



Instituto Politécnico de Santarém

Escola Superior Agrária de Santarém

**ESTUDO DE EXTRACTOS DE
Genista tenera
ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE E INIBIÇÃO DE ENZIMAS DO
METABOLISMO DA GLUCOSE**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre na área de Sistemas de Prevenção e Controlo Alimentar

Isabel Maria Montez Torgal Santos

Orientador:

Doutora Margarida Goulart de Medeiros, Equiparada a Professora Adjunta da Escola Superior Agrária de Santarém

Co-Orientadores:

Doutor Jorge Alberto Guerra Justino, Professor Coordenador com Agregação da Escola Superior Agrária de Santarém

Doutora Amélia Pilar Rauter, Professora Associada com Agregação da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Setembro
2011

AGRADECIMENTOS

O nosso agradecimento dirige-se, em primeiro lugar, à Doutora Margarida Goulart de Medeiros que aceitando a orientação científica do trabalho nos auxiliou com preciosas sugestões ao longo do trabalho e também pelas importantes considerações na revisão do manuscrito, manifestando sempre paciência e amizade.

Ao Doutor Jorge Alberto Guerra Justino, que aceitando a co-orientação científica do trabalho disponibilizou os meios necessários à sua execução manifestando sempre elevada disponibilidade.

À Doutora Amélia Pilar Rauter co-orientadora do trabalho, pela rapidez com que nos forneceu o material para análise e pelos ensinamentos prestados, sempre com simpatia.

À Mestre Ana Pinto responsável pelo laboratório de biociências, por toda a hospitalidade com que nos receberam e pela grande abertura na utilização de todo o equipamento.

À Mestre Maria José Diogo responsável do laboratório de química, por ter facilitado a utilização de equipamentos e do laboratório, sempre com simpatia.

À D^{ra}. Antonieta Santana por estar sempre disponível para nos apoiar com as estruturas químicas dos compostos, não esquecendo o seu estímulo constante.

À Mestre Cristina Laranjeira pela amizade e alegria com que nos apoiou no esclarecimento de algumas dúvidas surgidas na determinação das espécies reactivas ao ácido tiobarbitúrico.

Ao Doutor João André Gago e Mestre Gabriela Basto de Lima pela inexcelável disponibilidade demonstrada ao longo do tratamento estatístico de

dados com o programa Estatística 6.0 e também pela amizade e simpatia evidenciadas.

À Mestre Virgínia Crespo pelos preciosos esclarecimentos na bibliografia e por todo o estímulo e amizade evidenciados ao longo do trabalho.

Às técnicas do laboratório de biociências Luzia Diogo e Sofia Albergaria, entre outros pelo auxílio prestado com o tratamento de material de laboratório e pelo excelente ambiente de trabalho proporcionado.

Às técnicas do laboratório de química Anabela Matos e Ana Reis, entre outros pelo auxílio prestado com diversos equipamentos e pelo excelente ambiente de trabalho proporcionado.

FINANCIAMENTO

A realização deste trabalho foi possível mediante o financiamento das seguintes entidades:

Escola Superior Agrária de Santarém.

Projecto da Fundação Portuguesa para a Ciência e Tecnologia (FCT) (PTDC/QUI/67165/2006).

RESUMO

Objectivo: Estudar a actividade antidiabética e antioxidante de extractos de *Genista tenera*.

Materiais e métodos: Investigou-se a actividade antioxidante pelo método das espécies reactivas ao ácido tiobarbitúrico e o método do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolio). Procurou-se clarificar o mecanismo de acção antidiabética pelo estudo da actividade inibitória nas enzimas α -glucosidase, glucose-6-fosfatase e glicogénio fosforilase.

Resultados: No ensaio de MTT os extractos em éter, butanol e acetato de etilo possuem boa actividade antioxidante (87,80 %, 67,82 % e 67,70 % de viabilidade celular respectivamente). Na α -glucosidase os extractos em butanol e acetato de etilo apresentaram inibição (0,97% e 2,36% de actividade enzimática). Os extractos em acetato de etilo, butanol e éter são inibidores da glucose-6-fosfatase (48,33%, 80,25% e 64,42% de actividade enzimática).

Conclusões: Os extractos de *Genista tenera* em acetato de etilo, butanol e éter poderão ser no futuro incluídos em nutracêuticos para prevenir ou tratar a diabetes tipo 2.

Palavras-chave: *Genista tenera*, flavonóides, diabetes, antioxidante, α -glucosidase, glucose-6-fosfatase, glicogénio fosforilase, nutracêutico, alimento funcional.

ABSTRACT

Objectives: To study the antidiabetic and antioxidant activity of *Genista tenera* extracts.

Materials and methods: The antioxidant activity was investigated using the thiobarbituric acid assay and the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazol bromide) method. The mechanism of antidiabetic activity was evaluated in terms of inhibitory action on the enzymes α -glucosidase, glucose-6-phosphatase and glycogen phosphorylase.

Results: The MTT assay showed a good antioxidant activity for the ether, butanol and ethyl acetate extracts. (87,80 %, 67,82 % e 67,70 % of cellular viability respectively). For α -glucosidase the butanol and ethyl acetate extracts showed strong inhibitory activity (0,97% e 2,36% of enzymatic activity). The ethyl acetate, butanol and ether extracts are moderate inhibitors of glucose-6-phosphatase (48,33%, 80,25% e 64,42% of enzymatic activity).

Conclusions: *Genista tenera* extracts in ethyl acetate, butanol and ether can be included in nutraceutical products to prevent and treat type 2 diabetes in the future.

Key-words: *Genista tenera*, flavonoids, diabetes, antioxidant, α -glucosidase, glucose-6-phosphatase, glycogen phosphorylase, nutraceutic, functional food.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJECTIVOS	5
3	ÁREAS DE ESTUDO	7
3.1	STRESSE OXIDATIVO	7
3.1.1	ESPÉCIES REACTIVAS DE OXIGÉNIO E AZOTO	8
3.1.1.1	<i>Papel dos metais de transição</i>	11
3.1.2	LIPOPEROXIDAÇÃO	11
3.2	DEFESAS ANTIOXIDANTES	13
3.2.1	ANTIOXIDANTES ENDÓGENOS E EXÓGENOS	13
3.3	DIABETES	15
3.3.1	REGULAÇÃO DO METABOLISMO DA GLUCOSE	16
3.3.1.1	<i>Transportadores de glucose e captação de glucose</i>	16
3.3.1.2	<i>Síntese do glicogénio</i>	17
3.3.1.3	<i>Metabolismo da glucose</i>	19
3.3.2	PATOGÉNESE DA DIABETES TIPO 2	22
3.3.3	DIABETES E STRESSE OXIDATIVO	23
3.3.3.1	<i>Vias patológicas para a toxicidade da glucose</i>	24
3.3.3.2	<i>Stresse oxidativo: o elo de ligação para os danos causados pela hiperglicémia</i>	28
3.4	ENZIMAS DO METABOLISMO DA GLUCOSE	31
3.4.1	α -GLUCOSIDASE	31
3.4.1.1	<i>Função</i>	31
3.4.1.2	<i>Caracterização molecular da α-glucosidase</i>	32
3.4.1.3	<i>Importância da α-glucosidase como alvo biológico</i>	32

3.4.1.4	<i>Os inibidores da α-glucosidase</i>	33
3.4.2	GLUCOSE-6-FOSFATASE	34
3.4.2.1	<i>Função</i>	34
3.4.2.2	<i>Caracterização molecular da glucose-6-fosfatase</i>	34
3.4.2.3	<i>Importância da glucose-6-fosfatase como alvo biológico</i>	36
3.4.2.4	<i>Os inibidores da glucose-6-fosfatase</i>	36
3.4.3	GLICOGÉNIO FOSFORILASE	38
3.4.3.1	<i>Função</i>	38
3.4.3.2	<i>Importância da glicogénio fosforilase como alvo biológico</i>	38
3.4.3.3	<i>Caracterização molecular</i>	39
3.4.3.4	<i>Os inibidores da glicogénio fosforilase</i>	41
3.5	TRATAMENTO DA DIABETES	42
3.5.1	TERAPÊUTICA CONVENCIONAL	42
3.5.2	PLANTAS MEDICINAIS NO TRATAMENTO DA DIABETES	43
3.5.2.1	<i>Flavonóides</i>	44
3.5.2.2	<i>Absorção e metabolismo dos flavonóides</i>	45
3.5.3	<i>Genista tenera</i>	49
3.6	NUTRACÊUTICOS E ALIMENTOS FUNCIONAIS	50
4	METODOLOGIAS E RESULTADOS	53
4.1	MATERIAL VEGETAL	53
4.1.1	EXTRACÇÃO.....	53
4.2	ACTIVIDADE ANTI-OXIDANTE	53
4.2.1	ENSAIO DO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)	53
4.2.1.1	<i>Reagentes</i>	54
4.2.1.2	<i>Preparação das amostras</i>	55
4.2.1.3	<i>Procedimento experimental</i>	55
4.2.1.4	<i>Resultados e discussão</i>	56

4.2.2	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR (MTT)	58
4.2.2.1	<i>Reagentes</i>	59
4.2.2.2	<i>Cultura de células</i>	59
4.2.2.3	<i>Preparação das amostras</i>	60
4.2.2.4	<i>Procedimento experimental</i>	61
4.2.2.5	<i>Análise estatística</i>	62
4.2.2.6	<i>Resultados e discussão</i>	63
4.3	TESTES ENZIMÁTICOS	67
4.3.1	ENSAIO DA ACTIVIDADE INIBITÓRIA DA ENZIMA α - GLUCOSIDASE	67
4.3.1.1	<i>Reagentes</i>	67
4.3.1.2	<i>Preparação das amostras</i>	68
4.3.1.3	<i>Procedimento experimental</i>	68
4.3.1.4	<i>Análise estatística</i>	70
4.3.1.5	<i>Resultados e discussão</i>	71
4.3.2	ENSAIO DA ACTIVIDADE INIBITÓRIA DA ENZIMA GLUCOSE-6- FOSFATASE.....	74
4.3.2.1	<i>Reagentes</i>	74
4.3.2.2	<i>Preparação das amostras</i>	74
4.3.2.3	<i>Procedimento experimental</i>	75
4.3.2.4	<i>Análise estatística</i>	77
4.3.2.5	<i>Resultados e discussão</i>	77
4.3.3	ENSAIO DA ACTIVIDADE INIBITÓRIA DA ENZIMA GLICOGÉNIO FOSFORILASE	82
4.3.3.1	<i>Reagentes</i>	82
4.3.3.2	<i>Preparação das amostras</i>	82
4.3.3.3	<i>Procedimento experimental</i>	83

4.3.3.4	<i>Resultados e discussão</i>	84
5	CONCLUSÕES	87
6	BIBLIOGRAFIA	91
6.1	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
6.2	MEDIAGRAFIA.....	124

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1 - Esquema simplificado da produção de espécies reactivas do oxigénio nas células e a acção de alguns antioxidantes intracelulares, principalmente no citosol e na mitocôndria (devido à saída de electrões da cadeia respiratória). Rapidamente duas moléculas de superóxido dismutam, espontaneamente ou via a superóxido dismutase, em dióxigénio e peróxido de hidrogénio, permitindo a segunda o fluxo de ROS entre diferentes compartimentos celulares. O peróxido de hidrogénio pode ser enzimaticamente metabolizado a dióxigénio e água através de vários sistemas enzimáticos ou convertido no radical hidroxilo, que é extremamente reactivo, através de uma reacção química catalisada pelos metais de transição. RE, rectículo endoplasmático; CTE, cadeia de transporte de electrões; Ox, oxidases; GSH, glutatião reduzido; GSSG, glutatião oxidado; GR, glutatião redutase; GPox, glutatião peroxidase; SOD, superóxido dismutase; Prx, peroxiredoxinas. As espécies reactivas de oxigénio e os anti-oxidantes endógenos encontram-se a negrito. (Adaptado de Nordberg & Arner, 2001; Willcox *et al.*, 2004). 10
- Figura 2 - Esquema das reacções em cadeia da lipoperoxidação. (LH), ácido gordo polinsaturado; (L[•]), radical lipídico; (LOO[•]), radical peroxilo; (LOOH), hidroperóxido lipídico; (LO[•]), radical alcoxilo; (OH[•]), radical hidroxilo; (R[•]), espécies reactivas de oxigénio com iões desemparelhados (adaptado de De Zwart *et al.*, 1999). 12
- Figura 3 - Defesa celular antioxidante contra as espécies reactivas. SOD - super-óxido dismutase, GPox - glutatião peroxidase, GSH – glutatião reduzido, HSP – proteínas de choque térmico (Adaptado de Willcox *et al.*, 2004). 14
- Figura 4 - Secreção bifásica de insulina estimulada por glucose em indivíduos saudáveis e diabéticos (Albuquerque & Pimazoni Netto, 2008). 16
- Figura 5 - Síntese de glicogénio. UTP-uridina trifosfato, UDP-uridina difosfato, PPI-fosfato inorgânico (Adaptado de Srivastava & Pandey, 1998). 18
- Figura 6 - Visão global do metabolismo hepático da glucose, com destaque para os alvos da inibição da produção hepática de glucose. Frutose-6P - frutose-6-fosfato; Frutose-1,6P - frutose-1,6-difosfato; ciclo TCA - ciclo do ácido tricarbóxico (adaptado de McCormack *et al.*, 2001). 20
- Figura 7 - Regulação do metabolismo da glucose (adaptado de <http://health.howstuffworks.com/diabetes1.htm>. Acesso em 26-01-2010). 21

Figura 8 – Esquema do processo de glicosilação. 26

Figura 9 - Mecanismos moleculares que relacionam a hiperglicémia com o aumento da via de formação de poliois, via das hexosaminas, formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) estimulação da proteína quinase C (PKC). (Adaptado de Rolo & Palmeira, 2006) 27

Figura 10 - Produção de ROS pela cadeia de transporte de electrões da mitocôndria e dissipação do gradiente de protões pelas proteínas não ligadas. A captação pelas defesas antioxidantes é insuficiente para prevenir o stresse oxidativo na hiperglicémia. CI, complexo I; CII, complexo II; CIII, complexo III; CIV, complexo IV; CV, complexo V; ADP, adenosina difosfato; ATP, adenosina trifosfato; ATC, ciclo ácido tricarboxílico; PNL, proteínas não ligadas; GSH, glutatião reduzido; GSSG, glutatião oxidado (Adaptado de Rolo & Palmeira, 2006). 29

Figura 11 - Mecanismo de secreção de insulina pelo pâncreas. ATP, adenosina trifosfato; GLUT-2, transportador de glucose; pyr, piruvato (Adaptado de <http://www.lookfordiagnosis.com>. Acesso em 04-12-2009). 30

Figura 12 - Região do substrato onde ocorrerá a clivagem decorrente da acção da enzima α -glucosidase (seta preta) (Adaptado de http://www.sigmaaldrich.com/Área_of_interest/Biochemicals/Enzyme_Explorer/Key_Resources/Carbohydrate_Analysis.htm. Acesso em 19-12-2009). 32

Figura 13 - Estrutura química do pseudotetrasacarídeo acarbose, um inibidor endógeno não proteico da α -glucosidase. 33

Figura 14 - Representação esquemática do complexo enzimático glucose-6-fosfatase de acordo com o “modelo de transporte de substrato”. T1 – translocase, T2 e T3 – transportadores respectivamente de fosfato inorgânico e glucose. Também estão referidas as diferentes formas de doenças de armazenamento do glicogénio (GSD) causadas por deficiência num destes constituintes. Pi - fósforo inorgânico, G-6-P – glucose-6-fosfato; G-6-Pase – glucose-6-fosfatase (adaptado de Van Schaftingen & Gerin, 2002). 35

Figura 15 - Representação esquemática do dímero glicogénio fosforilase b (GPb) com indicação dos cinco sítios de ligação: catalítico (activo), inibidor, alostérico, armazenamento do glicogénio e novo sítio alostérico (adaptado de McCormack *et al.*, 2001). 39

Figura 16 - Diagrama esquemático mostrando a regulação da actividade da glicogénio fosforilase (GP). A estimulação com glucagom aumenta o nível de cAMP (AMP cíclico), o que conduz através de uma série de eventos de

fosforilação à activação da fosforilase quinase. Esta enzima converte a forma não fosforilada (GPb) na forma fosforilada (GPa). Os dois estados conformacionais T e R estão representados respectivamente, na forma de quadrado e círculo. Pi indica o fósforo inorgânico, G-1-P a glucose-1-fosfato e G-6-P a glucose-6-fosfato. AMP - adenosina monofosfato, ATP - adenosina trifosfato e PP1 indica a proteína fosfatase 1 que está ligada à desfosforilação da GP (adaptado de McCormack <i>et al.</i> , 2001).	41
Figura 17 - Fórmula estrutural básica dos flavonóides.....	44
Figura 18 - <i>Genista tenera</i> (Jacq. Ex Murr) O. Kuntze	50
Figura 19 – Tubos com as fases orgânica (n-butanol) e aquosa do ensaio de quantificação do complexo TBA-MDA. Evidencia-se o rápido desenvolvimento da cor amarela/laranja.....	57
Figura 20 – Células para leitura em espectrofotómetro com o extracto butanólico. Observa-se uma cor que não é característica do aducto TBA-MDA.	57
Figura 21 – Células H-4-II-E (hepatócitos de rato). Ampliação 200 X.....	60
Figura 22 – Sala do laboratório de biociências onde decorreu o trabalho analítico. Visualiza-se a câmara de fluxo laminar com segurança biológica, classe II tipo A/B3, (Steril Gard-Baker Company) e a câmara de incubação (Shel Lab CO ₂ Series).....	60
Figura 23 – Viabilidade comparativa entre células não irradiadas e irradiadas. A absorvência foi determinada medindo o formazam após 4h de incubação das células com MTT (concentração final 0,870 µg/mL). Cada valor é expresso como média + desvio padrão, num total de 5 ensaios realizados.....	63
Figura 24 – Influência dos diferentes extractos de <i>Genista tenera</i> no crescimento das células não irradiadas. A viabilidade foi determinada <i>in vitro</i> em células H-4-II-E e o ácido ascórbico (400 mg/L) foi usado como controlo positivo. Cada valor é expresso como média + desvio padrão. As médias são resultado de pelo menos 5 ensaios separados. Nas colunas da viabilidade em % onde se coloca * assinala-se diferença estatisticamente significativa entre o valor indicado e o valor obtido para as células não irradiadas sem adição de compostos (teste t de Student, p<0,05). Ext – Extracto.....	64
Figura 25 – Viabilidade celular em % proporcionada pelos extractos de <i>Genista tenera</i> em água, butanol, acetato de etilo e éter (400 mg/L) após indução do stresse oxidativo por radiação UV ($\lambda = 257,7$ nm). A viabilidade foi determinada <i>in vitro</i> em células H-4-II-E e o ácido ascórbico (400 mg/L) foi usado como controlo	

positivo. Cada valor é expresso como média + desvio padrão. As médias são resultado de pelo menos 5 ensaios separados. Nas colunas onde se coloca * assinala-se diferença estatisticamente significativa entre o valor indicado e o valor obtido para as células irradiadas sem adição de compostos (teste t de Student, $p < 0,05$). Ext – Extracto. 66

