roberto Barbosa Bazotte
Universidade Estadual de Maringá

Londrina, 22 de março de 2006.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e à minha irmã, por estarem sempre ao meu lado.

Aos meus companheiros queridos Alan e Pequerrucho.

Às minhas eternas amigas Helenir e Gláucia.

Com carinho dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu professor orientador Dr. Rui Sérgio dos Santos Ferreira da Silva, por me auxiliar a fazer um trabalho multidisciplinar na área de alimentos funcionais, por ensinar a aplicar uma estatística refinada aos meus resultados, pela paciência, pelas críticas construtivas, por nossas conversas e pela lição de vida.

À minha querida professora co-orientadora Dr^a. Helenir Medri de Souza, pela amizade, por todo o tempo dedicado, por ensinar, por corrigir e por todos os momentos bons que compartilhamos nesses anos.

À professora e amiga Dr^a. Gláucia Regina Borba-Murad, por ser companheira para todas as horas, por estar sempre sorrindo e pronta para ensinar.

Aos companheiros de laboratório Priscila e Cadú, pela amizade, dedicação e participação no desenvolvimento dos protocolos experimentais deste trabalho.

Ao Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos pela oportunidade de realizar este trabalho multidisciplinar e aprofundar meus conhecimentos no Mestrado.

Ao Departamento de Ciências Fisiológicas pelo espaço, materiais e toda a colaboração que foi necessária para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina pelo fornecimento dos animais para a realização deste trabalho.

À Professora Dr^a. Cássia Thaís B. V. Zaia, por sua colaboração para este trabalho, através do auxílio nos protocolos *in vivo* e nas dosagens de colesterol e triacilgliceróis plasmáticos.

Ao Celso Antônio de Castilho pela disponibilidade e apoio técnico na execução de etapas dos protocolos *in vivo*.

Ao Laboratório de Metabolismo Hepático da Universidade Estadual de Maringá, particularmente à Prof^a. Dr^a. Jorgete Constantin, pela parceria e realização dos estudos de avaliação da atividade da glicose-6-fosfatase.

À Companhia Iguaçu de Café Solúvel e ao CNPq, pelo interesse e auxílio nesta pesquisa em busca da comprovação da funcionalidade de um composto do café.

Meu eterno reconhecimento.

Muito obrigada por tudo.

BASSOLI, Bruna Kemper. **Bioensaios para avaliação de propriedades fisiologicamente funcionais do ácido clorogênico e do extrato de café solúvel com altos teores de ácidos clorogênicos**. 2006. 98f. Dissertação submetida ao Mestrado em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

RESUMO

O ácido clorogênico é um composto fenólico natural e o café é sua principal fonte na dieta humana. Estudos *in vitro* demonstram que o ácido clorogênico e seus derivados sintéticos são inibidores da glicose-6-fosfatase, enzima que catalisa a reação final da glicogenólise e neoglicogênese, as duas principais vias metabólicas hepáticas liberadoras de glicose. Também foi demonstrado que os derivados sintéticos do ácido clorogênico são efetivos na inibição da liberação hepática de glicose e redução da glicemia. Entretanto, não há dados disponíveis na literatura sobre o efeito do composto natural ácido clorogênico na produção hepática de glicose e seus efeitos sobre a glicemia, metabolismo lipídico e absorção intestinal de glicose não são conclusivos. O presente trabalho objetivou estudar o efeito do ácido clorogênico e/ou do extrato de café solúvel com altos teores de ácidos clorogênicos (37,8%) sobre a atividade da glicose-6-fosfatase, liberação hepática de glicose, glicemia, concentração plasmática de colesterol total e triacilgliceróis e sobre o teste de tolerância à glicose oral. A captação hepática do ácido clorogênico e seus efeitos sobre o catabolismo hepático da L-alanina e glicólise também foram avaliados. Nos experimentos foram utilizados ratos machos Wistar, alimentados ou submetidos a 24 horas de privação alimentar, dependendo do parâmetro metabólico a ser investigado. A atividade da glicose-6-fosfatase foi avaliada em microsomos intactos de fígado de rato. Os estudos dos parâmetros metabólicos hepáticos (liberação de glicose proveniente da neoglicogênese e glicogenólise, taxas de glicogenólise e glicólise, catabolismo da L-alanina e captação hepática do ácido clorogênico) foram realizados em perfusão de fígado *in situ*. Para análise dos efeitos do ácido clorogênico sobre a glicemia, colesterol total e triacilgliceróis plasmáticos, o extrato de café solúvel ou o ácido clorogênico foram administrados por via endovenosa (injeção única) ou oral (administração por 15 dias) e amostras de sangue foram coletadas para as determinações bioquímicas. O efeito da administração oral do ácido clorogênico sobre o teste de tolerância à glicose oral foi analisado através de amostras de sangue coletadas em diferentes tempos para as dosagens de glicose. Foram testadas a distribuição e homogeneidade das variâncias referentes aos dados obtidos e testes estatísticos adequados foram empregados para análise dos resultados. Apesar de o ácido clorogênico e o extrato de café solúvel terem inibido a atividade da glicose-6-fosfatase na fração microsomal de hepatócitos, foi observada ausência de efeito das doses testadas de ácido clorogênico na perfusão de fígado sobre as produções hepáticas de glicose oriundas da glicogenólise e neoglicogênese, sobre as taxas de glicogenólise e glicólise, e sobre o catabolismo da L-alanina. Uma vez que houve indícios de ausência de captação hepática do ácido clorogênico, é possível que este composto não tenha atingido níveis intracelulares compatíveis com a inibição da enzima-alvo. A administração endovenosa ou oral do ácido clorogênico e do extrato de café solúvel, também não implicou em redução da glicemia, colesterol total e triacilgliceróis

plasmáticos. O ácido clorogênico, no entanto, promoveu redução do pico glicêmico durante o teste de tolerância à glicose oral, o que o caracteriza como possível agente redutor do índice glicêmico, provavelmente por atenuar a absorção intestinal de glicose, e o torna um composto de interesse no auxílio da redução do risco de desenvolvimento do diabetes tipo 2.

Palavras-chave: Ácido clorogênico. Café solúvel. Glicose-6-fosfatase. Liberação hepática de glicose. Glicemia. Colesterol. Triacilgliceróis. Índice glicêmico.

BASSOLI, Bruna kemper. **Bioassays to evaluate physiological functional properties of chlorogenic acid and of an instant coffee extract with high levels of chlorogenic acids**. 2006. 98f. Dissertação submetida ao Mestrado em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

ABSTRACT

Chlorogenic acid is a natural phenolic compound and coffee is its major source on human diet. *In vitro* studies show that chlorogenic acid and its synthetic derivatives are inhibitors of glucose-6-phosphatase, enzyme that catalyzes the final reaction of glycogenolysis and gluconeogenesis, the two main hepatic metabolic ways of glucose release. It was also demonstrated that synthetic chlorogenic acid derivatives are effective in inhibit hepatic glucose output and reduce blood glucose levels. However, there is no available data on literature about the effects of the natural compound chlorogenic acid on hepatic production of glucose, and, its effects on blood glucose levels, lipidic metabolism and intestinal absorption of glucose are not conclusive. The present work's objective was to study the effect of chlorogenic acid and/or of an instant coffee extract with high levels of chlorogenic acids (37,8%) on glucose-6-phosphatase activity, hepatic glucose output, blood glucose levels, plasmatic total cholesterol and triacylglycerols concentrations and on oral glucose tolerance test. Hepatic uptake of chlorogenic acid and its effects on hepatic catabolism of L-alanine and glycolysis were also evaluated. For the experiments, male Wistar rats, fed or submitted to 24 hours of alimentary privation, depending on the metabolic parameter to be investigated, were used. The glucose-6-phosphatase activity was evaluated in rat liver intact microsomes. The studies of hepatic metabolic parameters (glucose output from gluconeogenesis and glycogenolysis, glycogenolysis and glycolysis rates, L-alanine catabolism and hepatic uptake of chlorogenic acid) were performed in *in situ* liver perfusion. For the analysis of the chlorogenic acid effects on blood glucose levels, plasmatic concentrations of total cholesterol and triacylglycerols, either instant coffee extract or chlorogenic acid were administrated intravenously (unique injection) or orally (administration for 15 days) and blood samples were collected for biochemical determinations. The effect of oral administration of chlorogenic acid on oral glucose tolerance test was evaluated through blood samples collected in distinct moments for glucose determinations. Distribution and variances homogeneity of the obtained data were tested and suitable statistical tests were employed to analyse the results. Although both chlorogenic acid and the instant coffee extract had inhibited glucose-6-phosphatase activity on microsomal fraction of hepatocytes, a lack of effect of the tested doses of chlorogenic acid on hepatic production of glucose from glycogenolysis and gluconeogenesis, glycogenolysis and glycolysis rates and L-alanine catabolism on liver perfusion was observed. Since there were indications of lack of hepatic uptake of chlorogenic acid, it is possible that this compound hasn't reached intracellular compatible levels with the inhibition of the target-enzyme. Intravenous or oral administration of both chlorogenic acid and instant coffee extract, also didn't imply in reduction of blood glucose levels, plasmatic concentration of total cholesterol and triacylglycerols. Chlorogenic acid, however, provoked a reduction in the glycemic peak during the oral glucose tolerance test, that characterizes it as a possible

glycemic index reductor agent, probably by attenuating the intestinal glucose absorption, highlighting it as a compound of interest to help in risk reduction of type 2 diabetes development.

Keywords: Chlorogenic acid. Instant coffee. Glucose-6-phosphatase. Hepatic glucose output. Blood glucose levels. Cholesterol. Triacylglycerols. Glycemic index.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura molecular geral dos ácidos clorogênicos	17
Figura 2 – Representação esquemática da enzima glicose-6-fosfatase (modelo de transporte de substrato) na membrana do retículo endoplasmático..	20
Figura 3 – Sistema de perfusão de fígado.....	34
Figura 4 – Posições das cânulas no fígado nos experimentos de perfusão	35
Figura 5 – Administração por gavagem.....	39
Figura 6 – Efeito do ácido clorogênico na atividade da G-6-Pase	50
Figura 7 – Efeito do extrato de café solúvel com altas concentrações de ácidos clorogênicos na atividade da G-6-Pase	51
Figura 8 – Produção hepática de glicose a partir da L-alanina (A) e as respectivas áreas sob as curvas (B)	53
Figura 9 – Produção hepática de piruvato a partir da L-alanina (A) e as respectivas áreas sob as curvas (B)	54
Figura 10 – Produção hepática de uréia a partir da L-alanina (A) e as respectivas áreas sob as curvas (B)	55
Figura 11 – Produção hepática de glicose a partir do glicerol (A) e as respectivas áreas sob as curvas 40	56
Figura 12 – Produção hepática de glicose a partir do L-lactato (A) e as respectivas áreas sob as curvas (B)	57
Figura 13 – Produção hepática de glicose estimulada pelo glucagon (A) e as respectivas áreas sob as curvas (B)	59
Figura 14 – Produção hepática de L-lactato na presença de glucagon (A) e as respectivas áreas sob as curvas (B)	60
Figura 15 – Produção hepática de piruvato na presença de glucagon (A) e as respectivas áreas sob as curvas (B)	61
Figura 16 – Glicogenólise estimulada pelo glucagon (A) e as respectivas áreas sob as curvas (B)	62

Figura 17 – Glicólise na presença de glucagon (A) e as respectivas áreas sob as curvas (B)	63
Figura 18 –Efeito do ácido clorogênico sobre o teste de tolerância à glicose oral (A) e percentagem de redução da glicemia aos 10 e 15 minutos do pico glicêmico (B).....	69
Figura 19 –Efeito do pH sobre o teste de tolerância à glicose oral	70
Figura 20 –Vias hepáticas liberadoras de glicose (glicogenólise e neoglicogênese) e o efeito do ácido clorogênico e seus derivados.....	77

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 ÁCIDOS CLOROGÊNICOS	17
2.2 EFEITO DO ÁCIDO CLOROGÊNICO E SEUS DERIVADOS NA GLICOSE-6-FOSFATASE	18
2.3 EFEITO DOS DERIVADOS DO ÁCIDO CLOROGÊNICO SOBRE A LIBERAÇÃO HEPÁTICA DE GLICOSE E GLICEMIA.....	21
2.4 EFEITO DO ÁCIDO CLOROGÊNICO E SEUS DERIVADOS NO METABOLISMO LIPÍDICO	23
2.5 DERIVADOS DO ÁCIDO CLOROGÊNICO COMO POTENCIAIS AGENTES TERAPÊUTICOS PARA O DIABETES TIPO	25
2.6 CONSUMO DE CAFÉ E REDUÇÃO DO RISCO DE DESENVOLVIMENTO DO DIABETES TIPO 2.....	26
3 OBJETIVOS	29
3.1 GERAL	29
3.2 ESPECÍFICOS	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 DROGAS E REAGENTES	30
4.2 ANIMAIS	31
4.3 BIOENSAIOS	31
4.3.1 Experimentos com Microsomas para Verificar o Efeito do Ácido Clorogênico e do Extrato de Café Solúvel com Altas Concentrações de Ácidos Clorogênicos Sobre a Atividade da G-6-Pase in vitro	31
4.3.2 Experimentos de Perfusão de Fígado in situ para Análise do Efeito do Ácido Clorogênico Sobre a Liberação Hepática de Glicose e Outros Parâmetros Metabólicos	32
4.3.3 Experimentos de Perfusão de Fígado in situ Para Avaliação da Captação Hepática de Ácido Clorogênico	37

4.3.4 Experimentos <i>in vivo</i> Para Avaliação da Administração Endovenosa (Efeito Agudo) do Extrato de Café Solúvel Concentrado de Ácidos Clorogênicos e do Ácido Clorogênico Sobre a Glicemia e a Concentração Plasmática de Colesterol Total.....	37
4.3.5 Experimentos <i>in vivo</i> Para Avaliação da Administração Oral Sub-Crônica do Extrato de Café Solúvel Concentrado de Ácidos Clorogênicos e do Ácido Clorogênico Sobre a Glicemia e a Concentração Plasmática de Colesterol Total e Triacilgliceróis	38
4.3.6 Experimentos <i>in vivo</i> Para Avaliação do Efeito Agudo do Ácido Clorogênico Sobre o Teste de Tolerância à Glicose Oral	40
4.4 PROCEDIMENTO ANALÍTICO.....	41
4.4.1 Determinação da Concentração de Proteína	42
4.4.2 Determinação da Atividade da G-6-Pase Microsomal	42
4.4.3 Determinação da Concentração de Glicose	43
4.4.4 Determinação da Concentração de L-Lactato	44
4.4.5 Determinação da Concentração de Piruvato	45
4.4.6 Determinação da Concentração de Uréia	45
4.4.7 Determinação das Taxas de Glicogenólise e Glicólise.....	46
4.4.8 Determinação da Concentração de Ácido Clorogênico	46
4.4.9 Determinação da Concentração do Colesterol Total	46
4.4.10 Determinação da Concentração dos Triacilgliceróis.....	47
4.5 PROCEDIMENTO ESTATÍSTICO	48
5 RESULTADOS.....	50
5.1 ANÁLISE DO EFEITO DO ÁCIDO CLOROGÊNICO E DO EXTRATO DE CAFÉ SOLÚVEL COM ALTAS CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDOS CLOROGÊNICOS SOBRE A ATIVIDADE DA G-6-PASE	50
5.2 ANÁLISE DO EFEITO DO ÁCIDO CLOROGÊNICO SOBRE A LIBERAÇÃO HEPÁTICA DE GLICOSE A PARTIR DA NEOGLICOGÊNESE E OUTROS PARÂMETROS METABÓLICOS	52
5.3 ANÁLISE DO EFEITO DO ÁCIDO CLOROGÊNICO SOBRE A LIBERAÇÃO HEPÁTICA DE GLICOSE A PARTIR DA GLICOGENÓLISE E OUTROS PARÂMETROS METABÓLICOS	58

5.4 AVALIAÇÃO DA CAPTAÇÃO HEPÁTICA DE ÁCIDO CLOROGÊNICO	64
5.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO AGUDO DA ADMINISTRAÇÃO ENDOVENOSA DO EXTRATO DE CAFÉ SOLÚVEL CONCENTRADO DE ÁCIDOS CLOROGÊNICOS E DO ÁCIDO CLOROGÊNICO SOBRE A GLICEMIA E CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE COLESTEROL.....	65
5.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO SUB-CRÔNICO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DO EXTRATO DE CAFÉ SOLÚVEL CONCENTRADO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO E DO ÁCIDO CLOROGÊNICO SOBRE A GLICEMIA E CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE COLESTEROL E TRIACILGLICERÓIS.....	66
5.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO AGUDO DO ÁCIDO CLOROGÊNICO SOBRE O TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE ORAL	68
6 DISCUSSÃO	71
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO.....	84
REFERÊNCIAS.....	86

1 INTRODUÇÃO

O fígado pode liberar glicose para a corrente sangüínea por duas vias metabólicas, a glicogenólise e a neoglicogênese. A liberação hepática de glicose depende do complexo enzimático glicose-6-fosfatase (G-6-Pase), que catalisa a etapa final destas duas vias produtoras de glicose, ou seja, a conversão da glicose-6-fosfato (G-6-P) para glicose, a qual é liberada dos hepatócitos por transportadores GLUT2 (NELSON; COX, 2002; STRYER, 1996).

O ácido clorogênico é um inibidor altamente específico do transportador T1 do complexo enzimático G-6-Pase e, por isso, inibe a hidrólise da G-6-P de maneira dose-dependente em estudos *in vitro* com vesículas intactas de retículo endoplasmático hepático (ARION *et al.*, 1997; HEMMERLE *et al.*, 1997; SCHINDLER *et al.*, 1998).

O ácido clorogênico está amplamente distribuído entre os alimentos e tem como principal fonte na dieta humana o café. “Bebedores” de café ingerem diariamente de 0,5 a 1 g de ácido clorogênico (CLIFFORD, 1999; OLTHOF; HOLLMAN; KATAN, 2001). Não há dados conclusivos sobre a absorção intestinal desse composto, mas estudos atuais sugerem que ele possa ser parcialmente absorvido no intestino delgado, principalmente por via paracelular (BUGIANESI *et al.*, 2004; KONISHI; KOBAYASHI, 2004; YANG *et al.*, 2004).

Os efeitos do ácido clorogênico sobre a glicemia e metabolismo do colesterol e triacilgliceróis também não são conclusivos, mas, por se tratar de um inibidor da G-6-Pase, o ácido clorogênico poderia reduzir a produção hepática de glicose e, até mesmo, a glicemia, como fazem seus derivados sintéticos (HEMMERLE *et al.*, 1997; HERLING *et al.*, 1998, 1999, 2002; PARKER *et al.*, 1998; SIMON *et al.*, 2000; VAN DIJK *et al.*, 2001), constituindo uma importante possibilidade para regulação da hiperprodução hepática de glicose em diabéticos tipo 2.

Uma vez que a melhora do controle glicêmico retarda o início e reduz a severidade das complicações a longo prazo do diabetes tipo 2, que esta patologia acomete de 5 a 10% da população adulta (TURNER; CLAPHAM, 1998) e

que há previsão de aumento do número de diabéticos tipo 2 em todo o mundo, de 171 milhões para mais de 366 milhões em 2030 (ASSOCIAÇÃO LATINO-AMERICANA DE DIABETES, 2002/2003; TUOMILEHTO; BIDEL; HU, 2004), há necessidade de desenvolvimento ou reconhecimento de novos agentes antidiabéticos.

Publicações científicas recentes, resultantes de acompanhamento de grandes grupos populacionais por diversos anos, estabeleceram uma forte associação entre o consumo contínuo de café e a redução do risco de desenvolvimento do diabetes tipo 2 (AGARDH *et al.*, 2004; SALAZAR-MARTINEZ *et al.*, 2004; TUOMILEHTO; BIDEL; HU, 2004; VAN DAM *et al.*, 2004; VAN DAM; FESKENS, 2002). Também há relatos de que o consumo de altas doses de café promove uma leve redução da glicemia em humanos e ratos (NAISMITH *et al.*, 1970 *apud* VAN DAM; FESKENS, 2002; WÜRZNER; LINDSTRÖM; VUATAZ, 1977; YAMAJI *et al.*, 2004).

Além disso, revisões atuais descrevem o ácido clorogênico como potencial agente redutor do índice glicêmico, por ser o componente do café responsável por inibir e, dessa forma, tornar mais lenta a absorção de glicose no intestino delgado (JOHNSTON; CLIFFORD; MORGAN, 2003; McCARTY, 2005a, 2005b).

Diante da existência da correlação populacional entre consumo de café e redução do risco de desenvolvimento de diabetes tipo 2, do fato de que o ácido clorogênico é um inibidor da G-6-Pase e do transporte de glicose em vesículas da membrana da borda em escova no intestino delgado (WELSCH; LACHANCE; WASSERMAN, 1989) e de que o café é a mais rica fonte de ácido clorogênico da dieta humana, o presente trabalho propôs, pela primeira vez, tanto quanto se sabe, analisar comparativamente o efeito do ácido clorogênico e do extrato de café solúvel concentrado de ácidos clorogênicos (37,8%) sobre a atividade da G-6-Pase *in vitro*, avaliar o efeito do ácido clorogênico sobre o metabolismo hepático da glicose em estudos de perfusão de fígado *in situ*, realizar estudos comparativos dos efeitos do extrato de café solúvel com altos teores de ácidos clorogênicos com os do ácido clorogênico sobre a glicemia e níveis plasmáticos de lipídeos em estudos *in vivo* e analisar o efeito do ácido clorogênico sobre o teste de tolerância à glicose oral.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ÁCIDOS CLOROGÊNICOS

Os ácidos clorogênicos são um conjunto de moléculas quimicamente relacionadas (compostos fenólicos) encontradas em diversos alimentos como café, chimarrão, batata, maçã, alcachofra, pêra, cereja, repolho, tomate, aipo, cenoura, brócolis, couve-flor, sementes de girassol, entre outros. Estes compostos, formados no metabolismo secundário das plantas, resultantes da esterificação do ácido quínico com o ácido caféico (CQA), ferúlico (FQA) ou p-cumárico (p-CoQA) (CAMPA *et al.*, 2003; CLIFFORD, 1999; MONTEIRO; TRUGO, 2005; NARDINI *et al.*, 2002), apresentam uma estrutura molecular comum (figura 1), diferenciando-se no grupamento R (radical) e na posição de esterificação (carbonos 3, 4 e 5 do ácido quínico) (DE MARIA; MOREIRA, 2004; MONTEIRO; TRUGO, 2005; TRUGO; MACRAE, 1984).

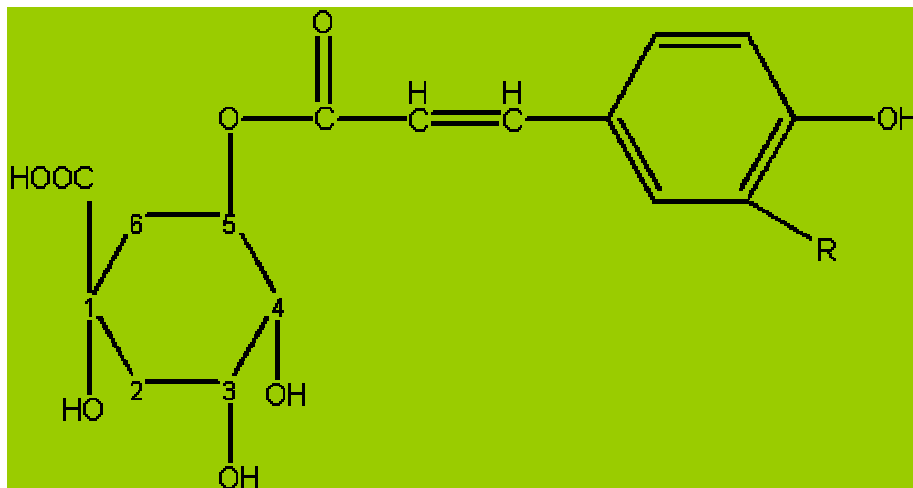


Figura 1 - Estrutura molecular geral dos ácidos clorogênicos. R: grupamentos distintos nos diferentes tipos de ácidos clorogênicos.

O termo ácido clorogênico é geralmente utilizado de forma genérica, e faz referência ao mais comum desses compostos encontrado na natureza, o ácido 5-

cafeoilquínico (5-CQA), onde R é uma hidroxila (OH). A fórmula do 5-CQA é $C_{16}H_{18}O_9$ e sua massa molar é 354,3 (DE MARIA; MOREIRA, 2004).

O café é uma das mais ricas fontes de ácidos clorogênicos da dieta humana e é composto por uma mistura de diferentes ácidos clorogênicos (isômeros naturais). Em cafés solúveis disponíveis comercialmente, o teor de ácidos clorogênicos totais pode apresentar variações de 0,7 a 5,9% (NOGUEIRA; TRUGO, 2003) e a soma dos isômeros do grupo cafeoilquínico representa 70% do total, sendo que o isômero presente em maior quantidade é o 5-CQA, contribuindo com 30% dos ácidos clorogênicos totais. Os grupos do ácido feruloilquínico e dicafeoilquínico representam 20 e 10% do total, respectivamente (TRUGO; MACRAE, 1984).

Apesar do processo de torrefação promover uma perda de ácido clorogênico, uma quantidade apreciável dessa substância está presente no café de coador e no café solúvel (CLIFFORD, 1999; NOGUEIRA; TRUGO, 2003).

2.2 EFEITO DO ÁCIDO CLOROGÊNICO E SEUS DERIVADOS NA GLICOSE-6-FOSFATASE

O composto natural ácido clorogênico e seus derivados sintéticos são inibidores da G-6-Pase, a enzima que catalisa a reação final da glicogenólise e neoglicogênese, as duas principais vias metabólicas hepáticas liberadoras de glicose, respectivamente a partir do glicogênio e de precursores endógenos como o glicerol, L-lactato, L-alanina e L-glutamina (figura 2) (ARION *et al.*, 1997, 1998b; HEMMERLE *et al.*, 1997; HERLING *et al.*, 1998; PARKER *et al.*, 1998; SCHINDLER *et al.*, 1998; SIMON *et al.*, 2000).

A G-6-Pase, encontrada predominantemente no fígado, promove a conversão da G-6-P para glicose e fosfato, passo essencial para a liberação de glicose pelo fígado, desempenhando um papel chave na regulação da glicemia (HEMMERLE *et al.*, 1997; HERLING *et al.*, 1998; SIMON *et al.*, 2000). A G-6-Pase é um sistema de enzimas, formado por várias proteínas integrais, que está presente na membrana do retículo endoplasmático dos hepatócitos (ARION *et al.*, 1975; BURCHELL, 1990; BURCHELL; WADDELL, 1991; GERIN; VAN SCHAFTINGEN,

2002; NORDLIE, 1982). Este complexo enzimático, ilustrado na figura 2, compreende:

a) uma proteína de transporte, T₁ (G-6-P translocase), que possibilita a entrada da G-6-P para o interior do retículo endoplasmático, a qual é passiva e decorrente da contínua hidrólise da G-6-P pelo sítio catalítico da enzima (ARION *et al.*, 1975);

b) uma subunidade catalítica que defosforila a G-6-P (G-6-P fosfohidrolase), com seu sítio catalítico voltado para o interior do retículo endoplasmático;

c) dois transportadores adicionais, translocases T₂ e T₃ (GLUT 7), que retornam os produtos fosfato e glicose, respectivamente, para o citosol;

d) uma proteína estabilizante, SP, essencial para a atividade normal da enzima e que parece funcionar como uma proteína reguladora ligante de cálcio (BURCHELL; WADDELL, 1991).

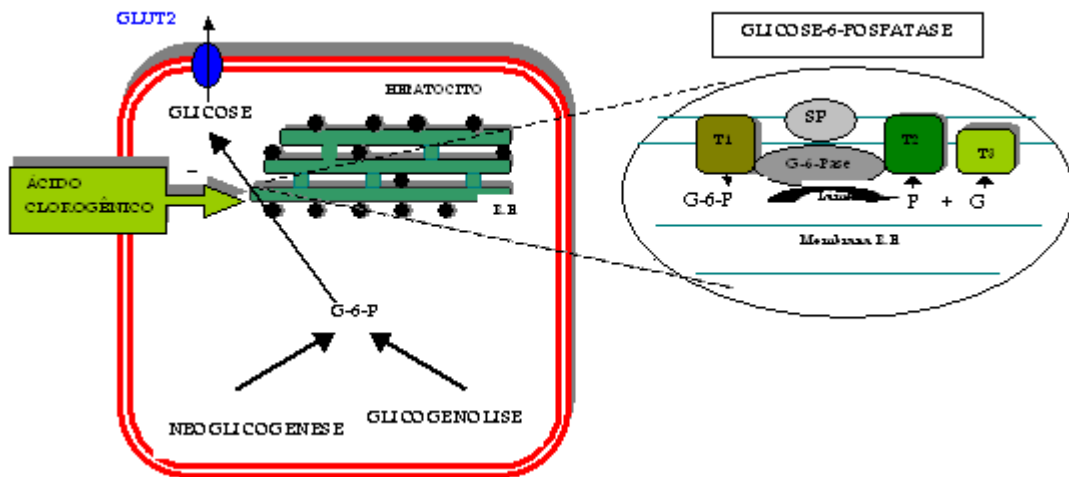


Figura 2 - Representação esquemática da enzima glicose-6-fosfatase (modelo de transporte de substrato) na membrana do retículo endoplasmático. R.E., retículo endoplasmático; G-6-Pase, subunidade catalítica; SP, proteína estabilizante ligante de cálcio; T1, proteína de transporte de G-6-P; T2, proteína de transporte de fosfato/pirofosfato; T3, proteína de transporte de glicose; P, fosfato; G, glicose. A glicose atravessa a membrana dos hepatócitos por difusão facilitada através dos transportadores GLUT 2. Segundo Burchell e Waddell, 1991.

