

**POLIANE FOLADOR**

**ESTUDO DO POTENCIAL HIPOGLICEMIANTE DA  
*WILBRANDIA EBRACTEATA* EM RATOS NORMAIS E  
DIABÉTICOS**

FLORIANÓPOLIS

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

**POLIANE FOLADOR**

**ESTUDO DO POTENCIAL HIPOGLICEMIANTE DA  
*WILBRANDIA EBRACTEATA* EM RATOS NORMAIS E  
DIABÉTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmácia, sob orientação da Profa. Dra. Fátima Regina Mena Barreto Silva.

Florianópolis

2009

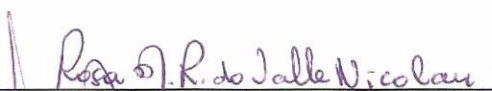
# “Estudo do Potencial Hipoglicemiante da *Wilbrandia ebracteata* em ratos normais e diabéticos”

POR

**Poliane Folador**

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pela Orientadora e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:


Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau (UFSC– Membro Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Marení Rocha Farias (UFSC - Membro Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Angela Machado de Campos (UFSC - Membro Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Fátima Regina Mena Barreto Silva (UFSC – Orientadora)

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Elenara Lemos Senna  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC

Florianópolis, 20 de março de 2009.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por proporcionar mais esta oportunidade em minha vida e por sempre me guiar e me mostrar os melhores caminhos a serem seguidos.

À minha família, em especial aos meus pais João e Lurdes, às minhas irmãs Aline e Pauline e ao meu namorado Rodrigo pela confiança, admiração, paciência, companheirismo e por sempre estarem me apoiando em minhas escolhas.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fátima Regina Mena Barreto Silva, pela confiança em mim depositada, pelo exemplo de perseverança e pelo imenso conhecimento que me transmitiu.

Às colegas de laboratório pelo companheirismo, amizade e conhecimentos compartilhados, especialmente à Luisa Helena Cazarolli, pelo apoio na realização dos experimentos.

Aos professores. Dr. Eloir P. Schenkel e Dr. Flávio H. Reginatto, bem a como à Ms. Andressa C. Gazola, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores Dr. Danilo Wilhelm Filho, Dr. João Batista Calixto e Dr<sup>a</sup>. Rozangela Curi Pedrosa por compartilhar equipamentos.

Ao laboratório da professora Dr<sup>a</sup>. Tânia Silvia Fröde, em especial às alunas Ziliane e Jucélia pela disponibilidade concedida.

À professora Dr<sup>a</sup>. Ângela Machado de Campos e a aluna de mestrado Daniela Paula Arend por indiretamente apoiarem a realização deste trabalho.

*Insanidade  
é fazer a mesma coisa, vez após outra,  
e esperar resultados diferentes.*

*Albert Einstein*

## RESUMO

### **Estudo do potencial hipoglicemiante da *Wilbrandia ebracteata* em ratos normais e diabéticos**

*Wilbrandia ebracteata* pertence à família Cucurbitaceae e é popularmente conhecida como taiuiá. Das raízes e folhas da espécie foram isoladas cucurbitacinas e flavonóides C-glicosídeos. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram atividades analgésica, antiinflamatória e antiulcerogênica das raízes e folhas da planta. Alguns C-glicosídeos presentes nas raízes de *W. ebracteata*, como vitexina e swertisina mostraram ainda ação antioxidante e inibição de  $\alpha$ -glicosidases intestinais. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar a ação e o mecanismo de ação anti-hiperglicêmica de extratos, frações, subfrações e dos compostos isolados das raízes de *W. ebracteata*, swertisina e isovitexina, em ratos normais hiperglicêmicos e diabéticos. Foram utilizados ratos *Wistar* machos adultos entre 50–55 dias em jejum de 16 h prévio ao tratamento. Nos experimentos para determinação da glicemia e da concentração plasmática de insulina, as preparações de *W. ebracteata* foram administradas em diferentes doses por via oral em ratos normais após sobrecarga de glicose e as determinações foram realizadas nos tempos de 0, 15, 30, 60 e 180 min. O conteúdo de glicogênio muscular foi determinado após 180 min. A glicemia de ratos diabéticos foi determinada nos tempos 0, 1, 2 e 3 h após tratamento. A captação de glicose foi estudada em músculo sóleo na ausência (controle) ou presença dos C-glicosídeos isovitexina e swertisina e/ou insulina (tratado). A administração do extrato bruto metanólico (400 e 800 mg/kg) reduziu a glicemia de ratos normais hiperglicêmicos entre os tempos 15-60 min e elevou a concentração plasmática de insulina entre 30 e 60 min. O aumento do conteúdo de glicogênio muscular também foi observado. A fração *n*-butanol (50 mg/kg) apresentou maior potência nos tempos 15 e 30 min, entretanto esta fração não alterou a glicemia de ratos diabéticos. Efeito semelhante foi observado para a subfração metanólica. Os flavonóides C-glicosídeos isovitexina e swertisina (15 mg/kg) apresentaram ação anti-hiperglicêmica mais potente que a observada para frações e extratos e não alteraram a captação de glicose em músculo sóleo de ratos normais. A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que os extratos, frações, subfrações e flavonóides C-glicosídeos isolados de *W. ebracteata* possuem ação anti-hiperglicêmica provavelmente pelo estímulo da secreção de insulina pelo pâncreas.

**Unitermos:** *Wilbrandia ebracteata*, flavonóides C-glicosídeos, hiperglicemia, secreção de insulina, diabetes.

## ABSTRACT

### Study of the hypoglycemic potential of *Wilbrandia ebracteata* in normal and diabetic rats

*Wilbrandia ebracteata* belongs to the Cucurbitaceae family and is popularly known as “taiuíá”. From roots and leaves of “taiuíá” were isolated cucurbitacines and C-glycosilflavones. *In vitro* and *in vivo* studies have shown that roots and leaves from plant produce anti-inflammatory, analgesic and anti-ulcerogenic activities. Some of C-glycosilflavones were found to have antioxidant activities and inhibitory effect on  $\alpha$ -glucosidases. The aim of the present study was to investigate the antihyperglycemic effect and mechanism of action of extracts, fractions, subfractions and isolated compounds from *W. ebracteata* roots in hyperglycemic normal and diabetic rats. Male Wistar rats 50-55 days were used. Fasted rats were deprived of food for 16 h before treatment. To study the glycemia and serum insulin levels, *W. ebracteata* preparations were administrated in different doses per oral in normal hyperglycemic rats and blood samples were collected just prior to and at 15, 30, 60 and 180 min after treatment. Glycogen content from muscle was determined at 180 min. The glycemia in diabetic rats was determined at 0, 1, 2 and 3 h after administration of each compound. The glucose uptake was studied in the soleus muscle in the absence (control) or presence of C-glycosilflavones isovitexin and swertisin and/or insulin (treatment). Oral administration of crude extract (400 and 800 mg/kg) reduced the glycemia at 15-60 min and increased serum insulin levels in hyperglycemic normal rats. An increased in glycogen content also was observed. A more potent effect was observed after treatment with *n*-butanol fraction (50 mg/kg) at 15 and 30 min. A similar effect was observed after methanol subfraction treatment. On the other hand, the antihyperglycemic effect of *n*-butanol fraction was not observed in diabetic rats. C-glycosilflavones isovitexin and swertisin (15 mg/kg) showed a more potent antihyperglycemic action when compared with extracts and fractions and did not stimulate muscle glucose uptake in normal rats. These reports points that the extracts, fractions, subfractions and C-glycosilflavones isolated from *W. ebracteata* roots have antihyperglycemic action probably due to stimulation of insulin secretion from pancreas.

**Key words:** *Wilbrandia ebracteata*, C-glycosilflavones, hyperglycemia, insulin secretion, diabetes.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Secreção bifásica de insulina estimulada por glicose.....	10
<b>Figura 2.</b> Mecanismo de secreção de insulina pelo pâncreas.....	11
<b>Figura 3:</b> Vias de sinalização da insulina.....	13
<b>Figura 4.</b> Sítios de ação dos hipoglicemiantes orais.....	15
<b>Figura 5.</b> Exemplar da espécie <i>Wilbrandia ebracteata</i> Cogn.....	19
<b>Figura 6.</b> Fórmula estrutural básica dos flavonóides.....	22
<b>Figura 7:</b> Obtenção dos extratos, frações e subfrações das raízes de <i>W. ebracteata</i> e isolamento das substâncias isovitexina e swertisina.....	63
<b>Figura 8.</b> Tratamentos dos animais normais hiperglicêmicos e diabéticos.....	64
<b>Figura 9.</b> Representação esquemática da extração de glicogênio muscular.....	65
<b>Figura 10.</b> Representação esquemática do ensaio de captação de [ <sup>14</sup> C]-DG.....	66



## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b> Farmacocinética das formulações de insulina pela via subcutânea.....	14
<b>Quadro 2:</b> Estruturas dos compostos isolados de <i>Wilbrandia ebracteata</i> .....	20

## LISTA DE ABREVIATURAS

[ <sup>14</sup> C]DG	[U- <sup>14</sup> C]-2-deoxi-D-glicose
ADA	<i>American Diabetes Association</i>
ADP	Adenosina difosfato
AE	Extrato bruto Aquoso das raízes de <i>Wilbrandia ebracteata</i>
AF	Subfração Aquosa das raízes de <i>Wilbrandia ebracteata</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BuOH	Fração <i>n</i> -butanol das raízes de <i>Wilbrandia ebracteata</i>
COX-2	Ciclooxigenase tipo 2
CTGO	Curva de tolerância à glicose oral
DM	Diabetes Melito
DPP-4	Dipeptidil peptidase 4
GIP	Polipeptídio insulino-trópico
GLP-1	Peptídeo semelhante ao glucagon 1
GLUT-2	Transportador de glicose tipo 2
GLUT-4	Transportador de glicose tipo 4
HSV-1	Vírus Herpes simples tipo 1
IRS	Substrato do receptor de insulina
K <sub>ATP</sub>	Canal de potássio dependente de ATP
LPH	Lactase florizina hidrolase
MAPK	Proteínas quinase de ativação mitogênica
MeE	Extrato bruto Metanólico das raízes de <i>Wilbrandia ebracteata</i>
MEF	Subfração Metanólica das raízes de <i>Wilbrandia ebracteata</i>
MS	Ministério da Saúde
NPH	Protamina Neutra Hagedorn
OMS	Organização Mundial de Saúde
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PPAR-Y	Receptor de proliferação de peroxissomo ativado
RTK	Receptor tirosina quinase
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SGLT-1	Transportador de glicose dependente de sódio tipo 1
SUR-1	Receptor de sulfoniluréia 1
WE	<i>Wilbrandia ebracteata</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

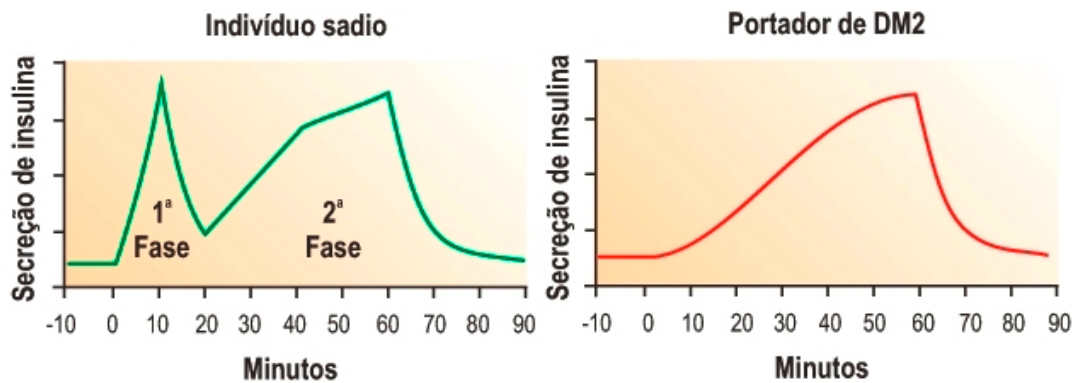
## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>1.1 Regulação do Metabolismo da Glicose e Diabetes</b> .....	<b>10</b>
<b>1.2 Tratamento do Diabetes</b> .....	<b>12</b>
<b>1.2.1 Insulina</b> .....	<b>13</b>
<b>1.2.2 Hipoglicemiantes orais</b> .....	<b>14</b>
1.2.2.1 Sulfoniluréias e Glinidas.....	15
1.2.2.2 Biguanidas.....	16
1.2.2.3 Inibidores da $\alpha$ -glicosidase.....	16
1.2.2.4 Tiazolidinodionas.....	16
1.2.2.5 Novas terapias.....	17
<b>1.3 Plantas Medicinais</b> .....	<b>17</b>
<b>1.4 <i>Wilbrandia ebracteata</i></b> .....	<b>19</b>
<b>1.5 Flavonóides</b> .....	<b>21</b>
<b>1.6 Justificativa</b> .....	<b>23</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	<b>25</b>
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>25</b>
<b>3. ARTIGO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO – “<i>JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACOLOGY</i>”</b> .....	<b>26</b>
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	<b>48</b>
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>53</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>54</b>
<b>APÊNDICE: Protocolos de estudo das ações hipoglicemiantes de <i>Wilbrandia ebracteata</i></b> .....	<b>63</b>
<b>ANEXO 1: Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais</b> .....	<b>67</b>
<b>ANEXO 2: Participação em trabalhos publicados neste tema</b> .....	<b>68</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Regulação do Metabolismo da Glicose e Diabetes

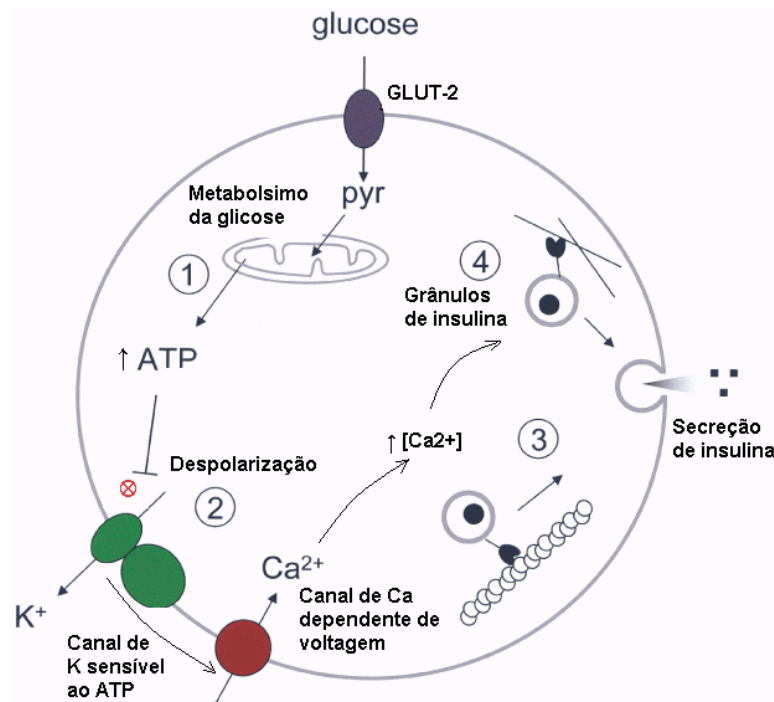
Sob condições fisiológicas, a concentração plasmática de glicose se mantém constante, garantindo a oferta adequada de nutrientes aos tecidos. O controle do metabolismo da glicose é mantido através de um sistema hormonal integrado composto pela insulina, hormônio hipoglicemiante, e alguns hormônios hiperglicemiantes como glucagon, cortisol, adrenalina e hormônio de crescimento. Por se tratar do único hormônio hipoglicemiante, a insulina dispõe de um sistema de controle de secreção finamente regulado (ALBUQUERQUE; PIMAZONI NETTO, 2008). Em condições normais, a secreção insulínica ocorre em duas fases (Figura 1), o primeiro pico é necessário para a utilização da glicose proveniente da refeição e para sinalizar o fígado a inibir a produção de glicose. A segunda fase mantém a glicemia nos valores basais. No indivíduo sadio, as duas fases de secreção de insulina estão preservadas enquanto no diabetes há perda da primeira fase e atraso na segunda fase deste processo (MAHLER; ADLER, 1999; ALBUQUERQUE; PIMAZONI NETTO, 2008).



**Figura 1.** Secreção bifásica de insulina estimulada por glicose em indivíduos saudáveis e diabéticos. Fonte: ALBUQUERQUE, PIMAZONI NETTO, 2008.

A glicose é o principal estímulo para a secreção de insulina (Figura 2). O influxo de glicose na célula  $\beta$  através do transportador de membrana GLUT-2, e o metabolismo subsequente através da glicocinase e da glicólise aumentam a concentração intracelular de ATP. Com o aumento da relação ATP/ADP no meio intracelular, ocorre o fechamento dos canais de potássio dependentes de ATP ( $K_{ATP}$ ) e despolarização da membrana. A abertura dos canais de cálcio dependentes da voltagem permite influxo de  $Ca^{+2}$  para a célula  $\beta$ , que ativa

um complexo sistema efetor cujo resultado é a secreção de insulina (MALAISSE, 1992; NORMAN; LITWAK, 1997; OHARA-IMAIZUMI; NAGAMATSU, 2006). Além da glicose, poucos nutrientes (leucina, glutamina, alanina, arginina, frutose e alguns ácidos graxos) podem induzir de forma independente ou de forma potencializadora à secreção de insulina (GYLFE, 1988).



**Figura 2.** Mecanismo de secreção de insulina pelo pâncreas. Fonte: adaptado de <http://www.lookfordiagnosis.com>. Acesso em 04/12/2008.

Diabetes melito (DM) é uma doença de etiologia múltipla decorrente da deficiência na produção e/ou na ação da insulina. Caracteriza-se por hiperglicemia crônica, frequentemente associada a distúrbios no metabolismo de proteínas e lipídios, causando danos a vários sistemas do organismo, principalmente o sistema nervoso e vascular (O'BRIEN; GRANNER, 1996; ISLAS-ANDRADE et al., 2000; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2003).

Clinicamente, existem duas classificações gerais para o diabetes: Tipo 1 (DM1), ou insulino-dependente e Tipo 2 (DM2) ou não insulino-dependente. O DM1 é resultante da destruição auto-imune das células  $\beta$  pancreáticas e ocorre em apenas 5-10% dos pacientes. Inúmeros fatores genéticos e ambientais desencadeiam esse processo destrutivo, que se caracteriza pela ausência da secreção de insulina (KAWASAKI et al., 2004; CONCANNON et al., 2005; GILLESPIE, 2006). Já o DM2, ocorre em 90-95% dos pacientes e resulta de

graus variáveis de resistência periférica à ação da insulina em tecidos-alvos (músculo, tecido adiposo e fígado) e do comprometimento da secreção de insulina. Esse tipo de diabetes geralmente está associado à obesidade e ao avanço da idade (PROIETTO, 2005).

Com relação à patogênese do diabetes, podem ser identificados quatro defeitos intrínsecos básicos: (1) resistência à insulina nos tecidos muscular e adiposo; (2) redução da secreção de insulina; (3) aumento da produção de glicose pelo fígado e (4) redução dos níveis do peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1) (STOLAR et al., 2008).

A resistência à insulina geralmente precede o início do diabetes e se caracteriza pela redução da captação de glicose nos tecidos periféricos como o músculo e o tecido adiposo. Como mecanismo de compensação, há o aumento da secreção de insulina pelo pâncreas, levando a hiperinsulinemia. Quando a célula  $\beta$  não é mais capaz de prover maior secreção de insulina, surge a hiperglicemia. O aumento da produção de glicose pelo fígado resulta da resistência hepática à insulina e contribui especialmente com a hiperglicemia de jejum. A exposição crônica à glicose (glicotoxicidade) e a ácidos graxos livres (lipotoxicidade), bem como o aumento da demanda secretória de insulina são fatores que levam a perda da função das células  $\beta$  pancreáticas. Um outro fator na patogênese do diabetes está relacionado à redução nos níveis de GLP-1, hormônio intestinal secretado durante a alimentação e que aumenta a secreção de insulina. O hormônio GLP-1 suprime a produção de glucagon das células alfa pancreáticas e retarda o esvaziamento gástrico, o que reduz a hiperglicemia pós-prandial. A estratégia de tratamento ideal do diabetes deve ser direcionada a esses quatro defeitos intrínsecos para que o controle glicêmico seja alcançado (GERICH; DAILEY, 2004; TODD; BLOOM et al., 2007; STOLAR et al., 2008).

