

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

**EFEITO INSULINO-MIMÉTICO DO CANFEROL 3,7-O-(α)-L-
DIRAMNOSÍDEO NA GLICEMIA E NA CAPTAÇÃO DA 2-[14 C (U)]-
DEOXI-D-GLICOSE EM MÚSCULO SÓLEO DE RATOS**

ANA PAULA JORGE

Florianópolis

2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

EFEITO INSULINO-MIMÉTICO DO CANFEROL 3,7-O-(α)-L-DIRAMNOSÍDEO NA
GLICEMIA E NA CAPTAÇÃO DA 2-[14 C (U)]-DEOXI-D-GLICOSE EM MÚSCULO
SÓLEO DE RATOS

Dissertação Apresentada por ANA PAULA JORGE para Obtenção do Grau de
Mestre em Farmácia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. FÁTIMA REGINA MENA BARRETO SILVA

Florianópolis
2003

JORGE, Ana Paula.

Efeito Insulino-Mimético do Canferol 3,7-O-(α)-L-Diramnosídeo na Glicemia e na Captação da 2-[14 C (U)]-Deoxi-D-Glicose em Músculo Sóleo de Ratos/ Ana Paula Jorge. Florianópolis, 2003. 92 p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós - Graduação em Farmácia

1. Canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo. 2. Bauhinia forficata. 3. Flavonóides. 4. Diabetes melito. 5. Aloxana.

Dedico este trabalho aos meus pais, Alberto e Marilda, que por vezes tão longe fisicamente, estiveram sempre, através de seu carinho, presentes e me apoiando em todos os momentos da minha vida.

Agradecimento Especial

À orientadora Prof^a. Dr^a. Fátima Regina Mena Barreto, pela confiança em mim depositada. E que com sua dedicação, paciência e seriedade soube conduzir de forma tão tranqüila e objetiva este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus irmãos, Luiz e Laura, pelo amor incondicional e pela compreensão em todos os momentos desta caminhada.

Ao Ricardo, um grande companheiro, que sempre me apoiou e esteve ao meu lado em todas as situações.

Às colegas e amigas de trabalho, Bernardete e Vivian, pois sem seu apoio e disposição seria ainda mais difícil a realização deste trabalho.

Às colegas de laboratório Ariane, Karine, Eliandra, Leila, Luisa, Cinira e Csele, por todo os momentos de apoio, carinho e de trocas de experiências.

Aos professores Dr Moacir G. Pizzolatti e Dr^a Tânia Beatriz C. Pasa pelos ensinamentos e colaboração no desenvolvimento do trabalho.

À doutoranda Ilana por seu empenho e disponibilidade sempre que necessário.

Às professoras Dr^a Tânia Beatriz C. Pasa e Dr^a Rozangela Curi Pedroza por apoiarem nosso trabalho compartilhando conosco conhecimentos preciosos, materiais e equipamentos.

Aos professores, funcionários e colegas do Curso de Pós-Graduação pelos momentos vividos e ensinamentos compartilhados.

Ao Departamento de Farmacologia, principalmente ao professor Dr^o João Batista Calixto, pelo uso do espectrômetro de cintilação.

A todos os amigos e colegas não mencionados, mas que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

A Deus por me conceder a oportunidade de realizar mais um sonho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Diabetes Melito.....	1
1.2 Insulina.....	2
1.3 Mecanismo de Ação da Insulina	4
1.4 Transportadores de Glicose.....	5
1.5 Regulação do Metabolismo da Glicose	7
1.6 Percurso Renal da Glicose.....	8
1.7 Terapia com Insulina.....	9
1.8 Hipoglicemiantes Orais.....	10
1.8.1 Inibidores da α -glicosidase	10
1.8.2 Tiazolidinadionas.....	11
1.8.3 Biguanidas	11
1.8.4 Sulfoniluréias.....	11
1.9 <i>Bauhinia forficata</i>	12
1.10 Lipossomas.....	15
1.11 Diabetes Experimental	16
2 JUSTIFICATIVA.....	19

3	<u>OBJETIVOS.....</u>	21
4	<u>MATERIAIS E MÉTODOS</u>	23
4.1	MATERIAIS	23
4.1.1	Reagentes.....	23
4.1.2	Substâncias Radioativas	24
4.1.3	Obtenção de Compostos Naturais da Espécie Vegetal <i>Bauhinia forficata</i>	24
4.1.4	Compostos Majoritários Isolados das Folhas da <i>Bauhinia forficata</i>	27
4.1.5	Equipamentos Utilizados	28
4.2	MÉTODOS	29
4.2.1	Animais	29
4.2.2	Procedimento Anestésico.....	29
4.2.3	Modelo do Diabetes Experimental	29
4.2.4	Preparação do Composto Canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo em Membranas Unilamelares de Fosfatidilcolina (lipossomas)	30
4.2.5	Ensaios para Determinação do Modelo Experimental do Diabetes.....	33
4.2.6	Ensaios para Determinação da Glicemia de Ratos Normais e Diabéticos	33
4.2.7	Ensaios para Determinação da Glicosúria de Ratos Normais e Diabéticos	33
4.2.8	Determinação da Glicemia e Glicosúria.....	34
4.2.9	Ensaios para Avaliação do Efeito do Canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo Incorporado (lipossomas) na Glicemia de Ratos Normais e Diabéticos	35
4.2.10	Ensaios e Medidas da Captação de Glicose no Músculo Sóleo <i>in vitro</i>	35
4.2.11	Ensaios e Medidas da Síntese Protéica no Músculo Sóleo <i>in vitro</i>	39
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
5	<u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	42
5.1	Caracterização do Modelo Experimental do Diabetes Melito Tipo 1 Induzido com Diferentes Doses de Aloxana.....	42
5.2	Efeito do Canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo na Glicemia de Ratos em Função do Tempo	44

5.3 Efeito Comparativo da Administração do Canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo Incorporado Lipossomas de Fosfatidilcolina e do Canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo na Glicemia de Ratos	46
5.4 Captação da ^{14}C- D- Glicose no Músculo Sóleo de Ratos Normais.....	50
5.4.1 Curva de Captação Basal da ^{14}C - D- Glicose em Músculo Sóleo	51
5.4.2 Curva de Dose - Resposta da Insulina na Captação da ^{14}C - D- Glicose em Músculos de Ratos Normais.....	52
5.4.3 Curva de Dose - Resposta do Canferol 3-7-O-(α)-L-diramnosídeo na Captação da ^{14}C - D - Glicose em Músculos de Ratos Normais.....	54
5.5 Estudo da Síntese Protéica em Músculo de Ratos Normais e Diabéticos	56
5.6 Efeito do Canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo na Glicose Urinária de Ratos Normais e Diabéticos.....	59
<u>6 CONCLUSÕES</u>	<u>61</u>
<u>7 PERSPECTIVAS.....</u>	<u>62</u>
<u>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	<u>63</u>
<u>9 ANEXOS</u>	<u>74</u>
9.1 Certificado de Apresentação de Trabalho em Congresso.....	75
9.2 Aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Metabolismo da Glicose no Estado Bem Alimentado.....	4
Figura 2 - Ilustração Esquemática do Modelo de Ação da Insulina na Regulação da Captação de Glicose em Tecidos Dependentes De Insulina.....	6
Figura 3 - Representação Esquemática da Estrutura dos Néfrons.....	9
Figura 4 – Espécie Vegetal <i>Bauhinia Forficata</i>	14
Figura 5 – Representação Esquemática do Corte Transversal de um Lipossoma Unilamelar	16
Figura 6 - Representação Esquemática do Fracionamento do Extrato Bruto Hidroalcoólico das Folhas de <i>B. Forficata</i>	26
Figura 7 - Estrutura Química do Composto Canferol.....	27
Figura 8 - Estrutura Química do Composto Canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo e do Composto Quercetina 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo.....	27
Figura 9 - Estrutura Química do Composto Canferol 3-O-(α)-Glicosídeo-(1"-6")- ramnosídeo-7-O-(α)-L-ramnosídeo) e do Composto Quercetina 3-O-(α)- Glicosídeo-(1"-6")-ramnosídeo-7-O-(α)-L-ramnosídeo.....	28
Figura 10 - Indução do Diabetes	30
Figura 11 - Espectros de UV do Canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo Incorporado ...	32
Figura 12 - Representação Esquemática da Metodologia da Captação de Glicose no Músculo Incubado <i>in vitro</i>	38
Figura 13 - Representação Esquemática da Metodologia da Síntese Protéica no Músculo Incubado <i>in vitro</i>	40
Figura 14 - Efeito das Diferentes Doses de Aloxana na Glicemia de Ratos.....	43
Figura 15 - Curva de Tempo do C-diRh na Glicemia de Ratos Diabéticos.....	45
Figura 16 - Efeito do LC-diRh e do C-diRh na Glicemia de Ratos Normais.....	48
Figura 17 - Efeito do LC-diRh e do C-diRh na Glicemia de Ratos Diabéticos.....	49
Figura 18 - Músculo Sóleo de Ratos Normais e Diabéticos.....	51
Figura 19 - Curva de Tempo da Captação Basal da [¹⁴ C]DG em Músculo Sóleo de Ratos Normais.....	52

Figura 20 - Curva de Dose-Resposta da Insulina na Captação da [¹⁴ C]DG em Músculo Sóleo de Ratos Normais	53
Figura 21 - Curva De Dose-Resposta do C-diRh na Captação da [¹⁴ C]DG em Músculo de Ratos Normais.....	54
Figura 22 - Síntese Protéica Basal em Músculo de Ratos Normais.	57
Figura 23 - Efeito do C-diRh na Síntese Protéica em Músculo Sóleo de Animais Normais e Diabéticos	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Soluções Estoque para o Preparo do KRb.....	35
Tabela 2 - Concentrações Iônicas do KRb no Líquido Intra e Extracelular.....	36
Tabela 3 - Efeito da Administração Intravenosa de Aloxana no Peso Corporal, Glicemia, Peso do Músculo e na Relação Peso Muscular/Corporal após Três Dias da Indução do Diabetes	44
Tabela 4 - Conversão da Molaridade para Unidades Internacionais de Insulina.....	53
Tabela 5 - Efeito Comparativo do Percentual Estimulatório da Insulina e do C-diRh na Captação da [¹⁴ C]DG no Músculo Sóleo	55
Tabela 6 - Efeito da Administração Oral de C-diRh na Glicose Urinária de Ratos Normais e Diabéticos.	60

LISTA DE ABREVIATURAS

[¹⁴ C]DG	2-[¹⁴ C (U)]-Deoxi-D-Glicose
[¹⁴ C]leucina	L-[U - ¹⁴ C] Leucina
AcOEt	Acetato de etila
AL	Aloxana
ATP	Adenosina trifosfato
<i>B. forficata</i>	<i>Bauhinia forficata</i>
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia de camada delgada
C-diRh	Canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo
CMV	Conselho Brasileiro de Medicina Veterinária
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
cpm	Contas por minuto
°C	Graus Celsius
DM	Diabetes Melito
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucléico
DO	Densidade óptica
ϵ	Coeficiente de absorção molar
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EtOH	Etanol
g/L	Gramas por litro
GLUT	Transportador de glicose
GOD	Glicose oxidase
h	Horas
IDDM	Diabetes melito dependente de insulina
IRS-1	Substrato 1 do receptor de insulina
K ⁺	Potássio

Kg	Quilograma
K_m	Constante cinética de Michaelis Menten
KRb	Tampão Krebs Ringer – bicarbonato
LC-diRh	Canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo incorporado em membranas lipossômicas de fosfatidilcolina
μ Ci	Micro Curie
μ L	Microlitro
μ M	Micromolar
mg/dL	Miligrama por decilitro
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmol	Milimol
n	Número de amostras
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -butanol
nm	nanômetro
NIDDM	Diabetes melito não dependente de insulina
nM	nanomolar
NPH	Insulina com protamina neutra de Hagedorn
OMS	Organização Mundial de Saúde
POD	Peroxidase
RMN ^{13}C	Ressonância magnética nuclear de carbono – 13
RMN ^1H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RNA	Ácido ribonucléico
STZ	Estreptozotocina
TCA	Ácido tricloroacético
T/M	Relação tecido meio
UI	Unidade internacional
UV	Ultravioleta
v/v	Relação volume por volume
$V_{m\acute{a}x}$	Velocidade máxima

RESUMO

O diabetes melito é caracterizado como um grupo de desordens metabólicas que afeta o metabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras. Tem como quadro principal os elevados níveis glicêmicos resultantes de defeitos na secreção e/ou ação da insulina. A utilização de plantas medicinais é uma alternativa cada vez mais difundida no tratamento do diabetes, em função do baixo custo comparado aos demais medicamentos. Entre as plantas amplamente utilizadas pela medicina popular está a *Bauhinia forficata*, popularmente conhecida como “Pata de Vaca”. Porém pouco se sabe a respeito da ação medicinal e da composição micromolecular desta planta. Recentemente foram isolados compostos presentes nas frações acetato de etila e *n*-butanólica das folhas da *B. forficata*, entre estes o composto majoritário, canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo, apresentou efeito hipoglicemiante. O presente trabalho teve como objetivo melhorar o efeito hipoglicemiante do composto através da técnica de incorporação em membranas lipossômicas unilamelares e estudar a ação deste composto na captação da [14 C]DG e na síntese protéica em músculo sóleo de ratos normais. Foram utilizados ratos Wistar machos entre 42-54 dias de idade. O diabetes foi induzido com 50 mg/kg de aloxana. Nos experimentos onde foram avaliados os níveis glicêmicos, as dosagens foram realizadas nos tempos 0, 1, 2, 3, 6 e 24 h após administração do canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo, via oral. A captação de [14 C]DG foi estudada após incubação do músculo sóleo com canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo na presença do radioisótopo, no período de 1 h. O canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo reduziu significativamente a glicemia em ratos diabéticos num período agudo de tratamento, efeito otimizado em função da dose pela incorporação em membranas lipossômicas. A captação da [14 C]DG foi estimulada significativamente pelo canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo, demonstrando um perfil, percentualmente, tão eficaz quanto a ação da insulina, sendo estes valores considerados, biologicamente, com ação insulino-mimética. A síntese protéica foi estudada através da incorporação de [14 C] leucina em músculo sóleo de ratos normais e diabéticos, na presença ou não de canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo. A síntese protéica e também os níveis de glicose urinária não foram alterados por este composto, no modelo experimental estudado. Destes resultados podemos concluir que o canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo incorporado em lipossoma reduziu significativamente a glicemia em ratos diabéticos, otimizando a ação hipoglicemiante do composto glicosídeo, estimulou a captação de glicose no músculo sóleo de ratos normais, não alterou a síntese protéica e nem a glicosúria em ratos normais e diabéticos, exibindo um efeito insulino-mimético nestes parâmetros estudados.

Palavras-chave: Canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo; *Bauhinia forficata*; Flavonóides; Diabetes melito; Aloxana.

ABSTRACT

Diabetes mellitus consists of a group of metabolic disorders that affect the metabolism of carbohydrates, proteins and fats. The main feature of this disease is the elevated glycaemia that results from defects in the release and/or action of insulin. The use of medicinal plants as an alternative for the treatment of diabetes is proposed with increasing frequency, due to their low cost when compared to other medicines. Among the plants widely used in popular medicine is *Bauhinia forficata*, popularly known as “Pata de Vaca” (“cow’s hoof”). However, little is known with respect to the medicinal action and the micromolecular composition of this plant. Several compounds were recently isolated from the ethyl acetate and *n*-butanolic fractions of the leaves of *B. forficata*, among which the principal constituent, kaempferol 3,7-O-(α)-L-dirhamnoside, exhibited a hypoglycaemic effect. The present study had the objectives of improving the hypoglycaemic effect of the compound by its incorporation into unilamellar liposome membranes and the study of the action of this compound on the uptake of [14 C]DG as well as on protein synthesis in the soleus muscle of normal rats. Male Wistar rats were used between 42 and 54 days of age. Diabetes was induced with 50 mg/kg of alloxan. In the experiments in which glycaemia was assessed, the doses were administered 0, 1, 2, 3, 6 and 24 h after administration of kaempferol 3,7-O-(α)-L-dirhamnoside, per oral. The uptake of [14 C]DG was determined after a 1 h incubation of the soleus muscle with kaempferol 3,7-O-(α)-L-dirhamnoside and the radioisotope. Kaempferol 3,7-O-(α)-L-dirhamnoside significantly reduced the glycaemia in diabetic rats submitted to an acute treatment, an effect that was improved by its incorporation into liposome membranes. The uptake of [14 C]DG was significantly stimulated by kaempferol 3,7-O-(α)-L-dirhamnoside, which exhibited a profile as efficient as that of insulin and enabled it to be considered, on the basis of these values, in biological terms as an insulin-mimetic. Protein synthesis was determined by the incorporation of [14 C] leucine in the soleus muscle of normal and diabetic rats, in the presence or not of kaempferol 3,7-O-(α)-L-dirhamnoside. Protein synthesis and the levels of urinary glucose were unaltered by this compound in the experimental model used. From these results we can conclude that kaempferol 3,7-O-(α)-L-dirhamnoside uptake in liposomes significantly reduced the glycaemia in diabetic rats, optimising the hypoglycaemic action of the glycoside compound, it also stimulated glucose uptake in the soleus muscle of normal rats, and did not alter protein synthesis nor glycosuria in normal and diabetic rats, thus exhibiting an insulin-mimetic effect on the studied parameters.

Key words: Kaempferol 3,7-O-(α)-L-dirhamnoside; *Bauhinia forficata*; Flavonoids; Diabetes mellitus; Alloxan.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes Melito

Diabetes Melito (DM) é um dos mais importantes problemas de saúde mundial, apresentando altos índices de prevalência e mortalidade. Existem mais de 150 milhões de diabéticos no mundo e a previsão é de que este número alcance 300 milhões ou mais em 2025 (ABDEL-BARRY et al., 1997; JAOUHARI et al., 2000; BOYLE et al., 2001; WHO, 2002). A doença tem como sintomas clássicos a polidipsia, poliúria e polifagia, embora freqüentemente estejam ausentes. Poderá existir hiperglicemia de grau suficiente para causar alterações funcionais ou patológicas por um longo período antes que o diagnóstico seja estabelecido (WHO, 2002; BEARDSALL et al., 2003).

Classicamente o diabetes não é definido como uma única doença pois não apresenta uma etiologia única e distinta. O DM é um conjunto de desordens metabólicas que levam a distúrbios no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos e que têm como aspecto central à hiperglicemia. Estas alterações são secundárias a defeitos na secreção, ação da insulina ou ambos (NORMAN; LITWACK, 1997; KAMESWARA RAO et al., 1999; ALARCON-AGUILAR et al., 2000; YADAV et al., 2002).

Clinicamente existem duas classificações gerais para o diabetes: Tipo 1 ou insulino-dependente (IDDM) e o Tipo 2 ou não insulino-dependente (NIDDM). O diabetes do tipo 1 é conhecido como diabetes juvenil, é uma desordem autoimune caracterizada pela destruição das células β -pancreáticas (BEARDSALL et al., 2003). A amplitude da destruição das células é variável, mas geralmente é mais rápida em crianças do que em adultos e leva a falha na secreção endógena de insulina (NORMAN; LITWACK, 1997; PERFETTI, AHMAD, 2000), sendo então o tratamento indicado para estes pacientes o uso contínuo de insulina exógena. Já o tipo 2 é o diabetes do adulto e é caracterizado por uma deterioração progressiva da função das células β -pancreáticas. Há relativa deficiência na secreção de insulina ou resistência dos tecidos alvo a este hormônio (BEARDSALL et al., 2003). O diabetes

do tipo 2 está intimamente associado à obesidade pelo aumento das células adiposas e diminuição dos receptores de insulina nos tecidos alvo (internalização). Inicialmente, o fígado e o tecido muscular perdem a sensibilidade à ação da insulina. Na tentativa de compensar esta perda o pâncreas passa a produzir o hormônio em maior quantidade e conforme a doença progride pode haver um “esgotamento” das células β e secundariamente, uma deficiência absoluta de insulina (KAMESWARA RAO et al., 1999; ISLAS-ANDRADE et al., 2000; ROSAK, 2002). Para os diabéticos do tipo 2 o tratamento inicial é em função da perda de peso o que inclui dieta balanceada, prática de exercícios físicos e posteriormente o uso de hipoglicemiantes orais e em casos mais raros, doses moderadas de insulina (OIKNINE; MOORADIAN, 2003).