O ácido clorogênico é um inibidor competitivo, que se liga de forma específica e reversível à translocase T1 da G-6-Pase (ARION *et al.*, 1997; HEMMERLE *et al.*, 1997; SCHINDLER *et al.*, 1998).

Diante da constatação da característica de inibição da G-6-Pase pelo ácido clorogênico, vários análogos desse composto foram sintetizados com um maior potencial inibitório. Entre eles encontram-se o S-5627, S-0838, S-3483, 29i e o S-4048 (composto A), sendo os três últimos os mais potentes inibidores da G-6-Pase. A potência do S-3483 é superior em três ordens de grandeza quando comparada à do ácido clorogênico e o composto 29i é cem vezes mais potente do que o ácido clorogênico (ARION *et al.*, 1998a, 1998b; HEMMERLE *et al.*, 1997; HERLING *et al.*, 2002; PARKER *et al.*, 1998).

Assim como o ácido clorogênico, seus derivados sintéticos S-5627 (ARION *et al.*, 1998a), S-0838 (ARION *et al.*, 1994; BURGER *et al.*, 1994), S-3483 (ARION *et al.*, 1998b; KHAN *et al.*, 1998) e S-4048 (PARKER *et al.*, 1998) inibiram a hidrólise da G-6-P de maneira dose-dependente em microsomos intactos (vesículas

intactas de retículo endoplasmático) de fígado de rato, mas não em microsossomos rompidos. Os derivados sintéticos também não tiveram efeito na translocase T_2 e nem no componente G-6-P fosfohidrolase, evidenciando que estes agentes atuam no bloqueio da translocação da G-6-P (ARION *et al.*, 1997; HEMMERLE *et al.*, 1997; SCHINDLER *et al.*, 1998).

2.3 EFEITO DOS DERIVADOS DO ÁCIDO CLOROGÊNICO SOBRE A LIBERAÇÃO HEPÁTICA DE GLICOSE E GLICEMIA

Como o fígado desempenha papel central na regulação da glicemia (MOORE; CONNOLLY; CHERRINGTON, 1998; PERSEGUIN *et al.*, 1997; SHIMAZU, 1983; TAPPY, 1995), a inibição da G-6-Pase deve reduzir a liberação hepática de glicose proveniente da glicogenólise e neoglicogênese e conseqüentemente diminuir a glicemia. De fato, há vários relatos de que inibidores específicos da G-6-Pase, como os derivados do ácido clorogênico, exercem estes efeitos.

O S-0838 reduziu a produção de glicose em hepatócitos de ratos submetidos à privação alimentar incubados com precursores da neoglicogênese como alanina, lactato/piruvato e glicerol e inibiu a produção de glicose pela via glicogenolítica em hepatócitos de ratos alimentados (ARION *et al.*, 1994; BURGER *et al.*, 1994).

Em perfusão de fígado de rato, os derivados sintéticos do ácido clorogênico, S-3483 e composto 29i, inibiram de uma maneira dose-dependente a glicogenólise e a neoglicogênese (HEMMERLE *et al.*, 1997; HERLING *et al.*, 1998). Em ratos alimentados, a glicogenólise estimulada pelo glucagon resultou em hiperglicemia por quase duas horas. A infusão intravenosa de S-3483 preveniu o pico hiperglicêmico e causou um decréscimo subseqüente da glicemia (HERLING *et al.*, 1998).

Em ratos privados de alimentação por 24 horas, com a normoglicemia mantida predominantemente pela neoglicogênese, a infusão intravenosa de S-3483 resultou em redução constante da glicemia (HERLING *et al.*, 1998). Em ratos submetidos à privação alimentar noturna, o tratamento com S-3483

induziu hipoglicemia, aumentou a concentração de G-6-P e glicogênio hepático e promoveu um aumento da expressão da G-6-Pase (SIMON *et al.*, 2000). Estudos de Khan *et al.* (1998) estabeleceram que esse composto não é tóxico e não provoca a queda da produção hepática de glicose a níveis abaixo do necessário para prover glicose suficiente para o cérebro.

Em ratos alimentados ou com 24 horas de privação alimentar, a infusão intravenosa do S-4048 (composto A) durante 5 horas, causou redução e estabilização em platôs dose-dependentes da glicemia, com correspondente aumento na concentração de G-6-P e glicogênio hepático e renal e da concentração sangüínea de lactato. A inibição promovida no transportador T1 da G-6-Pase, implicou no aumento da concentração de G-6-P e redirecionamento do fluxo de carbono para as vias de síntese de glicogênio e/ou via glicolítica (HERLING *et al.*, 1999).

A infusão intravenosa constante de S-4048 em ratos promoveu estabilização da glicemia após 60 minutos em níveis 50% inferiores aos do grupo controle. Após uma única injeção intravenosa de S-4048, o efeito de redução da glicose sangüínea atingiu seu máximo aos 45 minutos e foi completamente revertido nos próximos 60 minutos (HERLING *et al.*, 2002).

A atividade farmacológica do S-4048 também foi observada nos estudos de Van Dijk *et al.* (2001), onde a infusão intravenosa do S-4048 por 8 horas em ratos privados de alimentação promoveu inibição aguda da G-6-Pase, mas não afetou o fluxo neoglicogênico para G-6-P, redirecionando-o para síntese de glicogênio, reduziu a glicemia em 20% e a produção total de glicose em 50%. O conteúdo total de G-6-P no fígado dos animais tratados com S-4048 mostrou-se muito mais alto (+346%) do que nos animais controle.

A produção de glicose em fígados de ratos submetidos à perfusão, independentemente da via metabólica que estivesse predominantemente contribuindo para a produção hepática de glicose, também foi inibida pelo S-4048 (BURGER *et al.*, 1999).

Em ratos alimentados com a glicogenólise estimulada por injeção de glucagon, a infusão do S-4048 promoveu grande redução no pico hiperglicêmico, provavelmente devido à inibição competitiva da G-6-Pase, o que promoveu uma normalização da taxa de produção de glicose (HERLING *et al.*, 1999).

O S-4048 reduziu a produção basal de glicose (47%) e a produção de glicose estimulada pelo glucagon em hepatócitos isolados. A administração intraperitoneal do S-4048 promoveu diminuição aguda dose-dependente da glicemia em camundongos e ratos submetidos à privação alimentar, com uma redução de 71% e 36% respectivamente, aos 30 minutos após a sua administração, que se reverteu após três horas nos dois casos. O S-4048 promoveu, ainda, aumento do nível de glicogênio hepático nos ratos. Mesmo diante de elevadas doses desse derivado do ácido clorogênico, não foram estabelecidas taxas hipoglicêmicas severas em nenhum dos animais, sugerindo que, nessas condições, os mecanismos contra-regulatórios estavam suficientemente intactos para manter a glicemia acima do nível crítico para a sobrevivência (PARKER *et al.*, 1998).

Em resumo, os resultados anteriores demonstram, entre outros efeitos, que os derivados sintéticos do ácido clorogênico são efetivos na inibição da liberação hepática de glicose e redução da glicemia. Entretanto, há apenas um estudo conhecido onde foi observada a redução da glicemia em ratos diabéticos tipo 1 alimentados, de uma a três horas, após administração oral de ácido clorogênico (ANDRADE-CETTO; WIEDENFELD, 2001).

2.4 EFEITO DO ÁCIDO CLOROGÊNICO E SEUS DERIVADOS NO METABOLISMO LIPÍDICO

No que se refere ao metabolismo lipídico, a infusão endovenosa do S-4048, tanto em ratos privados de alimentação por 24 horas, quanto em ratos alimentados, promoveu elevação da concentração de ácidos graxos livres no plasma e de triacilgliceróis no fígado, mas não houve alterações nos níveis de colesterol no fígado e no plasma. A inibição da G-6-Pase pelo S-4048 e conseqüente redução da glicemia e dos níveis de insulina, implicaram no aumento da lipólise no tecido adiposo e liberação de ácidos graxos livres, uma fonte alternativa de combustível ao organismo. Os possíveis fatores responsáveis pelo aumento dos triacilgliceróis foram o aumento da disponibilidade de ácidos graxos livres e sua decorrente reesterificação e também o aumento da biossíntese a partir do glicerol-fosfato, que se encontra em níveis aumentados devido à redução do fluxo de carbono pelo sistema enzimático G-6-Pase (HERLING *et al.*, 1999).

Outros estudos mostram que a inibição do sistema G-6-Pase pelo S-4048 resultou em estimulação aguda da síntese de gorduras e desenvolvimento de esteatose hepática, sem afetar a síntese de colesterol e a secreção de VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade) pelo fígado de ratos (BANDSMA *et al.*, 2001).

Sotillo e Hadley (2002) demonstraram em ratos obesos, com hiperlipidemia e resistência à insulina, submetidos à privação alimentar noturna, redução de 44% e 58%, respectivamente, da concentração plasmática de colesterol e triacilgliceróis e redução do pico hiperglicêmico no teste de tolerância à glicose oral, após a infusão endovenosa de ácido clorogênico por 21 dias. Eles sugerem que o ácido clorogênico possa ter provocado um aumento da sensibilidade à insulina, como resultado de aumento da captação de glicose por outros tecidos, o que causou uma redução no fluxo de substrato para a via hepática de síntese de lipídeos e, conseqüentemente, uma redução na secreção de triacilgliceróis. Dessa forma, o ácido clorogênico poderia atuar *in vivo* como um agente antihiperglicêmico e hipolipidêmico.

Embora Gebhardt (1998) tenha demonstrado em hepatócitos (*in vitro*) que o ácido clorogênico inibe em 15% a atividade da HMGCoA redutase (enzima envolvida na biossíntese de colesterol), não foram observadas alterações nos níveis de colesterol e triacilgliceróis plasmáticos em ratos após ingestão de dietas semi-sintéticas com ácido clorogênico (2g/kg) durante 28 dias, embora tenha sido constatado o aumento do colesterol no fígado diante dessa ingestão de alta dose de ácido clorogênico (FRANK *et al.*, 2003).

Os resultados descritos anteriormente indicam que os efeitos do ácido clorogênico e seus derivados no metabolismo lipídico não estão bem estabelecidos.

2.5 DERIVADOS DO ÁCIDO CLOROGÊNICO COMO POTENCIAIS AGENTES TERAPÊUTICOS PARA O DIABETES TIPO 2

O aumento da liberação hepática de glicose é a principal causa da hiperglicemia que caracteriza o diabetes tipo 2 (DE FRONZO; FERRANNINI; SIMONSON, 1989). No diabético tipo 2, a produção hepática de glicose está inadequadamente elevada durante o período pós-absortivo e não é suprimida no período absortivo. Esta hiperprodução hepática de glicose pode ser proveniente da glicogenólise ou da neoglicogênese. Um dos fatores responsáveis pela hiperprodução hepática de glicose em ratos diabéticos pode ser a presença de maior número de subunidades catalíticas da G-6-Pase que, nessa condição patológica, podem apresentar maior atividade (BURCHELL; CAIN, 1985 *apud* BURCHELL; WADDELL, 1991; JAKOBSON; DALLNER, 1968; KHAN *et al.*, 1990a, 1990b; KHAN; CAO; LANDAU, 1995; SEOANE *et al.*, 1997).

A hiperglicemia crônica somada à resistência à insulina, acarreta uma série de complicações crônicas no diabético tipo 2, como desenvolvimento de doenças cardiovasculares e microvasculares (retinopatia e neuropatia).

A melhora do controle glicêmico retarda o início e reduz a severidade das complicações de longo prazo. Entretanto, mesmo com o uso intensivo de agentes antidiabéticos disponíveis no momento, mais de 50% dos pacientes diabéticos tipo 2 apresentam controle glicêmico pobre e 18% desenvolvem complicações dentro de 6 anos após o diagnóstico (BAILEY, 2000). Isto faz desta patologia um dos mais importantes problemas de saúde pública da atualidade, tanto em termos de número de pessoas afetadas, incapacitações, mortalidade prematura, como dos custos envolvidos no seu controle e no tratamento de suas complicações.

O diabetes tipo 2 acomete de 5 a 10% da população adulta (TURNER; CLAPHAM, 1998) e dados do Ministério da Saúde estimam que no Brasil existam aproximadamente 10 milhões de indivíduos diabéticos tipo 2 (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2005). Considerando ainda, que há previsão de aumento no número de diabéticos tipo 2 em todo o mundo de 171 milhões para mais de 366 milhões em 2030 (ASSOCIAÇÃO LATINO-AMERICANA DE DIABETES, 2002/2003; TUOMILEHTO; BIDEL; HU, 2004), há necessidade de novos agentes antidiabéticos.

É possível que inibidores da G-6-Pase, como os derivados do ácido clorogênico, os quais promovem redução na glicemia, possam ser úteis para modular a liberação hepática de glicose elevada em indivíduos diabéticos tipo 2, desse modo aliviando a hiperglicemia.

Por se tratar de um inibidor da G-6-Pase, o ácido clorogênico poderia, por hipótese, reduzir a produção hepática de glicose e, até mesmo, a glicemia, como fazem seus derivados sintéticos (HEMMERLE *et al.*, 1997; HERLING *et al.*, 1998, 1999, 2002; PARKER *et al.*, 1998; SIMON *et al.*, 2000; VAN DIJK *et al.*, 2001), constituindo também uma importante possibilidade para regulação da hiperprodução hepática de glicose em diabéticos tipo 2. Desse modo, a ingestão diária de café sem açúcar ou com edulcorantes poderia ser benéfica para o controle da glicemia em diabéticos tipo 2.

2.6 CONSUMO DE CAFÉ E REDUÇÃO DO RISCO DE DESENVOLVIMENTO DO DIABETES TIPO 2

Estudos publicados recentemente, envolvendo milhares de pessoas, acompanhadas no decorrer de vários anos, evidenciam uma associação inversa entre consumo de café a longo prazo e risco de desenvolvimento do diabetes tipo 2 (AGARDH *et al.*, 2004; SALAZAR-MARTINEZ *et al.*, 2004; TUOMILEHTO; BIDEL; HU, 2004; VAN DAM *et al.*, 2004; VAN DAM; FESKENS, 2002). O consumo de café promoveu redução de 50 a 70% no risco para desenvolvimento de diabetes tipo 2 (AGARDH *et al.*, 2004; VAN DAM; FESKENS, 2002) e alguns dos mecanismos de ação hipotetizados envolvem a ação do ácido clorogênico na inibição da G-6-Pase hepática e na redução de absorção de glicose, por inibir seu transporte intestinal (AGARDH *et al.*, 2004; McCARTY, 2005a, 2005b; TUOMILEHTO; BIDEL; HU, 2004; VAN DAM *et al.*, 2004).

Diante da constatação da correlação entre a ingestão de café e redução do risco de desenvolvimento do diabetes tipo 2, alguns estudos, com grande amostragem da população-alvo, direcionaram-se para a análise dos efeitos do café na tolerância à glicose e observaram que o consumo diário de 5 xícaras ou mais de café promoveu redução de 4,3 a 8,8% na glicemia diante de um teste de tolerância oral à glicose (VAN DAM *et al.*, 2004; YAMAJI *et al.*, 2004). Estes estudos concluíram que o consumo de café, 5 xícaras ou mais por dia, pode: a) inibir a

hiperglicemia pós-prandial (VAN DAM *et al.*, 2004; YAMAJI *et al.*, 2004); b) reduzir o risco de desenvolvimento de menor tolerância à glicose entre 40 a 60%, de resistência à insulina em até 70% e de mau funcionamento das células β em indivíduos diabéticos em até 50% (AGARDH *et al.*, 2004) e c) reduzir em 5,6% as concentrações insulínicas de humanos submetidos à privação alimentar noturna (VAN DAM *et al.*, 2004), o que adiciona evidências de que o café protege contra o desenvolvimento do diabetes tipo 2.

Algumas revisões atuais fazem referência a um estudo antigo, onde a ingestão de 5 g de café solúvel promoveu redução na glicemia aos 30 e 60 minutos durante o teste de tolerância à glicose oral em humanos normais (FEINBERG *et al.*, 1968 *apud* McCARTY, 2005a, 2005b). Há também evidências na literatura que sugerem que a ingestão de 400 mL de café descafeinado por humanos saudáveis em jejum, com faixa etária aproximada de 26 anos, concomitante com uma dose de glicose, atenua a absorção de glicose no intestino delgado, pelo fato de o ácido clorogênico ali presente inibir o transporte desse carboidrato (JOHNSTON; CLIFFORD; MORGAN, 2003), o que é enfatizado pela observação de que o ácido clorogênico reduziu em 80% a capacidade de transporte de glicose em vesículas de membrana da borda em escova, isoladas do intestino delgado de ratos (WELSCH; LACHANCE; WASSERMAN, 1989).

A inibição da absorção intestinal de glicose pelo ácido clorogênico poderia implicar, entre outros benefícios, na redução do índice glicêmico, que atualmente é considerado um fator importante na redução do risco de desenvolvimento do diabetes tipo 2 (McCARTY, 2005a).

Há ainda relatos sobre redução da glicemia em humanos no estado de jejum após o consumo de altas doses de café por quatorze dias (NAISMITH *et al.*, 1970 *apud* VAN DAM; FESKENS, 2002) e de uma leve redução da glicemia, após privação alimentar noturna, em ratos que consumiram durante um ano uma dieta com 6% de café solúvel, normal ou descafeinado (WÜRZNER; LINDSTRÖM; VUATAZ, 1977).

Um outro estudo recente com 3224 homens saudáveis na faixa etária de 46 a 59 anos, correlacionou o consumo diário de 5 xícaras de café ou mais com redução da glicemia em 1,5%, após privação alimentar noturna (YAMAJI *et al.*, 2004).

Considerando que: a) o ácido clorogênico, composto natural presente principalmente no café, é um inibidor da G-6-Pase hepática (ARION *et al.*,

1997; HEMMERLE *et al.*, 1997; SCHINDLER *et al.*, 1998) e do transporte intestinal de glicose em vesículas da membrana da borda em escova (WELSCH; LACHANCE; WASSERMAN, 1989); b) não há estudos conhecidos ou conclusivos do efeito do ácido clorogênico e de seus isômeros naturais presentes no café sobre o metabolismo hepático da glicose, glicemia, metabolismo lipídico e sobre o teste de tolerância à glicose oral e c) existe uma correlação entre ingestão de café, redução de risco de desenvolvimento de diabetes tipo 2 e possível redução da glicemia, no presente trabalho investigou-se os efeitos do ácido clorogênico e do extrato de café solúvel concentrado de ácidos clorogênicos (37,8%) sobre a atividade da G-6-Pase, liberação hepática de glicose, glicemia, lipídeos plasmáticos e sobre o teste de tolerância à glicose oral em bioensaios com animais.

O modelo animal escolhido deve-se ao fato de que uma série de estudos demonstra que as vias metabólicas hepáticas produtoras de glicose, os mecanismos de regulação da glicemia, a glicólise, a síntese e degradação do glicogênio (HERS; HUE, 1983; NELSON; COX, 2002; PILKIS; GRANNER, 1992; SOUZA, 1999; STRYER, 1996; TAPPY, 1995), a atividade da enzima G-6-Pase (ARION *et al.*, 1997; BURCHELL; WADDELL, 1991), as vias metabólicas e os mecanismos de regulação da síntese de colesterol e triacilgliceróis, entre diversos outros, são semelhantes e, muitas vezes vias metabólicas universais (glicólise, neoglicogênese, etc.) em humanos e demais mamíferos, como os ratos (NELSON; COX, 2002; STRYER, 1996).

Os ratos são amplamente utilizados e particularmente vantajosos na pesquisa biomédica nas áreas de endocrinologia, cardiologia, imunologia, toxicologia, neurociências, entre outras. A fisiologia e metabolismo dos ratos estão bem estudados e os animais utilizados para pesquisa no mundo todo atualmente pertencem a linhagens definidas, o que permite uma padronização genética, comparação de resultados e rápidos avanços científicos. Além disso, uma vez que os processos metabólicos obedecem a padrões bastante semelhantes nos animais mamíferos (NELSON; COX, 2002; STRYER, 1996), é justificada a busca de conhecimentos em outros modelos que não o humano, e, após análise e interpretação cuidadosa dos resultados obtidos, extrapolação ou transposição limitada para a espécie humana (ANDERSEN *et al.*, 2004). O uso de modelos animais permite o teste de hipóteses através de estudos mecanísticos, com protocolos experimentais que muitas vezes não são passíveis de intervenção em humanos, como os do presente trabalho.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Investigar os efeitos do ácido clorogênico e do extrato de café solúvel com altos teores de ácidos clorogênicos sobre o metabolismo da glicose e lipídeos plasmáticos.

3.2 ESPECÍFICOS

a) Verificar o efeito do ácido clorogênico e do extrato de café solúvel com altas concentrações de ácidos clorogênicos (37,8%) sobre a atividade da glicose-6-fosfatase *in vitro*;

b) Investigar em perfusão de fígado *in situ* o efeito do ácido clorogênico sobre a liberação hepática de glicose, proveniente da neoglicogênese e glicogenólise, e outros parâmetros metabólicos;

c) Avaliar em perfusão de fígado *in situ* a captação hepática de ácido clorogênico;

d) Analisar o efeito da administração endovenosa (efeito agudo) do extrato de café solúvel concentrado de ácidos clorogênicos (37,8%) e do ácido clorogênico sobre a glicemia e concentração plasmática de colesterol total;

e) Analisar o efeito da administração oral sub-crônica do extrato de café solúvel concentrado de ácidos clorogênicos (37,8%) e do ácido clorogênico sobre a glicemia e concentração plasmática de colesterol total e triacilgliceróis;

f) Avaliar o efeito agudo da administração oral do ácido clorogênico sobre o teste de tolerância à glicose oral.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DROGAS E REAGENTES

O ácido clorogênico (ácido 5-cafeoilquínico - $C_{16}H_{18}O_9$ - MM 354,3) foi adquirido da Sigma Chemical Company, o glucagon da Novo Nordisk, a L-alanina da Acros Organics, o glicerol e o L-lactato da Reagen. Os sais do líquido de perfusão e os demais reagentes foram adquiridos da Sigma Chemical Company, Merck, Reagen ou Biodiagnóstica.

O extrato de café solúvel com altos teores de ácidos clorogênicos (37,8%), gentilmente cedido, foi obtido a partir de café solúvel disponível comercialmente, com teor aproximado de **3%** de ácido clorogênico, no laboratório de pesquisa da Companhia Iguaçu de Café Solúvel, utilizando-se a técnica estabelecida por Bicchi *et al.* (1995) com modificações (BASSOLI; VIGNOLI; ALCÂNTARA, 2005). Segundo laudo do laboratório de pesquisa da referida indústria, a produção do extrato envolveu a precipitação das fibras do café solúvel com metanol, passagem por uma coluna C18, eluição e filtração para posterior quantificação dos ácidos clorogênicos utilizando-se HPLC-DAD.

O extrato obtido foi caracterizado pela indústria de café solúvel e apresentou um teor máximo de ácidos clorogênicos totais de **37,8%**, sendo 19% 5-CQA e 4-CQA, 16,2% 3-CQA e 2,6% 3-FQA, e uma composição aproximada de 20% de carboidratos (METODOLOGIA ISO 11292-HPLC-PAD), 13,61% de proteínas (método de Kjeldahl segundo INTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985), 6,1% de umidade (METODOLOGIA ISO 3726-Karl Fisher), ausência de cafeína (METODOLOGIA ISO 10095-HPLC-UV) e ausência ou teor máximo de lipídios similar ao do café solúvel (0,2%).

4.2 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos adultos, da linhagem Wistar, pesando entre 170 e 200 g, alimentados à vontade, com ração peletizada Nuvilab para roedores, ou submetidos a 24 horas de privação alimentar, dependendo do parâmetro a ser investigado, e com livre acesso à água. Os ratos foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina e mantidos no Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas, em gaiolas coletivas, a uma temperatura de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ e com ciclo claro/escuro de 12 horas. Os experimentos foram sempre iniciados às 14:00 horas para minimizar variações circadianas e foram utilizados de três a onze animais por grupo.

O protocolo experimental com os animais foi executado de acordo com as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação em Animais, pela Universidade Federal de São Paulo, Organização Mundial da Saúde e “Society for Neuroscience” (ANDERSEN *et al.*, 2004).

4.3 BIOENSAIOS

4.3.1 Experimentos com Microsossomos para Verificar o Efeito do Ácido Clorogênico e do Extrato de Café Solúvel com Altas Concentrações de Ácidos Clorogênicos Sobre a Atividade da G-6-Pase *in vitro*

Microsossomos para medida da atividade da G-6-Pase foram isolados de fígados de ratos, submetidos a 24 horas de privação alimentar e sacrificados por decaptação, por centrifugação diferencial de acordo com a técnica modificada a partir de Bygrave (1978), Mihara e Sato (1972), Moore *et al.* (1975), Schanne e Moore (1986) e Song *et al.* (1969). A fração microssomal foi isolada através da homogeneização do fígado em 10 volumes de meio contendo KCl 1,15%, Tris 10 mM, pH 7,4 e fenilmetilsulfonilfluoreto 100 μM , mantido à temperatura de 0 a 4°C , em homogeneizador Dounce, através de 8 -10 movimentos com o pistilo frouxo.

O homogeneizado obtido foi filtrado em gaze e centrifugado seqüencialmente a 2,550 g, 7,080 g e a 12,434 g, por 10 minutos. O sobrenadante da última centrifugação foi centrifugado a 105,000 g por 60 minutos. O sedimento resultante foi ressuspenso no mesmo meio, em volume suficiente para obter concentração protéica de cerca de 30 mg/mL. Esta suspensão microssomal foi utilizada para determinação da atividade da G-6-Pase na ausência (controle) ou presença do ácido clorogênico (0,25 mM; 0,5 mM; 0,75 mM e 1 mM) ou do extrato de café solúvel concentrado de ácidos clorogênicos nas concentrações de 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2 e 5 mg de extrato/mL de suspensão microssomal.

4.3.2 Experimentos de Perfusão de Fígado *in situ* para Análise do Efeito do Ácido Clorogênico sobre a Liberação Hepática de Glicose e outros Parâmetros Metabólicos

Nestes experimentos, a técnica de perfusão de fígado *in situ* (KELMER-BRACHT *et al.*, 1984) foi utilizada. O sistema de perfusão de fígado (figura 3), instalado no Departamento de Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, é composto por reservatórios para o líquido de perfusão, uma bomba peristáltica, um oxigenador de membrana, acoplado a um banho-maria com bomba de circulação externa de água aquecida e um cilindro com mistura carbogênica ($O_2/CO_2=95/5\%$).

O oxigenador de membrana é formado por um cilindro duplo de alumínio, ao redor do qual estão enrolados tubos de borracha silicone de parede fina (0,25 mm), diâmetro interno de 2 mm e comprimento total de 15 metros. A câmara interna do cilindro de alumínio é termostatizada pelo banho-maria, por meio da bomba de circulação externa de água aquecida. O cilindro de alumínio está isolado do ambiente por uma cobertura cilíndrica de plástico transparente, mantendo-se no seu interior uma atmosfera de O_2 e CO_2 nas proporções de 95:5. O sistema ainda contém um dispositivo que impede a entrada de bolhas de ar no fígado (capta-bolhas).

O líquido de perfusão utilizado foi o tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (KH) (KREBS; HENSELEIT, 1932 *apud* KELMER-BRACHT, 1993), com

a seguinte composição: NaCl 115 mM; NaHCO₃ 25 mM; KCl 5,8 mM; Na₂SO₄ 1,2 mM; MgCl₂ 1,18 mM; NaH₂PO₄ 1,2 mM e CaCl₂ 2,5 mM. Ácido clorogênico grau analítico, glucagon e precursores neoglicogênicos, quando utilizados, foram dissolvidos no líquido de perfusão nas concentrações desejadas.

Nesse sistema, o líquido de perfusão é impulsionado pela bomba peristáltica em direção ao oxigenador de membrana. Neste local se processam as trocas gasosas. O O₂ e o CO₂ contidos na atmosfera carbogênica já referida, por difusão, passam para o líquido de perfusão que circula no interior dos tubos de borracha de silicone. A fina espessura da parede destes tubos, seu pequeno diâmetro e o seu comprimento total (grande área de secção transversal) favorecem as transferências. Com os fluxos normalmente utilizados (limite superior 45 mL por minuto), o tempo de permanência do líquido no oxigenador de membrana é de aproximadamente 1 minuto, e a saturação, próxima a 99%. Desse modo, o líquido saturado de ar (21% de O₂, 78% de N₂, além de outros), por troca passiva, satura-se com 95% de O₂ e 5% de CO₂. A entrada de CO₂ no líquido de perfusão diminui o seu pH inicial de 7,6 para 7,4. O líquido de perfusão deixa o oxigenador, saturado de O₂ e CO₂, aquecido a 37°C e com pH 7,4, passa pelo capta-bolhas e se desloca em direção à cânula a ser inserida na veia porta.

