



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
EGAS MONIZ**

**MESTRADO EM NUTRIÇÃO CLÍNICA**

**EFEITO DA INGESTÃO DE 1G DE CHÁ BRANCO, CHÁ VERDE E  
CHÁ PRETO NA GLICÉMIA PÓS-PRANDIAL EM INDIVÍDUOS  
SAUDÁVEIS APÓS UMA PROVA DE TOLERÂNCIA ORAL À  
GLUCOSE**

Trabalho submetido por  
Sandra Marisa Gomes Lopes  
Para a obtenção do grau de Mestre em Nutrição Clínica

Trabalho orientado por  
**Professora Doutora Maria Fernanda Mesquita**

Outubro 2014



Aos meus pais e irmão, por tudo o que fizeram e fazem por mim e sem os quais o caminho percorrido não teria o mesmo valor...



## **AGRADECIMENTOS**

À Professora Doutora Maria Fernanda Mesquita, pela sua orientação, compreensão, paciência e disponibilidade, por me ter guiado nos momentos de maior dificuldade e por me ter ajudado a elaborar um trabalho de qualidade e rigor;

À Professora Doutora Margarida Moncada, pelo seu auxílio técnico no laboratório, a sua disponibilidade para responder às minhas questões e pela sua inesgotável simpatia;

À Professora Doutora Alexandra Bernardo, pelo seu auxílio na procura da excelência dos métodos utilizados neste estudo;

À Professora Doutora Paula Pereira, pela sua ajuda na escolha de um tema de entre o mundo de opções que tinha em mim e que assim contribuiu para este estudo;

À Mestre Alexandra Cardoso, por toda a sua ajuda ao longo do Mestrado, mas mais ainda por ser uma grande amiga;

Às colegas de Mestrado, sobretudo à Elisabeth Jerónimo e Ana Raquel Mateus, por estarem presentes quando eu mais precisei e por todos os risos e sorrisos nos últimos 2 anos;

Ao Bruno Dias, que soube entender os meus momentos de ausência e silêncio para me poder dedicar ao trabalho e que me mantinha no rumo certo quando começava a dispersar;

A todos os amigos e amigas, por todo o carinho e compreensão que demonstraram ao longo destes meses em que estive mais distante;

E por último, a todos os participantes deste estudo, que aceitaram fazer parte desta viagem e que agora chega ao fim;

O meu muito obrigada, esperando um dia poder retribuir!



## RESUMO

**Enquadramento:** O chá é a segunda bebida mais consumida em todo o mundo. Vários estudos realizados em modelos animais e em humanos têm sugerido um possível efeito benéfico sobre a glicémia pós prandial estando este efeito directamente associado à riqueza em polifenóis do chá bem como à sua actividade antioxidante.

**Objectivos:** Estudar o efeito da ingestão de 1 g de *C. sinensis* na forma de chá branco, chá verde e chá preto na glicémia capilar pós prandial de indivíduos saudáveis após uma prova de tolerância oral à glucose (PTOG). Determinar o conteúdo em fenóis, flavonóis, proantocianidinas e capacidade antioxidante de cada um dos chás em estudo.

**Materiais e Métodos:** 40 indivíduos adultos saudáveis foram distribuídos por quatro grupos experimentais, tendo o efeito do chá sido obtido por comparação de valores médios de glicémia capilar em jejum e após PTOG nos instantes 0, 30, 60, 90 e 120 minutos do grupo controlo com os valores médios de glicémia capilar obtidos no jejum e após PTOG com ingestão de 300 mL de chá branco, chá verde e chá preto. Foram ainda conduzidos testes químicos colorimétricos para a determinação do teor em fenóis e flavonóis totais, proantocianidinas, bem como testes de capacidade antioxidante por método FRAP, inibição do anião  $O_2^-$  e inibição do radical  $NO\cdot$ .

**Resultados:** Observou-se um efeito hiperglicemiante do chá verde entre os 30 e os 90 minutos não se tendo obtido diferenças significativas para o chá preto e o chá branco por apresentar diferenças significativas na glicémia de jejum ( $p=0,003$ ) não pôde ser objecto de comparação. Não se verificaram diferenças significativas para a AUC e  $\Delta C_{max}$  em nenhuma das bebidas. A análise química revelou valores elevados de fenóis no chá branco, verde e preto (384 mg/L, 584 mg/L e 508 mg/L de ácido gálico respectivamente), baixas concentrações de flavonóis (8,32 mg/L, 6,73 mg/L e 8,29 mg/L de quercitina respectivamente) e também baixas concentrações de proantocianidinas (38,5 mg/L, 23,25 mg/L, 41,11 mg/L de proantocianidina  $A_2$  respectivamente). O chá apresentou ainda uma capacidade antioxidante elevada (943 mg/L, 916 mg/L e 933 mg/L de Trolox respectivamente)

**Conclusão:** Este estudo sugere uma ausência de efeito do chá na glicémia pós prandial porém, confirma o chá como uma bebida rica em polifenóis de elevado poder antioxidante.

**Palavras-chave:** Chá, Glicémia pós-prandial, Polifenóis, Antioxidante



## ABSTRACT

**Background:** Tea is the second most consumed beverage in the world. Several studies conducted in animal models and human suggest a possible beneficial effect upon post prandial glycemia being this effect directly associated to the polyphenols richness of tea and its antioxidant activity.

**Objectives:** Determine the effect of ingesting 1g of *C. sinensis* in the form of white, green and black tea on the capilar glycemia of healthy subjects after an oral glucose tolerance test (OGTT). Determine the content of phenols, flavonols and proanthocyanidins as well as antioxidant capacity in each of the testing teas.

**Methods and Materials:** 40 healthy adults, were distributed into four experimental groups, being the effect of the tea obtained through the comparison of the mean values for fasting capilar glycemia and the values obtained after OGTT for the moments 0, 30, 60, 90 and 120 minutes on the control group with the means values obtained for fasting capilar glycemia and the values obtained after OGTT with the ingestion of 300 mL of white tea, green tea and black tea. Colorimetric analytical chemical tests were also performed to determine the total phenols, flavonols and proanthocyanidins content, as well as antioxidant capacity tests for white, green tea and black tea using FRAP method,  $O_2^-$  anion inhibition and  $NO\cdot$  radical inhibition.

**Results:** A Hyperglycemic effect was observed for green tea between 30 and 90 minutes, while for black tea no significant differences were observed and white tea could not be compared due to a significant difference in the fasting capilar glucose values ( $p=0,003$ ). AUC and  $\Delta C_{max}$  showed no differences for all beverages. The chemical analysis revealed high contents of phenols in white, green and black teas (384 mg/L, 584 mg/L and 508 mg/L of gallic acid respectively), low flavonols concentrations (8,32 mg/L, 6,73 mg/L and 8,29 mg/L of quercetin respectively) and also low concentrations of proanthocyanidins (38,5 mg/L, 23,25 mg/L, 41,11 mg/L of proanthocyanidin A<sub>2</sub> respectively). Tea also showed a high antioxidant capacity (943 mg/L, 916 mg/L and 933 mg/L of Trolox respectively).

**Conclusion:** This study suggests an absence of effect from tea upon post prandial glycemia however confirms it as a polyphenol rich beverage with a high antioxidant power.

**Keywords:** Tea, Post-Prandial Glycemia, Polyphenols, Antioxidant



## ÍNDICE GERAL

DEDICATÓRIA .....	3
AGRADECIMENTOS .....	5
RESUMO .....	7
ABSTRACT .....	9
ÍNDICE GERAL .....	11
ÍNDICE DE FIGURAS .....	15
ÍNDICE DE TABELAS .....	17
LISTA DE ABREVIATURAS .....	20
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>23</b>
<b>QUESTÃO DE INVESTIGAÇÃO</b> .....	<b>35</b>
<b>OBJECTIVOS DO ESTUDO</b> .....	<b>35</b>
1. Objectivo Geral .....	35
2. Objectivos específicos .....	35
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>38</b>
<i>A. Análise Química</i> .....	<i>38</i>
1. Reagentes e Soluções .....	38
2. Preparação da amostra para análise .....	39
3. Quantificação dos fenóis e flavonóis totais e das proantocianidinas do chá branco, chá verde e chá preto .....	39
3.1 Quantificação dos fenóis totais no chá branco, chá verde e chá preto .....	39
3.2 Quantificação de flavonóis totais no chá branco, chá verde e chá preto .....	40
3.3 Quantificação de Proantocianidinas no chá branco, chá verde e chá preto .....	40
4. Determinação da capacidade antioxidante do chá branco, chá verde e chá preto .....	41
4.1 Quantificação da capacidade antioxidante do chá branco, chá verde e chá preto por método FRAP .....	41
4.2 Quantificação da inibição do anião $O_2^-$ do chá branco, chá verde e chá preto .....	41

4.3	Quantificação da inibição do radical NO <sup>•</sup> do chá branco, chá verde e chá preto .....	42
<b>B.</b>	<b>Ensaio Clínico</b> .....	43
1.	Questões éticas .....	43
2.	População de estudo, distribuição dos grupos experimentais, variáveis de estudo .....	43
3.	Critérios de Inclusão.....	43
4.	Critérios de Exclusão .....	44
5.	Instrumentos de recolha de informação.....	44
5.1	Inquérito Geral .....	44
5.2	Análise do consumo alimentar .....	44
5.3	Dados antropométricos.....	45
5.4	Medição da glicémia pós prandial.....	45
6.	Preparação da prova de tolerância oral à glucose (PTOG).....	46
7.	Preparação do chá verde, chá branco, chá preto ( <i>C. sinensis</i> ).....	46
8.	Desenho de estudo.....	46
9.	Análise dos resultados.....	48
	<b>RESULTADOS</b> .....	51
<b>A.</b>	<b>Estudo da composição química do chá branco, chá verde e chá preto</b> .....	51
1.	Análise Química.....	51
1.1	Teor em fenóis e flavonóis totais e proantocianidinas .....	51
1.2	Capacidade antioxidante .....	51
1.2.1	Método FRAP .....	51
1.2.2	Inibição do anião O <sub>2</sub> <sup>-</sup> .....	52
1.2.3	Inibição do radical NO <sup>•</sup> .....	54
<b>B.</b>	<b>Ensaio Clínico</b> .....	56
1.	Caracterização da amostra.....	56
2.	Glicémia capilar .....	58
3.	Resultados de C <sub>max</sub> .....	63

4. Resultados da AUC .....	64
5. Resultados da relação de $C_{\max}$ e $\Delta C_{\max}$ .....	65
<b>DISCUSSÃO DE RESULTADOS</b> .....	67
<b>CONCLUSÃO</b> .....	72
<b>BIBLIOGRAFIA CONSULTADA</b> .....	74
<b>ANEXOS</b> .....	79



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Organograma do ensaio clínico .....	40
<b>Figura 2.</b> Gráfico da distribuição da amostra em percentagem segundo o seu género..	48
<b>Figura 3.</b> Histograma representativo da distribuição da idade em anos dos participantes por bebida .....	48
<b>Figura 4.</b> Histograma representativo da distribuição do peso em Kg dos participantes por tipo de bebida .....	49
<b>Figura 5.</b> Histograma representativo da distribuição da altura em metros dos participantes por bebida .....	49
<b>Figura 6.</b> Representação gráfica da distribuição em percentagem do IMC dos participantes por classe de IMC .....	50
<b>Figura 7.</b> Representação gráfica das curvas de glicémia para o grupo controlo após PTOG e <b>a)</b> PTOG + 300 mL de chá branco, <b>b)</b> PTOG + 300 mL de chá preto, <b>c)</b> PTOG + 300 mL de chá verde .....	55
<b>Figura 8.</b> Representação gráfica da percentagem de inibição do anião $O_2^-$ para o <b>a)</b> chá branco, <b>b)</b> chá verde, <b>c)</b> chá preto .....	60
<b>Figura 9.</b> Representação gráfica da percentagem de inibição do radical $NO^\cdot$ para o <b>a)</b> chá branco, <b>b)</b> chá verde, <b>c)</b> chá preto .....	62



## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição geral do chá verde, preto e branco .....	20
<b>Tabela 2.</b> Classes, subclasses e estrutura química basilar dos polifenóis .....	21
<b>Tabela 3.</b> Concentrações de polifenóis em infusões de chá verde e chá preto .....	23
<b>Tabela 4.</b> Estudos em linhas celulares e modelos animais que estudam os efeitos dos chá na glicémia pós prandial, secreção de insulina e na expressão de enzimas hipoglicemiantes .....	25
<b>Tabela 5.</b> Estudos em modelos humanos que estudam os efeitos dos chá na glicémia pós prandial, secreção de insulina e na expressão de enzimas hipoglicemiantes .....	26
<b>Tabela 6.</b> Caracterização da amostra (n = 40). Resultados apresentados em Mínimo (Min), Máximo (Max), média (Med) e erro padrão da média ( $\pm SEM$ ) .....	50
<b>Tabela 7.</b> Resultados da glicémia capilar medidos nos 5 momentos de estudo ( $T_{jej}$ , $T_{30}$ , $T_{60}$ , $T_{90}$ , $T_{120}$ ) após uma PTOG e ingestão de 300 mL de água (grupo controlo) e após uma PTOG seguida da ingestão de 300 mL de chá (branco, verde, preto). Valores apresentados em mínimo e máximo (n = 40). .....	51
<b>Tabela 8.</b> Resultados da glicémia capilar medidos nos 5 momentos de estudo ( $T_{jej}$ , $T_{30}$ , $T_{60}$ , $T_{90}$ , $T_{120}$ ) após uma PTOG e ingestão de 300 mL de água (grupo controlo) e após uma PTOG seguida da ingestão de 300 mL de chá (branco, verde, preto). Valores apresentados em Média (Med) e desvio padrão da média ( $\pm SEM$ ) (n = 40). .....	52
<b>Tabela 9.</b> Resultados da glicémia capilar medidos nos 5 momentos de estudo ( $T_{jej}$ , $T_{30}$ , $T_{60}$ , $T_{90}$ , $T_{120}$ ) após uma PTOG e ingestão de 300 mL de água (grupo controlo) e após uma PTOG seguida da ingestão de 300 mL de chá (branco, verde, preto). Valores apresentados em média (Med) e desvio padrão da média ( $\pm SEM$ ) (n = 40). O <i>p</i> – value obtido resulta da comparação das médias das respectivas bebidas para cada um dos tempos de estudo após a utilização do teste ANOVA de medições repetidas do tipo misto ( $p < 0,05$ ) .....	54

**Tabela 10.** Área sob a curva total (AUC). Os resultados apresentam-se na forma de média (Med) e erro padrão da média ( $\pm SEM$ ). *p*- value foi obtido através do teste *t-student* para avaliar a existência de diferenças entre os grupos ( $p < 0,05$ ) ..... 56

**Tabela 11.** Valores médios da concentração máxima ( $C_{max}$ ) e da variação da concentração máxima ( $\Delta C_{max}$ ). Os resultados apresentados encontram-se na forma de média (Med) e erro padrão da média ( $\pm SEM$ ). *p* – value foi obtido por comparação da média do grupo controlo com a media das bebidas em estudo com o teste *t-student* para avaliar a existência de diferenças entre os grupos ..... 57

**Tabela 12.** Quantificação do teor de fenóis e flavonóis totais e proantocianinas no chá branco, verde e preto. Resultados apresentados em média e erro padrão da média ( $\pm SEM$ )  $n = 3$ ..... 58

**Tabela 13.** Capacidade antioxidante do chá branco, verde e preto. Resultados apresentados sob a forma de média e erro padrão da média ( $\pm SEM$ ).  $n = 2$  ..... 59



## LISTA DE ABREVIATURAS

AGE: Produtos finais de glicação

AUC: Área sob a curva

BT: Black Tea

*C. sinensis*: *Camellia sinensis*

Cat: Catalase

C: Catequina

CB: Chá branco

CG: Grupo controlo

C<sub>max</sub>: Concentração máxima

CP: Chá preto

CV: Chá verde

DM2: Diabetes *mellitus* tipo 2

EC: Epicatequina

ECG: Epicatequina-3-galato

EGC: Epigallocatequina

EGCG: Epigallocatequina-3-galato

FR: Radicais livres

FRAP: Ferric Reducing/Antioxidant Power

GC: Galatocatequina

GLUT-(1, 2, 4); Transportadores de glucose

GT: Green Tea

GTE: Green Tea Extract

HbA1C: Hemoglobina glicada

HC: Hidratos de Carbono

HTA: Hipertensão Arterial

IMC: Índice de massa corporal

INSA: Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

ISCSEM: Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz

JDS: Japan Diabetes Society

Kg: Quilogramas

L: Lípidos

MG: Massa gorda

NA: Not Available

OMS: Organização Mundial de Saúde

P: Proteína

POD: Polifenol peroxidase

PPO: Polifenol oxidase

PTOG: Prova de tolerância oral à glucose

ROS: Espécies de oxigénio reactivas

SOD: Superóxido dismutase

SPSS: Statistical Package for Social Sciences

T °C: Temperatura em graus Celsius

T<sub>jej</sub>: Momento de medição da glicémia capilar em jejum

T<sub>0</sub>: Momento da medição da glicémia capilar após PTOG/ chá branco, chá verde, chá preto

T<sub>30</sub>: Momento da medição da glicémia capilar 30 minutos após PTOG/ chá branco, chá verde, chá preto

T<sub>60</sub>: Momento da medição da glicémia capilar 60 minutos após PTOG/ chá branco, chá verde, chá preto

T<sub>90</sub>: Momento da medição da glicémia capilar 90 minutos após PTOG/ chá branco, chá verde, chá preto

T<sub>120</sub>: Momento da medição da glicémia capilar 120 minutos após PTOG/ chá branco, chá verde, chá preto



## INTRODUÇÃO

O chá é uma bebida milenar (remonta ao ano de 4000 A.D) e a segunda bebida mais consumida em todo o mundo, ficando apenas atrás da água (Chacko, Thambi, Kuttan, & Nishigaki, 2010; Khan & Mukhtar, 2007; Stote & Baer, 2008). Ao longo de décadas os seus benefícios medicinais têm sido descritos destacando-se os seus efeitos antiangiogénico (Blumberg, 2003; Khurana, Venkataraman, Hollingsworth, Piche, & Tai, 2013), antibacterial (Vauzour, Rodriguez-Mateos, Corona, Oruna-Concha, & Spencer, 2010), anticarcinogénico (Ding, Yao, Yao, Fai, & Zhang, 2013; Yang, Wang, Lu, & Picinich, 2009), antiinflamatório (Yang & Landau, 2000), antiviral (de Oliveira et al., 2013), hipocolesterolémico (Singh, Banerjee, & Porter, 2009), hipoglicémico (Abe et al., 2009), e vasodilatador (Deka & Vita, 2011).