Figura 26 – Actividade da α -glucosidase do intestino delgado de rato em presença dos extractos de *Genista tenera* em água, butanol, acetato de etilo e éter. Actividade enzimática expressa em percentagem da actividade da enzima sem inibidor. Concentração dos extractos 400 mg/L. A actividade foi determinada usando maltose como substrato e a acarbose como controlo positivo. Cada valor é expresso como média + desvio padrão, de um total de 5 ensaios realizados. Diferentes índices (a-d) nas colunas da actividade em % indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) quando comparadas pelo teste *a posteriori* de Tukey. 71

Figura 27 – Actividade da glucose-6-fosfatase de microsomas de fígado de coelho em presença dos extractos de *Genista tenera* em água, butanol, acetato de etilo e éter. Actividade enzimática expressa em percentagem da actividade da enzima sem inibidor. Concentração dos extractos 400 mg/L. A actividade foi determinada usando glucose-6-fosfato como substrato e a florizina como controlo positivo. Cada valor é expresso como média + desvio padrão, de um total de 12 ensaios realizados. Diferentes índices (a-b) nas colunas da actividade em percentagem indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) quando comparadas pelo teste *a posteriori* de Tukey. 78

Figura 28 – Estrutura química da cafeína. 85

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Esquema de pipetagem dos diferentes compostos intervenientes no ensaio de TBARS-MDA.....	56
Tabela 2 – Esquema do ensaio de viabilidade celular (MTT) em placas de 96 poços Fez-se o dobro das placas, sendo metade das placas irradiadas e a outra metade não irradiada.	62
Tabela 3 – Viabilidade comparativa entre células não irradiadas e irradiadas.....	63
Tabela 4 - Influência dos diferentes extractos de <i>Genista tenera</i> no crescimento das células não irradiadas.....	64
Tabela 5 – Viabilidade em percentagem das células irradiadas expostas a diferentes extractos de <i>Genista tenera</i>	65
Tabela 6 – Breve esquema elucidativo da preparação das soluções usadas no ensaio de inibição de actividade da enzima α -glucosidase.....	69
Tabela 7 – Esquema de pipetagem dos diferentes compostos intervenientes no ensaio de inibição de actividade da enzima α -glucosidase.....	70
Tabela 8 – Actividade da enzima α -glucosidase em presença dos extractos de <i>Genista tenera</i>	71
Tabela 9 - Breve esquema elucidativo da preparação das soluções usadas no ensaio de inibição de actividade da enzima glucose-6-fosfatase.....	76
Tabela 10 – Esquema de pipetagem dos diferentes compostos intervenientes no ensaio de inibição de actividade da enzima glucose-6-fosfatase.....	76
Tabela 11 - Actividade da enzima glucose-6-fosfatase em presença dos extractos de <i>Genista tenera</i>	77
Tabela 12 - Breve esquema elucidativo da preparação das soluções usadas no ensaio de inibição da enzima glicogénio fosforilase.....	83

Tabela 13 – Esquema de pipetagem dos diferentes compostos intervenientes no ensaio de inibição de actividade da enzima glicogénio fosforilase..... 84

Tabela 14 - Absorvência média da enzima glicogénio fosforilase em presença dos extractos de *Genista tenera*..... 85

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato
AGE	Produtos avançados da glicosilação
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
cAMP	Adenosina monofosfato ciclica
CE-MS	<i>Capillary electrophoresis-mass spectrometry</i>
CO₂	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminatetraacético
EGTA	Ácido etilenoglicoltetraacético
FAB-MS/MS	<i>Fast-Atom-Bombardment tandem Mass-Spectrometry</i>
G-1-P	Glucose-1-fosfato
G-6-P	Glucose-6-fosfato
G-6-Pase	Glucose-6-fosfatase
GLUT	Transportador de glucose
GP	Glicogénio fosforilase
GS	Glicogénio sintetase
H₂O₂	Peróxido de hidrogénio
KCl	Cloreto de potássio
LC-DAD-ESI-MS	<i>Liquid chromatography-diode array detection-electrospray ionization-mass spectrometry</i>
MDA	Malondialdeído
MTT	(3-4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio
NAD⁺	Forma oxidada do dinucleótido adenina nicotinamida
NADH	Forma reduzida do dinucleótido adenina nicotinamida
NADPH	Forma reduzida do dinucleótido adenina nicotinamida fosfato
NMR	Ressonância Nuclear Magnética
NO[·]	Radical óxido nítrico
O₂^{·-}	Radical ião superóxido

OH[·]	Radical hidroxilo
PBS	Tampão fosfato salino
PKC	Proteína quinase C
PPi	Fosfato inorgânico
RE	Rectículo endoplasmático
RNS	Espécies reactivas do azoto
ROO[·]	Radical peroxilo
ROS	Espécies reactivas do oxigénio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
TBA-MDA	Ácido tiobarbitúrico-malondialdeído
TBARS	Espécies reactivas ao ácido tiobarbitúrico
UDP-G	Uridina-difosfato glucose
UTP	Uridina trifosfato
UV	Ultra-violeta
WHO	<i>World Health Organization</i>

1 INTRODUÇÃO

A diabetes é uma doença metabólica crónica que se caracteriza por elevados níveis de glicémia, lesão dos tecidos pela glucose e sua eliminação pela urina. No ano 2030 o número de diabéticos no mundo será 366 milhões e em Portugal cerca de 800 mil (WHO, 2010a). Apesar de ser considerada uma doença de países industrializados devido às alterações nos hábitos alimentares e ritmo de vida, 80% das mortes por diabetes ocorrerão em países em vias de desenvolvimento. A doença e as suas complicações terão um impacto económico significativo, nas famílias e nos sistemas de saúde dos respectivos países (WHO, 2010b).

Os alimentos e os nutrientes desempenham um papel vital no normal funcionamento do organismo: ajudam na manutenção da saúde e na redução dos riscos de várias doenças. Recentemente desenvolveram-se os conceitos de alimento funciona e nutracêutico. O primeiro caracteriza-se por oferecer vários benefícios à saúde, além do valor nutritivo inerente à sua composição química, podendo desempenhar um papel potencialmente benéfico na redução do risco de doenças crónicas e degenerativas (Moraes & Colla, 2006). Por sua vez, o nutracêutico é um alimento ou parte de um alimento que proporciona benefícios médicos e de saúde, incluindo a prevenção e/ou tratamento da doença (Moraes & Colla, 2006). Tais produtos podem abranger desde os nutrientes isolados, suplementos dietéticos na forma de cápsulas e dietas até aos produtos benéficamente projectados, produtos herbais e alimentos processados tais como cereais, sopas e bebidas (Kwak & Jukes, 2001; Roberfroid, 2002; Hungenholtz, 2002; Andlauer & Fürst, 2002).

Pensa-se que estes nutracêuticos são benéficos e úteis no tratamento de várias doenças (Ferrari, 2004; Ramaa *et al.*, 2006). Baseado em estudos epidemiológicos, estudos com animais, ensaios clínicos e estudos bioquímicos nutricionais, estes suplementos dietéticos são correntemente reconhecidos como benéficos para as doenças coronárias, cancro, osteoporose, e outras doenças crónicas e degenerativas como a diabetes, doenças de Parkinson e Alzheimer (Mandel *et al.*, 2005). Isto conduziu a um ímpeto na investigação dos mecanismos de acção de nutracêuticos e dos seus compostos bioactivos.

Os produtos naturais representam uma das principais fontes de estruturas químicas únicas para avaliação e pesquisa de novos fármacos, com potencial utilidade na indústria farmacêutica. Existem cerca de 1200 espécies de plantas, pertencentes a 190 famílias, que são citadas para uso na diabetes. (Marles & Farnsworth, 1995; Grover *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2002; Zareba *et al.*, 2005; Mukherjee *et al.*, 2006; Leduc *et al.*, 2006). *Genista tenera* (Jacq. Ex Murr) pertence à família das *Leguminosae*, e é um arbusto endémico da ilha da Madeira, em Portugal, com uso tradicional na diabetes. Recentemente foi confirmada a sua bioactividade com estudos em ratos (Rauter *et al.*, 2009). Em estudos prévios foram identificados vários flavonóides, possivelmente responsáveis pelo, efeito biológico na glicémia (Borges *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2002; Rauter *et al.*, 2005; Edwards *et al.*, 2006).

Os flavonóides e derivados são amplamente explorados em função das inúmeras aplicações terapêuticas que apresentam como a acção antioxidante e anti-hiperglicemiante (Cazarolli *et al.*, 2008a).

1) Há uma evidência cada vez maior, baseada em estudos clínicos e laboratoriais, de que o stresse oxidativo desempenha um papel importante na patogénese dos dois tipos de *diabetes mellitus* (Rösen *et al.*, 2001; Willcox *et al.*, 2004). Um aumento dos ácidos gordos livres e/ou glucose pode aumentar a produção de espécies reactivas do oxigénio e o stresse oxidativo.

2) O stresse oxidativo tem como consequência, uma diminuição da secreção de insulina e da sua acção nos tecidos alvo, acelerando a progressão da doença: resistência à insulina, tolerância à glucose diminuída e por fim diabetes tipo 2 declarada (Ceriello, 2000).

A actividade antioxidante dos flavonóides ou o mecanismo envolvido na sua acção está amplamente revista (Pietta, 2000; Amic, 2006). Os flavonóides estimulam a captação e metabolismo da glucose, regulam a actividade e/ou a expressão de enzimas chave do metabolismo de hidratos de carbono, actuam como secretagogos de insulina ou protectores da função das células β pancreáticas. Ainda, podem actuar como insulinomiméticos contribuindo para melhorar o estado diabético (Cazarolli *et al.*, 2008b). Diversos trabalhos demonstram o efeito antidiabético dos flavonóides. (Shin *et al.*, 1999; Sabu *et al.*, 2002; Vessal *et al.*, 2003; De Sousa *et al.*, 2004; Pinent *et al.*, 2004; Tsuneki *et al.*, 2004; Gonzalez-Mujica *et al.*, 2005; Lee, 2006; Park *et al.*, 2006)

Nos diabéticos o processo de digestão e absorção rápida dos hidratos de carbono não é considerado desejável devido à resposta glicémica elevada (Englyst & Englyst, 2005). Uma das abordagens terapêuticas para tratar a diabetes na fase inicial é diminuir a hiperglicémia pós-prandial. Isto faz-se retardando a absorção de glucose através da inibição da enzima que hidrolisa os hidratos de carbono no tubo digestivo, a α -glucosidase. Consequentemente os inibidores desta enzima determinam a redução da taxa de glucose absorvida e o consequente efeito de hiperglicémia pós-prandial (Chiasson *et al.*, 2002).

Uma vez que as enzimas hepáticas que intervêm no metabolismo da glucose servem como importantes reguladores da síntese e degradação do glicogénio, considera-se que a inibição destas enzimas é uma via para inibir a produção hepática de glucose e baixar a glicemia (Barf, 2004; Jung *et al.*, 2006; Agius, 2007). A glicogénio fosforilase hepática (GP) e a glucose-6-fosfatase (G-6-Pase) são duas enzimas chave na glicogenólise. A GP catalisa o primeiro passo da quebra do glicogénio que conduz a glucose-1-fosfato, enquanto G-6-Pase catalisa a reacção final na produção hepática de glucose (Onda *et al.*, 2008). Estas enzimas têm sido propostas como potenciais alvos de drogas anti-hiperglicémicas (Mc Cormack *et al.*, 2001; Kurukulasuriya *et al.*, 2003).

Em anos recentes têm surgido diversos trabalhos e patentes a fundamentar os benefícios dos extractos de plantas e/ou de produtos nutracêuticos contendo flavonóides (Kim *et al.*, 2006; Omoigui, 2006; Nishizono *et al.*, 2007; Raederstorff *et al.*, 2007).

2 OBJECTIVOS

O objectivo principal deste trabalho é estudar o mecanismo enzimático responsável pela actividade anti-hiperglicemiante de extractos de *Genista tenera* em água, acetato de etilo, n-butanol e éter através de ensaios de inibição das enzimas do metabolismo da glucose, α -glucosidase, glucose-6-fosfatase e glicogénio fosforilase. Paralelamente pretende-se avaliar a capacidade antioxidante dos mesmos extractos pela determinação de produtos de lipoperoxidação (através do ensaio do ácido tiobarbitúrico) em homogeneizados de gema de ovo expostos a condições oxidantes na presença dos extractos. A actividade antioxidante será adicionalmente avaliada *in vitro* em culturas celulares, pela inibição da citotoxicidade induzida por radiação UV na presença ou ausência dos extractos. A viabilidade celular neste ensaio será determinada pelo método do MTT.

3 ÁREAS DE ESTUDO

3.1 STRESSE OXIDATIVO

Em condições fisiológicas normais, a produção de radicais livres e outras espécies reativas de oxigénio (ROS) encontra-se aproximadamente em equilíbrio com os mecanismos de defesa antioxidante. Normalmente, as moléculas danificadas são reparadas e substituídas. Porém em certas circunstâncias, não há equilíbrio entre as espécies reativas e as defesas antioxidantes, ocorrendo uma situação designada por stresse oxidativo, havendo acumulação de moléculas oxidadas e vasta deterioração celular segundo Halliwell (1996), mesmo sem haver aumento da percentagem de oxigénio (Wilcox *et al.*, 2004). Este desequilíbrio em favor do estado pró-oxidante pode ser consequência de uma diminuição de antioxidantes, porque há uma deficiente alimentação ou devido a mutações nos genes que codificam as principais moléculas antioxidantes, superóxido dismutase, catalase, glutatíão peroxidase e a NADPH desidrogenase e/ou devido a um aumento de produção de espécies reativas (Halliwell, 1996). Este aumento pode ser devido a causas exógenas - exposição a radiações ionizantes (por exemplo radiação gama) e não ionizantes (por exemplo radiação ultra-violeta), hiperoxia, drogas, poluentes atmosféricos e xenobióticos (toxinas, pesticidas, herbicidas). Também pode ter origem endógena, nomeadamente devido a um aumento de produção de ROS, pelas células do organismo, especialmente células imunitárias, devido a situações patológicas como a diabetes, doenças neurodegenerativas e cardíacas, inflamações crónicas e isquémia (Halliwell, 1996; Halliwell, 2001; Kohen & Nyska, 2002; Wilcox *et al.*, 2004).

Quando o stresse oxidativo atinge níveis elevados pode ocorrer deterioração grave das moléculas celulares (proteínas, lípidos e DNA) podendo conduzir à morte celular em larga escala. Contudo as células toleram um nível moderado de stresse oxidativo, aumentando o mecanismo de defesa antioxidante através de alterações na expressão de genes (Halliwell, 1996).

Apesar do seu potencial para causar danos, segundo Forman (2001) as ROS também são úteis nos mecanismos de combate aos microrganismos e segundo Wilcox *et al.* (2004) e De Magalhães & Church (2006) são componentes

críticos em vários processos celulares como moléculas sinalizadoras. As ROS desempenham um papel específico em *sites* activos de enzimas e as reacções redox podem afectar a actividade de factores de transcrição. Actualmente torna-se claro que as ROS podem ter um grande impacto na regulação da expressão dos genes, no desenvolvimento, crescimento e apoptose.

3.1.1 ESPÉCIES REACTIVAS DE OXIGÉNIO E AZOTO

As espécies reactivas são produzidas na célula tanto em consequência do metabolismo celular normal (na mitocôndria, peroxissomas e devido à acção de certas enzimas do citosol), como devido a agentes extracelulares. Têm uma acção pró-oxidante se o seu nível for superior ao do ponto de equilíbrio homeostático.

As principais são as espécies reactivas de oxigénio (ROS) e as espécies reactivas de azoto (RNS) (Kohen & Nyska, 2002).

AS ROS englobam moléculas quimicamente reactivas derivadas do oxigénio.

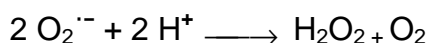
Podem-se classificar em dois grupos, radicais e não radicais. O primeiro grupo contém compostos como o radical óxido nítrico (NO^\cdot), radical ião superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo (OH^\cdot) e peróxido (ROO^\cdot). Radicais são espécies que contêm pelo menos um electrão desemparelhado nas orbitais à volta do núcleo e são capazes de existir independentemente. A existência de um electrão desemparelhado resulta em espécies altamente reactivas devido à sua propensão para dar ou receber um electrão para atingir a estabilidade (Kohen & Nyska, 2002; Willcox *et al.*, 2004). Os compostos não radicalares contêm algumas substâncias muito reactivas, que apesar de não serem radicais facilmente se podem converter num e/ou actuar como agentes oxidantes. São substâncias deste grupo e produzidas em elevadas concentrações pelas células vivas, o ácido hipocloroso (HClO), peróxido de hidrogénio (H_2O_2), peróxidos orgânicos e aldeídos (Evans & Halliwell, 2001; Kohen & Nyska, 2002).

Algumas ROS são extremamente reactivas (OH^\cdot), enquanto outras são menos oxidantes ($\text{O}_2^{\cdot-}$ e H_2O_2) (Halliwell, 2001; Nordberg & Arner, 2001; Willcox

et al., 2004). Para além disso algumas destas espécies são muito instáveis e só actuam no sítio em que são produzidas ($O_2^{\cdot-}$ e OH^{\cdot}), enquanto outras como H_2O_2 têm longo tempo de vida e difundem no organismo (Nordberg & Arner, 2001; Halliwell, 2001; Willcox *et al.*, 2004).

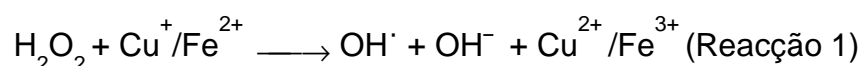
A fonte mais importante de $O_2^{\cdot-}$ nas células eucariotas é a saída de electrões da cadeia de transporte de electrões da mitocôndria (**Figura 10**). Este anião originado a partir do oxigénio molecular por adição de um electrão, perde a capacidade de penetrar as membranas lipídicas e fica aprisionado no compartimento em que é produzido.

O peróxido de hidrogénio para além de ser produzido por dismutação do superóxido, pela superóxido dismutase (SOD):

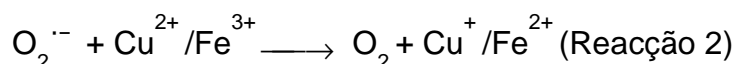


também pode ser directamente produzido por outras enzimas como a glicolato oxidase e a xantina oxidase (Halliwell, 2001). Apesar de não ser um radical livre, é muito importante devido à capacidade que apresenta de penetrar nas membranas biológicas (**Figura 1**) e formar espécies muito mais destruidoras como o radical hidroxilo (Nordberg & Arner, 2001; Halliwell, 2001; Willcox *et al.*, 2004).