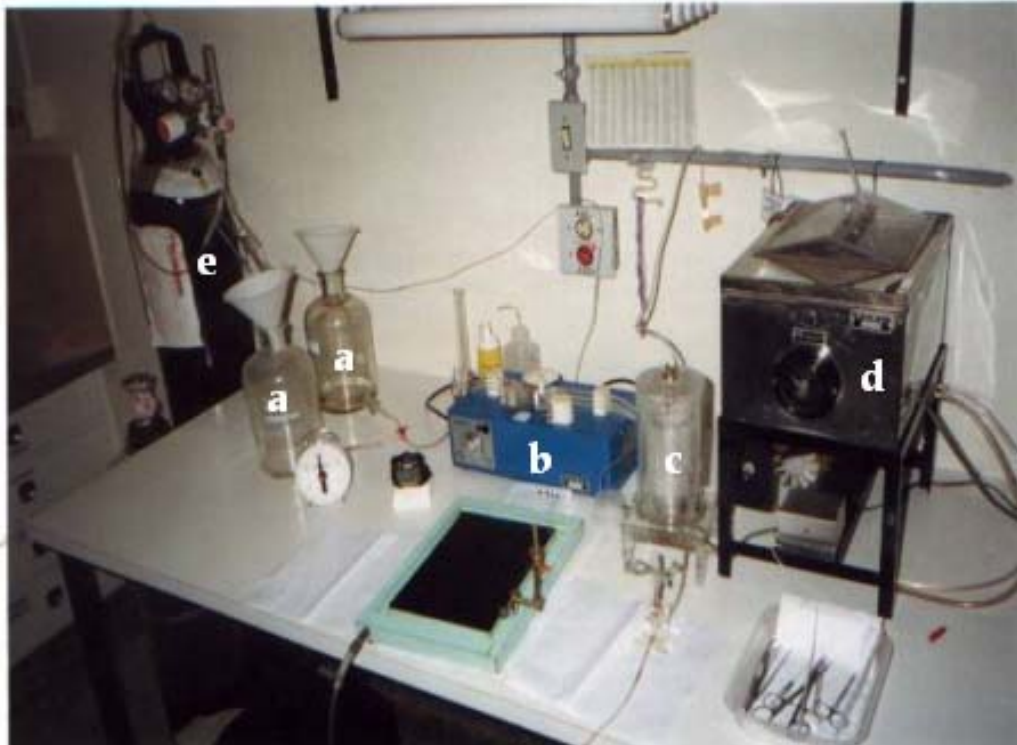


Figura 3 - Sistema de perfusão de fígado. Este sistema é formado por reservatórios (a) para o líquido de perfusão, uma bomba peristáltica (b), um oxigenador de membrana (c), acoplado a um banho-maria com bomba de circulação externa de água aquecida (d) e um cilindro com a mistura carbogênica (e).

Para a perfusão do fígado, os animais alimentados ou submetidos a 24 horas de privação alimentar, foram anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg de peso corpóreo) e fixados em mesa cirúrgica. O abdômen foi aberto até a altura do diafragma por uma incisão longitudinal central e duas incisões laterais, com exposição do fígado e dos demais órgãos. Ligaduras frouxas foram colocadas ao redor da veia cava inferior, logo acima da veia renal direita, e ao redor da veia porta. Em seguida, a veia porta foi canulada (figura 4) sob baixo fluxo, aproximadamente 0 mL/minuto e, imediatamente após a canulação, os vasos abdominais abaixo do fígado foram seccionados para que houvesse completo dessangramento deste órgão. Esta incisão dá vazão ao líquido extra que é bombeado para o sistema circulatório, evitando o aumento excessivo da pressão, o que causaria inchamento do fígado. Logo após, o fluxo foi elevado para garantir a oxigenação hepática, e a ligadura em torno da veia porta foi amarrada para fixação da cânula. O tórax foi aberto para exposição completa do fígado, e a veia cava inferior, acima do diafragma, foi ocluída para desviar o líquido para a veia cava inferior, abaixo do

fígado. Posteriormente, a veia cava inferior (porção infra-hepática) foi canulada (figura 4) para a coleta do líquido efluente (perfusado) que deixa o fígado através da veia hepática.

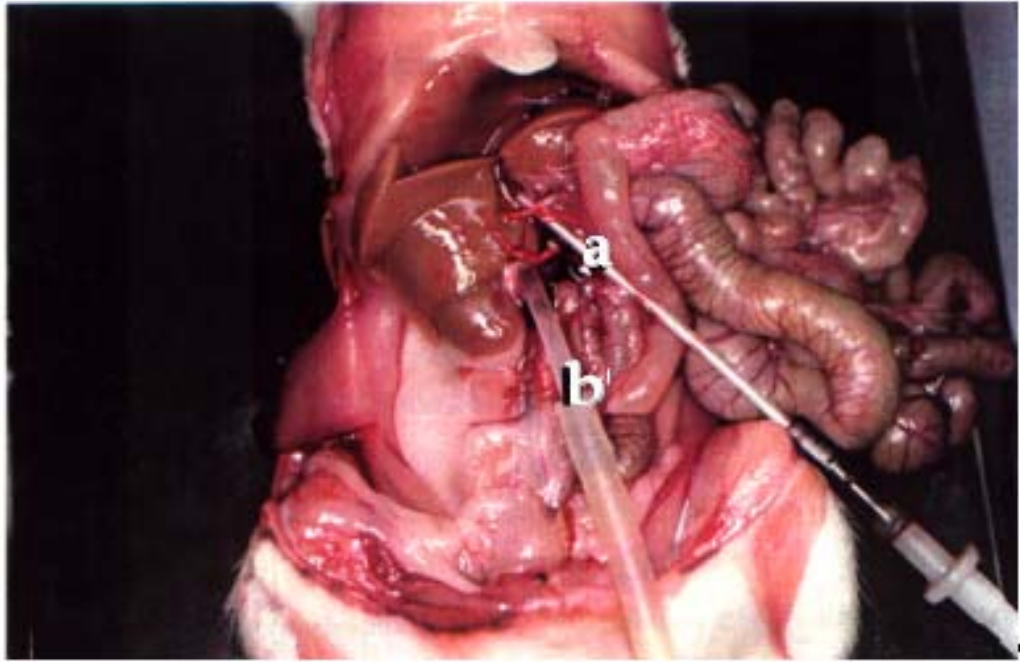


Figura 4 - Posições das cânulas no fígado nos experimentos de perfusão. As cânulas foram inseridas na veia porta (a) e na veia cava inferior (b).

Finalmente, o fluxo através do fígado foi ajustado para valores que permitissem a oxigenação adequada (cerca de $4 \text{ mL min}^{-1}\text{g}^{-1}$ de fígado).

Após os vinte minutos iniciais de perfusão, para a estabilização do consumo de oxigênio, amostras do perfusado foram coletadas em intervalos de dois minutos para a determinação de parâmetros bioquímicos (glicose, L-lactato, piruvato e uréia). Durante este período, a perfusão do fígado foi realizada por um dos seguintes modos:

a) 10 minutos com o tampão KH, 20 minutos com o tampão KH contendo precursores neoglicogênicos (L-alanina 2,5 mM ou glicerol 2 mM) na presença ou ausência (controle) do ácido clorogênico, nas concentrações de 0,33 mM ou 0,5 mM, e 20 minutos com o KH, como segue:

Intervalo de Tempo (min)	0-10	10-30	30-50
Grupo* Controle	KH**	KH + L-alanina 2,5 mM ou Glicerol 2 mM	KH
Grupo* Experimental	KH	KH + L-alanina 2,5 mM + Ácido clorogênico 0,33 mM ou KH + Glicerol 2 mM + Ácido clorogênico 0,5 mM	KH

*Animal com 24 horas de privação alimentar **KH= Krebs-Henseleit

b) 10 minutos com o tampão KH, 20 minutos com o tampão KH contendo L-lactato 2 mM e 40 minutos com o tampão KH contendo L-lactato 2 mM na presença ou ausência (controle) do ácido clorogênico 1 mM, conforme esquema abaixo:

Intervalo de Tempo (min)	0-10	10-30	30-70
Grupo* Controle	KH**	KH + L-lactato 2 mM	KH + L-lactato 2 mM
Grupo* Experimental	KH	KH + L-lactato 2 mM	KH + L-lactato 2 mM + Ácido clorogênico 1 mM

*Animal com 24 horas de privação alimentar **KH= Krebs-Henseleit

c) 10 minutos com o tampão KH, 30 minutos com o tampão KH contendo glucagon 1 nM, na presença ou ausência (controle) do ácido clorogênico 1 mM e 10 minutos com o KH, como ilustrado:

Intervalo de Tempo (min)	0-10	10-40	40-50
Grupo* Controle	KH**	KH + Glucagon 1 nM	KH
Grupo* Experimental	KH	KH + Glucagon 1 nM + Ácido clorogênico 1 mM	KH

*Animal alimentado **KH= Krebs-Henseleit

Ao final dos experimentos, o fígado foi retirado e pesado para que as produções de glicose, L-lactato, piruvato e uréia e as taxas de glicogenólise e glicólise por grama de fígado ($\mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) pudessem ser quantificadas.

4.3.3 Experimentos de Perfusão de Fígado *in situ* para Avaliação da Captação Hepática de Ácido Clorogênico

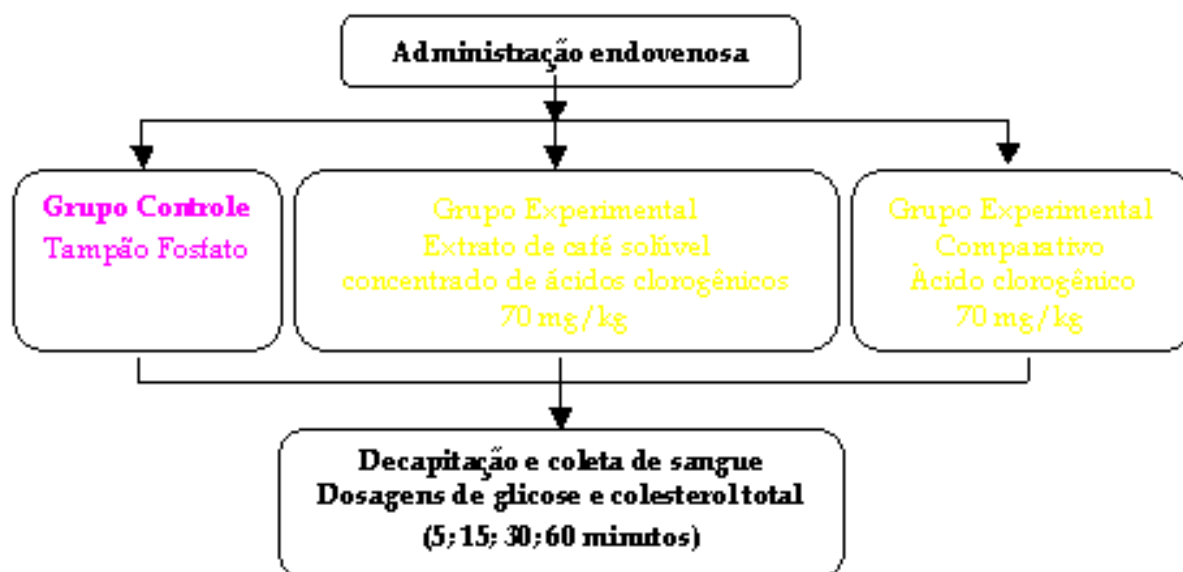
Para avaliar a captação do ácido clorogênico pelos hepatócitos, o ácido clorogênico (0,33 mM; 0,5 mM ou 1 mM), dissolvido no líquido de perfusão (KH), foi infundido em fígados de ratos e sua concentração foi determinada no líquido de perfusão antes da entrada no fígado e após a passagem pelo fígado (no perfusado).

4.3.4 Experimentos *in vivo* para Avaliação da Administração Endovenosa (efeito agudo) do Extrato de Café Solúvel Concentrado de Ácidos Clorogênicos e do Ácido Clorogênico sobre a Glicemia e a Concentração Plasmática de Colesterol Total

Nestes experimentos, ratos alimentados foram anestesiados com éter etílico e submetidos à injeção endovenosa (veia peniana) de um dos seguintes compostos:

- a) tampão fostato 5 mM, pH 7,4 (grupo controle);
- b) extrato de café solúvel concentrado de ácidos clorogênicos, dissolvido em tampão fostato, na concentração de 70 mg de ácidos clorogênicos/kg de peso corpóreo (grupo experimental);
- c) ácido clorogênico grau analítico também dissolvido no tampão fosfato, na concentração de 70 mg/kg de peso corpóreo (grupo experimental comparativo).

Transcorridos 5; 15; 30 e 60 minutos da administração endovenosa, os animais foram sacrificados por decapitação e o sangue coletado em tubos de ensaio heparinizados (vide esquema abaixo). As amostras de sangue foram refrigeradas imediatamente, centrifugadas, e o plasma coletado para as dosagens de glicose e colesterol total.



4.3.5 Experimentos *in vivo* para Avaliação da Administração Oral Sub-crônica do Extrato de Café Solúvel Concentrado de Ácidos Clorogênicos e do Ácido Clorogênico sobre a Glicemia e a Concentração Plasmática de Colesterol Total e Triacilgliceróis

Nestes experimentos, ratos alimentados foram submetidos à administração oral diária, por gavagem (figura 5), durante quinze dias (tratamento sub-crônico) de uma das seguintes substâncias:

- a) água (grupo controle);
- b) extrato de café solúvel concentrado de ácidos clorogênicos, na concentração de 100 mg de ácidos clorogênicos/kg de peso corpóreo (grupo experimental);
- c) ácido clorogênico grau analítico, 100 mg/kg de peso corpóreo (grupo experimental comparativo).

Durante o período de estudo foi avaliado o peso corpóreo dos animais e ao término deste período (15^o dia) os animais foram sacrificados por decapitação e o sangue coletado em tubos de ensaio heparinizados (vide esquema abaixo). As amostras de sangue foram refrigeradas imediatamente, centrifugadas, e o plasma coletado para as dosagens de glicose, colesterol total e triacilgliceróis

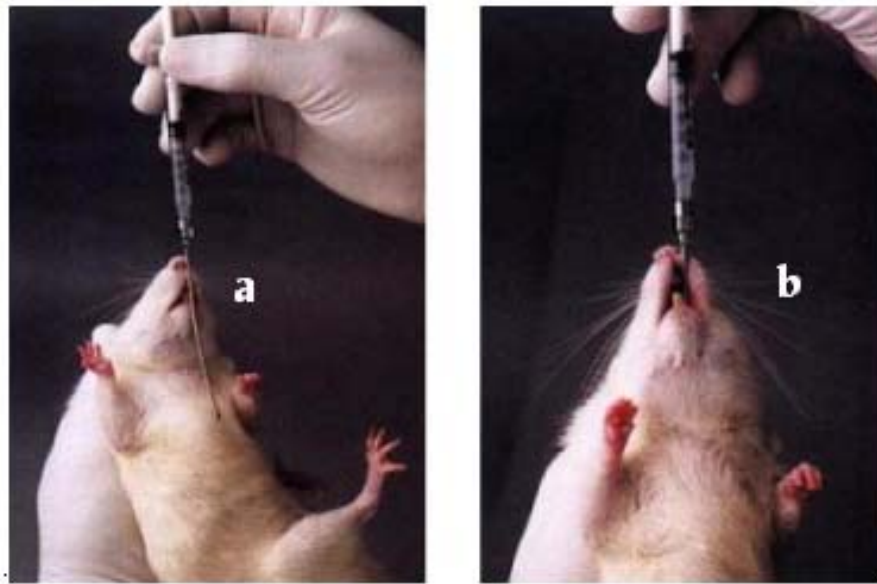
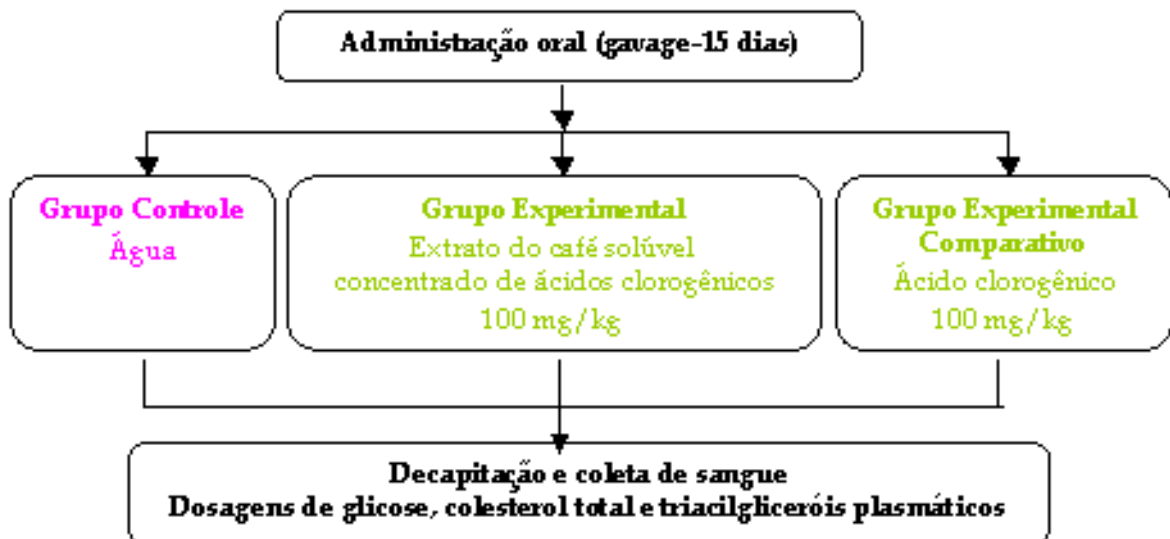


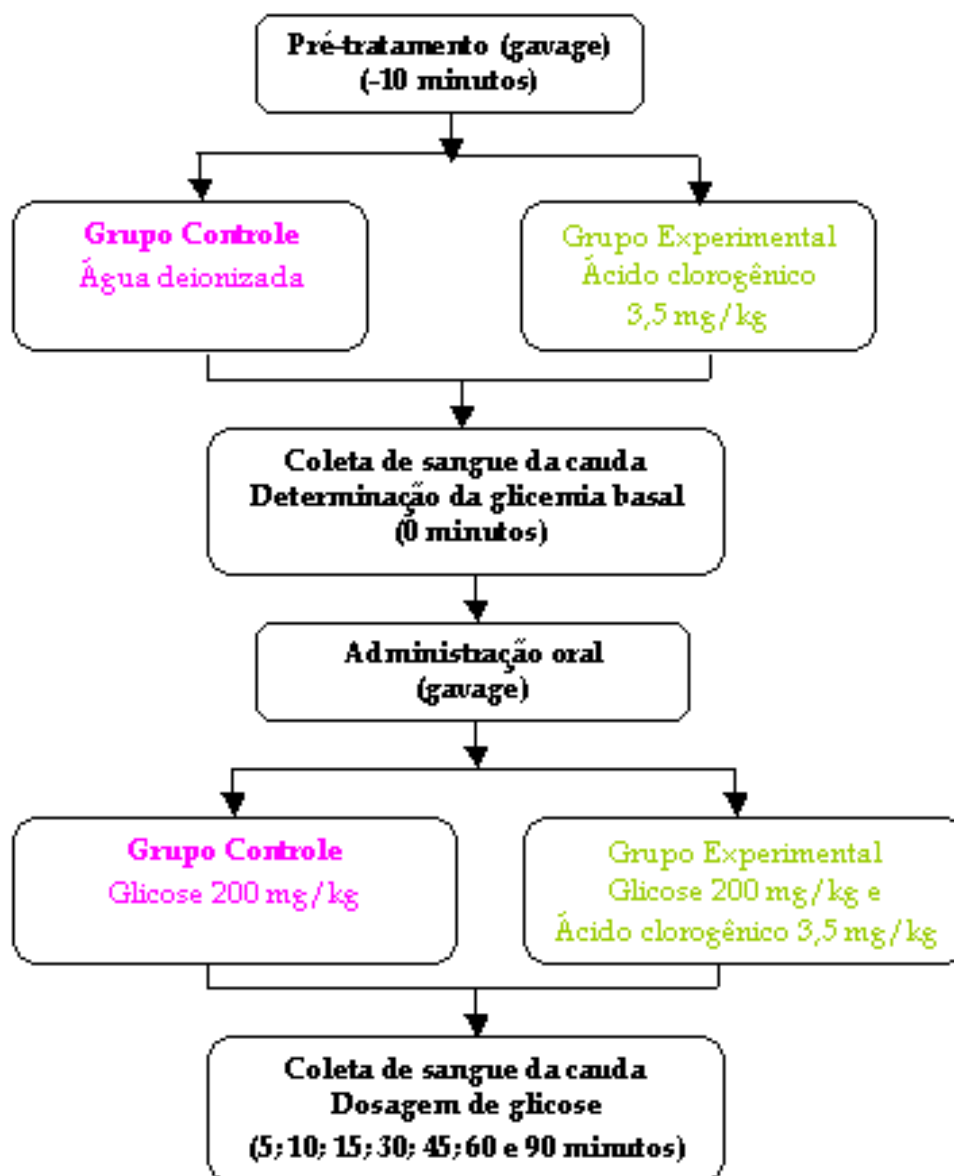
Figura 5 - Administração por gavagem. Para esse procedimento, uma agulha curva com ponta arredondada (a) é introduzida pela boca até o estômago do animal (b), de forma que se pode controlar exatamente a quantidade administrada (ANDERSEN *et al.*, 2004).



4.3.6 Experimentos *in vivo* para Avaliação do Efeito Agudo do Ácido Clorogênico Sobre o Teste de Tolerância à Glicose Oral

Para esta análise, conforme representado no fluxograma a seguir, foi feito um pré-tratamento com o ácido clorogênico 3,5 mg/kg ou água deionizada (grupo controle), por gavagem (figura 5), em ratos privados de alimentação por 24 horas. Após 10 minutos, coletou-se uma gota de sangue da ponta da cauda para determinação da glicemia através da fita teste do aparelho Accu-Chek Advantage II de determinação de glicose sangüínea. Esta primeira dosagem representou a glicemia basal (tempo 0 minutos). Imediatamente depois, outra gavagem foi realizada para administrar glicose na concentração de 200 mg/kg de peso corpóreo sem (grupo controle) ou com ácido clorogênico 3,5 mg/kg (grupo experimental). A partir desta segunda gavagem, foram feitas dosagens da glicose sangüínea pela fita teste nos tempos 5; 10; 15; 30; 45; 60 e 90 minutos para analisar a absorção intestinal da carga de glicose administrada.

Como a solução de ácido clorogênico apresenta pH ácido, de aproximadamente 2,8, experimentos utilizando o mesmo protocolo foram realizados para analisar o efeito do pH (pH=2,8) no teste de tolerância à glicose, acidez que foi obtida pela adição de ácido clorídrico (HCl) ao invés de ácido clorogênico nas soluções administradas por gavagem.



4.4 PROCEDIMENTO ANALÍTICO

Após a constatação inicial de que o ácido clorogênico interfere nas dosagens de glicose, colesterol e triacilgliceróis pelos métodos enzimáticos disponíveis comercialmente, métodos alternativos não enzimáticos para quantificação destes parâmetros metabólicos, nas amostras onde o ácido clorogênico estava presente (experimentos de perfusão de fígado e administração endovenosa), foram adotados.

Nos experimentos de administração oral dos ácidos clorogênicos, o sangue foi coletado depois de 20 horas da última administração destes compostos, o que garantiu que o ácido clorogênico, se absorvido, já estivesse completamente metabolizado (AZUMA *et al.*, 2000; HERLING *et al.*, 2002; OLTHOF *et al.*, 2003; OLTHOF; HOLLMAN; KATAN, 2001), viabilizando o uso de Kits enzimáticos para as dosagens de glicose, colesterol e triacilgliceróis.

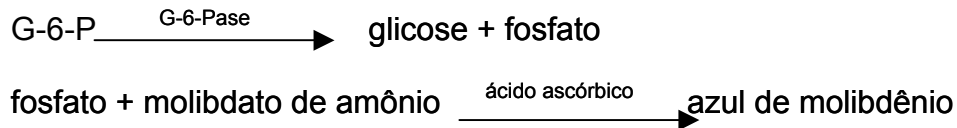
4.4.1 Determinação da Concentração de Proteína

A concentração de proteína na suspensão microsomal foi determinada no laboratório de Metabolismo Hepático da Universidade Estadual de Maringá pelo método de Lowry *et al.* (1982).

4.4.2 Determinação da Atividade da G-6-Pase Microsomal

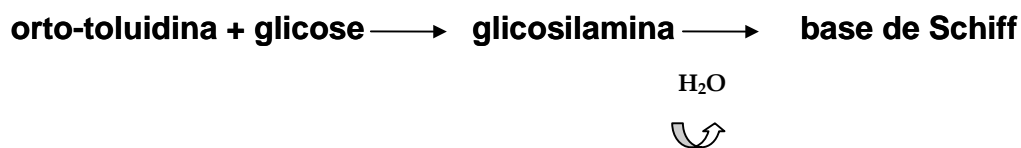
A atividade da enzima G-6-Pase foi determinada no laboratório de Metabolismo Hepático da Universidade Estadual de Maringá pela quantidade de fosfato liberado no meio (μmol de fosfato liberado/minuto, por mg de proteína da suspensão microsomal), conforme descrito por Fiske e Subbarow (1925).

As suspensões microsomais (0,2 a 0,3 mg de proteína/mL) foram incubadas em meio de reação contendo KCl 100 mM, Tris 20 mM, pH 6,5 e contendo ou não (controle) o ácido clorogênico ou o extrato de café solúvel concentrado de ácidos clorogênicos. A reação foi iniciada pela adição de G-6-P 10 mM e interrompida por desproteinização com ácido tricloroacético 5%. O fosfato liberado foi dosado no sobrenadante, após tamponamento com acetato de sódio e tampão acetato, por reação colorimétrica com molibdato de amônio, na presença de ácido ascórbico. O molibdato de amônio forma com o fosfato, o ácido fosfomolibdico, o qual é reduzido a azul de molibdênio pelo ácido ascórbico. A formação de cor é proporcional à concentração de fosfato na amostra e medida espectrofotometricamente a 700 nm. Segue o princípio da reação:

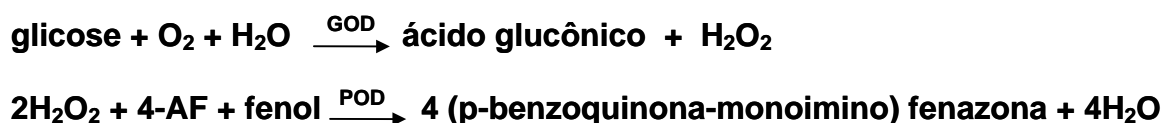


4.4.3 Determinação da Concentração de Glicose

A concentração de glicose no perfusado e no plasma após administração endovenosa de ácido clorogênico ou do extrato de café solúvel foi determinada pelo método da orto-toluidina de acordo com a técnica espectrofotométrica estabelecida por Dubowski (1962). Nesse método, a orto-toluidina reage com a glicose em solução aquecida de ácido acético e dá origem a base de Schiff, de cor verde, com o máximo de absorbância no comprimento de onda de 630 nm.



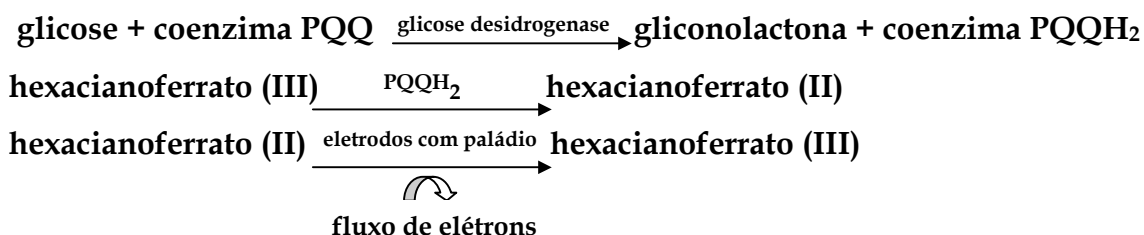
A concentração de glicose no plasma após administração oral de ácido clorogênico ou extrato de café solúvel foi medida pelo método da glicose-oxidase (BERGMEYER; BERNT, 1974). Neste método, conforme descrito pelas reações abaixo, a glicose é oxidada enzimaticamente pela glicose-oxidase (GOD) a ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio, em presença de peroxidase (POD), produz a ligação oxidativa do fenol com a 4-aminofenazona (4-AF) e dá origem a um cromógeno com máximo de absorção em 505 nm.