Assume-se que o chá teve a sua origem na China, estando documentado um livro do ano 780 sobre o cultivo, processamento e preparação do chá (Bond, 2012). A difusão do chá pelo mundo remonta ao século VIII, tendo começado no Japão e apenas chegado à Europa no século XVII através dos navios britânicos provenientes das trocas comerciais com a China. A planta do chá, *Thea sinensis*, foi classificada pelo botânico sueco Linnaeus em 1753, como pertencente ao género *Camellia*, por se tratar de uma planta sempre verde e a sub-espécie a que o seu nome alude refere-se à sua origem, sendo que *Camellia sinensis* é a espécie originária do Sul da China e *Camellia assamica* a espécie proveniente do norte da Índia da província de Assam (Zhang, 2012), havendo com a espécie chinesa, a mais comum e acessível, cerca de 10 000 formulações comercializadas em todo o mundo das quais as mais proeminentes são os chás preto, verde, branco e oolong (Zhang, 2012). Para se obterem os diversos chás, as folhas são sujeitas a diversos processos físicos e químicos traduzindo assim a grande variedade de chás existentes (Stote & Baer, 2008). Num processo primário e atendendo apenas à fermentação a que é sujeito, o chá divide-se em verde e branco (não fermentado), oolong (parcialmente fermentado) e preto (completamente fermentado) (Lin, Chen, & Harnly, 2008).

O chá branco (Hilal, 2007) o mais raro de todos os chás, é obtido através de uma colheita precoce das folhas e botões da *C.sinensis* (durante a primavera) ainda por

desabrochar, e é rapidamente colocado em secagem de modo a inibir as enzimas responsáveis pela complexação dos polifenóis do chá [Polifenol oxidase (PPO) e peroxidase (POD)] conservando assim todos os seus constituintes originais sem perdas de valor (Zhang, 2012). Este chá é particularmente rico em taninos dos quais se destacam as teaflavinas sendo que os efeitos benéficos para a saúde deste chá estão directamente relacionados a este polifenol.

O chá verde (Harbowy, 1997), é obtido através da colheita das folhas jovens (sobretudo do topo da planta) da *C.sinensis*, e passa por um processo de secagem (solar ou químico), cujo objectivo é inibir as enzimas polimerizantes supracitadas presentes nas folhas, de modo a preservar o conteúdo polifenólico original das folhas, sem que haja uma complexação e correspondente formação de polímeros fenólicos (Henning et al., 2004) que não lhe são característicos. Este chá é particularmente rico em flavanóis, dos quais a fracção mais predominante é a das catequinas tendo na (-)-epigallocatequina-3-galato [(-)-EGCG] o seu valor medicinal.

O chá preto (Olthof, Hollman, Buijsman, van Amelsvoort, & Katan, 2003), o mais extensamente processado, passa por uma oxidação enzimática via PPO e POD pois em presença de oxigénio estas enzimas tornam-se biologicamente activas, complexando os polifenóis simples da folha do chá, transformando-os em complexos poliméricos de crescente peso molecular – os taninos, sendo que destes a fracção em maior quantidade é a das tearubiginas e às quais se associam aos benefícios medicinais na ingestão deste chá (Beecher, 2003; Henning, et al., 2004).

A composição do chá é de difícil caracterização, uma vez que esta está dependente de factores ambientais (exposição solar, temperatura, poluentes ambientais) e geográficos (latitude) (Beecher, 2003). Na Tabela 1 tendo como referência o Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), é possível delinear a composição geral dos chás verde e preto, não havendo contudo dados disponíveis da composição do chá branco por este ter um consumo muito reduzido quando comparado com os restantes.

**Tabela 1.** Composição geral do chá verde, preto e branco. Retirado de: (INSA, 2006)

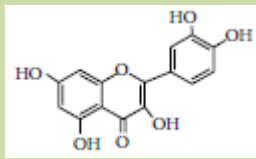
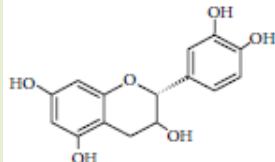
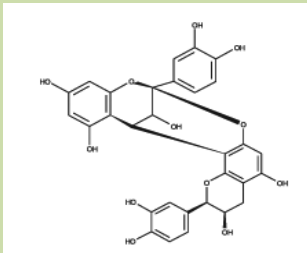
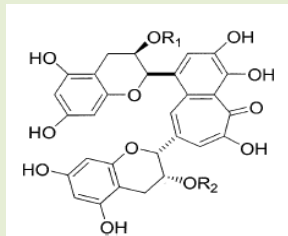
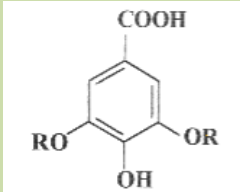
Constituinte	Verde *	Preto *	Branco <sup>1</sup>
Energia (kcal)	2	2	NA
Água (g)	99,7	99,8	NA
Proteína (g)	0,1	0,1	NA
Riboflavina (mg)	0,020	0,017	NA
Niacina (mg)	0,10	0,10	NA
Vitamina B6 (mg)	0,005	0,005	NA
Vitamina C (mg)	3,0	0	NA
Folatos (µg)	0,05	3,0	NA
Na (mg)	2,0	2,0	NA
K (mg)	10	11	NA
Ca (mg)	2,0	1,0	NA
P (mg)	1,0	1,0	NA
Mg (mg)	1,0	1,0	NA
Zn (mg)	0,1	0,1	NA

\*Valores apresentados por 100 g de parte edível.

<sup>1</sup> A composição do chá branco não existe na tabela de composição de alimentos do INSA (INSA, 2006)

O que torna o chá uma bebida tão interessante do ponto de vista medicinal é a sua concentração em fitoquímicos biologicamente activos, os polifenóis. Os polifenóis são um grupo heterogeneo e abrangente de fitoquímicos de origem vegetal, provenientes de alimentos como o chá, café, vinho, cacau, cereais, soja, fruta e bagos (Hanhineva et al., 2010). Os polifenóis repartem-se por diversas classes e subclasses de polímeros consoante a sua estrutura química. Na Tabela 2 é possível identificar as diversas classes pelas quais se dividem os polifenóis presentes no chá até à data conhecidos e a estrutura comum característica de cada subclasse.

**Tabela 2** Classes, subclasses e estrutura química basilar dos polifenóis do chá

Classe	Subclasse	Estrutura Química Basilar
Flavonóides <sup>1</sup>	Flavonóis (ex.: quercitina <sup>c</sup> )	
	Flavanóis (ex.: catequinas <sup>c</sup> )	
Taninos Condensados <sup>2</sup>	Antocianidinas (ex.: procianidinas <sup>a</sup> , prodelefinidinas, propelargonidinas)	
Taninos Derivados	Teaflavinas <sup>d</sup> Tearubiginas <sup>b</sup>	
Taninos Hidrolisáveis	Ácido Gálico <sup>e</sup> (R = H) Ácido Elágico	

<sup>1</sup>Estão identificados mais de 4000 espécies diferentes. Retirado de: (Young, 2001)

<sup>2</sup>Estão identificadas 15 subclasses sendo as classes apresentadas as mais proeminentes em alimentos de origem vegetal. Retirado de: (Beecher, 2003)

<sup>a</sup>Exemplo de uma procianidina dimérica do tipo A. Retirado de: (Scotti, 2007)

<sup>b</sup>Por terem uma elevada complexidade e tamanho molecular não possuem estrutura molecular definida

<sup>c</sup>Retirado de: (Kumar & Pandey, 2013)

<sup>d</sup>Retirado de: (Fatima, Kesharwani, Misra, & Rizvi, 2013)

<sup>e</sup>Retirado de: (Scotti, 2007)

De todos os polifenóis presentes no chá, dois grupos assumem maior preponderância tanto em quantidade como em efeitos medicinais (tendo o efeito hipoglicemiante maior destaque neste estudo), sendo eles os flavonóides e os taninos derivados. Os flavonóides são moléculas caracterizadas por conterem dois ou mais anéis aromáticos ligados entre si (1 átomo de oxigênio liga-se a 2 carbonos formando um

terceiro anel aromático de 6 carbonos) com um grupo hidroxilo aromático. Os flavonóides, estão presentes no chá verde sobretudo na forma de flavanóis, como já anteriormente referido, destacando-se a EGCG. A EGCG é de particular importância no chá pois em diversos estudos realizados esta apresenta um comportamento idêntico ao da insulina, mimetizando a sua acção e permitindo desta forma à célula aumentar o transporte de glucose para o meio intracelular. No chá verde existem ainda outras fracções de catequinas como a (+)-catequina [(+)-C], (-)-epicatequina [(-)-EC], (-)-epicatequina-3-galato [(-)-ECG], (-)-epigallocatequina [(-)-EGC] e a (+)-galocatequina [(+)-GC], nas suas formas monoméricas e poliméricas bem como os seus derivados funcionais (Beecher, 2003), os taninos condensados. Os taninos condensados do chá verde apresentam-se na forma de proantocianidinas (precursores das antocianinas) que se traduzem pela complexação de catequinas, formando extensos polímeros, com uma acção antioxidante bastante importante a nível biológico uma vez que actuam na neutralização de espécies reactivas (também conhecidas por radicais livres) que interferem na forma como a célula transporta os nutrientes para o seu interior.

Apesar do chá branco, à semelhança do chá verde, não ser processado a sua fracção de polifenóis dominante não é a de flavanóis mas sim de taninos derivados, nomeadamente teaflavinas. As teaflavinas são compostos poliméricos obtidos através da conjugação de diferentes catequinas, existindo quatro grandes grupos de teaflavinas (EC + EGC, teaflavina; EC + EGCG, teaflavina-3 galato; ECG + EGC, teaflavina-3'-galato; ECG + EGCG, teaflavina-3,3'-galato). A acção que as teaflavinas exercem sobre a glicémia pode estar ligada ao grupo de teaflavinas de maior expressão no chá e à metabolização intestinal que sofrem por parte da microflora, aumentando assim a fracção de catequinas circulantes disponível, tendo estas a mesma actuação que as anteriormente descritas no chá verde.

O chá preto, tal como o chá branco, tem nos taninos derivados a sua maior fonte de polifenóis, sendo no entanto a fracção de tearubiginas a que mais se destaca e que tão característica é deste chá. As tearubiginas são obtidas por oxidação dos flavanóis no processo de fabrico do chá preto, não sendo contudo conhecida uma estrutura base devido à sua enorme variabilidade, tanto em peso molecular como em complexidade, estando também pouco esclarecida a forma como exercem uma acção sobre a glicémia, hipotetizando-se (Lin, et al., 2008) porém que pelo facto de serem moléculas

ligeriamente ácidas possam ter um potencial antioxidante elevado e assim proteger a célula de danos oxidativos, tal como descritos no chá verde.

A Tabela 3 resume de forma sintética a composição dos diferentes chás no que às fracções de polifenóis diz respeito.

**Tabela 3.** Concentrações de polifenóis em infusões de chá verde, chá preto e chá branco. Retirado de: (Hilal, 2007)

Infusão	Total de polifenóis (g/ 100 g)	Total de flavanóis (g/ 100 g)	Teaflavinas (g/ 100 g)	Tearubiginas (g/ 100 g)
Chá verde	17,0	15,1	5,9	
Chá preto	16,5	4,2	59,7	
Chá branco	21,54	13,22	N.A. <sup>1</sup>	

<sup>1</sup>N.A.: Not Available

O interesse no chá e nos seus polifenóis tem crescido nas últimas décadas pois a sua ingestão parece contrariar os efeitos negativos da alteração dos hábitos alimentares das populações. O estilo de vida das populações tem mudado ao longo dos anos e com esta mudança várias doenças têm surgido, as denominadas “doenças da civilização” como a Hipertensão Arterial (HTA), a Diabetes Mellitus 2 (DM2), o Alzheimer, o Cancro, entre outras (Kim, 2014; Minich & Bland, 2013).

A DM2 tem um particular interesse, pois a sua incidência tem vindo a aumentar nos últimos anos, sendo que no fim do ano 2000 estima-se que existissem 150 milhões de pessoas afectadas por esta doença (Engelgau, Narayan, Saaddine, & Vinicor, 2003). Esta doença, de acordo com a Japan Diabetes Society (JDS), pertence a um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por uma hiperglicémia crónica por acção deficiente da insulina, que se traduz em distúrbios metabólicos ao nível dos hidratos de carbono (HC), lípidos (L) e proteínas (P). As perturbações metabólicas provocadas por esta doença podem estar relacionadas com uma secreção deficiente de insulina (absoluta ou relativa) ou a uma sensibilidade reduzida à mesma (insulino resistência) em órgãos ou células nos quais a insulina actua (Seino et al., 2010). Os valores de glicémia para os quais se diagnostica a DM2 estão definidos para, (i) um valor de glicémia em jejum  $\geq 126$  mg/dL, (ii) glicémia de 2 horas após uma prova de tolerância oral à glucose (PTOG)  $\geq 200$  mg/dL, (iii) valores de hemoglobina glicada (HbA1c)  $\geq 6,9\%$ . De todos os testes disponíveis a PTOG é o mais sensível na deteção de distúrbios no metabolismo

da glucose. Este teste pressupõe um jejum de 10-14 horas, após o qual o indivíduo deverá ingerir 75 g de glucose anidra ou uma bebida de 250 – 350 mL igualmente adoçada de modo a que haja uma elevação da glicémia, sendo esta subida do valor basilar de glucose denominada de glicémia pós prandial. A PTOG é assim um teste que avalia a taxa de metabolização da glucose após uma carga oral com a mesma (Seino, et al., 2010).

Os mecanismos pelos quais o chá e os seus polifenóis exercem uma acção biológica ainda não são totalmente conhecidos, estando dependentes de factores como polimorfismos genéticos nas enzimas envolvidas na sua metabolização (Blumberg, 2003), microflora intestinal diferente entre indivíduos (Del Rio, Stalmach, Calani, & Crozier, 2010; Hanhineva, et al., 2010), a forma como são absorvidos podendo estar dependentes de proteínas (como a albumina) ou outros polifenóis com uma absorção semelhante (Seino, et al., 2010), e estilo de vida (hábitos tabágicos, ingestão de gorduras, entre outros) (Seino, et al., 2010; Yang & Landau, 2000). Os estudos realizados até hoje sobre o chá e o seu efeito na glicémia são pouco conclusivos e contraditórios. A Tabela 4 exhibe de uma forma sintética os resultados dos vários ensaios clínicos realizados em modelos animais, enquanto que a Tabela 5 resume os vários estudos realizados em humanos saudáveis e diabéticos e o efeito do chá no controlo da glicémia pós prandial.