O DM apresenta como características a hiperglicemia, polidipsia, poliúria, polifagia, emagrecimento, repercussões no metabolismo glicídico, lipídico, protéico e hidro mineral. A longo prazo, pode ocorrer macroangiopatia, aterosclerose, lesões na microcirculação que levam ao comprometimento dos olhos, rins, nervos, músculos, pele, ossos, pulmões entre outros, causando nestes, danos funcionais endoteliais, espessamento da membrana basal, aumento da viscosidade e adesividade plaquetária, agregação eritroplaquetária e microtrombose (LACERDA, 1988; BALL; BARBER, 2003).

1.2 Insulina

A insulina é um hormônio peptídico sintetizado nas células β das ilhotas de Langerhans a partir de um precursor de 110 aminoácidos, a pré-pró-insulina, que posteriormente é clivada no retículo endoplasmático dando origem à pró-insulina. Esta é transportada para o complexo de Golgi onde é convertida à insulina. Este produto final é composto por duas cadeias peptídicas (A e B) unidas por duas pontes dissulfeto. A cadeia A (α) é formada por 21 resíduos de aminoácidos e a cadeia B (β) possui 30 (LE FLEM et al., 2002).

A glicose é o principal estímulo para a secreção de insulina e é mais eficiente quando administrada por via oral, em função da estimulação de outros hormônios como os gastrintestinais (gastrina, secretina, colecistocinina entre outros) e da atividade vagal, que promovem a secreção do hormônio. Quando estimulada pela glicose esta secreção é bifásica, atinge um pico entre 1 e 2 minutos após a ingestão, quando ocorre a liberação da insulina armazenada, fase de curta duração. Já a segunda fase é mais longa e tem início mais tardio, 15 a 20 minutos após o estímulo da glicose, após a síntese do hormônio (BRELJE; SORENSON, 1988; BEARDSALL et al., 2003). Os principais órgãos envolvidos com a metabolização da insulina são o fígado e os rins, onde, as insulinasas, provavelmente, promovem a hidrólise das pontes dissulfeto, com posterior proteólise. A meia-vida da insulina circulante é de 3-5 minutos (CHEATUM; KAHN, 1995).

A secreção da insulina inicia-se, basicamente, em função da hiperglicemia, que resulta em níveis intracelulares aumentados de ATP, que acabam por fechar os canais de potássio (K^+) dependentes de ATP. A diminuição da entrada do K^+ resulta em despolarização das células β -pancreáticas e abertura dos canais de cálcio. O conseqüente aumento do cálcio intracelular desencadeia a secreção do hormônio (RANG et al., 2000; GRIBBLE; REIMANN, 2003; OIKNINE; MOORADIAN, 2003).

Conforme descrito anteriormente a regulação dos níveis glicêmicos é extremamente dependente da insulina, principalmente no que diz respeito a utilização da glicose pelos tecidos periféricos e hepático. A insulina diminui a concentração de glicose no sangue pela inibição da produção hepática e estímulo da captação e metabolização da glicose pelo músculo e pelo tecido adiposo (DEVLIN, 1997; BEARDSALL et al., 2003; RODEN; BERNROIDER, 2003). A figura 1 mostra a rota de utilização da glicose após a ingestão.

Quando ausente, entre outros efeitos, a falta de insulina leva ao aumento dos níveis glicêmicos, diminuição da captação da glicose pelos tecidos periféricos e redução da síntese protéica devido à diminuição do transporte de aminoácidos para o músculo. Além disso, os aminoácidos passam a ser utilizados como substrato para a gliconeogênese. A ação lipogênica é perdida, bem como o efeito antilipolítico,

elevando os níveis plasmáticos de ácidos graxos (PONSSSEN et al., 2000; BEARDSALL et al., 2003; RODEN; BERNROIDER, 2003).

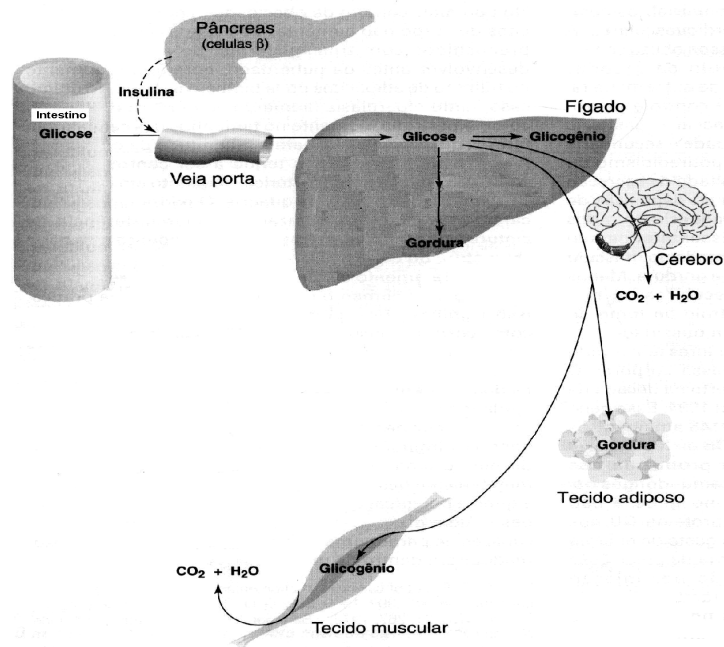


Figura 1 - Metabolismo da glicose no estado bem alimentado. Adaptado de Devlin, 1997.

1.3 Mecanismo de Ação da Insulina

A fosforilação é um mecanismo fundamental na regulação biológica de determinadas proteínas. É através dela que vários neurotransmissores, hormônios e fármacos produzem os efeitos fisiológicos, ativando segundos mensageiros e modulando as respostas biológicas. A insulina é um hormônio peptídico essencial que exerce diversos efeitos fisiológicos através da indução da fosforilação de proteínas, causando o aumento do transporte de glicose, mitogênese e regulação de vias enzimáticas (NESTLER; GREENGARD, 1994; NYSTROM; QUON, 1999).

Para exercer os efeitos sobre o metabolismo, a insulina liga-se a receptores de membrana. Os receptores da insulina são formados por 4 subunidades ligadas através de pontes dissulfeto, duas subunidades α , localizadas extracelularmente e que possuem os domínios de ligação da insulina e duas subunidades β ,

transmembrana, que possuem atividade de proteína tirosina cinase (NYSTROM; QUON, 1999; LE FLEM et al., 2002). Após a ligação da insulina na subunidade α do receptor há uma sinalização para a subunidade β que se autofosforila, tornando-se uma proteína cinase ativada dando início a cascata de fosforilação de outras enzimas, via transdução de sinais. Primeiramente ocorre a fosforilação da proteína denominada substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1), que fosforilada serve como “âncoradouro” para outras proteínas efetoras e ainda a ativação do fosfatidilinositol 3-cinase, molécula essencial no estímulo da translocação dos GLUT-4 e captação da glicose, finalizando o processo com a internalização do complexo insulina-receptor (HAYASHI et al., 1997; NYSTROM; QUON, 1999; TURINSKY; DAMRAU-ABNEY, 1999; WATSON; PESSIN, 2001).

1.4 Transportadores de Glicose

O transporte da glicose através da membrana ocorre por difusão facilitada, um processo independente de energia que utiliza carregadores de proteínas para o transporte (GLUT) (HAYASHI et al., 1997; RICHTER, 1998). Existem 11 isoformas de GLUTs identificadas no genoma humano, porém apenas os GLUTs 1-5, 8 e 9 estão relacionados ao transporte de glicose. O GLUT 1 é pouco abundante e é expresso principalmente em eritrócitos humanos e células endoteliais das veias do cérebro. O GLUT 3 está presente em neurônios e, juntos (GLUTs 1 e 3) transportam glicose através da barreira hemato-encefálica. O GLUT 2 é um transportador de baixa afinidade presente no fígado, intestino, rins e células β pancreáticas. O GLUT 4 é a isoforma presente no músculo esquelético de humanos e ratos, também está presente em adipócitos. A isoforma 4 é o principal transportador de glicose responsivo à insulina. Já o GLUT 5 é um transportador de frutose expresso no intestino. E os transportadores mais recentemente descobertos são os GLUTs 8 e 9, envolvidos no desenvolvimento de blastocistos (8) ou no cérebro e leucócitos (9) (HAYASHI et al., 1997; WATSON; PESSIN, 2001). Como o GLUT 4 é o principal transportador de glicose estimulado pela insulina, também é o maior alvo de estudos. Sua principal função está relacionada ao aumento da captação de glicose

pelos tecidos periféricos (HAYASHI et al., 1997; SHIMOKAWA et al., 2000; WATSON; PESSIN, 2001).

A insulina estimula a captação da glicose aumentando o número de transportadores na membrana. Existem hipóteses de que este aumento influenciado pela insulina possa ocorrer por três diferentes modos: 1) alteração da atividade intrínseca de transporte de GLUT 4 para a superfície celular; 2) através da regulação positiva da expressão de proteínas GLUT 4 pelo aumento da biossíntese e/ou diminuição da degradação; 3) ou ainda, promovendo a translocação das vesículas intracelulares pré-existentes, que contêm os receptores, para a membrana celular, sendo este o mecanismo mais difundido (WATSON; PESSIN, 2001; MOORE et al., 2003). O esquema a seguir mostra a dinâmica do estímulo da captação da glicose após a ligação da insulina ao receptor.

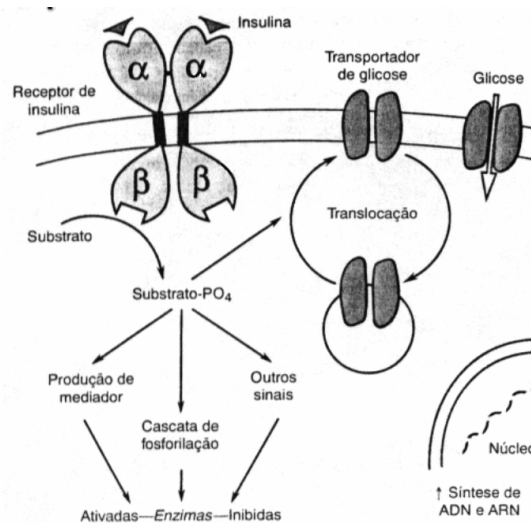


Figura 2 - Ilustração esquemática do modelo de ação da insulina na regulação da captação de glicose em tecidos dependentes de insulina. Adaptado de Gilman et al., 1991.

1.5 Regulação do Metabolismo da Glicose

A fim de manter o balanço energético ingerimos alimentos na forma de carboidratos, lipídeos e proteínas, macronutrientes da dieta. Contudo, a alimentação não é um processo contínuo, o organismo dispõe de reservas energéticas para os períodos de jejum mais prolongado. As principais fontes de energia do corpo são o glicogênio e gordura (NEWSHOLME, 1993; BEARDSALL et al., 2003).

A glicose é o carboidrato energético mais importante da dieta, após ser absorvida causa rápida secreção de insulina, que por sua vez promove a captação, armazenamento e rápida utilização da glicose pelos tecidos corporais, principalmente o músculo, tecido adiposo e o fígado. A glicose é a única fonte energética utilizada, em quantidades significativas, por algumas células especializadas e o principal combustível utilizado pelo cérebro (BEARDSALL et al., 2003; RODEN; BERNROIDER, 2003).

O tecido muscular, durante grande parte do dia utiliza-se de ácidos graxos para obter energia, pois as fibras musculares em estado de repouso são pouco permeáveis a glicose. Entretanto, após exercícios físicos ou refeições, quando há maior secreção de insulina, ocorre o estímulo para que esta captação se processe. No músculo esquelético a utilização da glicose ocorre no meio intracelular, após fosforilação à glicose-6-fosfato. A capacidade de fosforilação da glicose é determinada pela quantidade de hexocinase muscular. Após a entrada da glicose nas células, por difusão facilitada, a glicose passa a ser considerada “combustível” para os tecidos (RICHTER, 1998). Ocorrem então reações enzimáticas a fim de fosforilar as moléculas de glicose e convertê-las em glicose-6-fosfato. Esta por sua vez é armazenada no citosol das células e serve como substrato para as várias vias do metabolismo. Este substrato poderá ser convertido a glicogênio, degradado a piruvato através da glicólise, anaerobicamente ser convertido a lactato e aerobicamente a acetil coenzima A, entrando para o ciclo do ácido cítrico ou sendo convertido em ácido graxo (DEVLIN, 1997; MOORE et al., 2003).

Em contrapartida, o glucagon, outro hormônio produzido no pâncreas, porém pelas células α , é um antagonista dos efeitos da insulina, tem como propriedade

fundamental o aumento da glicemia estimulando a quebra do glicogênio e a gliconeogênese. É através destas ações antagônicas que ambos os hormônios mantém a regulação dos níveis glicêmicos. Entre as principais ações do glucagon estão: estimulação da glicogenólise, lipólise e proteólise (BEARDSALL et al., 2003).

1.6 Percurso Renal da Glicose

O mecanismo de controle dos níveis de glicose sangüínea, além dos já apresentados envolve também uma “fina” regulação renal. Quando se trata de níveis normais de glicose plasmática, através de processos de reabsorção renal, é evitada esta perda urinária, sendo que nestes casos pode-se considerar a urina livre de glicose.

Após o trajeto de filtração inicial, que inclui a passagem do sangue através dos glomérulos na cápsula de Bowman, o sangue inicial passa a ser um ultrafiltrado plasmático, onde não estão presentes proteínas plasmáticas e hemácias. Já na porção inicial do túbulo contorcido proximal ocorre o processo de reabsorção renal, a fim de evitar a perda excessiva de água e outros componentes essenciais ao organismo. Portanto o ultrafiltrado plasmático passa a ser reabsorvido através de mecanismos de transporte ativo e passivo. Para ocorrer o transporte ativo a substância deve ligar-se a uma proteína transportadora presente na membrana das células renais. No transporte passivo essa reabsorção ocorre pelas diferenças de concentração nos lados opostos da membrana. É através do transporte ativo que a glicose é reabsorvida envolvendo transportadores do tipo GLUT 2 e 3 (STRASINGER, 2000).

A reabsorção renal de substâncias apresenta uma capacidade reabsortiva máxima, quando este valor é ultrapassado, estas substâncias passam a ser encontradas na urina, o chamado “limiar renal”. No caso da glicose o limiar renal é de 160-180 mg/dL, ocorrendo glicosúria quando a concentração plasmática for superior a este valor. A figura 3 é uma representação esquemática do néfron, onde pode-se observar o local de reabsorção das substâncias essenciais ao organismo, o túbulo contorcido proximal.

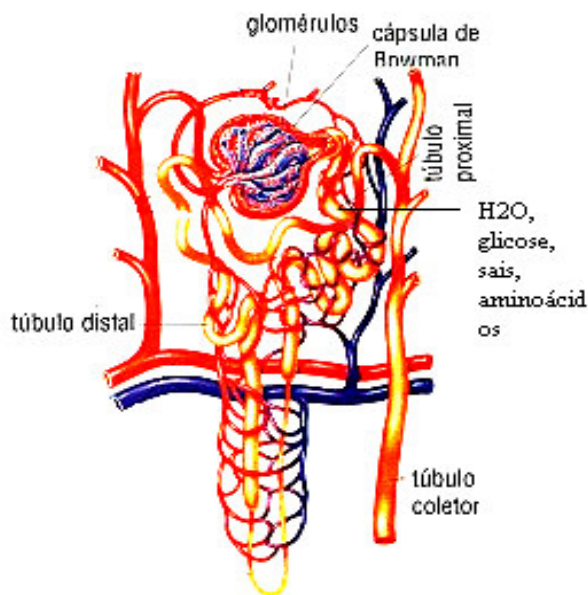


Figura 3 - Representação esquemática da estrutura dos néfrons, responsáveis pela filtração sangüínea. A figura mostra a localização do túbulo contorcido proximal, um dos pontos onde ocorre a reabsorção de elementos essenciais ao organismo como a glicose. Adaptado de Strasinger, 2000.

1.7 Terapia com Insulina

A insulina é a base do tratamento para quase todos os pacientes com diabetes do tipo 1 e para alguns do tipo 2. É utilizada principalmente pela via subcutânea e não apresenta o mesmo perfil de ação da insulina endógena. Na utilização exógena não são observados os picos de elevação rápida e declínio, normais da secreção de insulina, também não ocorre a liberação da insulina na circulação porta e sim na periférica, o que elimina o efeito preferencial da insulina, sua ação nos processos metabólicos hepáticos (GILMAN et al., 1991; BALL; BARBER, 2003). Contudo este é um tratamento bastante eficaz quando realizado com cautela.

As preparações insulínicas são classificadas de acordo com a concentração, pureza, tipo e origem. Quanto à origem, pode ser bovina, suína ou humana. As diferenças entre elas são mínimas, atendo-se a alterações em 1 (suína) ou 3 (bovina) aminoácidos da cadeia. A insulina humana vem sendo amplamente utilizada

em função do desenvolvimento de técnicas de DNA recombinante. No que diz respeito ao tipo de insulina, a classificação é feita pelo início de ação e pico máximo de atividade. As insulinas de ação curta são utilizadas pouco antes das refeições, apresentam início de ação rápido, aproximadamente 15 minutos, e menor duração, grupo em que está incluída a insulina regular. Já a insulina de ação intermediária apresenta um período de ação mais longo, sendo a forma mais utilizada a insulina NPH (insulina com protamina neutra de Hagedorn). As insulinas de ação ultralenta, têm início de ação muito lento e seus níveis mantêm-se durante todo o dia. São muito utilizadas as combinações de insulina lenta x ultralenta ou regular x NPH, a fim de obter combinações de início rápido e ação prolongada ou ainda início tardio e ação prolongada, respectivamente, conforme a necessidade de cada paciente (OIKNINE; MOORADIAN, 2003).

1.8 Hipoglicemiantes Orais

Pacientes com diabetes do tipo 2 não controlado com dieta e exercícios físicos geralmente utilizam os hipoglicemiantes orais para o controle dos níveis glicêmicos. Dois são os principais grupos de medicamentos utilizados no tratamento do diabetes tipo 2: os que estimulam a secreção de insulina e os que não estimulam. Os principais grupos de medicamentos incluem os inibidores da α -glicosidase, tiazolidinadionas, biguanidas e as sulfoniluréias.

1.8.1 Inibidores da α -glicosidase

Estes medicamentos são responsáveis por diminuir a absorção intestinal de amido, dextrina e dissacarídeos por inibição competitiva da ação da α -glicosidase da orla ciliada intestinal. A α -glicosidase é responsável pela geração de monossacarídeos, sendo que esta inibição lentifica a absorção intestinal dos carboidratos (ROSAK, 2002). Esta classe de medicamentos é utilizada para pacientes não controlados pela dieta ou por outros antidiabéticos orais. Entre os medicamentos desta classe terapêutica está a acarbose, que apresenta como

efeitos adversos flatulência e distensão abdominal. (BRESSLER; JOHNSON, 1992; OIKNINE; MOORADIAN, 2003).

1.8.2 Tiazolidinadionas

O mecanismo de ação está relacionado à melhora da ação da insulina por aumentar o número de transportadores de glicose nos tecidos resistentes à insulina, aumentando o transporte de glicose estimulado pela insulina e também a sensibilidade dos tecidos alvo ao hormônio. São conhecidos como sintetizadores de insulina. Estes fármacos estão em fase experimental, entre eles estão a pioglitazona e o rosiglitazona (GOLDSTEIN, 2000; ROSAK, 2002).

1.8.3 Biguanidas

A metformina é a principal representante desta classe de fármacos, sendo a mais amplamente utilizada. As biguanidas são substâncias antihiperlipidêmicas, sensitizadoras de insulina. Seu mecanismo de ação está envolvido com o aumento da sensibilidade dos tecidos periféricos à insulina, levando ao aumento da captação de glicose por estes tecidos e a inibição da gluconeogênese hepática. Entre os efeitos indesejáveis das biguanidas estão a anorexia, paladar metálico, náuseas e diarreia (BAILEY, 1992; PONSSEN et al., 2000).

1.8.4 Sulfoniluréias

As sulfoniluréias causam hipoglicemia por estimular a secreção de insulina das células β -pancreáticas (OHTA et al., 1999). Elas atuam através da ligação aos receptores localizados na membrana das células β das ilhotas de Langerhans. Esta ligação é seguida do fechamento de canais de potássio e abertura de canais de cálcio, influxo que leva a despolarização da membrana celular. Estes eventos induzem a degranulação das vesículas contendo insulina com posterior diminuição

dos níveis glicêmicos (PERFETTI; AHMAD, 2000; ROSAK, 2002; GRIBBLE; REIMANN, 2003; OIKNINE; MOORADIAN, 2003).