A aferição da glicose sangüínea nos experimentos do teste de tolerância à glicose oral foi realizada pelo aparelho Accu-Chek Advantage II, de

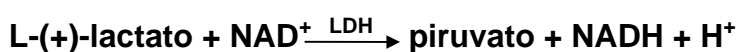
acordo com os princípios descritos no relatório de avaliação do sistema Advantage e tira de teste Advantage II do grupo Roche (2001).

Nesse sistema, a glicose é dosada a partir de uma gota de sangue colocada sobre uma fita teste, onde, conforme esquematizado abaixo, a glicose é oxidada pela glicose desidrogenase a gliconolactona. Essa reação promove a redução da coenzima PQQ a PQQH₂, a qual irá também reduzir o hexacianoferrato (III) a hexacianoferrato (II). Após, eletrodos contendo paládio reoxidam o hexacianoferrato (II) a hexacianoferrato (III) e esse processo implica na liberação de um fluxo de elétrons que é proporcional à concentração de glicose na amostra. Uma vez iniciada a reação, a fita teste é inserida no aparelho Accu-Chek Advantage II que interpreta o fluxo de elétrons (dosagem por amperimetria) e o traduz em valor de glicemia em seu monitor.



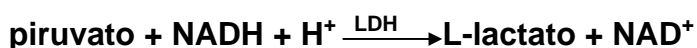
4.4.4 Determinação da Concentração de L-Lactato

A quantificação de L-lactato no perfusado foi realizada por um método enzimático, segundo a técnica de Gutman e Wahlefeld (1974). Nesse método, o L-lactato é oxidado a piruvato pelo NAD⁺ em uma reação catalisada pela lactato-desidrogenase (LDH), ocorrendo a formação de NADH, conforme ilustrado na reação abaixo. A quantidade de NADH formada é proporcional à concentração de L-lactato e medida espectrofotometricamente a 340 nm.



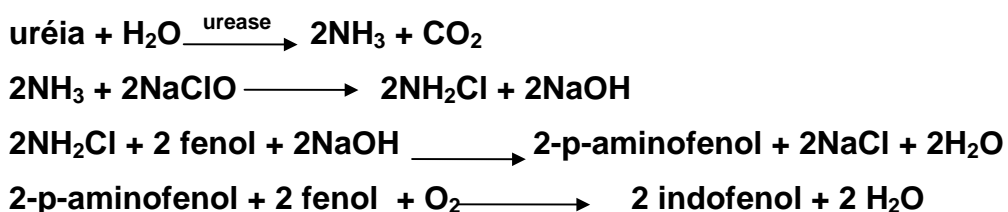
4.4.5 Determinação da Concentração de Piruvato

A concentração de piruvato no perfusado foi quantificada por um método enzimático, de acordo com técnica de Czok e Lamprecht (1974). Nesse método, o piruvato é convertido enzimaticamente em L-lactato, com oxidação de quantidades estequiométricas de NADH, em uma reação catalisada pela LDH, que pode ser observada abaixo. A oxidação de NADH é proporcional à quantidade de piruvato convertido e medida espectrofotometricamente a 340 nm.



4.4.6 Determinação da Concentração de Uréia

A concentração de uréia no perfusado foi determinada por um método enzimático, de acordo com a técnica de Gutmann e Bergmeyer (1974), no qual a uréia é hidrolisada pela urease a amônia e gás carbônico. A amônia reage em pH alcalino com hipoclorito de sódio e fenol, sob ação catalisadora do nitroprussiato de sódio, para formar azul de indofenol, como segue:



A concentração de azul de indofenol é proporcional à concentração de uréia na amostra e é medida espectrofotometricamente a 600 nm.

4.4.7 Determinação das Taxas de Glicogenólise e Glicólise

A glicogenólise foi calculada como a soma da produção hepática de glicose + $\frac{1}{2}$ da soma da produção hepática de L-lactato + piruvato, e a glicólise como a soma da produção hepática de L-lactato + piruvato (LOPES *et al.*, 1998).

4.4.8 Determinação da Concentração de Ácido Clorogênico

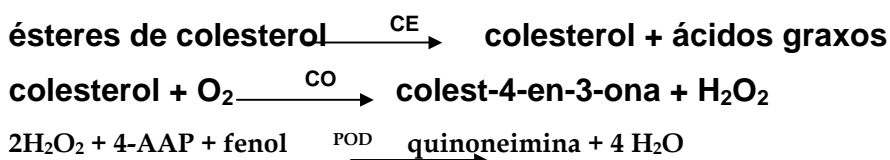
O ácido clorogênico das amostras foi quantificado pelo laboratório de pesquisa da Companhia Iguaçu de Café Solúvel utilizando-se HPLC-DAD, nas mesmas condições cromatográficas descritas por Ky, Noirot e Hamon (1997), sendo as principais especificações: a) utilização de uma coluna C18 de 250 X 4 mm Merck Supherspher; b) temperatura de 30°C; c) fluxo de 0,8 mL/min; d) programa de eluição a partir dos solventes A (ácido fosfórico 2 mM pH 2,7 e 5% de metanol) e B (metanol com 5% de ácido fosfórico 2 mM pH 3,9), onde em 45 minutos de gradiente linear passou-se da mistura A-B (75/25) para o solvente B puro e e) detecção em 325 nm (BASSOLI; VIGNOLI; ALCÂNTARA, 2005). Os critérios adotados pelo laboratório de pesquisa da indústria de café solúvel para quantificação dos isômeros do ácido clorogênico foram devidamente descritos no trabalho de Bassoli, Vignoli e Alcântara já citado.

4.4.9 Determinação da Concentração do Colesterol Total

A concentração de colesterol total no plasma após administração endovenosa de ácido clorogênico ou do extrato de café solúvel foi determinada espectrofotometricamente após a ocorrência da reação de Liebermann-Buchard (VILLELA; BACILA; TASTALDI, 1973), onde o colesterol, em solução clorofórmica com anidro acético e ácido sulfúrico, sofre uma reação que dá origem a um

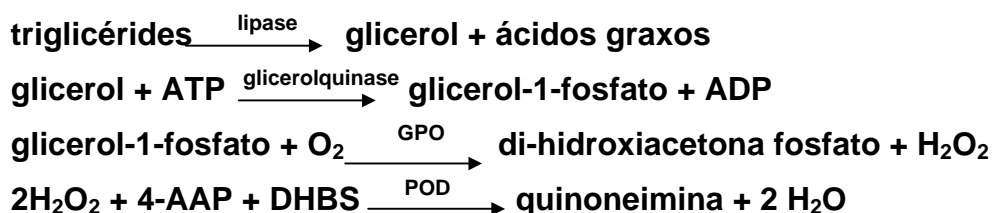
cromógeno verde que tem o máximo de absorção no comprimento de onda de 630 nm.

A concentração de colesterol total no plasma após administração oral de ácido clorogênico ou extrato de café solúvel foi determinada por um método enzimático, conforme descrito por Tietz (1995), onde os ésteres de colesterol são clivados a colesterol e ácidos graxos pela colesterol-esterase (CE), o colesterol resultante é oxidado enzimaticamente pela colesterol-oxidase (CO) a peróxido de hidrogênio e colest-4-en-3-ona. O peróxido de hidrogênio, em presença da peroxidase (POD), produz a ligação oxidativa do fenol com a 4-aminoantipirina (4-AAP) e dá origem a um cromógeno com máximo de absorção no comprimento de onda de 505 nm.



4.4.10 Determinação da Concentração dos Triacilgliceróis

A concentração de triacilgliceróis no plasma após administração oral de ácido clorogênico ou extrato de café solúvel foi determinada por um método enzimático baseado na reação de Trinder (1969). No método enzimático utilizado, os triacilgliceróis são convertidos pela lipase a glicerol e ácidos graxos, o glicerol a glicerol-1-fosfato pela glicerolquinase e o glicerol-1-fosfato resultante é oxidado enzimaticamente pela glicerol-1-fosfato oxidase (GPO) a peróxido de hidrogênio e di-hidroxiacetona fosfato. O peróxido de hidrogênio, em presença da peroxidase (POD), produz a ligação oxidativa do 3,5-dicloro-2-hidroxibenzenosulfonato (DHBS) com a 4-AAP e dá origem a um cromógeno com o máximo de absorção no comprimento de onda de 505 nm.



4.5 PROCEDIMENTO ESTATÍSTICO

Os experimentos foram realizados de forma inteiramente casualizada e todos os dados obtidos foram testados quanto à distribuição normal (testes de Shapiro-Wilk e Lilliefors) e à homogeneidade das variâncias (testes de Levene e Brown Forsythe). Na constatação de que foram satisfeitas as condições para aplicação dos testes estatísticos paramétricos de comparação de médias, as seguintes análises estatísticas foram realizadas:

a) as diferenças entre as glicemias dos grupos controle e experimental nos experimentos do teste de tolerância à glicose oral, no tempo discretizado, e entre as áreas sob as curvas (AUCs) na perfusão de fígado foram avaliadas pelo teste t de Student para amostras independentes. As AUCs foram calculadas, no intervalo de tempo onde o fígado foi submetido à perfusão com o ácido clorogênico, pelo programa GRAPHPAD PRISM 4.0 e a comparação entre as mesmas foi possível em razão das curvas apresentarem as mesmas bases, o que permitiu admitir que a comparação ocorreu entre as alturas médias dos pontos do grupo controle e do grupo experimental;

b) os resultados da captação hepática de ácido clorogênico, em diferentes concentrações e diferentes tempos de perfusão, foram avaliados de forma pareada pelo teste t de Student para amostras dependentes;

c) os dados dos experimentos de atividade da G-6-Pase e de administração *in vivo*, no tempo discretizado, por terem apresentado as devidas características de independência, foram comparados por Análise de Variância Unidimensional (ANOVA), seguida do teste Tukey para mesmo número ou número diferente de repetições, dependendo do caso (GOMES, 2000).

Nos conjuntos de dados em que não foram observadas distribuição normal e, principalmente, a homogeneidade das variâncias, testes estatísticos não-paramétricos foram adotados. Para comparação dos dados de captação hepática de ácido clorogênico de forma pareada, foi utilizado o teste de Wilcoxon para amostras dependentes. Para avaliação dos resultados dos protocolos com mais de dois tratamentos dos experimentos *in vivo*, que foram caracterizados como independentes, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis (GOMES, 2000).

Os resultados foram expressos como média dos resultados \pm desvio padrão. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa STATISTICA 5.1 e adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DO EFEITO DO ÁCIDO CLOROGÊNICO E DO EXTRATO DE CAFÉ SOLÚVEL COM ALTAS CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDOS CLOROGÊNICOS SOBRE A ATIVIDADE DA G-6-PASE

Como pode ser observado na figura 6, todas as concentrações testadas de ácido clorogênico, superiores a 0,25 mM, promoveram inibição da atividade da G-6-Pase na fração microssomal de hepatócitos, sendo que na maior concentração utilizada (1 mM), observou-se um efeito inibitório de aproximadamente 40% ($p < 0,05$).

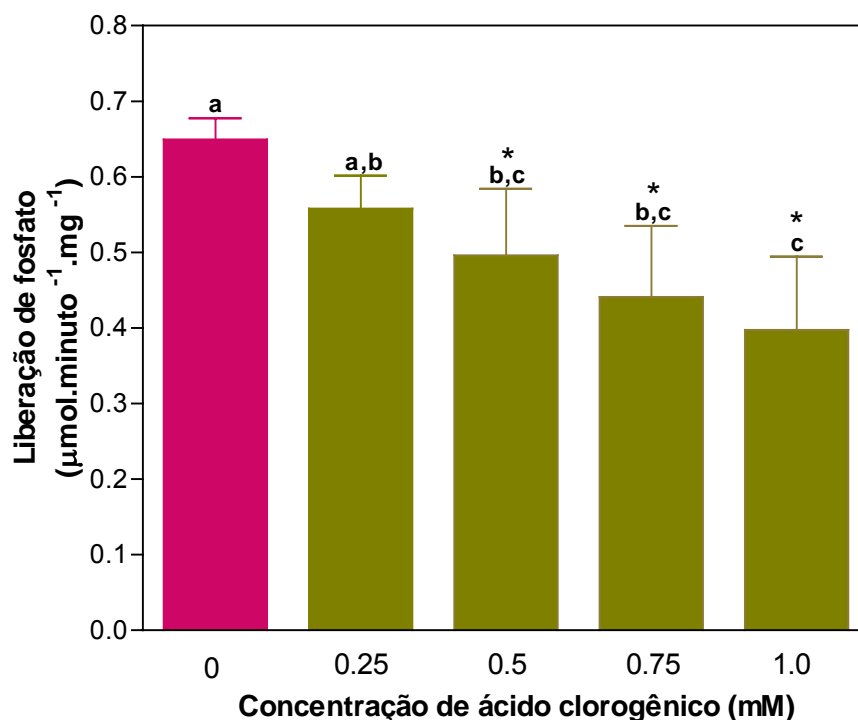


Figura 6 – Efeito do ácido clorogênico na atividade da G-6-Pase. Fígados de ratos com 24 horas de privação alimentar foram homogeneizados e submetidos à centrifugação diferencial como descrito em Métodos. A fração microssomal foi utilizada para o ensaio da atividade da G-6-Pase na ausência (■) ou presença (■) de várias concentrações de ácido clorogênico. Cada barra representa a média \pm desvio padrão de 5 determinações. Resultados analisados por ANOVA seguida de Tukey. Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$). * Diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

O extrato de café solúvel com altas concentrações de ácidos clorogênicos (37,8%) inibiu também, de uma maneira dose-dependente, a atividade da G-6-Pase na fração microssomal de hepatócitos. Efeito inibitório de aproximadamente 40% foi obtido para a concentração de 2 mg de extrato/mL de suspensão microssomal e na concentração de 5 mg/mL o efeito inibitório do extrato sobre a G-6-Pase foi de aproximadamente 50% ($p < 0,05$). A única concentração do extrato que não promoveu inibição foi a de 0,25 mg/mL ($p > 0,05$) (figura 7).

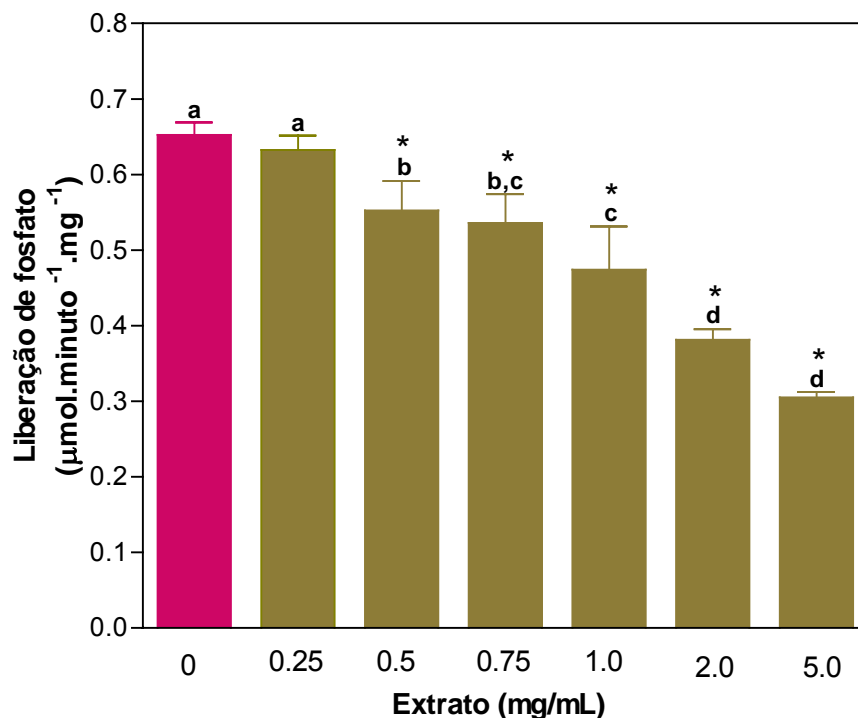


Figura 7 – Efeito do extrato de café solúvel com altas concentrações de ácidos clorogênicos na atividade da G-6-Pase. Fígados de ratos com 24 horas de privação alimentar foram homogeneizados e submetidos à centrifugação diferencial como descrito em Métodos. A fração microssomal foi utilizada para o ensaio da atividade da G-6-Pase na ausência (■) ou presença (■) de várias concentrações do extrato de café solúvel concentrado de ácidos clorogênicos. Cada barra representa a média \pm desvio padrão de 3 a 5 determinações. Resultados analisados por ANOVA seguida de Tukey. Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$). * Diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

5.2 ANÁLISE DO EFEITO DO ÁCIDO CLOROGÊNICO SOBRE A LIBERAÇÃO HEPÁTICA DE GLICOSE A PARTIR DA NEOGLICOGÊNESE E OUTROS PARÂMETROS METABÓLICOS

Nos primeiros 10 minutos de perfusão do fígado dos animais submetidos à privação alimentar, foram registradas baixas taxas de produção de glicose (figura 8A, 11A e 12A), piruvato (figura 9A) e uréia (figura 10A), correspondendo à produção basal. Esses parâmetros metabólicos tiveram sua produção aumentada após a infusão hepática dos precursores da neoglicogênese L-alanina (2,5 mM) (figuras 8A, 9A e 10A), glicerol (2 mM) (figura 11A) e L-lactato (2 mM) (figura 12A).

As figuras 8, 9 e 10 ilustram respectivamente a produção hepática de glicose, piruvato e uréia em fígados submetidos à perfusão com o precursor neoglicogênico L-alanina, na presença (grupo experimental) ou ausência (grupo controle) do ácido clorogênico 0,33 mM. Não houve diferença entre o aumento da produção hepática de glicose (figura 8B), piruvato (figura 9B) e uréia (figura 10B) a partir da L-alanina, nos grupos controle e experimental, como demonstrado pela análise das AUCs ($p > 0,50$). As AUCs dos grupos controle e experimental foram respectivamente, $4,43 \pm 0,69 \mu\text{mol.g}^{-1}$ e $4,35 \pm 1,10 \mu\text{mol.g}^{-1}$ para a produção de glicose (figura 8B), $4,61 \pm 0,97 \mu\text{mol.g}^{-1}$ e $4,64 \pm 1,14 \mu\text{mol.g}^{-1}$ para a produção de piruvato (figura 9B) e $5,58 \pm 1,95 \mu\text{mol.g}^{-1}$ e $4,44 \pm 2,26 \mu\text{mol.g}^{-1}$ para a produção de uréia (figura 10B). Estes resultados indicam ausência de efeito do ácido clorogênico, na concentração de 0,33 mM, sobre estes parâmetros metabólicos.

A infusão hepática de ácido clorogênico, na concentração de 0,5 mM, também não alterou significativamente a produção de glicose a partir do precursor glicerol (AUC= $6,17 \pm 1,86 \mu\text{mol.g}^{-1}$), em relação ao grupo controle (AUC= $6,33 \pm 1,68 \mu\text{mol.g}^{-1}$) ($p > 0,85$) (figuras 11A e 11B).

Mesmo diante da infusão de maior concentração de ácido clorogênico (1 mM), não foi constatado efeito sobre a produção hepática de glicose a partir do precursor L-lactato (AUC= $1,96 \pm 0,69 \mu\text{mol.g}^{-1}$), em comparação ao grupo controle (AUC= $1,10 \pm 0,39 \mu\text{mol.g}^{-1}$) ($p > 0,10$) (figuras 12A e 12B).

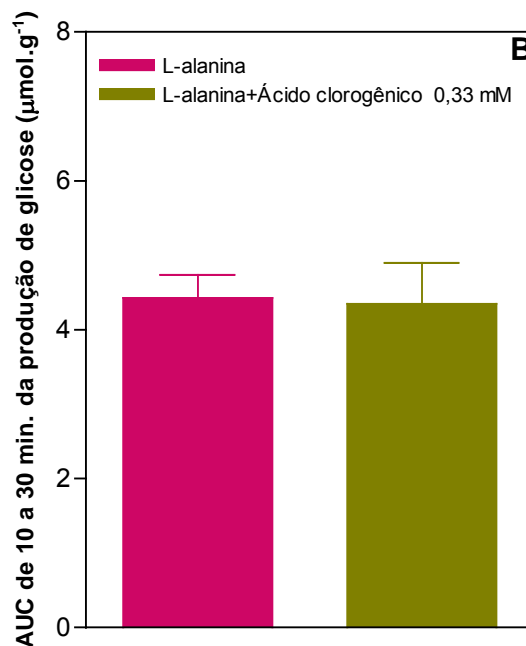
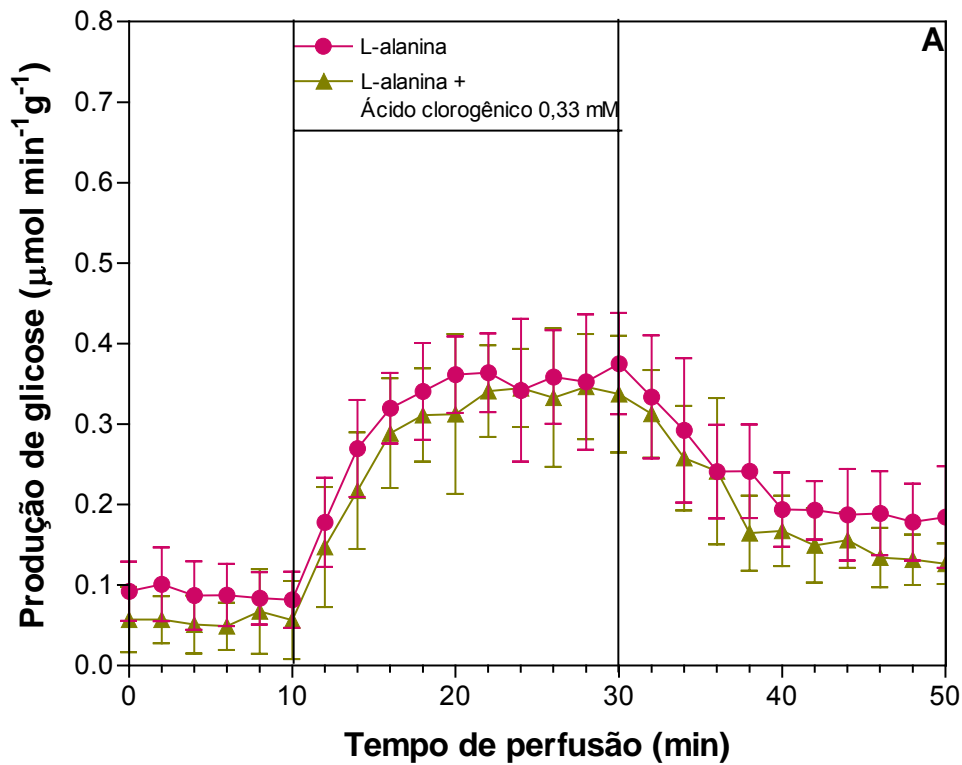


Figura 8 - Produção hepática de glicose a partir da L-alanina (A) e as respectivas áreas sob as curvas (B). Fígados de ratos com 24 horas de privação alimentar foram submetidos à perfusão *in situ* com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato. L-alanina 2,5 mM (●) ou L-alanina 2,5 mM + ácido clorogênico 0,33 mM (▲) foram infundidos no intervalo de 10 a 30 minutos. Amostras para dosagem de glicose foram coletadas em intervalos de 2 minutos. Cada ponto representa a média \pm desvio padrão de 4 ou 5 experimentos. Diferenças entre as AUCs dos grupos controle e experimental analisadas pelo teste t de Student para amostras independentes.

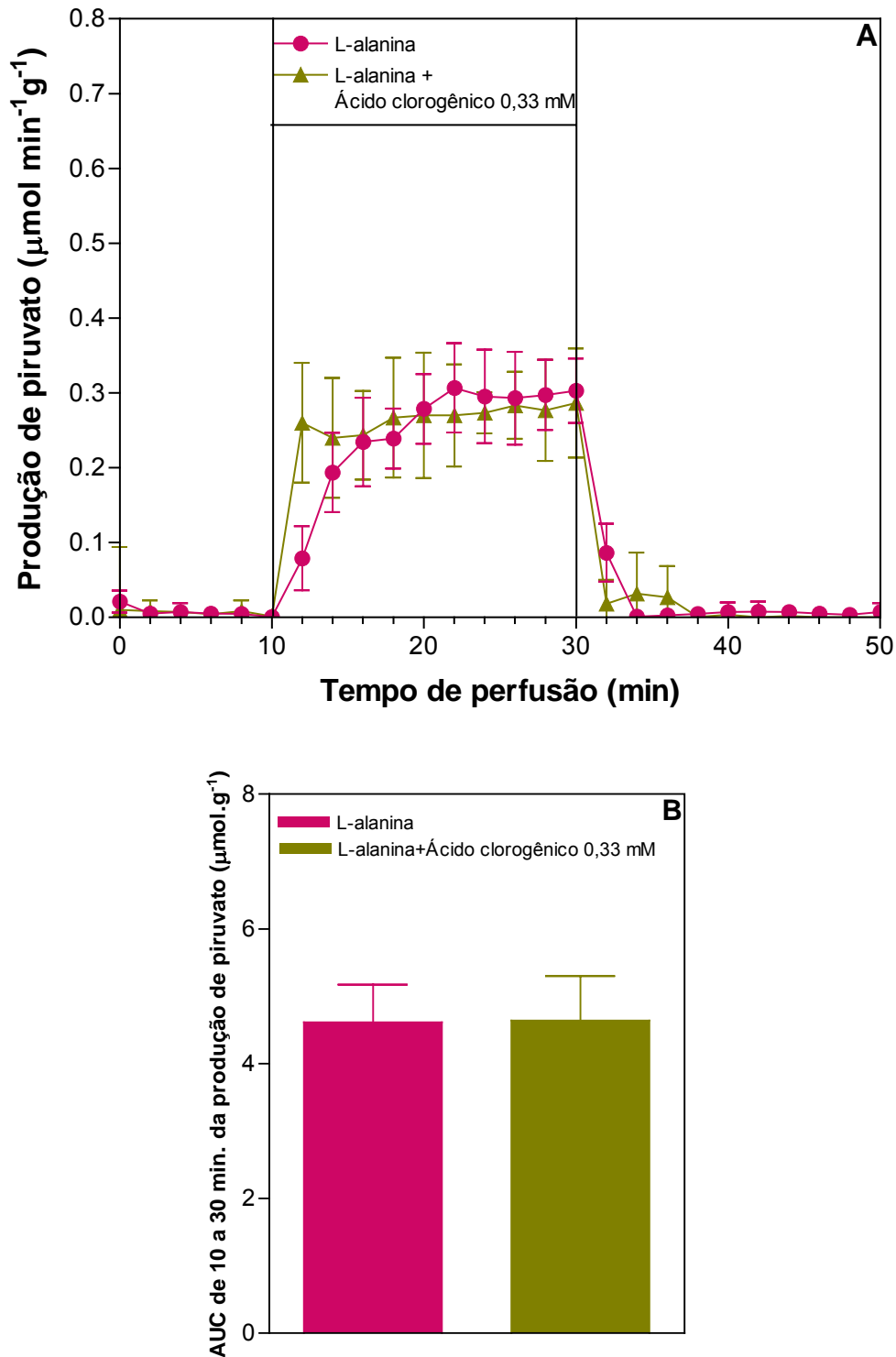


Figura 9 - Produção hepática de piruvato a partir da L-alanina (A) e as respectivas áreas sob as curvas (B). Fígados de ratos com 24 horas de privação alimentar foram submetidos à perfusão *in situ* com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato. L-alanina 2,5 mM (●) ou L-alanina 2,5 mM + ácido clorogênico 0,33 mM (▲) foram infundidos no intervalo de 10 a 30 minutos. Amostras para dosagem de piruvato foram coletadas em intervalos de 2 minutos. Cada ponto representa a média \pm desvio padrão de 3 experimentos. Diferenças entre as AUCs dos grupos controle e experimental analisadas pelo teste t de Student para amostras independentes.