**Tabela 4.** Estudos em modelos animais que estudam os efeitos dos chá na glicemia pós prandial, secreção de insulina e na expressão de enzimas hipoglicemiantes

Referência, Ano	Participantes			Intervenção			Resultados
	Amostra	N	Género	Desenho	Dose	Duração	
<b>Wolfram et al, 2006</b>	Ratos diabéticos (db/db)	23	23 ♂ <sup>1*</sup>	Ensaio clínico controlado com placebo	2.5, 5.0, 10.0 g/kg de EGCG 72.0 mg/kg de rosiglitazona (controlo positivo)	7 semanas	Efeito hipoglicemiante verificado numa base dose-dependente
<b>Ortsater et al, 2012</b>	Ratos diabéticos (db/db)	NA*	♂ <sup>1*</sup>	Ensaio clínico	GTE <sup>1</sup> com EGCG <sup>2</sup>	10 semanas	Efeito hipoglicemiante estatisticamente significativo com redução na AUC

\*Non available; <sup>1\*</sup>Macho; <sup>1</sup>GTE: Green Tea Extract; <sup>2</sup>Epigallocatequina galato

**Tabela 5.** Estudos em modelos humanos que estudam os efeitos dos chá na glicemia pós prandial, secreção de insulina e na expressão de enzimas hipoglicemiantes

Referência, Ano	Participantes			Intervenção			Resultados
	Amostra	N	Género	Desenho	Dose	Duração	
<b>Bryans et al, 2007</b>	Adultos saudáveis	16	4 ♂ <sup>1*</sup> 12 ♀ <sup>2*</sup>	Ensaio clínico randomizado controlado	75g açúcar + 250mL água 0,052g de cafeína + 250mL água 1g BT <sup>2</sup> + 250mL água 3g BT + 250mL água	4 dias, 150 minutos cada	Concentração de glucose diminuída aos 120 minutos quando ingerido 1 g de BT
<b>Louie et al, 2008</b>	Adultos saudáveis	8	5 ♂ <sup>1*</sup> 3 ♀ <sup>2*</sup>	Ensaio clínico randomizado controlado	250mL de BT 1 hora antes da refeição	7 dias, 120 minutos cada	Ausência de resultados estatisticamente significativos
<b>Park et al, 2009</b>	Adultos saudáveis	NA <sup>*</sup>	NA <sup>*</sup>	Ensaio clínico controlado com placebo	350mL de água com GTE (125-500 mg de EGCG) 350mL de água com GTE e PEG 350mL água	180 minutos	Efeito hipoglicemiante do GTE contra o controlo Aumento da concentração da glucose 60 minutos após a carga glicémica
<b>Brown et al, 2009</b>	Adultos com excesso de peso e obesos	88	88 ♂ <sup>1*</sup>	Ensaio clínico controlado com placebo	800mg de EGCG Placebo de lactose	8 semanas	Ausência de resultados estatisticamente significativos
<b>Josic et al, 2010</b>	Adultos saudáveis	14	7 ♂ <sup>1*</sup> 7 ♀ <sup>2*</sup>	Ensaio clínico randomizado controlado	300mL GT <sup>3</sup> 300mL água	2 dias, 120 minutos cada	Ausência de efeito hipoglicemiante Aumento da glicémia aos 120 minutos

\*Non available; <sup>1</sup>GTE: Green Tea Extract; <sup>2</sup>BT: Black Tea; <sup>3</sup>GT: Green Tea

Os ensaios clínicos conduzidos em animais testaram o efeito do extrato de chá verde (GTE) e o seu polifenol mais preponderante, a EGCG, na glicémia de ratos diabéticos por um período de 7 a 10 semanas, tendo sido observado um efeito hipoglicemiante tanto com o GTE como com a EGCG resultando numa AUC inferior quando comparada com o grupo controlo não tratado. Apesar da dose administrada não ser a mesma nos estudos, ambos apontam para um efeito na glicémia dose-dependente.

Ao contrário da aparente convergência de resultados dos estudos em modelos animais, os estudos em humanos são menos concensuais, demonstrando uma ausência de efeito sobre a glicémia pós prandial e em alguns casos está descrito um efeito hiperglicemiante.

Os estudos clínicos realizados em adultos saudáveis diferem no número de participantes (8 – 16), no modo como o ensaio é conduzido (com presença de grupo controlo ou cross-over), na duração (120 minutos a 16 semanas), na forma como é conduzida a prova de avaliação da glicémia (antes de uma refeição rica em HC ou após PTOG) e na bebida teste dada aos participantes (chá verde ou chá preto). Apesar de todas as diferenças mencionadas os resultados dos vários estudos apontam em diferentes direcções sendo que em alguns não existe um efeito na glicémia pós prandial com significado estatístico enquanto noutros existe um efeito hipoglicemiante acompanhado de um aumento de glicémia aos 60 e aos 120 minutos. O estudo realizado em adultos com excesso de peso distingue-se dos restantes estudos por ser controlado por placebo e utilizar na bebida teste a EGCG. Os resultados obtidos neste estudo indicam que não ocorre um efeito hipoglicemiante estatisticamente significativo após a ingestão de EGCG. Com base nos estudos consultados não é possível afirmar se o chá tem um efeito na glicémia pós prandial apesar de os resultados em adultos saudáveis indicarem uma inexistência de acção hipoglicemiante.

Sendo o chá uma bebida tão popular no mundo e o seu consumo bastante significativo, e não existindo ainda um estudo comparativo entre os três principais chás (branco, verde e preto), considerou-se pertinente estudar o efeito de 1 g de chá branco, verde e preto em 300 ml de água na glicémia pós prandial de indivíduos saudáveis após PTOG, sendo este o principal objectivo deste estudo. Considerou-se ainda importante caracterizar cada um dos chás no que respeita ao seu conteúdo em polifenóis totais, proantocianidinas, flavonóis pois são estas moléculas as responsáveis pelos possíveis

efeitos do chá na glicémia. A capacidade antioxidante de cada um dos chás foi também analisada pois os estudos referem uma acção protectora dos polifenóis sobre a célula através da neutralização de radicais livres (FR).

*Efeito da ingestão de 1g de chá branco, chá verde e chá preto na glicemia pós prandial de indivíduos saudáveis após uma prova de tolerância oral à glucose*

## QUESTÃO DE INVESTIGAÇÃO

Considerando que o consumo de chá (*Camelia sinensis*) pode ser benéfico para a regularização da glicémia pós prandial como sugerido por diversos estudos, o presente estudo pretende estudar o efeito da ingestão de 300 ml de chá branco, chá verde e chá preto na glicémia pós prandial de indivíduos saudáveis após uma PTOG.

## OBJECTIVOS DO ESTUDO

### 1. Objectivo Geral

- 1.1 Estudar o efeito de 1g de chá branco, chá verde e chá preto na glicémia pós prandial de indivíduos adultos saudáveis após a ingestão de 300 ml de água com 50 g de açúcar (PTOG).
- 1.2 Determinar o conteúdo em polifenóis e flavonóis totais, proantocianidinas e ainda a capacidade antioxidante de uma dose de chá verde, chá branco e chá preto (1 g de *C. sinensis* branco, verde, preto/300 mL água).

### 2. Objectivos específicos

- 2.1 Comparar os valores médios da glicémia para cada momento de estudo ( $T_{\min} = 0, 30, 60, 90, 120$ ) dos participantes após a PTOG do grupo controlo com os valores médios da glicémia após a PTOG seguida da ingestão de uma dose de chá de branco, verde ou preto (com 1 g de *C. sinensis* /300 mL);
- 2.2 Comparar o valor médio da área abaixo da curva glicémica (AUC) dos participantes após a PTOG do grupo controlo com o valor médio da AUC após a PTOG seguida da ingestão de uma dose de chá de branco, verde ou preto (com 1 g de *C. sinensis* /300 mL);
- 2.3 Comparar o valor médio máximo da glicémia pós prandial capilar ( $C_{\max}$ ) e da variação média máxima ( $\Delta C_{\max}$ ) dos participantes após a PTOG do grupo

controle com o valor médio máximo da glicemia pós prandial capilar ( $C_{\max}$ ) e da variação média máxima ( $\Delta C_{\max}$ ) após a PTOG seguida da ingestão de uma dose de chá branco, verde, ou preto (com 1 g de *C. sinensis* /300 mL);

**2.4** Quantificar o teor de polifenóis e flavonóis totais bem como de proantocianidinas do chá branco, verde e preto (1 g de *C. sinensis* /300 mL);

**2.5** Determinar a capacidade antioxidante do chá branco, verde, e preto (1 g de *C. sinensis* /300 mL).



## **MATERIAIS E MÉTODOS**

O presente estudo foi realizado em 2 momentos distintos: **A) Análise Química**, que compreendeu a caracterização de cada um dos chás em estudo relativamente quantidade de fenóis e flavonóis totais, proantocianidinas e poder antioxidante, e **B) Ensaio Clínico**, caracterizado por uma intervenção de 120 minutos de duração, onde após uma PTOG os participantes ingeriram 300 mL de água contendo 1 g de chá branco, verde, preto ou apenas 300 mL de água (grupo controle) e tiveram a sua glicemia medida durante 120 minutos,

O estudo foi autorizado pela Comissão Científica do Mestrado em Nutrição Clínica e pela Comissão de Ética do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz (ISCSEM) em 02 de Novembro de 2013 (Anexo 1), tendo a recolha de dados início no dia 09 de Agosto de 2014.

### **A. Análise Química**

#### **1. Reagentes e Soluções**

Os reagentes Cloreto de Ferro (III) hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), reagente de folin-ciocalteu (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácidosulfónico), *Trolox* (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico), TPTZ 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina, etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ), metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), o 1-butanol ( $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ ) foram adquiridos à *Sigma-Aldrich*, o ácido gálico-1-hidratato ( $\text{C}_6\text{H}_2(\text{OH})_3\text{COOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), o cloreto de alumínio (CIAI 10%) foram adquiridos à *Acros Organics*, o carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) e o ácido acético glacial foram adquiridos à *ICS Science group*. Os reagentes dinucleótido reduzido de nicotinamida adenina (NADH), nitroblue tetrazolium (NBT) 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol (Tris) e Phenazine metosulfato (PMS), Phosphate buffered saline (PBS) e diidro quercitina foram adquiridos na *Sigma-Aldrich*. Foram efectuadas as soluções de ácido clorídrico 40 mM ( $\text{HCl}$  37% adquirido à *Sigma-Aldrich*), e de

tampão acetato 300mM pH=3,6 (NaCH<sub>3</sub>COO.3H<sub>2</sub>O e CH<sub>3</sub>COOH adquiridos à *AnalaR Normapur*).

## 2. Preparação da amostra para análise

Para a obtenção da infusão de chá branco, verde e preto, foram utilizados 1000 mL de água e 3 g de cada um dos respectivos chás. Esta infusão foi ajustada para representar a quantidade dada a cada participante.

Cada um dos chás foi pesado numa balança analítica *Sartorius* ( $\pm 0,0001$ g) sendo posteriormente colocados numa placa de Petri e deixados cobertos por papel de alumínio até serem necessários. Em 3 Erlenmeyers de 1000 mL foram colocados 1000 mL de água, e procedeu-se ao aquecimento da água até esta atingir a temperatura de ebulição ( $T_c = 100$ ). Acrescentou-se à água fervida 3 g de chá branco, verde e preto a cada um dos Erlenmeyers, taparam-se os topos com filtro, e deixou-se em repouso por 5 minutos para que se procede-se à infusão. Após este tempo os chás foram coados e transferidos para balões volumétricos de 1000 mL, que foram rotulados, rolhados e deixados em repouso até atingirem a temperatura ambiente.

## 3. Quantificação dos fenóis e flavonóis totais e das proantocianidinas do chá branco, chá verde e chá preto

A quantificação dos fenóis e flavonóis totais e das proantocianidinas dos chás em estudo, foi realizada em amostras de cada um dos respectivos chás antes de ser iniciado o protocolo experimental.

### 3.1 Quantificação dos fenóis totais no chá branco, chá verde e chá preto

O conteúdo em fenóis totais foi determinado por adaptação do método de Prabha e Vasantha (Prabha & Vasantha, 2011). As amostras foram analisadas em triplicado. Pipetaram-se, para tubos rolhados, 500  $\mu$ L de amostra em metanol: água 50:50 (v/v) ao qual se adicionou 5mL solução reagente de *Folin-Ciocalteu* (1:10 diluído com água) e 4 mL solução aquosa Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M. Realizou-se um branco em duplicado onde se substituiu a amostra por uma solução em metanol:

água (50:50 (v/v)). Agitaram-se os tubos e aguardaram-se 15 minutos, após os quais se leu a absorvância a 765 nm.

Com o mesmo procedimento foi realizada uma curva padrão usando o ácido gálico com concentrações conhecidas.

### **3.2 Quantificação de flavonóis totais no chá branco, chá verde e chá preto**

O conteúdo em flavonóis totais dos diferentes chás foi determinado por adaptação do método de Praba e Vasantha (Prabha & Vasantha, 2011). O método baseia-se na formação de complexos ácidos estáveis entre o grupo cetona do C-4 com o grupo hidroxilo do C-3 ou C-5 dos flavonóis e ainda complexo lábeis com os grupos ortodihidroxilo do anel A- ou B- dos flavonóides como descrito por Chang e col., (Chang, Yang, Wen, & Chern, 2002). As amostras foram analisadas em triplicado. Pipetaram-se para tubos rolhados 0,5 mL de amostra, 1,5 mL de metanol, 0,1 mL de CIAI 10%, 0,1 mL de acetato de potássio 1M e 2,8 mL de água destilada, homogeneizando-se de seguida todos os tubos. Os tubos foram deixados em incubação à temperatura ambiente por um período de 30 minutos, após os quais foi lida a absorvância das amostras a 415 nm. Foram preparados brancos usando água destilada em vez de amostra e brancos especiais onde não foi adicionado CIAI. Utilizando o mesmo protocolo realizou-se uma curva padrão usando a quercitina com concentrações conhecidas.

### **3.3 Quantificação de Proantocianidinas no chá branco, chá verde e chá preto**

O conteúdo em proantocianidinas foi determinado por adaptação do método de Gu e col., (Gu et al., 2002). O método utilizado baseia-se na hidrólise ácida de polímeros de proantocianidinas produzindo-se pigmentos avermelhados como a cianidina e a definidina, em solução a quente. Assim, quanto maior a absorvância maior será o teor da amostra em proantocianidinas. As amostras foram analisadas em duplicado. Pipetaram-se para tubos rolhados, 400 µl de amostra em metanol:água (50:50) à qual se adicionaram 2850 µl da solução de HCl/1-butanol (10% v/v). Realizou-se um branco onde se substitui a amostra por 150 µl de metanol. As amostras foram agitadas e deixadas em incubação por 50 minutos em banho-maria a 100 °C, lendo-se posteriormente a absorvância a 550

nm. Utilizando o mesmo protocolo realizou-se uma curva padrão usando proantocianidina A<sub>2</sub> com concentrações conhecidas

#### **4. Determinação da capacidade antioxidante do chá branco, chá verde e chá preto**

##### **4.1 Quantificação da capacidade antioxidante do chá branco, chá verde e chá preto por método FRAP**

Este método foi adaptado de Thaipong e col., (Thaipong, Cisneros-Zevallos, Boonprakob, Crosby, & Byrne, 2006) e baseia-se na capacidade das moléculas antioxidantes reduzirem em meio ácido o Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup> na presença de (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) formando um intenso complexo azul Fe<sup>2+</sup>-(TPTZ).

Foi previamente preparada uma solução para o este método adicionando 25mL de tampão acetato 300 mM pH=3,6 a 2,5 mL de TPTZ 10 mM em HCL 40 mM e a 2,5 mL de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O 20 mM. Esta solução foi aquecida a 37 °C antes de ser usada.

As amostras foram analisadas em triplicado. Pipetaram-se para tubos rolhados 150µl da amostra aos quais se adicionaram 2850µl da solução FRAP. Os tubos foram mantidos no escuro, durante 30 minutos para que a reacção ocorresse. Realizou-se um branco onde se substituiu a amostra por 150 µl de água (nas mesmas condições). Leu-se a absorvância a 593 nm.

Para a determinação da curva padrão foi utilizado o *Trolox* (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico) com concentrações conhecidas.

##### **4.2 Quantificação da inibição do anião O<sub>2</sub><sup>-</sup> do chá branco, chá verde e chá preto**

O anião O<sub>2</sub><sup>-</sup> é gerado pela reacção da fenazina metassulfato (PMS) com o dinucleótido de nicotinamida e adenina hidreto (NADH) e oxigénio provocando este a redução do NBT a Formazan. O método aplicado baseou-se no método de Yu e col., citado por Moraes e col., (Calejo, Moraes, & Fernandes, 2009). As amostras foram analisadas em triplicado. Pipetaram-se para tubos rolhados 0,5 mL de amostra e 2 mL de uma solução constituída por NADH (189 µM) e

NBT(120 µM) em Tris-HCl (40 mM; pH=8). A reacção de neutralização iniciou-se após a adição de 0,5 mL de PMS (60 µM). Realizou-se um branco em triplicado onde a amostra foi substituída por 0,5 mL de água. As amostras foram deixadas em repouso por 5 minutos à temperatura ambiente, após os quais foi lida a absorvância das amostras a 560 nm.