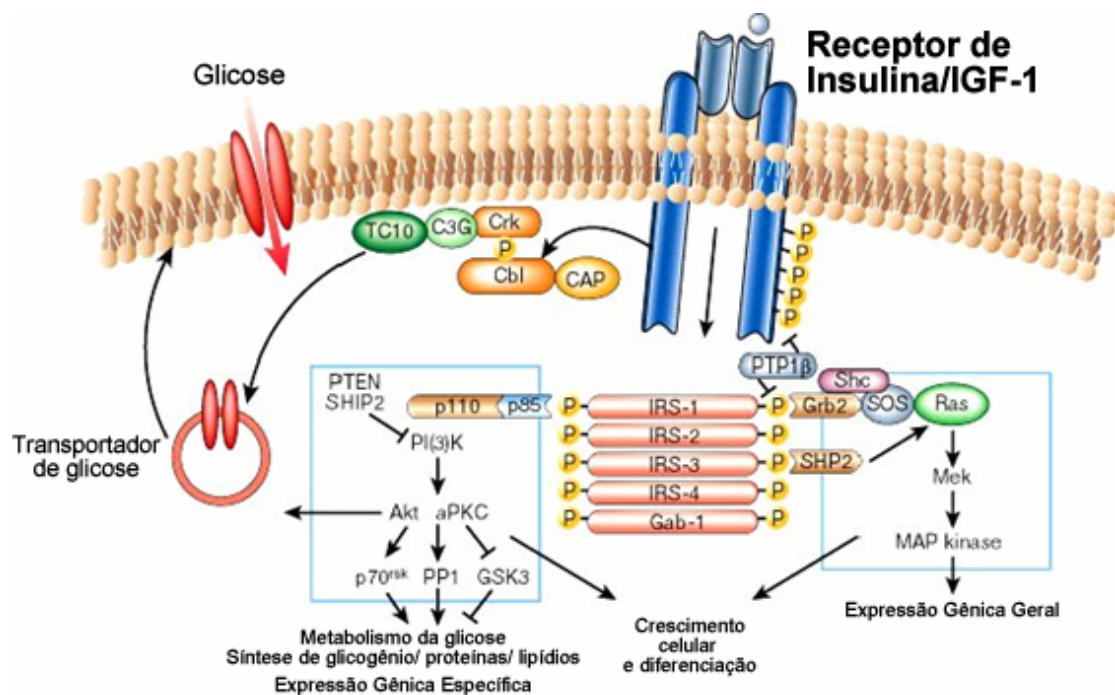
## **1.2 Tratamento do Diabetes**

Em geral, o tratamento inicial do diabetes envolve mudanças no estilo de vida, especialmente relacionadas à dieta, exercício físico e controle de peso. Quando o controle glicêmico adequado não é atingido com essas medidas, existem várias opções farmacológicas que devem ser escolhidas de acordo com cada caso, visando à redução da glicemia e dos efeitos adversos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2003; 2007).

### 1.2.1 Insulina

A terapia com insulina é a base do tratamento para o diabetes tipo 1 e, quando o controle glicêmico com os hipoglicemiantes orais não é alcançado, a insulina se torna a alternativa para os diabéticos do tipo 2 (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2003; BETHEL; FEINGLOS, 2005; YADAV; PARAKH, 2006; FOWLER, 2008).

A insulina se liga a um receptor específico presente na membrana celular. O receptor de insulina é uma proteína heterotetramérica pertencente à família de receptores tirosina quinases (RTKs). Consiste de duas subunidades  $\alpha$  extracelulares que contém o sítio de ligação à insulina e duas subunidades  $\beta$  transmembrana com atividade de tirosina quinase (TAHA; KLIP, 1999; SALTIEL; KAHN, 2001). A ligação da insulina ao receptor promove autofosforilação da subunidade  $\beta$  em resíduos de tirosina específicos. Uma vez ativado, o receptor de insulina promove a fosforilação de diversos substratos protéicos, por exemplo, a família de substratos do receptor de insulina (IRS 1-4), que servem como âncoras para a ativação de diferentes vias de sinalização da insulina (via da fosfatidilinositol 3-quinase – PI3K; via das proteínas quinases de ativação mitogênica – MAPK e via da fosfolipase C). Essas vias de transdução de sinal levam às ações metabólicas finais da insulina, tais como translocação de vesículas contendo transportadores de glicose (GLUT-4), ativação da síntese de glicogênio e de proteínas e transcrição de genes específicos para o crescimento e diferenciação celular (Figura 3) (NORMAN; LITWACK, 1997; CAZAROLLI et al., 2008a).



**Figura 3:** Vias de sinalização da insulina. Fonte: Adaptado de Saltiel; Kahn, 2001.

A administração de insulina é a forma mais efetiva para restabelecer o controle glicêmico nas duas formas de diabetes; entretanto, apresenta várias limitações. A administração por via subcutânea com frequência requer múltiplas doses de injeções por dia. Além disso, apresenta um risco considerável de hipoglicemia e requer o auto-monitoramento regular da glicemia pelo paciente. A ADA (*American Diabetes Association*) recomenda a insulina como base do tratamento para o DM1 e, ainda, como segunda opção para pacientes com DM2 que não estão adequadamente controlados com a monoterapia com metformina ou como terceira opção para aqueles que não alcançaram o controle glicêmico com terapia combinada de hipoglicemiantes orais (NATHAN et al., 2006; STOLAR et al., 2008).

Atualmente existem diversas preparações de insulina disponíveis. Essas incluem as insulinas de ação curta e rápida (glusilina, aspart, lispro e regular) e as insulinas de ação intermediária e lenta (NPH, lenta, ultralenta e glargina), classificadas de acordo com o início e duração de ação como demonstrado no Quadro 1 (DIPIRO, 2002; OIKNINE; MOORADIAN, 2003).

**Quadro 1:** Farmacocinética das formulações de insulina pela via subcutânea

<b>Tipo de Insulina</b>	<b>Início da Ação</b>	<b>Pico Plasmático (h)</b>	<b>Duração do Efeito (h)</b>
<b>Ação rápida</b>	(min)		
Glusilina	15	0,5 – 1,5	1 – 2,5
Aspart	25	1 – 2	3,5
Lispro	25	0,5 – 1,5	3 – 4
Regular	30 – 60	2 – 3	3 – 6
<b>Ação intermediária</b>	(h)		
NPH	2 – 4	6 – 10	10 – 16
Lenta	3 – 4	6 – 12	12 – 18
Detemir	–	1,5	20 – 24
<b>Ação prolongada</b>	(h)		
Ultralenta	6 – 10	10 – 16	18 – 20
Protamina Zinco	4 – 6	14 – 20	24 – 36
Glargina	4	–	24

Fonte: Adaptado de DIPIRO, 2002.

### 1.2.2 Hipoglicemiantes orais

Os hipoglicemiantes orais são medicamentos utilizados na terapia do diabetes tipo 2 e estão divididos em classes de acordo com o mecanismo de ação hipoglicemiante



(SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2003; 2007). Os fármacos chamados de “sensibilizadores da insulina” atuam sobre a resistência à insulina, exercendo efeitos terapêuticos através do estímulo à captação de glicose pelos tecidos periféricos e da redução da liberação de glicose pelo fígado. Este grupo inclui duas classes terapêuticas, as biguanidas e as glitazonas. O grupo dos fármacos “secretagogos de insulina” age estimulando a produção de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas, sendo representado pelas classes das glinidas e das sulfoniluréias. Há ainda, fármacos que retardam a absorção intestinal da glicose e outros com mecanismos menos conhecidos (Figura 4) (MAHLER; ADLER, 1998; ALBUQUERQUE; PIMAZONI NETTO, 2008).



**Figura 4:** Sítios de ação dos hipoglicemiantes orais. Fonte: Adaptado de DeFronzo, 1999.

#### 1.2.2.1 Sulfoniluréias e Glinidas

As sulfoniluréias exercem a principal ação sobre as células  $\beta$  do pâncreas, estimulando a secreção de insulina e, dessa forma, reduzindo os níveis plasmáticos de glicose. Essa classe de substâncias ocupa um sítio específico (subunidade SUR-1) do receptor de sulfoniluréia nos canais  $K_{ATP}$ . A ligação ao receptor leva a abertura dos canais de cálcio, resultando na liberação de insulina por exocitose. As glinidas (repaglinida e nateglinida) atuam pelo mesmo mecanismo de ação, porém ocupam outra subunidade do receptor e possuem duração de ação mais curta comparado às sulfoniluréias (RENDELL, 2004; VELLOSO; ALBUQUERQUE, 2008).

As sulfoniluréias estão divididas tradicionalmente em duas gerações. A primeira geração vem sendo preterida em função do início de ação tardio e hipoglicemia freqüente. A segunda geração inclui fármacos como a glibenclamida, glipizida, gliclazida e glimepirida e difere da primeira pela sua maior potência e menor incidência de efeitos adversos. (PERFETTI, 2000; HARDMAN; LIMBID; GILMAN, 2001; GOLDFRANK et al, 2002). Com o uso crônico, há um declínio progressivo na efetividade das sulfoniluréias, resultado da redução na capacidade de produção de insulina pelas células  $\beta$  (RENDELL, 2004).

#### 1.2.2.2 Biguanidas

Em contraste com as sulfoniluréias, as biguanidas são agentes hipoglicemiantes que não necessitam de células  $\beta$  pancreáticas funcionantes. A metformina, única representante da classe, é utilizada como primeira opção no tratamento do diabetes tipo 2 (INZUCHI, 2002; CHAN, 2007 et al.; STOLAR et al., 2008). A ação hipoglicemiante da metformina resulta primariamente da redução da produção hepática de glicose e, em menor extensão da diminuição da resistência à insulina. A metformina atua causando a translocação de transportadores de glicose para membrana plasmática das células hepáticas e musculares (MAHLER; ADLER, 1999; SCARPELLO; HOWLETT, 2008). As biguanidas apresentam ainda, efeitos positivos sobre o perfil lipídico, não causam hipoglicemia e ganho de peso, mas podem levar a distúrbios intestinais transitórios como náuseas e diarréias (CHAN et al., 2006).

#### 1.2.2.3 Inibidores da $\alpha$ -glicosidase

Membros dessa classe atuam pela redução da absorção intestinal de carboidratos, suprimindo, desse modo, a hiperglicemia pós-prandial. As  $\alpha$ -glicosidases são enzimas do epitélio intestinal responsáveis pelo processamento de dissacarídeos e carboidratos complexos. Os inibidores de  $\alpha$ -glicosidase reduzem a captação de carboidratos da dieta através da inibição competitiva das  $\alpha$ -glicosidases. Acarbose e miglitol, agentes dessa classe terapêutica em uso clínico, possuem alguns efeitos adversos gastrintestinais e geralmente são utilizados como terapia combinada com outros agentes como as sulfoniluréias (MAHLER; ADLER, 1999; INZUCHI, 2002).

#### 1.2.2.4 Tiazolidinodionas

As tiazolidinodionas ou glitazonas, representadas pela rosiglitazona e pioglitazona, exercem sua ação através da redução da resistência à insulina. Essa ação é atribuída ao estímulo de uma classe de receptores nucleares: receptor de proliferação de peroxissomo ativado (PPAR- $\gamma$ ), que aumentam a expressão de genes codificadores de proteínas envolvidas no metabolismo da glicose, lipídios e na sinalização da insulina (p.ex. lipoproteína lípase, proteína transportadora de ácidos graxos, proteína de ligação de ácidos graxos dos adipócitos, GLUT-4, fosfoenolpiruvato carboxiquinase e outros) (DIPIRO, 2002).

As tiazolidinodionas se ligam ao receptor PPAR-  $\gamma$  encontrado no tecido adiposo, muscular e hepático. O efeito da ativação do receptor resulta na diferenciação dos adipócitos, com conseqüente aumento da captação de triglicerídeos e inibição da lipólise. Dessa forma, os níveis de ácidos graxos livres circulantes diminuem, promovendo a captação de glicose no músculo. Além disso, outros mecanismos podem estar envolvidos na melhora da resistência à insulina (HARDMAN et al., 2001; DIPIRO, 2002). As glitazonas não têm efeito sobre a secreção de insulina, porém, o aumento da sensibilidade à insulina pode melhorar a função das células beta secundariamente à redução da glicotoxicidade e lipotoxicidade (STOLAR et al., 2008).

#### 1.2.2.5 Novas terapias

Dentre os novos fármacos em desenvolvimento estão os que estimulam a secreção de insulina como as incretinas GLP-1 e o polipeptídeo insulínico (GIP) e os inibidores da dipeptidil peptidase 4 (DPP-4), enzima que cliva o GLP-1, e agonistas do receptor de GLP-1 como o exenadina. Esses agentes aumentam a secreção de insulina, promovem a proliferação das ilhotas e suprimem a liberação de glucagon. Existem ainda, pesquisas envolvendo estratégias para reduzir a produção de glicose hepática como antagonistas do receptor de glucagon, inibidores da glicogênio fosforilase, glicose 6-fosfatase e frutose 1,6-bifosfatase e ativadores da glicoquinase objetivando a redução da gliconeogênese e glicogenólise e o aumento da glicólise e síntese de glicogênio hepáticas. Além disso, alternativas que alteram o metabolismo lipídico reduzindo os ácidos graxos livres circulantes também estão em estudo (MORRAL, 2003; VATS et al., 2005; FOWLER, 2007, 2008).

### 1.3 Plantas Medicinais

A busca de processos alternativos de tratamento do diabetes e de diversas outras doenças destaca uma área de grande importância – a exploração das plantas medicinais apoiada no conhecimento e uso popular. O estudo das propriedades biológicas, químicas, farmacológicas, clínicas e toxicológicas das plantas medicinais tornou-se um campo de importância estratégica no desenvolvimento de novos medicamentos. As plantas foram durante muito tempo a base da terapêutica e, atualmente, cerca de 25% dos fármacos utilizados são de origem vegetal e grande parte dos sintéticos têm os protótipos com origem nos princípios isolados de plantas medicinais (CECHINEL FILHO, 1998). Muitas dessas plantas são utilizadas pela população apesar dos compostos ativos nem sempre serem conhecidos (SIMÕES et al, 2003).

Muitas espécies de plantas são conhecidas na medicina popular de diferentes culturas pelas propriedades hipoglicemiantes e pelo uso crescente no tratamento do diabetes (ABDEL-BARRY et al., 1997). Entre as espécies de interesse medicinal no tratamento do diabetes, destaca-se a *Bauhinia forficata* (pata-de-vaca), espécie caracterizada pelo acúmulo de heterosídeos de flavonóides (DA SILVA; CECHINEL FILHO, 2002). Trabalhos demonstraram que a fração *n*-butanol, extraída das folhas da *B. forficata*, rica em flavonóides *O*-heterosídeos, promoveu a redução da glicemia após tratamento agudo em ratos diabéticos (SILVA et al. 2002). Posteriormente, desta fração foram isolados, purificados e identificados três canferóis, entre eles, o majoritário, canferol-3,7-*O*-( $\alpha$ )-*L*-diraminosídeo (canferitrina) (PIZZOLATTI et al., 2003). A curva de dose-resposta desse composto mostrou um efeito hipoglicemiante significativamente melhor do que o observado para a fração *n*-butanol. Além disso, o estudo do mecanismo de ação revelou o estímulo do acúmulo de glicogênio e da captação de glicose no músculo sóleo de ratos pela canferitrina, o que demonstra um potencial efeito insulino-mimético (DE SOUSA et al., 2004; JORGE et al., 2004; FOLADOR et al., 2005, 2006).

Empregada popularmente como antidiabética, a *Averrhoa carambola* teve seu perfil fitoquímico determinado por Aharo et. al (2005) que caracterizou a presença de flavonóides *C*-heterosídeos nas folhas da planta. Estudos posteriores demonstraram efeito hipoglicemiante do extrato bruto e das frações acetato de etila e *n*-butanol das folhas de *A. carambola* após tratamento por via oral em ratos hiperglicêmicos. Da fração acetato de etila, foram isolados dois flavonóides de núcleo apigenina que produziram redução da glicemia em ratos hiperglicêmicos potencialmente mais efetiva quando comparada às frações (CAZAROLLI et al., 2009b).

Além de plantas do gênero *Averrhoa*, outras espécies possuem como constituintes químicos os flavonóides C-heterosídeos, como a *Gentiana olivieri* (SEZIK et al., 2005) e a *Cecropia obtusifolia* (ANDRADE-CETTO; WIEDENFELD, 2001). Recentemente foi demonstrado que os extratos aquoso e metanólico e a fração acetato de etila das partes aéreas de *G. olivieri* reduziram a glicemia de ratos diabéticos e hiperglicêmicos. Os autores determinaram a correlação positiva entre a concentração de isoorientina – um flavonóide C-glicosídeo isolado da fração acetato de etila – e a atividade hipoglicemiante apresentada para os extratos e frações (SEZIK et al, 2005). Andrade-Cetto e Wiendenfeld (2001) relataram, ainda, o efeito hipoglicemiante dos extratos aquoso e butanólico das folhas de *C. obtusifolia* em ratos diabéticos confirmando o uso tradicional no tratamento do diabetes.

#### **1.4 *Wilbrandia ebracteata***

O gênero *Wilbrandia* é composto por espécies tropicais e subtropicais, próprias da América do Sul, cuja área de dispersão se estende do Rio Grande do Sul até o Espírito Santo. *Wilbrandia ebracteata* Cogn. (Figura 5) é uma espécie da família Cucurbitaceae que habita a região sul do Brasil (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná), leste do Paraguai e nordeste da Argentina (região das Missões). Conhecida popularmente como taiuiá, as raízes de *Wilbrandia ebracteata* foram empregadas historicamente na medicina popular para o tratamento da sífilis e da lepra. Atualmente, seu uso popular se restringe ao tratamento de doenças reumáticas, lesões gástricas e lesões da pele (HOEHNE, 1920, 1939; CROVETTO, 1960; PORTO, 1974; PIO CORRÊA, 1984; PEREIRA et al., 1992).

Duas classes de substâncias encontradas em grande quantidade nas frações de *Wilbrandia ebracteata* são as cucurbitacinas e os flavonóides. Cucurbitacinas são triterpenos que conferem sabor amargo às plantas da família Cucurbitaceae, geralmente provenientes da fração diclorometano das raízes de *W. ebracteata* (SIMÕES et al., 2003; SCHENKEL et al., 1992; FARIAS et al., 1986, 1993). Os flavonóides serão discutidos na sessão 1.5, sendo isolados e identificados da fração *n*-butanol e acetato de etila das raízes (SANTOS et al., 1996) ou das folhas de *W. ebracteata* (COELHO et al., 2008), estando entre os majoritários os flavonóides C-glicosídeos.



**Figura 5:** Exemplar da espécie *Wilbrandia ebracteata* Cogn.  
Fonte: GAZOLA, 2008

O isolamento e a identificação de flavonóides *C*-glicosídeos a partir da fração *n*-butanol das raízes de *W. ebracteata* foram descritos por Dos Santos et al., 1996, que verificaram a presença de spinosina, swertisina, isoswertisina, vitexina, isovitexina, vicenina-2, orientina e isoorientina, cujas estruturas são apresentadas no Quadro 2. Sobre a composição das folhas de *W. ebracteata*, Coelho (2008) descreveu o isolamento de sete flavonóides, dos quais quatro deles são *C*-glicosídeos que também ocorrem nas raízes da espécie (vitexina, isovitexina, orientina e isoorientina).

**Quadro 2:** Estrutura dos compostos isolados da fração *n*-butanol das raízes da *W. ebracteata*

	<b>R</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>	<b>R<sub>4</sub></b>
Spinosina	—OCH <sub>3</sub>	—Glicose-O-Glicose	—H	—H	—OH
Swertisina	—OCH <sub>3</sub>	—Glicose	—H	—H	—OH
Isoswertisina	—OCH <sub>3</sub>	—H	—Glicose	—H	—OH
Vitexina	—OH	—H	—Glicose	—H	—OH
Isovitexina	—OH	—Glicose	—H	—H	—OH
Vicenina-2	—OH	—Glicose	—Glicose	—H	—OH
Orientina	—OH	—H	—Glicose	—OH	—OH
Isoorientina	—OH	—Glicose	—H	—OH	—OH

Fonte: Adaptado de GAZOLA, 2008.

Alguns estudos *in vivo* e *in vitro* comprovaram atividades antiinflamatória, analgésica, antiulcerogênica e antiviral das raízes de *W. ebracteata*. Pereira e colaboradores (1992) verificaram a atividade antiinflamatória e antinociceptiva após a administração, por via oral, do extrato aquoso de *W. ebracteata* em camundongos. Posteriormente, trabalhos realizados por Peters e colaboradores (1997, 1999) demonstraram o efeito analgésico, bem como a atividade antiinflamatória, por via oral e intraperitoneal, da fração diclorometano e de cucurbitacinas isoladas das raízes de *W. ebracteata* em modelo animal de pleurisia. O estudo do mecanismo de ação antiinflamatória e antinociceptiva revelou ação sobre a liberação de óxido nítrico e de eucosanóides provenientes da atividade da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) pela fração diclorometano (PETERS et al., 2003) e pela dihidrocucurbitacina B isolada dessa fração (SIQUEIRA et al., 2007).