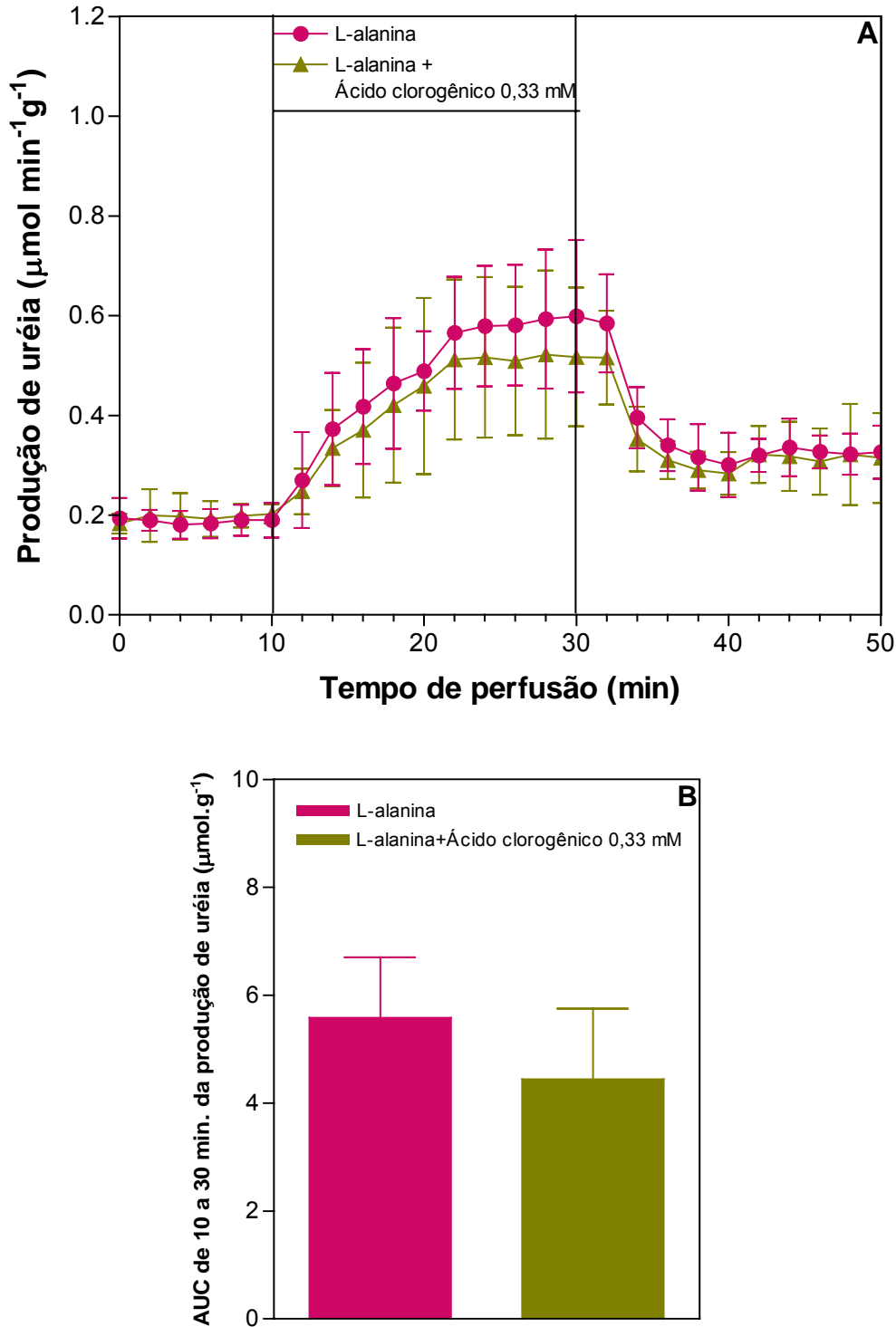


Figura 10 - Produção hepática de uréia a partir da L-alanina (A) e as respectivas áreas sob as curvas (B). Fígados de ratos com 24 horas de privação alimentar foram submetidos à perfusão *in situ* com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato. L-alanina 2,5 mM (●) ou L-alanina 2,5 mM + ácido clorogênico 0,33 mM (▲) foram infundidos no intervalo de 10 a 30 minutos. Amostras para dosagem de uréia foram coletadas em intervalos de 2 minutos. Cada ponto representa a média \pm desvio padrão de 3 experimentos. Diferenças entre as AUCs dos grupos controle e experimental analisadas pelo teste t de Student para amostras independentes.

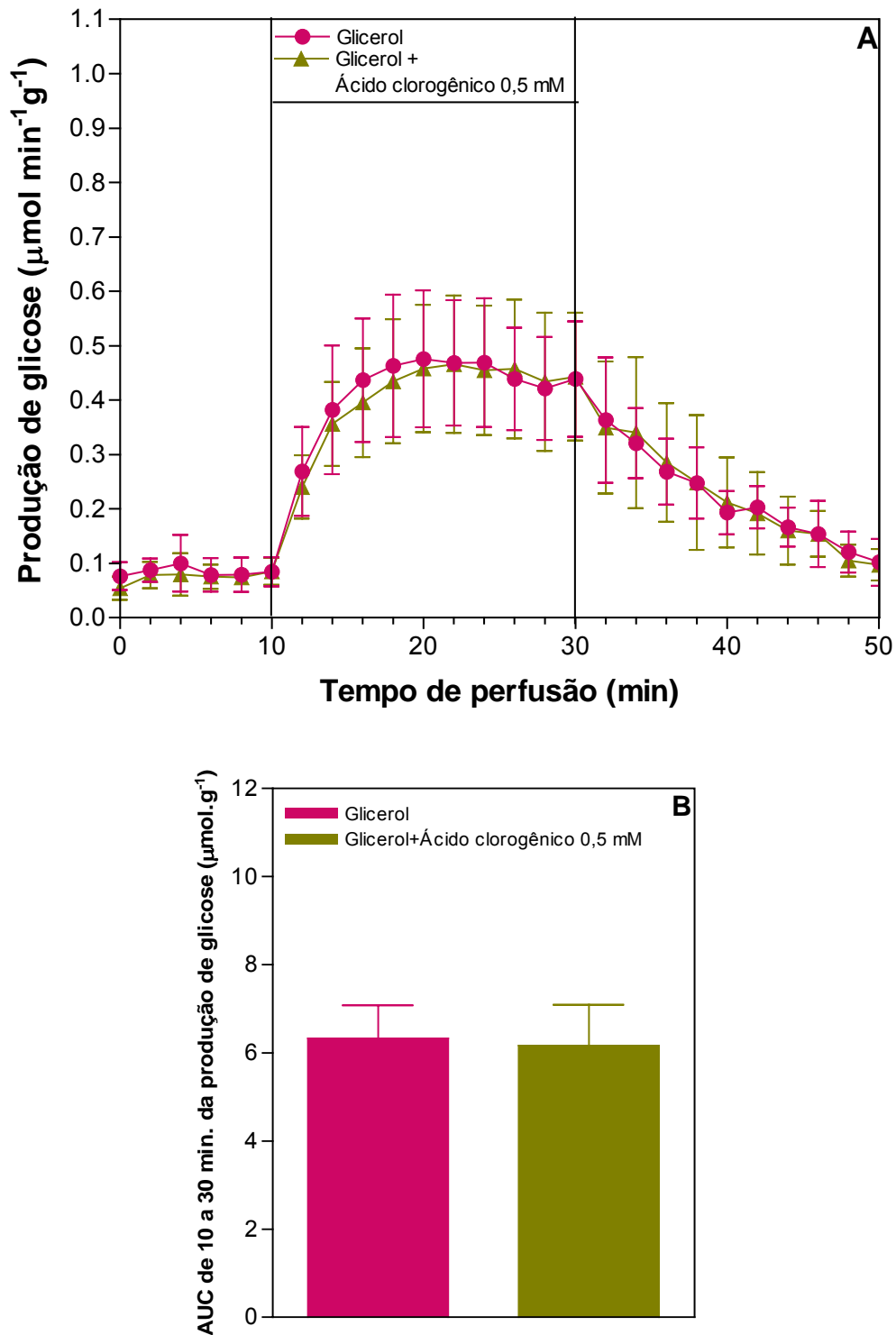


Figura 11 - Produção hepática de glicose a partir do glicerol (A) e as respectivas áreas sob as curvas (B). Fígados de ratos com 24 horas de privação alimentar foram submetidos à perfusão *in situ* com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato. Glicerol 2 mM (●) ou glicerol 2 mM + ácido clorogênico 0,5 mM (▲) foram infundidos no intervalo de 10 a 30 minutos. Amostras para dosagem de glicose foram coletadas em intervalos de 2 minutos. Cada ponto representa a média \pm desvio padrão de 4 ou 5 experimentos. Diferenças entre as AUCs dos grupos controle e experimental analisadas pelo teste t de Student para amostras independentes.

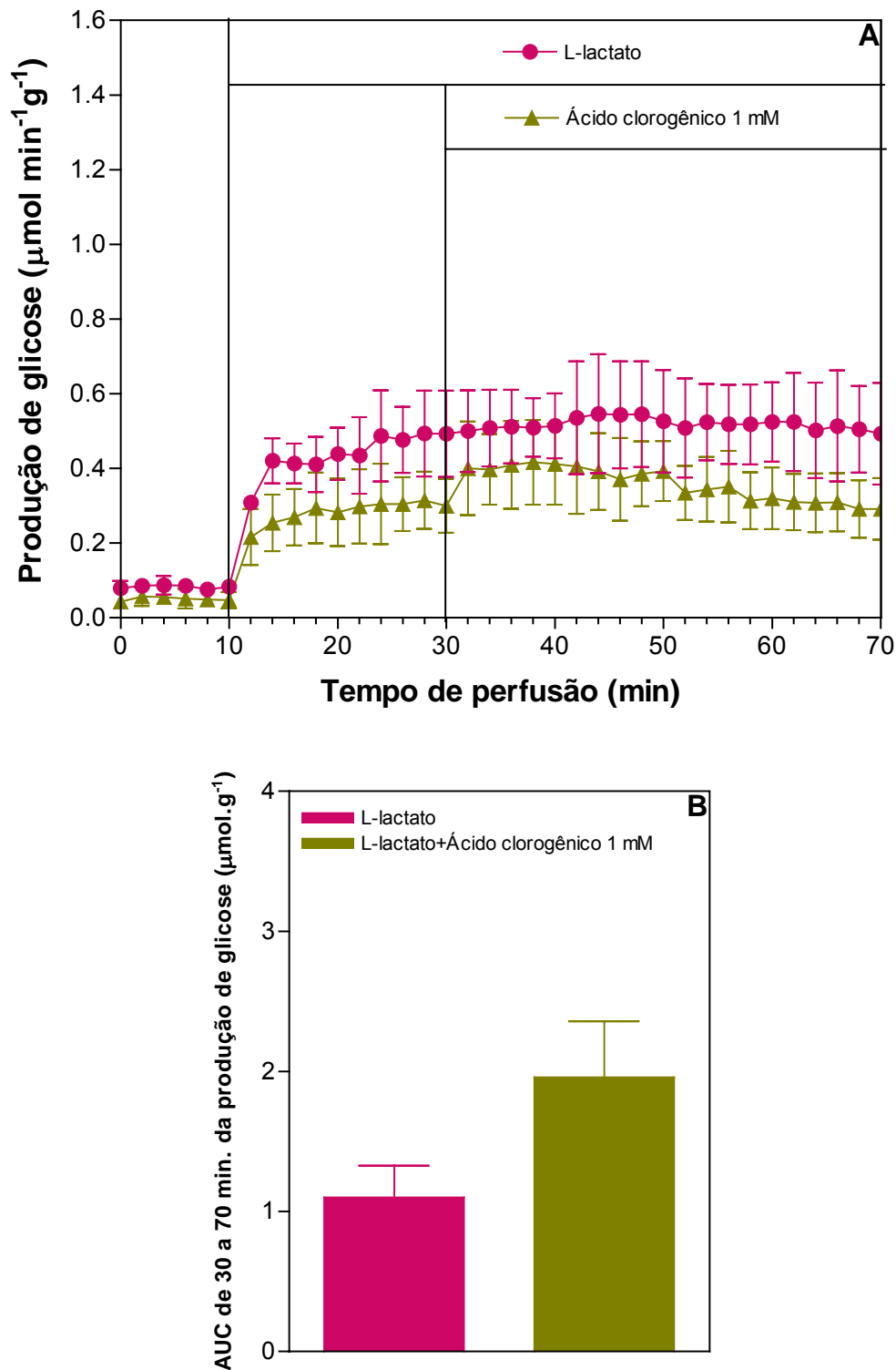


Figura 12 - Produção hepática de glicose a partir do L-lactato (A) e as respectivas áreas sob as curvas (B). Fígados de ratos com 24 horas de privação alimentar foram submetidos à perfusão *in situ* com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato. L-lactato 2 mM foi infundido no intervalo de 10 a 30 minutos e L-lactato 2 mM (●) ou L-lactato 2 mM + ácido clorogênico 1 mM (▲) foram infundidos dos 30 aos 70 minutos. Amostras para dosagem de glicose foram coletadas em intervalos de 2 minutos. Cada ponto representa a média \pm desvio padrão de 3 experimentos. Diferenças entre as AUCs dos grupos controle e experimental analisadas pelo teste t de Student para amostras independentes.

5.3 ANÁLISE DO EFEITO DO ÁCIDO CLOROGÊNICO SOBRE A LIBERAÇÃO HEPÁTICA DE GLICOSE A PARTIR DA GLICOGENÓLISE E OUTROS PARÂMETROS METABÓLICOS

Nos experimentos para avaliar o efeito do ácido clorogênico sobre a liberação hepática de glicose proveniente da glicogenólise, a infusão de glucagon (1 nM) no fígado, aos 10 minutos do período de perfusão, promoveu aumento da produção de glicose (figura 13A) e glicogenólise (figura 16A) nos grupos controle e experimental, os quais tenderam a retornar aos valores basais quando a infusão do glucagon foi interrompida. A produção hepática de glicose não foi alterada ($p > 0,06$) na presença do ácido clorogênico 1 mM, como demonstrado através das AUCs do grupo controle ($81,71 \pm 10,09 \mu\text{mol.g}^{-1}$) e experimental ($63,40 \pm 13,61 \mu\text{mol.g}^{-1}$) (figura 13B). O ácido clorogênico também não alterou ($p > 0,35$) as taxas de glicogenólise ($58,94 \pm 8,97 \mu\text{mol.g}^{-1}$) em relação ao grupo controle ($73,46 \pm 22,80 \mu\text{mol.g}^{-1}$) (figura 16B).

O glucagon causou, ainda, redução nas produções de L-lactato (figura 14A) e de piruvato (figura 15A), que não foram alteradas na presença do ácido clorogênico ($p > 0,06$), como pode ser observado pela análise das AUCs (figura 14B e 15B). As AUCs da produção de L-lactato dos grupos controle e experimental foram respectivamente de $-13,75 \pm 3,66 \mu\text{mol.g}^{-1}$ e $-8,20 \pm 2,46 \mu\text{mol.g}^{-1}$ (figura 14B), enquanto as AUCs da produção de piruvato para esses grupos foram respectivamente de $-5,93 \pm 1,46 \mu\text{mol.g}^{-1}$ e $-4,46 \pm 2,81 \mu\text{mol.g}^{-1}$ (figura 15B).

Como a taxa de glicólise é calculada pela soma das produções de L-lactato e piruvato e esses dois parâmetros tiveram sua produção diminuída na presença do glucagon, a taxa de glicólise também sofreu redução na presença deste hormônio (figura 17A). No entanto, esta redução não foi alterada pelo ácido clorogênico ($p > 0,07$) (figura 17A), como demonstrado pelas AUCs. As AUCs da taxa de glicólise dos grupos controle e experimental foram respectivamente de $-22,52 \pm 3,98 \mu\text{mol.g}^{-1}$ e $-14,95 \pm 4,93 \mu\text{mol.g}^{-1}$ (figura 17B).

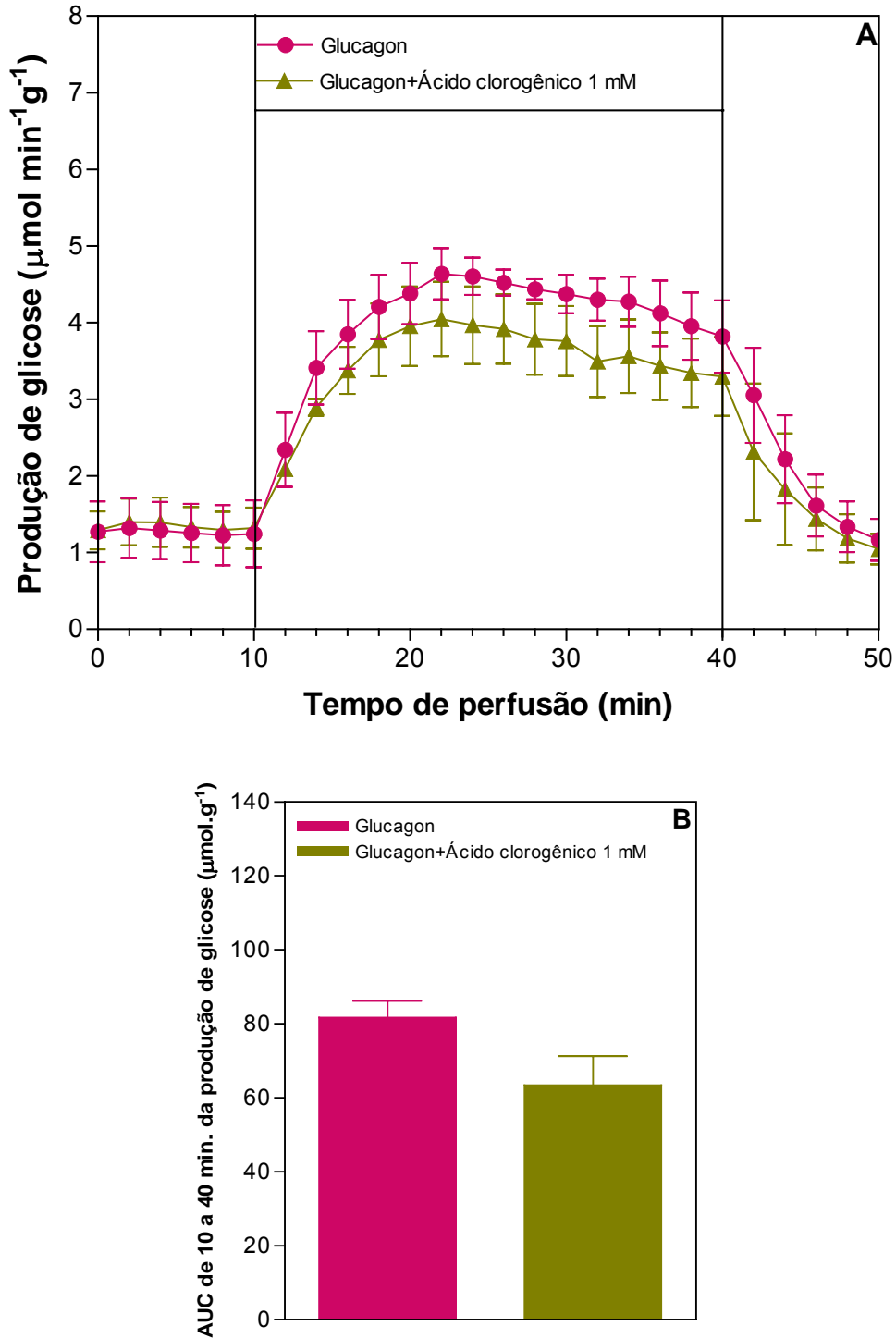


Figura 13 - Produção hepática de glicose estimulada pelo glucagon (A) e as respectivas áreas sob as curvas (B). Fígados de ratos alimentados foram submetidos à perfusão *in situ* com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato. Glucagon 1 nM (●) ou glucagon 1 nM + ácido clorogênico 1 mM (▲) foram infundidos no intervalo de 10 a 40 minutos. Amostras para dosagem de glicose foram coletadas em intervalos de 2 minutos. Cada ponto representa a média \pm desvio padrão de 3 a 5 experimentos. Diferenças entre as AUCs dos grupos controle e experimental analisadas pelo teste t de Student para amostras independentes.

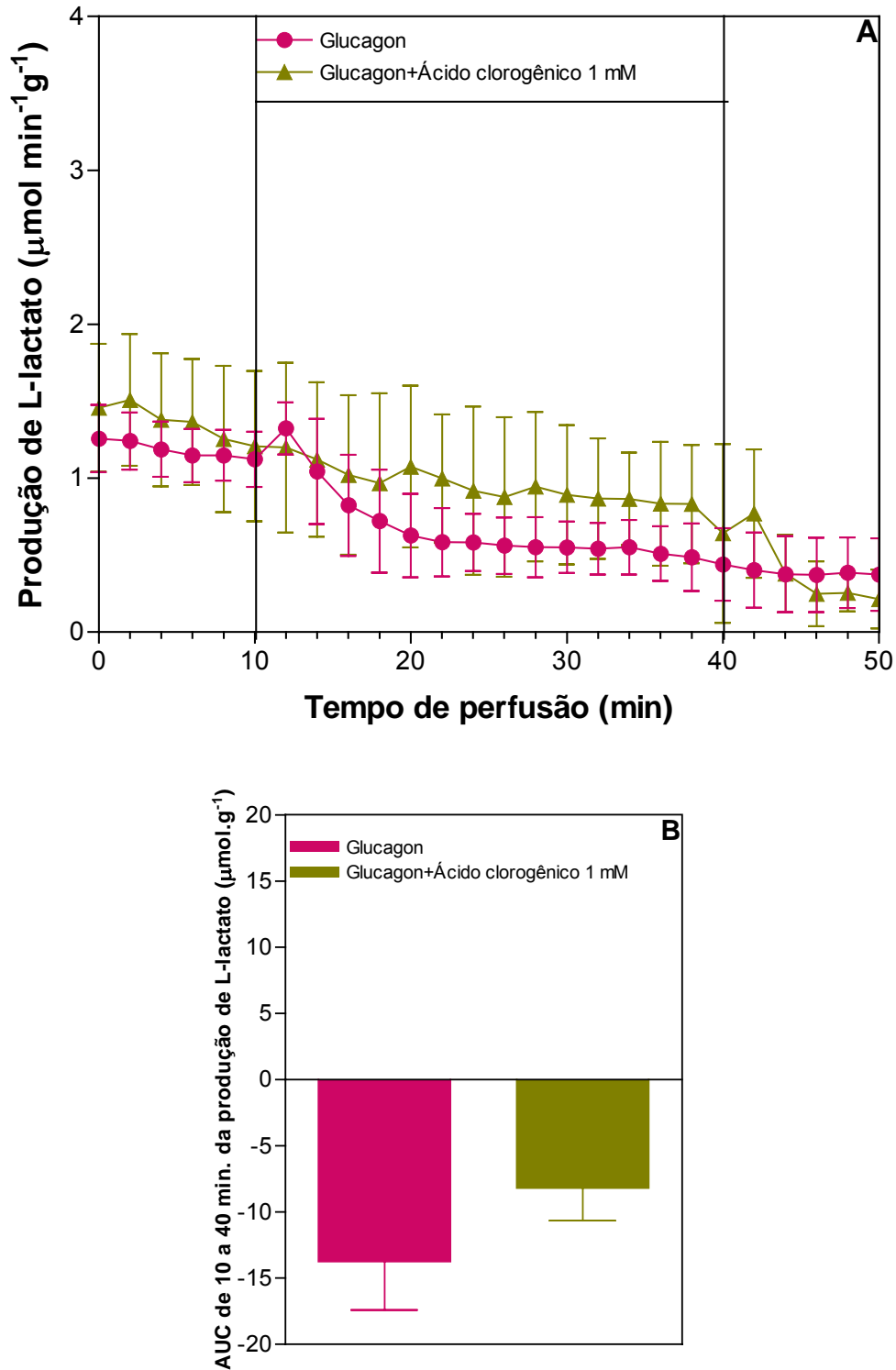


Figura 14 - Produção hepática de L-lactato na presença de glucagon (A) e as respectivas áreas sob as curvas (B). Fígados de ratos alimentados foram submetidos à perfusão *in situ* com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato. Glucagon 1 nM (●) ou glucagon 1 nM + ácido clorogênico 1 mM (▲) foram infundidos no intervalo de 10 a 40 minutos. Amostras para dosagem de L-lactato foram coletadas em intervalos de 2 minutos. Cada ponto representa a média \pm desvio padrão de 3 a 5 experimentos. Diferenças entre as AUCs dos grupos controle e experimental analisadas pelo teste t de Student para amostras independentes.

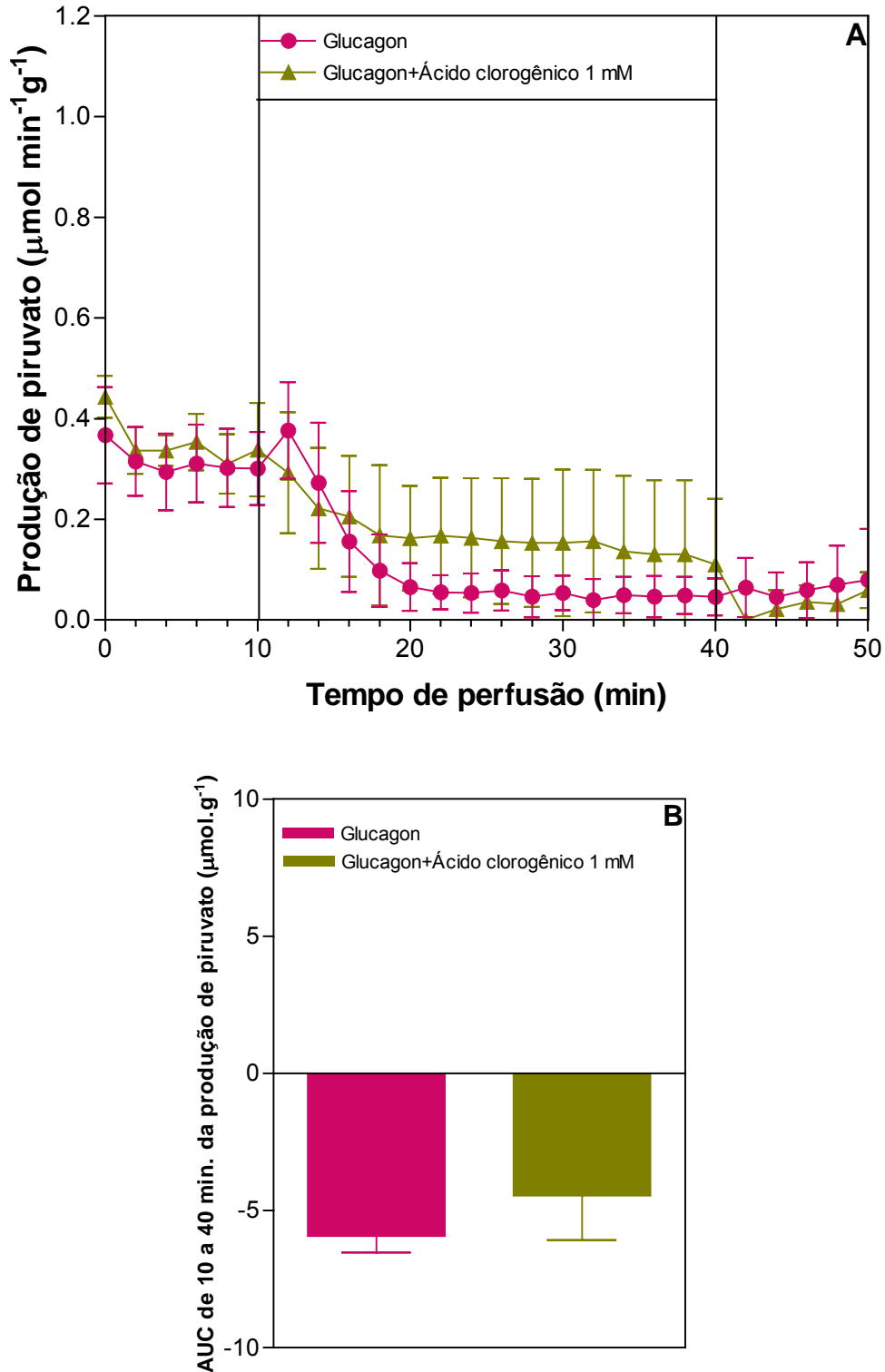


Figura 15 - Produção hepática de piruvato na presença de glucagon (A) e as respectivas áreas sob as curvas (B). Fígados de ratos alimentados foram submetidos à perfusão *in situ* com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato. Glucagon 1 nM (●) ou glucagon 1 nM + ácido clorogênico 1 mM (▲) foram infundidos no intervalo de 10 a 40 minutos. Amostras para dosagem de piruvato foram coletadas em intervalos de 2 minutos. Cada ponto representa a média \pm desvio padrão de 3 a 6 experimentos. Diferenças entre as AUCs dos grupos controle e experimental analisadas pelo teste t de Student para amostras independentes.