Estes compostos são divididos em dois grupos ou gerações. As sulfoniluréias de primeira geração (tolbutamida, clorpropamida) apresentam baixa especificidade de ação biológica, início de ação demorado, efeito de longa duração e inúmeros efeitos colaterais. Entre estes efeitos estão a diminuição excessiva nos níveis plasmáticos de glicose (hipoglicemia) e a ligação a receptores cardíacos causando sérios problemas cardiovasculares (RAPTIS; DIMITRIADIS, 2001). Já as de segunda geração são fármacos que apresentam potência aumentada e menor risco de efeitos colaterais, entre eles estão a gliburida e glipizida (PERFETTI; AHMAD, 2000). Novas classes de sulfoniluréias são estudadas, como exemplo estão a glimepirida e a gliquidona, fármacos com maior especificidade para os canais de potássio pancreáticos, substâncias bem mais seguras e com menores riscos de efeitos colaterais, propiciam maior sensibilidade à insulina aos tecidos alvo (RAPTIS; DIMITRIADIS, 2001).

1.9 *Bauhinia forficata*

As plantas medicinais foram durante muito tempo a base da terapêutica e, atualmente, cerca de 25% dos fármacos utilizados são de origem vegetal, enquanto 50% são sintéticos, cujos protótipos têm origem nos princípios isolados de plantas medicinais (FARNSWORTH, 1980; UGAZ, 1994; CECHINEL FILHO, 1998).

Devido a grande diversidade da flora e a dificuldade de recursos financeiros em alguns países, a Organização Mundial de Saúde (OMS) tem incentivado a utilização de plantas como recurso para o tratamento de doenças, como o diabetes. Acredita-se que esta alternativa, bem mais econômica, possa beneficiar 80% da população mundial que utiliza-se de plantas como primeiro recurso terapêutico (YAMADA, 1998).

Para o tratamento do diabetes, doença que atualmente atinge cerca de 142 milhões de pessoas no mundo, existe uma imensa variedade de plantas utilizadas

pela medicina popular. São amplamente utilizadas e estudadas plantas como a *Momocardia charantia*, *Catharanthus roseus*, *Phaseolus vulgaris*, *Murraya koenigii*, *Zygophyllum gaetulum* entre outras (JAOUHARI et al., 1999; VIRDI et al., 2002; YADAV et al., 2002; NAMMI, et al., 2003; PARI; VENKATESWARAN, 2003). Das inúmeras espécies vegetais de interesse medicinal, e utilizadas popularmente no Brasil, destaca-se a *Bauhinia forficata*. As espécies do gênero *Bauhinia* são caracterizadas pelo acúmulo de flavonóides, terpenóides, taninos, esteróides, quinonas, lactonas e triterpenos (DA SILVA; CECHINEL FILHO, 2002).

Os flavonóides provenientes de plantas são um grupo de polifenóis de baixo peso molecular, adquiridos da dieta e absorvidos tanto pelo estômago como intestino (HACKETT, 1986). Estes são bastante explorados em função das inúmeras aplicações terapêuticas como as ações anti-inflamatória, anti-alérgica, anti-viral, anti-câncer e anti-oxidante (LARSON, 1988). Mais recentemente, estudos sobre a ação anti-diabética dos flavonóides através da investigação dos mais diversos mecanismos de ação estão em desenvolvimento (SHISHEVA; SHECHTER, 1992; ONG; KHOO, 2000). A miricetina, um flavonóide amplamente encontrado em plantas medicinais, chás e frutas, exerce sua função hipoglicemiante mimetizando ações da insulina como, estimular a lipogênese e o transporte de glicose em adipócitos de rato. Outros exemplos de flavonóides envolvidos com a regulação dos níveis glicêmicos e que têm o mecanismo de ação elucidado são a silimarina, pela ação antioxidante, protegendo as células β -pancreáticas e a quercetina que atua na regeneração das ilhotas pancreáticas, aumentando a liberação de insulina plasmática e induzindo a enzima glicocinase hepática. (SOTO et al., 1998; ONG; KHOO 1996, 2000; VESSAL et al., 2003).

Na literatura existem alguns relatos sobre a ação hipoglicemiante da *Bauhinia forficata*, com resultados cientificamente comprovados bastante significativos (PEPATO et al., 2002; SILVA et al., 2002). A *Bauhinia forficata* Link, conhecida popularmente como “Pata de Vaca”, pertence à família Leguminosae, é encontrada principalmente nas áreas tropicais do planeta, compreendendo cerca de 300 espécies (RUSSO et al, 1990; DA SILVA et al, 2000). É uma árvore de porte médio de 5-9 metros, possui folhas bipartidas (uncinadas) lembrando de fato a pata de uma vaca, flores de cor branca e frutos do tipo vagem linear. No Brasil é encontrada

principalmente nas regiões Sul e Sudeste, do Rio Grande do Sul até o Rio de Janeiro. A infusão das folhas é utilizada como agente hipoglicemiante, diurético, tônico, depurativo, no combate a elefantíase e redução da glicosúria (MARTINS et al., 1998). A figura 4 mostra fotos da espécie vegetal *B. forficata*.



Figura 4 – Espécie vegetal *Bauhinia forficata*. A) Folhas bipartidas; B) flores brancas; C) árvore.

Os primeiros relatos sobre a ação hipoglicemiante da *B. forficata* são de 1929 e 1931, quando Carmela Juliani o demonstrou em pacientes diabéticos. Uma década mais tarde, a mesma voltou a demonstrar este efeito em cães e coelhos pancreatomizados hiperglicêmicos (JULIANI, 1941). Desde então alguns estudos foram feitos como os de Caricati-Neto e colaboradores (1985), que observou mudanças significativas na glicemia de ratos diabéticos após administração intraperitoneal da fração aquosa da planta. Já os resultados de Russo e colaboradores (1990) não foram tão promissores, a infusão das folhas da *Bauhinia forficata* não apresentou efeito hipoglicemiante em pacientes normais e diabéticos do tipo 2, tanto em períodos agudos quanto crônicos. Mais recentemente, Pepato e colaboradores (2002), utilizando o chá das folhas de *B. forficata*, por um período crônico, mostraram a redução da glicemia e glicosúria em animais diabéticos. Ainda em 2002, Silva e colaboradores observaram a redução dos níveis glicêmicos em

ratos normais e diabéticos após administração oral do extrato alcoólico (fração *n*-butanólica) em um período agudo.

De acordo com os dados encontrados na literatura observa-se que existem algumas controvérsias quanto aos resultados, porém estes podem estar relacionados às diferentes formas e vias de administração. Também devem ser levados em consideração as variações sazonais, os tipos de solo, clima e condições em que foi feito o cultivo e o armazenamento da planta. Tudo isto traz a necessidade de mais estudos para elucidar os compostos ativos e o mecanismo de ação dos mesmos, com o objetivo de comprovar os meios pelos quais os componentes da *Bauhinia forficata* realizam suas ações.

Os trabalhos mais relevantes encontrados na literatura, sobre a *B. forficata* mostram o estudo fitoquímico, farmacológico e avaliação biológica de componentes presentes nas folhas e flores. Além disso, foram isolados e identificados cinco flavonóides glicosilados contendo os flavonóis canferol e quercetina como agliconas (DA SILVA et al, 2002; DE SOUSA, 2003; PIZZOLATTI et al., 2003).

1.10 Lipossomas

Os lipossomas são membranas artificiais formadas por uma bicamada lipídica, estruturalmente similar a matriz lipídica das células servindo como modelo para vários tipos de estudos sobre as membranas celulares (SAIJA et al., 1995; CASTELLI et al., 1997). Os lipossomas podem ser utilizados para o estudo dos efeitos de espécies reativas de oxigênio (EROs) (SAIJA et al., 1995; CASTELLI et al., 1997), para o estudo sobre o transporte de íons ou moléculas através das membranas, cujos mecanismos ainda são desconhecidos (CRECZYNSKI-PASA; GRÄBER, 1994; SHIBATA et al., 2003)

Estas vesículas microscópicas representam um sistema avançado de liberação de fármacos atualmente disponível (KONG et al., 2000). Neste sentido lipossomas já são empregados como carreadores de fármacos particularmente em terapias anti-câncer, anti-fúngica e anti-bacteriana (OJA et al., 1996; KONG et al.,

2000). São muito eficientes quando utilizados em combinação a anticorpos específicos de tecidos, como transportadores de fármacos na circulação, tendo como alvo órgãos específicos, como na terapia do câncer (TARDI et al., 1996; SADZUKA et al., 2003; SHIBATA, 2003). Na figura 5 é mostrada a representação esquemática de um lipossoma cortado transversalmente.

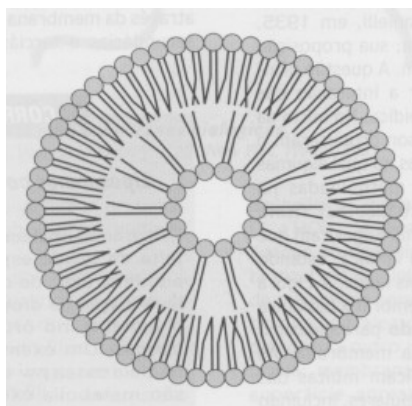


Figura 5 – Representação esquemática do corte transversal de um lipossoma unilamelar. Adaptado de Kong et al., 2000.

1.11 Diabetes Experimental

As causas do diabetes são ainda desconhecidas, sabe-se que o diabetes do tipo 1 é resultado da destruição das células β -pancreáticas, responsáveis pela produção de insulina. Este quadro está associado a uma resposta auto-imune do organismo às células ou ainda a processos infecciosos virais e devido a agentes ambientais. Já o diabetes do tipo 2 está associado a obesidade, idade e estilo de vida. Nestes pacientes há produção de insulina, porém a mesma não é bem utilizada pelas células dependentes de sua ação (OBERLEY, 1988; BEARDSALL et al., 2003).

O estado diabético pode ser induzido quimicamente através da administração de fármacos. Entre as mais amplamente utilizadas estão a aloxana (2,4,5,6-tetraoxohexahidropirimidina) e o antibiótico estreptozotocina (2-deoxi-2-(3-metil-3-

nitrosoureído)-D-glicopiranoose) (SOTO et al., 1998; ISLAS-ANDRADE et al., 2000; VERSPOHL, 2002). A vantagem atribuída a estes modelos experimentais é a possibilidade de avaliar os eventos bioquímicos, hormonais e morfológicos durante toda a evolução do processo diabético, até uma deficiência severa da insulina ou a morte do animal (ISLAS-ANDRADE et al., 2000).

A aloxana (AL) foi o primeiro agente químico diabetogênico descoberto após produzir acidentalmente necrose nas ilhotas de Langerhans de coelhos enquanto Dunn e Mc Letchie pesquisavam a nefrotoxicidade dos derivados do ácido úrico. Ao produzirem o DM em ratos, constataram-se alterações histológicas que resultaram em necrose e completo desaparecimento das células β das ilhotas pancreáticas (DUARTE, 1996). Por ser um composto bastante instável é rapidamente reduzido a ácido dialúrico, forma tóxica do composto (SOTO et al., 1998). Ainda não existem mecanismos muito claros sobre a ação tóxica da aloxana sobre as células β -pancreáticas, porém é aceito que esta toxicidade seja ocasionada pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), após o processo de auto-oxidação do ácido dialúrico, resultando na fragmentação do DNA destas células (SOTO et al., 1998; ISLAS-ANDRADE et al., 2000). Outro mecanismo também envolvido é a inibição da enzima glicocinase, enzima que promove a interação entre a secreção de insulina e a concentração de glicose, através da oxidação dos grupos tiol (SH) presentes no sítio de ligação da enzima, sendo esta uma reação reversível (IM WALDE et al., 2002).

A estrutura química da estreptozotocina (STZ) compreende uma molécula de glicose com uma cadeia lateral altamente reativa, nitrosurea, que inicia a ação citotóxica (ISLAS-ANDRADE et al., 2000). A molécula de glicose direciona a STZ para as células β pancreáticas, onde o mesmo liga-se ao transportador de membrana GLUT-2. Inicia-se então o processo de metilação, levando a quebra do DNA, geração de radicais livres e a produção de óxido nítrico (NO) (VERSPOHL, 2002).

O potencial da AL em gerar EROs é superior ao da STZ, portanto o dano causado pela maior quantidade destas espécies atinge um maior número de células (IM WALDE et al., 2002). Em função desta ação deletéria uma única dose da AL é

necessária para induzir em ratos o diabetes do tipo 1, já com o uso da STZ, uma dose única produz um estado diabético do tipo 2, para um diabetes do tipo 1 são necessárias doses múltiplas e baixas da STZ (VERSPOHL, 2002).

Ambos os compostos são bastante efetivos, porém cada um com particularidades funcionais. A aloxana induz um estado diabético mais rapidamente, provavelmente pela maior capacidade de gerar EROs do que a STZ (IM WALDE et al., 2002), apesar de não ser um estado permanente. Tanto a AL quanto a STZ induzem estados similares de hiperglicemia e hiperlipidemia, e ambos compostos levam ao aumento do volume urinário, diarreia e dependendo do caso, elevados níveis glicêmicos, o que gera cuidados especiais com os animais. Para tanto a escolha do modelo experimental se dá em função do mais adaptado ao tipo e objetivo do experimento a ser realizado (ISLAS-ANDRADE et al., 2000).

2 JUSTIFICATIVA

Diabetes melito é o nome dado a um grupo de desordens com diferentes etiologias (O'BRIEN; GRANNER, 1996). Hoje, no Brasil, são mais de 5 milhões de diabéticos, sendo 90% diabéticos do tipo 2. É uma patologia que requer cuidados rigorosos, principalmente com a alimentação, a prática de atividades físicas e o uso de medicação específica. No caso do diabético tipo 1, esta é feita à base de insulina, já no tipo 2 as medicações incluem o uso de hipoglicemiantes orais. O governo tem mostrado preocupação na distribuição gratuita destes medicamentos, porém em função do alto custo, é limitada, atingindo um pequeno número de pacientes.

Terapias alternativas, como a utilização de plantas da medicina popular na forma de chás, tornaram-se uma prática cada vez mais difundida em função do baixo custo e fácil obtenção. Desta forma, o estudo de compostos naturais com ações que mimetizem ou potencializem as ações da insulina tornou-se um campo de importância estratégica no desenvolvimento de novos fármacos.

A *Bauhinia forficata* é uma destas plantas, conhecida popularmente como hipoglicemiante, suas folhas são utilizadas na forma de infusão. Apesar do difundido uso popular a ação medicinal e composição micromolecular não estão satisfatoriamente estabelecidas.

Metodologicamente este trabalho fundamentou-se em três principais aspectos:

1. Isolamento e purificação dos metabólitos das frações acetato de etila e *n*-butanólica das folhas da *B. forficata*. Etapa coordenada pelo Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti (colaborador).
2. Incorporação do composto canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo em lipossomas. Processo coordenado pela Prof^a Dr^a Tânia Beatriz Creczynski-Pasa (colaboradora).

3. Avaliação da bioatividade e estudo do mecanismo de ação do canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo, composto majoritário purificado das frações acetato de etila e *n*-butanólica das folhas da *B. forficata*. Aspecto desenvolvido nesta dissertação sob a orientação da Prof^a Dr^a Fátima Regina Mena Barreto Silva.

3 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Apoiados no fato de que o canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo apresenta ação hipoglicemiante em um período agudo, o objetivo deste trabalho foi investigar esta ação do composto quando incorporado em lipossomas e avaliar a efetividade do canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo na captação da 2-[14 C (U)]-Deoxi-D-Glicose ([14 C]-DG) e na síntese de proteínas no músculo sóleo de ratos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o modelo diabético experimental utilizando a aloxana como agente diabetogênico.
- Realizar a curva glicêmica do canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo nos períodos de 0, 1, 2, 3, 6 e 24 h.
- Comparar a potência do canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo incorporado em membranas lipossômicas à do canferol 3,7-O- α -L-diramnosídeo na redução da glicemia de animais normais e diabéticos.
- Realizar as curvas de tempo basal e de dose-resposta da insulina na captação da [14 C]DG em músculo sóleo de ratos normais.
- Estudar os efeitos do canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo na captação da [14 C]DG em músculo sóleo de ratos normais.

- Comparar a efetividade do canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo com a da insulina na captação da [14 C]DG em músculo sóleo de ratos normais.
- Estudar os efeitos do canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo na síntese protéica, através da incorporação da [14 C] leucina, tanto em animais normais quanto diabéticos.
- Estudar o efeito do canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo na glicose urinária.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Reagentes

Glicose PAP – Kit utilizado para dosagem da glicemia e glicosúria pelo método enzimático da glicose oxidase da Labtest. Resultados foram expressos em mg/dL

Aloxana - Monohidrato de aloxana, obtido da Aldrich Chemical Company, USA

Insulina – Insulina regular humana (R) – Biohulin, doação da Biobrás Bioquímica do Brasil

Albumina Bovina – Utilizada para dosagem de proteínas totais, Sigma Chemical Company, USA

Líquido de Cintilação Miscível - Para a contagem da radioatividade das alíquotas utilizou-se o líquido de cintilação Optiphase hifase III, adquirido pela Fundação Sardi, Brasil

Ácido tricloroacético (TCA), etanol absoluto, éter etílico, ácido fórmico, dimetilsulfóxido (DMSO) – Todos reagentes P.A. da Merck, obtidos através da Fundação Sardi, Brasil.

4.1.2 Substâncias Radioativas

2-[^{14}C (U)]-Deoxi-D-Glicose – (^{14}C]DG) - Utilizou-se a glicose uniformemente marcada nos experimentos de captação de glicose, com atividade específica de 2,1 Gbq/mmol. Obtido da DuPont NEN Products, Boston, USA

L – [U - ^{14}C] Leucina - (^{14}C] leucina) - Aminoácido marcado com ^{14}C , utilizado nos experimentos para determinação de síntese protéica, com atividade específica de 11,4 Gbq/mmol . Obtido da DuPont NEN Products, Boston, USA.

4.1.3 Obtenção de Compostos Naturais da Espécie Vegetal *Bauhinia forficata* Link

4.1.3.1 Coleta e Identificação da Planta

As folhas da espécie vegetal *Bauhinia forficata* foram coletadas em novembro de 1998, na cidade de Orleans no sul do estado de Santa Catarina. A planta foi identificada pelo Professor Daniel de Barcellos Falkenberg do Departamento de Botânica da UFSC, onde uma exsicata da espécie foi depositada sob o número FLOR-31271.

4.1.3.2 Preparação do Extrato Bruto e das Frações

As folhas foram secas em estufa com circulação de ar a 30 °C, trituradas e extraídas por maceração com EtOH/H₂O (8:2) à temperatura ambiente em dois ciclos de 14 dias. O extrato hidroalcolico foi evaporado à vácuo até 1/5 do volume inicial e mantido em repouso por dois dias a 4 °C. Em seguida esta solução foi filtrada em papel filtro, o resíduo foi descartado e o filtrado aquoso submetido a um particionamento sucessivo com *n*-hexano, AcOEt, e *n*-butanol. O solvente de cada fase orgânica foi evaporado para a obtenção das respectivas frações hexano, acetato de etila e *n*-butanol.

4.1.3.3 Isolamento dos Flavonóides das Folhas da *Bauhinia forficata*

Conforme descrito por Pizzollatti et al. (2003) com algumas modificações, as frações acetato de etila e *n*-BuOH das folhas foram submetidas ao fracionamento cromatográfico em coluna (CC) de sílica gel. As frações recolhidas foram analisadas em cromatografia de camada delgada (CCD), sendo que após esta análise foram encontrados 5 compostos: o canferol, canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo, o canferol 3-O- β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -L-ramnopiranosil-7-O- α -L-ramnopiranosídeo, a quercetina 3,7-O- α -L-diramnosídeo e a quercetina 3-O- β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -L-ramnopiranosil-7-O- α -L-ramnopiranosídeo.

4.1.3.4 Caracterização dos Compostos

Os compostos isolados foram identificados através das técnicas de espectroscopia de infravermelho, ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C e espectroscopia de massas (PIZZOLATTI et al., 2003). A figura 6 representa esquematicamente os procedimentos experimentais para a obtenção dos compostos flavonoídicos a partir das folhas da *B. forficata*.