A percentagem de inibição do anião  $O_2^-$  foi calculada através da fórmula:

$$\% I = \frac{A \text{ controlo} - A \text{ amostra corrigida}}{A \text{ controlo}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

#### **4.3 Quantificação da inibição do radical $NO^\cdot$ do chá branco, chá verde e chá preto**

O radical  $NO^\cdot$  é gerado pela reacção do nitroprussiato de sódio em solução aquosa e em pH fisiológico com o oxigénio, produzindo-se iões nitrito que podem ser estimados pelo reagente de Griess por formarem um cromóforo rosa intenso. O método para a aplicação deste teste baseou-se no método de Nikkhah e col., (Nikkhah, Khayami, & Heidari, 2008). As amostras foram analisadas em triplicado. Pipetaram-se para tubos rolhados 2 mL de nitroprussiato de sódio (10 mM), 0,5 mL de PBS e 0,5 mL de amostra. Depois de homogeneizados os tubos foram incubados a 25 °C por um período de 150 minutos. Após o período de incubação foram retirados dos tubos 0,5 mL de amostra aos quais se adicionaram 1 mL de ácido sulfanílico (0,33% em ácido acético glacial 20%) e deixaram-se repousar os tubos por 5 minutos à temperatura ambiente, após os quaise se adicionou 1 mL de N-(1-naftil) etilenodiamina dicloridrato (NED 0,1% m/v), e após homogeneização os novos tubos foram colocados em incubação a uma temperatura de 25 °C por um período de 30 minutos. Findo o período de incubação foi lida a absorvância das amostra a 533 nm. Foram realizados brancos, onde a amostra foi substituída por 0,5 mL de água e brancos especiais onde foi utilizada a amostra em estudo mas não foi adicionado NED.

A percentagem de inibição do radical  $NO^\cdot$  foi calculada através da fórmula apresentada no ponto 2.2.2..

## **B. Ensaio Clínico**

### **1. Questões éticas**

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz (Anexo 1) tendo todos os participantes assinado o consentimento informado (Anexo 2) previamente à realização do estudo, tendo o propósito do estudo e os seus possíveis riscos ficado claro para todos os participantes, de acordo com a Declaração de Helsínquia (World Medical Association, 2001). Foi garantido a todos os participantes a confidencialidade e anonimato dos dados recolhidos sendo-lhes atribuído um código único, tendo apenas a investigadora Sandra Lopes e sua orientadora na pessoa da Professora Doutora Maria Fernanda Mesquita acesso aos mesmos.

### **2. População de estudo, distribuição dos grupos experimentais, variáveis de estudo**

No âmbito do estudo foram recrutados 40 voluntários adultos e saudáveis provenientes das cidades da Amadora, Lisboa e Almada. 30 voluntários foram colocados aleatoriamente nos grupos experimentais (10 voluntários em 3 grupos distintos), tendo os restantes 10 integrado o grupo controlo. A amostra incluiu participantes de ambos os sexos (homens e mulheres) de várias faixas etárias. Este estudo tem como variável independente o chá branco, chá verde e chá preto, e assume como variável dependente o valor de glicémia capilar obtido nos vários momentos de estudo.

### **3. Critérios de Inclusão**

Foram considerados elegíveis para o presente estudo todos os indivíduos que cumprissem os critérios abaixo mencionados,

- Homens e mulheres com idade superior a 18 anos;
- Glicémia capilar de jejum inferior ou igual a 110 mg/dl;

#### **4. Critérios de Exclusão**

Foram considerados ilegíveis para o presente estudo todos os indivíduos que cumprissem 1 ou mais dos critérios abaixo mencionados,

- Glicémia capilar de jejum superior a 110 mg/dl;
- IMC inferior a 18,5 e superior a 30 kg/m<sup>2</sup>;
- Intolerância ou alergia ao chá ou a algum dos seus constituintes,
- Consumo de bebidas cafeïnadas ou chocolate nas 8 horas anteriores à realização do estudo;
- História de anemia,
- História patologia cardíaca,
- Síndrome de má-absorção ou outra patologia que afecte a normal absorção dos nutrientes ao nível intestinal;
- Medicação ou suplementos alimentares que afectem o bom e normal funcionamento intestinal.

#### **5. Instrumentos de recolha de informação**

##### **5.1 Inquérito Geral**

Cada um dos participantes respondeu a um inquérito geral (Anexo 3) onde foram recolhidos dados antropométricos (idade, altura, peso, percentagem de massa gorda, IMC), e ainda a uma Anamnese onde constam dados sobre a sua glicémia em jejum, o seu historial clínico no que a patologias condicionantes ao estudo diz respeito, e ainda sobre eventual medicação ou suplementação que pudesse estar a fazer no momento de realização do estudo e que o pudesse condicionar.

##### **5.2 Análise do consumo alimentar**

Cada um dos participantes respondeu a um diário alimentar (Anexo 4) referente às 24 horas anteriores à realização do estudo por forma a assegurar que as indicações

dadas em relação à não ingestão de alimentos ou bebidas cafeinadas tinham sido cumpridas. Os resultados obtidos não foram considerados relevantes para a caracterização da amostra.

### 5.3 Dados antropométricos

Todos os participantes foram pesados em jejum, descalços e sem roupa considerada excessiva (casacos, cachecóis, acessórios). O peso foi registado numa balança de bioimpedância Tanita® UM-076 em quilogramas (Kg), de onde foi ainda extraído a percentagem de massa gorda (%MG) de cada participante.

Para a determinação do IMC de cada um dos participantes foi utilizada a fórmula:

$$\frac{\text{Peso (Kg)}}{\text{Altura}^2 \text{ (m)}} \quad \text{Equação 1}$$

Os valores obtidos para o IMC foram classificados de acordo com os critérios fornecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (World Health Organization, 2000) em que:

$$18,5 \leq \text{IMC} \leq 24,9, \text{ Normoponderal}$$

$$25,0 \leq \text{IMC} \leq 29,9, \text{ Excesso de peso}$$

As demais classes de IMC não foram consideradas por não se encontrarem abrangidas pelos critérios do presente estudo.

### 5.4 Medição da glicémia pós prandial

A glicémia pós prandial dos participantes foi medida através da recolha de uma gota de sangue obtida por punção com lancetas esterilizadas nos dedos de cada participante, em intervalos de tempo regulares ( $T_{\text{jej}}$ ,  $T_{30}$ ,  $T_{60}$ ,  $T_{90}$ ,  $T_{120}$ ), obtendo-se um total de 6 picadas. Cada gota de sangue foi recolhida com uma tira de teste FreeStyle *Precision* (Abbott®) e colocada no glicosímetro FreeStyle *Precision* (Abbott®) para que pudesse ser quantificada a glucose presente na amostra recolhida. Cada gota continha 0,6  $\mu\text{L}$  de sangue (mínimo de detecção para

quantificação da glucose), estando a detecção do resultado situada entre 20 a 500 mg/dL (Abbott Diabetes Care, 2010). O resultado do teste foi obtido em 5 segundos. Todos os resultados obtidos foram colocados numa grelha presente na folha de registo que acompanhou o estudo (Anexo 5)

## **6. Preparação da prova de tolerância oral à glucose (PTOG)**

Antes da chegada dos participantes para a intervenção, foi realizada uma pesagem em balança adequadamente calibrada, de 50 g de glucose (sacarose) para serem de seguida dissolvidos em 300 mL de água à temperatura ambiente ( $T_c = 18 \pm 2$ ). Após completa dissolução, a solução foi deixada em repouso até à chegada do participante em jejum, que após a realização de uma punção capilar a ingeriu na sua totalidade. Esta preparação foi adaptada e preparada através da norma da Direção Geral de Saúde (DGS) número 033/2011, de 30/09/2011 atualizada dia 06/02/2012 (George, 2012). Antes da realização do protocolo com os participantes, os procedimentos para a realização da PTOG e do chá verde, branco e preto, foram testados e padronizados procedendo-se a partir daí, sempre de igual maneira.

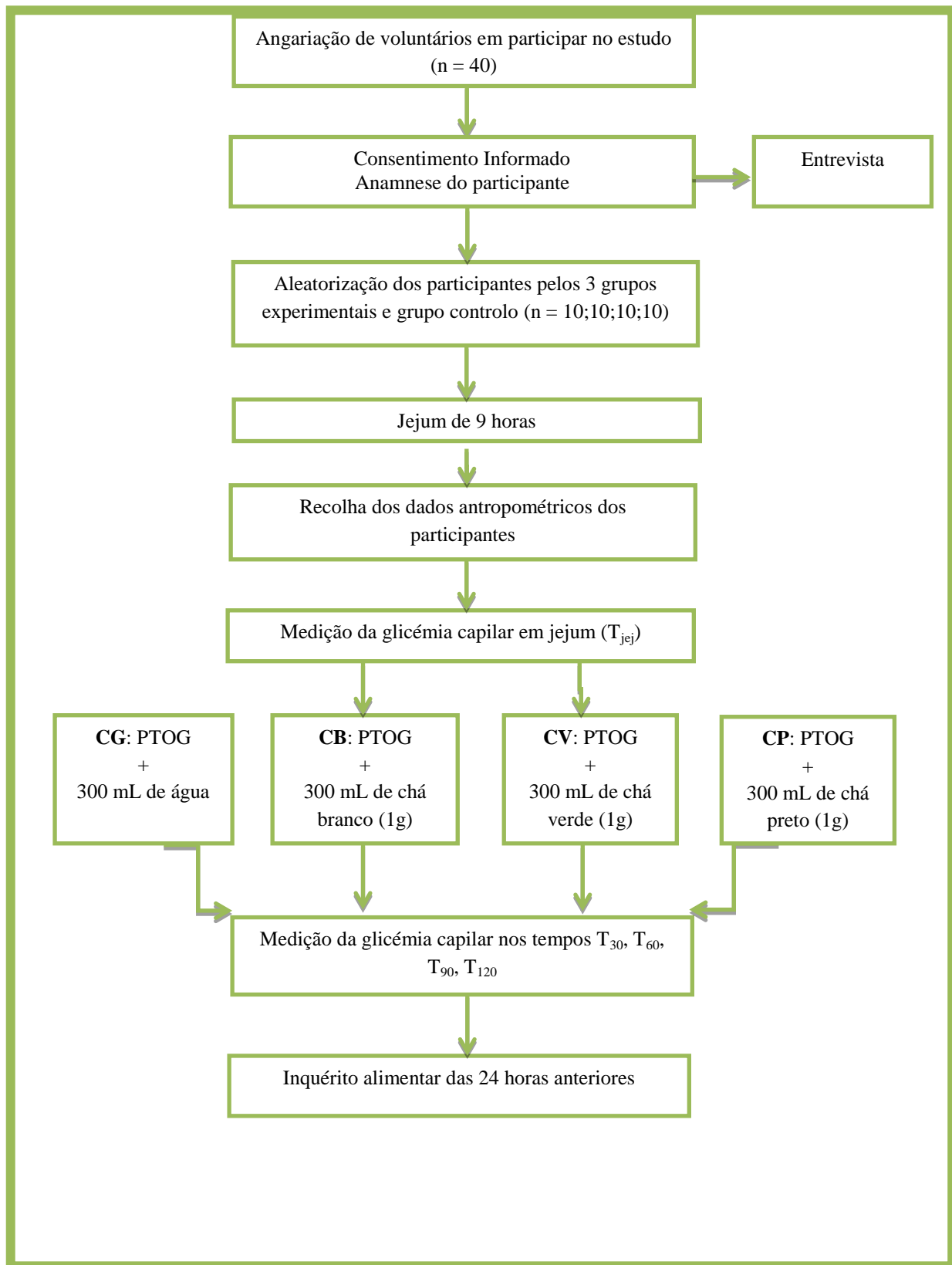
## **7. Preparação do chá verde, chá branco, chá preto (*C. sinensis*)**

As amostras de chá verde, chá branco (Pai Mu Tan), e chá preto (Oolong) utilizadas pertencem todas à empresa Sonnentor®, tendo sido utilizado apenas um lote de cada uma das amostras durante todo o protocolo. Foi pesado, em balança devidamente calibrada, 1 g de cada um dos chás e colocado dentro de uma pinça própria para infusão. A pinça contendo o chá foi colocada num copo de vidro de 500 mL e foram adicionados 300 ml de água fervida ( $T_c = 100 \pm 2$ ). A infusão foi deixada em repouso por 5 minutos, sendo a pinça retirada do copo findo esse tempo, e sido dada a ingerir a bebida a cada um dos participantes de acordo com o seu grupo. A quantidade de cada chá a ser ingerida pelos participantes foi adaptada do protocolo de Bryans (2007), em que 1 g de chá era imerso em 250 a 300 ml de água fervida ( $T_c = 100$ ), sem haver contudo adição de água fria e sem que existissem efeitos secundários que inviabilizassem o estudo.

## **8. Desenho de estudo**

O estudo foi conduzido como um ensaio clínico randomizado controlado cego e a sua intervenção teve uma duração de 2 horas.

Antes da chegada dos participantes estes foram distribuídos aleatoriamente pelos 3 grupos de estudo (Grupo experimental CV, CB e CP) e grupo controlo (CG). Todos os participantes deste estudo foram informados que não deveriam consumir bebidas cafeïnadas nem chocolate a partir das 24 horas (meia noite) do dia anterior à realização do estudo e que deveriam permanecer em jejum até à hora de início do estudo, obtendo-se assim um jejum de 9 horas. No dia da realização do protocolo experimental todos os participantes responderam a um inquérito geral como descrito no ponto 4.1 e a um inquérito de consumo das 24 horas anteriores ao estudo como descrito no ponto 4.2. Todos os participantes foram pesados numa balança de bioimpedância Tanita® UM-076 como descrito no ponto 4.3, e foi realizada uma primeira punção para determinação da glicémia em jejum usando um glicosímetro FreeStyle Precision (Abbott®) com tiras próprias para o efeito também FreeStyle Precision (Abbott®). Após todas as condições estarem reunidas, foi dado início ao estudo com a ingestão de 300 ml de água açucarada como descrita no ponto 5, sendo seguidamente dado a cada participante de cada grupo experimental a segunda bebida descrita no ponto 6, enquanto os participantes do grupo controlo ingeriram 300 ml de água, sendo que todos dispuseram de 15 minutos para ingerir as respectivas bebidas. Os participantes tiveram a sua glicémia medida em intervalos de 30 minutos após a ingestão da bebida em teste até ao tempo máximo de 120 minutos ( $T_{30}$ ,  $T_{60}$ ,  $T_{90}$ ,  $T_{120}$ ) conforme a metodologia utilizada por Bryans (2007). Aos participantes não foi permitida a ingestão de qualquer outra bebida durante o tempo de espera entre medidas, que não as bebidas em estudo nos tempos já referidos. Após a última punção, aos 120 minutos o protocolo foi dado como concluído e os participantes foram dispensados. Na Figura 1, abaixo apresentada encontra-se o organograma correspondente a este estudo.



**Figura 1.** Organograma do ensaio clínico

## 9. Análise dos resultados

Todos os resultados experimentais (código do participante, sexo, idade, altura, peso, IMC, %MG, medições da glicémia nos vários tempos de estudo) foram inseridos e organizados numa base de dados utilizando o Microsoft Excel 2010™. Foram contruídos histogramas e gráficos circulares para caracterização da amostra no que à sua distribuição diz respeito.

Para o tratamento estatístico dos dados experimentais (medições da glicémia nos diferentes tempos de estudo) foi utilizado o software *IBM SPSS™* versão 20.0.

Os dados foram sujeitos a diversos testes de modo a verificar: i) se estes tinham uma distribuição normal, foi utilizado o teste de *Shapiro-Wilk* para amostras pequenas com  $p \leq 0,05$  considerando-se as seguintes hipóteses:

$H_0$ : Existe normalidade dos dados

$H_1$ : Não existe normalidade dos dados

ii) se existia homogeneidade das variâncias, foi utilizado o teste de *Levene* com  $p \leq 0,05$ , considerando-se as seguintes hipóteses:

$H_0$ : Existe homogeneidade de variâncias

$H_1$ : Existem diferenças entre pelo menos duas variâncias

iii) a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os valores médios da glicémia capilar nos diversos momentos de estudo ( $T_{jej}$ ,  $T_{30}$ ,  $T_{60}$ ,  $T_{90}$ ,  $T_{120}$ ) entre o grupo controlo e os grupos experimentais (CB, CV, CP), utilizou-se o teste ANOVA de medições repetidas do tipo misto com correcção de Bonferroni para múltiplas comparações.

Para verificar o efeito dos diferentes chás na glicémia, determinou-se o valor abaixo da curva (AUC), referente à média da glicémia ao longo dos 120 minutos para cada grupo teste com o software *GraphPad Prism* versão 6.0. A AUC é calculada geometricamente e reflecte o aumento da área sob a curva da glicémia ao longo do tempo, sendo considerada a área acima do valor basal. O pico de glicémia observado foi denominado de  $C_{max}$  e a variação máxima entre o valor da glicémia basal e o máximo observado foi denominada de  $\Delta C_{max}$ .