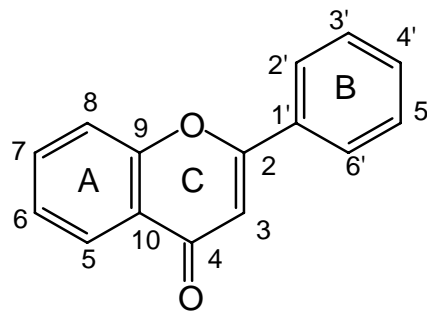
Além das atividades antiinflamatória e analgésica, foi avaliada a atividade antiviral das frações acetato de etila e *n*-butanol das raízes de *W. ebracteata*. Ambas as frações inibiram o efeito citopático viral para o vírus herpes simples tipo 1 (HSV-1) embora não tenha sido constatada atividade para o poliovírus tipo 2 (ANDRIGHETTI-FRÖHNER et al., 2005). Adicionalmente, estudos realizados com espécimes de *W. ebracteata* coletadas no estado do Paraná demonstraram atividade antioxidante *in vitro* do extrato aquoso das raízes da planta (MENEZES et al., 2004).

Com material proveniente das folhas de *W. ebracteata* foram determinadas atividades analgésica e antiulcerogênica *in vivo* e *in vitro*. Gonzalez e Di Stasi (2002) demonstraram a redução das lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos após administração por via oral da fração hidrometanólica, rica em flavonóides (GONZALEZ; STASI, 2002). Mais recentemente, outro estudo realizado pelo mesmo grupo de pesquisadores determinou um potente efeito antiulcerogênico da fração acetato de etila das folhas de *W. ebracteata*. Os flavonóides *C*-glicosídeos isolados dessa fração apresentaram ainda atividade antioxidante *in vitro* (COELHO et al., 2008).

Em relação à toxicidade, Pereira e colaboradores (1996) realizaram a análise de diferentes extratos e frações de *Wilbrandia ebracteata* e observaram ausência de indução mutagênica em cultura celular. Os extratos e frações ricas em flavonóides *C*-glicosídeos (extratos metanólico e aquoso e frações acetato de etila e *n*-butanol) também não apresentaram sinais de citotoxicidade significativos (PEREIRA et al., 1996). Siqueira e colaboradores (2009) demonstraram ainda que a dihidrocucurbitacina B, isolada da fração diclorometano da *W. ebracteata*, apresentou atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*, atuando sobre a redução da proliferação celular.

## 1.5 Flavonóides

Os flavonóides constituem uma importante classe de polifenóis de ocorrência natural, encontrados em raízes, frutas, caule, folhas, sementes e cascas de diversas plantas. Estruturalmente, possuem um núcleo fundamental com 15 átomos de carbono, formado por dois anéis aromáticos ligados entre si por uma cadeia de três átomos de carbono (C6-C3-C6). A Figura 6 mostra o núcleo fundamental dos flavonóides e a numeração dos átomos de carbono com a denominação de cada anel (SIMÕES et al., 2003; CAZAROLLI et al., 2008b).



**Figura 6:** Fórmula estrutural básica dos flavonóides.

O estado oxidativo do anel C determina as diferentes classes de flavonóides, incluindo as flavanas, flavonas, flavononas, flavanonols, flavonóis, catequinas, antocianidinas e isoflavonas. Além disso, os flavonóides podem ser encontrados na forma livre (aglicona) ou como derivados metilados, acetilados, sulfatados e, principalmente, glicosilados. Os flavonóides *O*-glicosídeos são aqueles cuja glicosilação do grupo hidroxil ocorre através de uma ligação hemiacetal. Flavonóides *C*-glicosídeos diferenciam dos demais flavonóides por apresentar a ligação açúcar-genina diretamente a um carbono do núcleo aglicônico a qual se dá principalmente entre o carbono C-1 (anomérico) do açúcar e os carbonos 6 e/ou 8 do anel A do flavonóide. (CHOPIN; BOUILLANT, 1975; SIMÕES et al., 2003; CAZAROLLI et al., 2008b).

Os animais obtêm bioflavonóides através da dieta, já que não possuem a capacidade de sintetizá-los (HARBORNE; WILLIAMS, 2000). Os flavonóides podem ser absorvidos tanto pelo estômago como pelo intestino. A porção açúcar é um fator importante na eficiência da absorção, aumentando a hidrofiliabilidade da molécula e reduzindo a possibilidade de transporte passivo pelas membranas. Trabalhos mostram que alguns heterosídeos de flavonóides podem ser absorvidos intactos no intestino através do transporte de glicose dependente de sódio (SGLT-1) (HOLLMAN et al., 1995; CHANG et al., 2005; GEE et al., 2000). Antes de serem



absorvidos, os flavonóides são clivados por enzimas específicas, como a lactase florizina hidrolase (LPH) que catalisa a hidrólise no lúmen, e as glicosidases citosólicas que atuam de acordo com a posição e estrutura do açúcar (CAZAROLLI et al., 2008a).

Há grande interesse nas aplicações terapêuticas de flavonóides para o tratamento e prevenção de doenças, sendo que uma variedade de propriedades biológicas já foi relatada, incluindo a capacidade antioxidante, antiinflamatória, antitumoral, antiviral e antibacteriana, assim como efeito citoprotetor direto sobre o sistema vascular, pâncreas e fígado (CAZAROLLI et al., 2008b). Além disso, muitos estudos já comprovaram a ação anti-hiperglicêmica dos flavonóides através da investigação dos mais diversos mecanismos de ação (SHISHEVA; SHECHTER, 1992; ONG; KHOO, 2000; DA SILVA; CECHINEL FILHO, 2002; SILVA et al., 2002; DE SOUSA et al., 2004; ZANATTA et al., 2007, 2008).

Com relação aos flavonóides C-glicosídeos, além da atividade hipoglicemiante, trabalhos demonstraram propriedades antioxidantes e antiinflamatórias, as quais estão diretamente relacionadas com o diabetes e suas complicações (ANDRADE-CETTO; WIEDENFEL, 2001; KUPELLI et al., 2004;; HASEGAWA et al., 2008; SHIBANO et al., 2008).

A atividade hipoglicemiante da isoorientina, um C-glicosídeo isolado das folhas de *Cecropia obtusifolia*, foi descrita por Andrade-Cetto (2001) em ratos diabéticos induzidos com estreptozotocina após uma hora da administração do composto por via oral. A isoorientina apresentou um efeito hipoglicemiante significativamente melhor e mais potente (na dose de 15 mg/kg) do que o observado para os extratos da planta e para a glibenclamida. Adicionalmente, Sezik et al. (2005) demonstraram a redução da glicemia de animais diabéticos e hiperglicêmicos após administração por via oral da isoorientina.

Diversos trabalhos demonstraram a atividade antioxidante *in vivo* e *in vitro* da isoorientina (BUDZIANOWSKI et al., 1991; DELIORMAN ORRHAN et al., 2003; COELHO et al., 2008; SHIBANO et al., 2008). A administração subaguda da isoorientina, isolada da fração acetato de etila das inflorescências da *Gentiana olivieri*, promoveu significativo efeito hepatoprotetor em modelo animal de hepatotoxicidade (DELIORMAN ORRHAN et al., 2003). Shibano e colaboradores (2008) demonstraram atividade antioxidante *in vitro* da isoorientina e da orientina. Além disso, a vitexina e a swertisina, outras C-glicosilflavonas isolada das flores de *Commelina communis*, promoveram também potente efeito inibidor na atividade da  $\alpha$ -glicosidase, enzima que cliva os dissacarídeos nos enterócitos.

## 1.6 Justificativa

O diabetes melito é um dos mais importantes problemas de saúde mundial e afeta cerca de 246 milhões de pessoas em todo o mundo. No Brasil, de acordo com o Vigitel 2007 (Sistema de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas Não Transmissíveis), a ocorrência média de diabetes na população adulta é de 5,2%, o que representa mais de 6 milhões de pessoas que confirmaram ser portadoras da doença. A prevalência aumenta com a idade, atingindo 18, 6% da população com idade superior a 65 anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Estima-se ainda, que a prevalência mundial chegará a 4,4% da população até o ano de 2030 (cerca de 366 milhões de indivíduos), sendo que no Brasil haverá 11 milhões de indivíduos diabéticos (WILD et al., 2004; WHO, 2006).

O Ministério da Saúde (MS) fornece os medicamentos essenciais para o controle da doença, além das agulhas e seringas para aplicação de insulina e glicosímetros e fitas reagentes para medida da glicemia. Além disso, o gasto com hospitalizações atribuíveis ao diabetes é expressivo (2,2% no orçamento executado pelo MS); porém, é difícil avaliar o custo total da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009; ROSA; SCHMIDT, 2008)

Como estratégias de prevenção, incluem-se a educação e modificações do estilo de vida da população. Constata-se ainda, que diversos segmentos da população utilizam plantas medicinais como adjuvantes ao tratamento de diversas doenças, prática incentivada pela OMS, e adotada por mais de 80% da população (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 2002).

Baseado nos estudos sobre as ações antioxidante e antiinflamatória de *Wilbrandia ebracteata*, as quais estão diretamente relacionadas com o diabetes e suas complicações, o presente trabalho está centrado na avaliação da atividade hipoglicemiante de preparações ricas em flavonóides C-glicosídeos a partir das raízes de *W. ebracteata*. Não existem estudos acerca da atividade hipoglicemiante dessa espécie nem relatos de uso popular da planta como antidiabética. Entretanto, a alta concentração de flavonóides C-glicosídeos isolados de frações de *W. ebracteata* e o potencial hipoglicemiante desses compostos demonstrado em outros estudos justificam o estudo do efeito de *Wilbrandia ebracteata* em animais hiperglicêmicos e diabéticos.

Nesse contexto, considerando as características epidemiológicas, os custos envolvidos no controle do diabetes e o aproveitamento do potencial terapêutico da flora nativa da região Sul do Brasil, o estudo da ação e mecanismo de ação hipoglicemiante de *W. ebracteata* pode constituir um meio eficaz para o desenvolvimento de um novo medicamento para o tratamento do diabetes e para a melhoria da qualidade de vida desses pacientes.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Caracterizar a ação e o mecanismo de ação anti-hiperglicêmica de extratos, frações, subfrações e compostos provenientes das raízes de *Wilbrandia ebracteata*.

### 2.2 Objetivos específicos

Determinar o efeito dos extratos, frações, subfrações e dos flavonóides C-glicosídeos isolados das raízes da *W. ebracteata*, swertisina e isovitexina, na curva de tolerância à glicose oral em ratos normais hiperglicêmicos;

Determinar o efeito da fração *n*-butanol das raízes de *W. ebracteata* na glicemia de ratos diabéticos;

Determinar a concentração plasmática de insulina após tratamento por via oral com as preparações de *W. ebracteata* que apresentaram atividade hipoglicemiante em ratos normais hiperglicêmicos;

Quantificar o glicogênio muscular após tratamento por via oral com as preparações de *W. ebracteata* que apresentaram atividade hipoglicemiante em ratos normais hiperglicêmicos;

Estudar a ação e o mecanismo de ação *in vitro* dos compostos isolados das raízes de *W. ebracteata*, swertisina e isovitexina, na captação de <sup>14</sup>C-Deóxi-glicose no músculo sóleo de ratos normais.

Comparar o efeito de diferentes extratos, frações, subfrações e dos flavonóides C-glicosídeos isolados das raízes *W. ebracteata* com o efeito da insulina e de hipoglicemiantes orais clinicamente utilizados, nos diferentes protocolos experimentais estudados.

**3. ARTIGO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO – “*JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACOLOGY*”**

**Antihyperglycemic effect of *Wilbrandia ebracteata* roots in rats**

Poliane Folador<sup>a</sup>, Luisa Helena Cazarolli<sup>a</sup>, Andressa Córneo Gazola<sup>b</sup>, Flávio Henrique Reginatto<sup>b</sup>, Eloir Paulo Schenkel<sup>b</sup>, Fátima Regina Mena Barreto Silva<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>*Departamento de Bioquímica - Centro de Ciências Biológicas;* <sup>b</sup>*Departamento de Ciências Farmacêuticas - Centro de Ciências da Saúde, Campus Universitário, Bairro Trindade*  
*Cx. Postal 5069, CEP: 88040-970 - Florianópolis, SC, Brazil.*

\*Corresponding author: Dr. Fátima Regina Mena Barreto Silva. Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, UFSC. Campus Universitário, Bairro Trindade, Cx Postal 5069, CEP: 88040-970 - Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. e-mail: mena@mbox1.ufsc.br, Tel/Fax: +55-48.3721.96.72

## Abstract

*Wilbrandia ebracteata* belongs to the Cucurbitaceae family and is popularly known as “taiuíá”. From the roots and leaves of “taiuíá” cucurbitacines and C-glycosylflavones were isolated. The aim of this study was to investigate the antihyperglycemic effect and mechanism of action of extracts, fractions, subfractions and isolated compounds from *W. ebracteata* roots in normal hyperglycemic and diabetic rats. Male Wistar rats, 50-55 days old, were used. Fasted rats were deprived of food for 16 h before treatment. To study the glycemia and serum insulin levels, *W. ebracteata* preparations were administrated in different doses per oral route in normal hyperglycemic rats and blood samples were collected just prior to and at 15, 30, 60 and 180 min after treatment. Glycogen content from muscle was determined at 180 min. The glycemia in diabetic rats was determined at 0, 1, 2 and 3 h after administration. The glucose uptake was studied in the soleus muscle in the absence or presence of C-glycosylflavones and/or insulin. Oral administration of the crude extract (400 and 800 mg/kg) reduced the glycemia at 15-60 min and increased serum insulin levels in normal hyperglycemic rats. An increase in glycogen content was also observed. A more potent effect was observed after treatment with the *n*-butanol fraction (50 mg/kg) at 15 and 30 min. A similar effect was observed after treatment with the methanol subfraction. On the other hand, the antihyperglycemic effect of the *n*-butanol fraction was not observed in diabetic rats. The C-glycosylflavones isovitexin and swertisin (15 mg/kg) showed a more potent antihyperglycemic action when compared with the extracts and fractions and did not stimulate muscle glucose uptake in normal rats. These results indicate that the extracts, fractions, subfractions and isolated C-glycosylflavones from *W. ebracteata* roots have antihyperglycemic action probably due to stimulation of insulin secretion from the pancreas.

**Keywords:** Glycemia, *Wilbrandia ebracteata*, Flavonoids, Isovitexin, Swertisin, Insulin.

## 1. Introduction

*Wilbrandia ebracteata* Cogn. (WE) belongs to the Cucurbitaceae family and is popularly known as “taiuíá” in Brazil. The roots of “taiuíá” have been used in traditional medicine as laxatives and against leprosy, ulcers, rheumatism, and syphilis [1, 2]. Pharmacological studies have shown that the roots and leaves of WE produce anti-inflammatory, analgesic, anti-ulcerogenic and antitumor effects [3-6]. These effects have been attributed to the cucurbitacines derived from the dichloromethane fraction of WE [7, 8]. Dos Santos et al. [9] demonstrated that the *n*-butanol fraction of *W. ebracteata* roots constitutes a rich source of C-glycosylflavonoids. The major C-glycosylflavonoids obtained from WE are swertisin, isoswertisin, vitexin, isovitexin, spinosin, orientin and isoorientin. Some of these flavonoids have been found to have antioxidant activity and an inhibitory effect on  $\alpha$ -glucosidase which are both closely related to diabetes and its complications [10-13].

Many plants used in folk medicine to treat diabetes have been found to contain C-glycosylflavones showing potentially important anti-hyperglycemic action, in different *in vivo* and *in vitro* assays, including reduction of serum glucose levels, stimulation of insulin secretion, regulation of enzyme activity in carbohydrate metabolism, stimulation of glucose uptake and glycogen storage in peripheral tissues [14-18].

Glucose homeostasis is maintained by the balance of liver glucose production and glucose utilization by peripheral tissues. In mammals, glucose is stored as glycogen in the liver and muscle, which are the major sites of glycogen synthesis and storage. Glucose metabolism is regulated by several hormones but only insulin possesses hypoglycemic properties [19, 20]. Insulin is secreted into the blood stream by  $\beta$ -cells of the endocrine pancreas and glucose is the main insulin secretagogue. An absolute or relative lack of insulin, as in the case of diabetes, leads to severe dysfunction in the major insulin target organs, i.e., muscle, liver and adipose tissue [20, 21].

Administration of insulin is the main treatment for diabetes mellitus and insulin-resistance. Also, sulphonylureas are oral hypoglycemic agents that act by triggering insulin release from  $\beta$ -cells. A specific site on the ATP-sensitive potassium channels is occupied by sulphonylureas leading to closure of these channels and subsequent opening of calcium channels, promoting exocytose of insulin [22]. Glipizide is a second generation sulphonylurea, characterized by rapid pharmacological action, as well as its safe use for long-term treatment [23].

Based on the potential anti-hyperglycemic effect reported for flavonoids C-glycosylflavones, this study was carried out to investigate the acute effect of the crude extract,

fractions and isolated compounds from *W. ebracteata* on serum glucose levels, muscle glycogen content and  $^{14}\text{C}$ -glucose uptake in soleus muscle in normal and diabetic rats.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Materials

Alloxan monohydrate was purchased from Sigma Chemical Company<sup>®</sup> (St. Louis, MO, USA). Glipizide was purchased from Acros Organics<sup>®</sup> (Germany). Crystalline human insulin (100 IU/mL; batch 20030H; Biohulin – Biobrás S.A, Montes Claros, MG, Brazil) was purchased from a commercial source. All reagents were of analytical grade. [ $^{14}\text{C}$ ]-2-deoxy-d-glucose ([ $^{14}\text{C}$ ]-DG), specific activity 10.6 GBq/mmol, and biodegradable liquid scintillation were obtained from Perkin Elmer Life and Analytical Sciences (Boston, MA).

### 2.2. Plant material

Roots of *Wilbrandia ebracteata* Cogn. (WE) were collected in Nova Petrópolis, State of Rio Grande do Sul, Brazil. The plant material was identified by Sérgio Bordignon (Department of Botany, Federal University of Rio Grande do Sul). Voucher specimens were deposited in the Herbarium (number ICN 95292) at the Federal University of Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Brazil).

### 2.3. Extraction and isolation

Roots of WE were extracted by infusion (90 °C - plant: solvent, 1:5, w/v - 30 min) and by maceration in methanol (MeOH) (plant:solvent, 1:5, w/v - 5 days). The aqueous extract was then filtered and freeze-dried yielding the aqueous crude extract (AE). The methanol extract was separated into two fractions of 250 ml. One fraction was evaporated to dryness under reduced pressure to give the crude methanol extract (MeE). The methanol content of the second fraction was removed under reduced pressure, the residue was suspended in H<sub>2</sub>O (500 mL) and extracted successively (4 x 100 mL) with petrol ether, chloroform, ethyl acetate and *n*-butanol. Evaporation of the *n*-butanol fraction (BuOH) yielded the crude flavonoid extract (36.6 g). A part of this fraction (5 g) was submitted to successive separations using flash column chromatography (silica gel 60G for TLC; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH and ethyl acetate:MeOH, gradient mixtures with increasing polarity) and silica gel column, (AcOEt:acetic acid:H<sub>2</sub>O; 8:1:1,2, v/v/v) resulting in the pure compounds swertisin (130 mg) and isovitexin (140 mg). Another part of the BuOH fraction (5 g) was suspended in 500 mL of water and stirred with 50 g of Amberlite<sup>®</sup> XAD-16 for 1 hour. The mixture was then filtered and the aqueous

solution freeze-dried yielding the aqueous fraction (AF). Thereafter, the Amberlite<sup>®</sup> XAD-16 was washed with 500 mL of MeOH (resin:solvent, 1:10, w/v) for 1 hour. This MeOH solution was then filtered and the solvent removed under reduce pressure yielding the MeOH fraction (MEF).

#### 2.4. *Experimental animals*

Male albino Wistar rats (180-210 g) were used. These were bred in our animal facility and housed in an air-conditioned room (approximately 21°C) with controlled lighting (lights on from 06:00 to 18:00 h). The animals were maintained with pelleted food (Nuvital, Nuvilab CR1, Curitiba, PR, Brazil), while tap water was available *ad libitum*. Fasted animals were deprived of food for 16 h but allowed free access to water. For all oral treatments, 0.4 mL of each respective substance was given by gavage [24]. All the animals were carefully monitored and maintained in accordance with ethical recommendations of the Brazilian Veterinary-Medicine Council and the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA). This study was approved by the Committee for Ethics in Animal Research of UFSC (Protocol CEUA PP0023).

#### 2.5. *Determination of the serum glucose level*

Blood samples from the tail vein were collected, centrifuged and the serum was used to determine the glycemia by the glucose oxidase method. For diabetic rats, a serum glucose range of 350-500 mg/dL was used for the experiments [24, 25].

#### 2.6. *Study of effects of insulin and glipizide on the serum glucose level in the oral glucose tolerance curve*

Fasted rats were divided in groups of six rats: Euglycemic, normal fasted rats that received H<sub>2</sub>O, p.o.; Hyperglycemic, rats that received glucose, p.o. (4 g/kg; 8.9 M); Insulin, hyperglycemic rats that received glucose plus lispro insulin (0.05 IU) by i.p. route; and Glipizide, hyperglycemic rats that received glipizide (10 mg/kg), p.o. Blood samples were collected just prior to and at 15, 30, 60 and 180 min after the glucose loading and the serum glucose levels were measured [26].