O radical hidroxilo é formado a partir do H_2O_2 numa reacção catalisada por iões metálicos (Fe^{2+} ou Cu^+), conhecida por reacção de Fenton:



O superóxido desempenha um papel importante como agente redutor em ligação com a reacção 1, ao reciclar os iões metálicos:



O ácido ascórbico também pode actuar como agente redutor. Embora normalmente o ascorbato actue como um poderoso captador de espécies reactivas, pode-se tornar pró-oxidante na presença de iões ferro ou cobre, danificando as biomoléculas por promover a formação de OH^{\cdot} (Halliwell, 2001). A

soma das reacções 1 e 2 é a reacção de Haber-Weiss (reacção 3), os metais desempenham então um papel importante na formação dos radicais hidroxilo (Nordberg & Arner, 2001).

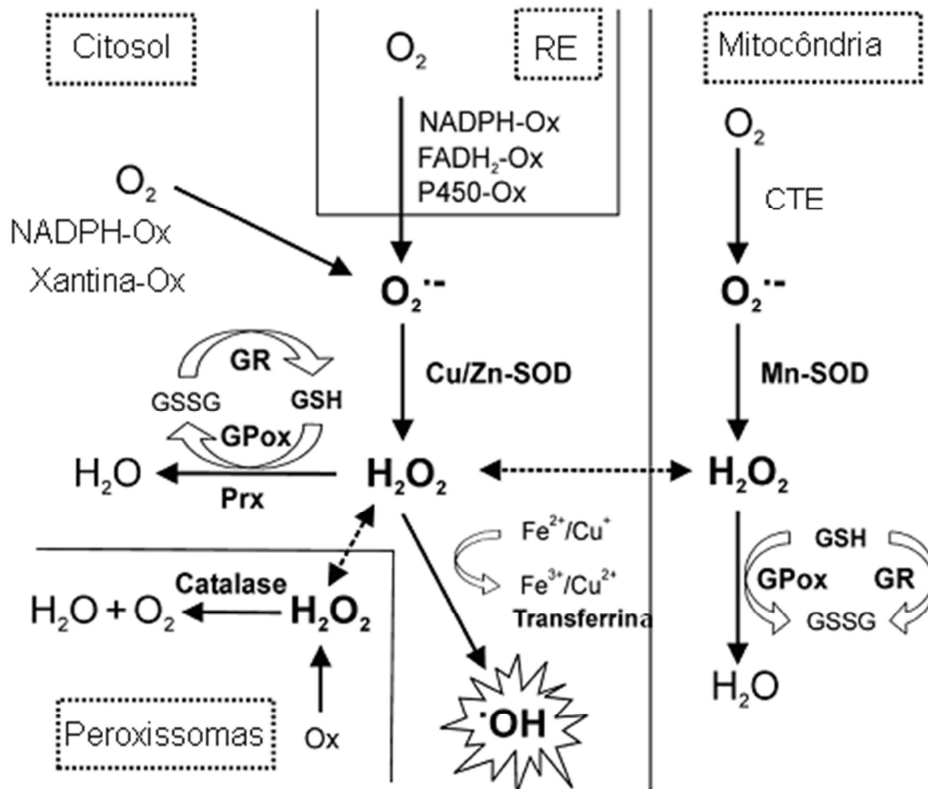
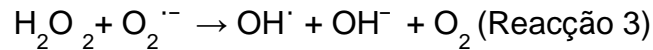


Figura 1 - Esquema simplificado da produção de espécies reativas do oxigénio nas células e a acção de alguns antioxidantes intracelulares, principalmente no citosol e na mitocôndria (devido à saída de electrões da cadeia respiratória). Rapidamente duas moléculas de superóxido dismutam, espontaneamente ou via a superóxido dismutase, em dióxigénio e peróxido de hidrogénio, permitindo a segunda o fluxo de ROS entre diferentes compartimentos celulares. O peróxido de hidrogénio pode ser enzimaticamente metabolizado a dióxigénio e água através de vários sistemas enzimáticos ou convertido no radical hidroxilo, que é extremamente reactivo, através de uma reacção química catalisada pelos metais de transição. RE, retículo endoplasmático; CTE, cadeia de transporte de electrões; Ox, oxidases; GSH, glutatião reduzido; GSSG, glutatião oxidado; GR, glutatião redutase; GPox, glutatião peroxidase; SOD, superóxido dismutase; Prx, peroxiredoxinas. As espécies reativas de oxigénio e os anti-oxidantes endógenos encontram-se a negrito. (Adaptado de Nordberg & Arner, 2001; Willcox *et al.*, 2004).

3.1.1.1 Papel dos metais de transição

A maioria dos metais de transição têm um electrão desemparelhado (com excepção do zinco) e por definição podem-se considerar radicais (Halliwell, 2001). Especialmente o cobre e o ferro participam na química dos radicais e convertem oxidantes relativamente estáveis em poderosos radicais.

Embora o cobre e ferro sejam necessários ao bom funcionamento do organismo humano podem ser perigosos devido a possibilidade de catalisar a produção de radicais livres. Por exemplo o ferro pode oscilar entre o estado ferroso (Fe^{2+}) e férrico (Fe^{3+}) o que o torna um potente catalisador da reacção de formação de radicais livres. Porém o organismo possuiu um sistema de proteínas de transporte e armazenagem (ferritina e heme) que asseguram que a maioria destes metais se encontra sequestrada na forma não catalítica (Halliwell, 1996; Kohen & Nyska, 2002).

Contudo o stresse oxidativo e a destruição celular, podem induzir a libertação dos iões metálicos (da ferritina e do grupo heme), que vão entrar nas reacções de formação de radicais livres.

Para além da sua importância na formação de OH^{\cdot} os metais de transição também podem exercer destruição ao catalisar a formação de espécies reactivas através de reacções de auto-oxidação e participar na formação de radicais alcóxil (RO^{\cdot}) e peróxil (ROO^{\cdot}) (Halliwell, 2001).

3.1.2 LIPOPEROXIDAÇÃO

A lipoperoxidação pode ser definida como uma deterioração oxidativa de ácidos gordos polinsaturados (possuidores de ligações duplas carbono-carbono) presentes em grande quantidade nas membranas e nos organelos intracelulares (mitocôndrias e peroxissomas). É um processo constituído por várias reacções encadeadas, sequenciais e que pode ser dividido em três etapas: iniciação, propagação e término (Ferreira & Matsubara, 1997; Gutteridge, 1982).

A lipoperoxidação tem início quando ROS com electrões desemparelhados promovem a remoção de um átomo de hidrogénio de um grupo metileno ($-\text{CH}_2-$)

de um ácido gordo polinsaturado. Nesta etapa há produção de um novo radical (-CH[·]-) que normalmente se estabiliza através de um rearranjo molecular para formar um dieno conjugado. Sob condições aeróbias esse radical (L[·]) combina-se com o oxigénio (O₂) formando um radical peroxilo (LOO[·]). Estes radicais podem retirar um átomo de hidrogénio de outra molécula lipídica, formando um novo radical que reage por sua vez com o oxigénio, originando novo radical peroxilo, permitindo que a reacção da peroxidação lipídica se torne contínua, pela repetição dos ciclos oxidativos e estabelecendo assim a etapa de propagação da reacção. Quando o radical peroxilo se combina com um átomo de hidrogénio, há formação de hidroperóxidos (LOOH), peróxidos cíclicos e epóxidos (Wilcox *et al.*, 2004). Estas substâncias, altamente reactivas, acabam por fragmentar os lípidos polinsaturados, produzindo malondialdeído, e outros compostos contendo grupos carbonilo. Um único evento de iniciação pode produzir várias moléculas de peróxido. À medida que as reacções em cadeia se processam, podem ser inactivadas proteínas de transporte ou enzimas da membrana, ou pode ocorrer o aumento da permeabilidade da dupla camada lipídica da membrana, alterando a homeostase (Ferreira & Matsubara, 1997). Finalmente, na etapa de conclusão, ocorre a formação de um intermediário instável (tetróxido), a partir dos radicais peroxilo, que sofrem decomposição, originando oxigénio singleto (¹O₂) e grupos carbonilo excitados, para além de outros produtos todos altamente lesivos para as macromoléculas incluindo o DNA (Wilcox *et al.*, 2004).

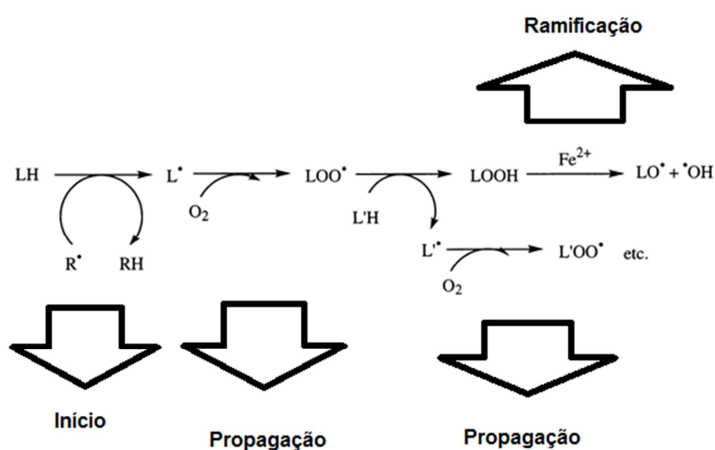


Figura 2 - Esquema das reacções em cadeia da lipoperoxidação. (LH), ácido gordo polinsaturado; (L[·]), radical lipídico; (LOO[·]), radical peroxilo; (LOOH), hidroperóxido lipídico; (LO[·]), radical alcóxido; (OH[·]), radical hidroxilo; (R[·]), espécies reactivas de oxigénio com iões desemparelhados (adaptado de De Zwart *et al.*, 1999).

3.2 DEFESAS ANTIOXIDANTES

Devido à contínua formação *in vivo* de espécies reactivas, os organismos aeróbios só sobrevivem porque desenvolveram sistemas de defesa antioxidante.

Na indústria alimentar o conceito de antioxidante está restringido aos compostos inibidores de quebra da cadeia de lipoperoxidação envolvida na rancidez dos alimentos, sendo um exemplo de antioxidante neste caso o α -tocoferol. Na indústria alimentar é vulgar ligarem simplesmente a peroxidação dos lípidos com os antioxidantes.

Mas *in vivo* para além dos lípidos, as espécies reactivas são nefastas para o DNA e proteínas.

Uma definição de antioxidante foi dada por Halliwell e Gutteridge em 1989, são “qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas com a de qualquer substrato oxidável, previne ou atrasa significativamente a oxidação desse substrato.” (citado por Wilcox *et al.*, 2004). Parker (1996) é a favor da definição de antioxidante como um intermediário metabólico, “um antioxidante é um substrato que protege os tecidos biológicos dos danos dos radicais livres, que é capaz de ser reciclado ou regenerado por redutores biológicos” (citado por Rösen *et al.*, 2001). Os antioxidantes podem proteger as células directa ou indirectamente contra o stresse oxidativo (Willcox *et al.*, 2004).

3.2.1 ANTIOXIDANTES ENDÓGENOS E EXÓGENOS

Alguns antioxidantes estão estrategicamente compartimentados dentro das células em organelos sub-celulares, a fim de proporcionarem a máxima protecção. São os antioxidantes endógenos. Estes podem defender das espécies reactivas por três mecanismos:

- 1 - inibindo a sua formação (antioxidantes preventivos);
- 2 - removendo-os ou degradando-os em produtos menos nocivos (antioxidantes removedores);
- 3 - apresentando-se eles próprios para oxidação (antioxidantes captadores).

Também as ROS e RNS, em níveis moderados, e certas moléculas de sinalização celular, como as citocinas, podem aumentar as defesas celulares antioxidantes (aumentando a regulação da expressão dos genes que codificam) (Halliwell *et al.*,1995).

Verificou-se que, apesar dos níveis de protecção, existem danos oxidativos que atingem as proteínas, os lípidos e o DNA, pelo que há necessidade fisiológica de reparar estes danos. Assim, concluiu-se que o modelo proposto de sistema de defesa celular antioxidante estava incompleto e um quarto grupo, os antioxidantes reparadores, foram adicionados ao conjunto conhecido de sistemas de defesas.

Em resumo, o mecanismo de defesa antioxidante pode incluir qualquer substância que neutralize o potencial efeito destruidor das espécies reactivas ou que o repare.

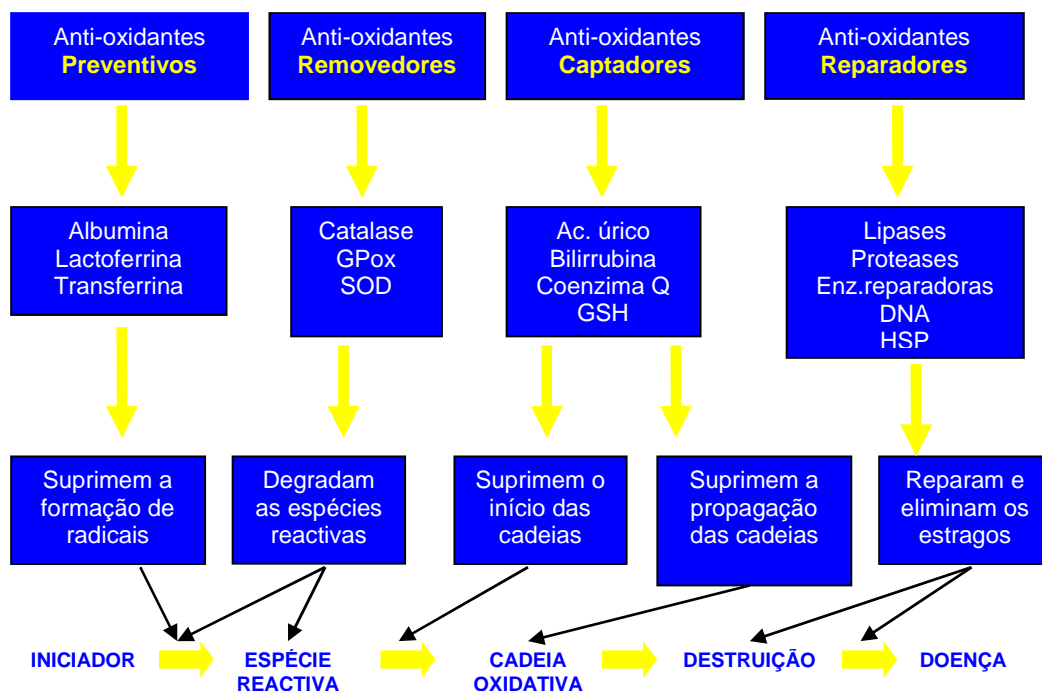


Figura 3 - Defesa celular antioxidante contra as espécies reactivas. SOD - super-óxido dismutase, GPox - glutatião peroxidase, GSH – glutatião reduzido, HSP – proteínas de choque térmico (Adaptado de Willcox *et al.*, 2004).

A dieta desempenha um papel muito importante ao fornecer nutrientes essenciais como as vitaminas hidrofílicas (vitamina C ou ácido ascórbico) e as vitaminas lipofílicas (vitamina E ou α -tocoferol) e o β -caroteno (Willcox *et al.*, 2004). Também importantes nas defesas antioxidantes e provenientes da dieta são os minerais, uma vez que muitos deles são cofactores de antioxidantes

enzimáticos (a glutatião peroxidase contém selênio e a SOD contém zinco). Ingerem-se outros antioxidantes provenientes de uma alimentação de frutos e vegetais, os polifenóis aos quais pertencem os flavonóides.

3.3 DIABETES

A *diabetes mellitus* é uma doença metabólica crónica que se caracteriza por níveis de glucose sanguínea elevados e eliminação de glucose pela urina. As principais formas são a diabetes tipo 1, vulgarmente denominada insulino dependente e a diabetes tipo 2 não dependente de insulina. A *diabetes mellitus* insulino dependente ou tipo 1 surge quando as células β do pâncreas são destruídas por processos auto-imunes ou infecções e se tornam incapazes de produzir insulina. Os sintomas surgem rapidamente e afectam principalmente doentes jovens. A *diabetes mellitus* não dependente de insulina ou tipo 2 afecta cerca de 90% dos doentes diabéticos, desenvolve-se lentamente e está geralmente associada à obesidade e estilo de vida sedentário, caracteriza-se por uma resistência dos tecidos à insulina e/ou deficiência da sua secreção, e tem vários graus de severidade. Tipicamente surgia em pessoas com idade superior a 40 anos e com história familiar de diabetes, mas recentemente tem-se constatado a ocorrência desta forma da doença em pessoas mais novas (Costacou & Mayer-Davis, 2003; Mandel *et al.*, 2005; Rolo & Palmeira, 2006).

A deficiente secreção de insulina nos doentes com diabetes tipo 2 caracteriza-se pela diminuição da primeira fase da secreção de insulina induzida pela glucose, hiperinsulinémia retardada e posterior desenvolvimento de incapacidade de síntese de insulina (Sakai *et al.*, 2002; Albuquerque & Pimazoni Netto, 2008).

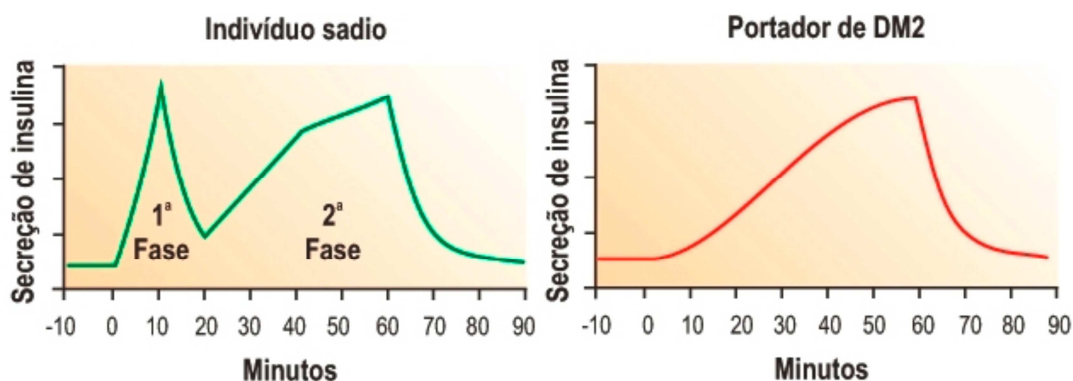


Figura 4 - Secreção bifásica de insulina estimulada por glicose em indivíduos saudáveis e diabéticos (Albuquerque & Pimazoni Netto, 2008).

Inicialmente a resistência à insulina é compensada por hiperinsulinemia, através da qual se preserva a tolerância normal à glicose. Quando a resistência à insulina aumenta mais e/ou a secreção compensatória de insulina diminui, ocorre deterioração até à diminuição da tolerância à glicose (Evans *et al.*, 2003; Robertson *et al.*, 2003).