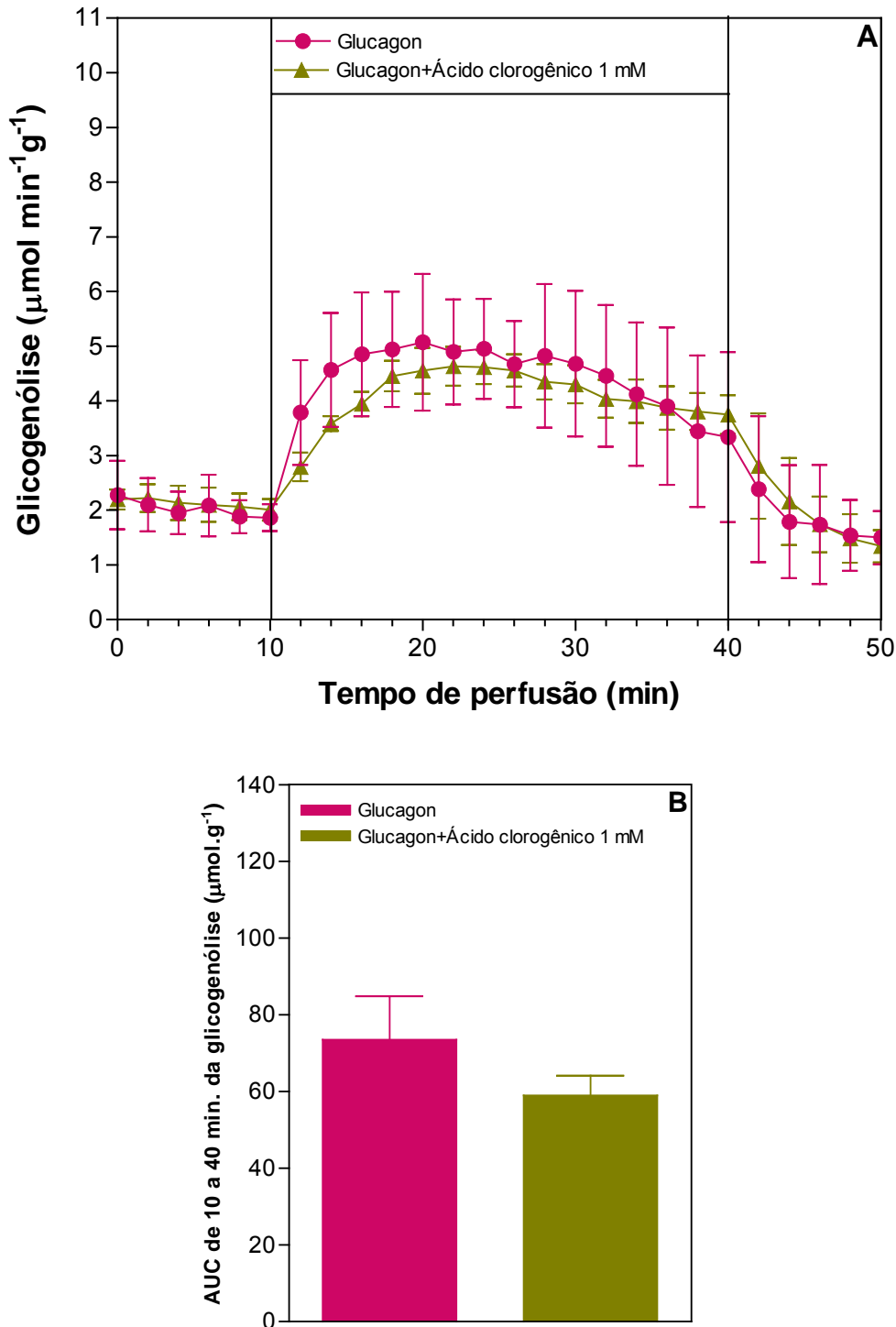


Figura 16 – Glicogenólise estimulada pelo glucagon (A) e as respectivas áreas sob as curvas (B). Fígados de ratos alimentados foram submetidos à perfusão *in situ* com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato. Glucagon 1 nM (●) ou glucagon 1 nM + ácido clorogênico 1 mM (▲) foram infundidos no intervalo de 10 a 40 minutos. Amostras para dosagens de glicose, L-lactato e piruvato foram coletadas em intervalos de 2 minutos. Cada ponto representa a média \pm desvio padrão de 3 ou 4 experimentos. Diferenças entre as AUCs dos grupos controle e experimental analisadas pelo teste t de Student para amostras independentes.

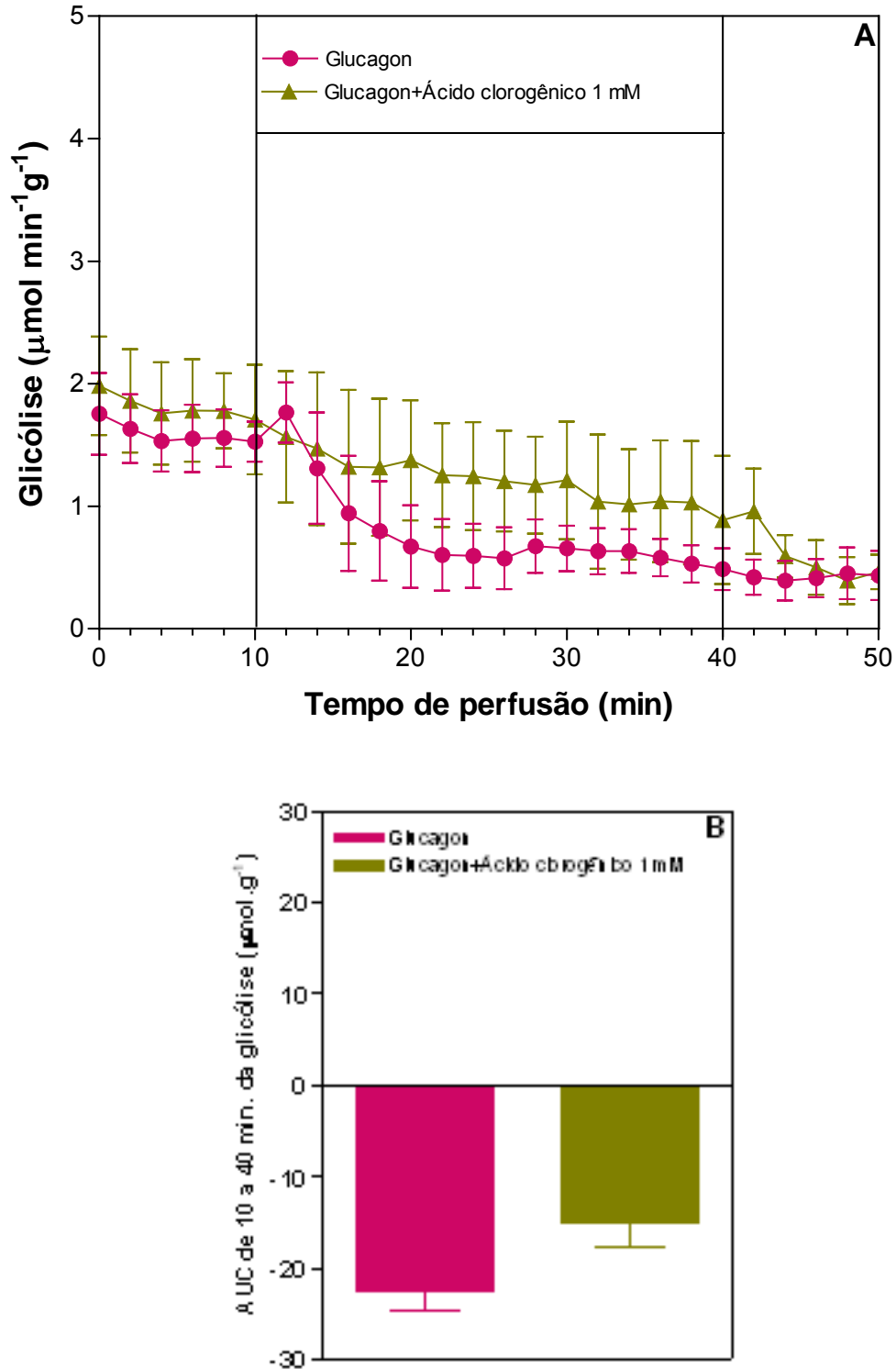


Figura 17 – Glicólise na presença de glucagon (A) e as respectivas áreas sob as curvas (B). Fígados de ratos alimentados foram submetidos à perfusão *in situ* com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato. Glucagon 1 nM (●) ou glucagon 1 nM + ácido clorogênico 1 mM (▲) foram infundidos no intervalo de 10 a 40 minutos. Amostras para dosagens de L-lactato e piruvato foram coletadas em intervalos de 2 minutos. Cada ponto representa a média \pm desvio padrão de 3 ou 4 experimentos. Diferenças entre as AUCs dos grupos controle e experimental analisadas pelo teste t de Student para amostras independentes.

5.4 AVALIAÇÃO DA CAPTAÇÃO HEPÁTICA DE ÁCIDO CLOROGÊNICO

Os resultados de experimentos de perfusão de fígado, utilizando diferentes tratamentos e concentrações de ácido clorogênico (0,33; 0,5 ou 1 mM) (tabela 1), demonstram que não houve diferenças ($p > 0,30$) entre as quantidades de ácido clorogênico infundidas (antes de entrar no fígado), e as detectadas no perfusado efluente (após a passagem pelo fígado), em diferentes tempos de perfusão (10; 20; 30 ou 50 minutos), o que sugere a ausência de captação hepática de ácido clorogênico.

Tabela 1 – Concentrações de ácido clorogênico antes e após a passagem pelo fígado. Ácido clorogênico em diferentes concentrações (0,33; 0,5 ou 1 mM) foi infundido no fígado (antes de entrar no fígado) e amostras do perfusado efluente (após a passagem pelo fígado) foram coletadas aos 10; 20; 30 ou 50 minutos para determinação da concentração de ácido clorogênico ($\mu\text{g/mL}$).

Ácido clorogênico antes de entrar no fígado	Ácido clorogênico após a passagem pelo fígado			
	10 min	20 min	30 min	50 min
59,32±6,22 (0,33 mM) (3)	61,49±6,15 (3)	----	----	----
96,77±15,69 (0,5 mM) (3)	94,40±5,17 (3)	----	----	----
261,76±19,57 (1 mM) (3)	259,02±26,14 (3)	----	276,99±8,34 (3)	267,77±6,52 (3)
247,41±26,33 (1 mM) (3)	----	228,95±31,91 (3)	----	----

Valores expressos como média \pm desvio padrão. Resultados analisados de forma pareada pelo teste t de Student para amostras dependentes e confirmados pelo teste não paramétrico de Wilcoxon, quando apropriado. () Número de experimentos.

5.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO AGUDO DA ADMINISTRAÇÃO ENDOVENOSA DO EXTRATO DE CAFÉ SOLÚVEL CONCENTRADO DE ÁCIDOS CLOROGÊNICOS E DO ÁCIDO CLOROGÊNICO SOBRE A GLICEMIA E CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE COLESTEROL

Nos experimentos de administração endovenosa do extrato de café solúvel concentrado de ácidos clorogênicos, na dose de 70 mg de ácidos clorogênicos/kg de peso corpóreo, ou do ácido clorogênico 70 mg/kg de peso corpóreo, não foram observadas alterações na glicemia ($p>0,15$) em nenhum dos grupos experimentais, nos tempos 5; 15; 30 e 60 minutos discretizados (tabela 2A).

O colesterol total plasmático também não foi alterado ($p>0,15$) em nenhum dos grupos experimentais em relação ao grupo controle (tabela 2B).

Tabela 2 – Concentrações plasmáticas de glicose (A) e colesterol total (B) após a administração endovenosa de extrato de café solúvel ou ácido clorogênico em ratos alimentados. A glicemia (mg/dL) e concentração de colesterol total plasmático (mg/dL) foram avaliadas aos 5; 15; 30 e 60 minutos após a administração endovenosa de extrato de café solúvel concentrado de ácidos clorogênicos (70 mg/kg) ou ácido clorogênico (70 mg/kg).

2A

Grupos	Glicemia			
	5 min	15 min	30 min	60 min
Controle	131,25±19,29 (7)	126,33±10,62 (9)	119,33±11,03 (9)	99,65±8,14 (9)
Extrato de café solúvel	137,03±10,39 (7)	122,02±11,30 (10)	115,51±8,50 (11)	106,92±10,58 (10)
Ácido clorogênico	134,32±7,97 (6)	115,08±16,04 (10)	123,22±9,25 (9)	103,70±10,41 (10)

2B

Grupos	Colesterol total			
	5 min	15 min	30 min	60 min
Controle	55,17±8,64 (8)	60,44±7,73 (10)	62,51±13,40 (11)	52,00±12,98 (9)
Extrato de café solúvel	47,99±5,00 (8)	68,92±19,62 (8)	59,26±13,14 (9)	52,29±11,15 (6)
Ácido clorogênico	59,74±9,28 (8)	55,47±12,94 (8)	65,34±9,73 (7)	61,28±16,55 (6)

Valores expressos como média ± desvio padrão. Resultados analisados por ANOVA (Tabela 2A). Diferenças entre os grupos controle e experimentais, no tempo discretizado, analisadas por ANOVA ou pelo seu equivalente não-paramétrico Kruskal-Wallis, quando apropriado (Tabela 2B).
() Número de Animais.

5.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO SUB-CRÔNICO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DO EXTRATO DE CAFÉ SOLÚVEL CONCENTRADO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO E DO ÁCIDO CLOROGÊNICO SOBRE A GLICEMIA E CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE COLESTEROL E TRIACILGLICERÓIS

A administração oral de extrato de café solúvel concentrado de ácidos clorogênicos na dose de 100 mg de ácidos clorogênicos/kg de peso corpóreo/dia, durante 15 dias, promoveu aumento na glicemia em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), enquanto a administração de ácido clorogênico 100 mg/kg de peso corpóreo/dia, não alterou a glicemia ($p > 0,05$) (tabela 3A).

Com relação aos lipídeos plasmáticos, não foram observadas diferenças nas concentrações de triacilgliceróis entre os grupos controle e experimentais ($p > 0,40$) (tabela 3A), enquanto a administração oral de ácido clorogênico aumentou o colesterol total em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

Pode-se, também, observar um aumento marginalmente significativo no colesterol total ($p = 0,055$), promovido pelo extrato de café solúvel em relação ao grupo controle (tabela 3A).

O ganho de peso corpóreo dos ratos não foi alterado pela administração oral de extrato de café solúvel ou ácido clorogênico ($p > 0,30$) (tabela 3B).

Tabela 3 - Concentrações plasmáticas de glicose, colesterol total e triacilgliceróis (A) e ganho de peso corpóreo (B) após a administração oral de extrato de café solúvel ou ácido clorogênico em ratos alimentados. A glicemia (mg/dL), concentração de colesterol total (mg/dL), triacilgliceróis plasmáticos (mg/dL) e o peso corpóreo (g) dos ratos foram avaliados após 15 dias de administração oral de extrato de café solúvel concentrado de ácidos clorogênicos (100 mg/kg/dia) ou ácido clorogênico (100 mg/kg/dia).

3A

Grupos	Glicemia	Colesterol total	Triacilgliceróis
Controle	114,53±7,67 ^b (9)	44,59±8,55 ^b (10)	62,52±20,97 (8)
Extrato de café solúvel	128,91±13,67 ^a (8)	57,31±11,37 ^{ab} (8)	70,74±14,74 (8)
Ácido clorogênico	120,54±9,13 ^{ab} (9)	61,87±11,35 ^a (8)	75,95±25,02 (8)

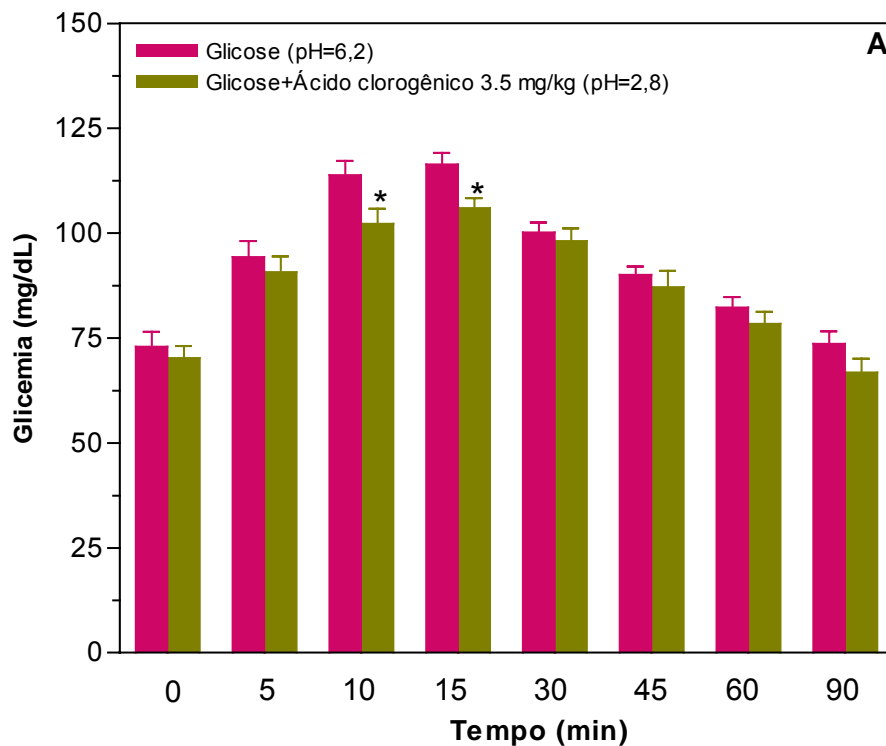
3B

Grupos	Peso inicial	Peso final	Ganho de peso
Controle	163,5±11,80 (10)	226±15,24 (10)	62,5 (10)
Extrato de café solúvel	160±13,54 (10)	235±20,41 (10)	75 (10)
Ácido clorogênico	161±10,75 (10)	225,5±18,63 (10)	64,5 (10)

Valores expressos como média ± desvio padrão. Resultados analisados por ANOVA (Tabelas 3A e 3B) seguida de Tukey (Tabela 3A). Médias com letras diferentes nas colunas representam diferença significativa ($p < 0,05$) () Número de animais.

5.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO AGUDO DO ÁCIDO CLOROGÊNICO SOBRE O TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE ORAL

A administração oral de ácido clorogênico 3,5 mg/kg reduziu significativamente ($p < 0,05$) o pico glicêmico nos animais submetidos ao teste de tolerância à glicose oral (figura 18A), sendo que aos 10 minutos do pico a redução foi de 21,76% e aos 15 minutos de 17,82% (figura 18B). A glicemia dos grupos controle e experimental foram de, respectivamente, $113,80 \pm 10,88$ mg/dL e $102,25 \pm 10,10$ mg/dL aos 10 minutos e $116,40 \pm 8,63$ mg/dL e $106 \pm 6,63$ mg/dL aos 15 minutos (Figura 18A).



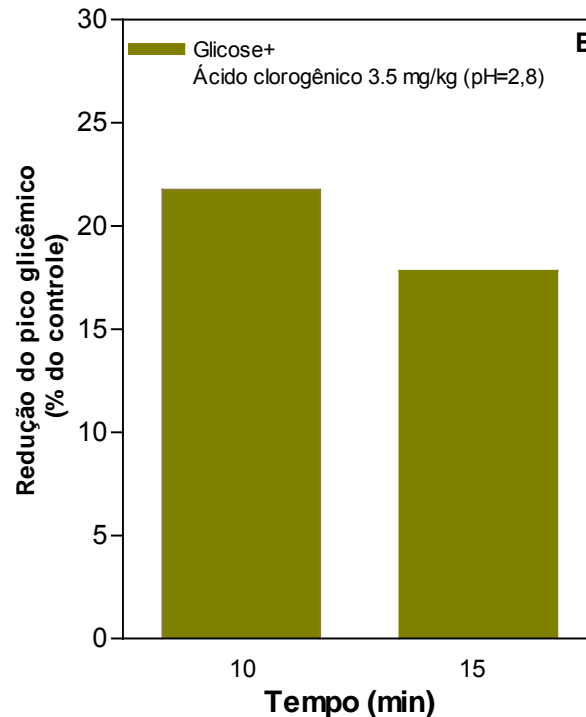


Figura 18 – Efeito do ácido clorogênico sobre o teste de tolerância à glicose oral (A) e porcentagem de redução da glicemia aos 10 e 15 minutos do pico glicêmico (B). Ratos com 24 horas de privação alimentar foram submetidos ao teste de tolerância à glicose oral na ausência (▪) ou presença (■) de ácido clorogênico. A glicemia foi avaliada nos tempos 0 (basal); 5; 10; 15; 30; 45; 60 e 90 minutos após a carga oral de glicose. Cada barra representa a média \pm desvio padrão de 8 a 10 experimentos. Diferenças entre os grupos controle e experimental, no tempo discretizado, analisadas pelo teste t de Student para amostras independentes. *Diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

Nos experimentos para análise do possível efeito do pH ácido da solução de ácido clorogênico sobre o teste de tolerância à glicose oral, constatou-se que este fator não modificou o pico glicêmico ($p > 0,10$), uma vez que as glicemias do grupo controle e do grupo experimental foram de, respectivamente, $97,5 \pm 12,77$ mg/dL e $100 \pm 9,65$ mg/dL aos 10 minutos e $101,67 \pm 8,12$ mg/dL e $100,17 \pm 10,98$ mg/dL aos 15 minutos (Figura 19).

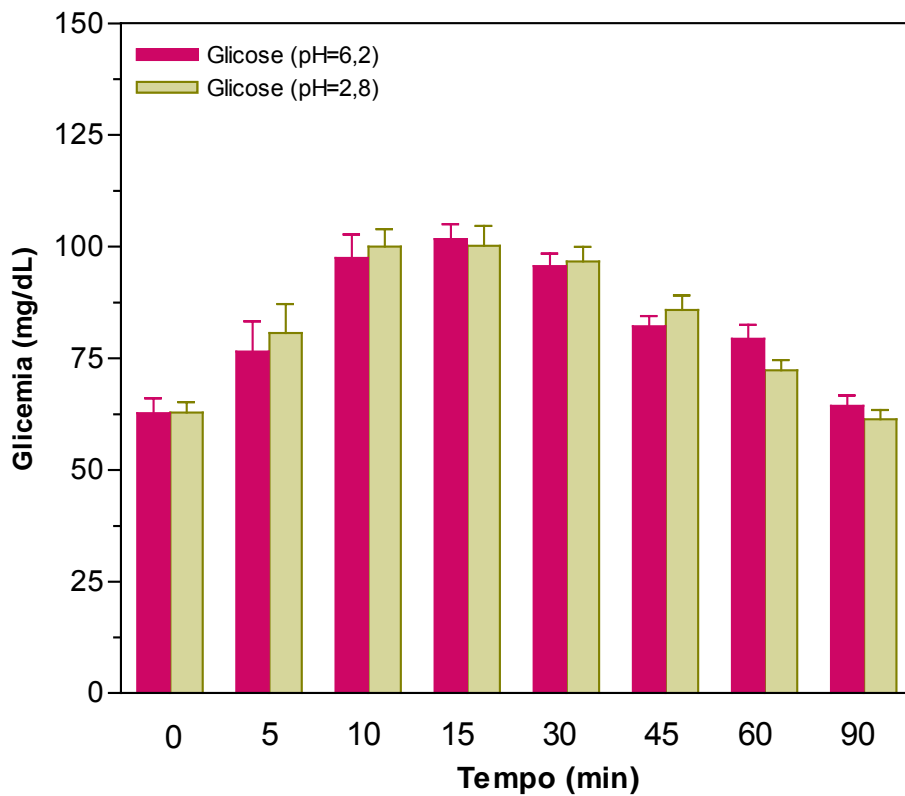


Figura 19 – Efeito do pH sobre o teste de tolerância à glicose oral. Ratos com 24 horas de privação alimentar foram submetidos ao teste de tolerância à glicose oral. Os animais receberam oralmente as soluções de glicose com pH 6,2 (■) ou 2,8 (■). A glicemia foi avaliada nos tempos 0 (basal); 5; 10; 15; 30; 45; 60 e 90 minutos após a carga oral de glicose. Cada barra representa a média \pm desvio padrão de 6 experimentos. Diferenças entre os grupos controle e experimental, no tempo discretizado, analisadas pelo teste t de Student para amostras independentes.

6 DISCUSSÃO

A G-6-Pase constitui um potente ponto de intervenção para a regulação da glicemia e o T1 é um alvo importante para intervenções farmacológicas (ARION *et al.*, 1975; SCOTT; BURCHELL, 1991) devido as seguintes características: a) o T1 exibe alta especificidade ao substrato G-6-P (ARION *et al.*, 1972, 1976); b) na membrana do retículo endoplasmático, apenas o transportador T1 apresenta seu sítio de ligação do lado do citoplasma celular, onde a G-6-P está acumulada como resultado da glicogenólise e neoglicogênese (NILSSON *et al.*, 1978; WALLIN; ARION, 1972) e c) se, ao invés de inibir o T1, um fármaco inibir a subunidade catalítica da G-6-Pase, pode ocorrer também a inibição de outras fosfatases, o que pode prejudicar o metabolismo celular (SCHINDLER *et al.*, 1998).

Evidências da literatura demonstram que o ácido clorogênico e seus derivados sintéticos inibem o transportador T1 da G-6-Pase (ARION *et al.*, 1998a, 1998b; CLIFFORD, 1999; HEMMERLE *et al.*, 1997; OLTHOF; HOLLMAN; KATAN, 2001; PARKER *et al.*, 1998). O ácido clorogênico é o inibidor mais específico do T1 da G-6-Pase já descrito (HEMMERLE *et al.*, 1997; SCHINDLER *et al.*, 1998) e seus derivados sintéticos inibiram a G-6-Pase em microsossomos intactos de fígado de rato (ARION *et al.*, 1994, 1998a, 1998b; BURGER *et al.*, 1994; HEMMERLE *et al.*, 1997; KHAN *et al.*, 1998; PARKER *et al.*, 1998; SCHINDLER *et al.*, 1998) de uma maneira dose dependente, mas não tiveram efeito em microsossomos rompidos (SCHINDLER *et al.*, 1998).

No presente trabalho, o ácido clorogênico (5-CQA), nas concentrações de 0,5 mM; 0,75 mM e 1 mM, promoveu inibição da atividade da G-6-Pase em microsossomos intactos de fígado de rato, com inibição de aproximadamente 40% para a concentração de 1 mM, confirmando os achados prévios da literatura. Na concentração de 0,25 mM houve apenas tendência de inibição da atividade dessa enzima (figura 6).

Entretanto, publicações anteriores evidenciam um maior potencial inibitório deste composto. Foi relatada inibição de 50% para a dose de 0,25 mM de ácido clorogênico em preparações microsossomais intactas (SCHINDLER *et al.*, 1998).

Similarmente, o extrato de café solúvel com altas concentrações de ácidos clorogênicos (37,8%) reduziu, de uma maneira dose-dependente, a atividade

da G-6-Pase em microsomas de fígado de rato (figura 7), evidenciando pela primeira vez, tanto quanto se sabe, que a mistura de isômeros do ácido clorogênico naturalmente presente no café solúvel apresenta a propriedade funcional de inibir a G-6-Pase.

Diante da confirmação da inibição da G-6-Pase pelo ácido clorogênico e dos relatos da literatura que demonstram que os seus derivados sintéticos, também inibidores da G-6-Pase, inibem a liberação hepática de glicose proveniente da neoglicogênese e glicogenólise (vide figura 20) e reduzem a glicemia (HEMMERLE *et al.*, 1997; HERLING *et al.*, 1998, 1999, 2002; PARKER *et al.*, 1998; SIMON *et al.*, 2000; VAN DIJK *et al.*, 2001), constituiu-se como uma das etapas deste trabalho investigar se o ácido clorogênico 5-CQA, que é o isômero presente em maior concentração no café, interfere na liberação hepática de glicose.

Inicialmente, avaliou-se, em perfusão de fígado *in situ*, o efeito do ácido clorogênico sobre a liberação de glicose proveniente da neoglicogênese a partir de vários precursores de glicose (vide figura 20). O ácido clorogênico, nas concentrações de 0,33 mM; 0,5 mM e 1 mM, não promoveu alteração da produção hepática de glicose pela neoglicogênese a partir dos precursores L-alanina (figuras 8A e B), glicerol (figuras 11A e B) e L-lactato (figuras 12A e B) respectivamente.

Para avaliação pormenorizada dos fenômenos da neoglicogênese, diante da presença de uma substância-teste (ácido clorogênico) que pode interferir em diferentes pontos da via metabólica, além da glicose, parâmetros metabólicos complementares, como piruvato e uréia (vide figura 20), foram analisados.

A determinação do parâmetro piruvato teve por objetivo analisar a taxa de captação hepática do precursor neoglicogênico L-alanina, a atividade da enzima alanina-aminotransferase, que converte a L-alanina em piruvato e a produção hepática de glicose (figura 20). Uma menor produção de piruvato pode, por exemplo, ser decorrente da redução da captação hepática da L-alanina, da diminuição de sua conversão para piruvato ou da redução da produção hepática de glicose, que implicaria em menor fornecimento de glicose para a via glicolítica (NELSON; COX, 2002; PILKS; GRANNER, 1992; STRYER, 1996).

Nos resultados apresentados, pode-se observar que o ácido clorogênico não alterou o aumento da produção de piruvato produzido pela L-alanina (figuras 9A e B), indicando que este composto não interferiu no metabolismo hepático da L-alanina.

Outro parâmetro analisado nos fígados submetido à perfusão com L-alanina foi a produção de uréia, pois a redução de sua produção pode indicar menor capacidade de desaminação desse aminoácido neoglicogênico, o que acarretará em menor disponibilidade de piruvato para ser convertido em L-lactato ou glicose (figura 20) (PILKS; GRANNER, 1992; STRYER, 1996). A infusão da L-alanina promoveu um aumento da produção hepática de uréia (figura 10A), que não foi alterada na presença do ácido clorogênico (figuras 10A e B), reforçando os achados anteriores de que o ácido clorogênico 0,33 mM não interferiu no catabolismo da L-alanina e na liberação de glicose pelo fígado.