#### 2.7. *Study of the effects of crude extract, fractions, sub-fractions or isolated compounds from WE on the serum glucose level in the oral glucose tolerance curve*

Fasted rats were divided into different groups of six animals for each treatment: Crude extract, hyperglycemic rats that received MeE or AE (200, 400 and 800 mg/kg); *n*-Butanol



fraction, hyperglycemic rats that received BuOH (25, 50, 100 and 200 mg/kg); Sub-fractions, hyperglycemic rats that received MEF or AF (25 and 50 mg/kg); Isolated compounds, hyperglycemic rats that received isovitexin or swertisin (15 mg/kg). All treatments were carried out p.o. Blood samples were collected just prior to and at 15, 30, 60 and 180 min after the glucose loading and the serum glucose levels were measured [26].

### *2.8. Insulin serum measurements*

Serum insulin concentrations were determined in hyperglycemic rats untreated and treated with MeE (400 mg/kg), BuOH (50 mg/kg), isovitexin (15 mg/kg), swertisin (15 mg/kg) and glipizide (10 mg/kg). Blood samples were collected at 15, 30, and 60 min after treatments. The insulin levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to the manufacturer's instructions. The range of values detected by this assay was: 0.2 ng/mL to 10 ng/mL. The intra- and inter-assay coefficients of variation (CV) for insulin were 3.22 and 6.95, respectively, with a sensitivity of 0.2 ng/mL. All insulin levels were estimated by means of colorimetric measurements at 450 nm with an ELISA plate reader (Organon Teknika, Roseland, NJ, USA) by interpolation from a standard curve. Samples were analyzed in duplicate and results were expressed as ng of insulin serum mL<sup>-1</sup> [27].

### *2.9. Glycogen content measurements*

Soleus muscles were harvested from hyperglycemic rats untreated and treated with MeE (400 mg/kg), BuOH (50 mg/kg), isovitexin (15 mg/kg), swertisin (15 mg/kg), glipizide (10 mg/kg) or regular insulin (0.05 IU; 3.5 nM) and used for the assay of glycogen content immediately after 3 h of treatment. Glycogen was isolated from these tissues as described by Krisman [28], with minor modifications [29]. The tissues were weighed, homogenized in 33% KOH and boiled at 100 °C for 20 min, with occasional stirring. After cooling, 96% ethanol was added to the samples and heated to boiling followed by cooling in an ice bath to aid the precipitation of glycogen. The homogenates were centrifuged at 1,300 g for 15 min, the supernatant was discarded and the pellets were neutralized with saturated NH<sub>4</sub>Cl before being heated to 100 °C for 5 min, washed and resolubilized in water. Glycogen content was determined by treatment with iodine reagent and the absorbance was measured at 460 nm. The results are expressed as mg of glycogen/ g of tissue.

### *2.10. Study of the effects of insulin and BuOH from WE on the serum glucose level in diabetic rats*

Rats fasted for 16 h received 50 mg/kg body weight of alloxan by a single intravenous injection. The diabetic state was assessed by measuring body weight and serum glucose levels 3 days later and a serum glucose range of 350-500 mg/dL was used for the experiment. Diabetic rats in the treated group were divided into different groups. Rats that received insulin 0.05 IU i.p.; and rats that received BuOH (50, 100 and 400 mg/kg), p.o. Blood samples were collected just prior to and at 60, 120 and 180 min after treatment.

### 2.11. Studies on $^{14}\text{C}$ -glucose uptake in rat soleus muscle

For the  $^{14}\text{C}$ -DG uptake experiments, soleus muscles from euglycemic rats were used. Slices of soleus muscle were distributed (alternately left and right) between control and treated groups. The muscles were dissected, weighed, and pre-incubated and incubated at 37 °C in Krebs Ringer-bicarbonate (KRb) buffer with a composition of 122 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1.3 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , and 25 mM  $\text{NaHCO}_3$  and bubbled with  $\text{O}_2/\text{CO}_2$  (95%:5%, v/v) up to pH 7.4. Isovitexin and swertisin (0.01, 0.1, 1, 10 and 100  $\mu\text{M}$ ) and insulin (1 IU; 10 nM) were added to the pre-incubation (30 min) and incubation medium (60 min). The  $^{14}\text{C}$ -DG (0.1  $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ ) was added to each sample during the incubation period. After incubation, the muscles were transferred to screw-cap tubes containing 1 mL of distilled water. These were frozen at -20 °C in a freezer and boiled afterward for 10 min; 25  $\mu\text{L}$  aliquots of tissue and external medium were placed in liquid scintillation in a LKB rack, beta liquid scintillation spectrometer (model 1215; EG and G-Wallac, Turku, Finland), for the radioactivity measurements. The results were expressed as the tissue/medium (T/M) ratio: cpm/mL tissue fluid per cpm/mL incubation medium [24].

### 2.12. Data and statistical analysis

Data were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. One and two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni *post-test* or unpaired Student's *t*-test were used to determine whether there were significant differences between groups. Differences were considered to be significant at  $p \leq 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Insulin and glipizide effects on the serum glucose level in the oral glucose tolerance curve

The euglycemic control group showed an unchanged profile of glycemia over the period studied. As expected, after starting the glucose tolerance test the serum glucose concentration was significantly increased when compared with zero time. Also, the classical hypoglycemic effect of insulin was observed over the period studied when compared to the hyperglycemic group. The oral hypoglycemic agent, glipizide (10 mg/kg), produced a typical serum glucose lowering from 15 to 180 min, compared to the hyperglycemic group (Table 1).

**Table 1.** Acute effect of insulin and glipizide on serum glucose levels (mg/dL) in oral glucose tolerance curve.

Time (min)	Euglycemic	Hyper Glucose (4g/kg)	Hyper + Lispro Insulin (0.05 IU)	Hyper + Glipizide (10 mg/kg)
0	111.76 ± 2.8	109.67 ± 3.03	113.06 ± 2.62	103.61 ± 2.26
15	114.73 ± 6.8	185.53 ± 4.63#	147.22 ± 2.09***	160.71 ± 3.74**
30	125.53 ± 3.8	194.15 ± 6.16#	151.68 ± 4.26***	148.41 ± 6.64***
60	128.25 ± 3.8	165.98 ± 2.95#	126.22 ± 4.23***	121.96 ± 4.29***
180	120.12 ± 7.0	134.60 ± 4.86	126.04 ± 2.68	116.32 ± 5.46*

Values are expressed as mean ± S.E.M; n = 6 in duplicate for each treatment. Statistically significant difference compared to the corresponding zero time value; # $p \leq 0.0001$ . Statistically significant difference compared to the corresponding hyperglycemic group; \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$ .

### 3.2. Effect of crude extract, fractions, sub-fractions or isolated compounds from WE on the serum glucose level in the oral glucose tolerance curve

MeE at 400 mg/kg was effective in reducing glycemia at 15, 30 and 60 min after oral treatment when compared with the respective hyperglycemic control group. However, 800 mg/kg of this extract was able to reduce glycemia after only 15 min while no effect was observed at 200 mg/kg (data not shown). Similarly, a significant antihyperglycemic effect was also observed when hyperglycemic rats were treated with 400 and 800 mg/kg of aqueous crude extract (Table 2).

**Table 2.** Acute effect of different doses of crude extracts – **MeE** and **AE** of WE on serum glucose levels (mg/dL) in oral glucose tolerance curve.

Time (min)	Hyper	Hyper + WE crude extracts			
	Glucose	MeE	MeE	AE	AE
	4 g/kg	400 mg/kg	800 mg/kg	400 mg/kg	800 mg/kg
0	109.7 ± 3.03	110.6 ± 3.75	106.5 ± 4.47	111.1 ± 3.97	107.9 ± 4.96
15	185.5 ± 4.63	160.3 ± 3.78**	149.8 ± 8.37**	152.3 ± 5.56**	165.4 ± 8.51*
30	194.2 ± 6.16	172.5 ± 3.84*	200.7 ± 16.8	167.1 ± 6.80*	172.5 ± 5.59*
60	165.9 ± 2.95	152.1 ± 3.49*	179.8 ± 12.7	152.6 ± 4.24*	161.4 ± 3.78
180	134.6 ± 4.86	139.9 ± 3.77	147.4 ± 5.69	147.4 ± 5.69	128.4 ± 8.14

Values are expressed as mean ± S.E.M; n = 6 in duplicate for each treatment. Statistically significant difference compared to the corresponding hyperglycemic group. \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ .

Table 3 shows the effect of the BuOH on the oral glucose tolerance curve. The oral treatment of hyperglycemic rats with 25 mg/kg of this fraction produced a significant antihyperglycemic effect at 15 min. In addition, the serum glucose lowering was maintained with 50 and 200 mg/kg from 15 to 30 min. Also, the dose of 100 mg/kg (data not shown) was able to reduce glycemia at 15 and 30 min. In view of the effectiveness of 50 mg/kg of BuOH on serum glucose lowering, this dose was chosen to further experiments.

In order to evaluate flavonoid-enriched fractions, the effects of MEF and AF at 25 and 50 mg/kg were studied using the oral glucose tolerance curve for hyperglycemic rats (Table 4). Although both doses of MEF showed an antihyperglycemic effect (at 15 min or 15 and 30 min, respectively) with AF treatment, neither 25 mg/kg (data not shown) nor 50 mg/kg doses were able to reduce glycemia. These results indicate that compounds with biological activity are present in MEF.

**Table 3.** Acute effect of different doses of **BuOH** of WE on serum glucose levels (mg/dL) in oral glucose tolerance curve.

Time (min)	Hyper Glucose 4 g/kg	Hyper + BuOH fraction of WE		
		BuOH	BuOH	BuOH
		25 mg/kg	50 mg/kg	200 mg/kg
0	109.7 ± 3.03	105.1 ± 3.9	112.5 ± 2.15	108.5 ± 2.78
15	185.5 ± 4.63	154.1 ± 4.86***	146.4 ± 7.24***	140.5 ± 8.94***
30	194.2 ± 6.16	184.4 ± 8.99	157.0 ± 5.73**	169.8 ± 8.80*
60	165.9 ± 2.95	173.6 ± 9.92	163.4 ± 9.56	157.3 ± 11.5
180	134.6 ± 4.86	126.6 ± 15.5	115.8 ± 4.19	128.8 ± 7.64

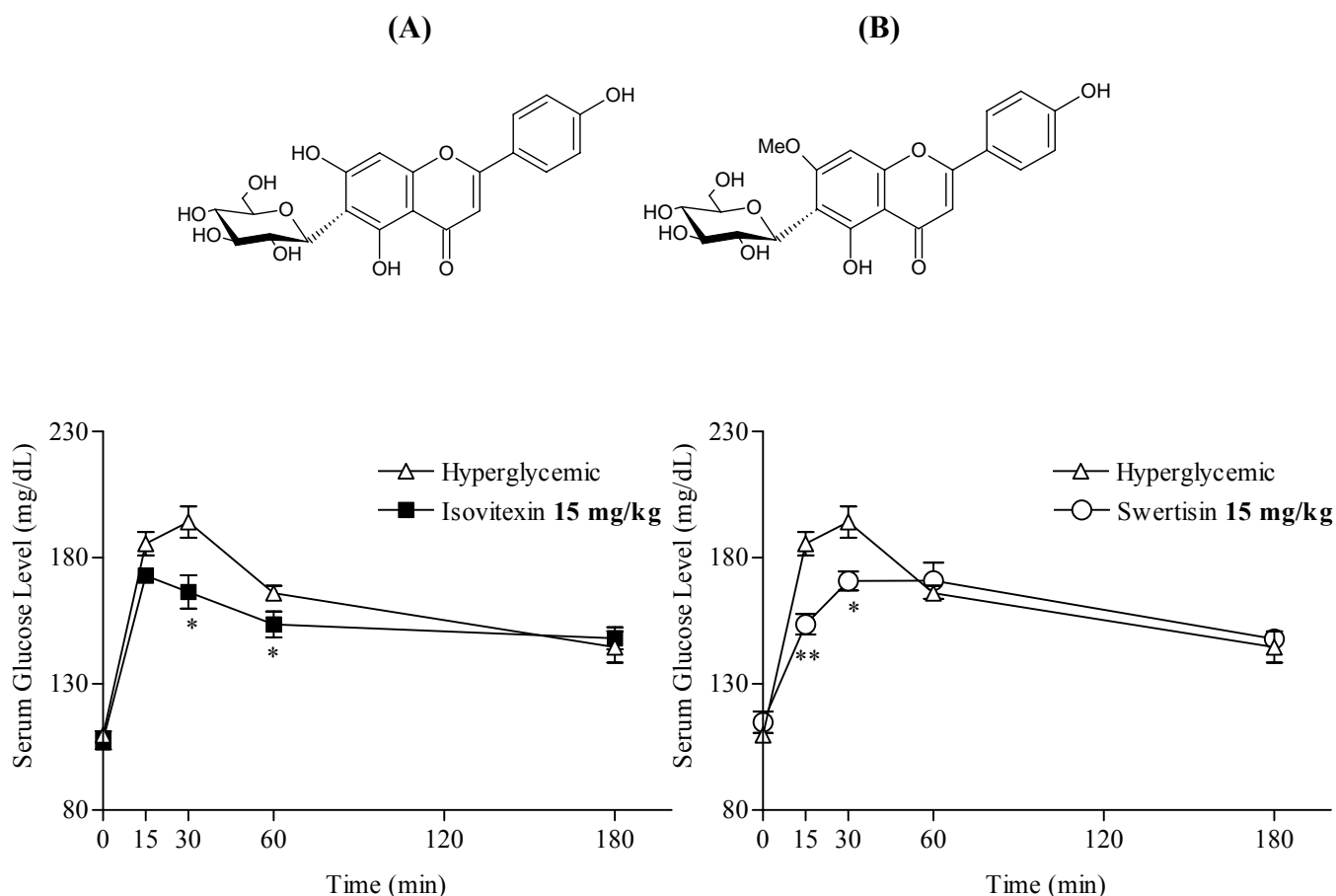
Values are expressed as mean ± S.E.M; n = 6 in duplicate for each treatment. Statistically significant difference compared to the corresponding hyperglycemic group. \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$ .

**Table 4.** Acute effect of different doses of subfractions **MEF** and **AF** from WE on serum glucose levels (mg/dL) in oral glucose tolerance curve.

Time (min)	Hyper Glucose 4 g/kg	Hyper + WE subfractions (MEF and AF)		
		MEF	MEF	AF
		25 mg/kg	50 mg/kg	50 mg/kg
0	109.7 ± 3.03	99.49 ± 2.43	97.66 ± 6.29	99.58 ± 2.53
15	185.5 ± 4.63	135.8 ± 8.14***	153.0 ± 7.64***	170.0 ± 15.2
30	194.2 ± 6.16	193.9 ± 16.8	170.6 ± 1.26*	195.9 ± 11.6
60	165.9 ± 2.95	169.9 ± 14.7	173.5 ± 12.4	200.0 ± 10.2
180	134.6 ± 4.86	158.2 ± 14.3	133.56 ± 5.85	142.2 ± 4.15

Values are expressed as mean ± S.E.M; n = 6 in duplicate for each treatment. Statistically significant difference compared to the corresponding hyperglycemic group. \* $p \leq 0.05$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$ .

Figures 1A and 1B show the structures and oral glucose tolerance curves for the flavonoids isolated from the roots of WE, isovitexin and swertisin, and their effect on the serum glucose levels. The oral treatment of hyperglycemic rats with isovitexin (15 mg/kg) reduced glycemia at 30 and 60 min. Moreover, swertisin, at the same dose, presented a faster antihyperglycemic effect (15 and 30 min after treatment) compared with isovitexin.



**Figure 1.** Structure and effect of isovitexin (A) and swertisin; (B) E on serum glucose levels (mg/dL) in oral glucose tolerance curve. Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M; n = 6 in duplicate. Significant at \* $p \leq 0.05$  and \*\* $p \leq 0.01$  in relation to hyperglycemic control.

### 3.3. Effect of MeE, BuOH and isolated compounds from WE and glipizide on insulin secretion

Serum insulin levels were determined in fasted rats after an oral glucose loading (4 g/kg) as shown in Table 5. Glucose induced-insulin secretion was increased 128 % at 15 min in hyperglycemic rats when compared with the euglycemic group (zero time), returning to the basal levels after 30 min. As expected a sulfonylurea agent, glipizide, stimulated the insulin

secretion at 15, 30 and 60 min by around 147, 128 and 70 % when compared to the hyperglycemic control group (Table 5).

MeE potentiated insulin secretion induced by glucose at 30 (60%) and 60 min (170%) after oral treatment. Moreover, BuOH potentiated the glucose effect on insulin secretion at 30 min (107%). Swertisin stimulated significantly insulin secretion and potentiated the glucose effect on insulin levels by around 80% and 60% at 30 and 60 min, respectively. In addition, swertisin and isovitexin (lower doses when compared to MeE extract) were able to stimulate significantly insulin secretion in hyperglycemic rats. Finally, the high serum insulin levels are correlated with the antihyperglycemic effect of isovitexin and swertisin on the glucose tolerance curve showed in Fig. 1B.

#### *3.4. Effect of MeE, BuOH, or isolated compounds from WE, glipizide and insulin on glycogen content*

Figure 2 shows that soleus muscle glycogen content increased significantly 3 h after administration of glucose (4 g/kg) by oral gavage when compared with fasted normal rats. Additionally, the known stimulatory effect of insulin on glycogen storage was observed 3 h after insulin (0.05 I.U) treatment in hyperglycemic rats, compared to the hyperglycemic control group. Moreover, glipizide (10 mg/kg) produced a significant increase in glycogen content in soleus muscle in relation to the hyperglycemic and fasted normal control groups.

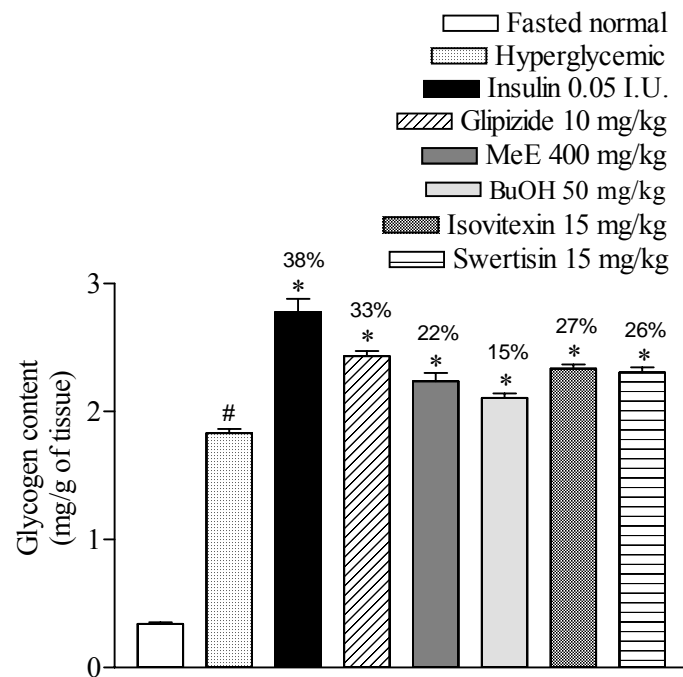
The treatment of hyperglycemic rats with MeE of WE (400 mg/kg) increased significantly the glycogen content in soleus muscle 3 h after oral treatment compared to the hyperglycemic control group. In addition, BuOH (50 mg/kg) produced a similar effect when compared with MeE (Figure 2).

The compounds isolated from WE, isovitexin and swertisin, were also able to increase the glycogen content in soleus muscle when compared with fasted normal and hyperglycemic rats 3 h after treatments. In percentage terms, both compounds showed a similar stimulatory effect on glycogen content in hyperglycemic rats (around 26%). However, liver glycogen content was not modified 3 h after treatment with the BuOH fraction of WE compared with hyperglycemic control groups (data not shown).

**Table 5.** Acute effect of **MeE**, **BuOH**, isovitexin and swertisin on serum insulin levels (ng/mL). Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M; n = 4 in duplicate for each treatment. Statistically significant at  $^{\#}p \leq 0.01$  in relation to euglycemic group. Statistically significant difference compared to the corresponding hyperglycemic group;  $*p \leq 0.05$ ;  $**p \leq 0.01$ ;  $***p \leq 0.001$ .