A diabetes está associada com a aterosclerose macrovascular que afecta as artérias que fornecem sangue ao coração, cérebro e membros inferiores. Como consequência, estes doentes têm um risco mais elevado de sofrerem enfarte do miocárdio, trombose e amputação de extremidades inferiores. Também está associada com complicações microvasculares na retina e glomérulo que podem levar à falência deste tecido ou órgão (Brownlee, 2001).

A doença e as suas complicações têm um impacto económico significativo, nas famílias e nos sistemas de saúde dos países (WHO, 2010b).

3.3.1 REGULAÇÃO DO METABOLISMO DA GLUCOSE

3.3.1.1 Transportadores de glicose e captação de glicose

A captação de glicose nas células ocorre através de difusão facilitada por transportadores específicos (Kahn & Pessin, 2002). O transporte facilitado de glicose nos tecidos periféricos é mediado através de transportadores solúveis

pertencentes à família dos transportadores de glucose, GLUTs. Actualmente, existem 14 membros desta família (GLUTs 1-14) cuja distribuição tecidual, propriedades cinéticas e especificidade de hidratos de carbono é variável. Essas proteínas são divididas em 3 classes principais, sendo a classe I a melhor caracterizada e compreende os GLUTs 1-4 e o GLUT 14 (Kahn & Pessin, 2002; Manolescu *et al.*, 2007). A classe II é composta pelos GLUTs 5, 7, 9 e 11 e a classe III pelos transportadores GLUT 6, 8, 10, 12 e 13 (Manolescu *et al.*, 2007).

A insulina estimula a captação de glucose no músculo e tecido adiposo através de vias de sinalização complexas que se iniciam com a ligação da insulina ao receptor de membrana (Kahn & Pessin, 2002).

A translocação dos transportadores do local de armazenamento intracelular para a membrana é considerada o passo limitante do processo de captação de glucose (Kahn & Pessin, 2002).

3.3.1.2 Síntese do glicogénio

Nos tecidos dos mamíferos, os hidratos de carbono são armazenados principalmente na forma de glicogénio sendo os principais locais de depósito o fígado e o músculo-esquelético. Além destes, tecidos como o músculo liso e cardíaco, rins, cérebro e tecido adiposo também são capazes de sintetizar e armazenar glicogénio (Srivastava & Pandey, 1998; Roach, 2002).

Entre as refeições, o glicogénio do fígado é o responsável por manter a glicemia do nosso organismo e durante o exercício físico, é a fonte de glucose para o músculo.

O glicogénio é um polímero ramificado de glucose, com peso molecular aproximado de 107 Daltons que apresenta uma cadeia aproximada de 1-11 resíduos de glicosil, tendo cerca de 4000 cadeias de glicosil (Lomako *et al.*, 1991)

A insulina regula a síntese de glicogénio em duas etapas: a primeira através do controle da captação e transporte de glucose e a segunda pela regulação dos estados de fosforilação e activação das enzimas envolvidas na síntese e degradação do glicogénio (Srivastava & Pandey, 1998; Roach, 2002). Após entrar na célula, a glucose é fosforilada a glucose-6-fosfato pela

hexoquinase muscular e/ou pela glucoquinase/hexoquinase hepáticas. A glucose-6-fosfato (G-6-P) é convertida a glucose-1-fosfato (G-1-P) pela enzima fosfoglucomutase e a seguir, convertida em uridina-difosfato glucose (UDP-G) pela enzima uridina-difosfato glucose pirofosforilase. A UDP-G formada serve como doador de unidades glicosil para a cadeia de glicogénio nascente. Essa reacção é catalisada pela enzima glicogénio sintetase (GS), ponto-chave na síntese de glicogénio. Além da GS, uma proteína iniciadora chamada glicogenina e uma enzima ramificadora também contribuem para o processo de síntese e armazenamento de glicogénio (**Figura 5**) (Srivastava & Pandey, 1998; Roach, 2002; Ferrer *et al.*, 2003).

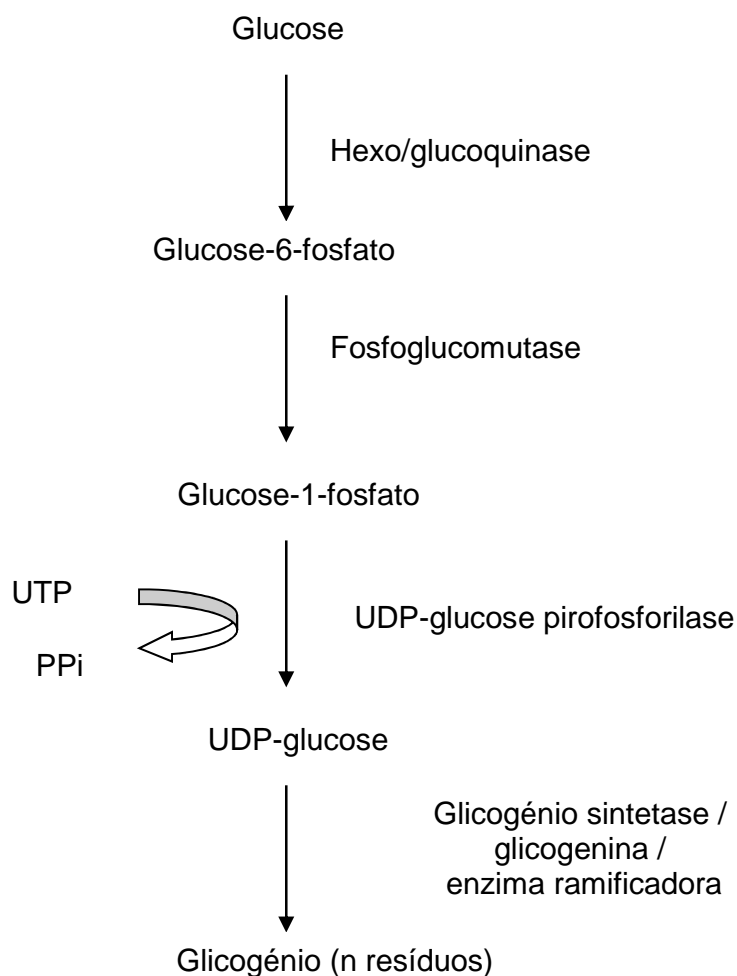


Figura 5 - Síntese de glicogénio. UTP-uridina trifosfato, UDP-uridina difosfato, PPI-fosfato inorgânico (Adaptado de Srivastava & Pandey, 1998).

A GS é uma proteína multimérica, cuja actividade é regulada por mecanismos alostéricos e de fosforilação/desfosforilação. Nos mamíferos ela

existe basicamente sob duas isoformas, uma expressa no fígado e outra no músculo, também se encontra em outros tecidos (Srivastava & Pandey, 1998; Roach, 2002). A insulina modula a actividade da GS através de modificação covalente, translocação e regulação alostérica (Ferrer *et al.*, 2003).

A degradação do glicogénio (glicogenólise) é catalisada pela glicogénio fosforilase resultando em glucose-1-fosfato, substrato para a glucose-6-fosfatase. A queda das reservas de glicogénio é a primeira resposta dos tecidos, especialmente do fígado, para a manutenção das concentrações normais de glucose sanguínea frente a uma redução das concentrações plasmáticas de insulina e aumento das concentrações de glucagon (Roach, 2002; Ferrer *et al.*, 2003).

3.3.1.3 Metabolismo da glucose

No estado fisiológico, a manutenção da homeostase da glucose é mantida, principalmente, através da regulação hormonal da captação periférica e produção endógena de glucose, primeiro pelo músculo, tecido adiposo e fígado, além da secreção de insulina pelo pâncreas e da secreção de hormonas contra-reguladoras (Taha & Klip, 1999; Saltiel & Kahn, 2001; Beardsall *et al.*, 2003; Moore *et al.*, 2003).

A insulina é uma das hormonas essenciais que regulam o metabolismo, o crescimento e a diferenciação celular, actuando em diversos tecidos. De maneira geral, as acções anabólicas da insulina incluem o estímulo da captação, da utilização e do armazenamento intracelular de glucose, aminoácidos e ácidos gordos e a inibição de processos catabólicos como a glicogenólise, lipólise e proteólise. Além disso, a insulina também inibe a gluconeogénese hepática (Saltiel; Kahn, 2001; Beardsall *et al.*, 2003; Moore *et al.*, 2003).

No estado pós-prandial, quando as concentrações de glucose sanguínea estão elevadas, a hiperglicémia sinaliza às células β do pâncreas para produzir e libertar insulina e suprimir a produção de glucagon pelas células α dos ilheus pancreáticas (Taha & Klip, 1999; Beardsall *et al.*, 2003). Uma vez libertada, a insulina estimula a captação de glucose pelo músculo através do aumento da

translocação dos transportadores de glucose (GLUT4) para a membrana. Além disso, as concentrações aumentadas de glucose no interior das células musculares e a presença da insulina estimulam a glicólise para produção de energia. A glucose que não é imediatamente utilizada pelo músculo e/ou tecido adiposo é captada pelo fígado onde a insulina estimula a produção de glicogénio através da estimulação da GS, inibição da glicogénio fosforilase e inibição da gluconeogénese e da glicogenólise.

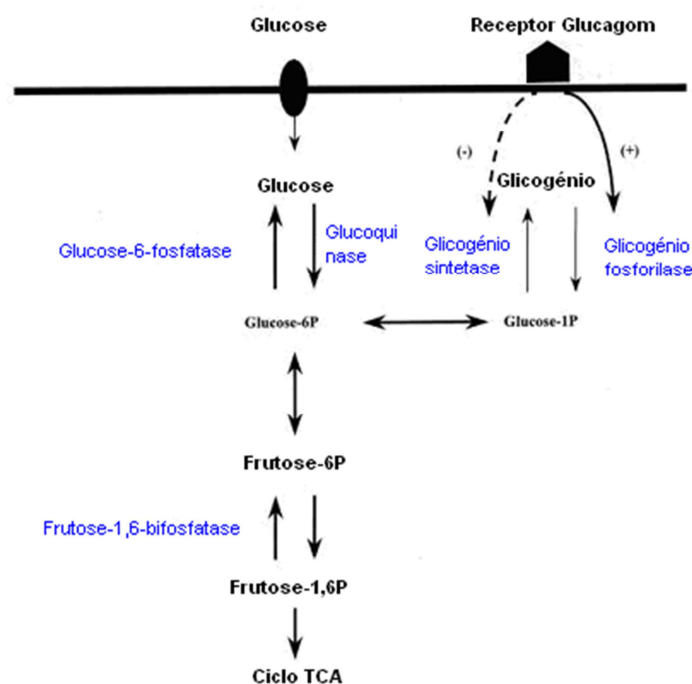


Figura 6 - Visão global do metabolismo hepático da glucose, com destaque para os alvos da inibição da produção hepática de glucose. Frutose-6P - frutose-6-fosfato; Frutose-1,6P - frutose-1,6-difosfato; ciclo TCA - ciclo do ácido tricarbóxico (adaptado de McCormack *et al.*, 2001).

No tecido adiposo, a insulina estimula a captação de glucose de forma semelhante ao músculo e promove a lipogénese, aumentando a actividade da lipoproteína lipase, que liberta ácidos gordos para a síntese de trigliceridos e inibe a lipase hormona-sensível, enzima responsável pela utilização das reservas de gordura. Em relação ao metabolismo proteico, a insulina também possui um efeito anabólico, promovendo a entrada de aminoácidos nas células e estimulando a síntese proteica (**Figura 7**) (Taha & Klip, 1999; Beardsall *et al.*, 2003; Moore *et al.*, 2003).

Durante o jejum ou entre as refeições, as concentrações de insulina diminuem e as de glucagon e outras hormonas contra-reguladoras da insulina

aumentam. O glucagon actua primeiramente no fígado com o objectivo de activar vias que levem ao aumento das concentrações plasmáticas de glucose como a gluconeogénese e glicogenólise. Embora as concentrações de glucose sanguínea sejam mantidas inicialmente pela glicogenólise hepática, as reservas de glicogénio são limitadas e após um jejum prolongado, a contribuição da gluconeogénese hepática bem como renal a partir de glicerol, lactato e aminoácidos aumenta progressivamente (Saltiel & Kahn, 2001; Beardsall *et al.*, 2003). Durante o jejum, a captação de glucose no músculo é reduzida e este torna-se altamente dependente da oxidação de ácidos gordos para obtenção de energia. Além disso, ocorre aumento da glicogenólise e proteólise muscular. No tecido adiposo ocorre activação da lipólise com elevação da libertação de ácidos gordos e glicerol que servem como precursores gluconeogénicos e cetogénicos no fígado (**Figura 7**) (Beardsall *et al.*, 2003; Moore *et al.*, 2003).

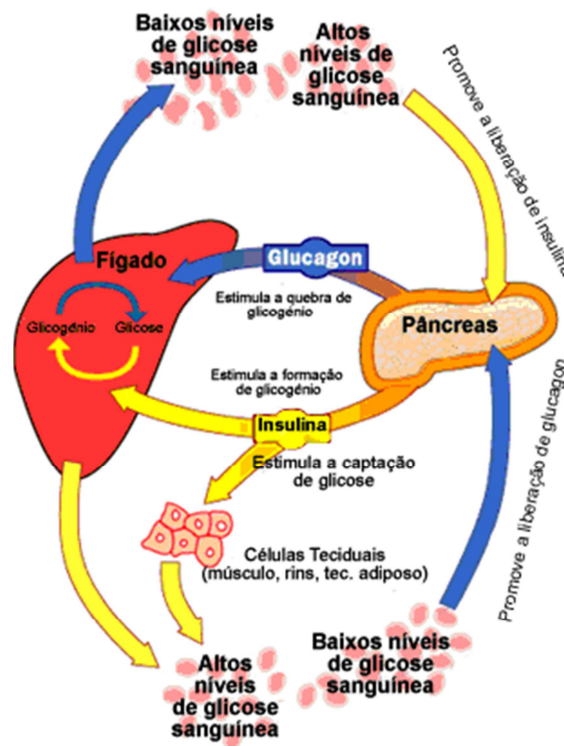


Figura 7 - Regulação do metabolismo da glucose (adaptado de <http://health.howstuffworks.com/diabetes1.htm>. Acesso em 26-01-2010).

3.3.2 PATOGÊNESE DA DIABETES TIPO 2

A insulina é a hormona anabólica mais importante que regula o metabolismo energético. Uma deficiência relativa ou absoluta, como no caso da diabetes, leva a severas disfunções nos principais órgãos alvos da insulina, isto é, fígado, tecido adiposo e músculo. A falta de insulina pode levar ao aumento da glicémia, redução da captação de glucose pelos tecidos periféricos, redução da lipogénese e da síntese proteica, com os aminoácidos sendo utilizados como substrato para a gluconeogénese. Além disso, ocorre activação da produção hepática de glucose e aumento da lipólise no tecido adiposo com consequente elevação de ácidos gordos na circulação (Moore *et al.*, 2003). Se não controlada, a hiperglicémia crónica resulta no desenvolvimento de diversas complicações que levam a disfunção, dano ou falência de vários órgãos (American Diabetes Association, 2008; WHO, 2009).

Em relação à patogénese da diabetes tipo 2, podem ser identificados quatro defeitos intrínsecos básicos:

- (1) resistência à insulina nos tecidos muscular e adiposo;
- (2) redução da secreção de insulina;
- (3) aumento da produção de glucose pelo fígado;
- (4) redução de produção de peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1) (Stolar *et al.*, 2008).

A resistência à insulina geralmente precede o início da diabetes e caracteriza-se pela redução da captação de glucose nos tecidos periféricos como o músculo e o tecido adiposo. Como mecanismo de compensação, há o aumento da secreção de insulina pelo pâncreas, levando a hiperinsulinémia. Quando a célula β já não é capaz de promover maior secreção de insulina, surge a hiperglicémia. O aumento da produção de glucose pelo fígado resulta da resistência hepática à insulina e contribui especialmente com a hiperglicémia de jejum. A exposição crónica à glucose (glucotoxicidade) e a ácidos gordos livres (lipotoxicidade), bem como o aumento da necessidade secretória de insulina são factores que levam à perda da função das células β pancreáticas. Um outro factor na patogénese da diabetes está relacionado com a redução nos níveis de GLP-1, hormona intestinal secretada durante a alimentação e que aumenta a secreção de insulina. A hormona GLP-1 suprime a produção de glucagon pelas células alfa

pancreáticas e retarda o esvaziamento gástrico, o que reduz a hiperglicémia pós-prandial. A estratégia de tratamento ideal da diabetes deve ser direccionada para estes quatro defeitos intrínsecos para que o controle glicémico seja alcançado (Gerich & Dailey, 2004; Todd & Bloom, 2007; Stolar *et al.*, 2008).

3.3.3 DIABETES E STRESSE OXIDATIVO

Baseado em estudos clínicos e laboratoriais há uma evidência cada vez maior que o stresse oxidativo desempenha um papel importante na patogénese dos dois tipos de *diabetes mellitus* (Rösen *et al.*, 2001; Wilcox *et al.*, 2004).

Um aumento dos níveis de insulina, ácidos gordos livres e/ou glucose pode aumentar a produção de ROS e o stresse oxidativo. O stresse oxidativo tem como consequência uma diminuição da secreção de insulina e da sua acção nos tecidos alvo, acelerando a progressão da doença desde: resistência à insulina, tolerância à glucose diminuída e por fim diabetes tipo 2 declarada (Ceriello, 2000).

Uma repetida exposição a níveis elevados de ácidos gordos livres e hiperglicémia, pode conduzir a uma disfunção das células β (células produtoras de insulina), que com o tempo se pode tornar irreversível (Robertson *et al.*, 2003; Ceriello & Motz, 2004).

Os pacientes diabéticos quando comparados com indivíduos saudáveis apresentam uma produção aumentada de ROS (e outros radicais livres) e/ou possuem as defesas antioxidantes diminuídas, indicando uma acção crítica das ROS no surgimento da diabetes, na sua progressão e nas consequências patológicas (Ceriello *et al.*, 1998; Rösen *et al.*, 2001; Wilcox *et al.*, 2004; Rolo & Palmeira, 2006; Palmeira *et al.*, 2007).

As células danificadas pelo stresse oxidativo (células endoteliais dos capilares da retina, células mesangiais do glomérulo renal, células de Schwan dos nervos periféricos), contrariamente às outras células do organismo, não são capazes de regular o transporte de glucose para o seu interior, quando expostas a hiperglicémia (Brownlee, 2005). Assim surgem as complicações degenerativas mais frequentes da diabetes: retinopatia, glomerulonefrite e neuropatia periférica.

Hoje em dia é vulgarmente aceite que o stresse oxidativo gerado em consequência da hiperglicémia tem um papel importante nas complicações secundárias da diabetes, tanto a nível macrovascular como microvascular (Ha & Kim, 1999; Ceriello & Motz, 2004; Ceriello, 2005).