Em ratos submetidos à privação alimentar, o derivado sintético do ácido clorogênico S-4048 promoveu inibição aguda da G-6-Pase, o que causou redução na produção total de glicose em 50% (VAN DIJK *et al.*, 2001). Em hepatócitos de ratos privados de alimentação, o S-0838 também reduziu a liberação de glicose (neoglicogênese) (BURGER *et al.*, 1994). Em outros estudos de perfusão de fígado isolado de rato, a neoglicogênese foi também inibida pelos derivados do ácido clorogênico S-4048 (BURGER *et al.*, 1999), S-3483 (HERLING *et al.*, 1998) e 29i (HEMMERLE *et al.*, 1997), sendo que no estudo de Herling *et al.* (1998), baixa concentração de S-3483, 0,1 mM, promoveu inibição da liberação de glicose pelo fígado e esse fenômeno caracterizou-se como dose-dependente.

Adicionalmente, o efeito do ácido clorogênico 1 mM sobre a liberação hepática de glicose proveniente da glicogenólise e sobre as taxas de glicogenólise e glicólise, na presença do glucagon (figura 20), foi avaliado em perfusão de fígado.

Nestes experimentos, a infusão hepática de glucagon aos 10 minutos do período de perfusão estimulou transitoriamente a produção de glicose (figura 13A) e glicogenólise (figura 16A), e inibiu a glicólise (figura 17A).

O glucagon é um hormônio glicogenolítico e antiglicolítico (MAGNUSSON *et al.*, 1995). No estado alimentado, este hormônio estimula a produção hepática de glicose dentro de segundos (GAUTHIER; HETENYI, 1982), por estimular a glicogenólise (figura 20) (LECAVALIER, 1989). Seu efeito na glicogenólise é transitório (SHIOTA *et al.*, 1996) por razões desconhecidas e não envolve a depleção de glicogênio hepático (FELIG *et al.*, 1979; MAGNUSSON *et al.*, 1995).

O glucagon, após ligar-se ao seu receptor na membrana do hepatócito, ativa a proteína G estimuladora, que estimula a adenilato-ciclase a converter o ATP a AMPc (SHIMAZU, 1983; VANDER; SHERMAN; LUCIANO, 1998; VOET; VOET, 1995). Os efeitos do glucagon nas enzimas envolvidas no metabolismo hepático do glicogênio são mediados pelo aumento nas concentrações intracelulares de AMPc (SHIOTA *et al.*, 1996). O AMPc inicia uma cascata de reações que conduzem à ativação da proteína quinase dependente de AMPc e à subsequente fosforilação e ativação da fosforilase-quinase e glicogênio-fosforilase (enzima glicogenolítica), estimulando, desta forma, a glicogenólise (SHIMAZU, 1983; VANDER; SHERMAN; LUCIANO, 1998; VOET; VOET, 1995).

Os efeitos a curto prazo do glucagon na glicólise são também mediados por aumento na concentração de AMPc e envolvem fosforilação e diminuição da atividade de enzimas desta via metabólica, implicando em redução no fluxo glicolítico (PILKIS; GRANNER, 1992).

A presença de ácido clorogênico (1 mM) nos fígados perfundidos com glucagon, não alterou a produção hepática de glicose (figura 13B).

Os parâmetros auxiliares piruvato e L-lactato foram utilizados na determinação das taxas de glicogenólise e glicólise e para avaliação da atividade da enzima lactato-desidrogenase, que converte piruvato a L-lactato (figura 20). A redução da taxa de glicólise (figura 17A) nos fígados submetidos à perfusão com glucagon pode ser constatada pela diminuição da conversão de glicose, proveniente da via glicogenolítica, a L-lactato (figura 14A) e a piruvato (figura 15A).

Os resultados obtidos mostram que o ácido clorogênico (1 mM) não alterou a inibição da glicólise promovida pelo glucagon (figura 17B), pois não houve alterações nas produções de L-lactato (figuras 14B) e piruvato (figuras 15B). Esses resultados indicam, ainda, que o ácido clorogênico não interferiu na atividade da lactato-desidrogenase.

O ácido clorogênico (1 mM) também não interferiu na taxa de glicogenólise estimulada pelo glucagon (figura 16B). Os indicativos de que esta via estava operando em seu fluxo normal são as ausências de inibição da produção hepática de glicose e, secundariamente, as produções de piruvato e L-lactato que não diferiram do grupo controle.

Estudos demonstram que devido a inibição da G-6-Pase, em perfusão de fígado isolado de rato, os derivados sintéticos do ácido clorogênico S-

4048 (BURGER *et al.*, 1999), S-3483 (HERLING *et al.*, 1998) e o composto 29i (HEMMERLE *et al.*, 1997) promoveram inibição da glicogenólise. A produção de glicose pela via da glicogenólise também foi inibida pelo S-0838 em hepatócitos de ratos alimentados (BURGER *et al.*, 1994). Parker *et al.* (1998) constataram, ainda, que o S-4048 reduziu a produção basal de glicose em 47% e a produção de glicose estimulada pelo glucagon em hepatócitos isolados.

Em conjunto, os resultados anteriormente discutidos demonstram que o ácido clorogênico, em sua forma natural, encontrada amplamente distribuída nos alimentos, embora seja o inibidor mais específico do T1 da G-6-Pase já descrito (HEMMERLE *et al.*, 1997; SCHINDLER *et al.*, 1998), não promove diminuição da liberação hepática de glicose, como fazem seus derivados sintéticos (figura 20).

Diante dos resultados de que o ácido clorogênico inibiu a G-6-Pase em microsomas de retículo endoplasmático isolados de hepatócitos (figura 6), mas não teve efeito sobre a liberação de glicose em perfusão de fígado *in situ* (figuras 8, 11, 12 e 13), postulou-se que a ausência de efeito do ácido clorogênico na liberação de glicose pelo fígado poderia ser decorrente da baixa taxa de captação, conforme descrito recentemente por Farah e Trugo (2005b), ou não captação deste composto pelos hepatócitos, de forma que a molécula intacta de ácido clorogênico poderia não ter alcançado concentrações intracelulares suficientes para inibir a G-6-Pase, apesar de terem sido utilizadas concentrações de ácido clorogênico suficientes para causar inibição da G-6-Pase *in vitro* e similares às que produziram efeitos inibitórios na liberação hepática de glicose com os seus derivados sintéticos.

De fato, os resultados dos estudos de perfusão de fígado da tabela 1 sugerem ausência de captação hepática de ácido clorogênico, uma vez que não houve diferença entre as concentrações de ácido clorogênico infundidas no fígado e as observadas, em diferentes tempos de perfusão, no líquido de perfusão efluente (após a passagem pelo fígado).

Com relação aos derivados do ácido clorogênico, é provável que, por apresentarem estruturas muito complexas, não atravessem a membrana dos hepatócitos por difusão simples. Um estudo com hepatócitos isolados de ratos, utilizando um derivado do ácido clorogênico radiomarcado (S-1743), verificou que o transportador OATP1, pertencente à família de transportadores polipeptídicos de ânions orgânicos (OATPS), pode não só estar envolvido, mas ser o principal responsável pela captação hepática dos derivados do ácido clorogênico (figura 20).

Nesse estudo, porém, não foram constatadas interações do ácido clorogênico, mesmo que em altas doses, com esse transportador (SCHWAB *et al.*, 2001).

Por outro lado, outros pesquisadores constataram a captação de ácidos cafeoilquínicos em células hepatoma de cultura (PLUMB *et al.*, 1999) e recentemente foi observada uma captação do 5-CQA em hepatócitos humanos (células da linhagem HepG2) proporcional a sua concentração no meio de cultura, perfil coerente com a captação celular por difusão passiva, conforme via sugerida na figura 20 (FARAH; TRUGO, 2005a).

No entanto, em estudos da captação dos isômeros do ácido clorogênico do café solúvel descafeinado também por hepatócitos humanos, observou-se que o 5-CQA, apesar de estar em maior concentração no café, foi o isômero menos captado, provavelmente por depender do mecanismo de difusão passiva para ser captado, diferentemente dos isômeros 3- e 4-cafeoilquínicos e 3- e 4-feruloilquínicos, que teriam sua difusão mediada por um carreador (FARAH; TRUGO, 2005b).

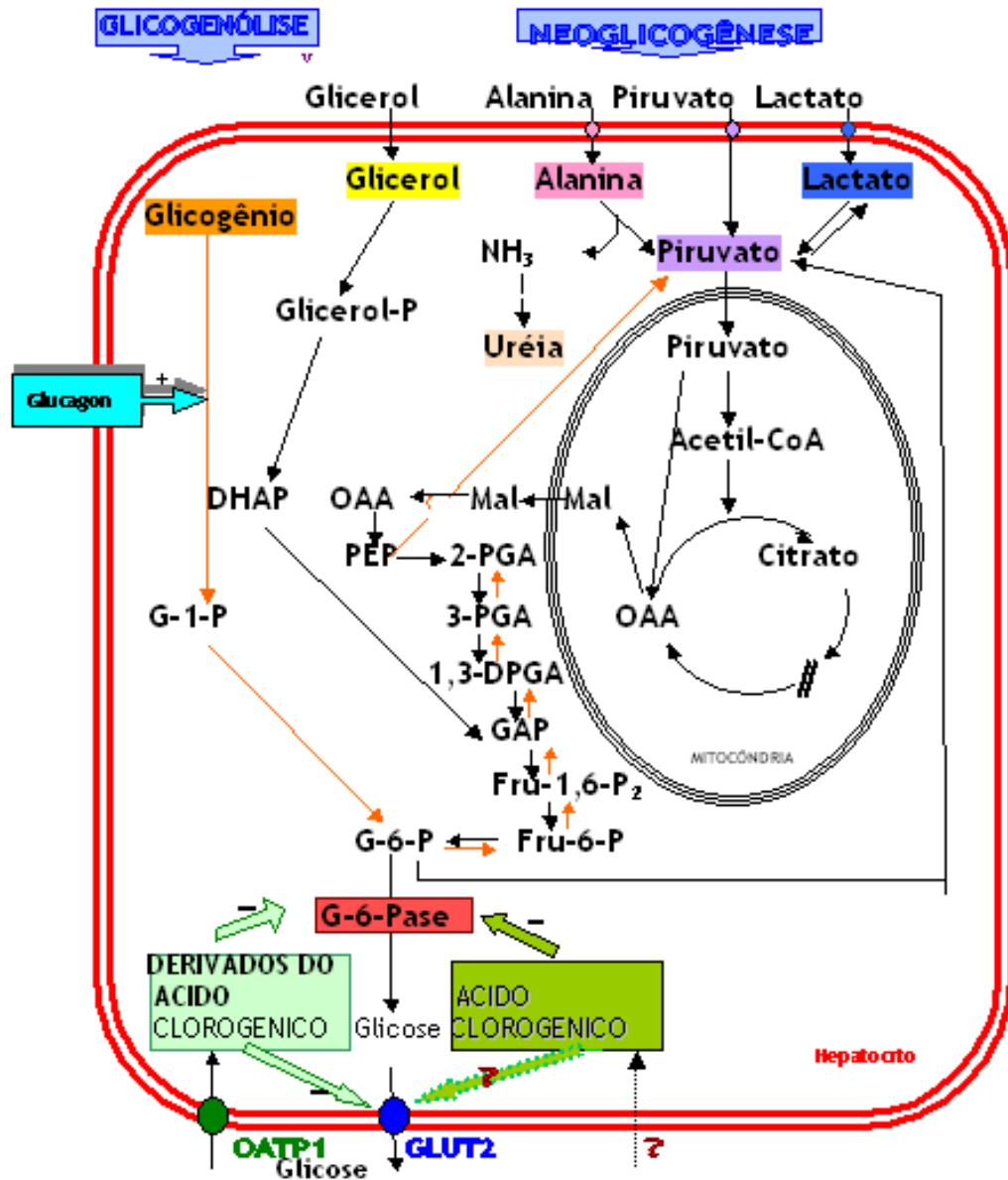


Figura 20 – Vias hepáticas liberadoras de glicose (glicogenólise e neoglicogênese) e o efeito do ácido clorogênico e seus derivados. G-1-P, glicose-1-fostato; DHAP, dihidroxiacetona fostato; OAA, oxalacetato; Mal, malato; PEP, fosfoenolpiruvato; 2-PGA, 2-fosfoglicerato; 3-PGA, 3-fosfoglicerato; 1,3-DPGA, 1,3-difosfoglicerato; GAP, gliceraldeído-3-fostato; Fru-1,6-P₂, frutose-1,6-bifostato; Fru-6-P, frutose-6-fostato; G-6-P, glicose-6-fostato; G-6-Pase, glicose-6-fostatase; OATP1, transportador de derivados do ácido clorogênico, pertencente à família de transportadores de polipeptídicos de ânions orgânicos (OATPS); GLUT 2, transportador de glicose.

Há uma série de estudos evidenciando que os derivados do ácido clorogênico, por inibirem a G-6-Pase e a liberação hepática de glicose, reduzem a glicemia. A injeção intraperitoneal ou endovenosa do S-4048 e a infusão endovenosa do S-4048 (HERLING *et al.*, 1999, 2002; PARKER *et al.*, 1998; VAN DIJK *et al.*, 2001) e do S-3483 (HERLING *et al.*, 1998; SIMON *et al.*, 2000) causaram redução da glicemia em ratos alimentados ou em estado de privação alimentar. A infusão endovenosa de S-3483 (HERLING *et al.*, 1998) e S-4048 (HERLING *et al.*, 1999) em ratos alimentados preveniu o pico hiperglicêmico induzido pela administração de glucagon.

No entanto, no presente trabalho, a injeção endovenosa de alta dose de ácido clorogênico (70 mg/kg de peso corpóreo) ou do extrato de café solúvel concentrado de ácidos clorogênicos (70 mg/kg de peso corpóreo), diferentemente dos derivados sintéticos do ácido clorogênico em doses de 50 mg/kg de peso corpóreo (HERLING *et al.*, 2002), não reduziu as concentrações plasmáticas de glicose (tabela 2A). A ausência de efeito agudo deste composto na glicemia provavelmente reflete a sua falta de efeito na liberação hepática de glicose, como demonstrado nos estudos de perfusão de fígado.

Um outro fator que poderia ter contribuído para a ausência de efeito do ácido clorogênico na glicemia, é a possibilidade de sua rápida metabolização, uma vez que seus potentes derivados, que apresentam estrutura molecular similar, tiveram seus efeitos de curta duração atribuídos ao seu alto “clearance” da circulação, que resultou em rápida queda das concentrações plasmáticas desses compostos após a sua injeção (HERLING *et al.*, 2002).

O S-4048 e o S-3025 são rapidamente e eficientemente excretados na bile. Após 30 minutos da administração endovenosa do S-4048, constatou-se a presença de 57% do total injetado na bile. No estudo que utilizou o análogo radioativo [³H] S-1743, após 20 minutos da administração endovenosa, detectou-se a presença de 72% do

total injetado na bile. Após o término do período do estudo (2 horas), 92% da radioatividade administrada foi encontrada na bile e apenas 5% dessa radioatividade foi observada na urina, sangue, fígado e rins. Então, a rápida eliminação hepatobiliar desses compostos representa o mecanismo predominante para sua rápida depuração do plasma (HERLING *et al.*, 2002).

De fato, foi demonstrado que a maioria do ácido clorogênico absorvido é intensamente metabolizado no fígado (OLTHOF *et al.*, 2003; OLTHOF; HOLLMAN; KATAN, 2001). Azuma *et al.* (2000) observaram, após a administração intraperitoneal de ácido clorogênico em ratos, um pico máximo desse composto no plasma aos 30 minutos e ausência quase que absoluta aos 120 minutos, confirmando sua rápida metabolização.

Nos estudos do presente trabalho, de administração oral sub-crônica, por 15 dias, também foi constatada a ausência de efeitos significativos do ácido clorogênico na glicemia (tabela 3A), que pode ter ocorrido, além dos fatores já discutidos anteriormente nos estudos de administração endovenosa, devido à baixa taxa de absorção intestinal do ácido clorogênico. Baixa taxa de absorção deste composto tem sido evidenciada em ratos e humanos (OLTHOF *et al.*, 2003; OLTHOF; HOLLMAN; KATAN, 2001), e é enfatizada por estudos que não detectaram o ácido clorogênico no plasma de ratos ou humanos após a ingestão de café ou ameixas secas (alimentos que contém ácido clorogênico) (AZUMA *et al.*, 2000; CREMIN; KASIM-KARAKAS; WATERHOUSE, 2001; GONTHIER *et al.*, 2003; NARDINI *et al.*, 2002).

O ácido clorogênico, como já descrito, tem como principal fonte alimentar o café. “Bebedores” de café ingerem diariamente 0,5 a 1 g de ácido clorogênico (CLIFFORD, 1999; OLTHOF; HOLLMAN; KATAN, 2001). Há relatos de uma absorção de ácido clorogênico no intestino delgado de humanos de $33 \pm 17\%$ e de que traços desse composto (0,3% a 1,7%) puderam ser encontrados na urina após ingestão de ácido clorogênico ou alimentos com ácido clorogênico, como ameixa seca, por ratos ou humanos (CREMIN; KASIM-KARAKAS; WATERHOUSE, 2001; GONTHIER *et al.*, 2003; OLTHOF *et al.*, 2003; OLTHOF; HOLLMAN; KATAN, 2001). A excreção biliar poderia ser um mecanismo para explicar sua baixa recuperação na urina, uma vez que alguns autores observaram a ausência de sua metabolização pelo plasma ou extrato de fígado humano, devido à falta da atividade da esterase (GONTHIER *et al.*, 2003; PLUMB *et al.*, 1999).

Em alguns estudos, após a administração oral de ácido clorogênico, apenas seus metabólitos, como o ácido caféico, foram encontrados no plasma de ratos ou humanos e atualmente a principal causa apontada para esse fenômeno é a ocorrência de uma ampla degradação do ácido clorogênico pelas esterases da

microflora colônica (AZUMA *et al.*, 2000; GONTHIER *et al.*, 2003; NARDINI *et al.*, 2002; OLTHOF *et al.*, 2003; PLUMB *et al.*, 1999).

Outro estudo recente com indivíduos ileostomizados (ausência de esterases da microflora colônica), que ingeriram 250 mL de café (220 mg de ácido clorogênico) concluiu, através da diferença entre a quantidade de ácidos clorogênicos ingerida e a excretada juntamente com seus metabólitos, que os ácidos clorogênicos foram eficientemente absorvidos no intestino delgado, e, sugeriu valores de até 76% de absorção (STEWART; CROZIER, 2004).

Após incubação *in vitro*, com suco gástrico e fluido duodenal, o ácido clorogênico pode ser recuperado quase completamente, descartando a hipótese de degradação total durante sua passagem pelo trato gastrointestinal (OLTHOF; HOLLMAN; KATAN, 2001). Estudos mais atuais de ingestão do ácido clorogênico na presença da matriz alimentar, em coelhos que ingeriram um extrato de uma planta e em humanos que ingeriram tomates cozidos, detectaram ácido clorogênico no plasma, de 30 minutos até 9 horas após a ingestão, o que pode ter ocorrido pela absorção intestinal por via paracelular, facilitada por componentes da matriz dos alimentos ou pelo aumento de sua biodisponibilidade após o cozimento (BUGIANESI *et al.*, 2004; KONISHI; KOBAYASHI, 2004; YANG *et al.*, 2004).

Uma vez que um aumento da glicemia pode ser observado após a administração oral a longo prazo do extrato de café solúvel, mas não de ácido clorogênico (tabela 3A), esse efeito deve ter sido decorrente de alterações metabólicas e fisiológicas provocadas por outros componentes do extrato.

A dose utilizada na administração oral, de 100 mg/kg de ácido clorogênico grau analítico ou do conjunto de seus isômeros presentes no café solúvel, é aproximadamente seis vezes maior do que a quantidade de ácido clorogênico ingerida por bebedores de café (CLIFFORD, 1999; OLTHOF; HOLLMAN; KATAN, 2001). Desse modo, a ausência de redução da glicemia não deve ser atribuída à administração de doses insuficientes de ácido clorogênico.

O efeito do ácido clorogênico sobre o metabolismo lipídico não está totalmente estabelecido e não há estudos do efeito dos seus isômeros naturais presentes no café solúvel no metabolismo lipídico, desse modo, no presente trabalho, também foram realizados estudos *in vivo* de administração endovenosa e oral destes compostos para investigar estas questões.

A administração endovenosa (efeito agudo) de ácido clorogênico ou do extrato de café solúvel concentrado de ácidos clorogênicos não promoveu alterações nos níveis de colesterol total plasmático (tabela 2B), em concordância com as observações de estudos similares com o derivado do ácido clorogênico S-4048 (HERLING *et al.*, 1999).

Porém, a administração oral durante quinze dias de altas doses de ácido clorogênico e do extrato de café solúvel (resultado marginalmente significativo), promoveu aumento nos níveis de colesterol total plasmático (tabela 3A). Uma vez que após administração endovenosa esse fenômeno não foi observado, este aumento do colesterol deve ter sido decorrente do tratamento a longo prazo (sub-crônico). A administração oral sub-crônica de ácido clorogênico ou do extrato de café solúvel concentrado de ácidos clorogênicos não alterou significativamente os níveis de triacilgliceróis plasmáticos (tabela 3A).

Há estudos descritos na literatura onde não foram observadas alterações significativas nos níveis de colesterol e triacilgliceróis plasmáticos após administração oral de ácido clorogênico em ratos (FRANK *et al.*, 2003). Entretanto, alguns estudos demonstram que a infusão endovenosa de ácido clorogênico por 21 dias promoveu redução do colesterol total e triacilgliceróis em ratos obesos, com hiperlipidemia e resistência à insulina, possivelmente por apresentar efeitos que não a inibição direta da G-6-Pase, como aumentar a sensibilidade à insulina (SOTILLO; HADLEY, 2002).

Embora o café solúvel (instantâneo), assim como o café que é preparado utilizando-se a filtragem em filtro de papel, sejam praticamente destituídos dos diterpenos cafestol e kahweol, que são responsáveis por aumento de colesterol total, LDL colesterol e triacilgliceróis em humanos, conforme revisto por Urget e Katan (1997), há estudos como o de Würzner, Lindström e Vuataz (1977), onde o café solúvel normal, com diferentes teores de cafeína, foram administrados oralmente para ratos durante um ano e observou-se aumento do colesterol plasmático e tendência a aumento dos triacilgliceróis plasmáticos, efeitos que foram correlacionados pelos autores ao conteúdo de cafeína ingerido no café instantâneo. Há ainda outros estudos onde o consumo de café solúvel não promoveu aumento no colesterol em humanos (URGET; KATAN, 1997).

Nos experimentos realizados de administração por gavagem, durante 15 dias, de ácido clorogênico ou de extrato de café solúvel concentrado de ácidos

clorogênicos, o ganho de peso corpóreo dos animais não foi afetado (tabela 3B), o que foi também observado em trabalhos com ratos submetidos à infusão endovenosa ou ingestão de altas doses de ácido clorogênico (FRANK *et al.*, 2003; GONTHIER *et al.*, 2003; SOTILLO; HADLEY, 2002) e indica que o ácido clorogênico não interferiu no desenvolvimento dos animais.

Atualmente, não apenas o aumento da glicemia de jejum, mas também a hiperglicemia pós-prandial ou o elevado índice glicêmico são critérios para a constatação do início do desenvolvimento do diabetes tipo 2 e suas complicações cardiovasculares. A redução do índice glicêmico é considerada um fator importante na diminuição de risco de desenvolvimento do diabetes tipo 2 (McCARTY, 2005a).

Nesse sentido, estudos foram conduzidos neste trabalho para avaliar o efeito do ácido clorogênico sobre o perfil glicêmico após o teste de tolerância à glicose oral.

O ácido clorogênico promoveu redução significativa do pico glicêmico aos 10 e 15 minutos (figuras 18A e 18B) após administração da carga oral de glicose e os dados e coletados indicam que este efeito não foi devido à redução de pH promovida por este composto (figura 19). Estes resultados podem ser atribuídos provavelmente, ao menos parcialmente, aos efeitos do ácido clorogênico na redução da absorção intestinal da glicose. Há apenas um estudo conhecido onde foi observada redução da glicemia em ratos diabéticos tipo 1 alimentados, de uma a três horas, após administração oral de ácido clorogênico (ANDRADE-CETTO; WIEDENFELD, 2001).

Considerando que os cafés solúveis disponíveis comercialmente apresentam um teor de ácidos clorogênicos totais entre 0,7 a 5,9% (NOGUEIRA; TRUGO, 2003) e que a forma de preparo do café solúvel sugerida por uma indústria de café solúvel da região (Companhia Iguaçu de Café Solúvel) implica na utilização de aproximadamente 2 g de café solúvel para 100 mL de água, a dose total de ácido clorogênico utilizada nos estudos de tolerância à glicose oral, estaria contida em aproximadamente 750 mL de café solúvel.

A dose de ácido clorogênico utilizada (3,5 mg/kg, na forma de uma solução 10 mM) foi baseada nos achados de que 1 mM de ácido clorogênico reduziu em 80% a capacidade de transporte de glicose em vesículas de membrana da borda em escova, isoladas do intestino delgado de ratos, fenômeno que, de acordo com os pesquisadores, pode ser atribuído à dissipação do gradiente

eletroquímico dos íons sódio, que fornecem a força-motriz para o transporte de glicose (WELSCH; LACHANCE; WASSERMAN, 1989). Outro mecanismo proposto para explicar a redução da absorção intestinal de glicose pelo ácido clorogênico é a inibição da G-6-Pase do retículo endoplasmático do enterócitos, enzima que tem papel no processo de absorção de glicose intestinal (McCARTY, 2005a).

Há evidências na literatura de que a ingestão de café solúvel, com seu componente ácido clorogênico, promoveu redução da glicemia durante o teste de tolerância à glicose oral em humanos (FEINBERG *et al.*, 1968 *apud* McCARTY, 2005a, 2005b; VAN DAM *et al.*, 2004; YAMAJI *et al.*, 2004) e que a ingestão do café descafeinado por humanos, concomitante com uma dose de glicose, resultou na tendência de redução da glicemia (JOHNSTON; CLIFFORD; MORGAN, 2003).

Os resultados da presente pesquisa adicionam mais uma evidência favorável à propriedade do ácido clorogênico de atenuar a absorção intestinal de glicose e reduzir o índice glicêmico. Se esta propriedade funcional for confirmada em estudos posteriores em humanos, esse composto fenólico e possivelmente o café poderiam auxiliar na redução do risco de desenvolvimento do diabetes tipo 2, por contribuir para a redução do pico hiperglicêmico após as refeições e, assim, poupar o pâncreas do trabalho exaustivo de secreção de insulina (JOHNSTON; CLIFFORD; MORGAN, 2003; McCARTY, 2005a).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

O café é a principal fonte de ácido clorogênico da dieta humana (CLIFFORD, 1999; OLTHOF; HOLLMAN; KATAN, 2001) e é uma das bebidas mais consumidas no mundo.

Este estudo foi o primeiro passo na tentativa de identificar possíveis efeitos *in vitro* e *in vivo* dos ácidos clorogênicos presentes no café solúvel. Como o ácido clorogênico é um inibidor da G-6-Pase, enzima responsável pela liberação hepática de glicose proveniente da glicogenólise e da neoglicogênese, efeito confirmado nos resultados deste trabalho, seria possível que este composto e o extrato do café solúvel concentrado de ácidos clorogênicos promovessem inibição da liberação hepática de glicose e pudessem ser úteis para modular a liberação hepática de glicose elevada em indivíduos diabéticos tipo 2.

No entanto, os resultados obtidos permitiram a observação de que o ácido clorogênico e o extrato de café solúvel com altos teores de ácidos clorogênicos inibem a G-6-Pase apenas nos microsomas hepáticos *in vitro*, onde esta enzima está acessível e não é necessária a entrada do ácido clorogênico na célula. Nas doses e condições experimentais utilizadas neste estudo, o ácido clorogênico não alterou a produção hepática de glicose, glicogenólise, glicólise e o catabolismo da L-alanina nos estudos de perfusão de fígado *in situ* e nem a glicemia nos estudos de administração endovenosa. A ausência de efeito deste composto na liberação de glicose pelo fígado e glicemia, provavelmente é decorrente de sua baixa taxa de captação ou não captação pelos hepatócitos, como indicam os resultados, uma vez que as concentrações testadas de ácido clorogênico foram suficientes para promover inibição da G-6-Pase *in vitro*.

Nos estudos de administração oral por quinze dias, o ácido clorogênico também não teve efeito sobre a glicemia e, assim como seus isômeros presentes no extrato de café solúvel, não alterou os triacilgliceróis plasmáticos. O colesterol plasmático também não foi alterado após a administração endovenosa de ácido clorogênico ou de extrato de café solúvel concentrado de ácidos clorogênicos (37,8%). Porém, pode-se observar um aumento no colesterol total plasmático após a administração oral por quinze dias de ácido clorogênico ou dos ácidos clorogênicos presentes no extrato de café solúvel (aumento marginalmente significativo).

Considerando a baixa taxa de absorção dos ácidos clorogênicos, sua rápida metabolização e provável ausência de captação pelos hepatócitos, os efeitos produzidos no metabolismo lipídico devem-se, possivelmente, a ações que independem de sua absorção e presença na corrente sangüínea, como ações em nível intestinal.