*Efeito da ingestão de 1g de chá branco, chá verde e chá preto na glicemia pós prandial de indivíduos saudáveis após uma prova de tolerância oral à glucose*

## RESULTADOS

### A. Estudo da composição química do chá branco, chá verde e chá preto

#### 1. Análise Química

##### 1.1 Teor em fenóis e flavonóis totais e proantocianidinas

Para a determinação do teor de fenóis e flavonóis totais e proantocianidinas dos 3 chás em estudo, foram elaboradas curvas padrão com respectivas rectas de calibração tendo como padrões o ácido gálico, quercitina e proantocianidina A<sub>2</sub> respectivamente, estando os resultados discriminados na Tabela 12.

**Tabela 12.** Quantificação do teor de fenóis e flavonóis totais e proantocianidinas no chá branco, verde e preto. Resultados apresentados em média e erro padrão da média ( $\pm SEM$ ) n =3.

	Chá		
	Branco	Verde	Preto
Fenóis totais (mg/L ácido gálico <sup>1</sup> )	384,36 ( $\pm 0,02$ )	534,24 ( $\pm 0,02$ )	506,80 ( $\pm 0,01$ )
Flavonóis totais (mg/L quercitina <sup>2</sup> )	8,32 ( $\pm 0,00$ )	6,73 ( $\pm 0,00$ )	8,29 ( $\pm 0,00$ )
Proantocianidinas (mg/L proantocianidina A <sub>2</sub> <sup>3</sup> )	38,50 ( $\pm 0,02$ )	23,25 ( $\pm 0,01$ )	41,11 ( $\pm 0,02$ )

<sup>1</sup> Equação da recta:  $y = 5,193x10^{-3}x + 2,533x10^{-3}$  ( $r^2 = 0,9991$ )

<sup>2</sup> Equação da recta:  $y = 6,444x10^{-3}x + 1,050x10^{-5}$  ( $r^2 = 0,9974$ )

<sup>3</sup> Equação da recta:  $y = 6,4938x10^{-3}x + 8,0321x10^{-7}$  ( $r^2 = 0,9960$ )

##### 1.2 Capacidade antioxidante

###### 1.2.1 Método FRAP

A quantificação da capacidade antioxidante do chá neste método utilizou uma curva padrão de Trolox com respectiva recta de calibração e demonstrou que 1g de chá branco, verde e preto possui uma elevada capacidade antioxidante, como é possível verificar na Tabela 13 abaixo apresentada.

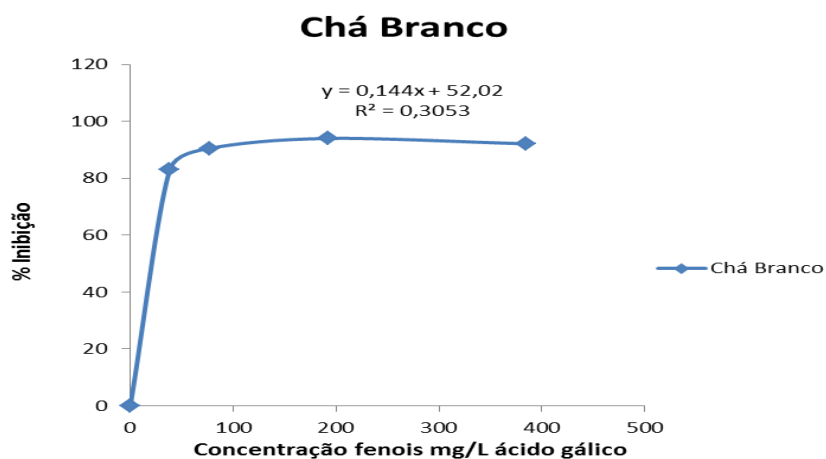
**Tabela 13.** Capacidade antioxidante do chá branco, verde e preto. Resultados apresentados sob a forma de média e erro padrão da média ( $\pm SEM$ ). n = 2

	Chá Branco	Chá Verde	Chá Preto
Capacidade antioxidante Frap ( $\mu\text{mol Trolox/L}^{-1}$ )	943,58 ( $\pm 0,01$ )	916,05 ( $\pm 0,05$ )	933,94 ( $\pm 0,01$ )

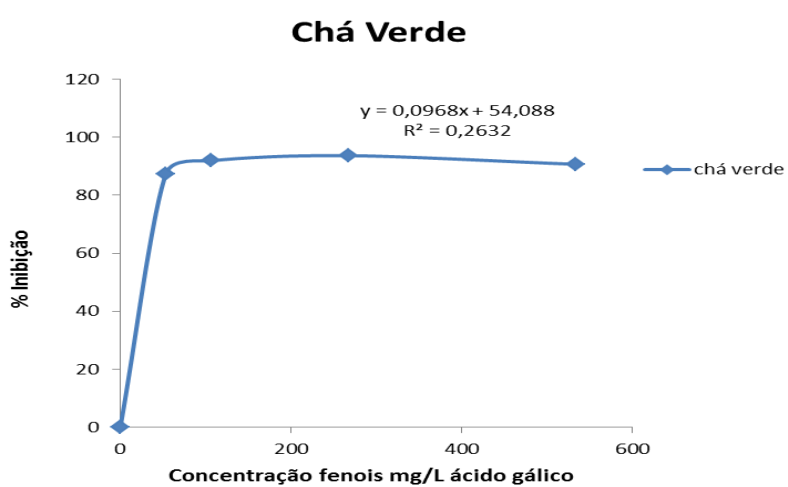
1 Equação da recta:  $y = 2,189 \times 10^{-3}x + 2,203 \times 10^2$  ( $r^2 = 0,9983$ )

### 1.2.2 Inibição do anião $\text{O}_2^-$

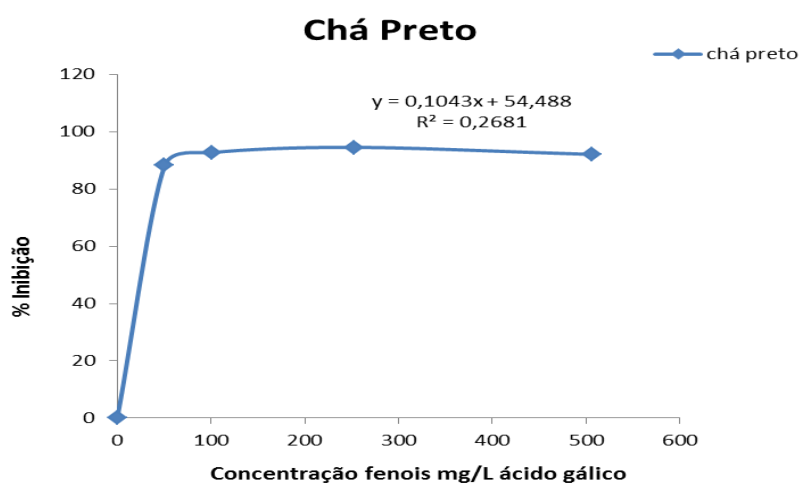
A quantificação da taxa de inibição deste anião para cada um dos chás usou o ácido gálico como curva padrão e a realização deste procedimento permitiu determinar uma percentagem de inibição de anião  $\text{O}_2^-$  de aproximadamente 92% com uma quantidade equivalente de 384 mg/L de fenóis totais para o chá branco, 90% com uma quantidade equivalente de 534 mg/L de fenóis totais para o chá verde, e de 92% com uma quantidade equivalente de 506 mg/L de fenóis totais para o chá preto, como é possível verificar na Figura 8.



a)



b)

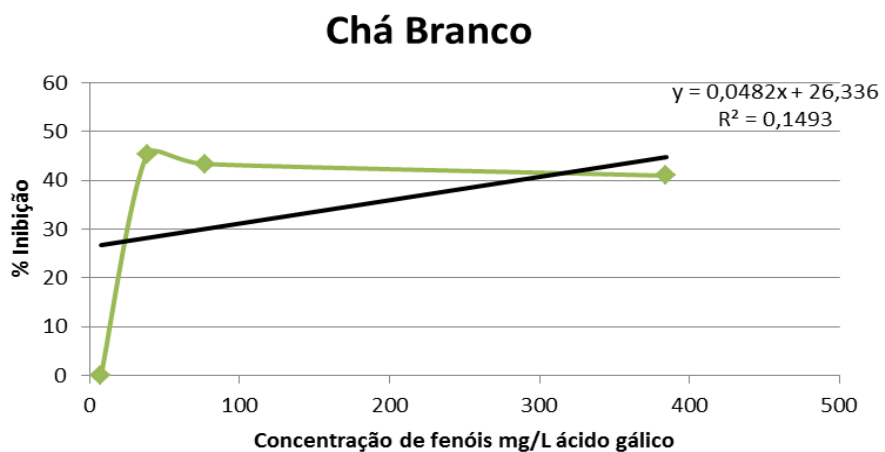


c)

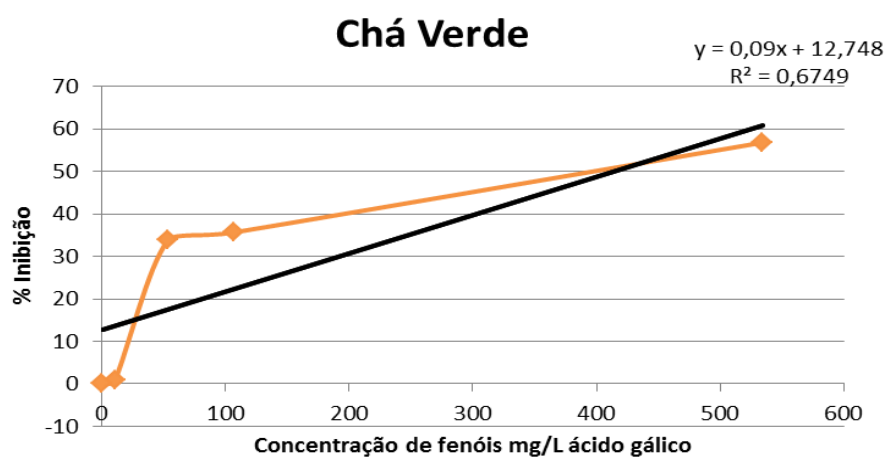
**Figura 8.** Representação gráfica da percentagem de inibição do anião  $O_2^-$  para o a) chá branco, b) chá verde, c) chá preto

### **1.2.3 Inibição do radical NO<sup>•</sup>**

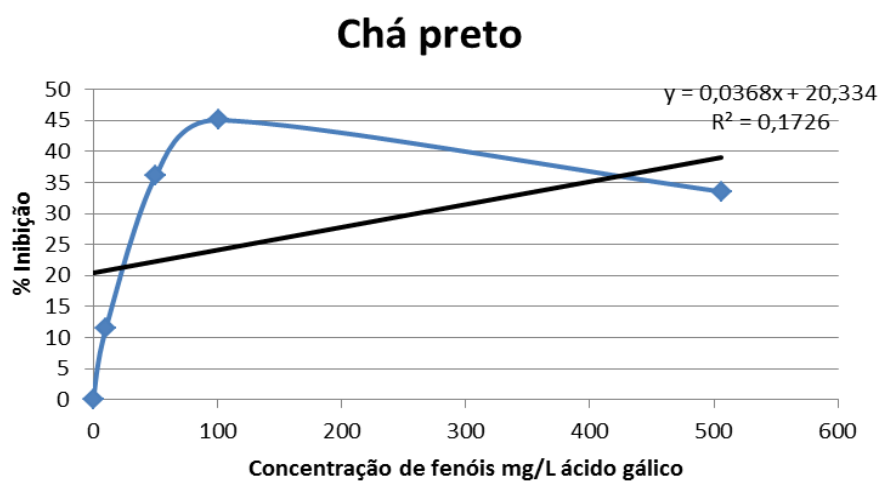
A quantificação da inibição deste radical pelo chá utilizou o ácido gálico como curva padrão e a realização deste protocolo permitiu verificar uma elevada percentagem de inibição do radical NO<sup>•</sup> de aproximadamente 45% com uma quantidade equivalente de 384 mg/L de fenóis totais para o chá branco, 56% com uma quantidade equivalente de 534 mg/L de fenóis totais para o chá verde, e de 45% com uma quantidade equivalente de 506 mg/L de fenóis totais para o chá preto, como é possível verificar na Figura 9.



a)



b)



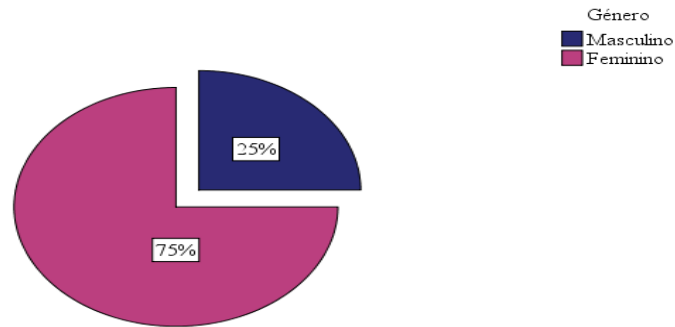
c)

**Figura 9.** Representação gráfica da percentagem de inibição do radical  $\text{NO}^\cdot$  para o a) chá branco, b) chá verde, c) chá preto

## B. Ensaio Clínico

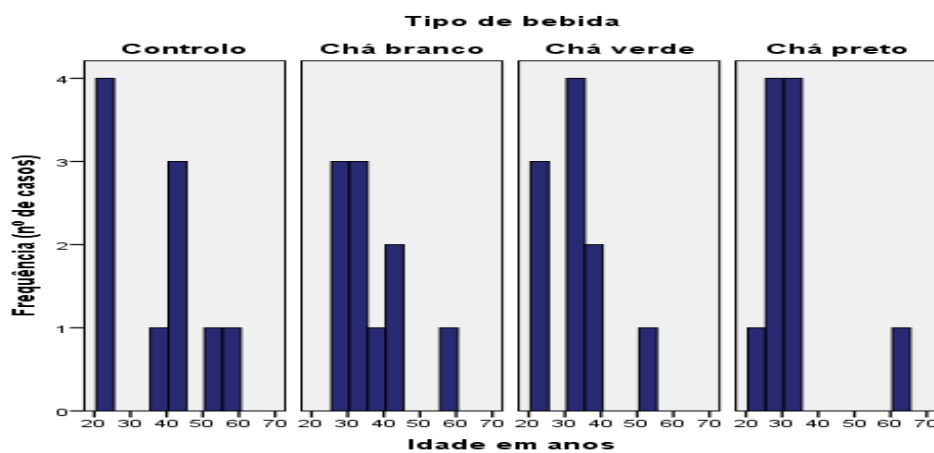
### 1. Caracterização da amostra

A amostra foi constituída por 40 adultos ( $n = 40$ ) saudáveis, sendo na sua maioria mulheres ( $n = 30$ , 75%), como abaixo descrito na Figura 2.



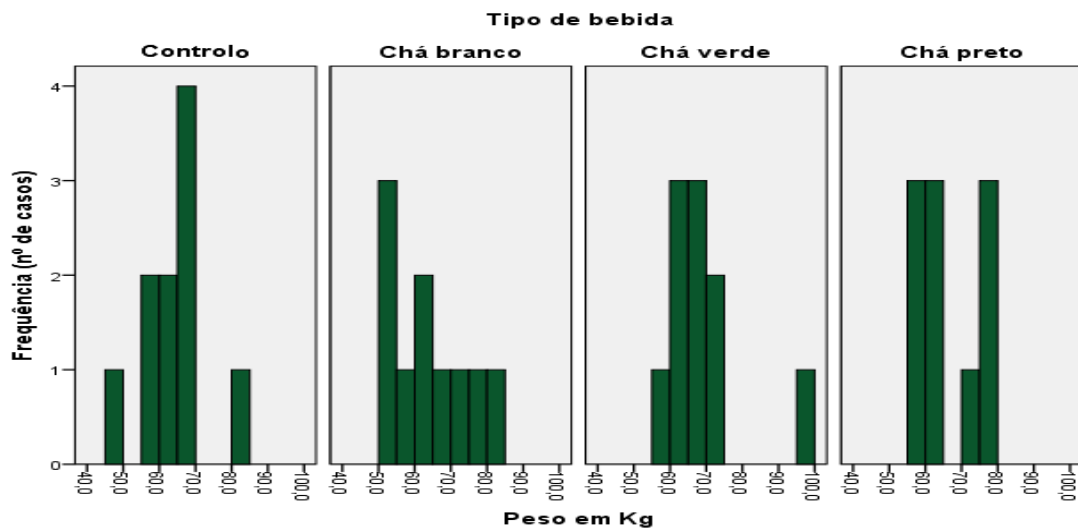
**Figura 2.** Gráfico da distribuição da amostra em percentagem segundo o seu género

A média de idades geral dos participantes foi de  $34,93 \pm 1,62$  anos, estando a idade dos participantes distribuída entre os 23 e os 64 anos, sendo que a maioria dos participantes ( $n = 35$ , 87,5%) apresentava uma idade entre 23 e 45 anos como é possível verificar na Figura 3.