3.3.3.1 Vias patológicas para a toxicidade da glucose

Na deterioração dos tecidos causada pela hiperglicémia há quatro mecanismos moleculares que têm sido considerados como os principais implicados: aumento do metabolismo da via dos poliois, activação da proteína quinase C, aumento dos produtos finais avançados da glicosilação (AGE) e aumento do metabolismo da via das hexosaminas (Brownlee, 2001; Brownlee, 2005; Palmeira *et al.*, 2007)

3.3.3.1.1 A via dos poliois

Normalmente a aldose redutase reduz os aldeídos tóxicos da célula a álcoois inactivos. Mas quando a concentração de glucose se torna muito elevada a mesma enzima também reduz a glucose a sorbitol que é posteriormente oxidado a frutose, o que implica o consumo do cofactor NADPH. Porém o NADPH também é o cofactor essencial para a regeneração de um importante antioxidante intracelular, o glutatião reduzido. Ao consumir NADPH e consequentemente diminuir a quantidade de glutatião reduzido, a via dos poliois aumenta a susceptibilidade intracelular ao stresse oxidativo (Brownlee, 2005).

A excessiva produção de superóxido induzida pela hiperglicémia inibe de forma significativa a glucose-6-fosfato desidrogenase, a enzima limitante da via das pentoses, necessária para o fornecimento de equivalentes redutores ao sistema de defesa antioxidante (Nishikawa *et al.*, 2000a; Sakai *et al.*, 2003).

3.3.3.1.2 Ativação de isoformas da proteína quinase C (PKC)

Segundo Browlee (2001) o sorbitol é metabolizado a frutose pela sorbitol desidrogenase, aumentando a razão NADH/NAD⁺, resultando em trioses fosfato oxidadas com síntese de diacilglicerol (DAG) (Rolo & Palmeira, 2006).

A hiperglicémia dentro da célula aumenta a síntese de diacilglicerol que é um cofactor de activação das isoformas da PKC (α , β , δ) (Rolo & Palmeira, 2006).

Quando a PKC é activada tem vários efeitos na expressão dos genes. Por exemplo: a sintase endotelial de óxido nítrico (eNOS) que é vasodilatadora, está diminuída, enquanto a endotelina-1 que é vasoconstritora está aumentada, o factor β de transformação do crescimento que promove oclusão capilar está aumentado, assim como o factor inibidor-1 da activação do plasminogénio, que está ligado à diminuição da fibrinólise e à consequente oclusão vascular (Brownlee, 2005).

3.3.3.1.3 Produção intracelular de precursores de AGE

Os produtos finais avançados da glicosilação (AGE) têm origem na auto-oxidação da glucose a glioxal, decomposição do produto de Amadori ou cetoamida (α -carbonil) a 3-desoxiglucosona e fragmentação do gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona-fosfato a metilglioxal. O glioxal, metilglioxal e 3-desoxiglucosona reagem com grupos amina de proteínas intra e extra celulares, formando AGE (Rolo & Palmeira, 2006).

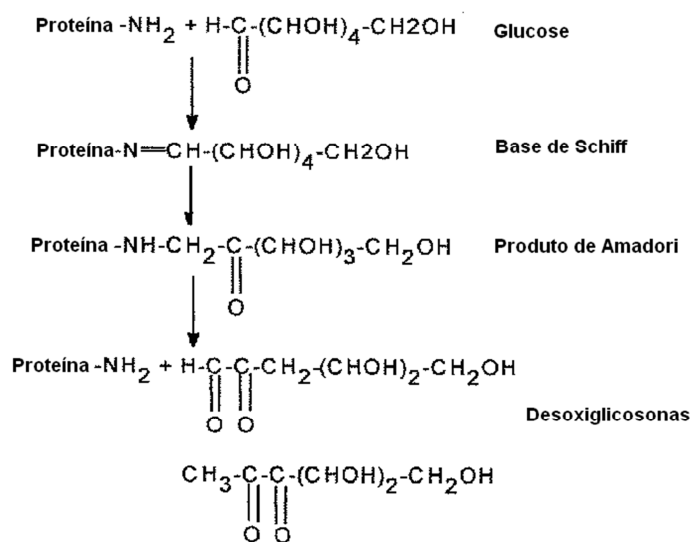


Figura 8 – Esquema do processo de glicosilação.

Segundo Brownlee (2005) os precursores intracelulares de AGE danificam as células por três mecanismos:

- 1 - a glicosilação das proteínas intracelulares, incluindo as proteínas envolvidas na transcrição dos genes;
- 2 - os precursores intracelulares de AGE podem difundir para fora da célula e modificar as moléculas da matriz extracelular e causar disfunção celular;
- 3 - os precursores de AGE ao difundirem para o exterior da célula modificam as proteínas circulantes no sangue (a albumina é um exemplo), que podem depois ligar-se aos receptores dos AGE e activá-los, causando a produção de citocinas inflamatórias e factores de crescimento que por seu lado causam patologias vasculares.

Principalmente pelas suas propriedades de glicosilação proteica, os AGE têm sido implicados na patogénese da maioria das complicações microvasculares da diabetes: nefropatia, retinopatia e neuropatia (Ha & Kim, 1999; Rolo & Palmeira, 2006).

3.3.3.1.4 Actividade aumentada da via das hexosaminas

Em condições metabólicas normais 2-5% da glucose que entra nas células segue a via metabólica das hexosaminas. Quando a glucose intracelular está

aumentada muita glucose vai seguir esta via, em que a enzima glutamina:frutose-6-fosfato amidotransferase (GFAT) converte a frutose-6-fosfato a glucosamina-6-fosfato e por fim a uridina difosfato-N-acetilglucosamina. Esta liga-se aos resíduos de serina e treonina dos factores de transcrição e esta alteração resulta em mudanças patológicas da expressão dos genes. Por exemplo a modificação do factor Sp1 resulta numa expressão aumentada do factor de crescimento β 1 e do factor inibidor-1 da activação do plasminogénio (PAI-1), ambos prejudiciais ao funcionamento os vasos sanguíneos dos diabéticos (Brownlee, 2001; Rolo & Palmeira, 2006).

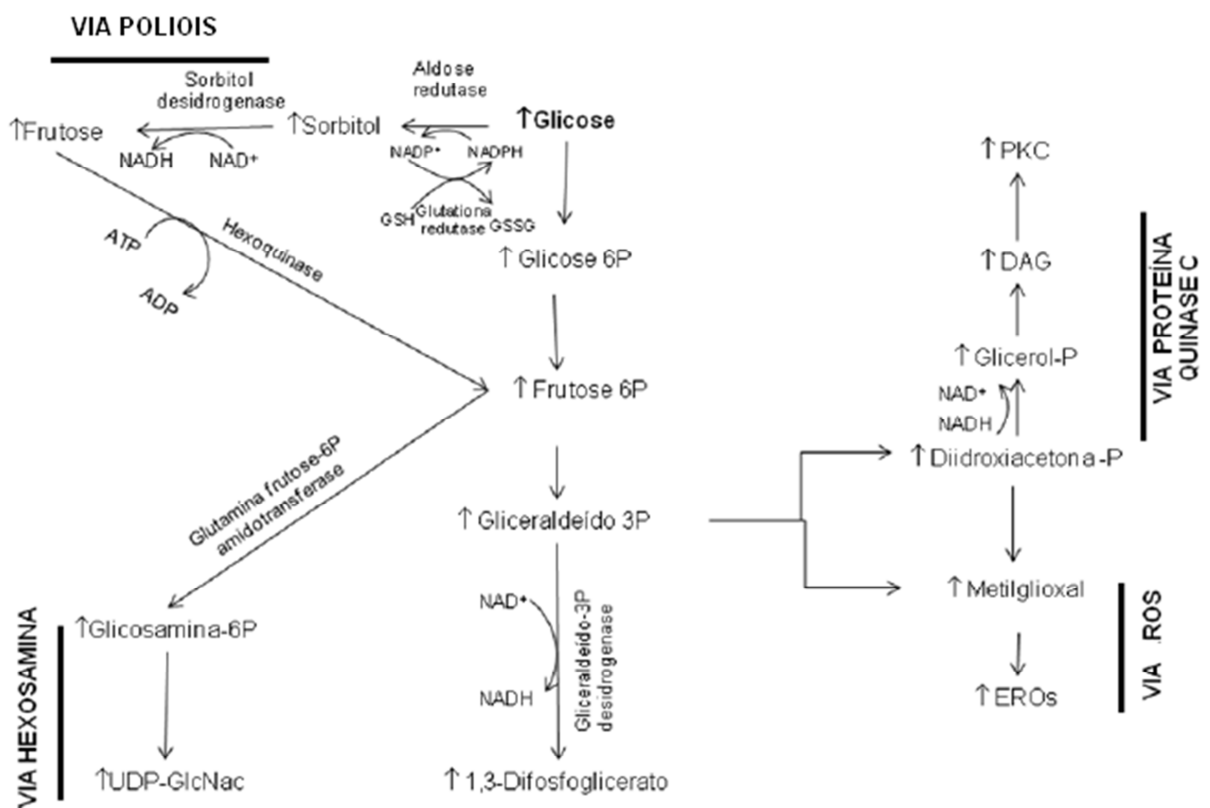


Figura 9 - Mecanismos moleculares que relacionam a hiperglicémia com o aumento da via de formação de poliois, via das hexosaminas, formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e estimulação da proteína quinase C (PKC). (Adaptado de Rolo & Palmeira, 2006)

3.3.3.2 Stresse oxidativo: o elo de ligação para os danos causados pela hiperglicémia

A grande produção de superóxido pela cadeia de transporte de electrões da mitocôndria, induzida pela hiperglicémia, é o elo de ligação causal entre o alto nível de glucose e as vias responsáveis pelo dano hiperglicémico (Nishikawa *et al.*, 2000b; Ceriello & Motz, 2004; Brownlee, 2005; Rolo & Palmeira, 2006; Palmeira *et al.*, 2007).

A mitocôndria é a principal fonte celular de ROS, que resultam de um deficiente transporte de electrões (Nishikawa *et al.*, 2000b; Sakai *et al.*, 2002).

O piruvato proveniente da glicólise é transportado para a mitocôndria onde é oxidado pelo ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) para produzir NADH. Os electrões provenientes da oxidação dos substratos são encaminhados pelos transportadores redox da cadeia respiratória (complexos I, III e IV) até ao aceitador final, o oxigénio molecular. Mediante quatro reduções o oxigénio é convertido em água (Nishikawa *et al.*, 2000a).

O principal factor a regular a produção de ROS pela mitocôndria é o estado redox da cadeia respiratória. A transferência de electrões através da cadeia respiratória gera um gradiente de protões (voltagem). Em condições normais, muita da energia deste gradiente de voltagem é usada para gerar ATP (Nishikawa *et al.*, 2000a; Sakai *et al.*, 2002). A amplitude deste gradiente é designada controlo respiratório e regula todo o transporte de electrões através da cadeia respiratória (Rolo & Palmeira, 2006). Quando a diferença de potencial electroquímico é elevada, como quando há hiperglicémia, a vida dos transportadores intermédios, como a ubisemiquinona, é prolongada (Nishikawa *et al.*, 2000a). Isto sucede, porque a actividade dos complexos da cadeia respiratória como a bomba de protões, são regulados pelo gradiente transmembranar de protões e o potencial de membrana. Quando são suficientemente altos inibem a bomba de protões. Cada local de geração de ROS tem um potencial diferente e assim responde de forma diferente a mudanças do gradiente transmembranar de protões e ao potencial de membrana, o que dá origem a uma complexa regulação da produção de ROS (Rolo & Palmeira, 2006).

Parece haver um patamar acima do qual mesmo uma pequena variação no potencial de membrana dá origem a uma grande produção de superóxido pela mitocôndria (Nishikawa *et al.*, 2000a).

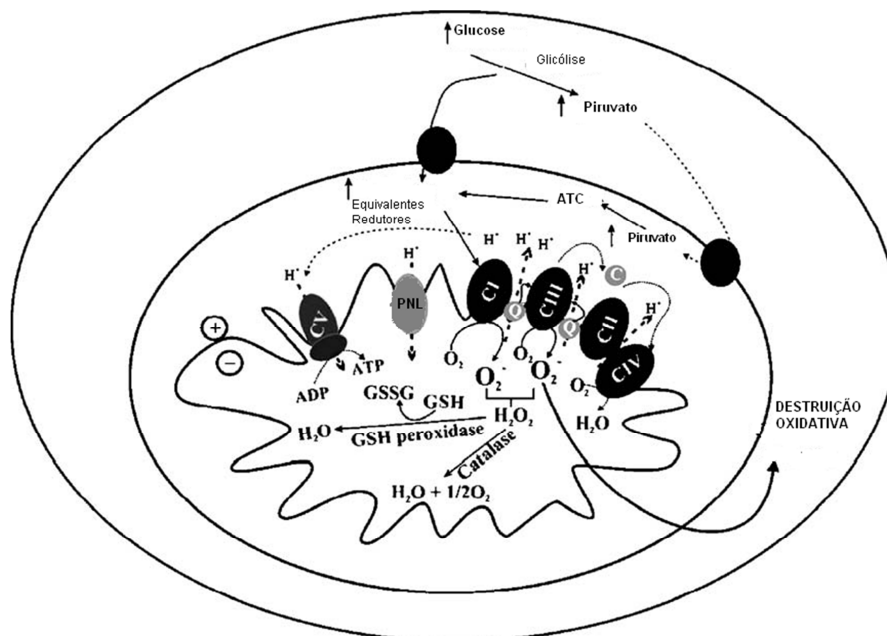


Figura 10 - Produção de ROS pela cadeia de transporte de electrões da mitocôndria e dissipação do gradiente de prótons pelas proteínas não ligadas. A captação pelas defesas antioxidantes é insuficiente para prevenir o stresse oxidativo na hiperglicémia. CI, complexo I; CII, complexo II; CIII, complexo III; CIV, complexo IV; CV, complexo V; ADP, adenosina difosfato; ATP, adenosina trifosfato; ATC, ciclo ácido tricarboxílico; PNL, proteínas não ligadas; GSH, glutatião reduzido; GSSG, glutatião oxidado (Adaptado de Rolo & Palmeira, 2006).

O aumento de dadores de electrões (NADH e FADH₂) induzido pela hiperglicémia, aumenta o fluxo de electrões através da cadeia de transporte de electrões da mitocôndria. Consequentemente há um aumento da razão ATP/ADP e hiperpolarização do potencial de membrana da mitocôndria. Isto conduz a uma inibição parcial do transporte de electrões no complexo III, resultando numa acumulação de electrões para a coenzima Q. Leva a uma redução parcial do O₂ e à produção do radical livre anião superóxido. Pensa-se que é esta redução acelerada da coenzima Q e produção de ROS que é a fonte da disfunção da mitocôndria, que desempenha um papel crítico nas desordens metabólicas ligadas à diabetes (Rolo & Palmeira, 2006; Palmeira *et al.*, 2007).

A inibição da produção de ROS e/ou o aumento de captação de ROS provaram ser terapias benéficas (Rolo & Palmeira, 2006).

3.3.3.2.1 Funcionamento mitocondrial e a secreção de insulina pelas células β

Nas células β do pâncreas a razão ATP/ADP provavelmente determina a abertura do canal K_{ATP} envolvido na secreção de insulina (Detimary *et al.*, 1995; Tarasov *et al.*, 2004). Alterações nesta razão em consequência da disfunção mitocondrial induzida pela glucose, irão afectar a secreção de insulina (Rolo & Palmeira, 2006).

A glucose é transportada através da membrana celular por transportadores (GLUT) principalmente pelo GLUT-2. Mais de 90% do piruvato produzido a partir da glucose pela via glicolítica vai para o interior da mitocôndria. A razão ATP/ADP aumenta como consequência do aumento do processamento da glucose, pela via glicolítica, ciclo do ácido tricarboxílico e fosforilação oxidativa. Este aumento na razão ATP/ADP causa o fecho dos canais de K^+ sensíveis ao ATP causando despolarização dos canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem, desencadeando a exocitose das vesículas secretoras de insulina (Rolo & Palmeira, 2006).

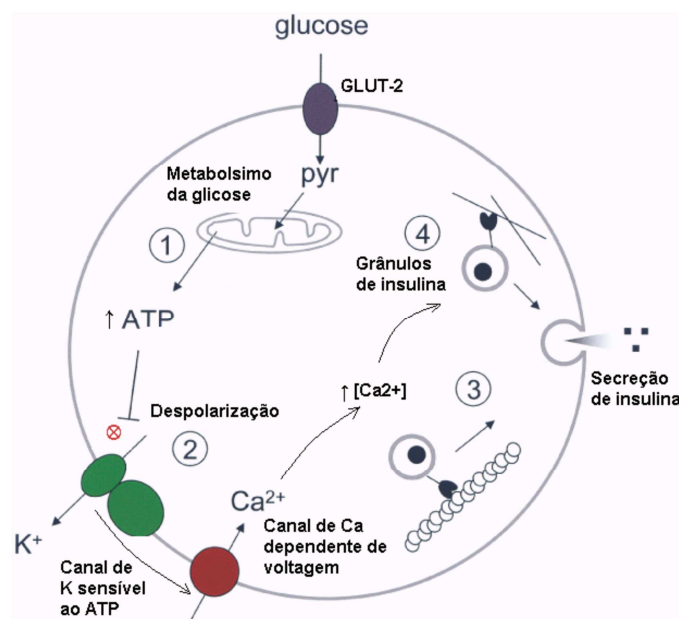


Figura 11 - Mecanismo de secreção de insulina pelo pâncreas. ATP, adenosina trifosfato; GLUT-2, transportador de glucose; pyr, piruvato (Adaptado de <http://www.lookfordiagnosis.com>. Acesso em 04-12-2009).

3.4 ENZIMAS DO METABOLISMO DA GLUCOSE

3.4.1 α -GLUCOSIDASE

3.4.1.1 Função

Os hidratos de carbono constituem a classe de alimentos de maior importância na dieta dos ocidentais. Correspondem a 40-50% das calorias ingeridas, constituindo o principal componente da dieta na forma de amido ou de açúcares simples (Payan, 2004).

O amido, principal forma de armazenamento de hidratos de carbono nas plantas, é formado por dois tipos de polímeros de glucose: amilose e amilopectina (Muralikrishna & Nirmala, 2005; Whitcombe & Lowe, 2007). A amilose é um polímero linear de moléculas de glucose unidas por ligações glucosídicas α -1,4 e corresponde a cerca de 20% do amido da dieta (Muralikrishna & Nirmala, 2005). A amilopectina constitui cerca de 80% do amido da dieta, é um polímero ramificado, possui cadeias principais de glucose unidas por ligações α -1,4 interligadas por ligações α -1,6 a cada 20-25 resíduos de glucose (Muralikrishna & Nirmala, 2005).