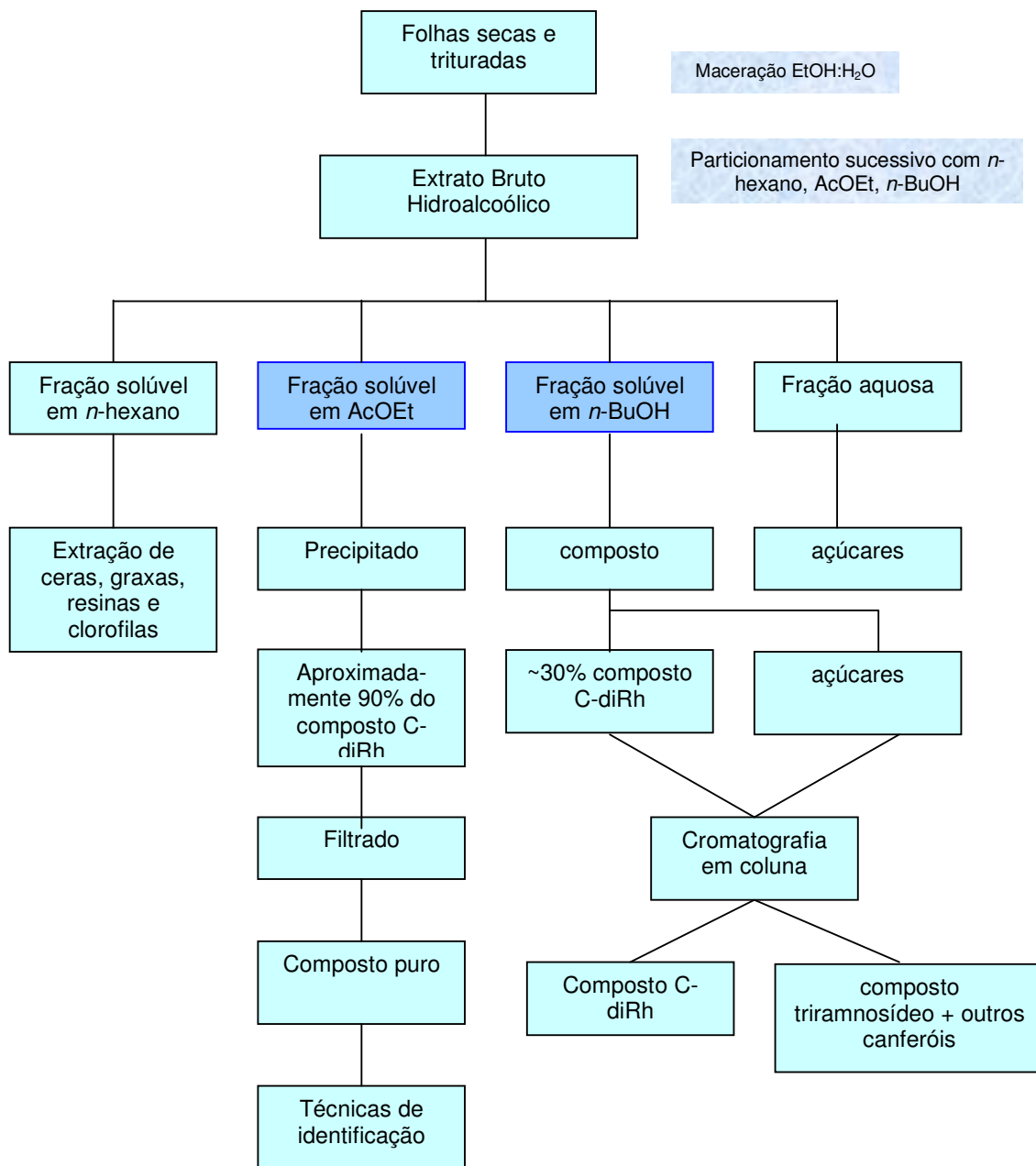


Figura 6 - Representação esquemática do fracionamento do extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *B. forficata*.

4.1.4 Compostos Majoritários Isolados das Folhas da *Bauhinia forficata*

Composto: canferol

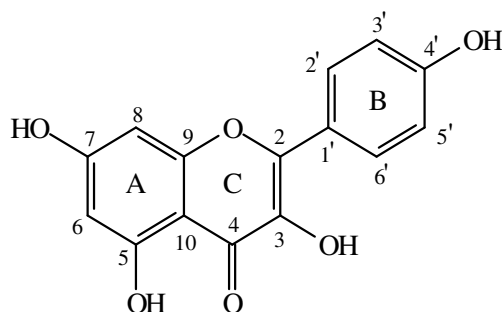


Figura 7 - Estrutura química do composto canferol.

Composto: canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo (R=H); quercetina 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo (R=OH).

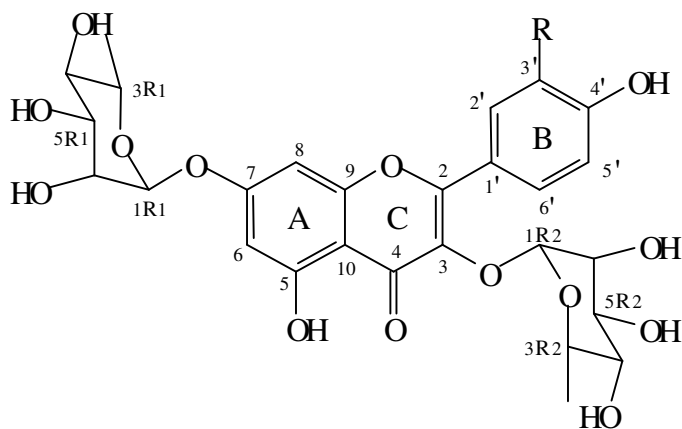


Figura 8 - Estrutura química do composto canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo e do composto quercetina 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo.

Compostos: canferol 3-O-(α)-glicosídeo-(1' -'6'')-ramnnosídeo-7-O-(α)-L-ramnnosídeo (R=H); quercetina 3-O-(α)-glicosídeo-(1' -'6'')-ramnnosídeo-7-O-(α)-L-ramnnosídeo (R=OH).

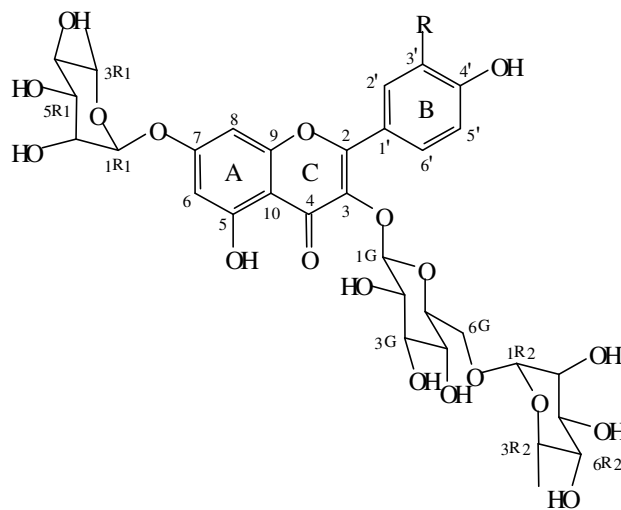


Figura 9 - Estrutura química do composto canferol 3-O-(α)-glicosídeo-(1' -'6'')-ramnnosídeo-7-O-(α)-L-ramnnosídeo e do composto quercetina 3-O-(α)-glicosídeo-(1' -'6'')-ramnnosídeo-7-O-(α)-L-ramnnosídeo.

4.1.5 Equipamentos Utilizados

- ⊞ Medidor de pH (modelo DMPH – 3 Digimed) - para monitoração do pH em todas as soluções, calibrado no momento do uso.
- ⊞ Banho metabólico com agitação (Quimis) - Aparelho termostatizado com atmosfera úmida.
- ⊞ Espectrofotômetro UV / Visível (Pharmacia LKB-Ultrospec III) - Utilizado para leitura das dosagens de glicose e proteínas.
- ⊞ Espectrômetro de cintilação líquida (LKB modelo 1209 – Rack-Beta) - Utilizado para contagem da radioatividade com eficiência de 85-90%.

- ⊖ Centrífuga baby Fanem – para separação do soro das amostras de sangue coletadas.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos entre 42-54 dias de idade, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas e alimentados com ração comercial e água *ad libitum* em sala climatizada onde eram submetidos a um ciclo claro/escuro (06-19 h luzes acesas, 19-06 h luzes apagadas).

Todos os animais foram cuidadosamente monitorados e mantidos em concordância com as recomendações do Conselho Brasileiro de Medicina Veterinária (CMV) e do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), protocolo 142/CEUA/UFSC.

4.2.2 Procedimento Anestésico

Antecedendo o momento de indução do diabetes e também da coleta de sangue os animais foram anestesiados em câmara etérea para realização da injeção de aloxana na veia dorsal do pênis e das coletas de sangue da veia do plexo retro-orbital.

4.2.3 Modelo do Diabetes Experimental

O diabetes foi induzido através de uma única injeção intravenosa de monohidrato de aloxana (Sigma) 5 % em solução fisiológica (NaCl 0,9%) nas doses de 50, 60 ou 70 mg/kg de peso corporal na veia dorsal do pênis de animais sob

anestesia etérea. Esta solução foi sempre preparada imediatamente antes do uso. Três dias depois foram coletadas as amostras de sangue pela veia do plexo retro-orbital e os níveis de glicose foram determinados para confirmar o desenvolvimento do diabetes. Foram utilizados, para a maioria dos experimentos com animais diabéticos, ratos que apresentavam glicose entre 400-480 mg/dL. A figura 10 mostra o procedimento utilizado, neste trabalho, para a indução do diabetes experimental.



Figura 10 - Indução do diabetes através da injeção intravenosa de aloxana na veia dorsal do pênis.

4.2.4 Preparação do Composto Canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo em Membranas Unilamelares de Fosfatidilcolina (lipossomas)

Os lipossomas foram preparados conforme o método descrito por Sone et al (1977), que se baseia na solubilização dos lipídeos em um tampão contendo tricina 10 mM, colato de sódio 20 g/L e desoxicolato de sódio 10 g/L (CRECZYNSKI-PASA et al., 1997). Esta mistura (tampão de solubilização + lipídeos) foi submetida à diálise em banho-maria a 30 °C, por 5 h, contra um tampão de reconstituição contendo MgCl₂ 2,5 mM, tricina 10 mM (pH 8,0). Fosfatidilcolina (50 mg/mL) foi utilizada como fosfolipídeo para a preparação dos lipossomas. O canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo (C-diRh), nas concentrações iniciais de 50, 30 e 15 mM, foi adicionado ao tampão de preparação dos lipossomas sendo posteriormente submetido ao processo de reconstituição da membrana. A concentração do

composto ao final do processo de reconstituição foi determinada após dissolução da membrana em tampão de solubilização, através do coeficiente de absorção molar (ϵ), determinado nas mesmas condições experimentais. As concentrações finais obtidas e utilizadas nos experimentos foram 0,85 mM (15 mM inicial); 3,75 mM (30 mM inicial). O rendimento obtido para o composto foi de 30%, partindo da concentração inicial de 15 mM e 46% a partir da dose de 30 mM. Por ser um processo longo e em função do grande volume utilizado como tampão de solubilização, o C-diRh atravessa os poros da membrana, não possibilitando maior incorporação do composto. Na preparação lipossômica inicial de 50 mM observou-se um precipitado no final do processo de diálise, sendo esta preparação descartada.

A determinação do LC-diRh na membrana do lipossoma foi através da técnica de ultravioleta (UV) em 360 nm, utilizando-se para os gráficos o programa Grams. Foram então observadas bandas de absorção correspondentes ao C-diRh, conforme demonstrado na figura 11.

A)

DO

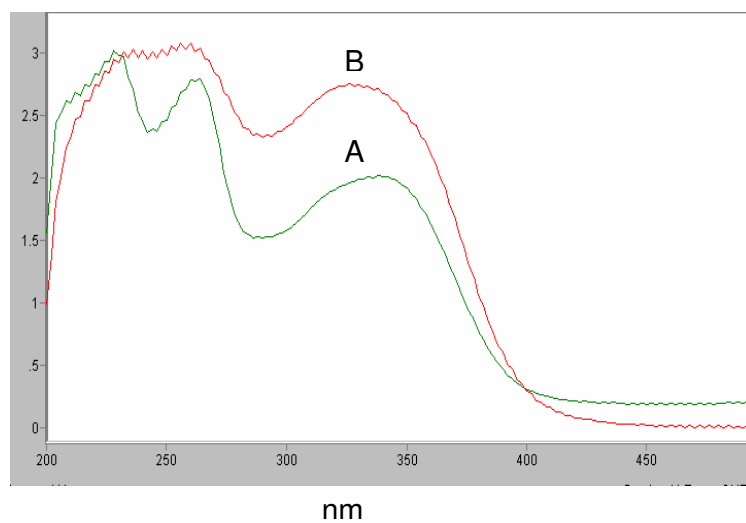


Figura 11 A – Espectros de UV do canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo. A – Solução contendo C-diRh na concentração inicial de 15 mM, B – Solução contendo C-diRh na concentração inicial de 30 mM.

B)

DO

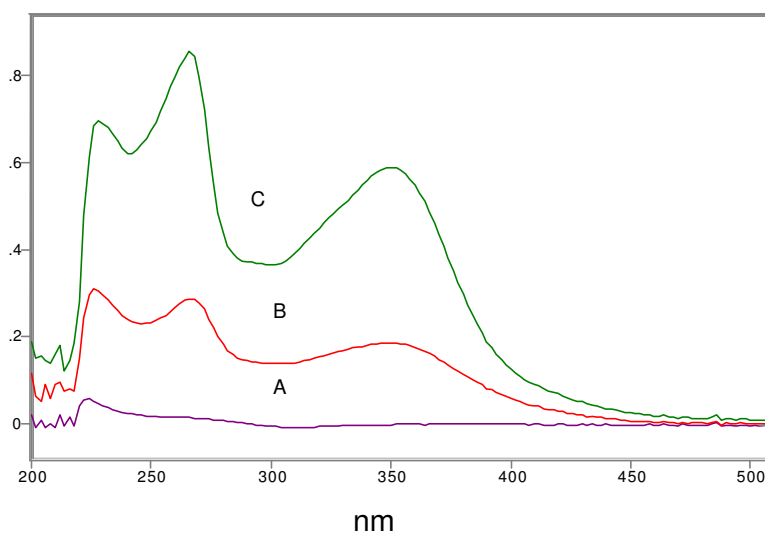


Figura 11 B – Espectros de UV do canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo incorporado. A - lipossoma (controle); B = solução da membrana contendo LC-diRh (concentração inicial 15 mM), C = solução da membrana contendo LC-diRh (30 mM).

4.2.5 Ensaio para Determinação do Modelo Experimental do Diabetes Induzido com Aloxana

Os animais foram divididos em grupos normais e diabéticos, induzidos com diferentes doses de aloxana (50, 60 e 70 mg/kg) para escolha do modelo experimental utilizado nos demais experimentos, em função dos níveis glicêmicos. Três dias após a indução o sangue foi coletado e a glicemia dosada nos tempos de 0 a 3 h. Todos os animais ficaram em jejum de aproximadamente 16 h antes da indução do diabetes e antes das dosagens glicêmicas.

4.2.6 Ensaio para Determinação da Glicemia de Ratos Normais e Diabéticos Induzidos com Aloxana 50 mg/kg, no Período de 0-24 h

Os animais foram divididos em grupos controles e tratados e então induzidos com aloxana 50 mg/kg de peso corporal a fim de obter a curva de tempo para o C-diRh 58 mM. Para este procedimento os animais foram mantidos em jejum de aproximadamente 16 h. Foram coletadas amostras de sangue para determinação da glicemia nos tempos de 0, 1, 2, 3, 6 e 24 h após administração do composto.

4.2.7 Ensaio para Determinação da Glicosúria de Ratos Normais e Diabéticos

Ratos normais e diabéticos foram divididos em grupos controle e tratado com C-diRh na dose de 58 mM. Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas por 1 h, a fim de adaptarem-se ao local. Três horas após administração oral do composto aos animais tratados ou do veículo (etanol + H₂O) aos animais controles foram realizadas as determinações de glicose urinária.

4.2.8 Determinação da Glicemia e Glicosúria

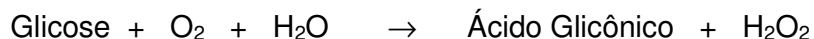
Conforme já mencionado, todos os animais estavam em jejum de aproximadamente 16 h antes da coleta de sangue. O sangue foi obtido por capilaridade pela veia do plexo retro-orbital em tubos do tipo eppendorf. Após centrifugadas, alíquotas de 10 μ L de soro (em duplicatas) foram utilizadas para dosar a glicose pelo método enzimático da glicose oxidase. As amostras foram incubadas por 15 min a 37 °C e as absorbâncias lidas em espectrofotômetro em 505 nm. As dosagens glicêmicas foram feitas dentro de uma hora após a coleta do sangue. Os resultados foram expressos em mg/dL de glicose.

Para dosagem da glicose na urina foi também utilizado o método enzimático da glicose oxidase conforme descrito por VARLEY et al (1976).

Princípio do método

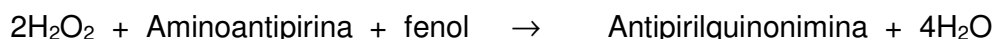
A glicose oxidase catalisa a oxidação da glicose de acordo com a seguinte reação:

GOD



O peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol sob ação catalisadora da peroxidase, através de uma reação oxidativa de acoplamento que forma uma antipiriquinonimina vermelha cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose na amostra.

POD



Através da fórmula $\text{Glicose} = \frac{\text{Absorbância do teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 100$,

Absorbância do padrão

o resultado da dosagem foi expresso em mg/dL.

4.2.9 Ensaio para Avaliação do Efeito do Canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo Incorporado (lipossomas) na Glicemia de Ratos Normais e Diabéticos

Ratos normais ou diabéticos induzidos com aloxana (50 mg/kg) foram mantidos em jejum. Os animais foram divididos em grupos controles e tratados. Administraram-se então diferentes doses do LC-diRh ao grupo tratado, nas concentrações de 0,85 e 3,75 mM e do lipossoma puro aos grupos controles, por via oral através de uma sonda. Os níveis de glicose plasmática foram dosados nos tempos 0, 1, 2 e 3 h após o tratamento.

4.2.10 Ensaio e Medidas da Captação de Glicose no Músculo Sóleo *in vitro*

Para os experimentos de pré-incubação e incubação do músculo sóleo com o radioisótopo foi sempre utilizado o tampão Krebs Ringer-bicarbonato (KRb). Esta solução foi utilizada como meio de incubação em todos os ensaios *in vitro* e foi preparada imediatamente antes do experimento. O preparo da solução foi feito a partir das seguintes soluções estoque:

Tabela 1 - Soluções estoque para o preparo do KRb

CaCl ₂ .H ₂ O	2,50 mM
KH ₂ .PO ₄	1,19 mM
MgSO ₄ .H ₂ O	0,76 mM
NaHCO ₃	25,00 mM
NaCl	118,00 mM
KCl	4,61 mM

Após o preparo da solução-tampão, esta foi gaseificada com carbogênio (O₂:CO₂, 95: 5, v/v), monitorada através de um pH-metro até que atingisse o pH 7,4. A solução foi mantida em gelo durante todo o experimento.

Tabela 2 - Concentrações iônicas do KRb no líquido intra e extracelular.

Meio mEq/L	Na ⁺	K ⁺	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	HCO ⁻³	HPO ⁻⁴	Cl ⁻	SO ⁻⁴
Extracelular	140-145	4-5	2,5	1,5	27	1,0	100	-
Intracelular	10	145-150	2,0	4,0	8	65-70	5-20	-
KRb	146	4,7	2,5	1,2	25	1,2	127	1,2

4.2.10.1 Ensaio para Determinação da Curva de Tempo de Captação de Glicose e Curva de Dose-Resposta da Insulina

Ratos Wistar machos normais foram decapitados, o músculo sóleo foi removido e imediatamente colocado em placa de Petri, em gelo, contendo o tampão KRb em pH 7,4. Após dissecação e limpeza do tecido conjuntivo, os músculos direito e esquerdo foram pesados e alternadamente pré-incubados (30 min) e incubados (15, 30, 60, 90 min) nos grupos controles e tratados. Para a curva de tempo de captação de 2-[¹⁴C (U)]-deoxi-D-glicose ([¹⁴C]DG) os músculos foram pré-incubados em 1 mL do tampão KRb em um agitador metabólico a 37 °C em atmosfera de carbogênio (O₂:CO₂ ; 95:5 v/v) e incubados (diferentes períodos) em um novo tampão contendo 0,2 µCi/mL de [¹⁴C]DG.