Time (min)	Hyper	Hyper	Hyper + WE			
	Glucose 4 g/kg	Glipizide 10 mg/kg	MeE 400 mg/kg	BuOH 50 mg/kg	Swertisin 15 mg/kg	Isovitexin 15 mg/kg
0	0.523 $\pm$ 0.033	-	-	-	-	-
15	0.894 $\pm$ 0.114 <sup>#</sup>	2.270 $\pm$ 0.209 <sup>***</sup>	0.968 $\pm$ 0.043	1.056 $\pm$ 0.366	0.929 $\pm$ 0.229	0.928 $\pm$ 0.279
30	0.601 $\pm$ 0.042	1.372 $\pm$ 0.269 <sup>*</sup>	0.948 $\pm$ 0.088 <sup>**</sup>	1.246 $\pm$ 0.410 <sup>*</sup>	1.078 $\pm$ 0.138 <sup>***</sup>	0.784 $\pm$ 0.147
60	0.570 $\pm$ 0.085	1.027 $\pm$ 0.216 <sup>*</sup>	1.559 $\pm$ 0.454 <sup>**</sup>	0.747 $\pm$ 0.181	0.893 $\pm$ 0.046 <sup>*</sup>	0.902 $\pm$ 0.119 <sup>*</sup>





**Figure 2.** Effect of **MeE**, **BuOH** and isolated compounds from WE roots on muscle glycogen content in hyperglycemic rats. Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M; n= 6 in duplicate for each group. Statistically significant at # $p \leq 0.0001$  in relation to euglycemic group Significant at \* $p \leq 0.05$  in relation to hyperglycemic control.

### 3.5. Effect of BuOH on serum glucose levels in diabetic rats

The best doses of BuOH in the oral glucose tolerance curve were used to study the effect of this fraction on glycemia in diabetic rats. Table 6 shows the profile of glycemia in diabetic rats treated with BuOH (50, 100 or 400 mg/kg). Contrary to the hypoglycemic effect of insulin, BuOH did not alter glycemia from 1 to 3 h after treatments when compared to the respective zero time and to the diabetic control group.

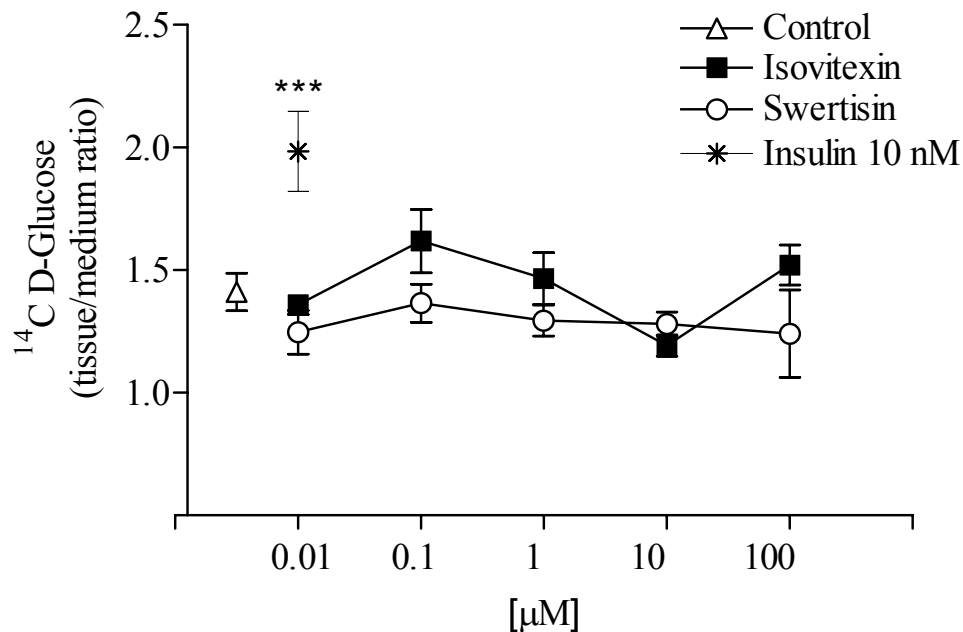
### 3.6. Effect of compounds isolated from WE and insulin on $^{14}\text{C}$ -glucose uptake in rat soleus muscle

Taking into account the effective dose of *in vivo* treatments of isovitexin and swertisin on the glucose tolerance curve, the dose-response curves of these compounds for *in vitro*  $^{14}\text{C}$ -glucose uptake were plotted. Figure 3 shows the *in vitro* effect of insulin (1 IU; 10 nM), isovitexin and swertisin (0.01, 0.1, 1, 10 and 100  $\mu\text{M}$ ) on glucose uptake in the rat soleus muscle following 60 min of incubation. As expected, insulin stimulated significantly the  $^{14}\text{C}$ -DG uptake when compared to the control group. Nevertheless, different concentrations of isovitexin and swertisin, ranging from 0.01 to 100  $\mu\text{M}$ , had no stimulatory effect on glucose uptake in soleus muscle.

**Table 6.** Acute effect of different doses of **BuOH** fraction of WE, and insulin on serum glucose levels (mg/dL) in alloxan-diabetic rats.

Time	Group I	Group II	Group III		
(h)	Diabetic	Diabetic + Insulin (0.05 IU)	50 mg/kg	100 mg/kg	400 mg/kg
0	401.6 ± 17.3	407.6 ± 10.6	483.5 ± 30.1	414.8 ± 19.0	410.9 ± 20.6
1	438.4 ± 11.8	342.6 ± 18.2*	529.6 ± 25.4	421.8 ± 34.5	475.2 ± 37.7
2	441.4 ± 11.9	185.0 ± 13.9***	558.4 ± 26.0	472.4 ± 42.4	437.6 ± 46.1
3	429.6 ± 14.2	132.5 ± 23.6***	531.4 ± 48.9	402.5 ± 55.0	417.7 ± 48.6

Values are expressed as mean ± S.E.M; n = 6 in duplicate for each treatment. Statistically significant difference compared to the corresponding zero time value. \* $p \leq 0.05$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$ .



**Figure 3.** Effect of isovitexin and swertisin on  $^{14}\text{C}$ -glucose uptake in the rat soleus muscle. Values are expressed as mean ± S.E.M; n= 4 in duplicate for each group. Significant at \*\*\* $p \leq 0.001$  in relation to control group.

#### 4. Discussion

Currently, the search for appropriate hypoglycemic agents is focused on natural products used in traditional medicine, especially those derived from plants. Flavonoids are a large group of phenolic plant constituents and their bioactive potential in the treatment and prevention of diabetes and other diseases has been demonstrated [30-32]. Phenolic compounds can affect glucose transport and glucose metabolism as well as inducing insulin release from  $\beta$ -cells in the pancreas [31, 33-36]. This study showed the antihyperglycemic effect of crude extracts, fractions, sub-fractions and isolated flavonoids from the roots of WE in hyperglycemic rats after an acute treatment. As far as we are aware, this is the first report on the effect of this plant on glycemia balance.

Several plants rich in flavonoids have been shown to have an effect on blood glucose levels. Acute treatment with *Syzygium cordatum* leaf extracts has been found to decrease serum glucose levels in hyperglycemic rats compared to a control group. However, no effect was observed after long-term treatment of diabetic rats with this extract. In addition, the methanol extract of *Gentiana olivieri* has shown significant activity in glucose-hyperglycemic rats with no effect in normal rats [14, 37]. These results are in agreement with those for MeE and AE from the roots of WE, which reduced the glucose levels after an acute treatment in hyperglycemic rats. Furthermore, the effect of the crude extracts of WE seems to be mediated through a mechanism involving regulation of glucose metabolism in peripheral tissues, and/or insulin secretion from the pancreas.

The BuOH, MEF and AF were obtained from the methanol crude extract and their potential antihyperglycemic effects were studied in normal glucose-fed rats and diabetic rats. The best antihyperglycemic effect of the BuOH was quite similar to that caused by glipizide during the same time-course studied [38]. Moreover, the treatment with MEF, a subfraction with high flavonoid content, showed as pronounced an effect as that of BuOH, while AF did not alter the glucose levels. Additionally, the BuOH fraction was not able to reduce the blood glucose levels in diabetic rats after acute treatment. Consequently, the effect of the BuOH fraction, as well as of MEF, seems to be mediated through mechanisms involving insulin secretion from  $\beta$ -cells [39, 40].

The methanol extract of *Gentiana olivieri* and its related fractions (EtOAc and *n*-butanol) have been reported to be effective in reducing the blood glucose levels in hyperglycemic rats after acute treatment [14]. Also, the aqueous and *n*-BuOH fractions of *Averrhoa bilimbi* leaves have been shown to effect serum glucose levels in diabetic and hyperglycemic normal rats. Both fractions improved the glucose tolerance curve in diabetic

rats and hyperglycemic rats. Furthermore, after two weeks of treatment the fractions increased serum insulin levels when compared with zero time and with the diabetic control group [41, 42].

Considering the antihyperglycemic effect of BuOH, two C-glycosylflavones, isovitexin and swertisin were isolated from this fraction. The oral administration of isovitexin and swertisin resulted in significant antihyperglycemic effects in glucose-fed normal rats. The antihyperglycemic activity of plant extracts rich in flavones in hyperglycemic and diabetic rats has been previously described. Recently, Hsu et al., [33] showed the antihyperglycemic effect of puerarin, an isoflavone, in normal, hyperglycemic normal and diabetic rats. This compound reduced glycemia in normal and diabetic rats in a dose-dependent manner and it was also able to attenuate the increase in plasma glucose induced by an intravenous glucose challenge in normal rats. Also, isoorientin, a C-glycosylflavone, significantly can reduce serum glucose levels in hyperglycemic and diabetic rats [14] and swertisin, isolated from *Commelina communis* (dayflower), has been reported to inhibit the activity of  $\alpha$ -glucosidase from rat intestine [13]. The results observed for isovitexin and swertisin in the present study suggest that some pancreatic functions, such as insulin secretion or the presence of insulin, are required for the antihyperglycemic activity of such compounds since BuOH, the fraction from which isovitexin and swertisin were isolated, showed an effect in hyperglycemic normal rats but not in diabetic rats.

In order to evaluate the mechanism of action of the MeE, BuOH, MEF and isolated flavonoids from WE, the effect of the extract, fractions and isolated compounds on muscle glycogen content and on insulin secretion was investigated. Insulin is the most important hormone that regulates energy metabolism. Biphasic insulin secretion is the normal response of  $\beta$  cells to a rapid and sustained increase in blood glucose concentration [40, 43]. The rapid increase in insulin levels observed in the hyperglycemic group confirms the classical profile of glucose-induced insulin secretion [44]. Also, the stimulatory effect observed for glipizide reinforces the proposed action of this compound as a short-acting insulin secretagogue [22]. The treatments with isovitexin and swertisin potentiated insulin secretion, as did those with MeE and BuOH. These effects are consistent with the reported action of glipizide on glucose-induced insulin release. Flavonoids have been reported as insulin secretagogues. Genistein and daidzein have been found to increase insulin secretion stimulated by glucose *in vivo* and *in vitro*. Also, anthocianins, anthocianidins, apigenin (4',5,7-trihydroxyflavone) and apigenin-6-C-(2''-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl)- $\beta$ -L-fucopyranoside have been shown to act on pancreas stimulating insulin secretion [27, 45, 46]. Thus, the hypoglycemic effect of WE seems to be a consequence of insulin secretion to regulate serum glucose levels.

In mammals, carbohydrate is stored mainly in the form of glycogen, with skeletal muscle and liver as the major storage sites. Glycogen metabolism is one of the metabolic pathways regulated by insulin through activation and/or inhibition of several enzymes and proteins [19, 47]. The determination of glycogen content in the muscle of hyperglycemic normal rats after acute treatments with MeE and BuOH showed a significant increase in muscle glycogen content but did not change the hepatic glycogen content in hyperglycemic rats (data not show). Additionally, the known effect of insulin, as well as glipizide, on muscle glycogen storage was observed. Treatment with the compounds isolated from WE, isovitexin and swertisin, shows a significant stimulation of muscle glycogen storage in hyperglycemic rats, while it had no stimulatory effect on *in vitro* glucose uptake in the soleus muscle, showing an indirect effect on glycogen content (consequence of insulin secretion), instead of glucose transporter regulation (GLUT-4). Also, these results indicate that the pancreas is an important target for WE compounds.

Other bioflavonoids have been previously reported to prevent glycogen depletion in diabetic animals. Zanatta et al., [29] showed that kaempferol 3-neohesperidoside, a flavonol isolated from *Cyathea phalerata*, increased muscle glycogen content in diabetic rats. Furthermore, restoration of glycogen levels and the activity of carbohydrate metabolic enzymes have been observed in diabetic rats chronically treated with rutin, another flavonol glycoside [48].

## 5. Conclusions

Glycogen levels and glucose uptake in skeletal muscle can serve as markers in studies on insulinomimetic activity and insulin secretion indicates an antihyperglycemic effect. Glycogen synthesis and glucose uptake in skeletal muscle are stimulated acutely by insulin and are impaired in the diabetes state [49]. These results show that the potential antihyperglycemic effect of WE is mainly due to the stimulation of insulin secretion.

## Acknowledgements

“This work was supported by grants from CNPq-Brasil, CAPES and FAPESC-SC. The authors are grateful to the Departamento de Farmacologia, CCB, UFSC, Florianópolis, SC, for use of the LKB rack, beta liquid scintillation spectrometer. PF, LHC and ACG are registered on the Pharmacy Postgraduate Program of the Federal University of Santa Catarina. We are grateful to Dr. Rozangela Curi Pedrosa for experimental support and Dr. Siobhan Wiese for assistance with the English text.”

## References

1. Pio Corrêa M. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: IBDF, 1928.
2. Rizzini CT, Mors WB. *Botânica Econômica Brasileira*. São Paulo: EDUSP, 1976.
3. Peters RR, Farias MR, Ribeiro do Vale PM. Anti-inflammatory and analgesic effects of cucurbitacins from *Wilbrandia ebracteata*. *Planta Med* 1997; 63(6): 525-8.
4. Peters RR, Saleh TF, Lora M, Patry C, de Brum-Fernandes AJ, Farias MR, Ribeiro-do-Valle RM. Anti-inflammatory effects of the products from *Wilbrandia ebracteata* on carrageenan-induced pleurisy in mice. *Life Sci* 1999; 64(26): 2429-37.
5. Gonzalez FG, Di Stasi LC. Anti-ulcerogenic and analgesic activities of the leaves of *Wilbrandia ebracteata* in mice. *Phytomedicine* 2002; 9(2): 125-34.
6. Coelho RG, Gonzalez FG, Sannomiya M, Di Stasi LC, Vilegas W. Gastric anti-ulcer activity of leaf fractions obtained of polar extract from *Wilbrandia ebracteata* in mice. *Nat Prod Res* 2008; 6: 1-9.
7. Peters RR, Baier Krepsky P, Siqueira-Junior JM, da Silva Rocha JC, Marques Bezerra M, de Albuquerque Ribeiro R, de Brum-Fernandes AJ, Rocha Farias M, Castro da Rocha FA, Ribeiro-do-Valle RM. Nitric oxide and cyclooxygenase may participate in the analgesic and anti-inflammatory effect of the cucurbitacins fraction from *Wilbrandia ebracteata*. *Life Sci* 2003; 73(17): 2185-97.
8. Siqueira JM Jr, Peters RR, Gazola AC, Krepsky PB, Farias MR, Rae GA, de Brum-Fernandes AJ, Ribeiro-do-Valle RM. Anti-inflammatory effects of a triterpenoid isolated from *Wilbrandia ebracteata* Cogn. *Life Sci* 2007; 80(15):1382-7.
9. Dos Santos RI, Dos Santos MA, Schenkel EP. Analysis of the plant drug *Wilbrandia ebracteata* Cogn. *Int J Pharmacogn* 1996; 34(4): 300-2.
10. Küpeli E, Aslan M, Gürbüz I, Yesilada E. Evaluation of in vivo biological activity profile of isoorientin. *Z Naturforsch [C]* 2004; 59(11-12): 787-90.
11. Ferreres F, Sousa C, Valentão P, Andrade PB, Seabra RM, Gil-Izquierdo A. New C-deoxyhexosyl flavones and antioxidant properties of *Passiflora edulis* leaf extract. *J Agric Food Chem* 2007; 55(25):10187-93.
12. Hasegawa T, Tanaka A, Hosoda A, Takano F, Ohta T. Antioxidant C-glycosyl flavones from the leaves of *Sasa kurilensis* var. *gigantea*. *Phytochemistry* 2008; 69(6):1419-24.
13. Shibano M, Kakutani K, Taniguchi M, Yasuda M, Baba K. Antioxidant constituents in the dayflower (*Commelina communis* L.) and their alpha-glucosidase-inhibitory activity. *Nat Med* 2008; 62(3): 349-53.
14. Sezik E, Aslan M, Yesilada E, Ito S. Hypoglycemic activity of *Gentiana olivieri* and isolation of the active constituent through bioassay-directed fractionation techniques. *Life Sci* 2005; 76: 1223-1238.

15. Vats V, Yadav SP, Grover JK. Effect of *T. foenumgraecum* on glycogen content of tissues and the key enzymes of carbohydrate metabolism. *J Ethnopharmacol* 2003; 85(2-3): 237-42.
16. Anandharajan R, Jaiganesh S, Shankernarayanan NP, Viswakarma RA, Balakrishnan A. In vitro glucose uptake activity of *Aegles marmelos* and *Syzygium cumini* by activation of Glut-4, PI3 kinase and PPARgamma in L6 myotubes. *Phytomedicine* 2006;13(6): 434-41.
17. Hanamura T, Mayama C, Aoki H, Hirayama Y, Shimizu M. Antihyperglycemic effect of polyphenols from Acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. *Biosci Biotechnol Biochem* 2006; 70(8): 1813-20.
18. Andrade-Cetto A, Wiedenfeld H. Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 2001; 78: 145-9.
19. Ferrer JC, Favre C, Gomis RR, Fernández-Novell JM, Garcia-Rocha M, De laIglesia N, Cid E, Guinovart JJ. Control of glycogen deposition. *FEBS Lett* 2003; 546: 127-132.
20. Beardsall K, Yuen K, Williams R, Dunger D. Applied physiology of glucose control. *Current Paediatrics* 2003; 13: 543-548.
21. Hei YJ. Recent progress in insulin signal transduction. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1998; 40: 123-135.
22. Rendell M. The role of sulphonylureas in the management of type 2 diabetes mellitus. *Drugs* 2004; 64(12): 1339-58.
23. Ogonowski J. [Glipizide--a short-acting sulphonylurea derivative] *Przegl Lek* 1996; 53(9):666-667 [in Polish].
24. Jorge AP, Horst H, De Sousa E, Pizzolatti MG, Silva FRMB. Insulinomimetic effects of kaempferitrin on glycaemia and on <sup>14</sup>Cglucose uptake in rat soleus muscle. *Chem Biol Interact* 2004; 149: 89-96.
25. De Sousa E, Zanatta L, Seifriz I, Creczynski-Pasa TB, Pizzolatti MG, Szpoganicz B, Silva FRMB. Hypoglycemic effect and antioxidant potential of kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* leaves. *J Nat Prod* 2004; 67: 829-832.
26. Zanatta, L., De Sousa, E., Cazarolli, L.H., Junior, A. C., Pizzolatti, M. G., Szpoganicz, B., Silva, F. R. M. B. Effect of crude extract and fractions from *Vitex megapotamica* leaves on hyperglycemia in alloxan-diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 2007; 109: 151-155.
27. Cazarolli LH, Folador P, Moresco HH, Brighente IM, Pizzolatti MG, Silva FR. Mechanism of action of the stimulatory effect of apigenin-6-C-(2"-O-alpha-l-rhamnopyranosyl)-beta-l-fucopyranoside on (14)C-glucose uptake. *Chem Biol Interact* 2009 (accessed 25 Nov 2008, epub ahead of print).
28. Krisman CR. A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. *Analytical Biochem* 1962; 4: 17-23.