Como são moléculas complexas, precisam de ser degradados em moléculas menores capazes de ser absorvidas no tracto gastrointestinal. Os hidratos de carbono dependem de várias enzimas para a sua degradação e posterior absorção (Payan, 2004). Essas enzimas podem ser divididas em três grupos principais de acordo com o seu mecanismo de acção: endo-amilases, exo-amilases e enzimas de desramificação (Muralikrishna & Nirmala, 2005).

Posteriormente, essas moléculas menores penetram nas células e participam nas reacções catabólicas intracelulares de libertação de energia.

3.4.1.2 Caracterização molecular da α -glucosidase

A α -glucosidase enquadrada na classe enzimática EC 3.2.1.20 (Muralikrishna & Nirmala, 2005) é uma exo-amilase e pode cindir as ligações glucosídicas α -1,4 externas da amilose, amilopectina e polissacáridos relacionados, removendo gradualmente maltose ou glucose (Sorensen *et al.*, 2004). A α -glucosidase também é capaz de clivar ligações α -1,6 desde que possuam ligações α -1,4 adjacentes (**Figura 12**). A α -glucosidase humana pertence à família GH 31 (Frandsen & Svensson, 1998). Esta enzima encontra-se ligada à membrana epitelial do intestino delgado e é uma enzima chave na digestão dos hidratos de carbono (Tundis *et al.*, 2010).

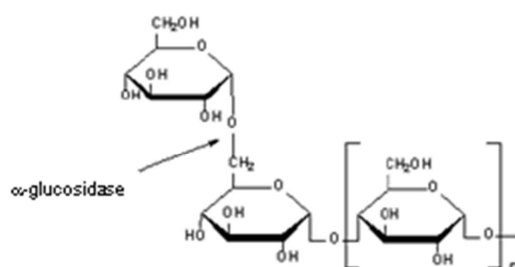


Figura 12 - Região do substrato onde ocorrerá a clivagem decorrente da acção da enzima α -glucosidase (seta preta) (Adaptado de http://www.sigmaaldrich.com/Área_of_interest/Biochemicals/Enzyme_Explorer/Key_Resources/Carbohydrate_Analysis.htm. Acesso em 19-12-2009).

Diversos estudos bioquímicos, sobre estrutura e inibidores, contribuíram para aumentar a área de conhecimento sobre amílases (Strobl *et al.*, 1998; Gerrard *et al.*, 2000; Titarenko & Chrispelels, 2000; Payan, 2004). Recentemente Saqib (2008) construiu o modelo tridimensional da α -glucosidase humana e investigou a interacção com o inibidor competitivo acarbose.

3.4.1.3 Importância da α -glucosidase como alvo biológico

Nos diabéticos o processo de digestão e absorção rápida dos hidratos de carbono não é considerado desejável devido à resposta glicémica elevada

(Englyst & Englyst, 2005). Uma das abordagens terapêuticas para tratar a diabetes na fase inicial é diminuir a hiperglicemia pós-prandial. Isto faz-se retardando a absorção de glucose através da inibição das enzimas que hidrolisam os hidratos de carbono no tubo digestivo. Uma destas enzimas é a α -glucosidase.

Os inibidores desta enzima determinam a redução da taxa de glucose absorvida e a consequente diminuição da glucose pós-prandial (Chiasson *et al.*, 2002).

3.4.1.4Os inibidores da α -glucosidase

A acarbose, miglitol e voglibose têm sido amplamente usados como inibidores da α -glucosidase, porém exercem o controlo da glicemia por um curto prazo e para cerca de 30-40% dos pacientes são inadequadas, devido aos efeitos colaterais como hipoglicemia em doses mais elevadas, problemas hepáticos, acidose láctica e diarreia. (Tundis *et al.*, 2010).

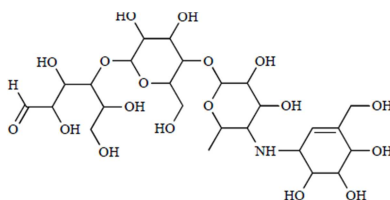


Figura 13 - Estrutura química do pseudotetrasacarídeo acarbose, um inibidor endógeno não proteico da α -glucosidase.

Estes efeitos adversos têm despertado o interesse médico no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, como os flavonóides (Kandra *et al.*, 2005).

Em todo o mundo tem-se recorrido à medicina tradicional para o tratamento da diabetes. As plantas têm sido utilizadas devido à sua efectiva acção, menores efeitos colaterais, e baixo custo (Venkatesh, *et al.*, 2003)

Há diversas publicações com ensaios de extractos brutos vegetais e metabolitos secundários isolados de diversas plantas que possuem actividade inibitória sobre a α -glucosidase (Asano *et al.*, 2001; Hiroyuki *et al.*, 2001; Lee & Lee, 2001; Matsui *et al.*, 2001; Payan, 2004; McDougall & Stewart, 2005; Matsui

et al., 2006; Mukherjee *et al.*, 2006; Mai *et al.*, 2007; Jung *et al.*, 2006 Yin *et al.*, 2008; Tundis *et al.*, 2010).

3.4.2 GLUCOSE-6-FOSFATASE

3.4.2.1 Função

A glucose-6-fosfatase (G-6-Pase) catalisa a desfosforilização da glucose-6-fosfato (G-6-P) no fígado e representa o último passo antes da libertação de glucose livre nos vasos hepáticos, seja ela proveniente da gluconeogénese ou da glicogenólise. É uma enzima que se encontra principalmente no fígado e rins. É nestes tecidos que, durante o período de jejum, a gluconeogénese resulta na libertação de glucose livre para a corrente sanguínea (Schaffingen & Gerin, 2002; Roden & Bernroider, 2003).

Esta enzima é reguladora da manutenção da glicemia em níveis normais (Nordlie *et al.*, 1999). Este facto foi demonstrado em pacientes com a doença de armazenamento do glicogénio tipo 1a e 1b (em que a enzima é deficiente) e causa hipoglicémia entre outros problemas clínicos (Cori & Cori, 1952; Narisawa *et al.*, 1983; Hawkins *et al.*, 1995). Pelo contrário, em animais diabéticos, a actividade catalítica da enzima, conteúdo proteico, e níveis de mRNA estão aumentados e presumivelmente contribuem para a hiperglicémia (Burchell & Cain, 1985; Liu *et al.*, 1994; Lyall *et al.*, 1995; Argaud *et al.*, 1996).

3.4.2.2 Caracterização molecular da glucose-6-fosfatase

Várias tentativas foram feitas para purificar a G-6-Pase, tem-se revelado uma tarefa difícil devido à instabilidade da enzima após a extracção das membranas e ao facto da G-6-Pase só representar cerca de 0.1% da proteína microsomal hepática (Burchell & Burchell, 1982; Speth, & Schulze, 1986).

Contudo pode-se dizer que é um polipéptido de 35 KDa (Speth & Schulze, 1992a).

Em 1975 Arion e colaboradores propuseram para esta enzima um modelo designado “modelo de transporte de substrato”, que é o mais vulgarmente aceite. A G-6-Pase (EC 3.1.3.9) é um sistema multicomponente constituído por uma proteína catalítica e três transportadores. T1 (T1-translocase) para a G-6-P, T2 para o fosfato/pirofosfato e T3 para a glucose (McCormack *et al.*, 2001; Van Schaftingen & Gerin, 2002).

O sítio activo da G-6-Pase está localizado no lúmen do retículo endoplasmático (RE), por isso são necessárias proteínas de transporte para permitir a entrada de G-6-P neste compartimento, assim como a saída da glucose e do fosfato (Pi) (Van Schaftingen & Gerin, 2002; Csala *et al.*, 2006).

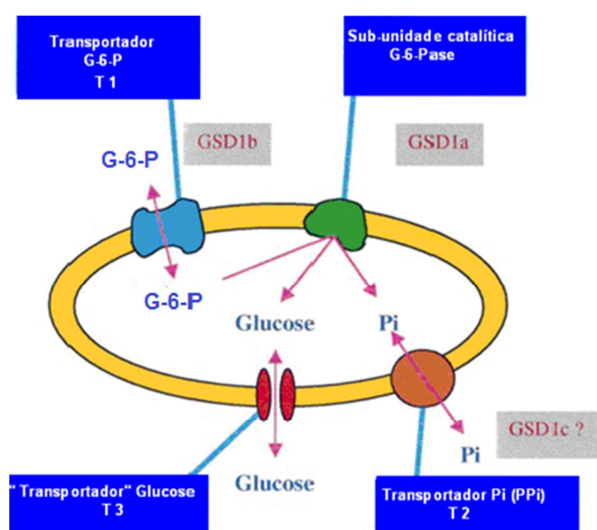


Figura 14 - Representação esquemática do complexo enzimático glucose-6-fosfatase de acordo com o “modelo de transporte de substrato”. T1 – translocase, T2 e T3 – transportadores respectivamente de fosfato inorgânico e glucose. Também estão referidas as diferentes formas de doenças de armazenamento do glicogénio (GSD) causadas por deficiência num destes constituintes. Pi - fósforo inorgânico, G-6-P – glucose-6-fosfato; G-6-Pase – glucose-6-fosfatase (adaptado de Van Schaftingen & Gerin, 2002).

Sabe-se que o transporte de glucose através da membrana do retículo endoplasmático é de alta capacidade e bidireccional, embora a proteína transportadora de glucose ainda não tenha sido identificada (Csala *et al.*, 2006). À semelhança de outras enzimas luminiais a G-6-Pase tem elevada actividade e baixa especificidade se a membrana estiver permeabilizada. Este fenómeno é designado como latência e indica que os fluxos transmembranares (presumivelmente a entrada de glucose e a sua libertação) são limitantes de todo

o processo (Van Schaftingen & Gerin, 2002; Csala *et al.*, 2006). Latência refere-se à porção da actividade enzimática intrínseca que não se manifesta a menos que a estrutura microssomal seja quebrada, sendo os microssomas permeabilizados (Nordlie, 1979). Calcula-se: $100 \times (\text{actividade dos microssomas rompidos} - \text{actividade dos microssomas intactos}) / \text{actividade dos microssomas rompidos}$ (Arion & Walls, 1982).

Em microssomas intactos a actividade fosfohidrolase da G-6-Pase é específica da G-6-P, mas em microssomas sem a membrana intacta, a enzima catalisa uma vasta gama de dadores de grupos fosfato (Arion *et al.*, 1971).

A componente rompida é facilmente quantificada ensaiando a actividade fosfohidrolase com manose-6-fosfato, de baixo K_m , em microssomas não tratados e em microssomas tratados para ficarem totalmente rompidos. Baixas concentrações de manose-6-fosfato só são hidrolisadas pela fosfohidrolase existente nos microssomas rompidos (Arion *et al.*, 1982).

Um modelo alternativo do funcionamento da G-6-Pase baseia-se numa única enzima multifuncional embutida na membrana do rectículo endoplasmático e ligada por canais aos espaços intra e extra-vesiculares, com diferente permeabilidade à glucose (Bertellot *et al.*, 1995).

3.4.2.3 Importância da glucose-6-fosfatase como alvo biológico

Na diabetes tipo 2 a gluconeogénese hepática está significativamente aumentada, contribuindo para a hiperglicémia pós-prandial que se observa. A inibição farmacológica da G-6-Pase tem sido um método proposto para restaurar a sensibilidade à insulina (Rolo & Palmeira, 2006).

3.4.2.4 Os inibidores da glucose-6-fosfatase

A glucose comporta-se como um inibidor não competitivo da G-6-Pase independentemente da presença de detergentes que vão permeabilizar os microssomas.

Em microssomas intactos a inibição por fosfato é não competitiva, mas é competitiva na presença de detergentes, o que indica a presença de um transportador do fosfato (Arion *et al.*, 1980 b).

O vanadato inibe as actividades fosfotransferase e fosfohidrolase, sendo mais potente em microssomas tratados com detergentes (Singh *et al.*, 1981). Este efeito é suprimido por quelantes de metais como o EDTA, possivelmente devido à formação de um complexo EDTA-vanadato (Huyer *et al.*, 1979). Também o tungstato é um potente inibidor, sendo também mais potente em microssomas tratados com detergente (Foster *et al.*, 1998)

A G-6-Pase também é inibida por diversos compostos anfifílicos como ácidos gordos e acil-Co A (Fulceri *et al.*, 1995; Mithieux & Zitoun, 1996; Daniele *et al.*, 1997).

Diversos fosfoinosítidos (difosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato, fosfatidilinositol 4,5-bifosfato e fosfatidilinositol 3,4-bifosfato) são inibidores do tipo competitivo, o que sugere uma ligação ao sítio catalítico (Mithieux *et al.*, 1998).

Há um outro conjunto de inibidores que são característicos do transportador da G-6-P. Estes inibidores da translocase da G-6-P inibem a G-6-Pase em microssomas intactos mas não nos permeabilizados. Também não inibem a actividade pirofosfatase da G-6-Pase. A existência de compostos com este tipo de propriedades é um forte argumento a favor da existência de um transportador da G-6-P (Arion *et al.*, 1998 a). Inibidores deste tipo são:

- DIDS (4,4'-di-isothiocianostilbeno-2,2'-disulfonato) (Zoccoli & Karnovsky, 1980);
- ácido 3-mercaptopicolínico (Foster *et al.*, 1994);
- TLCK (tosil-lisilclorometano) e TPCK (tosilfenilalanilclorometano) (Speth & Schulze, 1992 b);
- ácido clorogénico e seus derivados (Arion *et al.*, 1997; Hemmerle *et al.*, 1997; Arion *et al.*, 1998 b);
- coidaistatinas A e C (Vertesy *et al.*, 2000; Vertesy *et al.*, 2001).
- florizina (Arion *et al.*, 1997).

3.4.3 GLICOGÉNIO FOSFORILASE

3.4.3.1 Função

O fígado é a principal fonte de glucose sanguínea. Numerosos estudos têm demonstrado que a produção hepática de glucose está aumentada na diabetes tipo 2 na fase pós-absorção estando directamente relacionado com a hiperglicémia em jejum (Bollen *et al.*, 1998; Moller, 2001; Radziuk & Pye, 2001; Treadway *et al.*, 2001; Staehr *et al.*, 2001).

A glucose hepática é produzida por duas vias: a glicogenólise (quebra do glicogénio) e a gluconeogénese (síntese de glucose *de novo*).

A libertação de glucose hepática é regulada por um complexo sistema de enzimas. A principal enzima reguladora deste sistema é a glicogénio fosforilase (GP), e só a sua forma fosforilada (GP_a) tem actividade significativa. A enzima GP_a catalisa a reacção em que uma ligação glucosídica, unindo dois resíduos de glucose, sofre o ataque por fosfato inorgânico (Pi), libertando o resíduo terminal não redutor de glucose, como glucose-1-fosfato (G-1-P) a partir do glicogénio. Este processo de glicogenólise tem um papel muito importante na produção hepática de glucose, enquanto no músculo a G-1-P é utilizada para gerar energia metabólica pela via glicolítica (Somsák *et al.*, 2008).

3.4.3.2 Importância da glicogénio fosforilase como alvo biológico

Como já referido a manutenção da glicémia depende em grande parte da função hepática em termos de glicogenólise (quebra do glicogénio) e gluconeogénese (síntese de glucose *de novo*). A glicogenólise pode contribuir para mais de 70% da produção hepática de glucose, além disso uma quantidade considerável da glucose formada na gluconeogénese passa pelo armazenamento em glicogénio antes de sair do hepatócito para a corrente sanguínea (Andersen *et al.*, 1999; McCormack *et al.*, 2001; Treadway *et al.*, 2001; Roden & Bernroider, 2003; Oikonomakos *et al.*, 2005; Somsák *et al.*, 2008).

Assim a inibição hepática da GP tanto pode suprimir a produção de glucose com origem na glicogenólise como na gluconeogénese (Treadway *et al.*, 2001; Oikonomakos *et al.*, 2002; McCormack *et al.*, 2001).

Como forma de combate à diabetes tipo 2, a inibição da enzima glicogénio fosforilase hepática é uma área de investigação importante.

3.4.3.3 Caracterização molecular

Nos mamíferos há três enzimas glicogénio fosforilase (GP) (EC 2.4.1.1) referidas como musculares, cerebrais ou hepáticas, dependendo a sua designação do tecido em que são preferencialmente expressas, e são codificadas por diferentes genes localizados respectivamente nos cromossomas humanos 11, 20 e 14 (McCormack *et al.*, 2001).

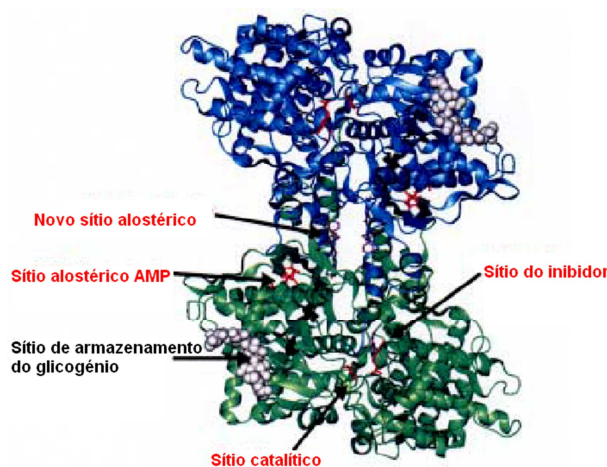


Figura 15 - Representação esquemática do dímero glicogénio fosforilase b (GPb) com indicação dos cinco sítios de ligação: catalítico (activo), inibidor, alostérico, armazenamento do glicogénio e novo sítio alostérico (adaptado de McCormack *et al.*, 2001).

A glicogénio fosforilase é um dímero com duas subunidades idênticas (peso molecular aproximado 97500 Dalton). Todas as isoenzimas se podem converter da forma inactiva (GPb) na forma activa (GPa) através da fosforilação da Ser-14 pela fosforilase quinase. Adicionalmente as GP específicas do cérebro e músculo também são enzimas alostéricas, a forma *b* pode-se encontrar predominantemente no estado T (“Tense”) e a forma *a* no estado R (“Relaxed”). A

GPb apresenta baixa actividade e baixa afinidade para o substrato enquanto a GPa tem elevada actividade e alta afinidade para o substrato (Oikonomakos *et al.*, 2000).

O estado R é promovido pela fosforilação de um resíduo de serina no terminal N e por activadores alostéricos como o AMP (um promotor do estado R que promove a degradação do glicogénio). Os inibidores alostéricos (por exemplo glucose, glucose-6-fosfato e cafeína) retardam a degradação alterando o equilíbrio entre o estado T menos activo e o estado R mais activo (Oikonomakos *et al.*, 2000; Oikonomakos *et al.*, 2002).

Em estudos cinéticos com a fosforilase, foram descobertas diferenças na regulação pelo AMP das isoformas hepática e muscular: ao contrário da GPb hepática a GPb muscular pode ser activada pelo AMP. Partindo de comparações cristalográficas destas duas isoformas foram reveladas diferenças na ligação entre o AMP e o sítio catalítico que estão relacionadas com a diferente sensibilidade à activação pelo AMP (Freeman *et al.*, 2006).