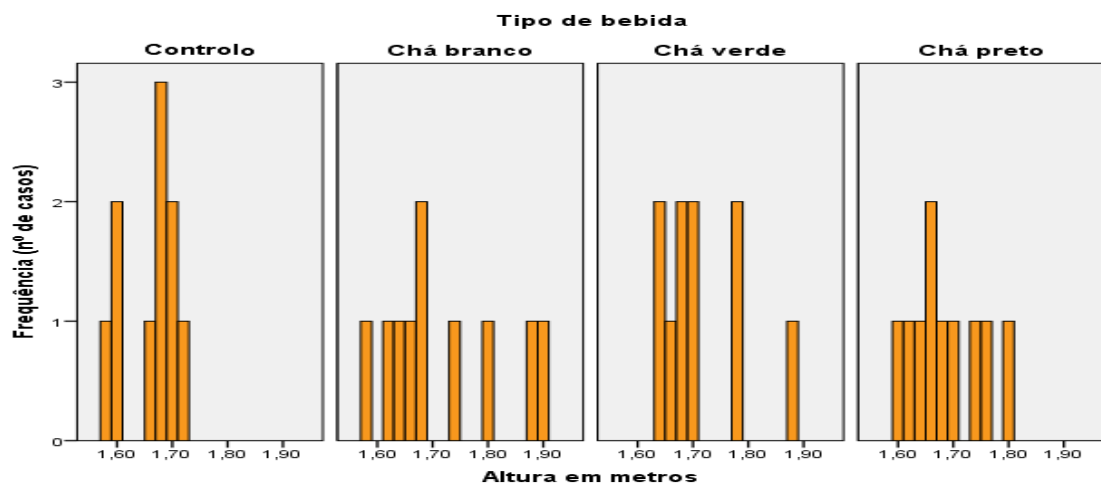
**Figura 3.** Histograma representativo da distribuição da idade em anos dos participantes por bebida

O peso médio geral dos participantes foi de  $65,89 \pm 1,53$  Kg, estando o peso dos participantes distribuído entre os 49,1 e os 95,9 kg, como é possível observar na Figura 4.



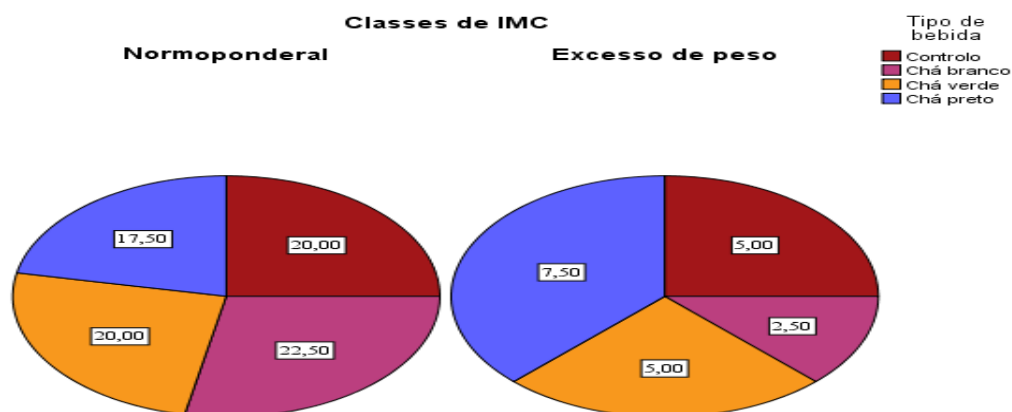
**Figura 4.** Histograma representativo da distribuição do peso em Kg dos participantes por tipo de bebida

A altura média geral dos participantes foi de  $1,69 \pm 0,12$  m, estando a altura dos participantes distribuída entre os 1,58 e 1,89 m, como é possível verificar na Figura 5.



**Figura 5.** Histograma representativo da distribuição da altura em metros dos participantes por bebida

O IMC médio geral dos participantes foi de  $23,0 \pm 2,67 \text{ kg/m}^2$ , tendo o IMC dos participantes oscilado entre 18,7 e  $28,6 \text{ kg/m}^2$ , sendo na maioria normoponderais como é possível verificar na Figura 6.



**Fig**  
classe de IMC

Na Tabela 6 encontram-se resumidos todos os atributos anteriormente mencionados que caracterizam na sua generalidade a amostra deste estudo

**Tabela 6.** Caracterização da amostra (n= 40). Resultados apresentados em Mínimo (Min), Máximo (Max), média (Med) e erro padrão da média ( $\pm SEM$ )

	n	Min	Max	Med( $\pm SEM$ )
<b>Idade (anos)</b>	40	23	64	$34,93 \pm 1,62$
<b>Peso (kg)</b>	40	49,1	95,9	$65,89 \pm 1,53$
<b>Altura (m)</b>	40	1,58	1,89	$1,69 \pm 0,12$
<b>IMC (<math>\text{kg/m}^2</math>)</b>	40	18,7	28,6	$23,0 \pm 2,6$

## 2. Glicémia capilar

O principal objectivo do presente estudo foi a análise da variação dos valores da glicémia de cada participante, durante os 120 minutos, após a realização de uma PTOG e ingestão de 300 mL de água (grupo controlo) e de uma PTOG seguida da ingestão de 300 mL de chá (1 g de chá branco, chá verde e chá preto consoante o grupo experimental).

Os resultados das medições da glicémia capilar de todos os participantes encontram-se no Anexo 5.

Numa primeira análise utilizaram-se medidas de dispersão como os valores de mínimo, máximo e de tendência central como a média dos valores de glicémia capilar para cada um dos tempos de estudo das diferentes bebidas por forma a verificar se existiam diferenças entre si.

Atendendo ao valor mínimo e máximo da glicémia capilar medida em cada um dos participantes nos vários momentos de estudo presentes na Tabela 7, é possível observar que os valores obtidos para a glicémia em jejum se encontram dentro do limite estabelecido para este estudo ( $\leq 110$  mg/dL).

**Tabela 7.** Resultados da glicémia capilar medidos nos 5 momentos de estudo ( $T_{\text{jej}}$ ,  $T_{30}$ ,  $T_{60}$ ,  $T_{90}$ ,  $T_{120}$ ) após uma PTOG e ingestão de 300 mL de água (grupo controlo) e após uma PTOG seguida da ingestão de 300 mL de chá (branco, verde, preto). Valores apresentados em mínimo e máximo (n = 10 em cada grupo).

T	PTOG (grupo controlo)	PTOG + chá branco	PTOG + chá verde	PTOG + chá preto
(min)	Min – Max (mg/dL)	Mín – Max (mg/dL)	Min – Max (mg/dL)	Min – Max (mg/dL)
$T_{\text{jej}}$	82 – 110	74* – 100*	76 – 110*	72* – 109*
$T_{30}$	116 – 200	114* – 167*	120 – 230	132 – 188*
$T_{60}$	91 – 152	84* – 152*	89* – 191	108 – 150*
$T_{90}$	85 – 140	59* – 138*	64* – 146	77* – 132*
$T_{120}$	72 – 114	76 – 120	80 – 120	84 – 114

\*Valores de glicémia capilar que diferem dos valores obtidos para o grupo controlo

Considerando cada um dos grupos experimentais e comparando os seus resultados com o do grupo controlo é possível observar que os participantes que ingeriram chá branco apresentam valores máximos da glicémia capilar inferiores aos do grupo controlo, sendo que os valores mínimos para o tempo  $T_{120}$  é o único que se encontra acima do valor observado no grupo controlo. Os participantes que ingeriram chá verde apresentaram valores de glicémia capilar máxima superiores em todos os momentos de estudo em relação aos registados no grupo controlo e os valores mínimos de glicémia capilar neste grupo foram inferiores ao grupo controlo apenas nos momentos  $T_{60}$  e  $T_{90}$ . Os participantes que ingeriram chá preto apresentaram valores máximos de glicémia capilar inferiores aos registados no

grupo controlo. Quanto aos valores mínimos de glicémia capilar, estes foram consistentemente superiores aos do grupo controlo exceptuando-se o momento T<sub>90</sub> onde foram inferiores. Numa primeira análise e atendendo aos resultados obtidos, o chá branco é a bebida experimental que maior acção exerce sobre a glicémia pós prandial tanto nos valores mínimos como máximos observados, seguida pelo chá preto e por fim o chá verde.

Para melhor caracterizar as diferenças encontradas entre as bebidas nos vários tempos de estudo, compararam-se as suas médias e respectivos SEM como é possível observar na Tabela 8.

**Tabela 8.** Resultados da glicémia capilar medidos nos 5 momentos de estudo (T<sub>jej</sub>, T<sub>30</sub>, T<sub>60</sub>, T<sub>90</sub>, T<sub>120</sub>) após uma PTOG e ingestão de 300 mL de água (grupo controlo) e após uma PTOG seguida da ingestão de 300 mL de chá (branco, verde, preto). Valores apresentados em Média (Med) e desvio padrão da média ( $\pm$ SEM) (n = 10 em cada grupo).

	PTOG (grupo controlo)	PTOG + chá branco	PTOG + chá verde	PTOG + chá preto
	Med ( $\pm$ SEM)	Med ( $\pm$ SEM)	Med ( $\pm$ SEM)	Med ( $\pm$ SEM)
<b>T<sub>jej</sub></b>	99,50 ( $\pm$ 2,95)	85,90 ( $\pm$ 2,64)*	95,20 ( $\pm$ 3,84)*	94,10 ( $\pm$ 4,61)*
<b>T<sub>30</sub></b>	159,00 ( $\pm$ 6,94)	144,30 ( $\pm$ 5,65)*	170,00 ( $\pm$ 11,54)	156,20 ( $\pm$ 5,06)*
<b>T<sub>60</sub></b>	118,50 ( $\pm$ 7,07)	125,00 ( $\pm$ 5,76)	143,60 ( $\pm$ 10,88)	133,20 ( $\pm$ 4,56)
<b>T<sub>90</sub></b>	110,50 ( $\pm$ 5,48)	105,60 ( $\pm$ 7,36)*	110,10 ( $\pm$ 8,27)*	113,00 ( $\pm$ 5,72)
<b>T<sub>120</sub></b>	95,40 ( $\pm$ 3,82)	92,30 ( $\pm$ 4,19)*	96,00 ( $\pm$ 4,57)	97,70 ( $\pm$ 3,80)

\*Médias de glicémia capilar inferiores em comparação com o grupo controlo

Atendendo aos resultados obtidos, os participantes que ingeriram chá branco continuam a apresentar valores de glicémica capilar relativamente mais baixos quando comparados com os valores obtidos pelo grupo controlo exceptuando-se o momento T<sub>60</sub>. Os participantes que ingeriram o chá verde apresentaram um valor de glicémia capilar inferior ao do grupo controlo apenas no momento T<sub>90</sub> sendo que em todos os outros momentos a média foi superior à verificada no grupo controlo. Os participantes que ingeriram chá preto tiveram uma glicémia capilar consistentemente superior em relação ao grupo controlo exceptuando-se os momentos T<sub>jej</sub> e T<sub>30</sub>.

Para verificar se as diferenças encontradas entre as 3 bebidas em teste e o grupo controlo eram estatisticamente significativas realizou-se uma ANOVA de

medições repetidas do tipo misto para um intervalo de confiança a 95% ( $p = 0,05$ ). Este teste permitiu verificar que existem diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,001$ ) nos momentos  $T_{jej}$ ,  $T_{30}$ ,  $T_{60}$  e  $T_{90}$  nas várias bebidas em estudo mas não em  $T_{120}$  ( $p = 1,00$ ), e quando testado o efeito da bebida ingerida na glicémia ao longo do tempo de estudo, esta diferença não tem significado estatístico ( $p = 0,094$ ).

Para averiguar existem diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controlo e cada uma das bebidas em teste para os momentos  $T_{jej}$ ,  $T_{30}$ ,  $T_{60}$ , e  $T_{90}$  utilizou-se a comparação de grupos com correcção de Bonferroni e verificou-se que para os tempos em questão as diferenças obtidas só são significativas para  $T_{jej}$  e  $T_{30}$  no chá branco como é possível observar na Tabela 9.

**Tabela 9.** Resultados da glicémia capilar medidos nos 5 momentos de estudo ( $T_{jej}$ ,  $T_{30}$ ,  $T_{60}$ ,  $T_{90}$ ,  $T_{120}$ ) após uma PTOG e ingestão de 300 mL de água (grupo controlo) e após uma PTOG seguida da ingestão de 300 mL de chá (branco, verde, preto). Valores apresentados em média (Med) e desvio padrão da média ( $\pm SEM$ ) (n = 10 em cada grupo). O *p* – *value* obtido resulta da comparação das médias das respectivas bebidas para cada um dos tempos de estudo após a utilização do teste ANOVA de medições repetidas do tipo misto com correcção de Tukey ( $p < 0,05$ )

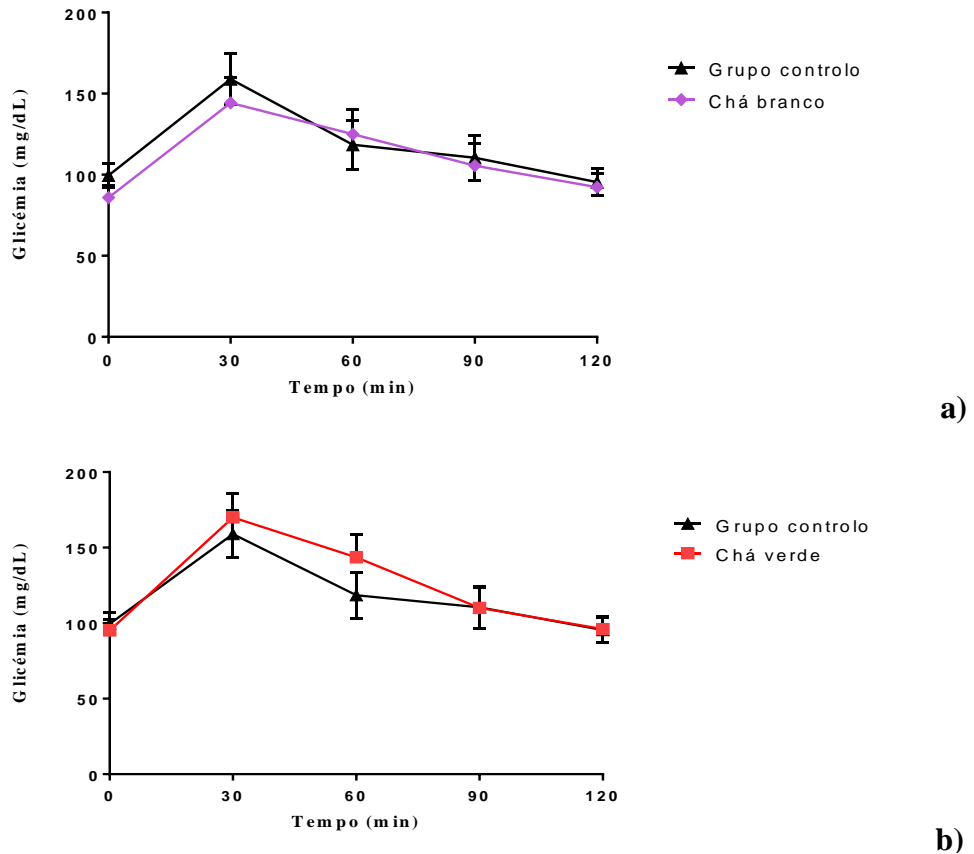
		Média ( $\pm SEM$ ) (mg/dL)		<i>p</i> - <i>value</i>
<b>T<sub>jej</sub></b>	Controlo 99,50 ( $\pm 2,95$ )	CB	85,90 ( $\pm 2,64$ )	0,003*
		CV	95,20 ( $\pm 3,84$ )	0,386
		CP	94,10 ( $\pm 4,61$ )	0,337
<b>T<sub>30</sub></b>	Controlo 159,00 ( $\pm 6,94$ )	CB	144,30 ( $\pm 5,65$ )	0,029*
		CV	170,00 ( $\pm 11,54$ )	0,365
		CP	156,20 ( $\pm 5,61$ )	0,629
<b>T<sub>60</sub></b>	Controlo 118,50 ( $\pm 7,07$ )	CB	125,00 ( $\pm 5,76$ )	0,485
		CV	143,60 ( $\pm 10,88$ )	0,072
		CP	133,20 ( $\pm 4,56$ )	0,100
<b>T<sub>90</sub></b>	Controlo 110,50 ( $\pm 5,48$ )	CB	105,60 ( $\pm 7,36$ )	0,600
		CV	110,10 ( $\pm 8,27$ )	0,968
		CP	113,00 ( $\pm 5,72$ )	0,756
<b>T<sub>120</sub></b>	Controlo 95,40 ( $\pm 3,82$ )	CB	92,30 ( $\pm 3,82$ )	0,591
		CV	96,00 ( $\pm 4,57$ )	0,921
		CP	97,70 ( $\pm 3,80$ )	0,675