29. Zanatta L, Rosso A, Folador P, Figueiredo MS, Pizzolatti MG, Leite LD, Silva FR. Insulinomimetic effect of kaempferol 3-neohesperidoside on the rat soleus muscle. *J Nat Prod* 2008; 71(4): 532-5.
30. Mukherjee PK, Maiti K, Mukherjee K, Houghton PJ. Leads from Indian medicinal plants with hypoglycemic potentials. *J Ethnopharmacol* 2006; 106: 1-28.
31. Cazarolli LH, Zanatta L, Alberton EH, Figueiredo MS, Folador P, Damazio RG, Pizzolatti MG, Silva FR. Flavonoids: prospective drug candidates. *Mini Rev Med Chem* 2008a; 8(13): 1429-40.
32. Cazarolli LH, Zanatta L, Alberton EH, Figueiredo MS, Folador P, Damazio RG, Pizzolatti MG, Silva FR. Flavonoids: cellular and molecular mechanism of action in glucose homeostasis. *Mini Rev Med Chem* 2008b;8(10): 1032-8.
33. Hsu FL, Liu IM, Kuo DH, Chen WC, Su HC, Cheng JT. Antihyperglycemic effect of puerarin in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nat Prod* 2003;66(6):788-92.
34. Pinent M, Blay M, Bladé MC, Salvadó MJ, Arola L, Ardévol A. Grape seed-derived procyanidins have an antihyperglycemic effect in streptozotocin-induced diabetic rats and insulinomimetic activity in insulin-sensitive cell lines. *Endocrinology* 2004; 145(11): 4985-90.
35. Liu D, Zhen W, Yang Z, Carter JD, Si H, Reynolds KA. Genistein acutely stimulates insulin secretion in pancreatic beta-cells through a cAMP-dependent protein kinase pathway. *Diabetes* 2006; 55(4): 1043-50.
36. Park SA, Choi MS, Cho SY, Seo JS, Jung UJ, Kim MJ, Sung MK, Park YB, Lee MK. Genistein and daidzein modulate hepatic glucose and lipid regulating enzyme activities in C57BL/KsJ-db/db mice. *Life Sci* 2006; 79: 1207-1213.
37. Musabayane CT, Mahlalela N, Shode FO, Ojewole JA. Effects of *Syzygium cordatum* (Hochst.) [Myrtaceae] leaf extract on plasma glucose and hepatic glycogen in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 2005; 97(3): 485-90.
38. Inzucchi SE. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes: scientific review. *JAMA* 2002; 287(3): 360-72.
39. Detimary P, Jonas JC, Henquin JC. Possible links between glucose-induced changes in the energy state of pancreatic B cells and insulin release. Unmasking by decreasing a stable pool of adenine nucleotides in mouse islets. *J Clin Invest* 1995; 96(4): 1738-45.
40. Rorsman P. The pancreatic beta-cell as a fuel sensor: an electrophysiologist's viewpoint. *Diabetologia* 1997; 40(5): 487-95.
41. Pushparaj PN, Tan BK, Tan CH. The mechanism of hypoglycemic action of the semi-purified fractions of *Averrhoa bilimbi* in streptozotocin-diabetic rats. *Life Sci* 2001; 70(5): 535-47.
42. Tan BK, Tan CH, Pushparaj PN. Anti-diabetic activity of the semi-purified fractions of *Averrhoa bilimbi* in high fat diet fed-streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci* 2005; 76(24): 2827-39.



43. Taha C, Klip A. The insulin signaling pathway. *J Membr Biol* 1999; 169(1): 1-12.
44. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001; 414: 799-806.
45. Jayaprakasam B, Vareed SK, Olson LK, Nair MG. Insulin secretion by bioactive anthocyanins and anthocyanidins present in fruits. *J Agric Food Chem* 2005; 53(1): 28-31.
46. Panda S, Kar A. Apigenin (4',5,7-trihydroxyflavone) regulates hyperglycaemia, thyroid dysfunction and lipid peroxidation in alloxan-induced diabetic mice. *J Pharm Pharmacol* 2007; 59(11): 1543-8.
47. Srivastava AK, Pandey SK. Potential mechanism(s) involved in the regulation of glycogen synthesis by insulin. *Mol Cell Biochem* 1998; 182(1-2): 135-41.
48. Prince SM, Kamalakkannan N. Rutin improves glucose homeostasis in streptozotocin diabetic tissues by altering glycolytic and gluconeogenic enzymes. *J Biochem Mol Toxicol* 2006; 20(2): 96-102.
49. Yeaman SJ, Armstrong JL, Bonavaud SM, Poinasamy D, Pickersgill L, Halse R. Regulation of glycogen synthesis in human muscle cells. *Biochem Soc Trans* 2001; 29(4): 537-41.

## 4. DISCUSSÃO

A prevalência do diabetes vem crescendo rapidamente nos últimos anos e o desenvolvimento de complicações contribuem para a elevada morbidade e mortalidade (SBD, 2007; ADA, 2008; WHO, 2008). A patogênese do diabetes é complexa e envolve, entre vários fatores, defeitos na secreção de insulina e desenvolvimento de resistência à insulina nos tecidos periféricos (STOLAR et al., 2008).

Apesar do grande interesse no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento e prevenção do diabetes, de suas complicações e do crescente interesse da comunidade científica na avaliação de produtos naturais, poucas espécies tem os efeitos biológicos cientificamente validados (FRÖDE; MEDEIROS, 2008). Algumas plantas com comprovada atividade hipoglicemiante já tiveram o perfil fitoquímico e mecanismo de ação elucidados. Plantas ricas em flavonóides podem atuar através do transporte e metabolismo da glicose nos tecidos periféricos, pela indução da secreção de insulina pelas células  $\beta$  do pâncreas ou ainda, sobre a absorção intestinal de carboidratos (PINENT et al., 2004; LIU et al., 2006; HANAMURA et al., 2006; CAZAROLLI et al., 2008a; CAZAROLLI, 2009a; ZANATTA et al., 2008). Este trabalho apresenta, pela primeira vez, a comprovação do efeito anti-hiperglicêmico de preparações de *Wilbrandia ebracteata* ricas em flavonóides em modelos animais de diabetes e hiperglicemia.

Existem diversos modelos disponíveis para o estudo de substâncias com potenciais ações antidiabéticas. Em modelos animais, o diabetes pode ser induzido por agentes químicos, por manipulação genética ou por métodos cirúrgicos. Nos últimos anos, a maioria dos estudos tem empregado a indução química com aloxano ou estreptozotocina para a avaliação dos diversos aspectos da doença. Além da indução do diabetes, a curva de tolerância à glicose em ratos normais e os estudos *in vitro* podem ser utilizados para avaliação da ação e do mecanismo de ação hipoglicemiante de produtos naturais (KAPLAN; WAGNER, 2006; CEFALU, 2006; BNOUHAM et al., 2008; FRÖDE; MEDEIROS, 2008).

O modelo de indução por agentes químicos (aloxano e estreptozotocina) é muito utilizado para avaliação da atividade biológica de plantas e produtos naturais. O aloxano leva a hiperglicemia pela ação citotóxica sobre as células  $\beta$  pancreáticas e conseqüente deficiência insulínica. Dessa forma, esse modelo permite estudar a ação de compostos com efeito insulino-mimético, ou seja, substâncias que atuem nos alvos de ação da insulina sem necessitar da presença de insulina para exercer efeitos biológicos (ISLAS-ANDRADE, et al., 2000; SRINIVASAN; RAMARAO, 2007; FOWLER, 2007; FRÖDE; MEDEIROS, 2008).

Estudos com a *Bauhinia forficata*, planta utilizada popularmente como antidiabética, demonstraram que a fração *n*-butanol teve efeito hipoglicemiante após tratamento agudo em ratos diabéticos induzidos com aloxano e não mostrou alteração na curva de tolerância à glicose em animais normais. A canferitrina, flavonóide *O*-heterosídeo isolado das folhas da *B. forficata*, demonstrou o mesmo perfil quando administrada a ratos diabéticos e normais hiperglicêmicos (SILVA et al. 2002; DE SOUSA et al., 2004).

Como mencionado, a resistência à insulina contribui para a hiperglicemia no diabetes melito. Dessa forma, estudos *in vitro* podem ser utilizados para a verificação da ação de produtos naturais nos tecidos periféricos alvos da insulina, como músculo e tecido adiposo. O estudo dos compostos isolados de *B. forficata* (canferitrina) e *Cyathea phalerata* (canferol 3-neohesperidósídeo) demonstrou o estímulo da captação de glicose *in vitro* no músculo sóleo de ratos normais por esses compostos. Esses resultados, somados as ações hipoglicemiantes em ratos diabéticos, apontam para uma possível ação insulino-mimética desses flavonóides, já que os mesmos não apresentaram ação sobre a curva de tolerância à glicose (JORGE et al., 2004; ZANATTA et al., 2008).

No presente trabalho foi utilizado o modelo de indução de diabetes por aloxano para o estudo das ações hipoglicemiantes de *W. ebracteata*. Esse modelo apresenta alta faixa glicêmica que caracteriza um diabetes severo, onde a concentração de insulina residual liberada pelas células beta pancreáticas é muito baixa ou nula (SHARMA et al., 2003, 2008; SRINIVASAN; RAMARAO, 2007). A administração da fração *n*-butanol de *W. ebracteata* não foi capaz de reduzir os níveis glicêmicos de ratos diabéticos por via oral. Além disso, os flavonóides *C*-glicosídeos majoritários dessa fração, isovitexina e swertisina, não exerceram ação sobre a captação de glicose em músculo sóleo de ratos normais. Esses resultados evidenciam que os compostos e frações da planta não atuam mimetizando as ações da insulina sobre tecidos periféricos como o músculo. Provavelmente, outros mecanismos relacionados ao estímulo da secreção de insulina pelo pâncreas ou a inibição da absorção de carboidratos no intestino possam estar envolvidos.

Para avaliação da atividade anti-hiperglicêmica de extratos, frações e compostos de *W. ebracteata* foi realizada a curva de tolerância à glicose oral (CTGO) em ratos normais. Na CTGO é avaliada a alteração transitória da glicemia em resposta a uma sobrecarga de glicose. Como os ratos são normais, possuem as células  $\beta$  funcionantes, ao contrário do modelo de diabetes severo induzido por agentes químicos (SRINIVASAN; RAMARAO, 2007; IKEHARA et al., 2008). A administração dos extratos aquoso e metanólico das raízes de *W. ebracteata* demonstrou que ambos reduziram significativamente a glicemia de ratos normais hiperglicêmicos, entre 15 e 60 min. Adicionalmente, o extrato metanólico aumentou a

concentração plasmática de insulina estimulada por glicose entre 30-60 min após a administração. Esses resultados apontam para uma possível ação dos extratos de *W. ebracteata* sobre a liberação de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas. A redução da glicemia observada na CTGO está relacionada com o aumento da concentração de insulina nos tempos estudados, com exceção do tempo 15 min. Nesse tempo, é provável que a redução da glicemia seja em função do pico inicial de liberação de insulina frente à glicose (provavelmente anterior à redução da glicemia e não detectado em 15 min) ou por uma ação sobre a absorção intestinal de carboidratos.

A insulina é o hormônio mais importante na regulação do metabolismo energético. As ações na homeostasia da glicose incluem basicamente a síntese e armazenamento de carboidratos, proteínas e lipídeos, a modulação do crescimento e diferenciação celular, bem como a inibição do catabolismo (TAHA; KLIP, 1999; SALTIEL; KHAN, 2001). A glicose é o estímulo primário para a secreção de insulina e quando as concentrações plasmáticas de glicose aumentam, a insulina é secretada na circulação de forma bifásica, com um pico rápido e transitório e outro mais lento e duradouro (NORMAN; LITWACK, 1997; MACDONALD et al., 2005).

Outras plantas com potencial atividade anti-hiperglicêmica e secretagogas de insulina já foram estudadas. Trabalhos com *Eugenia jambolana* e *Tinospora cordifolia* demonstraram que os extratos das plantas só apresentaram efeito em diabetes leve e moderado induzido por estreptozotocina, sem alterar a glicemia de ratos diabéticos severos. Os efeitos observados na glicemia parecem envolver o estímulo da liberação de insulina das células  $\beta$ , bem como a atividade insulino-mimética de algum componente dos extratos ou ainda uma combinação de ambos, uma vez que os extratos não apresentaram efeito em ratos diabéticos severos (GROVER et al., 2000).

Além do estudo em ratos diabéticos, a fração *n*-butanol das raízes de *W. ebracteata* foi estudada também em ratos normais hiperglicêmicos. Na CTGO, a fração foi mais potente que o extrato bruto, reduzindo a glicemia e demonstrando um efeito comparável com a ação rápida da insulina lispro. A maior potência da fração *n*-butanol se deve provavelmente à maior concentração de flavonóides em relação ao extrato bruto. Assim como o extrato metanólico, a fração *n*-butanol aumentou a concentração plasmática de insulina (aos 30 min), o que pode ser relacionado à redução da glicemia na CTGO. Com o intuito de estudar preparações de *W. ebracteata* mais purificadas e ricas em flavonóides, foi obtida a subfração metanólica após tratamento da fração *n*-butanol com amberlit XAD-16, uma resina que tem a propriedade de ligação aos flavonóides. Essa subfração apresentou efeito anti-hiperglicêmico semelhante ao

observado para a fração *n*-butanol. Entretanto, o resíduo aquoso resultante, pobre em flavonóides, não foi capaz de reduzir a glicemia de ratos normais hiperglicêmicos.

Diversos estudos mostram ação anti-hiperglicêmica de frações de plantas ricas em flavonóides *C*-glicosídeos. As frações acetato de etila e *n*-butanol obtidas do extrato metanólico de *Gentiana olivieri* foram efetivas na redução da glicemia em ratos hiperglicêmicos após tratamento agudo (SEZIK et al., 2005). Estudos com as folhas de *Averrhoa carambola* demonstraram que tanto o extrato bruto quanto as frações acetato de etila e *n*-butanol reduziram significativamente a glicemia de ratos normais hiperglicêmicos sem apresentar efeito em ratos diabéticos. Além disso, o efeito da fração acetato de etila foi comparável ao promovido pela tolbutamida e pela insulina lispro (CAZAROLLI et al., 2009b).

Os resultados obtidos com os extratos, frações e subfrações de *W. ebracteata* mostram que as mesmas atuam de forma semelhante à glipizida, agente hipoglicemiante da classe das sulfoniluréias com conhecido mecanismo de ação sobre as células  $\beta$  pancreáticas, promovendo a exocitose da insulina. No modelo estudado neste trabalho, a glipizida reduziu a glicemia de ratos normais hiperglicêmicos na CTGO, entre os tempos 15-180 min. Além disso, foi observado o aumento da concentração de insulina plasmática frente a uma sobrecarga de glicose entre os tempos 15-60 min. Esses dados corroboram a hipótese do mecanismo de ação anti-hiperglicêmica de *W. ebracteata* como secretagogo de insulina.

O fígado e o músculo são os principais depósitos de glicogênio no organismo. A insulina regula a síntese de glicogênio através do controle da captação e transporte de glicose e pela regulação dos estados de fosforilação e ativação das diversas enzimas envolvidas na síntese e degradação do glicogênio (TAHA; KLIP, 1999; YEAMAN, 2001; FERRER et al., 2003). Sobre o conteúdo de glicogênio, foi avaliada a ação da glipizida e das preparações de *W. ebracteata* que apresentaram ações anti-hiperglicêmicas por via oral em ratos normais hiperglicêmicos. Os resultados mostraram que o extrato bruto e a fração *n*-butanol da planta estimularam o acúmulo de glicogênio no músculo sóleo de ratos hiperglicêmicos de forma semelhante ao efeito da glipizida, efeito possivelmente secundário a liberação de insulina pelo pâncreas.

Da fração *n*-butanol de *W. ebracteata* foram isoladas e identificadas diversas flavonas *C*-glicosiladas, entre elas a swertisina e a isovitexina, estudadas neste trabalho (DOS SANTOS et al., 1996). Conforme os resultados apresentados, ambos os flavonóides possuem importantes ações anti-hiperglicêmicas sobre a CTGO e sobre a liberação de insulina após tratamento agudo por via oral. A swertisina apresentou ação mais rápida (15-30 min) quando comparada a isovitexina (30-60 min) tanto na CTGO como na determinação da concentração

plasmática de insulina. Além disso, os compostos aumentaram significativamente o conteúdo de glicogênio muscular e não apresentaram ação sobre a captação de glicose muscular *in vitro*. Dessa forma, pode-se inferir que o estímulo da secreção de insulina nas células  $\beta$  pancreáticas seja um dos mecanismos envolvidos na regulação da glicemia por esses flavonóides.

Relatos da literatura descrevem a atividade de plantas ricas em flavonóides e de compostos C-glicosídeos na homeostasia da glicose, seja atuando como insulino-miméticos, secretagogos de insulina ou ambos. O extrato bruto e frações da *Gentiana olivieri* e o composto isolado, isoorientina, reduziram a glicemia de ratos normais hiperglicêmicos e diabéticos após tratamento agudo por via oral. O mecanismo de ação proposto para a isoorientina envolve a proteção das células  $\beta$  do dano oxidativo e o aumento da secreção da insulina. Além disso, o flavonóide aumentaria a sensibilidade dos tecidos periféricos em resposta à insulina (SEZIK et al., 2005). Ainda, estudos com a luteolina e apigenina demonstraram que estes compostos protegem as células  $\beta$  e aumentam as concentrações plasmáticas de insulina. A redução da glicemia em ratos diabéticos observada após tratamentos crônicos sugere ainda que estes compostos atuem aumentando a utilização da glicose por tecidos periféricos responsivos a insulina, além de estimularem a liberação deste hormônio das células  $\beta$  pancreáticas (ZARZUELO et al., 1996; PANDA; KAR, 2007; LI et al., 2007).

Baseado nos resultados obtidos neste trabalho é possível propor que as preparações de *W. ebracteata* bem como os flavonóides C-glicosídeos isolados das raízes da planta possam exercer ações anti-hiperglicêmicas através do estímulo da secreção de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas, ou seja, como secretagogos da insulina. Estudos complementares devem ser realizados a fim de esclarecer a importância de outras vias de regulação do metabolismo da glicose e da patogênese do diabetes como a absorção intestinal de carboidratos e a ação sobre outros tecidos alvos da insulina como fígado, rins e adipócitos.

## 5. CONCLUSÕES

Os extratos brutos, fração *n*-butanol, subfração metanólica e os flavonóides *C*-glicosídeos isovitexina e swertisina isolados das raízes da *Wilbrandia ebracteata* reduziram a glicemia de ratos normais hiperglicêmicos após período agudo de tratamento.

A fração *n*-butanol das raízes da *W. ebracteata* não alterou a glicemia de ratos diabéticos após período agudo de tratamento por via oral.

O extrato bruto metanólico, a fração *n*-butanol e os flavonóides *C*-glicosídeos isovitexina e swertisina isolados das raízes da *W. ebracteata* aumentaram a concentração plasmática de insulina estimulada por glicose em ratos normais hiperglicêmicos após período agudo de tratamento.

O extrato bruto metanólico, fração *n*-butanol e os flavonóides *C*-glicosídeos isovitexina e swertisina isolados das raízes da *W. ebracteata* aumentaram significativamente o conteúdo de glicogênio em músculo sóleo de ratos normais hiperglicêmicos.

Ambos os flavonóides *C*-glicosídeos, isovitexina e swertisina, não alteraram a captação de glicose basal em músculo sóleo de ratos normais.

Os flavonóides *C*-glicosídeos swertisina e isovitexina mostraram ação anti-hiperglicêmica mais potente que a fração *n*-butanol e esta apresentou maior potência quando comparada aos extratos brutos da *W. ebracteata*.

Os extratos, frações, subfrações e compostos isolados da *W. ebracteata* apresentaram ação anti-hiperglicêmica semelhante à observada para a glipizida.

Os efeitos dos extratos, frações, subfrações e flavonóides *C*-glicosídeos isolados da *W. ebracteata* nos modelos animais estudados sugerem uma possível ação sobre a secreção de insulina pelo pâncreas.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-BARRY, J.A.; ABDEL-HASSAN, I.A.; AL-HAKIEM, M.H.H. Hypoglycaemic and antihyperglycaemic effects of *Trigonella foenum-graecum* leaf in normal and alloxan induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 58, p. 149-155, 1997.
- ALBUQUERQUE, R.; PIMAZONI NETTO, A. (eds). **Diabetes na Prática Clínica**. Sociedade Brasileira de Diabetes, 2008. Disponível em <http://www.diabetesebook.org.br>. Acesso em 05 nov. 2008.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 31, p. S55-S60, 2008.
- ANDRADE-CETTO, A.; WIEDENFELD, H. Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, p. 145-9, 2001.
- ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C.R.; SINCERO, T.C.M.; SILVA, A.C.; SAVI, L.A.; GAIDO, C.M.; BETTEGA, J.M.R.; MANCINI, M.; ALMEIDA, M.T.R.; BARBOSA, R.A.; FARIAS, M.R.; BARARDI, C.R.M.; SIMÕES, C.M.O. Antiviral evaluation of plants from Brazilian Atlantic Tropical Forest. **Fitoterapia**, v. 76, p.374-378, 2005.
- AHARO, D.; MIYAKOSHI, M.; CHOU, W.; KAMBARA, T.; MIZUTANI, K.; IKEDA, T. A New Flavone C-Glycoside from the Leaves of *Averrhoa carambola*. **Natural Medicines**, v. 59, n. 3, p.113-16, 2005.
- BETHEL, M.A.; FEINGLOS, M.N. Basal Insulin Therapy in Type 2 Diabetes. **The Journal of the American Board of Family Practice**, v. 18, p. 199-204, 2005.
- BNOUHAM, M.; MERHFOUR, F.; ZIYYAT, A.; MEKHFI, H.; AZIZ, M.; LEGSSYER, A. Antihyperglycemic activity of the aqueous extract of *Urtica dioica*. **Fitoterapia**, v. 74, p. 677-681, 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas Públicas. **Plano de Reorganização da Atenção à Hipertensão Arterial e ao Diabetes Mellitus**. Brasília, 2001.
- BUDZIANOWSKI, J.; PAKULSKI, G.; ROBAK, J. Studies on antioxidative activity of some C-glycosylflavones. **Polish Journal of Pharmacology Pharmacy**, v. 43, p. 395-401, 1991.
- CAZAROLLI, L.H.; ZANATTA, L.; ALBERTON, E.H.; FIGUEIREDO, M.S.; FOLADOR, P.; DAMAZIO, R.G.; PIZZOLATTI, M.G.; SILVA, F.R.M.B. Flavonoids: cellular and molecular mechanism of action in glucose homeostasis. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 10, p.1032-8, 2008a.
- CAZAROLLI, L.H.; ZANATTA, L.; ALBERTON, E.H.; FIGUEIREDO, M.S.; FOLADOR, P.; DAMAZIO, R.G.; PIZZOLATTI, M.G.; Silva, F.R.M.B. Flavonoids: prospective drug candidates. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 13, p.1429-40, 2008b.
- CAZAROLLI, L.H.; MACHADO, L.M.; FOLADOR, P.; MORESCO, H.H.; BRIGHENTE, I.M.; PIZZOLATTI, M.G.; SILVA, F.R.M.B. Potential antihyperglycemic role of crude



extract, fractions and flavonoids from *Averrhoa carambola* leaves in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 2009a [submetido à publicação]

CAZAROLLI, L.H.; FOLADOR, P.; MORESCO, H.H.; BRIGHENTE, I.M.; PIZZOLATTI, M.G.; SILVA, F.R.M.B. Mechanism of action of the stimulatory effect of apigenin-6-C-(2"-O-alpha-l-rhamnopyranosyl)-beta-l-fucopyranoside on (14)C-glucose uptake. **Chemico-Biological Interactions**, v. 179, p. 407-412, 2009.