No entanto a GP específica do fígado, contrariamente à GP específica do músculo, é controlada de uma forma muito mais apertada pela fosforilação do que pela regulação alostérica. Os efectores alostéricos têm pouco efeito na actividade da isoenzima hepática (Radziuk & Pye, 2001).

A regulação da GP hepática pela glucose é importante no controlo do balanço hepático de glucose. A glucose inibe a GP hepática ao causar uma alteração conformacional para o estado T. Nos hepatócitos a GPa é rapidamente desfosforilada a GPb inactiva, pela proteína-fosfatase-1 (Freeman *et al.*, 2006). A importância da glucose para a regulação da GP muscular é menos clara, há estudos a referirem que a concentração intracelular de glucose varia entre 0,1 e 0,3 mM no músculo-esquelético humano e de rato (Cline *et al.*, 1998). Neste nível de concentrações a glucose *per se* terá pouco efeito inibidor na GPa do músculo (Freeman *et al.*, 2006).

3 - sítio alostérico do AMP (ou nucleótido): ligam-se aqui vários compostos fosforilados como AMP, ATP, glucose-6-fosfato e BAY W1870 um derivado 1,4-dihidroxipiridina-2,2-dicarboxilato (Zographos *et al.*, 1997);

4 - sítio de armazenamento do glicogénio: local de ligação do glicogénio, de malto-oligosacáridos, e da acarbose, este sítio de ligação à enzima produz porém um efeito inibitório mais fraco do que o da glucose;

5 - novo sítio alostérico: dois derivados do indol ligam-se a este sítio CP-320626 e CP-91149 (Rath *et al.*, 2000). Os estudos usando CP-91149 evidenciam e dão suporte ao conceito de que um inibidor da GP leva também à inibição da gluconeogénese e à concomitante hipótese que uma parte substancial do fluxo da via gluconeogénica também circula através do glicogénio (Martin *et al.*, 1998).

3.5 TRATAMENTO DA DIABETES

3.5.1 TERAPÊUTICA CONVENCIONAL

Em geral, o tratamento inicial da diabetes envolve mudanças no estilo de vida, especialmente relacionadas com a dieta, exercício físico e controle de peso.

Quando o controle glicémico adequado não é atingido com essas medidas, existem várias opções farmacológicas que devem ser escolhidas de acordo com cada caso, visando a redução da glicemia e dos efeitos adversos.

A primeira terapia descrita para o tratamento da diabetes tem sido uma combinação de hipoglicemiantes orais com dieta e exercício (Reddy *et al.*, 1999).

Indicam-se alguns hipoglicemiantes orais vulgarmente usados:

1 – retardam a absorção de hidratos de carbono

inibidores da α -glucosidase – acarbose, miglitol, voglibose (Van de Laar *et al.*, 2005);

2 – reduzem a produção excessiva de glucose no fígado:

inibidores da glucose-6-fosfatase, biguanidas – metformina (Ram, *et al.*, 2003);

inibidores da glicogénio fosforilase, acil-ureias (Oikonomakos *et al.*, 2005);

3 – estimulam a produção de insulina:

tiazolidionas ou glitazonas – troglitazona, rosiglitazona (Diamant & Heine, 2003); sulfonilureias, – glipzida, clorpropamida, glibenclamida (Lebovitz, 1998).

Quando o controle glicémico com os hipoglicemiantes orais não é alcançado, a insulina torna-se a alternativa para os diabéticos do tipo 2 (Fowler, 2008).

Uma grande variedade de agentes farmacológicos actualmente disponíveis tem diversos efeitos secundários como, hipoglicémia, acidose láctica e aumento de peso, segundo Skyler (2004) e hepatotoxicidade segundo Satyanarayana *et al.* (2004).

Há uma grande necessidade de pesquisar novos e mais eficientes agentes antidiabéticos orais. Conhecem-se vários preparados vegetais que exibem actividade redutora da glicemia, pesquisar novas estruturas com actividade antidiabética surge como uma boa perspectiva para o futuro.

3.5.2 PLANTAS MEDICINAIS NO TRATAMENTO DA DIABETES

Existem muitos tratamentos tradicionais da diabetes com plantas. Há um potencial escondido de produtos naturais úteis para controlar a diabetes. Contudo poucas plantas da medicina tradicional foram estudadas de forma científica, apesar de a WHO desde 1980 o recomendar. A WHO (2000) publicou um documento com as linhas gerais das metodologias para pesquisar e avaliar os medicamentos tradicionais.

Para uma revisão sobre plantas medicinais com actividade antidiabética consultar (Jung, 2006).

A hipótese de que os antioxidantes das plantas são responsáveis pelos efeitos promotores da saúde é suportada por algumas experiências com animais, culturas com linhas celulares e estudos químicos *in vitro* (Halliwell *et al.*, 2005; Scalbert *et al.*, 2005). O estudo com animais ou culturas celulares suporta o papel dos flavonóides e outros compostos fenólicos na prevenção da diabetes, doenças neurodegenerativas, cardiovasculares, cancro e osteoporose (Jiang & Dustin, 2003; Neuhouser, 2004; Tsuda *et al.*, 2004; Scalbert *et al.*, 2005; Nichenametla *et al.*, 2006). Contudo a partir destes resultados é difícil prever no homem, o efeito

da ingestão dos polifenóis na prevenção das doenças. Uma das razões é estes estudos terem sido frequentemente conduzidos com doses ou concentrações muito diferentes das observadas em humanos (Scalbert *et al.*, 2005). A concentração plasmática máxima atingida é baixa, geralmente da ordem de uma micro mole, em parte devido à baixa absorção gastrointestinal e rápido metabolismo pelas bactérias do cólon e metabolismo tecidual. Devido à baixa concentração atingida *in vivo* pelos fitoquímicos, tem sido sugerido que a sua acção não é exercida directamente, mas sim por modulação de proteínas (e enzimas), expressão de genes e sinalização de cascatas celulares (Williams *et al.*, 2004; Mandel *et al.*, 2005). *In vivo*, a forma bioactiva de uma planta não é necessariamente o fitoquímico natural, mas conjugados e metabolitos deste. (Spencer *et al.*, 2004; Williams *et al.*, 2004).

3.5.2.1 Flavonóides

Os flavonóides constituem um grupo importante de polifenóis de baixo peso molecular amplamente distribuídos em frutas, plantas e vegetais. São usados por botânicos e taxionomistas para fins de classificação de plantas (Havsteen, 2002).

São compostos formados por uma estrutura comum fenilbenzopirona (C6-C3-C6) com 15 carbonos constituída por dois anéis aromáticos (anéis A e B) ligados por uma cadeia com três carbonos que geralmente estão num anel heterocíclico aromático (anel C). São biosintetizados pela união de duas subunidades, uma proveniente do ácido xiquímico (anel B) e outra da via do acetato (anel A) (Havsteen, 2002; Liu, 2004; Crozier *et al.*, 2009).

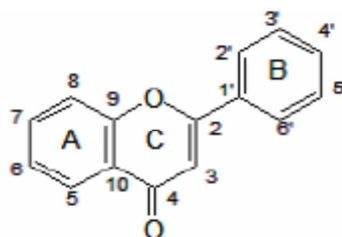


Figura 17 - Fórmula estrutural básica dos flavonóides.

O esqueleto básico dos flavonóides pode ter muitos substituintes. Geralmente os grupos hidroxilo encontram-se nas posições 4'-, 5- e 7-. Os açúcares são muito vulgares, na natureza a maioria dos flavonóides encontra-se na forma glicosilada. O hidrato de carbono mais vulgarmente encontrado é a D-glucose mas outros hidratos de carbono como L-ramnose, glicoramnose, galactose, xilose e arabinose ou combinações destes podem estar presentes.

Enquanto os grupos referidos, aumentam a solubilidade dos flavonóides em água, outros substituintes como os grupos metilo e isopentilo tornam-nos mais lipofílicos (Crozier *et al.*, 2009).

Devido às inúmeras possibilidades de combinações entre as agliconas e os diferentes hidratos de carbono, é grande o número de flavonóides encontrados na natureza (Aherne & O'Brien, 2002; Cazarolli *et al.*, 2008a).

3.5.2.2 Absorção e metabolismo dos flavonóides

Um factor importante na eficiência da absorção intestinal dos flavonóides glicosilados é a metade do açúcar (Hollman *et al.*, 1995). Os flavonóides agliconas por serem hidrofóbicos podem ser transportados através da membrana por difusão passiva. A metade glicosídica por aumentar a hidrofilia da molécula do flavonóide reduz a hipótese de transporte passivo. Isto conduz à teoria de que os flavonóides são absorvidos por transporte activo (Aherne & O'Brien, 2002).

Há evidência indirecta que indica que os flavonóides glicosilados podem ser absorvidos intactos no intestino delgado, através do transportador 1 de glucose dependente do sódio (SGLT-1) (Hollman *et al.*, 1995; Gee *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2005). Contudo um estudo recente em ovócitos de *Xenopus laevis* indicou que o SGLT-1 não transportava os flavonóides e que os flavonóides glicosilados e algumas agliconas têm a capacidade de inibir o transportador de glucose (Kotra & Daniel, 2007).

Por outro lado os flavonóides podem voltar ao lúmen intestinal através de um eficiente transporte de efluxo (Cazarolli *et al.*, 2008a). Tem sido descrito que os flavonóides são cindidos por enzimas específicas antes da absorção, tanto no

lúmen como dentro das células do intestino (hidrolase lactase-florizina, β -glucosidase citosólica) (Cazarolli *et al.*, 2008a).

A via metabólica mais vulgarmente seguida pelos flavonóides parece ser a das reacções de conjugação com ácido glucorónico ou sulfato (Aherne & O'Brien, 2002; Cazarolli *et al.*, 2008a; Crozier *et al.*, 2009). A conjugação ocorre primeiro no epitélio intestinal, posteriormente estes conjugados atingem o fígado onde são metabolizados.

Os flavonóides e os seus metabolitos que não absorvidos no intestino delgado podem ser absorvidos no intestino grosso, sendo aí sujeitos à acção da microflora do cólon, que os quebra levando à produção de ácidos fenólicos e hidroxicinamatos (Cazarolli *et al.*, 2008a; Crozier *et al.*, 2009).

Os metabolitos dos flavonóides (assim como os metabolitos da microflora), agliconas, glicosidos e os metabolitos conjugados que não são absorvidos podem seguir duas vias de excreção, a via biliar ou a via urinária. Os grandes metabolitos conjugados são geralmente eliminados pela bÍlis enquanto os pequenos são preferencialmente excretados pela urina.

Revisões detalhadas da biodisponibilidade dos polifenóis nos humanos foram publicadas por Manach *et al.* (2005) e por Crozier *et al.* (2009).

3.5.2.2.1 Actividade antioxidante

A actividade antioxidante dos flavonóides ou o mecanismo envolvido na sua acção foi amplamente revista (Pieta, 2000; Amic *et al.*, 2007).

A configuração e o número total de grupos hidroxilo são factores determinantes no mecanismo de actividade antioxidante dos flavonóides.

Uma estrutura 3', 4'-catecol no anel B e a presença de grupos hidroxilo potencia a inibição de peroxidação lipídica assim como o efeito captador de radicais livres (Rice-Evans *et al.*, 1996; Dugas Jr. *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2006; Es-Safi *et al.*, 2007).

A presença de glicosidos, o seu número e posição, na estrutura dos flavonóides é outra característica importante dos agentes antioxidantes. Em geral as agliconas são antioxidantes mais potentes que as correspondentes formas

glicosiladas, conforme demonstrado pela daidzeína, genisteína e os seus 7-glicosídeos, canferritina e os glicosídeos de flavonol no chá verde (Burda & Oleszek, 2001; De Sousa *et al.*, 2004).

Os flavonóides também inibem enzimas envolvidas na produção de ROS (Cazarolli *et al.*, 2008a). A inibição das enzimas responsáveis pela produção do anião super-óxido é uma das actividades antioxidantes melhor conhecidas dos flavonóides (Van Hoorn *et al.*, 2002)

Um outro possível mecanismo que contribui para a actividade antioxidante dos flavonóides é a capacidade que apresentam de quelar os metais impedindo-os de participar na produção de radicais livres (Cheng & Breen, 2000; Soczynska-Kordala *et al.*, 2001).

3.5.2.2.2 Actividade anti-hiperglicémica

Os flavonóides estimulam a captação e metabolismo da glucose, regulam a actividade e/ou a expressão de enzimas chave do metabolismo de hidratos de carbono, actuam como secretagogos de insulina ou protectores da função das células β pancreáticas. Ainda, podem actuar como insulinomiméticos contribuindo para melhorar o estado diabético (Cazarolli *et al.*, 2008 b).

Vários estudos têm demonstrado que os flavonóides são absorvidos no intestino e nalguns casos, competem com a glucose, em certos mecanismos de absorção (Shimizu *et al.* 2000; Bhathena & Velásquez, 2002).

Em tecidos de animais tanto *in vivo* como *in vitro*, os polifenóis não glicosilados, têm demonstrado reduzir a absorção de glucose, em condições dependentes do sódio (Zhao *et al.*, 2004; Johnston *et al.*, 2005).

Um outro possível mecanismo de controlo do nível de glucose é a inibição da actividade intestinal da α -glucosidase. A cianidina-3- α -O-ramnosido e a pelargonidina-3- α -O-ramnosido, duas antocianidinas têm demonstrado efeitos inibitórios da absorção de glucose e da actividade da α -glucosidase (Hanamura *et al.*, 2006). Também a luteolina, o canferol a crisina e a galangina têm apresentado o mesmo efeito sobre a α -glucosidase (Matsui *et al.*, 2002). Num estudo efectuado por Kim *et al.* (2000) demonstrou-se que tanto a luteolina como a

amentoflavona, luteolina 7-O-glicosido e a daidzeina eram fortes inibidores da α -glucosidase.

A glucose presente na urina é um dos sintomas dos doentes diabéticos que pode causar complicações graves como a nefropatia. Para reverter esta complicação têm sido estudados vários flavonóides, devido ao seu efeito na reabsorção e excreção renal de glucose (Shetty *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006). Também tem sido referido que os flavonóides afectam os AGE renais e a expressão de proteínas envolvidas na nefropatia diabética (Mao & Gu, 2005; Yamabe *et al.*, 2006).

Diversos investigadores constataram que os flavonóides exercem múltiplas acções na síntese e libertação da insulina Jayaprakasam *et al.* (2005), Lee (2006) e Liu *et al.* (2006) assim como na proliferação das células β (Hii & Howell, 1985; Vessal *et al.*, 2003).

Vários polifenóis têm demonstrado afectar o transporte de glucose e o funcionamento dos receptores de insulina. Zarzuelo *et al.* (1996), Ong & Khoo (1996, 2000), Jorge *et al.* (2004) e Liu *et al.* (2006) demonstraram o efeito estimulador de vários polifenóis no aporte de glucose e na sua utilização. Também foi observada uma significativa redução do transportador de glucose hepática GLUT2, e um aumento da expressão do transportador GLUT4 adipócitario (Jung *et al.*, 2006).

Os flavonoides diminuem a acção da enzima G-6-Pase. Ao suplementar a alimentação de ratos normais e diabéticos com genisteina e daidzeina verificou-se uma significativa redução da G-6-Pase nos grupos tratados com genisteina (Lee, 2006; Park *et al.*, 2006). Também a epigallocatequina 3-galato mimetiza os efeitos da insulina na redução da expressão dos genes da fosfoenolpiruvato carboxiquinase e G-6-Pase (Koyama *et al.*, 2004). Jung *et al.* (2004, 2006) efectuaram estudos com hesperidina e naringina em que verificaram uma acentuada diminuição da actividade da G-6-Pase e fosfoenolpiruvato carboxiquinase hepáticas. Prince & Kamalakkannam (2006) em estudos com rutina e Estrada *et al.* (2005) e Gonzales-Mujica *et al.* (2005) com quercetina, igualmente permitiram concluir que havia diminuição da G-6-Pase.

Também a actividade da enzima glicogénio-fosforilase é diminuída pelos flavonóides. Kato *et al.* (2008) estudou a relação da estrutura de diversos

flavonóides com a actividade inibitória desta enzima. Em ensaios efectuados com ratos verificou-se que a goma de *Artemisia sphaerocephala* melhorava a hiperglicemia, hiperlipidémia e a diabetes tipo 2 (Xing *et al.*, 2009). Também em ensaios efectuados com ratos Kannappan & Anuradha, 2010 verificaram que a naringenina tinha propriedades semelhantes à insulina e prevenia a hiperglicemia e Lv *et al.* (2010) constatou que o astragalosido IV tinha propriedades hipoglicemiantes.

3.5.3 *Genista tenera*

Genista tenera (Jacq. Ex Murr) O. Kuntze pertence à família das *Leguminosae*, é um arbusto endémico da ilha da Madeira, em Portugal.

Este arbusto é composto por ramos curvos e frágeis e as flores são amarelas. Floresce entre Março e Julho. Pode atingir os 2,5 m de altura.

Cresce em solos rochosos, em encostas que vão desde os 50 m de altitude, em relação ao nível do mar, até 1000-1500 m (Jardim & Francisco, 2000).

Segundo a medicina tradicional, a sua parte aérea é usada pela população sob a forma de infusão, para o tratamento da diabetes.

O estudo da composição química da planta revelou a presença de alcalóides e de flavonóides que são os principais metabolitos secundários e marcadores químicos do género *Genista* (Harborne, 1994).

É a produção de metabolitos secundários que dá à *Genista tenera* as suas propriedades medicinais e a torna uma fonte rica em compostos bioactivos.

Em estudos prévios foram identificados dez alcalóides, sendo maioritários a anagirina, lupanina, citisina, N-metilcitisina e N-formilcitisina, também se identificaram dehidrocitisina, 5,6-dehidrolupanina, rombifolina, afilina e termopsina. (Martins *et al.*, 2005).

Também foram identificados vários flavonóides na planta *Genista tenera*. Por FAB-MS/MS, num extracto em éter dietílico identificaram-se as flavonas apigenina, e crisoeriol e as isoflavonas genisteina, 3'-O-metilrobof, 5-O-metilgenisteina e alpinumisofavona (Borges *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2002). Por LC-DAD-ESI-MS e NMR num extracto em acetato de etilo identificaram-se como

compostos maiores, genisteína-8-C-glucosido e genisteína-7-O-glucosido e como composto menor, luteolina-7-O-glucosido e em traços luteolina-7,3'-di-O-glucosido e rutina (Rauter *et al.*, 2005). Por CE-MS num extracto em n-butanol identificou-se a presença de vinte e seis flavonóides, cinco flavonóides agliconas, cinco flavonóides monoglicosidos, dois flavonóides diglicosidos, um flavonóide triglicosido, três monoacetil flavonóides, um diacetil flavonóide e um acetil flavonóide glicosido (Edwards *et al.*, 2006).