CB: Chá branco; CV: Chá verde; CP: Chá preto

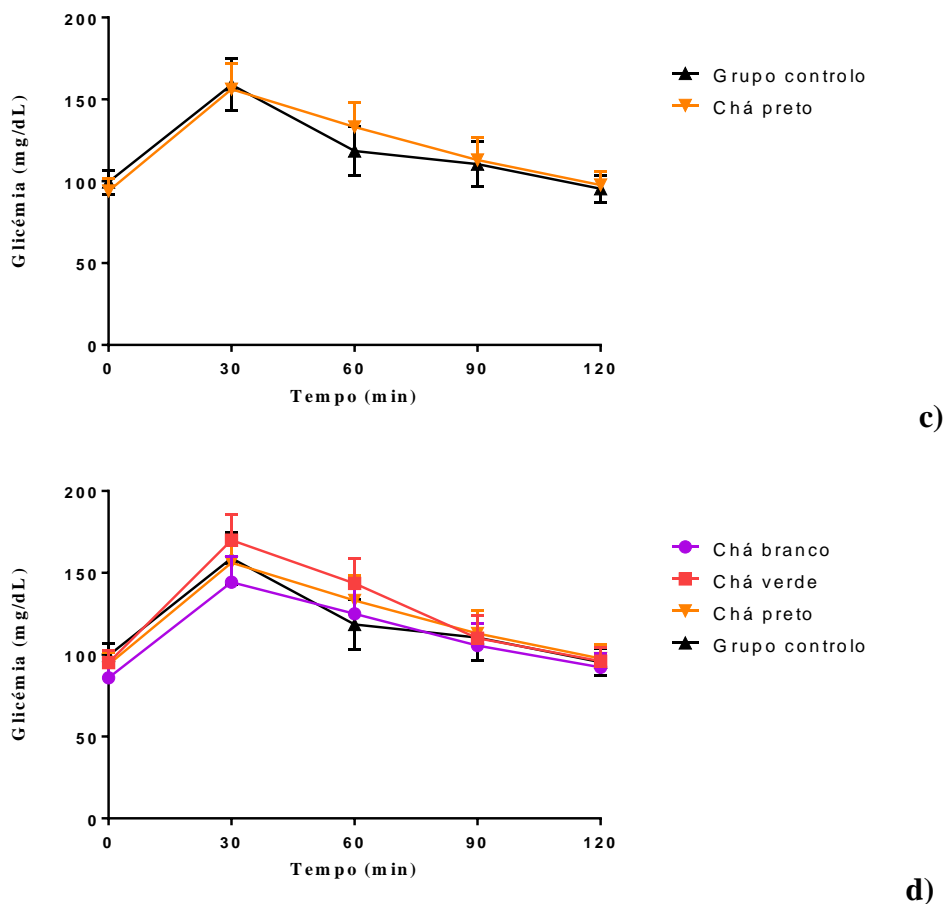
\*Valores estatisticamente significativos:  $p < 0,05$

### 3. Resultados de $C_{\max}$

Atendendo aos valores médios de glicémia capilar obtidos em cada momento de estudo para cada bebida, é possível observar que todos os grupos atingem um valor máximo de glucose ( $C_{\max}$ ) em  $T_{30}$ , existindo diferenças significativas neste tempo entre o grupo controlo e o chá branco, o mesmo não se verificando para o chá verde e chá preto ( $p = 0,029$  e  $p = 0,427$  e  $p = 0,757$  respectivamente).



**Figura 7.** Representação gráfica das curvas de glicémia para o grupo controlo após PTOG e **a)** PTOG + 300 mL de chá branco, **b)** PTOG + 300 mL de chá verde, **c)** PTOG + 300 mL de chá preto, **d)** chá branco, chá verde e chá preto



**Figura 7.** Representação gráfica das curvas de glicémia para o grupo controle após PTOG e **a)** PTOG + 300 mL de chá branco, **b)** PTOG + 300 mL de chá verde, **c)** PTOG + 300 mL de chá preto, **d)** chá branco, chá verde e chá preto

#### 4. Resultados da AUC

No que respeita à área sob a curva (AUC), é possível verificar na Tabela 10 que apenas no chá branco ocorreu uma resposta glicémica inferior à observada ao grupo controle sem contudo ser esta diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ), apresentando as restantes bebidas uma resposta glicémica superior à observada no grupo controle.

**Tabela 10.** Área sob a curva total (AUC). Os resultados apresentam-se na forma de média (Med) e erro padrão da média ( $\pm SEM$ ). *p*-value foi obtido através do teste *t-student* para avaliar a existência de diferenças entre os grupos ( $p < 0,05$ )

Grupo Controlo (Med $\pm SEM$ )	Bebida Teste	AUC (0 -120 min) (Med $\pm SEM$ )	<i>p</i> – value (controlo x bebida teste)
<b>14563,50 (<math>\pm 510,83</math>)</b>	Chá branco	13920 ( $\pm 541,68$ )	0,399
	Chá verde	15579 ( $\pm 931,90$ )	0,356
	Chá preto	14949 ( $\pm 465,03$ )	0,584

### 5. Resultados da relação de $C_{max}$ e $\Delta C_{max}$

Atendendo aos valores apresentados na Tabela 11 para  $C_{max}$  e  $\Delta C_{max}$  é possível observar que o grupo que ingeriu chá branco e chá preto apresentaram um valor de glicémia capilar máxima inferior ao observada no grupo controlo sendo porém esta diferença apenas significativa para o chá branco ( $p = 0,029$ ). Em relação à variação de  $C_{max}$  ( $\Delta C_{max}$ ) o chá branco foi o grupo que registou menor variação na resposta glicémica produzida e avaliada anteriormente pela AUC quando comparada com o grupo controlo, sendo que o chá preto também apresenta uma  $\Delta C_{max}$  inferior, não havendo porém significado estatístico para este parâmetro. O grupo que ingeriu chá verde obteve valores superiores tanto para a AUC como para a  $\Delta C_{max}$ .

**Tabela 11.** Valores médios da concentração máxima ( $C_{max}$ ) e da variação da concentração máxima ( $\Delta C_{max}$ ). Os resultados apresentados encontram-se na forma de média (Med) e erro padrão da média ( $\pm SEM$ ).  $p$  – value foi obtido por comparação da média do grupo controlo com a media das bebidas em estudo com o teste *t-student* para avaliar a existência de diferenças entre os grupos

Variável	Controlo Med ( $\pm SEM$ )(mg/dL)	Bebida teste Med ( $\pm SEM$ )(mg/dL)		$p$ - value
$C_{max}$	159,00 ( $\pm 10,14$ )	CB	144,30 ( $\pm 5,64$ )	0,029*
		CV	170,00 ( $\pm 11,54$ )	0,365
		CP	156,20 ( $\pm 5,61$ )	0,629
$\Delta C_{max}$	63,60 ( $\pm 10,36$ )	CB	58,40 ( $\pm 9,81$ )	0,892
		CV	74,80 ( $\pm 13,87$ )	0,679
		CP	62,10 ( $\pm 10,59$ )	0,974

\*Valor estatisticamente significativo para  $p < 0,05$

## DISCUSSÃO DE RESULTADOS

O chá é uma planta com um elevador teor em polifenóis. A quantificação de fenóis totais realizada assim o demonstrou, obtendo-se uma concentração de 384,25 ( $\pm 0,02$ ) mg/L de fenóis totais para o chá branco, 534,24 ( $\pm 0,02$ ) mg/L para o chá verde e 506,08 ( $\pm 0,01$ ) mg/L para o chá preto, contudo a concentração de fenóis totais não é suficiente para poder afirmar qual dos chás é biologicamente mais activo, sendo por isso quantificada a concentração de flavonóis e de proantocianidinas para cada um dos chás em estudo, obtendo-se uma concentração de 8,31 ( $\pm 0,00$ ) mg/L de flavonóis totais para o chá branco, 6,73 ( $\pm 0,00$ ) mg/L para o chá verde e 8,29 ( $\pm 0,00$ ) mg/L para o chá preto, e de 38,50 ( $\pm 0,02$ ) mg/L proantocianidina A<sub>2</sub> para o chá branco, 23,25 ( $\pm 0,01$ ) mg/L para o chá verde e 41,11 ( $\pm 0,02$ ) mg/L para o chá preto. Com base na análise química realizada é possível verificar que o chá verde é aquele que maior concentração em fenóis totais apresenta, enquanto que no chá preto a fracção que o domina é a de proantocianidinas e no chá branco a de flavonóis. Esta distribuição permite verificar que os chás diferem no tipo de fenóis que os constituem e este pode ser um dos factores explicativos para a diferente forma como eles actuam na glicémia. Outro factor que pode influenciar a acção dos polifenóis na glicémia é o local e respectivo agente de metabolização. Os polifenóis do chá são metabolizados sobretudo no intestino delgado pelas enzimas lactase florizina hidrolase (presentes nas microvilosidades intestinais) ou pelas  $\beta$ -glucosidades (bacterianas), através das quais são convertidos a glucósidos sendo estes metabolizados resultando em metabolitos sulfanados, glucorinados ou metilados (Stefek, 2011), sendo esta a forma na qual os fenóis do chá circulam no sangue e a forma pela qual exercem uma acção biológica na célula (van Duynhoven et al., 2011) sendo que Abe e col., (Abe, et al., 2009) verificaram, uma acção promotora sobre as proteínas transportadoras de glucose (GLUT-1, GLUT-2, GLUT-4), aumentando a sua expressão na membrana celular promovendo assim uma maior captação de glucose na célula diminuindo desta forma a glicémia. Contudo se os polifenóis chegarem ao cólon, a microflora aí presente metaboliza-os, sendo os metabolitos absorvidos na forma de agliconas ou nos seus conjugados mediante a concentração de fenóis que chega ao cólon e à microflora aí presente. A variabilidade na população microbiana de cada participante neste estudo pode explicar os diferentes resultados obtidos, sendo que nos chás com

maior teor fenólico a sua acção espera-se que seja mais tardia visto serem mais extensamente metabolizados no cólon. Tendo determinado as concentrações das fracções de maior expressão para cada um dos chás, considerou-se importante determinar o poder antioxidante de cada um dos chás em estudo pois vários são os autores (Fatima, et al., 2013) que relacionam o efeito hipoglicemiante do chá com a sua capacidade antioxidante. Partindo deste pressuposto, quantificou-se o potencial antioxidante do chá por método FRAP obtendo-se uma concentração de 943,58 ( $\pm$  0,01) mg/L de Trolox para o chá branco, 916,06 ( $\pm$  0,05) mg/L para o chá verde e 933,95 ( $\pm$  0,01) mg/L de Trolox para o chá preto. Para melhor caracterizar o poder antioxidante do chá realizou-se ainda a quantificação da taxa de inibição do anião  $O_2^-$  obtendo-se um poder de inibição de 92% com uma quantidade equivalente de 384 mg/L de fenóis totais para o chá branco, 90% para uma quantidade equivalente de 584 mg/L de fenóis totais no chá verde e 92% com uma quantidade equivalente de 506 mg/L de fenóis totais para o chá preto, e a inibição do radical  $NO^\cdot$ , obtendo-se uma inibição de 45% com uma quantidade equivalente de 384 mg/L de fenóis totais para o chá branco, 57% para uma quantidade equivalente de 584 mg/L de fenóis totais no chá verde e de 45% com uma quantidade equivalente de 506 mg/L de fenóis totais para o chá preto. Os resultados obtidos para o poder antioxidante do chá sugerem que o chá branco é o mais eficaz na neutralização de radicais livres, estando descrita a sua acção na promoção da expressão de enzimas antioxidantes como a Catalase (Cat) e a Superóxido dismutase (SOD). O dano provocado por radicais livres nos estudos sobre a glicémia está descrito como sendo um dos responsáveis pela anormal captação de glucose na célula pancreática e hepática levando a um estado de hiperglicémia (Vauzour, et al., 2010).

Perante os resultados obtidos na análise química de cada um dos chás, previu-se que o chá branco seria aquele que maior acção exerceria na glicémia pois dos chás analisados é o que maior capacidade antioxidante tem e que menos metabolizado seria pois apresenta uma menor concentração de polifenóis.

Quando calculado o efeito dos diferentes chás na glicémia, é possível observar que o grupo que ingeriu chá branco foi aquele que registou menor AUC, e concentração máxima de glucose ao fim de 30 minutos, porém estes valores não podem ser considerados neste estudo uma vez que a glicémia capilar em jejum dos participantes deste grupo difere significativamente do grupo controlo ( $p = 0,003$ ) inviabilizando por

isso qualquer conclusão em relação à acção deste chá sobre a glicémia. O grupo que ingeriu chá preto não divergiu significativamente do grupo controlo em nenhum dos tempos de estudo, sendo verificado um valor de glicémia capilar inferior no jejum e em T<sub>30</sub> sem no entanto serem significativos ( $p=0,337$ ,  $p=0,629$  respectivamente). A AUC e  $\Delta C_{\max}$  neste grupo foram superiores às observadas no grupo controlo, podendo desta forma argumentar-se que o chá preto não influencia a glicémia. O grupo que ingeriu chá verde foi o que maior discrepâncias apresentou, obtendo uma AUC largamente superior ao grupo controlo e registando um pico de glicémia também superior (T<sub>30</sub> = 170 mg/dL), mantendo-se os valores de glicémia capilar deste grupo elevados em relação ao controlo até T<sub>90</sub>, instante a partir do qual este chá apresenta um comportamento idêntico ao controlo, fazendo supor uma acção tardia do chá verde sobre a glicémia podendo esta ser explicada pelo elevado teor em fenóis deste chá que ao que os estudos indicam tem uma extensa metabolização no cólon, estando assim o efeito deste chá na glicémia dependente do tipo de microflora e da sua capacidade de metabolização em cada indivíduo.

Os resultados obtidos nos vários parâmetros em teste neste estudo não permitem estabelecer nenhuma conclusão sobre a acção do chá branco na glicémia e, relativamente ao chá verde e ao chá preto existe a sugestão de que o seu efeito será hiperglicemiante não podendo contudo retirar conclusões concretas pois este estudo teve várias limitações, limitações essas que podem afectar os resultados obtidos.

O facto de os participantes não terem uma glicémia capilar de jejum homogénea pode ser o factor chave para a impossibilidade de extrair conclusões deste estudo uma vez que, não partindo de um ponto comum todos os resultados subsequentes estão sob a sua influência. A duração do estudo foi pequena e o tempo de exposição ao chá também podendo este ter um efeito mais marcado sobre a glicémia se o indivíduo for exposto mais vezes à bebida. O protocolo seguido neste estudo baseou-se numa PTOG de 2 horas (Josic, Olsson, Wickeberg, Lindstedt, & Hlebowicz, 2010) seguida da ingestão do chá pois este método é o mais sensível na detecção de perturbações no metabolismo da glucose porém este protocolo não é seguido em todos os estudos consultados, não permitindo a comparação directa de resultados. Optou-se por administrar 1g de chá (Bryans, Judd, & Ellis, 2007) em forma de folha seca pois este é um produto a que qualquer indivíduo pode ter acesso e não a isolados de EGCG, que submetem o

participante do estudo a concentrações de fenóis que este não obteria naturalmente condicionando assim os resultados obtidos. A dieta dos participantes deste estudo não foi tida em conta apesar de se ter realizado um inquérito das 24 horas anteriores uma vez que, este consumo não traduz a normal dieta do indivíduo. A grande variabilidade de participantes neste estudo e o número reduzido de participantes em cada grupo, não o permite comparar com os estudos consultados uma vez que todos os grupos tiveram participantes diferentes não seguindo o normal desenho de cross-over, inserindo assim variáveis de confundimento que escapam ao controlo do investigador, sendo que nas variáveis peso, altura, idade e IMC tentou-se a homegeização dos grupos para que os resultados obtidos fossem os mais possivelmente homogéneos.



## **CONCLUSÃO**

O presente estudo sugere uma ausência de efeito do chá na glicémia pós prandial, tendo sido observado um efeito hiperglicemiante do chá verde entre os 30 e os 90 minutos de estudo.

Não é possível concluir se a ingestão de chá é benéfica na redução da glicémia pós prandial de um adulto saudável após PTOG pois o estudo teve uma duração e um número de participantes reduzido, sugerindo-se que se realizem estudos com os mesmos chás nas mesmas condições mas por um período de tempo mais longo pois o chá verde apenas começou a actuar ao fim de 90 minutos sendo interessante verificar se este teria um efeito hipoglicemiante após os 120 minutos e se os restantes chás manteriam o seu comportamento. A análise da microflora dos indivíduos e a sua dieta deve ser considerada em estudos futuros pois ambos os factores são cruciais na modelação da resposta glicémica podendo interferir na forma como os polifenóis do chá actuam.

Pode no entanto concluir-se que 1g de chá branco, chá verde e chá preto contem uma elevada concentração de compostos fenólicos com uma grande capacidade antioxidante.