CEFALU, W.T. Animal models of type 2 diabetes: Clinical presentation and pathophysiological relevance to the human condition. **ILAR Journal**, v. 47, n. 3, p.186-196, 2006.

CECHINEL FILHO, V. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, p. 99-105, 1998.

CHAN, J.C.N. et al. Role of metformin in the initiation of pharmacotherapy for type 2 diabetes: An Asian-Pacific perspective. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 75, n. 3, p. 255-263, 2007.

CHANG, Q.; ZUO, Z.; CHOW, M.S.S.; HO, W.K.K. Difference in absorption of the two structurally similar flavonoid glycosides, hyperoside and isoquercitrin, in rats. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 59, p. 549-555, 2005.

CHOPIN, J.; BOUILLANT, M.L. C-glycosylflavonoids. In: HARBORNE, J.B.; MABRY, T.J.; MABRY, H. (ed.) **The flavonoids**. New York: Academic Press, 1975. Cap. 12, p.633-691.

COELHO, R.G; GONZALEZ F.G.; SANNOMIVA, M.; DI STASI, L.C.; VILEGAS, W. Gastric anti-ulcer activity of leaf fractions obtained of polar extract from *Wilbrandia ebracteata* in mice. **Natural Products Research**, v. 6, p. 1-9, 2008.

CONCANNON, P. et al. Evidence for susceptibility loci from four genome-wide linkage scans in 1,435 multiplex families. **Diabetes**, v. 54, p. 2995-3001, 2005.

CROVETTO, R.M. Revisión critica del género *Wilbrandia* (*Cucurbitaceae*). **Darwiniana**, v.12, n.1, p.17-42, 1960.

DA SILVA, K.L.; CECHINEL FILHO, V. Plantas do gênero Bauhinia: composição química e potencial farmacológico. **Química Nova**, v. 25, p. 449-454, 2002.

DEFRONZO, R. A. Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus. **Annals of Internal Medicine**, v. 131, p. 281-303, 1999.

DE SOUSA E. et al. Hypoglycemic effect and antioxidant potential of kaempferol-3,7-O-( $\alpha$ )-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* leaves. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1-4, 2004.

DELIORMAN ORHAN, D.; ASLAN, M.; AKTAY, G.; ERGUN, E.; YESILADA, E.; ERGUN, F. Evaluation of hepatoprotective effect of *Gentiana olivieri* herb on subacute administration and isolation of active principle. **Life Sciences**, v. 72, p. 2273-2283, 2003.

- DIPIRO, J.T. **Pharmacotherapy**: a pathophysiologic approach. 5 ed. New York: McGraw-Hill, 2002. p. 1335-1358.
- FARIAS, M.R.; SCHENKEL, E.P.; VIANNA, R.M.J.; SANTOS, R.I. Identificação de amostras comerciais de raiz de taiuiá como *Wilbrandia ebracteata* Cogn. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 1, p. 200-202, 1986.
- FARIAS, M.R.; SCHENKEL, E.P.; MAYER, R.; RÜCKER, G. Cucurbitacins as constituents of *Wilbrandia ebracteata*. **Planta Medica**, v. 59, p. 272-275, 1993.
- FERRER, J.C.; FAVRE, C.; GOMIS, R.R.; FERNÁNDEZ-NOVELL, J.M.; GARCÍA-ROCHA, M.; DE LA IGLESIA, N.; CID, E.; GUINOVART, J.J. Control of glycogen deposition. **FEBS Letters**, v. 546, n. 1, p. 127-132, 2003.
- FOLADOR, P.; ARAÚJO, L.; PIZZOLATTI, M.G.; VERDI, L.G.; HEROS HOST, H.; FIGUEIREDO, M.S.R.B.; SILVA, F.R.M.B. Effect of glycosylated flavonols on the glycogen contents from muscle and liver of diabetic rats. In: XXXIV Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. **Anais...** Águas de Lindóia: SBBq, 2005.
- FOLADOR, P.; FIGUEIREDO, M.S.R.B.; CAZAROLLI, L.H.; PROVESI J.G.; MOREIRA, E.L.G.; PIZZOLATTI, M.G.; HOST, H.; SILVA, F.R.M.B. Effect of kaempferitrin and insulin on the glycogen content and hexokinase activity on soleus muscle from diabetic rats. In: XXI Reunião Anual da FeSBE. **Anais...** Águas de Lindóia: FeSBE, 2006.
- FOWLER, M.J. Diabetes treatment, part 2: Oral agents for glycemic management. **Clinical Diabetes**, v. 25, p.131-134, 2007.
- FOWLER, M.J. Diabetes treatment, part 3: Insulin and incretins. **Clinical Diabetes**, v. 26, p. 35-39, 2008.
- FRÖDE, T.S.; MEDEIROS, Y.S. Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, p. 173-183, 2008.
- GAZOLA, A.C. Estudo químico das raízes e folhas de *Wilbrandia ebracteata* Cogn. 2008. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Programa de pós Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- GEE, J.M.; DUPONT, M.S.; DAY, A.J.; PLUMB, G.W.; WILLIAMSON, G.; JOHNSON, I.T. Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 2765-2771, 2000.
- GERICH, J.E.; DAILEY, G. Advances in diabetes for the millennium: understanding insulin resistance. **Medscape General Medicine**, v. 6, n. 11, 2004. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov>>. Acesso em: 20 dez. 2008.
- GILLESPIE, K.M. Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. **Canadian Medical Association Journal**, v.175, p. 165-170, 2006.

- GOLDFRANK, L.R.; FLOMENBAUM, N.E. LEWIN, N.A.; HOWLAND, M.A.; HOFFMAN, R.S. NELSON, L.S. **GoldFrank's Toxicology Emergencies**. 7 ed. New York: McGraw-Hill, 2002. p. 593-603.
- GONZALEZ, F.G.; STASI, L.C. Anti-ulcerogenic and analgesic activities of the leaves of *Wilbrandia ebracteata* in mice. **Phytomedicine**, v. 9, p. 125-134, 2002.
- GROVER, J.K.; VATS, V.; RATHI, S.S. Anti-hyperglycemic effect of *Eugenia jambolana* and *Tinospora cordifolia* in experimental diabetes and their effects on key metabolic enzymes involved in carbohydrate metabolism. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 461-470, 2000.
- GYLFE, E. Nutrient secretagogues induce bimodal early changes in cytoplasmic calcium of insulin-releasing ob/ob mouse beta-cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, p.13750-13754, 1988.
- HACKETT, A.M. The metabolism of flavonoid compounds in mammals. **Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure Activity Relationships**, v. 54, p. 157-194, 1986.
- HANAMURA, T.; MAYAMA, C.; AOKI, H.; HIRAYAMA, Y.; SHIMIZU, M. Antihyperglycemic effect of polyphenols from Acerola (*Malpighia emarginata* DC.). **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 70, n. 8, 1813-1820, 2006.
- HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481-504, 2000.
- HARDMAN, J.G.; LIMBID, L.E.; GILMAN, A.G. **Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 10 ed. New York: McGraw-Hill, 2001, p. 1701-1705.
- HASEGAWA, T.; TANAKA, A.; HOSODA, A.; TAKANO, F.; OHTA, T. Antioxidant C-glycosyl flavones from the leaves of *Sasa kurilensis* var. gigantean. **Phytochemistry**, v. 69, n. 6, p. 1419-1424, 2008.
- HOEHNE, F.C. **Vegetais anti-helmínticos**. São Paulo: Weisflog, 1920.
- HOEHNE, F.C. **Plantas e substâncias vegetais tóxicas**. São Paulo: Graphicars, 1939.
- HOLLMAN, P.C.H.; VRIES, J.H.M. DE; LEEUWEN, S.D.; MENGELERS, M.J.B.; KATAN, M.B. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, p. 1276-82, 1995.
- IKEHARA, O.; KAWASAKI, N.; MAEZONO, K.; KOMATSU, M.; KONISHI, A. Acute and chronic treatment of L-isoleucine ameliorates glucose metabolism in glucose-intolerant and diabetic mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 3, p. 469-472, 2008.
- INZUCCHI, S.E. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes. Scientific review. **Journal of American Medical Association**, v. 287, n. 3, p. 360-369, 2002.
- ISLAS-ANDRADE, S.; MONSALVE, M.C.R.; DE LA PEÑA, J.E.; POLANCO, A.C.; PALOMINO, M.A.; VELASCO, A.F. Streptozotocin and Alloxan in Experimental Diabetes:

Comparison of the two models in rats. **Acta Histochemical Cytochemistry**, v. 33, p. 201-8, 2000.

JORGE, A.P.; DE SOUSA, E.; PIZZOLATTI, M.G.; SILVA, F.R.M.B. Insulinomimetic Effects of Kaempferitrin on Glycaemia and on <sup>14</sup>C-Glucose Uptake in Rat Soleus Muscle. **Chemico-Biological Interaction**, v. 149, p. 89-96, 2004.

KAPLAN, J.R.; WAGNER, J.D. Type 2 Diabetes – An introduction to the development and use of animal models. **ILAR Journal**, v. 47, n. 3, p. 181-185, 2006.

KÜPELI, E.; ASLAN, M.; GÜRBÜZ, I.; YESILADA, E. Evaluation of in vivo biological activity profile of isoorientin. **Zeitschrift für Naturforschung [C]**, v. 59, n. 11-12, p. 787-790, 2004.

KAWASAKI, E.; ABIRU, N.; EGUCHI, K. Prevention of type 1 diabetes: from the view point of  $\beta$  cell damage. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 66, p. S27-S32, 2004.

LI, W.; DAI, R.J.; YU, Y.H.; LI, L.; WU, C.M.; LUAN, W.W.; MENG, W.W.; ZHANG, X.S.; DENG, Y.L. Antihyperglycemic effect of *Cephalotaxus sinensis* leaves and GLUT4 translocation facilitating activity of its flavonoid constituents. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, p. 1123-1129, 2007.

LIU, X.J.; HE, A.B.; CHANG, Y.S.; FANG, F.D. Atypical protein kinase C in glucose metabolism. **Cellular Signalling**, v. 18, p. 2071-2076, 2006.

MACDONALD, P.E.; JOSEPH, J.W.; RORSMAN, P. Glucose-sensing mechanisms in pancreatic beta-cells. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 360, n. 1464, p. 2211-2225, 2005.

MAHLER, R.J.; ADLER, M.L. Clinical review 102: Type 2 Diabetes Mellitus: update on diagnosis, pathophysiology, and treatment. **Journal of Clinical Endocrine & Metabolism**, v. 84, n. 4, p. 1165-1169, 1999.

MALAISSÉ, W.J. Glucose-sensing by the pancreatic B-cell: the mitochondrial part. **International Journal of Biochemistry**, v. 24, p. 693-701, 1992.

MENEZES, P.R.; SCHWARZ, E.A.; SANTOS, C.A.M. In vitro antioxidant activity of species collected in Paraná. **Fitoterapia**, v. 75, p.398-400, 2004.

MENEZES, P.R.; SCHWARZ, E.A.; SANTOS, C.A.M. In vitro antioxidant activity of species collected in Paraná. **Fitoterapia**, v. 75, p.398-400, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Dia Mundial do Diabetes – Dados Estatísticos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009. Disponível em <<http://portal.saude.gov.br>>. Acesso em 25 Mar. 2009.

MORRAL, N. Novel targets and therapeutic strategies for type 2 diabetes. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 14, p. 169-175, 2003.

NORMAN, A.W.; LITWACK, G. **Hormones**. Second edition. Academic Press, 1997.

OHARA-IMAIZUMI, M.; NAGAMATSU, S. Insulin exocytotic mechanism by imaging technique. **Journal of Biochemistry**, v. 140, p.1-5, 2006.

O'BRIEN, R.M.; GRANNER D.K. Regulation of gene expression by insulin. **Physiological Reviews**, v. 76, p. 1109-61, 1996.

OIKNINE, R.; MOORADIAN, A.D. Drug therapy of diabetes in the elderly. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 57, p. 231-239, 2003.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). **Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005**. Ginebra: OMS, 2002. Disponível em: <<http://www.who.int>>. Acesso em: 17 Out. 2007.

ONG, K.C.; KHOO, H. Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. **Life Sciences**, v. 67, p. 1695-705, 2000.

PANDA, S.; KAR, A. Apigenin (4',5,7-trihydroxyflavone) regulates hyperglycemia, thyroid dysfunction and lipid peroxidation in alloxan-induced diabetic mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, p. 1543-1548, 2007.

PEREIRA, B.M.R.; GONÇALVES, L.C.; PEREIRA, N.A. Abordagem farmacológica de plantas recomendadas pela medicina folclórica como antiofídicas III – atividade antiedematogênica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 73, p.85-86, 1992.

PEREIRA, A.M.C.B.; FARIAS, M.R.; VARGAS, V.M.F. Study of the mutagenic activity of extracts of the plant *Wilbrandia ebracteata*. **Phytotherapy research**, v. 10, p.512-516, 1996.

PERFETTI, R.; AHMAD, A. Novel sulfonylurea and non-sulfonylurea drugs to promote the secretion of insulin. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 11, p. 218-223, 2000.

PETERS, R.R.; FARIAS, M.R.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Anti-inflammatory and analgesic effects of cucurbitacins from *Wilbrandia ebracteata*. **Planta Medica**, v. 63, p. 525-528, 1997.

PETERS, R.R.; SALEH, T.F.; LORA, M.; PATRY, C.; DE BRUM-FERNANDES, A.J.; FARIAS, M.R.; RIBEIRO DO VALE, R.M. Anti-inflammatory effects of the products from *Wilbrandia ebracteata* on carrageenan-induced pleurisy in mice. **Life Sciences**, v. 64, n. 26, p. 2429-37, 1999.

PETERS, R.R.; KREPSKY, P.B.; SIQUEIRA-JUNIOR, J.M.; ROCHA, J.C.S; BEZERRA, M.M.; RIBEIRO, R.A.; DE BRUM-FERNANDES, A.J.; FARIAS, M.R.; ROCHA, F.A.C.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Nitric oxide and cyclooxygenase may participate in the analgesic and anti-inflammatory effect of the cucurbitacins fraction from *Wilbrandia ebracteata*. **Life Sciences**, v. 73, n. 17, p. 2185-97, 2003.

PINENT, M.; BLAY, M.; BLADÉ, M.C.; SALVADÓ, M.J.; AROLA, L.; ARDEVOL, A. Grape seed-derived procyanidins have an antihyperglycemic effect in streptozotocin-induced diabetic rats and insulinomimetic activity in insulin-sensitive cell lines. **Endocrinology**, v. 145, n. 11, p. 4985-4990, 2004.

PIO CORRÊA. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**, 6. ed. Rio de Janeiro: Instituto Nacional Desenvolvimento Florestal, v. 4, 1984, p.199-200.

PIZZOLATTI, M.G.; CUNHA JR, A.; SZPOGANICZ, B.; SOUSA, E. Flavonóides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata* (Leguminosae). **Química Nova**, v. 26, p. 466-469, 2003.

- PORTO, M.L. **Flora Ilustrada do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre: Iheringia, 1974.
- PROIETTO, J. Mechanisms of insulin resistance caused by nutrient toxicity. **Hepatology Research**, v. 33, p. 87-91, 2005.
- RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.
- RENDEL, M. The role of sulphonylureas in the management of type 2 diabetes mellitus. **Drugs**, v. 64, n. 12, p. 1339-1358, 2004.
- RIZZINI, C.T., MORS, W.B. **Botânica Econômica Brasileira**. São Paulo: EDUSP, 1976, p.85.
- ROSA, R.S.; SCHMIDT, M.I. Diabetes *mellitus*: magnitude das hospitalizações na rede pública do Brasil, 1999-2001. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 17, n. 2, p. 123-153, 2008.
- SALSALI, A.; NATHAN, M. A review of types 1 and 2 diabetes mellitus and their treatment with insulin. **American Journal of therapeutics**, v. 13, n. 4, p. 349-361, 2006.
- SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, 799-806, 2001.
- SANTOS, R.I.; SANTOS, M.A.; SCHENKEL, E.P. Analysis of the plant drug *Wilbrandia ebracteata* (Cogn.) Cogn. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 34, p.300-302, 1996.
- SCARPELLO, J.H.B.; HOWLETT, H.C.S. Metformin therapy and clinical uses. **Diabetes and Vascular Disease Research**, v. 5, n. 3, p. 157-166, 2008.
- SCHENKEL, E.P.; FARIAS, M.R.; MAYER, R.; BREITMAIER, E.; RUCKER, G. Cucurbitacins from *Wilbrandia ebracteata*. **Phytochemistry**, v. 31, p. 1329-33, 1993.
- SEZIK, E.; ASLAN, M.; YESILADA, E.; ITO, S. Hypoglycaemic activity of *Gentiana olivieri* and isolation of the active constituent through bioassay-directed fractionation techniques. **Life Sciences**, v. 76, p. 1223-1238, 2005.
- SHARMA, B.; BALOMAJUMDER, C.; ROY, P. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of flavonoid rich extract from *Eugenia jambolana* seeds on streptozotocin induced diabetic rats. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 7, p. 2376-2383, 2008.
- SHARMA, S.B.; NASIR, A.; PRABHU, K.M.; MURTHY, P.S.; DEV, G. Hypoglycaemic and hypolipidemic effect of ethanolic extract of seeds of *Eugenia jambolana* in alloxan-induced diabetic rabbits. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, n. 2-3, p.201-206, 2003.
- SHIBANO, M.; KAKUTAMI, K.; TANIGUCHI, M.; YASUDA, M.; BABA, K. Antioxidant constituents in the dayflower (*Commelina communis* L.) and their  $\alpha$ -glucosidase-inhibitory activity. **Journal of Natural Medicine**, v. 62, p. 349-353, 2008.

SHISHEVA, A.; SHECHTER, Y. Quercetin selectively inhibits insulin receptor function in vitro and the bioresponses of insulin and insulinomimetic agents in rat adipocytes. **Biochemistry**, v. 31, p. 8059-8063, 1992.

SIQUEIRA, J.M.; PETERS, R.R.; GAZOLA, A.C.; KREPSKY, P.B.; FARIAS, M.R.; RAE, G.A.; BRUM-FERNANDES, A.J.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Anti-inflammatory effects of a triterpenoid isolated from *Wilbrandia ebracteata* Cogn. **Life Sciences**, v. 80, p.1382-1387, 2007.

SIQUEIRA, J.B.; GAZOLA, A.C.; FARIAS, M.R.; VOLKOV, L.; RIVARD, N.; BRUM-FERNANDES, A.J.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Evaluation of the antitumoral effect of dihydrocucurbitacin-B in both in vitro and in vivo models. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, 2009. [Epub ahead of print]

SILVA, F.R.M.B.; SZPOGANICZ, B.; PIZZOLATTI, M.G.; WILLRICH, M.A.V.; SOUSA, E. Acute effect of *Bauhinia forficata* on serum glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, p. 33-37, 2002.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora da UFSC, Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003.

SIMÕES, C.M.O, MENTZ, L.A., SCHENKEL, E.P., IRGANG, B.E., STEHMANN, JR. **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Editora UFRGS, 1996, p. 96– 7.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Consenso Brasileiro sobre Diabetes 2002. Diagnóstico e classificação do diabetes melito e tratamento do diabetes melito do tipo 2**. Rio de Janeiro: Diagraphic, 2003. 72 p.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Tratamento e Acompanhamento do Diabetes Mellitus – Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**. Rio de Janeiro: Diagraphic, 2007. 168p.