Para a determinação da curva de dose-resposta da insulina todos os grupos foram pré-incubados com KRb (controles) e KRb adicionado de insulina (tratados), nas condições descritas acima, por 30 min e após foram incubados em um novo

tampão contendo 0,2 $\mu\text{Ci/mL}$ de $[^{14}\text{C}]\text{DG}$ por um período adicional de 1 h. A insulina foi utilizada em diferentes concentrações (7×10^{-3} ; 7×10^{-2} ; 7×10^{-1} ; 3,5; 7; 35; 70 nM).

4.2.10.2 Ensaio para Determinação da Curva de Dose-Resposta do Canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo na Captação de Glicose

Foram utilizados ratos Wistar machos normais. Os animais foram decapitados, o músculo sóleo foi removido e imediatamente colocado em placa de Petri, em gelo, contendo o tampão KRb em pH 7,4. Após dissecação e limpeza do tecido conjuntivo os músculos direito e esquerdo foram pesados e alternadamente incubados nos grupos controles e tratados. Para a curva de captação de $[^{14}\text{C}]\text{DG}$ os músculos foram pré incubados por 30 min em 1 mL do tampão KRb (controles) e 1 mL de KRb adicionado de C-diRh (tratados) em um agitador metabólico a 37 °C em atmosfera de carbogênio (O_2 : CO_2 ; 95: 5 v/v) e posteriormente incubados por 1 h em novo tampão KRb contendo 0,2 $\mu\text{Ci/mL}$ de $[^{14}\text{C}]\text{DG}$ acrescido do C-diRh nas concentrações de 26 (150 $\mu\text{g/mL}$); 52 (300 $\mu\text{g/mL}$) e 104 (600 $\mu\text{g/mL}$) mM.

4.2.10.3 Processamento das Amostras

Após a incubação os músculos foram retirados do meio, secos em papel filtro umedecido com KRb gelado, para remoção do excesso de radioativo aderido e, transferidos para frascos com tampa hermética contendo 1 mL de água destilada. Estes frascos foram congelados a -20 °C e após foram fervidos durante 10 min a fim de atingir o equilíbrio completo da água no tecido e no meio e processadas conforme Silva et al. (1995), com pequenas modificações. Alíquotas de 25 μL do meio interno (tecido) e do meio externo (meio de incubação) foram transferidas para frascos contendo 3 mL de líquido de cintilação, utilizadas para a medida da radioatividade usando um contador de cintilografia líquida LKB-Rack Beta. Os resultados foram expressos pela razão da radioatividade no tecido e no meio de incubação, avaliada pelo número de contas por minuto (cpm), por mL do líquido tissular/número de contas por minuto por mL do líquido de incubação (T/M) (SILVA et al., 1995). A

figura 12 representa a seqüência dos procedimentos de incubação e processamento das amostras incubadas com $[^{14}\text{C}]\text{DG}$.

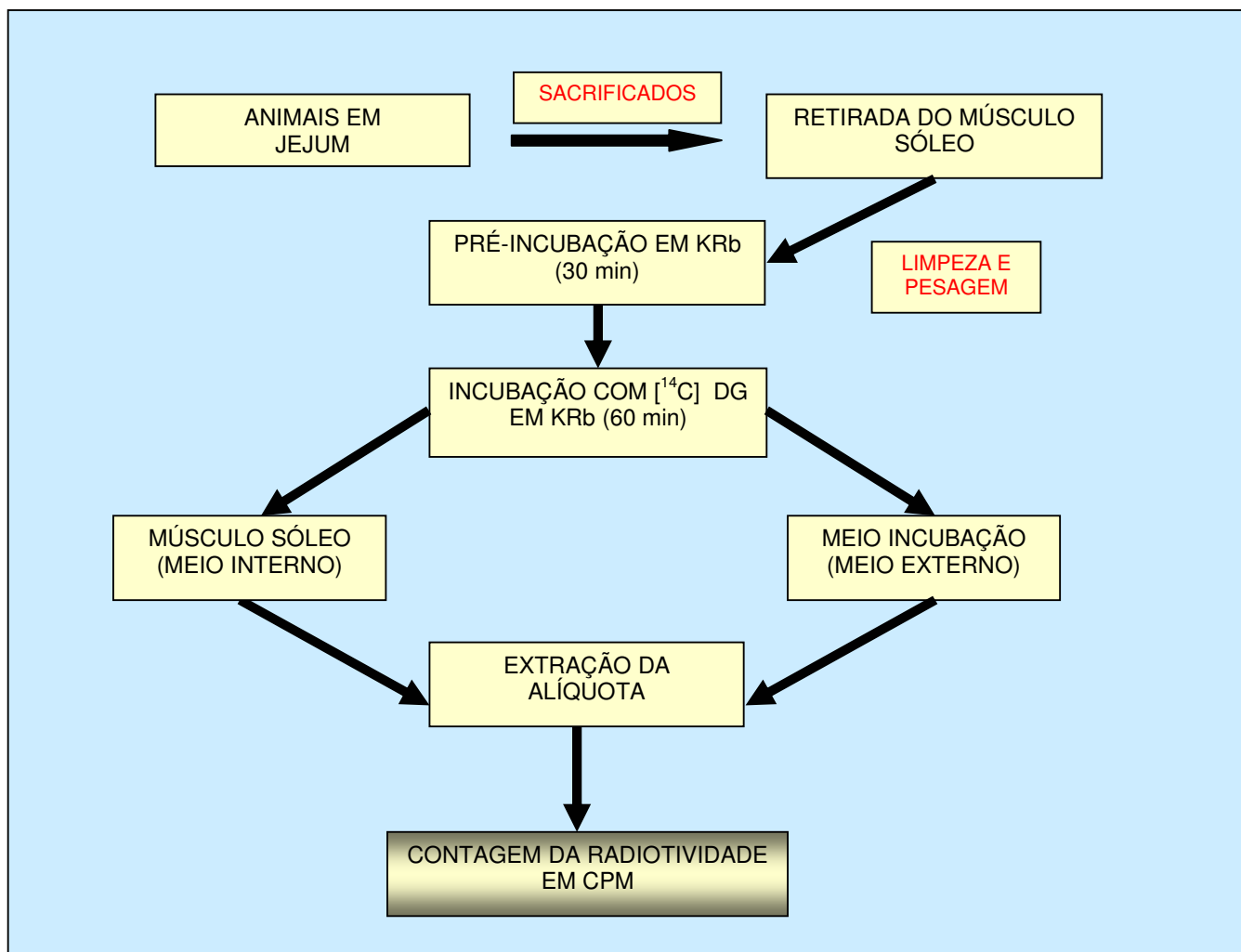


Figura 12 - Representação esquemática da metodologia da captação de glicose no músculo incubado *in vitro* para curva de tempo da captação basal de glicose e com insulina (diferentes doses) ou com C-diRh (diferentes doses).

4.2.11 Ensaio e Medidas da Síntese Protéica no Músculo Sóleo *in vitro*

Para os experimentos de síntese protéica foi realizada a curva basal e estimulada pela ação do C-diRh através da incubação do músculo sóleo de animais controles e tratados com 0,1 $\mu\text{Ci/mL}$ de L – [U - ^{14}C] Leucina ([^{14}C] leucina).

Para o ensaio de tempo basal da síntese protéica foram utilizados ratos Wistar normais. Após serem decapitados, os músculos sóleo foram extraídos e imediatamente colocados em placa de Petri, em gelo, contendo o tampão KRb em pH 7,4. Após dissecação e limpeza do tecido conjuntivo os músculos direito e esquerdo foram pesados e alternadamente pré-incubados por 30 min em tampão KRb em um agitador metabólico a 37 °C em atmosfera de carbogênio (O_2 : CO_2 ; 95: 5 v/v) sendo posteriormente incubados nos grupos controle e tratado com 0,1 $\mu\text{Ci/mL}$ de [^{14}C] leucina em 1 mL de KRb, nos tempos de 60 e 120 min. Os músculos extraídos foram homogeneizados com a solução de incubação contendo TCA 7% e centrifugados a 2000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado 1 mL de TCA 10% e posteriormente fervido a 96 °C por 10 min em frasco hermeticamente fechado. Após o resfriamento dos frascos estes foram novamente centrifugados por 10 min e tiveram o sobrenadante desprezado. Cada frasco foi inicialmente lavado por duas vezes com 1 mL de água destilada, sempre centrifugando e desprezando o sobrenadante; após, foi utilizado 1 mL de etanol, o qual foi centrifugado e desprezado o sobrenadante; 1 mL de etanol:éter (1:1), e por fim, após desprezar o sobrenadante foi adicionado 0,2 mL de ácido fórmico P.A. no qual a amostra foi desnaturada. Deste homogeneizado foi retirada uma alíquota para dosagem de proteínas totais pelo método descrito por Lowry et al (1951), utilizando como padrão de proteína a albumina bovina 0,5 mg/mL em água. As leituras foram determinadas em 620 nm. O homogeneizado foi então vertido para um tubo contendo 3 mL do líquido de cintilação para a medida da radioatividade usando um contador de cintilografia líquida. Os resultados foram expressos em cpm/mg de proteínas (BERNARD; WASSERMANN, 1982).

Para a curva do efeito do C-diRh na síntese de proteínas, foram utilizados tanto ratos normais quanto diabéticos. Os animais foram tratados por via oral com

veículo (controle) ou composto (tratado), 3 h antes da extração do músculo. Após este período os animais foram decapitados, tiveram o músculo sóleo removido e este foi imediatamente colocado em placa de Petri, seguindo protocolo anteriormente descrito para curva basal, sendo incubados por 120 min em KRb com agitação em atmosfera úmida. A figura 13 representa a seqüência dos procedimentos de incubação e processamento das amostras incubadas com [^{14}C] leucina.

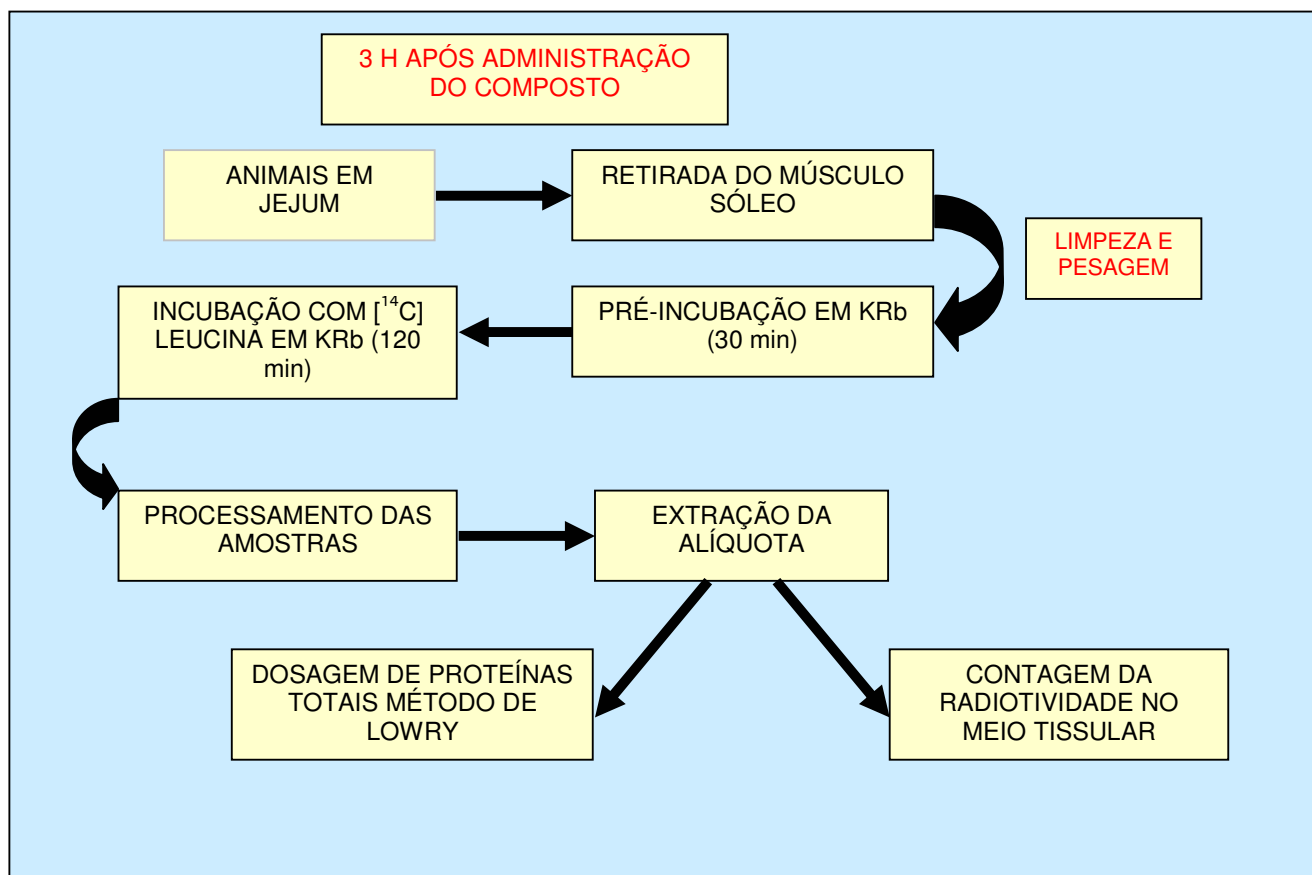


Figura 13 - Representação esquemática da metodologia da síntese protéica no músculo incubado *in vitro* com ou sem C-diRh.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M., conforme número de amostras especificados nas figuras. As comparações estatísticas foram realizadas através da análise de variância de uma ou duas vias (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Bonferroni pelo programa INSTAT versão 2.02. Também foi utilizado para avaliação de algumas amostras o teste “t” de Student. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para um “p” igual ou menor que 0,05.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do Modelo Experimental do Diabetes Melito Tipo 1 Induzido com Diferentes Doses de Aloxana

Inicialmente foram estudadas diferentes doses da aloxana a fim de determinar o melhor perfil do diabético do tipo 1 segundo os parâmetros glicêmicos. Para tanto, foram injetadas pela via intravenosa as doses de 50, 60 ou 70 mg/kg de peso corporal em uma única administração, conforme descrito em materiais e métodos. A figura 14 mostra a média da glicemia (mg/dL) obtida após os diferentes tratamentos.

Aloxana é uma substância que destrói especificamente as células β -pancreáticas, levando ao estado de deficiência de insulina (DUNN; MC LETCHIE 1942). Os níveis glicêmicos produzidos nos animais são bastante variados em função das doses utilizadas, mas também entre os animais induzidos com a mesma dose. Na literatura não existe ainda uma descrição definida dos motivos pelos quais ocorrem estas variações, o que há descrito é que estas diferenças podem ocorrer em função da idade do animal ou ainda da raça, sexo e estado nutricional (ISLAS-ANDRADE et al., 2000; VERSPOHL, 2002). Alguns grupos sugerem que as variações glicêmicas obtidas entre as diferentes doses de aloxana se dão em função da existência de células β -pancreáticas ainda funcionantes (PARI; UMA MAHESWARI, 1999; ALARCON-AGUILAR et al., 2000; IM WALDE et al., 2002), o que torna bastante crítica a caracterização do modelo experimental.

Conforme demonstrado na figura 14, os níveis glicêmicos podem definir diferentes modalidades de diabetes. Pode-se observar que nos resultados mostrados na figura 14 A a glicemia variou na faixa de 400 - 480 mg/dL caracterizando, segundo a literatura, um diabetes moderado, já na dose de aloxana 60 mg/kg (Fig.14 B) a glicemia variou entre 490 – 580 mg/dL e com 70 mg/kg (Fig.14 C) os valores foram ainda maiores, de 620 – 950 mg/dL, caracterizando um diabético severo. Levando em consideração os valores obtidos e a avaliação do estado

fisiológico do animal optou-se em trabalhar com a dose de aloxana 50 mg/kg de peso corporal, pois a mesma caracteriza um diabético experimental com glicemia moderada. Além disso, com esta dose obteve-se um baixo índice de mortalidade, em torno de 1%.

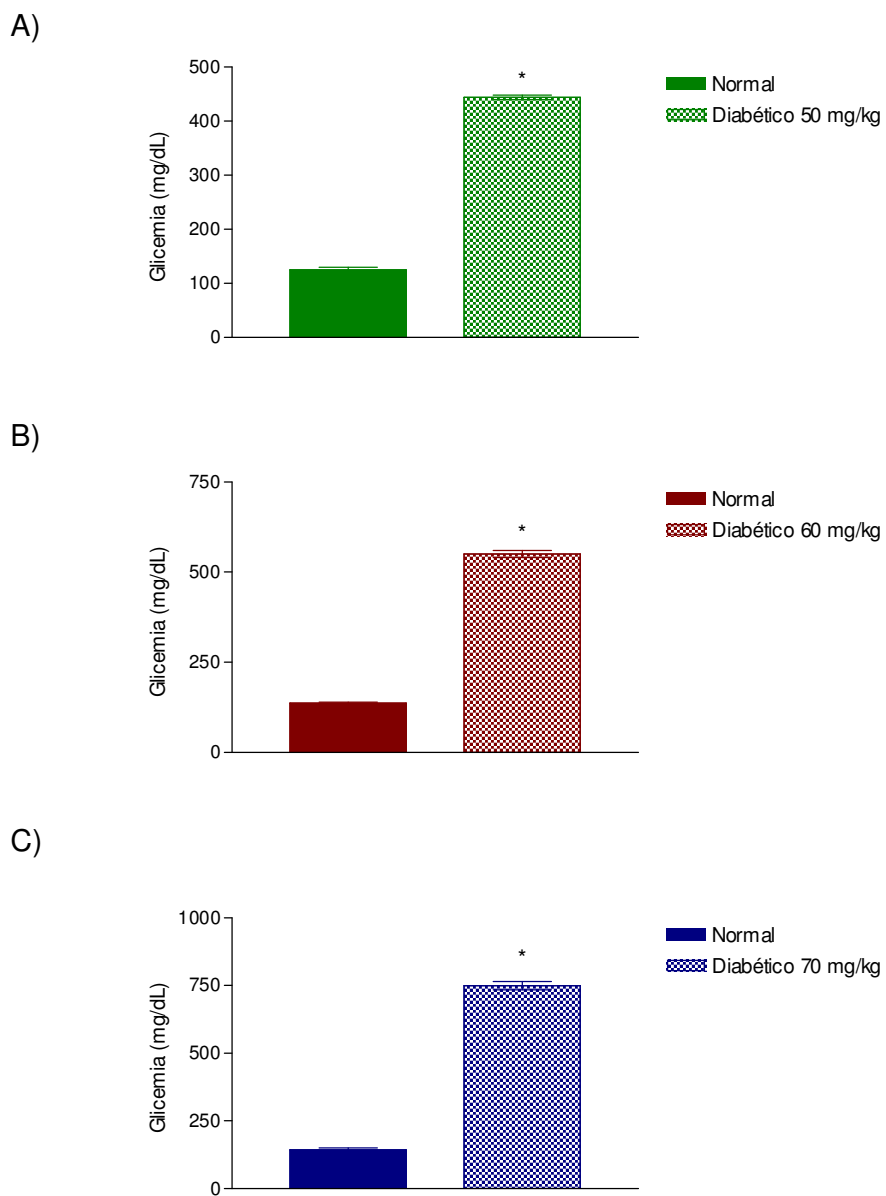


Figura 14 - Efeito das diferentes doses de aloxana na glicemia de ratos. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M de experimentos realizados em duplicatas (n=6). *Significativo para $p < 0,05$.

A tabela 3 apresenta os parâmetros analisados para a caracterização do estado diabético moderado, como peso corporal, glicemia, peso do músculo e a relação peso muscular/corporal, avaliados neste modelo experimental após três dias da indução com aloxana. A dose utilizada foi de 50 mg/kg de peso corporal e os valores obtidos foram comparados aos de animais normais. Pode-se observar claramente uma redução estatisticamente significativa no peso corporal e aumento dos níveis glicêmicos. O peso do músculo e a relação com o peso corporal não sofreram alterações significativas após este período.