## **BIBLIOGRAFIA CONSULTADA**

- Abbott Diabetes Care. (2010). *Freestyle Precision: Blood Glucose Monitoring system*: In owner's booklet.
- Abe, K., Okada, N., Tanabe, H., Fukutomi, R., Yasui, K., Isemura, M., & Kinae, N. (2009). Effects of chronic ingestion of catechin-rich green tea on hepatic gene expression of gluconeogenic enzymes in rats. *Biomed Res*, 30(1), 25-29. doi: JST.JSTAGE/biomedres/30.25
- Beecher, G. R. (2003). Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J Nutr*, 133(10), 3248S-3254S.
- Blumberg, J. (2003). Introduction to the proceedings of the Third International Scientific Symposium on Tea and Human Health: Role of Flavonoids in the Diet. *J Nutr*, 133(10), 3244S-3246S.
- Bond, T. J. (2012). *Teas, Cocoa and Coffee: Plant Secondary Metabolites and Health* (First ed.). London: Blackwell Publishing Ltd.
- Bryans, J. A., Judd, P. A., & Ellis, P. R. (2007). The effect of consuming instant black tea on postprandial plasma glucose and insulin concentrations in healthy humans. *J Am Coll Nutr*, 26(5), 471-477. doi: 26/5/471
- Calejo, M. T., Morais, Z. B., & Fernandes, A. I. (2009). Isolation and biochemical characterisation of a novel collagen from *Catostylus tagi*. *J Biomater Sci Polym Ed*, 20(14), 2073-2087. doi: 10.1163/156856208X399125
- Chacko, S. M., Thambi, P. T., Kuttan, R., & Nishigaki, I. (2010). Beneficial effects of green tea: a literature review. *Chin Med*, 5, 13. doi: 10.1186/1749-8546-5-131749-8546-5-13
- Chang, B. C., Yang, B., Wen, Z., & Chern, J. (2002). Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178-182.
- de Oliveira, A., Adams, S. D., Lee, L. H., Murray, S. R., Hsu, S. D., Hammond, J. R., . . . Chu, T. C. (2013). Inhibition of herpes simplex virus type 1 with the modified green tea polyphenol palmitoyl-epigallocatechin gallate. *Food Chem Toxicol*, 52, 207-215. doi: 10.1016/j.fct.2012.11.006S0278-6915(12)00813-7
- Deka, A., & Vita, J. A. (2011). Tea and cardiovascular disease. *Pharmacol Res*, 64(2), 136-145. doi: 10.1016/j.phrs.2011.03.009S1043-6618(11)00086-7
- Del Rio, D., Stalmach, A., Calani, L., & Crozier, A. (2010). Bioavailability of coffee chlorogenic acids and green tea flavan-3-ols. *Nutrients*, 2(8), 820-833. doi: 10.3390/nu2080820nutrients-02-00820
- Ding, Y., Yao, H., Yao, Y., Fai, L. Y., & Zhang, Z. (2013). Protection of dietary polyphenols against oral cancer. *Nutrients*, 5(6), 2173-2191. doi: 10.3390/nu5062173nu5062173

- Engelgau, M. M., Narayan, K. M., Saaddine, J. B., & Vinicor, F. (2003). Addressing the burden of diabetes in the 21st century: better care and primary prevention. *J Am Soc Nephrol*, 14(7 Suppl 2), S88-91.
- Fatima, M., Kesharwani, R. K., Misra, K., & Rizvi, S. I. (2013). Protective effect of theaflavin on erythrocytes subjected to in vitro oxidative stress. *Biochem Res Int*, 2013, 649759. doi: 10.1155/2013/649759
- George, F. H. M. (2012). NORMA DA DIREÇÃO GERAL DE SAÚDE: Prescrição e Determinação da Hemoglobina Glicada A1c.
- Gu, L., Kelm, M., Hammerstone, J., Beecher, G. R., Cunningham, D., Vannozzi, S., & Prior, R. (2002). Fractionation of Polymeric Procyanidins from Lowbush Blueberry and Quantification of Procyanidins in Selected Foods with an Optimized Normal-Phase HPLC–MS Fluorescent Detection Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17), 4852-4460. doi: 10.1021/jf020214v
- Hanhineva, K., Torronen, R., Bondia-Pons, I., Pekkinen, J., Kolehmainen, M., Mykkanen, H., & Poutanen, K. (2010). Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *Int J Mol Sci*, 11(4), 1365-1402. doi: 10.3390/ijms11041365
- Harbowy, M., Balentine, D. (1997). Tea Chemistry. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 16(5), 415-480.
- Henning, S. M., Niu, Y., Lee, N. H., Thames, G. D., Minutti, R. R., Wang, H., . . . Heber, D. (2004). Bioavailability and antioxidant activity of tea flavanols after consumption of green tea, black tea, or a green tea extract supplement. *Am J Clin Nutr*, 80(6), 1558-1564. doi: 80/6/1558
- Hilal, Y., U. Engelhardt. (2007). Characterisation of white tea – Comparison to green and black tea. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*(2), 414-421. doi: 10.1007/s00003-007-0250-3
- INSA. (2006). *Tabela de Composição de Alimentos Portuguesa* (1ª ed.). Lisboa.
- Josic, J., Olsson, A. T., Wickeberg, J., Lindstedt, S., & Hlebowicz, J. (2010). Does green tea affect postprandial glucose, insulin and satiety in healthy subjects: a randomized controlled trial. *Nutr J*, 9, 63. doi: 10.1186/1475-2891-9-631475-2891-9-63
- Khan, N., & Mukhtar, H. (2007). Tea polyphenols for health promotion. *Life Sci*, 81(7), 519-533. doi: S0024-3205(07)00471-710.1016/j.lfs.2007.06.011
- Khurana, S., Venkataraman, K., Hollingsworth, A., Piche, M., & Tai, T. C. (2013). Polyphenols: benefits to the cardiovascular system in health and in aging. *Nutrients*, 5(10), 3779-3827. doi: 10.3390/nu5103779
- Kim, H., Quon, M., Kim, J. (2014). New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. *Redox Biology*, 2, 187-195.
- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *ScientificWorldJournal*, 2013, 162750. doi: 10.1155/2013/162750

- Lin, L. Z., Chen, P., & Harnly, J. M. (2008). New phenolic components and chromatographic profiles of green and fermented teas. *J Agric Food Chem*, 56(17), 8130-8140. doi: 10.1021/jf800986s
- Minich, D. M., & Bland, J. S. (2013). Personalized lifestyle medicine: relevance for nutrition and lifestyle recommendations. *ScientificWorldJournal*, 2013, 129841. doi: 10.1155/2013/129841
- Nikkhah, E., Khayami, M., & Heidari, R. (2008). In Vitro Screening for Antioxidant Activity and Cancer Suppressive Effect of Blackberry (*Morus Nigra*). *Iranian Journal of Cancer Prevention*, 4, 167-172.
- Olthof, M. R., Hollman, P. C., Buijsman, M. N., van Amelsvoort, J. M., & Katan, M. B. (2003). Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. *J Nutr*, 133(6), 1806-1814.
- Prabha, M. R., & Vasantha, K. (2011). Antioxidant, Cytotoxicity and Polyphenolic Content of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. Flowers. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1(7), 136-140.
- Scotti, L., Scotti, M.T., Cardoso, C., Pauletti, P., Castro-Gamboa, I., Bolzani, V., Velasco, M., Menezes, C., Ferreira, E. (2007). Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 43(2), 153-166.
- Seino, Y., Nanjo, K., Tajima, N., Kadowaki, T., Kashiwagi, A., Araki, E., . . . Ueki, K. (2010). Report of the committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. *J Diabetes Investig*, 1(5), 212-228. doi: 10.1111/j.2040-1124.2010.00074.xJDI74
- Singh, D. K., Banerjee, S., & Porter, T. D. (2009). Green and black tea extracts inhibit HMG-CoA reductase and activate AMP kinase to decrease cholesterol synthesis in hepatoma cells. *J Nutr Biochem*, 20(10), 816-822. doi: 10.1016/j.jnutbio.2008.07.011S0955-2863(08)00173-3
- Stefek, M. (2011). Natural flavonoids as potential multifunctional agents in prevention of diabetic cataract. *Interdiscip Toxicol*, 4(2), 69-77. doi: 10.2478/v10102-011-0013-yITX-4-069
- Stote, K. S., & Baer, D. J. (2008). Tea consumption may improve biomarkers of insulin sensitivity and risk factors for diabetes. *J Nutr*, 138(8), 1584S-1588S. doi: 138/8S-I/1584S
- Thaipong, K., Cisneros-Zevallos, L., Boonprakob, U., Crosby, K., & Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 669-675.
- van Duynhoven, J., Vaughan, E. E., Jacobs, D. M., Kemperman, R. A., van Velzen, E. J., Gross, G., . . . Van de Wiele, T. (2011). Metabolic fate of polyphenols in the human superorganism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 Suppl 1, 4531-4538. doi: 10.1073/pnas.10000981071000098107

- Vauzour, D., Rodriguez-Mateos, A., Corona, G., Oruna-Concha, M. J., & Spencer, J. P. (2010). Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients*, 2(11), 1106-1131. doi: 10.3390/nu2111106nutrients-02-01106
- World Health Organization. (2000). Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. 894, ppl-253.
- World Medical Association. (2001). Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *Bulletin of the World Health Organization*, 79(5), 373-374.
- Yang, C. S., & Landau, J. M. (2000). Effects of tea consumption on nutrition and health. *J Nutr*, 130(10), 2409-2412.
- Yang, C. S., Wang, X., Lu, G., & Picinich, S. C. (2009). Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance. *Nat Rev Cancer*, 9(6), 429-439. doi: 10.1038/nrc2641
- Young, I. S., Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*, 54(3), 176-186.
- Zhang, B. (2012). *The Characteristics of New Zealand Oolong Tea*. Master of Science, The University of Waikato.

*Efeito da ingestão de 1g de chá branco, chá verde e chá preto na glicemia pós prandial de indivíduos saudáveis após uma prova de tolerância oral à glucose*

# **ANEXOS**

## Anexo 1 – Autorização da Comissão de Ética do ISCSEM



Ex.ma Senhora  
Sandra Marisa Gomes Lopes

Monte de Caparica, 02 de novembro de 2013

Ex.ma Senhora,

Venho comunicar-lhe que o Pedido de Parecer que submeteu à apreciação da Comissão de Ética da Egas Moniz, com o tema denominado "Efeito do chá branco, chá verde e chá preto na glicémia pós-prandial de indivíduos saudáveis após a ingestão de água açucarada", foi aprovado por unanimidade.

Queira aceitar os melhores cumprimentos,

A Presidente da Comissão de Ética da Egas Moniz

Prof. Doutora Maria Fernanda de Mesquita

s.e. Prof. Doutora Maria Fernanda de Mesquita



## Anexo 2 – Consetimento Informado

Monte de Caparica, 09 de Agosto de 2014

Exmo.(a) Sr.(a),

No âmbito do Mestrado em Nutrição Clínica na Unidade Curricular de Dissertação do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, sob a orientação da Professora Doutora Maria Fernanda Mesquita, solicita-se autorização para a participação no estudo intitulado “Efeito do chá branco, chá verde e chá preto na glicémia pós-prandial de indivíduos saudáveis após a ingestão de água açucarada” a alunos do ISCSEM com o objetivo de verificar a existência ou ausência de um efeito hipoglicemiante de 1 grama de chá branco, chá verde e chá preto, em indivíduos saudáveis após ingestão de água açucarada.

A participação neste estudo é voluntária. A sua não participação não lhe trará qualquer prejuízo. A participação neste estudo implica:

- a) 5 picadas no dedo para recolha de uma gota de sangue (medição da glicémia capilar). Estas picadas são efetuadas no dia do estudo e em momentos diferentes: 1 picada em jejum, antes da ingestão do respectivo chá, e as restantes picadas: 30, 60, 90 e 120 minutos depois da ingestão desta bebida.

Este estudo pode trazer benefícios tais como a aquisição de conhecimentos que poderão vir a beneficiá-lo a si ou a terceiros no futuro ao progresso do conhecimento.

A informação recolhida destina-se unicamente a tratamento estatístico e/ou publicação e será tratada pelo(s) orientador(es) e/ou pelos seus mandatados. A sua recolha é anónima e confidencial.

*(Riscar o que não interessa)*

**ACEITO/NÃO ACEITO** participar neste estudo, confirmando que fui esclarecido sobre as condições do mesmo e que não tenho dúvidas.

---

*(Assinatura do participante ou, no caso de menores, do pai/mãe ou tutor legal)*

### DADOS ANTROPOMÉTRICOS

Sexo: M  F

Idade: \_\_\_\_\_ anos

Altura: \_\_\_\_\_ cm

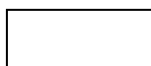
Peso: \_\_\_\_\_ kg

IMC: \_\_\_\_\_ kg/m<sup>2</sup>

Massa gorda: \_\_\_\_\_ %

### ANAMNESE

	Sim	Não
Glicémia em jejum $\leq$ 110 mg/dl		
IMC $<$ 30 kg/m <sup>2</sup>		
É intolerante/alérgico ao chá ou a algum dos seus constituintes?		
Ingeriu algum alimento que contém cafeína nas últimas 8 horas? (chá, café, chocolate, refrigerantes, bebidas energéticas, etc.)		
É anémico(a)?		
Tem algum problema cardíaco?		
Tem alguma patologia intestinal que altere ou afecte a normal absorção dos nutrientes? (D.Chron, S. Má-absorção, D.Celíaca, S. Cólon Irritável, etc.)		
Faz alguma medicação que afecte o bom funcionamento intestinal? (laxantes, clisters, etc.)		
Toma algum suplemento alimentar que altere o normal funcionamento do organismo? (Fibras, queimadores de gordura, drenantes, laxantes, etc.)		



Código:



## Anexo 4 – Diário alimentar das 24 hora anteriores

- Pequeno-Almoço

Alimento	Porção
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

- Meio-Manhã

Alimento	Porção
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

- Almoço

Alimento	Porção
_____	_____
_____	_____

_____	_____
_____	_____
_____	_____

- Lanche

Alimento	Porção
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

- Lanche 2

Alimento	Porção
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

- Jantar

Alimento	Porção
_____	_____
_____	_____

---

---

---

---

---

---

- Ceia

Alimento

Porção

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

Código

**Anexo 5 – Tabela de registo de medições de glicémia capilar nos momentos  $T_{\text{jej}}$ ,  $T_0$ ,  $T_{30}$ ,  $T_{60}$ ,  $T_{90}$ ,  $T_{120}$  para o grupo controlo, chá branco, chá verde e chá preto**

<b>Código</b>	<b><math>T_{\text{jej}}</math></b>	<b><math>T_{30}</math></b>	<b><math>T_{60}</math></b>	<b><math>T_{90}</math></b>	<b><math>T_{120}</math></b>
<b>01 CV</b>	100	128	89	64	83
<b>02 CP</b>	93	138	128	90	86
<b>03 CB</b>	89	120	84	75	82
<b>04 CV</b>	82	230	191	101	91
<b>05 CP</b>	107	188	143	129	114
<b>06 CB</b>	100	114	120	59	97
<b>07 CV</b>	105	182	159	115	89
<b>08 CB</b>	98	152	125	114	80
<b>09 CP</b>	105	153	108	77	89
<b>10 CV</b>	110	198	176	146	120
<b>11 CB</b>	82	142	128	107	90
<b>12 CB</b>	89	160	142	125	100
<b>13 CV</b>	95	120	100	79	84
<b>14 CP</b>	73	148	112	99	84
<b>15 CV</b>	84	182	160	124	110
<b>16 CB</b>	78	167	152	138	120
<b>17 CP</b>	105	176	142	118	98
<b>18 CV</b>	110	210	173	141	108
<b>19 CB</b>	83	150	128	117	102
<b>20 CP</b>	72	147	134	121	106

<b>Código</b>	<b><math>T_{\text{jej}}</math></b>	<b><math>T_{30}</math></b>	<b><math>T_{60}</math></b>	<b><math>T_{90}</math></b>	<b><math>T_{120}</math></b>
<b>21 CP</b>	109	165	149	124	89
<b>22 CV</b>	88	140	117	101	85
<b>23 CB</b>	80	139	120	115	94
<b>24 CP</b>	91	13	138	120	88
<b>25 CV</b>	102	162	147	129	110
<b>26 CB</b>	74	164	136	107	82
<b>27 CP</b>	106	146	128	120	109
<b>28 CB</b>	86	135	115	99	76
<b>29 CP</b>	80	169	150	132	114
<b>30 CG</b>	76	148	124	101	80
<b>31 CG</b>	107	152	93	90	96
<b>32 CG</b>	105	116	101	127	86
<b>33 CG</b>	94	157	122	120	103
<b>34 CG</b>	91	170	121	107	114
<b>35 CG</b>	109	200	141	111	89
<b>36 CG</b>	110	152	119	99	92
<b>37 CG</b>	92	147	91	102	72
<b>38 CG</b>	82	165	146	124	98
<b>39 CG</b>	100	153	99	85	94
<b>40 CG</b>	105	178	152	140	110