No presente trabalho, foram analisados efeitos do ácido clorogênico em nível intestinal através de protocolos do teste de tolerância à glicose oral em ratos privados de alimentação por 24 horas, onde o ácido clorogênico reduziu significativamente o pico glicêmico aos 10 e 15 minutos. Esse resultado, em conjunto com os demais, de ausência de efeito do ácido clorogênico sobre a liberação hepática de glicose e glicemia após administração endovenosa e administração oral crônica, é mais uma evidência que favorece a hipótese de que o ácido clorogênico pode reduzir o índice glicêmico, provavelmente por atenuar a absorção intestinal de glicose.

Há dois mecanismos de ação prováveis para explicar a inibição da absorção de glicose intestinal pelo ácido clorogênico: a dissipação do gradiente eletroquímico dos íons sódio, que fornecem a força-motriz para o transporte de glicose (WELSCH; LACHANCE; WASSERMAN, 1989) e a inibição da G-6-Pase do retículo endoplasmático dos enterócitos, enzima que tem papel no mecanismo de absorção de glicose intestinal (McCARTY, 2005a), porém, estudos posteriores serão necessários para confirmação do mecanismo pelo qual o ácido clorogênico atua.

Desse modo, estudos que viabilizem a obtenção de maiores níveis intracelulares de ácido clorogênico, que analisem seus efeitos na redução do risco de desenvolvimento de intolerância à glicose e resistência à insulina e, finalmente, confirmem os efeitos em nível intestinal do ácido clorogênico e de seus isômeros presentes no café, parecem ser a próxima etapa na tentativa de compreender a relação entre consumo contínuo de café e redução de risco de desenvolvimento de diabetes tipo 2. Estudos em modelos animais representam uma etapa intermediária indispensável na busca desses conhecimentos.

Embora a transposição de resultados de estudos da funcionalidade de compostos em animais para a nutrição humana tenha limitações, todo estudo é válido na tentativa de se compreender os mecanismos responsáveis pelos efeitos benéficos de substâncias na saúde humana, rumo ao reconhecimento de um alimento funcional, que pode ser uma alternativa de fácil acesso à população, na busca de redução de risco de doenças e melhoria da qualidade de vida.

REFERÊNCIAS

AGARDH, E. E.; CARLSSON, S.; AHLBOM, A.; EFENDIC, S.; GRILL, V.; HAMMAR, N.; HILDING, A.; ÖSTENSON, C.-G. Coffee consumption, type 2 diabetes and impaired glucose tolerance in Swedish men and women. **Journal of Internal Medicine**, v. 255, p. 645-652, 2004.

ANDERSEN, M. L.; D'ALMEIDA, V.; KO, G. M.; KAWAKAMI, R.; MARTINS, P. J. F.; MAGALHÃES, L. E.; TUFIK, S. **Princípios Éticos e Práticos do uso de Animais de Experimentação**. São Paulo-UNIFESP: Cromosete, 2004.

ANDRADE-CETTO, A.; WIEDENFELD, H. Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, p. 145-149, 2001.

ARION, W. J.; BALLAS, L. M.; LANGE, A. J.; WALLING, B. K. Microsomal membranes permeability and the hepatic glucose-6-phosphatase system. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 251, p. 4901-4907, 1976.

ARION, W. J.; CANFIELD, W. K.; CALLAWAY, E. S.; BURGER, H.-J.; HEMMERLE, H.; SCHUBERT, G.; HERLING, A. W.; OEKONOMOPULOS, R. Direct evidence for the involvement of two glucose-6-phosphate-binding sites in the glucose-6-phosphatase activity of intact liver microsomes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 11, p. 6223-6227, 1998a.

ARION, W. J.; CANFIELD, W. K.; RAMOS, F. C.; SCHINDLER, P. W.; BURGER, H.-J.; HEMMERLE, H.; SCHUBERT, G.; BELOW, P.; HERLING, A. W. Clorogenic acid and hydroxynitribenzaldehyde: new inhibitors of hepatic glucose-6-phosphatase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 339, n. 2, p. 315-322, 1997.

ARION, W. J.; CANFIELD, W. K.; RAMOS, F. C.; SU, M. L.; BURGER, H.-J.; HEMMERLE, H.; SCHUBERT, G.; BELOW, P.; HERLING, A. W. Clorogenic acid analogue S-3483: a potent competitive inhibitor of the hepatic and renal glucose-6-phosphatase systems. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 351, n. 2, p. 279-285, 1998b.

ARION, W. J.; CANFIELD, W. K.; SCHINDLER, P. W.; BURGER, H.-J.; HEMMERLE, H.; SCHUBERT, G.; BELOW, P.; HERLING, A. W. Clorogenic acid and hydroxynitribenzaldehyde: new inhibitors of hepatic glucose-6-phosphatase. **Diabetologia**, v. 37, n. 1, p. A134, 1994.

ARION, W. J.; WALLIN, B. K.; CARLSON, P. W.; LANGE, A. J. The specificity of glucosephosphatase of intact liver microsomes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 247, p. 2558-2565, 1972.

ARION, W. J.; WALLIN, B. K.; LANGE, A. J.; BALLAS, L. M. On the involvement of a glucose 6-phosphate transport system in the function of microsomal glucose 6-phosphatase. **Molecular & Cellular Biochemistry**, v. 6, n. 2, p. 75-83, 1975.

ASSOCIAÇÃO LATINO-AMERICANA DE DIABETES. **Atlas de Diabetes**. São Paulo: Science Press Brasil Ltda., 2002/2003. CD-ROM.

AZUMA, K.; IPPOUSHI, K.; NAKAYAMA, M.; ITO, H.; HIGASHIO, H.; TERAQ, J. Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 11, p. 5496-5500, 2000.

BAILEY, C. J. Potencial new treatments for type 2 diabetes. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 21, p. 259-265, 2000.

BANDSMA, R. H.; WIEGMAN, C. H.; HERLING, A. W.; BURGER H.-J.; TER HARMSEL, A.; MEIJER, A. J.; ROMIJN, J. A.; REIJNGOUD, D. J.; KUIPERS, F. Acute inhibition of glucose-6-phosphatase translocator activity leads to increased de novo lipogenesis and development VLDL production rats. **Diabetes**, v. 50, n. 11, p. 2591-2597, 2001.

BASSOLI, D. G.; VIGNOLI, J. A.; ALCÂNTARA, P. H. N. Purification and determination of chlorogenic acids in soluble coffee - Influence of the roasting conditions and raw material. **Química Nova**, v., n., p., 2005 (Submetido).

BERGMEYER, H. U.; BERNT, E. Determination of glucose with glucose-oxidase and peroxidase. In: BERGMEYER, H. U. **Methods of enzymatic analysis**. New York: Verlag Chemie-Academic Press, 1974. p. 1205-1215.

BICCHI, C. P.; BINELLO, A. E.; PELLEGRINO, G. M.; VANNI, A. C. Characterization of green and roasted coffees through the chlorogenic acid fraction by HPLC-UV and principal component analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 6, p. 1549-1555, 1995.

BUGIANESI, R.; SALUCCI, M; LEONARDI, C.; FERRACANE, R.; CATASTA, G.; AZZINI, E.; MAIANI, G. Effect of domestic cooking on human bioavailability of naringenin, chlorogenic acid, lycopene and β -carotene in cherry tomatoes. **European Journal of Nutrition**, v. 43, n. 6, p. 360-366, 2004.

BURCHELL, A. Molecular pathology of glucose-6-phosphatase. **FASEB Journal** v. 4, p. 2978-2988, 1990.

BURCHELL, A.; WADDELL, I. D. The molecular basis of the hepatic microsomal glucose-6-phosphatase system. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1092, p. 129-137, 1991.

BURGER, H.-J.; HEMMERLE, H.; SCHUBERT, G.; HERLING, A. W.; BELOW, P.; HARTZ, D.; SEELAND, A.; SCHINDLER, P. W.; ARION, W. J. Inhibition of glucose-6-phosphatase affects glucose output and glycogenesis in rat hepatocytes. **Diabetologia**, v. 37, n. 1, p. A135, 1994.

BURGER, H.-J.; SCHUBERT, G.; HEMMERLE, H.; KRAMER, W.; HERLING, A. W. Pharmacological interference with hepatic glucose production. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 892, p. 312-314, 1999.

BYGRAVE, F. L. Properties of energy-dependent calcium transport by rat liver microsomal fractions as revealed by initial-rate measurements. **Biochemistry Journal**, v. 170, p. 87-91, 1978.

CAMPA, C.; NOIROT, M.; BOURGEOIS, M.; PERVENT, M.; KY, C. L.; CHRESTIN, H.; HAMNON, S.; KOCHKO, A. Genetic mapping of a caffeoyl-coenzyme A 3-O-methyltransferase gene in coffee trees. Impact on chlorogenic acid content. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 107, p. 751-756, 2003.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 362-372, 1999.

CREMIN, P.; KASIM-KARAKAS, S.; WATERHOUSE, A. L. LC/ES-MS Detection of hydroxycinnamates in human plasma and urine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 4, p. 1747-1750, 2001.

CZOK, R.; LAMPRECHT, W. Pyruvate, phosphoenolpyruvate and D-glycerate-2-phosphate. In: BERGMAYER, H. U. **Methods of enzymatic analysis**. New York: Academic Press, 1974. p. 1446-1448.

DE FRONZO, R. A.; FERRANNINI, E.; SIMONSON, D. C. Fasting hyperglycemia in non-insulin-dependent diabetes mellitus: contributions of excessive hepatic glucose production and impaired tissue glucose uptake. **Metabolism**, v. 38, p. 387-395, 1989.

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Métodos para análise de ácido clorogênico. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 586-592, 2004.

DUBOWSKI, K. M. An o-toluidine method for body-fluid glucose determination. **Clinical Chemistry**, v. 8, p. 215-225, 1962.

FARAH, A.; TRUGO, L. C. Captação dos ácidos 5-cafeoilquínico e caféico por hepatócitos humanos da linhagem HepG2. In: 6º SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 2005, Campinas. **CR-ROM 6º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**. Campinas: 2005a. nº 1967.

FARAH, A.; TRUGO, L. C. Isômeros dos ácidos clorogênicos do café são captados de forma diferenciada por hepatócitos humanos da linhagem HepG2. In: 6º SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 2005, Campinas. **CR-ROM 6º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**. Campinas: 2005b. nº 1963.

FELIG, P.; SHERWIN, R. S.; SOMAN, V.; WAHREN, R.; HENDLER, R.; SACCÀ, L.; EIGLER, N.; GOLDBERG, D.; WALESKI, M. Hormonal interactions in the regulation of blood glucose. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 35, p. 501-531, 1979.

FISKE, C. H.; SUBARROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 66, p. 375-400, 1925.

FRANK, J.; KAMAL-ELDIN, A.; RAZDAN, A.; LUNDH, T.; VESSBY, B. The dietary hydroxycinnamate caffeic acid and its conjugate chlorogenic acid increase vitamin E and cholesterol concentrations in sprague-dawley rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 9, p. 2526-2531, 2003.

GAUTHIER, C.; HETENYI, G. Origin of glucose released in the regulatory response against hypoglycemia. **Metabolism**, v. 31, n. 2, p. 147-153, 1982.

GEBHARDT, R. Inhibition of cholesterol biosynthesis in primary cultured rat hepatocytes by artichoke (*Cynara scolynus* L.) extracts. **Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics**, v. 286, p. 1122-1128, 1998.

GERIN, I.; VAN SCHAFTINGEN, E. Evidence for glucose-6-phosphate transport in rat liver microsomes. **FEBS Letters**, v. 517, p. 257-260, 2002.

GOMES, F. P. **Curso de Estatística Experimental**. 14. ed. Piracicaba: Nobel, 2000.

GONTHIER, M.-P.; VERNY, M.-A.; BESSON, C.; RÉMÉSY, C.; SCALBERT, A. Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. **The Journal of Nutrition**, v. 133, p. 1853-1859, 2003.

GRAPHPAD PRISM 4.0 for Windows. San Diego, California: GraphPad Software, 2003.

GUTMANN, I.; BERGMAYER, H. U. Determination of urea, indicator reaction with phenol and hypochlorite. In: BERGMAYER, H. U. **Methods of Enzymatic Analysis**. New York: Academic Press, 1974. p. 1790-1798.

GUTMANN, I.; WAHLEFELD, W. L-(+)-Lactate. Determination with lactate dehydrogenase and NAD. In: BERGMAYER, H. U. **Methods of Enzymatic Analysis**. New York: Academic Press, 1974. p. 1464-1472.

HEMMERLE, H.; BURGER, H.-J.; BELOW, P.; SCHUBERT, G.; RIPPEL, R.; SCHINDLER, P. W.; PAULUS E.; HERLING A. W. Clorogenic acid and sintetic clorogenic acid derivatives: novel inhibitors of hepatic glucose-6-fosfatase translocase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, n. 2, p. 137-145, 1997.

HERLING, A. W.; BURGER, H.-J.; SCHUBERT, G.; HEMMERLE, H.; SHAEFER, H.; KRAMER, W. Alterations of carbohydrate and lipid intermediary metabolism during inhibition of glucose-6-phosphatase in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 386, p. 75-82, 1999.

HERLING, A. W.; BURGER H.-J.; SCHWAB, D.; HEMMERLE, H.; BELOW, P.; SCHUBERT, G. Pharmacodynamic profile of a novel inhibitor of the glucose-6-phosphatase system. **American Journal of Physiology**, v. 274, n. 37, p. G1087-G1093, 1998.

HERLING, A. W.; SCHWAB, D.; BURGER, H.-J.; MAAS, J.; HAMMERL, R.; SCHMIDT, D.; STROHSCHHEIN, S.; HEMMERLE, H.; SCHUBERT, G.; PETRY, S.; KRAMER, W. Prolonged blood glucose reduction in mrp-2 deficient rats (GY/TR⁻) by the glucose-6-phosphate translocase inhibitor S 3025. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1569, p. 105-110, 2002.

HERS, H.-G.; HUE, L. Regulation of hepatic glycolysis and gluconeogenesis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 52, p. 617-653, 1983.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3. ed. v. 1. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985.

JAKOBSSON, S. V.; DALLNER, G. Nature of the increase in liver microsomal glucose-6-phosphatase activity during the early stages of alloxan-induced diabetes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 165, p. 380-392, 1968.

JOHNSTON, K. L.; CLIFFORD, M. N.; MORGAN, L. M. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78 p. 728-733, 2003.

KELMER-BRACHT, A. M. **Efeitos metabólicos e transporte do ácido niflúmico no fígado de rato**. 1993. Tese-Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

KELMER-BRACHT, A. M.; ISHII, E. L.; ANDRADE, P. V. M.; BRACHT, A. Construção de aparelho de perfusão de fígado para estudos de regulação do metabolismo e de mecanismos de ação de drogas. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 27, n. 4, p. 419-438, 1984.

KHAN, A.; CAO, H.-L.; LANDAU, B. R. Glucose-6-phosphatase activity in islets from ob/ob and lean mice and the effect of dexamethasone. **Endocrinology**, v. 136, p. 1934-1938, 1995.

KHAN, A.; CHANDRAMOULI, V.; OSTENSON, C.-G.; BERGGREN, P.-O.; LOW, H.; LANDAU, B. R.; EFENDIC, S. Glucose cycling is markedly enhanced in pancreatic islets of obese hyperglycemic mice. **Endocrinology**, v. 126, p. 2413-2416, 1990a.

KHAN, A.; CHANDRAMOULI, V.; OSTENSON, C.-G.; LOW, H.; LANDAU, B. R.; EFENDIC, S. Glucose cycling in islets from healthy and diabetic rats. **Diabetes**, v. 39, p. 456-459, 1990b.

KHAN, A.; LING, Z.-C.; PUKK, K.; HERLING, A.; LANDAU, B. R.; EFENDIC, S. Effects of 3-mercaptopicolinic acid and a derivative of chlorogenic acid (S-3483) on hepatic and islet glucose-6-phosphatase activity. **European Journal of Pharmacology**, v. 349, p. 325-331, 1998.

KONISHI, Y.; KOBAYASHI, S. Transepithelial transport of chlorogenic acid, caffeic acid, and their colonic metabolites in intestinal Caco-2 cell monolayers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 9, p. 2518-2526, 2004.

KY, C.-L.; NOIROT, M.; HAMON, S. Comparison of five purification methods for chlorogenic acids in green coffee beans (*Coffea sp.*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 3, p. 786-790, 1997.

LECAVALIER, L.; BOLLI, G.; CRYER, P.; GERICH, J. Contributions of gluconeogenesis and glycogenolysis during glucose counterregulation in normal humans. **American Journal of Physiology**, v. 256, n. 19, p. E 844-851, 1989.

LOPES, G.; HELL, N. S.; LIMA, F. B.; VARDANEGA, M.; BAZOTTE, R. B. Responsiveness of glycogen catabolism to adrenergic agonists during insulin-induced hypoglycemia in rat livers. **General Pharmacology**, v. 30, n. 4, p. 593-599, 1998.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. J. Protein measurement with Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 131-138, 1957.

MAGNUSSON, I.; ROTHMAN, D. L.; GERARD, D. P.; KATZ, L. D.; SHULMAN, G. I. Contribution of hepatic glycogenolysis to glucose production in humans in response to a physiological increase in plasma glucagon concentration. **Diabetes**, v. 44, n. 2, p. 185-189, 1995.

McCARTY, M. F. A chlorogenic acid-induced increase in glp-1 production may mediate the impact of heavy coffee consumption on diabetes risk. **Medical Hypotheses**, v. 64, p. 848-853, 2005a.

McCARTY, M. F. Nutraceutical resources for diabetes prevention-an update. **Medical Hypotheses**, v. 64, p. 151-158, 2005b.

METODOLOGIA ISO 10095. Coffee - Determination of caffeine content - Method using high-performance liquid chromatography. 1. ed. 1992.

METODOLOGIA ISO 11292. Instant coffee – Determination of free and total carbohydrate contents - Method using high-performance anion-exchange chromatography.

METODOLOGIA ISO 3726. Instant coffee - Determination of loss in mass at 70°C under reduced pressure (Karl Fisher). 1. ed. 1983.

MIHARA, K.; SATO, R. Partial purification of NADH-cytochrome b₅ reductase from rabbit liver microsomes with detergents and its properties. **Journal of Biochemistry**, v. 71, p. 725-735, 1972.

MONTEIRO, M. C.; TRUGO, L. C. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 637-641, 2005.

MOORE, L.; CHEN, T.; KNAPP, R.; LANDON, E. J. Energy-dependent calcium sequestration activity in rat liver microsomes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 12, p. 4562-4568, 1975.

MOORE, M. C.; CONNOLLY, C. C.; CHERRINGTON, A. D. Autoregulation of hepatic glucose production. **European Journal of Endocrinology**, v. 138, p. 240-248, 1998.

NARDINI, M.; CIRILLO, E.; NATELLA, F.; SCACCINI, C. Absorption of phenolic acid in humans after coffee consumption. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 20, p. 5735-5741, 2002.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

NILSSON, O. S.; ARION, W. J.; DEPIERRE, J. W.; DALINER, G.; ERNSTER, L. Evidence for the involvement of a glucose-6-phosphate carrier in microsomal glucose-6-phosphatase activity. **European Journal of Biochemistry**, v. 82, p. 627-634, 1978.

NOGUEIRA, M.; TRUGO, L. C. Distribuição de isômeros de ácido clorogênico e teores de cafeína e trigonelina em cafés solúveis brasileiros. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 296-299, 2003.

NORDLIE, R. C. Multi-functional glucose-6-phosphatase of the endoplasmic reticulum and nuclear membrane. In: MARTINOSI, A. N. **Vitamin and Hormones**. New York: Ed. Plenum, 1982. p. 263-268.

OLTHOF, M. R.; HOLLMAN, P. C. H.; BUIJSMAN, M. N. C. P.; VAN AMELSVOORT, J. M. M. ; KATAN, M. B. Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. **The Journal of Nutrition**, v. 133, p. 1806-1814, 2003.

OLTHOF, M. R.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. **The Journal of Nutrition**, v. 131, p. 66-71, 2001.

PARKER, J. C.; VANVOLKENBURG, M. A.; LEVY, C. B.; MARTIN, W. H.; BURK, S. H.; KNOW, Y.; GIRAGOSSIAN, C.; GANT, T. G.; CARPINO, P. A.; MCPHERSON, R. K.; VESTERGAARD, P.; TREADWAY, J. L. Plasma glucose levels are reduced in rats and mice treated with an inhibitor of glucose-6-phosphate translocase. **Diabetes**, v. 47, p. 1630-1636, 1998.

PERSEGUIN, G.; REGALLA, E.; BATTEZZATI, A.; VERGANI, S.; PULVIRENTI, A.; TERRUZZI, I.; BARATTI, D.; BOZZETTI, F.; MAZZAFERRO, V.; LUIZI, L. Regulation of glucose homeostasis in humans with denervated livers. **Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 4, p. 931-941, 1997.

PILKIS, S. J.; GRANNER, D. K. Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. **Annual Review of Physiology**, v. 54, p. 885-909, 1992.

PLUMB, G. W.; GARCIA-CONESA, M. T.; KROON, P. A.; RHODES, M.; RIDLEY, S.; WILLIAMSON, G. Metabolism of chlorogenic acid by human plasma, liver, intestine and gut microflora. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 390-392, 1999.

ROCHE. **Relatório de avaliação do sistema Advantage e tira de teste Advantage II**. Indianapolis: Roche Diagnostics Corporation, 2001.

SALAZAR-MARTINEZ, E.; WILLETT, W. C.; ASCHERIO, A.; MANSON, J. E.; LEITZMANN, M. F.; STAMPFER, M. J.; HU, F. B. Coffee consumption and risk for type 2 diabetes mellitus. **Annals of Internal Medicine**, v. 140, n. 1, p. 1-8, 2004.

SCHANNE, F. A. X.; MOORE, L. Liver plasma membrane calcium transport. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 21, p. 9886-9889, 1986.

SCHINDLER, P. W.; BELOW, P.; HEMMERLE, H.; BURGER, H.-J.; SWAMY, K. H. S.; ARION, W. J.; EFENDIC, S.; HERLING, A. W. Identification of two new inhibitors of the hepatic glucose-6-phosphatase system. **Drug Development Research**, v. 43, p. 34-40, 1998.

SCHWAB, D.; HERLING, A. W.; HEMMERLE, H.; SCHUBERT, G.; HAGENBUCH, B.; BURGER, H.-J. Hepatic uptake of synthetic chlorogenic acid derivatives by the organic anion transport proteins. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 296, n. 1, p. 91-98, 2001.

SCOTT, H. M.; BURCHELL, A. Effects of drugs on the hepatic microsomal glucose-6-phosphatase system. **Biochemical Society Transactions**, v. 20, p. 37S, 1991.

SEONAE, J.; TRINH, K.; O'DOHERTY, R. M.; GOMEZ-FOIX, A. M.; LANGE, A. J.; NEWGARD, C. B.; GUINOVART, J. J. Metabolic impact of adenovirus-mediated overexpression of the glucose-6-phosphatase catalytic subunit in hepatocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 26972-26977, 1997.

SHIMAZU, T. Reciprocal innervation of the liver: its significance in metabolic control. In: LEVINE, R. & LUFF, R. **Advances in Metabolic Disorders**, 10 (CNS Regulation of Carbohydrate Metabolism). New York: Ed. Szabo, A. J., Academic Press, 1983. p. 355-384.

SHIOTA, M.; GREEN, R.; COLBURN, C.; MITCHELL, G.; CHERRINGTON, A. D.; Inability of hyperglycemia to counter the ability of glucagon to increase net glucose output and activate glycogen phosphorylase in the perfused rat liver. **Metabolism**, v. 45, n. 4, p. 481-485, 1996.

SIMON, C.; HERLING, A. W.; PREIBISH, G.; BURGER, H.-J. Upregulation of hepatic glucose 6-phosphatase gene expression in rats treated with an inhibitor of glucose-6-phosphate translocase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 373, n. 2, p. 418-428, 2000.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Número de pessoas com diabetes no país**. Disponível em <<http://www.diabetes.org.br>>. Acesso em 05 set. 2005.

SONG, C. S.; RUBIN, W.; RIFKIND, A. B.; KAPPAS, A. Plasma membranes of the rat liver. Isolation and enzymatic characterization of a fraction rich in bile canaliculi. **Journal of Cellular Biology**, v. 41, p. 124-132, 1969.

SOTILLO, D. V. R.; HADLEY, M. Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of: cholesterol, triacylglycerol and minerals in (*fa/fa*) Zucker rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 717-726, 2002.

SOUZA, H. M. **Resposta glicogenolítica e responsividade hepática a substratos neoglicogênicos durante hipoglicemia induzida por insulina**. 1999. 156 p. Tese – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

STATISTICA 5.1 for Windows, v. 1. Tulsa, OK: StatSoft Inc. Software, 1998.

STEWART, A. J.; CROZIER, A. Chlorogenic acids in coffee-absorption and excretion by human volunteers. In: ASIC 20^o COLLOC, 2004, Bangalore-India. **CD-ROM ASIC 20^o Colloc**. Bangalore, 2004. p. 52-59.

STRYER, L. **Bioquímica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

TAPPY, L. Regulation of hepatic glucose production in healthy subjects and patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Diabetes & Metabolism**, v. 21, n. 4, p. 233-240, 1995.

TIETZ, N. W. **Clinical Guide to Laboratory Tests**. 4th. Saunders, 1995.

TRINDER, P. Determination of blood-glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 6, p. 24, 1969.

TRUGO, L. C.; MACRAE, R. Chlorogenic acid composition of instant coffees. **Analyst**, v. 109, p. 263-266, 1984.

TUOMILEHTO, J.; BIDEL, S.; HU, G. Coffee and risk of type 2 diabetes. In: ASIC 20^o COLLOC, 2004, Bangalore-India. **CD-ROM ASIC 20^o Colloc**. Bangalore, 2004. p. 27-34.

TURNER, N. C.; CLAPHAM, J. C. Insulin resistance, impaired glucose tolerance and non-insulin-dependent diabetes, pathologic mechanisms and treatment: current status and therapeutic possibilities. In: JUCKER, E. **Progress in Drug Research**. Birkhauser-Verlag, 1998. p. 35-94.

URGET, R.; KATAN, M. B. The cholesterol-raising factor from coffee beans. **Annual Review of Nutrition**, v. 17, p. 305-324, 1997.

VAN DAM, R. M.; DEKKER, J. M.; NIJPELS, G.; STEHOUWER, C. D. A.; BOUTER, L. M.; HEINE, R. J. Coffee consumption and incidence of impaired fasting glucose, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetes: the Hoorn study. **Diabetologia**, v.47, p. 2152-2159, 2004.

VAN DAM, R. M.; FESKENS, E. J. M. Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus. **The Lancet**, v. 360, p. 1477-1478, 2002.

VAN DIJK, T. H.; VAN DER SLUIJS, F. H.; WIEGMAN, C. H.; BALLER, J. F. W.; GUSTAFSON, L. A.; BURGER, H.-J.; HERLING, A. W.; KUIPERS, F.; MEIJER, A. J.; REIJNGOUD, D. J. Acute inhibition of hepatic glucose-6-phosphatase does not affect gluconeogenesis but directs gluconeogenic flux toward glycogen in fasted rats. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 28, p. 25727-25735, 2001.

VANDER, A. J.; SHERMAN, J. H.; LUCIANO, D. S. **Human Physiology: the mechanism of body function**. 7th. United States of America: Mcgraw Hill, 1998.

VILLELA, G. G.; BACILA, M.; TASTALDI, H. **Técnicas e Experimentos de Bioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1973.

VOET, D.; VOET, J.G. **Biochemistry**. 2th. New York: John Wiley & Sons, 1995. p. 484-512.

WALLIN, B. K.; ARION, W. J. The requirement for membrane integrity in the inhibition of hepatic glucose 6-phosphatase by sulfhydryl reagents and taurocholate. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 48, n. 3, p. 694-699, 1972.

WELSCH, C. A.; LACHANCE, P. A.; WASSERMAN, B. P. Dietary phenolic compounds: inhibition of Na⁺-dependent D-glucose uptake in rat intestinal brush border membrane vesicles. **The Journal of Nutrition**, v. 119, n. 11, p. 1698-1704, 1989.

WÜRZNER, H.-P.; LINDSTRÖM, E.; VUATAZ, L. A 2-year feeding study of instant coffees in rats. I-body weight, food consumption, haematological parameters and plasma chemistry. **Food and Cosmetics Toxicology**, v. 15, p. 7-16, 1977.

YAMAJI, T.; MIZOUE, T.; TABATA, S.; OGAWA, S.; YAMAGUCHI, K.; SHIMIZU, E.; MINESHITA, M.; KONO, S. Coffee consumption and glucose tolerance status in middle-aged Japanese men. **Diabetologia**, v. 47, p. 2145-2151, 2004.

YANG, H; YUAN, B.; LI, L.; CHEN, H.; LI, F. HPLC Determination and pharmacokinetics of chlorogenic acid in rabbit plasma after an oral dose of *Flos Lonicerae* extract. **Journal of Chromatographic Science**, v. 42, p. 173-176, 2004.