Tabela 3 - Efeito da administração intravenosa de aloxana no peso corporal, glicemia, peso do músculo e na relação peso muscular/corporal após três dias da indução do diabetes

GRUPO	NORMAIS	n	DIABÉTICOS	n
Peso Corporal (g)	197,0 ± 5,8	95	151,0 ± 4,6*	55
Glicemia (mg/dL)	128,1 ± 2,7	19	443,8 ± 4,14*	18
Glicemia (mmol/L)	7,12 ± 0,15	19	24,6 ± 0,23*	18
Peso do Músculo (mg)	66,0 ± 1,9	98	70,5 ± 7,0	24
Peso Muscular/Corporal (mg/g)	0,003 ± 0,0001	18	0,004 ± 0,0001	26

Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M de experimentos realizados em duplicatas. *Significativo para $p < 0,05$.

5.2 Efeito do Canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo na Glicemia de Ratos em Função do Tempo

Conforme demonstrado por Silva et al. (2002), a fração *n*-butanólica proveniente das folhas da *Bauhinia forficata* demonstrou ação hipoglicemiante. Esta fração apresentou efeito significativo em ratos normais e diabéticos após tratamento agudo por via oral, no período de 0 a 3 horas. O melhor efeito hipoglicemiante da fração *n*-butanólica foi demonstrado com 800 mg/kg em animais diabéticos, significativo durante todo o período estudado.

Recentemente, Pizzolatti et al. (2003), descreveram através de métodos químicos e espectroscópicos os constituintes isolados da *Bauhinia forficata*. Das folhas foram caracterizados o canferol e quatro flavonóides glicosídeos, o canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo, o canferol 3-O- β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -L-ramnopiranosil-7-O- α -L-ramnopiranosídeo, a quercetina-3,7-O- α -L-diramnosídeo e a quercetina-3-O- β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -L-ramnopiranosil-7-O- α -L-ramnopiranosídeo. Enquanto das flores desta mesma planta foi isolado somente o flavonóide canferol-7-O-(α)-L-ramnosídeo. De Sousa (2003), determinou a curva de dose-resposta do composto majoritário da fração *n*-butanólica, o C-diRh, na glicemia de ratos normais e diabéticos. Destes resultados observou-se que o composto teve ação hipoglicemiante nas doses de 50 mg/kg (29 mM), 100 mg/kg (58 mM) e 200 mg/kg (116 mM).

O resultado do experimento mostrado na figura 15 teve por objetivo estudar o efeito do C-diRh (58 mM) após um período longo de tratamento, uma vez que em resultados prévios esta dose foi efetiva na ação hipoglicemiante em ratos diabéticos avaliados num período agudo (0-3 h).

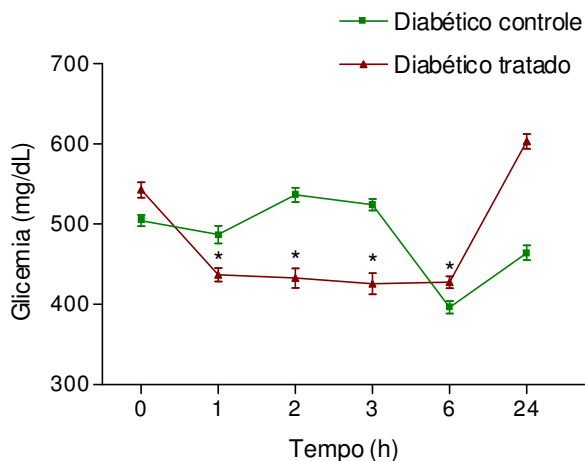


Figura 15 - Curva de tempo do C-diRh na glicemia de ratos diabéticos. Administrado por via oral na dose de 58 mM, após indução do diabetes com aloxana 50 mg/dL. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M de experimentos realizados em duplicatas (n=6). *Significativo para $p < 0,05$.

O C-diRh reduziu a glicemia significativamente nos tempos de 1, 2, 3 e 6 horas após a administração quando comparado ao tempo zero. Por outro lado, quando comparado ao diabético controle a redução da glicemia foi significativa nos tempos de 1 a 3 h. Os resultados são condizentes ao relatado na literatura para o C-diRh em ratos diabéticos, num período agudo (DE SOUSA, 2003).

Os flavonóides após consumidos são absorvidos através do estômago e do intestino e são principalmente metabolizados pelo fígado (HACKETT, 1986). Os resultados mostrados na figura 15 reforçam a atividade imediata do C-diRh na redução da glicemia, a qual é igualada após as 6 h de tratamento em ambos os grupos. Este período (6 h) coincide com a depleção de glicogênio hepático e início da gliconeogênese, demonstrado através das médias dos dois grupos. Ainda, no último período estudado o nível glicêmico reflete o resultado de uma gliconeogênese completa e ativa (BEARDSALL et al., 2003; RODEN; BERNROIDER, 2003). Em função dos resultados obtidos foram escolhidos o período agudo de tratamento assim como, a dose de 58 mM como referência para os experimentos subseqüentes.

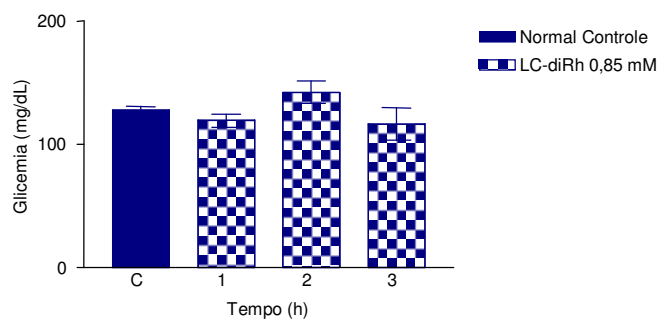
5.3 Efeito Comparativo da Administração do Canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo Incorporado em Lipossomas de Fosfatidilcolina e do Canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo na Glicemia de Ratos

Os flavonóides constituem uma ampla classe de polifenóis de relativa abundância entre os metabólitos secundários de vegetais (SIMÕES et al., 2001). Muitas destas propriedades biológicas conhecidas estão relacionadas à estrutura química e a habilidade em interagir com biomembranas (SAIJA et al., 1995). Com o objetivo de estudar a biopotência do LC-diRh na glicemia em relação ao C-diRh, utilizamos membranas lipídicas como carregadoras do composto, a fim de otimizar (em função da dose) o efeito deste flavonóide na redução da glicemia. Para este estudo comparativo foram utilizadas as doses de 0,85 e 3,75 mM do LC-diRh e para o C-diRh a dose de 58 mM. Cabe salientar que as doses de LC-diRh utilizadas foram escolhidas após os experimentos de incorporação do composto nos lipossomas, conforme descrito nos materiais e métodos.

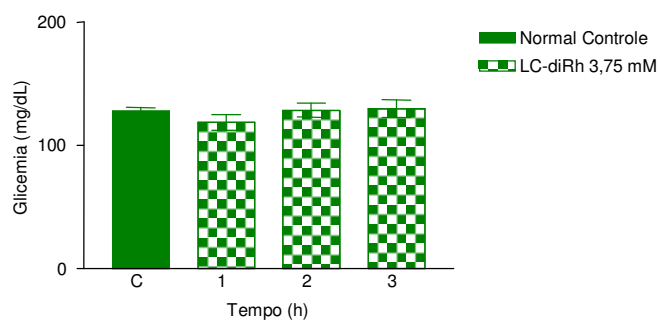
Em ratos normais, diferentes doses do LC-diRh não mostraram efeito significativo na redução da glicemia (Figura 16). Por outro lado, em ratos diabéticos o efeito hipoglicêmico do LC-diRh foi imediato e significativo para ambas as doses nas duas primeiras horas após o tratamento (Figura 17).

Observou-se que em ratos diabéticos ambas as doses testadas do LC-diRh reduziram significativamente os níveis glicêmicos nos tempos de 1 e 2 h (aproximadamente 12%). Enquanto o C-diRh, na concentração de 58 mM, reduziu a glicemia em aproximadamente 20% durante as três horas de tratamento. A concentração de 0,85 mM do LC-diRh é em torno de setenta vezes menor, quando comparada ao C-diRh na dose de 58 mM, caracterizando um melhor efeito do composto incorporado na redução dos níveis glicêmicos.

A)



B)



C)

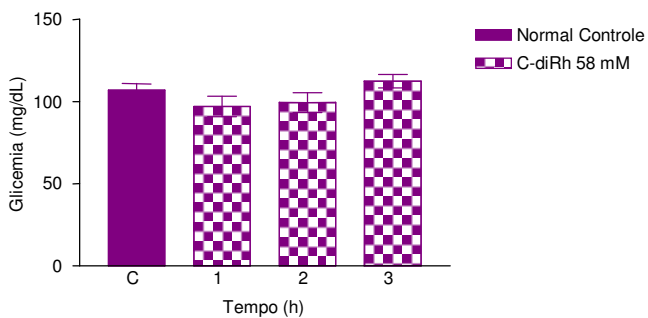
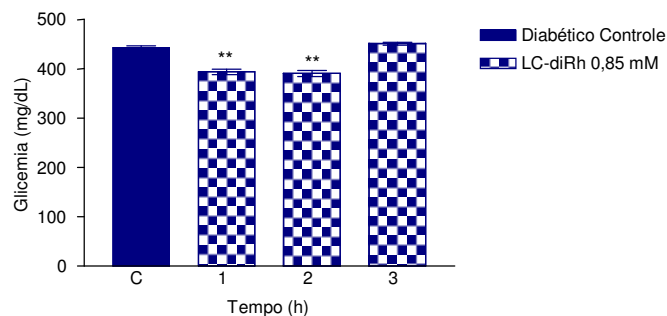
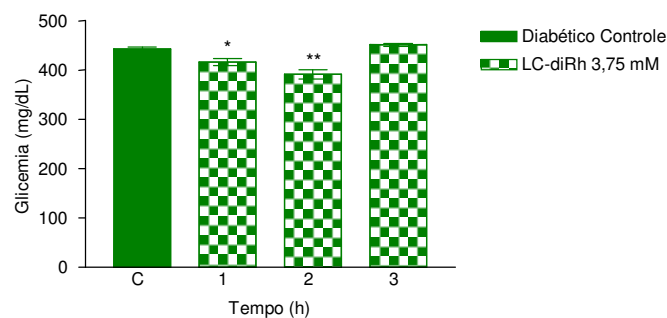


Figura 16 - Efeito do LC-diRh e do C-diRh na glicemia de ratos normais. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M de experimentos realizados em duplicatas (n=6).

A)



B)



C)

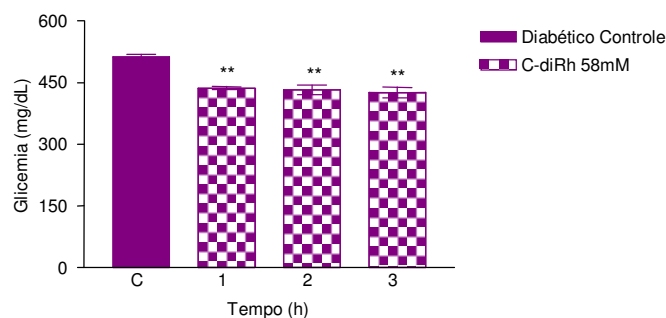


Figura 17 - Efeito do LC-diRh e do C-diRh na glicemia de ratos diabéticos. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M de experimentos realizados em duplicatas (n=6). *Significativo para $p \bullet 0,05$, ** Significativo para $p \bullet 0,001$.

Os lipossomas são geralmente aceitos como modelo adequado para o estudo de parâmetros bioquímicos que envolvem estruturas e propriedades de membrana, uma vez que eles formam uma camada lipídica estruturalmente similar a matriz

lipídica das membranas celulares. Além da ampla utilização deste sistema de lipossomas nos estudos que envolvem ação de antioxidantes e carreadores de fármacos, os diferentes tipos de lipossomas (uni ou multilamelar) contribuem nos processos de difusão através das membranas (SAIJA et al., 1995; CASTELLI et al., 1997; KONG et al., 2000). Aspectos positivos da utilização dos lipossomas no efeito hipoglicêmico foram efetivamente demonstrados em relação ao C-diRh, porém a restrição deste método está na impossibilidade de incorporação de quantidades crescentes do composto, pois as membranas apresentam um índice de saturação bastante limitado, não permitindo a realização de estudos de dose-resposta. Portanto, para análise mais adequada da biopotência do composto seria necessária a utilização de técnicas de micro incorporação que permitissem estudar a cinética de liberação do mesmo. Estudos complementares para a elucidação da bioatividade do C-diRh na glicemia, na captação da glicose em tecidos alvo da insulina, no estudo da cinética de liberação do composto das microcápsulas bem como a distribuição deste na membrana são objetivos pertinentes para melhor compreensão da bioatividade deste composto.

5.4 Captação da ¹⁴C- D- Glicose no Músculo Sóleo de Ratos Normais

O transporte de glicose através da membrana é um mecanismo clássico que sofre ação direta da insulina. Este hormônio apresenta efeito sobre os tecidos periféricos, principalmente o tecido muscular e adiposo, elevando os níveis de captação de glicose através da regulação dos carregadores deste açúcar (WATSON; PESSIN, 2001; MOORE et al., 2003). Com o objetivo de estudar os efeitos insulino-miméticos do C-diRh, foi utilizada a captação de 2-[¹⁴C (U)]-deoxi-D-glicose no músculo sóleo de ratos.

Imediatamente antes da incubação os animais foram sacrificados, o músculo sóleo foi retirado e incubado no grupo controle (sem tratamento) e o músculo contralateral no grupo tratado (insulina ou C-diRh). A figura 18 mostra o músculo direito de animais normais e diabéticos.

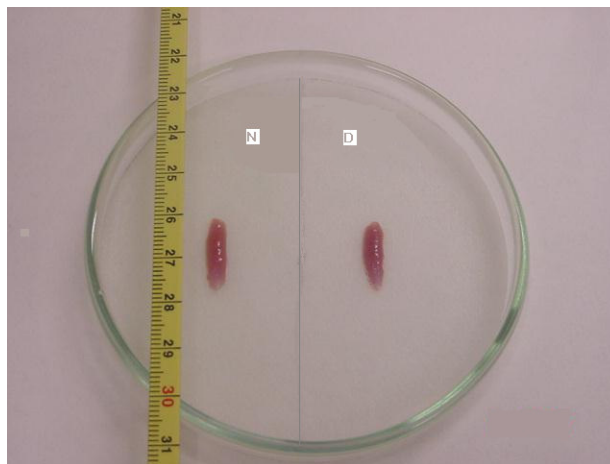


Figura 18 - Músculo sóleo de ratos normais (N) e diabéticos (D) retirados da perna direita de cada animal.

5.1.1 Curva de Captação Basal da ^{14}C - D- Glicose em Músculo Sóleo

Sob as condições experimentais *in vitro*, empregadas no presente estudo, o músculo sóleo de ratos normais eficientemente transportou $[^{14}\text{C}]\text{DG}$. A deoxiglicose é um análogo sintético da glicose, a qual é transportada pelo mesmo mecanismo deste açúcar, mas é metabolizada somente a 2-deoxi-D-glicose-6-fosfato (MIAN et al., 1979). Assim o uso deste substrato análogo permite-nos medir somente o transporte da glicose sem qualquer interferência no metabolismo celular.

A captação da $[^{14}\text{C}]\text{DG}$ foi estudada na ausência (captação basal) e na presença de diferentes doses de insulina. Para determinar o melhor tempo de captação basal de glicose no músculo sóleo, nestas condições experimentais, foi realizada a curva nos períodos de 15, 30, 60 e 90 min, conforme descrito nos métodos. Na figura 19 foi observado que o aumento da captação da $[^{14}\text{C}]\text{DG}$ foi crescente entre 15 e 60 min, atingindo um platô entre 60 e 90 min. Em todos os períodos estudados, observou-se um aumento significativo da captação em relação ao tempo de 15 min (menor período de incubação). O tempo de curso da $[^{14}\text{C}]\text{DG}$ consistiu numa curva de estímulo progressivo, seguida de um platô, típico de um processo em equilíbrio. Apoiado nestes resultados o período de incubação padrão de 60 min foi escolhido para os experimentos subseqüentes.

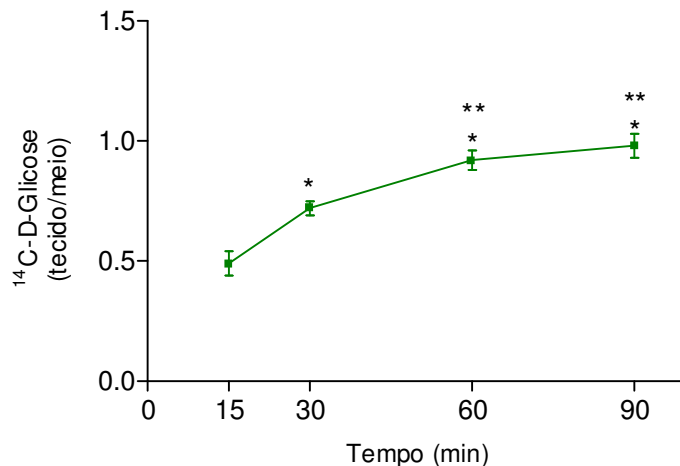


Figura 19 - Curva de tempo da captação basal da [¹⁴C]DG em músculo sóleo de ratos normais. Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M. de grupos de 4 músculos. *Significativo para $p \leq 0,001$ em relação ao tempo 15 min. **Significativo para $p \leq 0,05$ em relação ao tempo 30 min.

5.4.2 Curva de Dose - Resposta da Insulina na Captação da ¹⁴C- D-Glicose em Músculos de Ratos Normais

A insulina é fundamental no estímulo da captação de glicose pelos tecidos periféricos no organismo em condições normais. Na figura 20 foram estudadas as doses de 7×10^{-3} ; 7×10^{-2} ; 7×10^{-1} ; 3,5; 7; 35 e 70 nM de insulina, utilizando-se o melhor tempo de captação basal de glicose. O efeito da insulina na captação de glicose foi dependente da dose e significativo com 3,5 e 7,0 nM após 1 h de incubação em relação ao grupo controle. Estas doses representam um estímulo na captação de 42 e 50%, respectivamente, em relação à captação basal no mesmo período (1 h). O estímulo do hormônio mostrou um perfil de dose-resposta em forma de sino, de acordo com o esperado para hormônios. A adição de insulina no período de pré-incubação e incubação produziu um efeito estimulatório da captação de glicose no músculo, como também já demonstrado para o tecido adiposo e tireoideo (CARRUTHERS, 1990; MACHADO et al., 1996; MOORE et al., 2003).

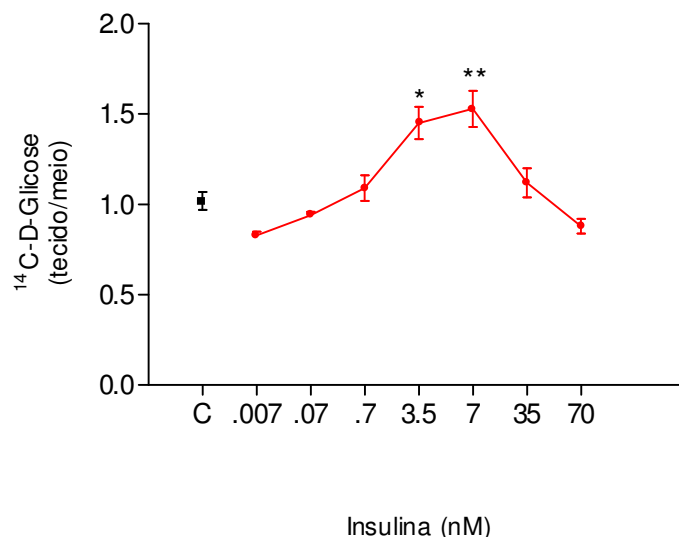


Figura 20 - Curva de dose-resposta da insulina na captação da [¹⁴C]DG em músculo sóleo de ratos normais. C = controle. Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M. (n=6). *Significativo para p •0,01; ** Significativo para p •0,001.

Tabela 4 - Conversão da molaridade para unidades internacionais (UI) de insulina

Insulina (nM)	0,007	0,07	0,7	3,5	7,0	35,0	70,0
Insulina (UI)	0,001	0,01	0,1	0,5	1,0	5,0	10,0

A precisa regulação da captação da glicose hepática e periférica é essencial para preservar a homeostasia da glicose. Mesmo com o grande número de investigações relacionados ao transporte de glicose, a regulação da captação é ainda pouco entendida. Ainda que complexo, o efeito melhor conhecido da insulina na captação de glicose no músculo é no estímulo da translocação do transportador de glicose, GLUT 4, para a membrana plasmática da célula muscular. De um modo geral, mesmo em diferentes tecidos e estudados por diferentes metodologias (cultura de células, *in situ* e *in vitro*), observa-se que a dose efetiva de insulina no estímulo da captação de glicose está entre 0,1 e 1000 UI num período de incubação que varia de 15 a 60 minutos (BIGORNIA; BIHLER, 1986; MACHADO et al., 1996; NISHITANI et al., 2002).