SRINIVASAN, K.; RAMARAO, P. Animal models in type 2 diabetes research: An overview. **Indian Journal of Medical Research**, v. 125, p. 451-471, 2007.

STOLAR, M.W.; HOOGWERF, B.J.; GORSHOW, S.M.; BOYLE, P.J.; WALES, D.O. Managing type 2 diabetes: going beyond glycemic control. **Journal of Managed Care Pharmacy**, v. 14, n. 5, p. S2-S19, 2008.

TAHA, C.; KLIP, A. The insulin signaling pathway. **Journal of Membrane Biology**, v. 169, p. 1-12, 1999.

TODD, J.F.; BLOOM, S.R. Incretins and peptides in the treatment of diabetes. **Diabetic Medicine**, v. 24, p. 223-232, 2007.

VATS, R.K.; KUMAR, V.; KOTHARI, A.; MITAL, A.; RAMACHANDRAN, U. Emerging targets for diabetes. **Current Science**, v. 88, p. 241-249, 2005.

WHO, World Health Organization. **Diabetes**. Fact Sheet nº 312. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/print.html>>. Acesso em: 30 Out. 2008.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global prevalence of diabetes – Estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27, p. 1047-1053, 2004.

YADAV, S.; PARAKH, A. Insulin therapy. **Indian Pediatrics**, v. 43, p. 863-872, 2006.

YAMADA, C.B.S. Fitoterapia sua história e importância. *Racine*, p. 50-51, 1998.

ZANATTA, L. et al. Effect of crude extract and fractions from *Vitex megapotamica* leaves on hyperglycemia in alloxan-diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 151-155, 2007.

YEAMAN, S.J.; ARMSTRONG, J.L.; BONAUAUD, S.M.; POINASAMY, D.; PICKERSGILL, L.; HALSE, R. Regulation of glycogen synthesis in human muscle cells. **Biochemical Society Transactions**, v. 29, n. 4, p. 537-541, 2001.

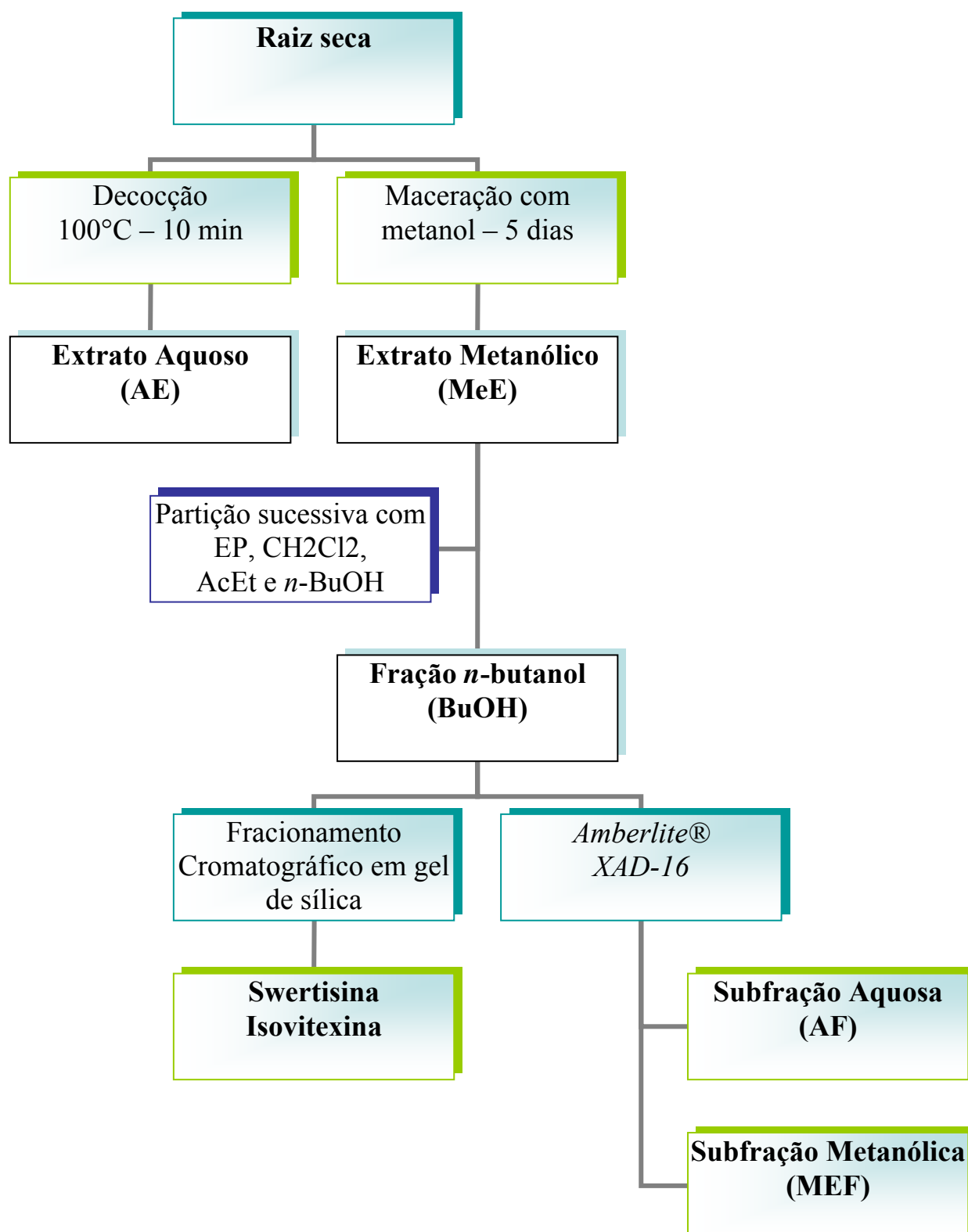
ZANATTA, L.; DE SOUSA, E.; CAZAROLLI, L.H.; JUNIOR, A.C.; PIZZOLATTI, M.G.; SZPOGANICZ, B.; SILVA, F.R.M.B. Effect of crude extract and fractions from *Vitex megapotamica* leaves on hyperglycemia in alloxan-diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p.151-155, 2007.

ZANATTA, L.; ROSSO, A.; FOLADOR, P.; FIGUEIREDO, M.S.; PIZZOLATTI, M.G.; LEITE, L.D.; SILVA, F.R.M.B. Insulinomimetic effect of kaempferol 3-neohesperidoside on the rat soleus muscle. **Journal of Natural Products**, v.71, p.532-535, 2008.

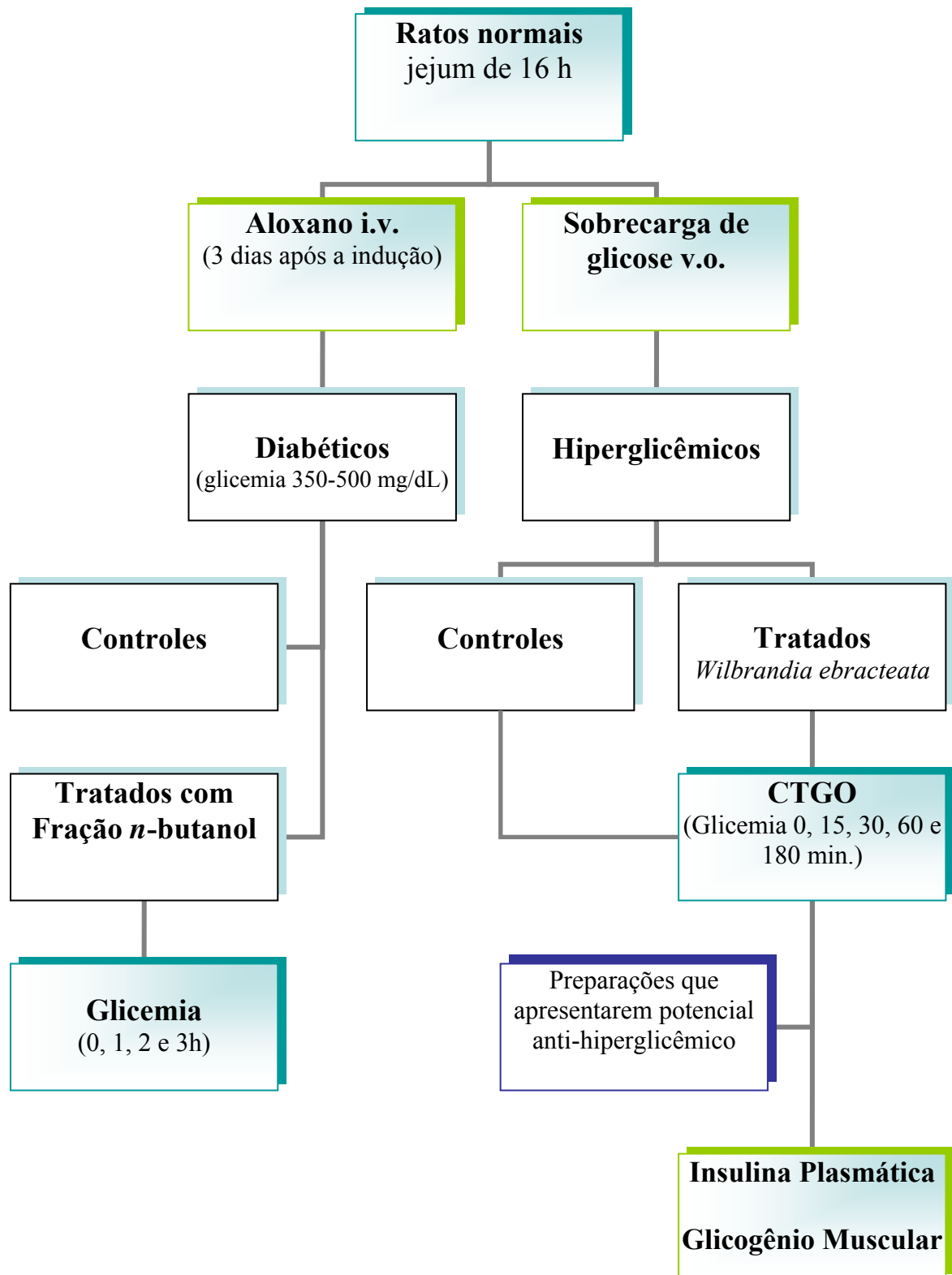
ZARZUELO, A.; JIMÉNEZ, I.; GÁMEZ, M.J.; UTRILLA, P.; FERNANDEZ, I.; TORRES, M.I.; OSUNA, I. Effects of luteolin 5-O-beta-rutinoside in streptozotocin-induced diabetic rats. **Life Sciences**, v. 58, n. 25, p.2311-2316, 1996.



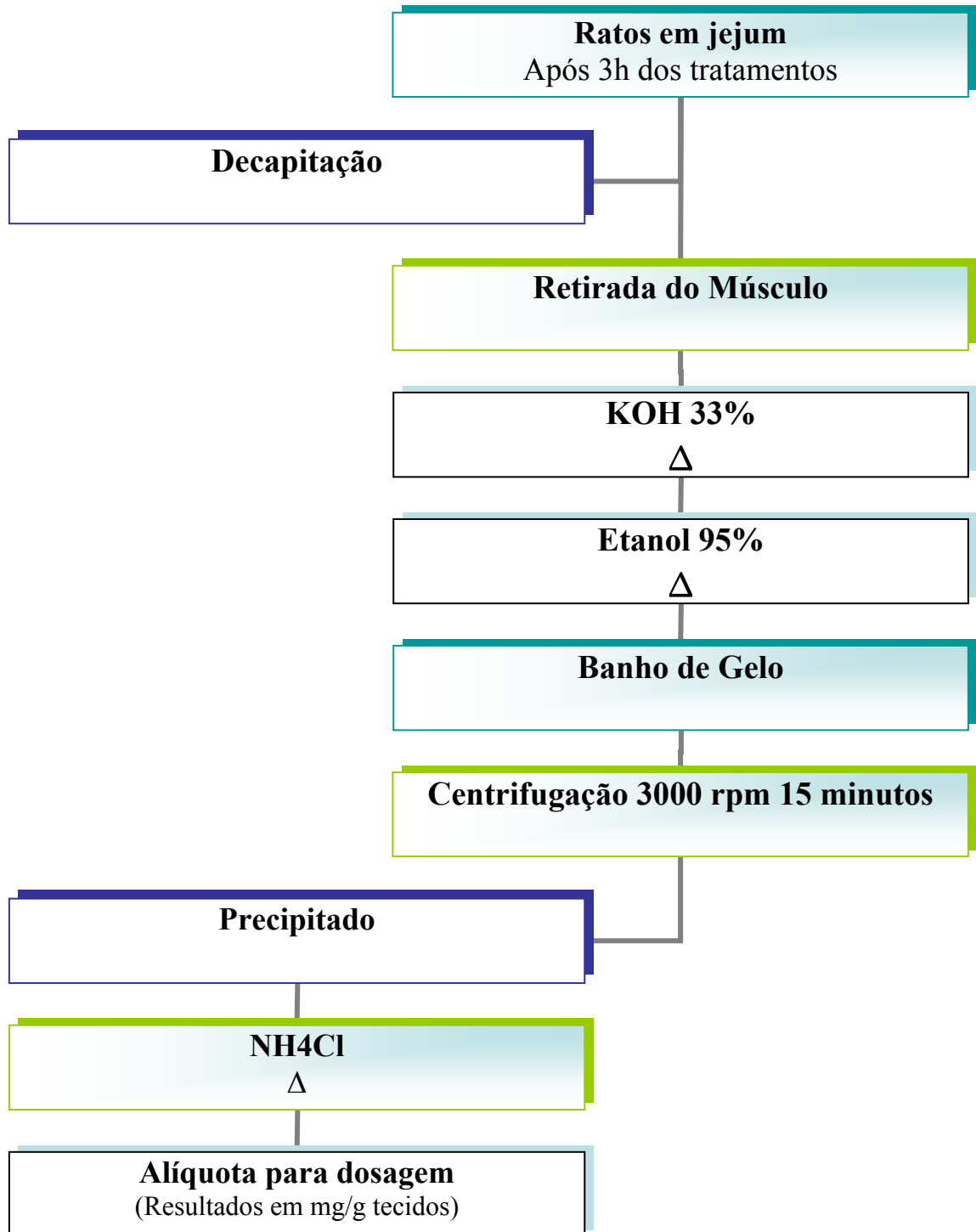
## APÊNDICES



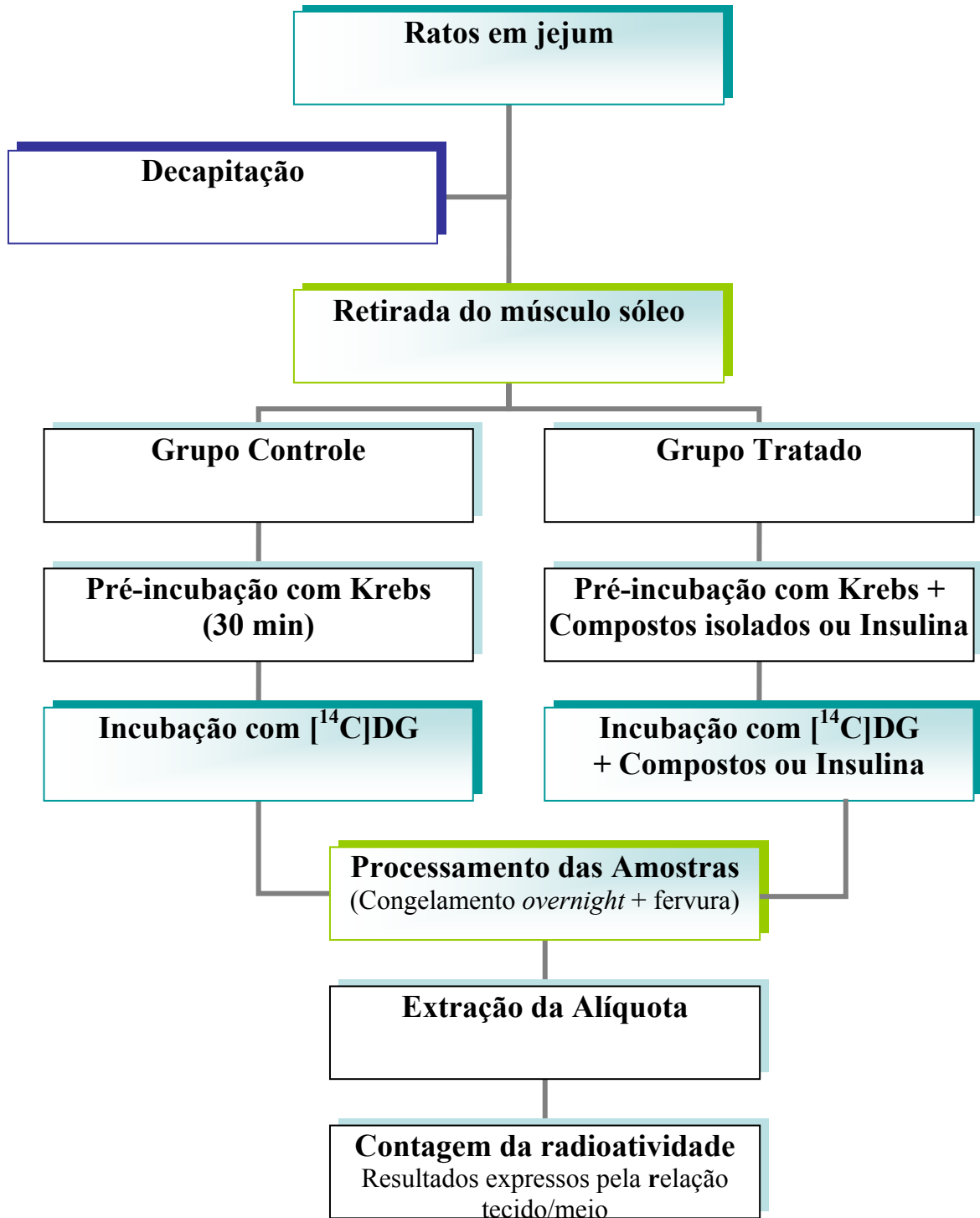
**Figura 7.** Obtenção dos extratos, frações e subfrações das raízes de *W. ebracteata* e isolamento das substâncias isovitexina e swertisina.



**Figura 8.** Fluxograma representativo dos tratamentos dos animais normais hiperglicêmicos e diabéticos.



**Figura 9.** Representação esquemática da extração de glicogênio muscular.



**Figura 10.** Representação esquemática do ensaio de captação de [<sup>14</sup>C]-DG no músculo para a curva de dose-resposta com os compostos isolados de *W. ebracteata* ou insulina.

## ANEXO 1

### Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais

#### Resultado de Solicitação de Protocolo

**Protocolo**

PP00223

**Título**

Potencial hipoglicemiante de extratos, frações e compostos provenientes de plantas - *Cecropia glaziovii* e *Wilbrandia ebracteata*: otimização da bioatividade em microesferas.

**Data de Entrada**

16/05/2008

**Resultado:**

Aprovado

**Data/Prazo**

ad referendum 07/07/2008

**Considerações**

Ofício nº 094/CEUA/PRPe/2008

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Fátima Regina Mena Barreto Silva, Departamento de Bioquímica - CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por 2 (dois) anos, para a utilização de 622 ratos (*Rattus norvegicus*).

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

**Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)**

**Data 07/10/2010**

Data 07/07/2008

**Parecer(es):**



**Prof. Assóc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC  
PRESIDENTE**

## ANEXO 2

### Participação em trabalhos publicados neste tema

CAZAROLLI, L.H.; ZANATTA, L.; ALBERTON, E.H.; FIGUEIREDO, M.S.; FOLADOR, P.; DAMAZIO, R.G.; PIZZOLATTI, M.G.; SILVA, F.R.M.B. Flavonoids: cellular and molecular mechanism of action in glucose homeostasis. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 10, p.1032-8, 2008.

CAZAROLLI, L.H.; ZANATTA, L.; ALBERTON, E.H.; FIGUEIREDO, M.S.; FOLADOR, P.; DAMAZIO, R.G.; PIZZOLATTI, M.G.; Silva, F.R.M.B. Flavonoids: prospective drug candidates. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 13, p.1429-40, 2008.

CAZAROLLI, L.H.; FOLADOR, P.; MORESCO, H.H.; BRIGHENTE, I.M.; PIZZOLATTI, M.G.; SILVA, F.R.M.B. Mechanism of action of the stimulatory effect of apigenin-6-C-(2"-O-alpha-l-rhamnopyranosyl)-beta-l-fucopyranoside on (14)C-glucose uptake. **Chemico-Biological Interactions**. v. 179, p. 407-412, 2009.

ZANATTA, L.; ROSSO, A.; FOLADOR, P.; FIGUEIREDO, M.S.; PIZZOLATTI, M.G.; LEITE, L.D.; SILVA, F.R.M.B. Insulinomimetic effect of kaempferol 3-neohesperidoside on the rat soleus muscle. **Journal of Natural Products**, v.71, p.532-535, 2008.