O propósito final deste experimento foi estabelecer um padrão de captação de glicose sob a regulação da insulina na tentativa de reproduzir ou comparar com o efeito do bioflavonóide em estudo.

5.4.3 Curva de Dose - Resposta do Canferol 3-7-O-(α)-L-Diramnosídeo na Captação da ^{14}C - D - Glicose em Músculos de Ratos Normais

Flavonóides são compostos polifenólicos encontrados em plantas e exibem uma ampla atividade biológica relatada através de estudos *in vivo* e *in vitro* (BELTRAME et al., 2001). No entanto, a maioria dos estudos mostra o efeito dos flavonóides como potenciais agentes anti-oxidantes, e poucos são os estudos relacionados com o metabolismo de carboidratos (ONG; KHOO, 2000; BELTRAME et al., 2001; VESSAL et al., 2003). A figura 21 mostra o efeito das doses de 26; 52 e 104 mM do C-diRh, *in vitro*, na captação da glicose em músculo sóleo no período de 1 h. O efeito estimulatório do C-diRh foi crescente e significativo nas doses de 52 e 104 mM em relação ao grupo controle. Estas doses representam um efeito estimulatório de 43 e 46% em relação à captação basal no período de 1 h.

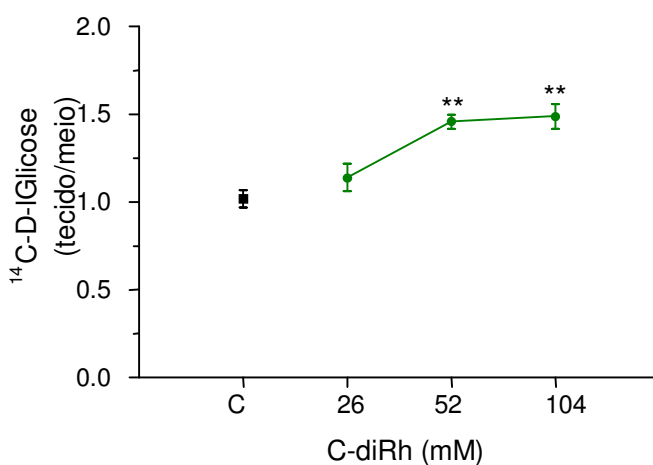


Figura 21 - Curva de dose-resposta do C-diRh na captação da ^{14}C]DG em músculo de ratos normais. C = controle. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M (n=8).

** Significativo para $p < 0,001$.

A tabela 5 mostra o efeito comparativo do percentual estimulatório da insulina e do C-diRh na captação de [^{14}C]DG no músculo sóleo.

Tabela 5 - Efeito comparativo do percentual estimulatório da insulina e do C-diRh na captação da [^{14}C]DG no músculo sóleo

Captação de [^{14}C]DG (tecido/meio)			
	Insulina	C-diRh	% de estímulo
Basal	1,02 \pm 0,03		-
3,5 nM	1,45 \pm 0,09*	-	42
7,0 nM	1,53 \pm 0,1**	-	50
52 mM	-	1,46 \pm 0,04**	43
104 mM	-	1,49 \pm 0,07**	46

Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M (experimentos com insulina - n=6); (experimentos com C-diRh - n=8). *Significativo para $p < 0,01$; ** Significativo para $p < 0,001$.

A ação do C-diRh, nas doses de 52 e 104 mM, na captação de glicose, comparada percentualmente a da insulina, mostrou um estímulo tão efetivo quanto ao obtido para este hormônio. Considerando os efeitos do C-diRh (29, 58 e 116 mM) descritos por De Sousa (2003) na redução da glicemia de ratos diabéticos, os resultados do presente trabalho na captação da glicose em resposta ao C-diRh (26, 52 e 104 mM) sugerem que o efeito hipoglicemiante observado *in vivo* possa ser consequência da captação de glicose aumentada no músculo. Estes resultados demonstram o potencial efeito insulino-mimético do C-diRh na captação de glicose num tecido alvo da insulina, o músculo.

Os flavonóides exercem alguns efeitos no metabolismo da glicose (transporte de glicose, atividade da glicose 6-fosfato, atividade da fosforilase "a" muscular), bem

como no metabolismo dos lipídeos (lipogênese). Por outro lado, alguns flavonóides também são conhecidos por atuarem indiretamente como agentes anti-hiperglicêmicos por exercerem efeitos na proteção da degeneração (antioxidantes) de células β -pancreáticas. A miricetina, por exemplo, estimula a captação de glicose no tecido adiposo por aumentar a velocidade de captação ($V_{m\acute{a}x}$), sem alterar o K_m . Também foi demonstrado neste mesmo tecido que a miricetina não afeta a autofosforilação do receptor de insulina nem a atividade tirosina-cinase deste receptor. Através de imunodeteção estes autores mostraram que a estimulação da captação de glicose pela miricetina não é por consequência do estímulo da translocação do transportador de glicose para a membrana plasmática (ONG; KHOO, 1996, 2000). Para outro flavonóide, a quercetina, que também apresenta ação hipoglicemiante em ratos diabéticos, foi demonstrada uma regulação no metabolismo da glicose através da atividade da glicocinase hepática (VESSAL et al., 2003). Já a silimarina, um outro flavonóide extraído de plantas, apresenta uma atividade anti-hiperglicêmica por proteger as células β -pancreáticas do estresse oxidativo (SOTO et al., 1998).

Devido à ótima captação de glicose estimulada pelo C-diRh quando comparado ao grupo controle, bem como ao grupo insulina, é de nosso interesse, num futuro breve, estudar as constantes cinéticas da captação da glicose sob a regulação do composto em tecido muscular.

5.5 Estudo da Síntese Protéica em Músculo de Ratos Normais e Diabéticos

Um dos efeitos clássicos da insulina na regulação da glicemia é a habilidade em aumentar a taxa de captação de glicose no músculo (DE FRONZO, 1997). O músculo esquelético exibe uma significativa utilização de glicose sangüínea através de um transportador de glicose (GLUT 4), regulado pela insulina. O recrutamento de distintos GLUT'S 4 de um "estoque" intracelular para a membrana plasmática ocorre em resposta a vários estímulos, incluindo a insulina e o exercício (HAYASHI et al., 1997; BORGHOUTS; KEIZER, 2000). No entanto, a homeostasia da glicose pela

insulina pode envolver outros processos como o aumento da velocidade de transporte através da membrana. Na figura 22 observa-se uma crescente incorporação de [^{14}C] leucina em proteínas no músculo sóleo de ratos nos períodos de 1 e 2 h de incubação. Utilizamos o período de 2 h para os estudos do C-diRh na síntese de proteínas no músculo sóleo de ratos normais e diabéticos.

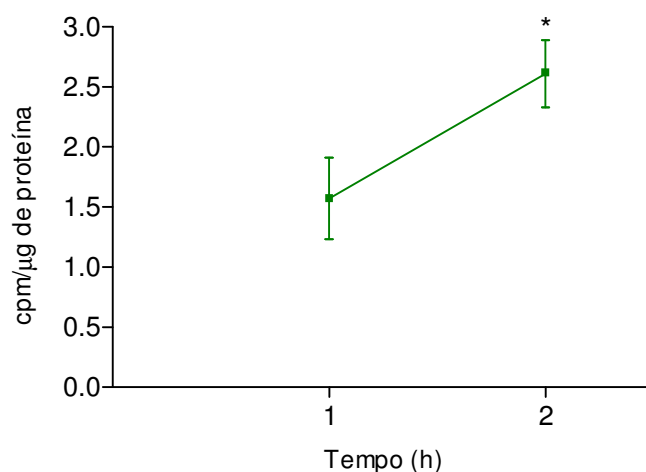


Figura 22 - Síntese protéica basal em músculos de ratos normais. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M (n=6). * Significativo para $p < 0,05$.

Este aumento na síntese em proteínas musculares em função do tempo também é demonstrado por outros autores em humanos e ratos através de diferentes técnicas experimentais tanto na ausência como presença de insulina (GELFAND; BARREL, 1987; PACY et al., 1989; WEINSTEIN et al., 2002).

A figura 23 representa o efeito do C-diRh na incorporação de [^{14}C] leucina na síntese de proteínas de músculos de ratos normais e diabéticos. Após o tratamento *in vivo* com 58 mM de C-diRh por via oral, os músculos foram incubados com 0,1 $\mu\text{Ci/mL}$ de [^{14}C] leucina por 2 h. Neste período não foi observado nenhum efeito estimulatório do composto na síntese protéica em relação aos respectivos controles, tanto nos músculos de ratos normais quanto de diabéticos. No entanto, a síntese protéica permaneceu ativa durante este período na presença do C-diRh. Ao contrário, outros flavonóides como a metil-quercetina, a quercetina e a genisteína apresentam um efeito anti-tumoral por inibir a síntese de proteínas, DNA e RNA,

suprimindo assim o crescimento tumoral (VRIJSEN et al., 1987; ITO et al., 1999; WONG; MC LEAN, 1999).

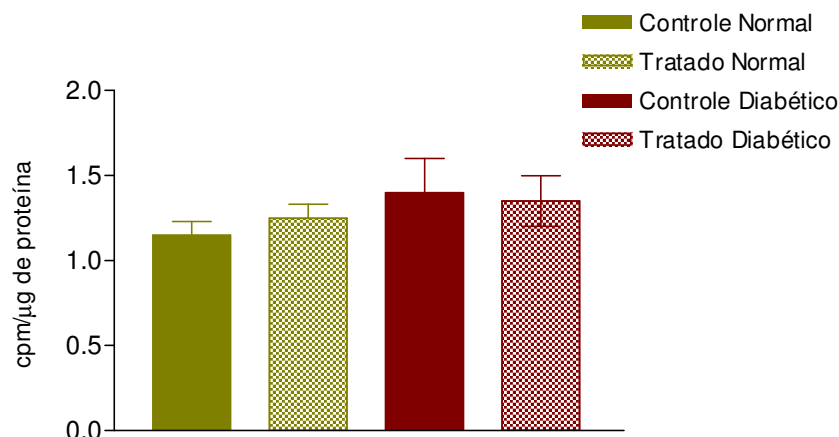


Figura 23 - Efeito do C-diRh na síntese protéica em músculo sóleo de animais normais e diabéticos 3 horas após administração oral do composto. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M (n=8).

De acordo com o demonstrado por Ong e Khoo (1996, 2000), para a miricetina, o estímulo na captação de glicose no tecido adiposo não está diretamente relacionado com a translocação do GLUT-4. Os resultados do presente trabalho indicam que o estímulo da captação de glicose pelo C-diRh pode ser mediado pelas propriedades cinéticas da membrana plasmática (K_m e $V_{m\acute{a}x}$) e/ou pela translocação dos carregadores de glicose, já que a síntese protéica permaneceu ativa também na presença do composto. Com base nestes resultados mostrados na figura 23, entretanto, não podemos ainda descartar a hipótese de que o C-diRh possa atuar na translocação dos carregadores de glicose já formados e armazenados no retículo das células. Por isso, são necessários estudos com bloqueadores da síntese de DNA, RNA e proteínas, a fim de esclarecer esta via de atuação do composto.

5.6 Efeito do Canferol 3,7-O-(α)-L-Diramnosídeo na Glicose Urinária de Ratos Normais e Diabéticos

No sistema renal normal o sangue irriga os rins, nos quais ocorrerão trocas de elementos essenciais, como a água, sais e ainda a filtração, reabsorção e secreção de outros elementos que o organismo não deve eliminar, como o excesso de água que é reabsorvida passivamente em vários locais do aparelho renal. A reabsorção de glicose, aminoácidos e sais são também fundamentais e ocorre através da ligação destas substâncias a proteínas transportadoras presentes na membrana das células dos túbulos renais (transporte ativo). Ambos os transportes (ativo e passivo) são influenciados pela concentração plasmática das substâncias a serem reabsorvidas, o chamado “limiar renal”. Para a glicose este valor varia entre 160 e 180 mg/dL, ocorrendo glicosúria quando as concentrações plasmáticas superam estes níveis (STRASINGER, 2000). Em condições normais a glicose sofre reabsorção completa pelas células do epitélio tubular renal e retorna a corrente sangüínea, já no estado diabético o limiar de reabsorção é ultrapassado e então, como característica da doença, ocorre a presença de glicose na urina (SCHOSSLER et al., 1984).

Previamente foi demonstrado que o C-diRh diminuiu ligeiramente os níveis glicêmicos em ratos normais após um período agudo de tratamento. Já nos ratos diabéticos o efeito hipoglicêmico ocorreu com todas as doses estudadas. Além disso, a curva de tolerância à glicose na presença do C-diRh não afetou a liberação de insulina, quando comparado à ação do tolbutamida (DE SOUSA, 2003). Apoiado nestes resultados foi estudada uma outra via que poderia estar contribuindo para este efeito hipoglicemiante, a inibição da reabsorção renal da glicose. A fim de avaliar esta possibilidade foram coletadas amostras de urina durante três horas, após a administração por via oral do C-diRh (tratados), na dose de 58 mM ou do veículo, solução de etanol 1% (controles). A tabela 6 mostra os resultados referentes à glicose urinária que foi dosada tanto em ratos normais quanto diabéticos e comparada aos valores obtidos nos respectivos controles.

Tabela 6 - Efeito da administração oral de C-diRh na glicose urinária de ratos normais e diabéticos.

Tempo (h)	Glicose urinária (mg/dL)			
	Normais		Diabéticos	
	n = 4		n = 9	
	Controle (veículo)	Tratado (58 mM)	Controle (veículo)	Tratado (58 mM)
3	1,15 ± 0,9	1,54 ± 0,32	901 ± 22,0	892,5 ± 1,5

Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M de experimentos realizados em duplicatas.

No período agudo, conforme mostrado na tabela 6, não foram observadas diferenças nos valores da glicosúria entre os animais controles e tratados com C-diRh, indicando que o mesmo não atua prioritariamente por esta via neste curto período de tratamento. No entanto, a utilização do chá das folhas da *B. forficata*, após um período crônico de tratamento (31 dias) reduziu os níveis de glicose urinária, conforme demonstrado por Pepato et al. (2002).

No presente trabalho demonstramos que os flavonóides glicosilados das folhas da *Bauhinia forficata*, especificamente o C-diRh, possui um potencial efeito hipoglicemiante no diabético moderado. Este composto, num período agudo, apresentou um efeito melhorado na redução da glicemia após ser incorporado em membranas lipossômicas. Além disso, o C-diRh, mostrou uma ação insulino-mimética na captação de [¹⁴C]DG, sem no entanto alterar a síntese protéica. Estes dados levantam a hipótese de que este composto possa estar atuando na velocidade de entrada da glicose nas células e/ou na translocação dos carregadores de glicose para a membrana plasmática, uma vez que, não afetou a glicosúria e conforme demonstrado por De Sousa (2003) o composto também não alterou a absorção intestinal da glicose e não influenciou a curva de tolerância a glicose.

6 CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que:

- ↪ O modelo experimental induzido com aloxana caracterizou o estado diabético.
- ↪ O canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo reduziu significativamente a glicemia em ratos diabéticos num período agudo de tratamento.
- ↪ O canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo incorporado, numa dose de até 70 vezes menor que a dose de 58 mM do canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo, foi efetivo em reduzir significativamente a glicemia em ratos diabéticos.
- ↪ A captação de [14 C]DG foi crescente de 15 a 90 min no músculo sóleo de ratos normais.
- ↪ A insulina estimulou a captação de [14 C]DG, no músculo sóleo de ratos normais, de modo dependente da dose e significativo nas concentrações de 3,5 e 7,0 nM em relação ao controle.
- ↪ O canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo estimulou a captação de [14 C]DG no músculo sóleo de ratos normais com valores percentualmente similares ao estímulo produzido com as melhores doses de insulina (3,5 e 7,0 nM).
- ↪ O canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo não alterou a síntese protéica endógena em ratos normais e diabéticos, comparados aos respectivos controles.
- ↪ O canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo não reduziu os níveis de glicose urinária num período agudo de tratamento.

7 PERSPECTIVAS

Considerando que o canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo foi efetivo como agente hipoglicemiante e com ação no tecido alvo da insulina, mostrando um efeito insulino-mimético, as perspectivas deste grupo são estudar a relação estrutura-atividade dos diferentes canferóis, estudar a distribuição do canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo no lipossoma e a cinética de liberação deste das microcápsulas, bem como, determinar os parâmetros cinéticos K_m e $V_{m\acute{a}x}$ na captação de glicose em tecido muscular.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-BARRY, J.A; ABDEL-HASSAN, I.A; AL-HAKIEM, M.H.H. Hypoglycaemic and antihyperglycaemic effects of *Trigonella foenum – graecum* in normal and alloxan induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 58, p. 149-155, 1997.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 1052: Citações em documentos. Rio de Janeiro, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Referências - Elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ALARCON-AGUILAR, F.J.; JIMENEZ-ESTRADA, M.; REYES-CHILPA, R.; GONZALEZ-PAREDES, B.; CONTRERAS-WEBER, C.C.; ROMAN-RAMOS, R. Hypoglycemic activity of root water decoction, sesquiterpenoids, and one polysaccharide fraction from *Psacalium decompositum* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v.69, p. 207-215, 2000.

BAILEY, C.J. Biguanides and NIDDM. *Diabetes Care*, v. 16, p. 755-772, 1992.

BALL, S.G.; BARBER, T.M. Molecular development of the pancreatic β cell: implications for cell replacement therapy. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, v.14, p. 349-355, 2003.

BEARDSALL, K.; YUEN. K.; WILLIAMS, R.; DUNGER, D. Applied physiology of glucose control. *Current Paediatrics*, v.13, p. 543-548, 2003.

BELTRAME, F.L.; SARTORETTO, J.L.; BAZOTTE, R.B.; CUMAN, R.N.; CORTEZ, D.A.G. Estudo fitoquímico e avaliação do potencial antidiabético do *Cissus Sicyoides* L. (Vitaceae). *Química Nova*, v.24, p. 783-785, 2001.

BERNARD, E.A.; WASSERMANN, G.F. Changes of nucleic acid and protein synthesis in rat testis during development. *Arquives of Biological and Tecnology*, v.25, p.211-214, 1982.

BIGORNIA, L.; BIHLER, I. 3-O-Methyl-D-glucose uptake in isolated bovine adrenal chromaffin cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 885, p. 335-344, 1986.

BORGHOUTS, L.B.; KEIZER, H.A. Exercise and insulin sensitivity: a review. *International Journal Sports of Medicine*, v.21, p. 1-12, 2000.

BOYLE, J.P.; HONEYCUTT, A.A.; NARAYAN, K.M.; HOERGER, T.J.; GEISS, L.S.; CHEN, H.; THOMPSON, T.J. Projection of diabetes burden through 2050: impact of changing demography and disease prevalence in the US. *Diabetes Care*, v.24, p. 1936-1940, 2001.

BRELJE, T.C.; SORENSON, R.L. Nutrient and hormonal regulation of the threshold of glucose-stimulated insulin secretion in isolated rat pancreases. *Endocrinology*, v. 123, p. 1582-1590, 1988.

BRESSLER, R; JOHNSON, D. New pharmacological approaches to therapy of NIDDM. *Diabetes Care*, v.15(6), p. 792-805, 1992.

CARICATI-NETO, A.; PEREIRA, O.C.M.; BASTOS-RAMOS, W.P. Effects of the aqueous and alcoholic extracts of *Bauhinia forficata* on blood glucose in the rat. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 18, p. 726A, 1985.

CARRUTHERS, A. Facilitated diffusion of glucose. *Physiological Reviews*, v.70, p. 1135-1156, 1990.

CASTELLI, F.; TROMBETTA, D.; TOMAINO, A.; BONINA, F.; ROMEO, G.; UCCELLA, N.; SAIJA, A. Dipalmitoylphosphatidylcholine/linoleic acid mixed unilamellar vesicles as model membranes for studies on novel free-radical scavengers. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v. 37, p. 135-141, 1997.

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.

CHEATUM, B.; KAHN, C.R. Insulin action and the insulin signalling network. *Endocrinology Review*, v. 16, p. 115, 1995.

CRECZYNSKI-PASA, T.B.; GRÄBER, P. ADP binding and ATP synthesis by reconstituted H⁺-ATPase from chloroplasts. *FEBS Letter*. v. 350, p. 195-198, 1994.

CRECZYNSKI-PASA, T.B.; GRÄBER, P. Phosphatase activity of H⁺-ATPase from chloroplasts. *Biochimica et Biophysica.Acta*. v.1320, p. 58-64; 1997.

DA SILVA, K.L.; BIAVATTI, M.W.; LEITE, S.N.; YUNES, R.A; MONACHE, F.D.; CECHINEL FILHO, V. Phytochemical and phamacognostic investigation of *Bauhinia forficata* Link (Leguminosae). *Zeieschrift Naturforschung*, v.55, p. 478-480, 2000.

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

DE FRONZO, R.A. Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diabetes Review*, v.5, p. 157-269, 1997.

DE SOUSA, E. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade hipoglicêmica da espécie vegetal *Bauhinia forficata* Link. 2002. Dissertação de mestrado em Química. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

DEVLIN, T.M. Manual de bioquímica com correlações clínicas. 4ª edição. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 1997.

DUARTE, A.C.G.O. Estudo experimental dos efeitos da estimulação ultrassônica de baixa intensidade na consolidação óssea em ratos submetidos ao diabetes aloxânico. Dissertação de mestrado em Bioengenharia. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1996.

DUNN, J.S.; MC LETCHIE, N.G.B. Experimental alloxan diabetes in the rat. *Lancet*, v.2, p. 384-387, 1942.

FARNSWORTH, N.R. The development of pharmacological and chemical research for application to traditional medicine in developing countries. *Journal of Ethnopharmacology*, v.2, p. 173-181, 1980.

GELFAND, R.A.; BARREL, E.J. Effect of physiologic hyperinsulinemia on skeletal muscle protein synthesis and breakdown in man. *Journal Clinical of Investigation*, v.80, p. 1-6, 1987.

GILMAN, A.G.; RALL, T.W.; NIES, A.S.; TAYLOR, P. GOODMAN & GILMAN. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 8ª edição. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1991.

GOLDSTEIN, B.J. Rosiglitazone. *International Journal of Clinical Practice*, v. 54, p. 333-337, 2000.

GRIBBLE, F.M.; REIMANN, F. Differential selectivity of insulin secretagogues. Mechanisms, clinical implications, and drug interactions. *Journal of Diabetes and Its Complications*, v.15, p. 11-15, 2003.

HACKETT, A.M. The metabolism of flavonoid compounds in mammals. *Plant Flavonoids in Biology and Medicina: Biochemical, Pharmacological and Structure Activity Relationships*, p. 157-194, 1986.

HAYASHI, T.; WOJTASZEWSKI, J.F.P.; GOODYEAR, L.J. Exercise regulation of glucose transport in skeletal muscle. *American Journal of Physiology*, v.273, p. 1039-1051, 1997.

IM WALDE, S.S.; DOHLE, C.; SCHOTT-OHLY, P.; GLEICHMANN, H. Molecular target structures in alloxan-induced diabetes in mice. *Life Sciences*, v.71, p. 1681-1694, 2002.

ISLAS-ANDRADE ET AL. ET AL., S.; MONSALVE, M.C.R.; DE LA PENÃ, 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 Histochemistry Citochemistry*, v.33 (3), p. 201-208, 2000.

ITO, T.; WARNKEN, S.P.; MAY, W.S. Protein synthesis inhibition by flavonoids: Roles of eukaryotic initiation factor 2 α kinases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 265, p. 589-594, 1999.

JAOUHARI, J.T.; LAZREK, H.B.; JANA, M. The hypoglycemic activity of *Zygophyllum gaetulum* extracts in alloxan-induced hyperglycemic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 69, p. 15-20, 2000.

JULIANI, C. Ação hipoglicemiante da Unha-de-Vaca. *Revista Médica Farmacologia, Química e Fisiologia*, v.2, p. 165-169, 1929.

JULIANI, C. Ação hipoglicemiante da *Bauhinia forficata* Link - novos estudos experimentais. *Revista Sudamericana de Endocrinologia, Imunologia e Quimioterapia*, v. 14, p. 326-334, 1931.

JULIANI, C. Ação hipoglicemiante da *Bauhinia forficata* Link - Novos estudos clínicos e experimentais. *Jornal dos Clínicos*, v.3, p. 93-112, 1941.

KAMESWARA RAO, B.; KESAVULU, M.M.; GIRI, R.; APPA RAO, C. Antidiabetic and hypolipidemic effects of *Momordica cymbalaria* hook. Fruit powder in alloxan-diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v.67, p. 103-109, 1999.

KONG, G.; ANYARAMBHATLA, G.; PETROS, W.P.; BRAUN, R.D.; COLVIN, O.M.; NEEDHAM, D.; DEWHIRST, M.W. Efficacy of liposomes and hyperthermia in a human tumor xenograft model: importance of triggered drug release. *Cancer Research*, v.60, p. 6950-6957, 2000.

LACERDA, S.N. Diabetes mellitus. São Paulo: *Pirâmide*, 1988.

LARSON, L. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, v.27, p. 959-978, 1988.

LE FLEM, G.; DUPRADEAU, F.; PUJOL, J.; MONTI, J.; BOGDANOWICZ, P. Synthesis, and functional properties of a modified human insulin A-chain: implication in a 'mini-insulin' structure determination. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v.10, p. 2111-2117, 2002.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. v.193, p. 265-275, 1951.

MACHADO, V.L.A.; LUDWIG, A.C.; MARQUES, M. Decreased basal and acute insulin-stimulated effect on the uptake of glucose and amino acid *in vitro* by thyroid glands from streptozotocin-diabetic rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 29, p. 1549-1555, 1996.

MARTINS, R.E.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. *Plantas Mediciniais*. Editora UFV: Viçosa, p. 155, 1998.

MIAN, N., ANDERSON, C.E.; KENT, P.W. Effect of sulphated glycopeptides on kinetics of 3-O-methylglucose and 2-deoxy-glucose transport by epithelial cells isolated from rabbit small intestine. *European Journal of Biochemistry*, v.97, p. 197-204, 1979.

MOORE, M.C.; CHERRINGTON, A.D.; WASSERMAN, D.H. Regulation of hepatic and peripheral glucose disposal. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, v.15, p. 343-364, 2003.

NESTLER, E.J.; GREENGARD, P. Protein phosphorylation and neuronal function. In: *Basic Neurochemistry*. New York : Raven Press, p.449-474, 1994.

NEWSHOLME, E.A. Basic aspects of metabolic regulation and their application to provision of energy in exercise. In: *Principles of Biochemistry. Medicine Sport and Science*, v.38, p. 51-88, 1993.

NISHITANI, S.; MATSUMURA, T.; FUJITANI, S.; SONAKA, I.; MIURA, Y.; YAGASAKI, K. Leucine promotes glucose uptake in skeletal muscles of rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.299, p. 693-696, 2002.

NORMAN, A.W.; LITWACK, G. *Hormones*. Second edition. Academic Press, p. 224, 1997.

NYSTROM, F.H.; QUON, M.J. Insulin signalling: metabolic pathways and mechanisms for specificity. *Cellular Signalling*, v.11, p. 563-574, 1999.

OBERLEY, L.W. Free radicals and diabetes. *Free Radical Biology and Medicine*, v.5, p. 113-124, 1988.

O'BRIEN, R.M.; GRANNER, D.K. Regulation of gene expression by insulin. *Physiological Reviews*, v.76, p. 1109-1161, 1996.

OHTA, T.; FURUKAWA, F.; YONEMORI, F.; WAKITANI, K. JTT-608 controls blood glucose by enhancement of glucose-stimulated insulin secretion in normal and diabetes mellitus rats. *European Journal of Pharmacology*, v.367, p. 91-99, 1999.

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

OJA, C.D.; SEMPLE, S.C.; CHONN, A.; CULLIS, P.R. Influence of dose on liposome clearance: critical role of blood proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1281, p. 31-37, 1996.

ONG, K.C.; KHOO, H. Insulinomimetic effects of myricetin on lipogenesis and glucose transport in rat adipocytes but not glucose transporter translocation. *Biochemical Pharmacology*, v.51, p. 423-429, 1996.

ONG, K.C.; KHOO, H. Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. *Life Sciences*, v.67, p. 1695-1505, 2000.

PACY, P.J.; NAIR, K.S.; FORD, C. Failure of insulin infusion to stimulate fractional protein synthesis in type 1 diabetic patients. Anabolic effect of insulin and decreased proteolysis. *Diabetes*, v.38, p. 618-624, 1989.

PARI, L.; UMA MAHESWARI, J. Hipoglycaemic effect of *Musa sapientum* L. in alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v.68, p. 321-325, 1999.

PEPATO, M.T.; KELLER, E.H.; BAVIERA, A.M.; KETTELHUT, I.C.; VENDRAMINI, R.C.; BRUNETTI, I.L. Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v.81, p. 191-197, 2002.

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.

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.

PONSSEN, H.H.; ELTE, J.W.F.; LEHERT, P.; SCHOUTEN, J.P.; BETS, D. Combined metformin and insulin therapy for patients with type 2 diabetes mellitus. *Clinical Therapeutics*, v.22, p. 709-718, 2000.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. In: Farmacologia. 4ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

RAPTIS, S.A.; DIMITRIADIS, G.D. Oral hypoglycemic agents: insulin secretagogues, alpha-glucosidase inhibitors and insulin sensitizers. *Clinical and Endocrinology Diabetes*, v. 109, p. 265-287, 2001.

RICHTER, E.A. Glucose metabolism in skeletal muscle. *Pathophysiology*, v. 5, p. 119, 1998.

RODEN, M.; BERNROIDER, E. Hepatic glucose metabolism in humans – its role in health and disease. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, v.15, p. 365-383, 2003.

ROSAK, C. The pathophysiologic basis of efficacy and clinical experience with the new oral antidiabetic agents. *Journal of Diabetes and Its Complications*, v.16, p. 123-132, 2002.

RUSSO, E.M.K.; REICHEL, A.A.J.; DE SÁ, J.R.; FURLANETTO, R.P.; MOISÉS, R.C.S.; KASAMATSU, T.S.; CHACRA, A.R. Clinical trial of *Myrcia uniflora* and *Bauhinia forficata* leaf extracts in normal and diabetic patients. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.23, p. 11-20, 1990.

SADZUKA, Y.; NAKADE, A.; TSURUDA, T.; SONOBE, T. Study on the characterization of mixed polyethyleneglycol modified liposomes containing doxorubicin. *Journal of Controlled Release*, v. 91, p. 271-280, 2003.

SAIJA, A.; SCALESE, M.; LANZA, M.; MARZULLO, D.; BONINA, F.; CASTELLI, F. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Radical Biology and Medicine*, v.19, p. 481-486, 1995.

SCHLOSSER, M.J.; KAPEGHIAN, J.C.; VERLANGIERI, A.J. Effects of streptozotocin in the male guinea pig: a potential animal model for studying diabetes. *Life Sciences*, v.35, p. 649-655, 1984.

SHIBATA, A.; MURATA, S.; UENO, S.; LIU, S.; FUTAKI, S.; BABA, Y. Synthetic copoly (Lys/Phe) and poly (Lys) translocate through lipid bilayer membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, article in press.

SHIMOKAWA, T.; KAGAMI, M.; KATO, M.; KUROSAKI, E.; SHIBASAKI, M.; KATOH, M. Effect of YM-126414 on glucose uptake and redistribution of glucose transporter isotype 4 in muscle cells. *European Journal of Pharmacology*, v.410, p. 1-5, 2000.

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.

SILVA, F.R.M.B.; RENCK, L.; WASSERMANN, G.F. Retinol stimulates amino acid transport in Sertoli cell by mechanism unrelated to protein synthesis. *Medical Science Research*, v.23, p. 155-156, 1995.

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.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3ª edição. Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. UFSC, 2001.

SONE, N.; YOSHIDA, M.; HIRATA, H.; KAGAWA, Y. Reconstitution of vesicles capable of energy transformation from phospholipids and adenosine triphosphatase of thermophilic bacterium. *Journal of Biochemistry*, v.81, p. 519-528, 1977.

SOTO, C.P.; PEREZ, B.L.; FAVARI, L.P.; REYES, J.L. Prevention of alloxan-induced diabetes mellitus in the rat by silymarin. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 119C, p. 125-129, 1998.

STRASINGER, S.K. Uroanálise e fluidos biológicos. 3ª edição. São Paulo : Editorial Premier, 2000.

TARDI, P.G.; BOMAN, N.L.; CULLIS, P.R. Liposomal doxorubicin. *Journal Drug Target*, v. 4, p. 129-140, 1996.

TURINSKY, J.; DAMRAU-ABNEY, A. Akt kinases and 2-deoxyglucose uptake in rat skeletal muscles *in vivo*: study with insulin and exercise. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v.276, p. 277-282, 1999.

UGAZ, O.L. Investigación Fitoquímica. Fondo Editorial *Lima: Pontificia Universidad Católica del Peru*, Lima: Peru, 1994.

VARLEY, H.; GOWENLOCK, A.H.; BELL, M. *Practical Biochemistry*, v.1, p. 389-391, 1976.

VERSPOHL, E.J. Recommended testing in diabetes research. *Planta Medica*, v.68, p. 581-590, 2002.

VESSAL, M.; HEMMATI, M.; VASER, M. Antidiabetic effects of quercetin in streptozotocin-induced diabetic rats. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v.135C, p. 357-364, 2003.

VRIJSEN, R.; EVERAERT, L.; VAN HOOFF, L.M.; VLIETINCK, A.J.; VANDEN BERGHE, D.A.; BOEYÉ, A. The poliovirus induced shut-off of cellular protein synthesis persists in the presence of 3-methylquercetin, a flavonoid which blocks viral protein and RNA synthesis. *Antiviral Research*, v. 7, p. 35-42, 1987.

WATSON, R.T.; PESSIN, J.E. Subcellular compartmentalization and trafficking of the insulin-responsive glucose transporter, GLUT 4. *Experimental Cell Research*, v.271, p. 271-275, 2001.

WEINSTEIN, R.B.; ELEID, N.; LECESNE, C.; DURANDO, B.; CRAWFORD, J.T.; HEFFNER, M.; LAYTON, C.; O'KEEFE, M.; ROBINSON, J.; RUDINSKY, S.; HENRIKSEN, E.K.; TISCHLER, M.E. Differential half-maximal effects of human insulin and its analogs for in situ glucose transport and protein synthesis in rat soleus muscle. *Metabolism*, v.51, p. 1065-1070, 2002.

WHO, World Health Organization. Diabetes Mellitus. Disponível em <<http://www.who.int/inf-fs/en/fact138html>>. Acessado em Dezembro de 2003.

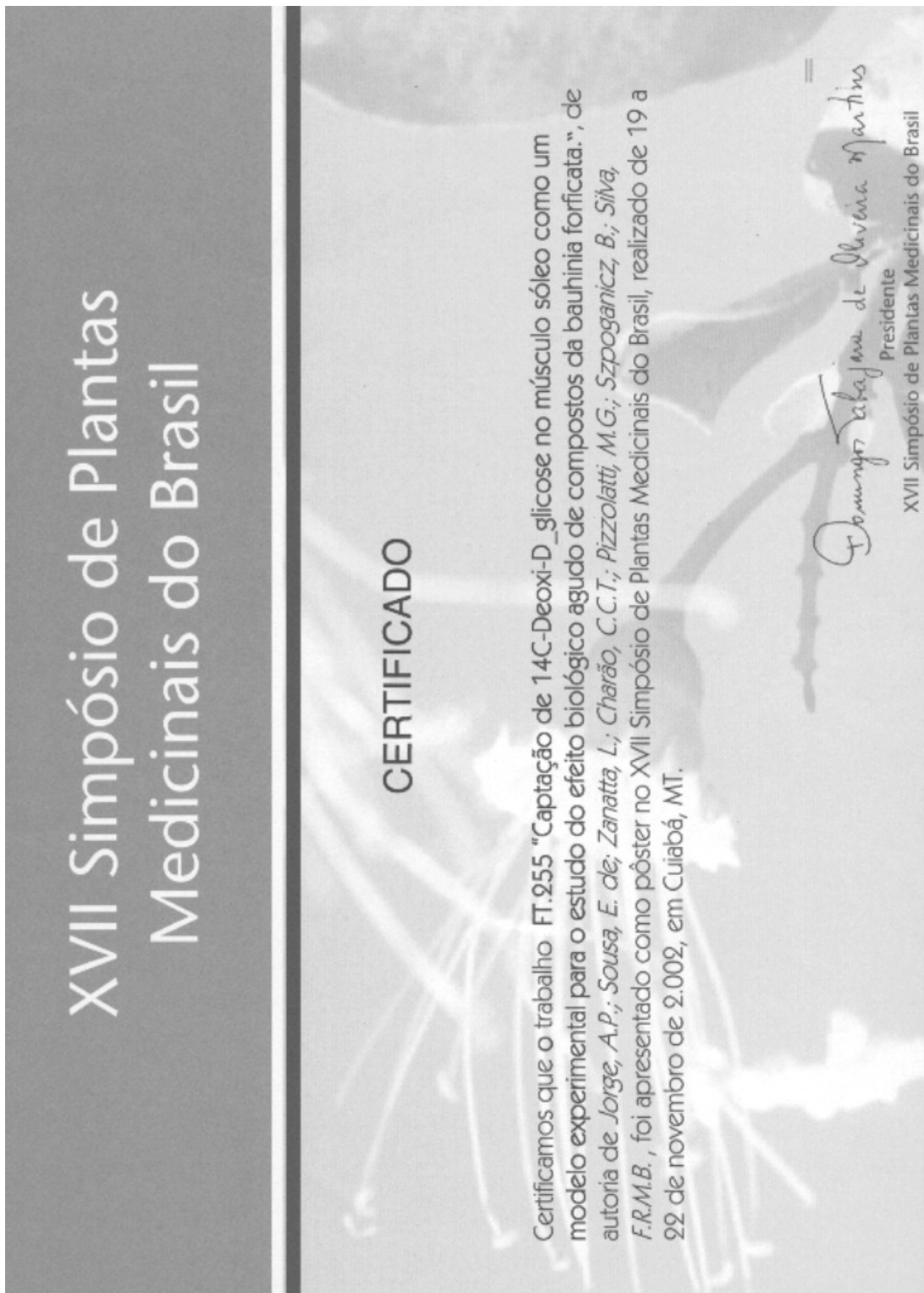
WONG, W.S.; MC LEAN, A.E.M. Effects of phenolic antioxidants and flavonoids on DNA synthesis in rat liver, spleen and testis in vitro. *Toxicology*, v.139, p. 243-253, 1999.

YADAV, S.; VATS, V.; DHUNNOO, Y.; GROVER, J.K. Hypoglycemic and antihyperglycemic activity of *Murraya koenigii* leaves in diabetes rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v.82, p. 111-116, 2002.


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

9 ANEXOS

9.1 Certificado de Apresentação de Trabalho em Congresso.



9.2 Aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética no Uso de Animais
Fone: (048) 331-9206 Fax: (048) 331-9599
e-mail: dap@reitoria.ufsc.br

Ofício nº 099/CEUA/DAP/PRPG
Florianópolis, 23 de outubro de 2002.

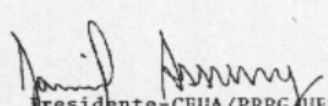
Senhora Professora,

Em relação ao Protocolo de pesquisa cadastrado sob os nºs 142 e 23080.003730/2002-95, intitulado "**Flavanóides complexados com vanádio (IV), uma nova terapêutica para diabetes**", em reunião do 18/10 /2002 a CEUA, deliberou o seguinte:

- APROVADO por 2 (dois) anos, a partir dessa data, para utilização de 267 Ratos Norvegicus/Rato, durante o período.

O pedido de revalidação do presente credenciamento, caso seja do interesse de V.Sa, deverá vir acompanhado de relatório detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido à resultados objetivos (por exemplo, anexando cópias dos resultados obtidos tais como trabalhos em revistas indexadas ou não, teses ou dissertações, resumos em congressos, capítulos de livros, processos e patentes, etc.) e/ou benefícios resultantes da pesquisa para seres humanos e/ou para animais, sejam estes benefícios de natureza acadêmica, aplicada, industrial, etc.

Atenciosamente,


Presidente-CEUA/PRPG/UFSC
Prof. Dr. Jamil Assrauy

Ao(à) Prof.(a): Dr(a) Fátima Regina Mena Barreto Silva
Departamento de Ciências Fisiológicas-CCB