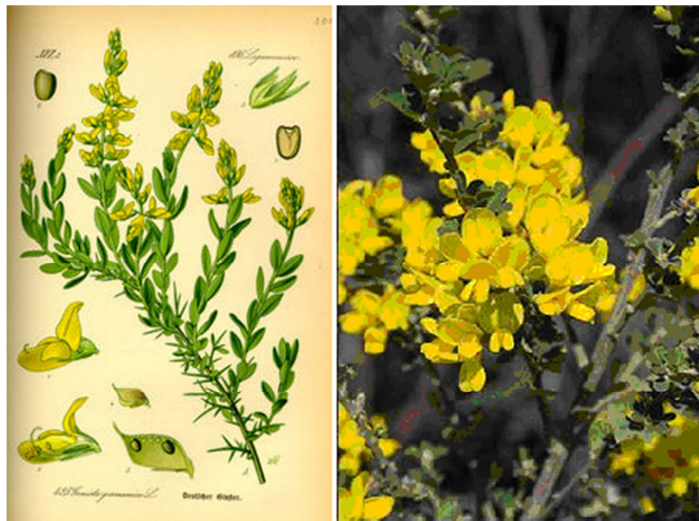


Figura 18 - *Genista tenera* (Jacq. Ex Murr) O. Kuntze

3.6 NUTRACÊUTICOS E ALIMENTOS FUNCIONAIS

“Deixem o alimento ser o remédio e o remédio ser o alimento” referiu Hipócrates 2500 anos antes de Cristo, desconhecedor da pertinência da sua afirmação na actualidade. A ciência da nutrição humana evoluiu da prevenção de deficiências nutricionais, para dar ênfase à manutenção da saúde e redução do risco de se sofrer de doenças crónicas. Tradicionalmente os produtos alimentares eram desenvolvidos para o paladar, aspecto, valor e conveniência do consumidor. O desenvolvimento de produtos tendo em vista a sua aplicação na saúde é um conceito novo que reconhece o papel da dieta na prevenção das doenças e no seu tratamento (Ramaa *et al.*, 2006).

O termo “alimento funcional” foi introduzido pela primeira vez no Japão no meio dos anos 1980 e referia-se a alimentos processados que continham ingredientes que auxiliavam funções específicas do corpo para além de serem nutritivos. Até à presente data o Japão é o único país que possuiu um regulamento aprovado para o processamento de alimentos funcionais. Conhecidos como *Foods for Specified Health Use* (FOSHU), estes alimentos recebem um selo de aprovação do Ministro da Saúde e Bem-Estar do Japão (Sumi, 2008)

Os alimentos funcionais têm sido amplamente definidos como “alimentos similares em aspecto aos alimentos convencionais que são consumidos como parte de uma dieta normal e têm demonstrado benefícios fisiológicos e/ou reduzem o risco de doenças crónicas para além das funções nutricionais básicas” (Clydesdale, 1997). Os FOSHU caem nesta categoria. Os alimentos funcionais são considerados alimentos e demonstram o seu efeito em quantidades que podem ser normalmente consumidas numa dieta normal (Moraes & Colla, 2006). Os alimentos naturais podem ser anunciados e vendidos como alimentos funcionais desde que acompanhados de documentação em que seja demonstrado o novo benefício para a saúde (Kwak & Jukes, 2001).

O termo nutracêutico surgiu em 1989 quando o Dr. Stephen DeFelice o criou da união de nutrição e farmacêutico. Segundo DeFelice pode-se definir nutracêutico como “um alimento ou parte de um alimento que fornece benefícios medicinais e à saúde, incluindo a prevenção e/ou tratamento duma doença.” Os nutracêuticos podem ir desde nutrientes isolados até alimentos geneticamente manipulados (“designer foods”) e produtos herbais (Ramaa *et al.*, 2006). Os nutracêuticos são compostos químicos bioactivos naturais que se caracterizam por promoverem a saúde, prevenirem a doença ou possuírem propriedades medicinais. O âmbito dos nutracêuticos é substancialmente diferente do dos alimentos funcionais. Os nutracêuticos podem contribuir para a prevenção e o tratamento de doenças ao passo que os alimentos funcionais apenas se relacionam com a redução do risco de doença. Em contraste com os nutracêuticos, os alimentos funcionais encontram-se entre os alimentos comuns.

Pensa-se que os nutracêuticos são benéficos no tratamento de várias doenças (Ferrari, 2004; Ramaa *et al.*, 2006). Baseado em estudos epidemiológicos, experiências com animais, ensaios clínicos e estudos

bioquímicos nutricionais, estes suplementos da dieta são correntemente reconhecidos como benéficos para as doenças coronárias, cancro, osteoporose, e outras doenças crónicas e degenerativas como a diabetes, doenças de Parkinson e Alzheimer (Mandel *et al.*, 2005). Isto conduziu a um ímpeto na investigação dos mecanismos de acção de nutracêuticos e dos seus compostos bioactivos.

Os benefícios para a saúde de nutracêuticos com origem em plantas (fitoquímicos) são os mais vulgarmente estudados. Como o stresse oxidativo desempenha um papel central no envelhecimento e nas doenças relacionadas com a idade, os antioxidantes das plantas, como as vitaminas C, vitamina E, carotenoides (β -caroteno, licopeno e luteína) e os compostos fenólicos (flavonoides), têm sido propostos como os componentes destes alimentos vegetais responsáveis pela promoção da saúde (Willcox *et al.*, 2004; Stanner *et al.*, 2004; Sharma, 2006). No caso da diabetes, por esta ser uma doença metabólica em que a restrição e a alteração da dieta são mandatórias, os alimentos funcionais e os nutracêuticos podem assumir uma importância reforçada.

4 METODOLOGIAS E RESULTADOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

As partes aéreas da planta foram colhidas na ilha da Madeira no início do período da floração.

As amostras a analisar foram colhidas por Susana Fontinha e Padre Manuel Nóbrega colaboradores do Jardim Botânico da Madeira, que depositaram um voucher da planta recolhida (MADJ 2508) no herbário desta instituição.

4.1.1 EXTRACÇÃO

Uma amostra da planta (162,71 g) foi seca ao ar à temperatura ambiente na ausência de luz solar directa e foi moída, fez-se a extracção num sistema Soxhlet com 2,5 L de etanol. O extracto foi posteriormente filtrado sob vácuo num funil de Büchner e evaporado até à secura em rotavapor.

O resíduo (40,49 g) foi redissolvido em 150 mL de água quente, filtrado e sucessivamente fraccionado em 150 mL de éter dietílico, 500 mL acetato de etilo e 1 L de n-butanol. Posteriormente levaram-se as fracções à secura sob vácuo.

4.2 ACTIVIDADE ANTI-OXIDANTE

4.2.1 ENSAIO DO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

O método conhecido como ensaio das espécies reactivas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), diz respeito à medição espectrofotométrica do pigmento rosa, produzido pela reacção do ácido tiobarbitúrico com o malondialdeído (MDA)

e outros produtos secundários da peroxidação dos lípidos. Para tentar ultrapassar esta limitação o complexo TBA-MDA foi extraído da mistura de reacção com um solvente orgânico e a quantificação foi feita usando este extracto de n-butanol. A avaliação da absorvência a 532 nm dá uma medida da extensão da degradação dos lípidos.

Os resultados do ensaio TBA-MDA apresentam-se como TBARS expressos como MDA.

Os extractos de *Genista tenera* foram testados e comparados entre si e em comparação com o ácido ascórbico, quanto à sua capacidade como inibidores da oxidação dos lípidos.

O ácido tiobarbitúrico adicionou-se às amostras que tinham o homogeneizado de gema de ovo como meio rico em lípidos. A gema é composta por aproximadamente 50% de água sendo também muito rica em lípidos e proteínas e pobre em hidratos de carbono. Esta composição pode variar bastante, dependendo do tipo de alimentação das aves. Segundo USDA (2000) os principais lípidos da gema são: triglicerídeos (65,5%), seguidos dos fosfolípidos (28,3%), com pequenas quantidades de colesterol (5,2%) e ácidos gordos livres (1%). Os principais ácidos gordos em percentagem do peso da gema são: os ácidos gordos saturados (mirístico (1%), palmítico (23%), esteárico (4%)) e os ácidos gordos insaturados (palmitoleico (5%), oléico (47%), linoleico (16%), linolénico (2%)) (National Research Council, 1976).

As amostras, em quinze ensaios separados, foram aquecidas a 95 °C durante 1 hora para que se desse a formação do complexo TBARS-MDA. Adicionou-se butiril-hidroxitolueno ao meio de reacção para evitar a oxidação dos lípidos da amostra durante a incubação a 95 °C.

4.2.1.1 Reagentes

Os reagentes a seguir indicados foram adquiridos a Sigma, St. Louis, Mo., USA: ácido tiobarbitúrico, butiril-hidroxitolueno, dodecil sulfato de sódio e ácido ascórbico. Todos os outros reagentes utilizados são de grau analítico.

4.2.1.2 Preparação das amostras

Os extractos foram redissolvidos nos respectivos solventes (água, acetato de etilo, n-butanol e éter), para a concentração testada (400 mg/L). Efectuaram-se no total quinze ensaios separados.

4.2.1.3 Procedimento experimental

O procedimento experimental foi conduzido segundo o método de Graça *et al.* (2006) para a determinação de espécies reactivas ao ácido tiobarbitúrico, para determinar a capacidade antioxidante dos extractos de *Genista tenera*. Cada extracto foi ensaiado na concentração de 400 mg/L. Como meio rico em lípidos usou-se um homogeneizado de gema de ovo, uma alíquota de gema de ovo foi preparada na concentração de 10% (p/v) com KCl (1,5%, p/v). Esta mistura foi depois homogeneizada durante 30 segundos, seguindo-se uma ultrasonicação por mais 5 minutos. Num tubo de ensaio colocaram-se 500 µL do homogeneizado a 10% (p/v) e 100 µL de extracto solubilizado no respectivo solvente (água, acetato de etilo, n-butanol e éter), e fez-se o volume de 1 mL com água destilada. De seguida adicionou-se 1,5 mL de ácido acético a 20% (pH 3,5), 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,8% (p/v) em 1,1% (p/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 50 µL de butiril-hidroxitolueno a 4%. A mistura foi agitada num vortex e aquecida a 95°C durante uma hora. Após arrefecimento à temperatura ambiente, adicionou-se a cada tubo 5 mL de n-butanol, agitaram-se os tubos num vortex e centrifugaram-se a 3000 rpm durante 10 minutos. Mediu-se a absorvência do sobrenadante a 532 nm num espectrofotómetro Hitachi U-2001. Para a determinação do branco (para permitir a absorvência da solução do extracto), o homogeneizado de gema de ovo foi substituído por água destilada e seguiu-se o procedimento anteriormente descrito.

Fez-se um controlo negativo com 100 µL de água, acetato de etilo, butanol ou éter em vez do extracto. O ácido ascórbico foi usado como controlo positivo e foi testado na concentração de 0,1% no meio de reacção final do ensaio. Cada extracto ou controlo foi medido em quinze ensaios separados. O índice

antioxidante foi calculado como uma percentagem do controlo pela seguinte fórmula:

$$\text{Índice Antioxidante \%} = (\text{Ac} - \text{Aa}) / \text{Ac} \times 100$$

Onde Aa é a diferença da absorvência a 532 nm entre o branco e a amostra; Ac é a absorvência do controlo totalmente oxidado.

Tabela 1 - Esquema de pipetagem dos diferentes compostos intervenientes no ensaio de TBARS-MDA.

	Controlo negativo	Controlo positivo (ácido ascórbico)	Extractos (400mg/L)	Branco Reagentes
Homogeneizado gema ovo (10%)	500 µL	500 µL	500 µL	
Extractos (400mg/L)			100 µL	
Ácido ascórbico (40mg/L)		100 µL		
H2O	400 µL	400 µL	400 µL	900 µL
Solvente do extracto	100 µL			100 µL
Ácido acético (20% pH 3,5)	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL
TBA (0,8%)	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL
BHT (4%)	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
Agitar				
Incubar 95 °C/1 hora				
Arrefecer à temperatura ambiente				
n-Butanol	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL
Agitar				
Centrifugar 3000 rpm/10 minutos				

4.2.1.4 Resultados e discussão

Ao pesquisar a influência dos extractos de *Genista tenera* na inibição do stresse oxidativo observou-se que a mistura de reacção apresentava uma coloração não característica do aducto MDA-TBA (ver **figuras 19 e 20**). No início do ensaio as soluções apresentavam cor amarela, em vez de cor-de-rosa, cerca de uma hora depois ficavam cor-de-laranja e ao fim de várias horas apresentavam um tom vermelho. Adicionalmente, analisando o espectro de absorvências das misturas que continham os extractos de *Genista tenera* a vários comprimentos de onda, tornou-se evidente que o cromogéneo formado tinha um máximo de

absorvência a 455 nm, enquanto o máximo de absorvência do aducto TBA-MDA é a 532 nm

A taxa de formação da banda de absorção a 530-532 nm depende do tipo de aldeído e das condições da reacção (Gusmán-Chosas *et al.*, 1997).

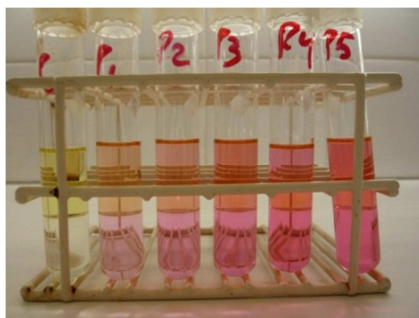


Figura 19 – Tubos com as fases orgânica (n-butanol) e aquosa do ensaio de quantificação do complexo TBA-MDA. Evidencia-se o rápido desenvolvimento da cor amarela/laranja.



Figura 20 – Células para leitura em espectrofotómetro com o extracto butanólico. Observa-se uma cor que não é característica do aducto TBA-MDA.

Não foi viável quantificar os produtos de lipoperoxidação por este método devido a uma alteração da coloração característica do complexo MDA-TBA, existem algumas possíveis explicações. Também Burits *et al.* (2001) se refere a um ensaio com este desenvolvimento de cores.

Segundo Gusmán-Chosas *et al.* (1997) a reacção entre MDA e TBA dá origem a um produto de reacção com uma cor rosa claro e uma banda de absorção estável, intensa e estreita a 532 nm.

Mas, quando reagem quantidades equimoleculares de TBA e MDA, primeiro forma-se um produto intermediário (aducto incolor) que só é estável numa atmosfera inerte (N₂). Em condições aeróbias este aducto incolor dá origem a uma mistura de cor amarela e vermelha, sendo o vermelho predominante. A cor laranja também aparece com excesso de TBA e condições aeróbias. A reacção de alque-2-enais de cadeia simples com quatro a oito carbonos, com o TBA,

produz pigmentos amarelos que têm o máximo de absorção a 455 nm, laranja, a 495 nm e vermelhos a 532 nm. A formação destes pigmentos depende das condições da reacção. A reacção dos aldeídos com TBA em excesso e a 100 °C produz o pigmento amarelo após 15 minutos, o laranja após 2-6 horas e o vermelho entre 25-26 horas. A formação destes pigmentos requer a existência de oxigénio molecular (Kosugi *et al.*, 2004).

Por este motivo não se terá conseguido fazer a determinação a 532 nm no fim da fase de extracção com n-butanol.

Mas mesmo que pequenas quantidades de MDA estejam presentes podem-se formar grande quantidade do aducto MDA-TBA. Isto porque durante o ensaio os peróxidos lipídicos se quebram para libertar MDA. Ao homogeneizado de gema de ovo deveria ter-se adicionado um composto com ferro, incubar previamente a mistura durante uma hora antes do aquecimento a 100 °C, (Jia *et al.*, 2010). O ferro não é necessário para a quebra dos peróxidos lipídicos mas sim para a reactividade do TBA. Isto pode estar relacionado com a capacidade que o ferro tem de decompor os peróxidos lipídicos com libertação de radicais peróxilo, que são os precursores do MDA. Estes radicais quando libertados podem iniciar posteriores peroxidações durante a fase de aquecimento do ensaio. Na ausência de ferro e de peróxidos lipídicos, os ácidos gordos não sofrem uma peroxidação significativa, durante a fase de aquecimento do teste (Gutteridge & Quinlan, 1983). Também por este facto não terá sido possível fazer as determinações espectrofotométricas.

4.2.2 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR (MTT)

A viabilidade celular foi estudada pelo método do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolio), que se baseia na clivagem do sal de tetrazólio pelas desidrogenases mitocondriais de células viáveis, dando origem a um produto (formazam) que se acumula no interior das células pois não é capaz de atravessar a membrana celular. Ao solubilizar as células com DMSO o formazam liberta-se e pode ser detectado de forma fácil por um método colorimétrico. A capacidade das células reduzirem o MTT dá uma indicação da

integridade e actividade mitocondrial, o que por seu lado pode ser interpretado como uma medição da viabilidade celular. O ensaio a seguir descrito está adaptado para ser usado com culturas celulares em fase de crescimento. A determinação da sua capacidade para reduzir o MTT a formazan, após exposição aos extractos a testar e à radiação UV, quando comparada com o controlo permite avaliar a capacidade antioxidante (ECVAM, 1990).

Para se fazerem culturas celulares é necessário manter a temperatura a 37 °C e o pH do meio entre 7,0-7,2. O tipo de sub-produtos do metabolismo celular tende a baixar o pH do meio, devendo então usar-se um tampão, para evitar o pH ácido. O mais utilizado é um sistema bicarbonato/CO₂ que requer o fornecimento de CO₂ da estufa e o bicarbonato do meio de cultura MEM. Este meio também contém sais minerais, aminoácidos, vitaminas e glucose (Alberton *et al.*, 2006).

4.2.2.1 Reagentes

Os reagentes a seguir indicados foram adquiridos a Sigma, St. Louis, Mo., USA: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolio (MTT), DMSO (dimetil sulfóxido), MEM (*Minimum Essential Medium*), FCS (soro fetal de vitelo), tripsina, PBS (tampão fosfato salino), solução de antifúngico (anfotericina B); solução de antibióticos (penicilina e estreptomicina). As células H-4-II-E (hepatoma de rato) foram compradas a *European Collection of Cell Cultures*. Todos os reagentes utilizados são de grau analítico.

4.2.2.2 Cultura de células

As células H-4-II-E foram semeadas em frascos de cultura de tecidos de 75 cm², em meio MEM suplementado com 10% de FCS e 1% de antibióticos contendo penicilina (10 000 U/mL) e estreptomicina (10 mg/mL) e também 0,1% de antifúngico, anfotericina B (250 µg/mL). As células multiplicaram-se livremente até 80-90% de confluência a 37°C numa atmosfera húmida com 10% de CO₂ (câmara de incubação Shel Lab CO₂ Séries). O meio foi mudado a cada 3 dias.

Quando as culturas estavam 80-90% confluentes as células H-4-II-E foram lavadas com 10 mL PBS, destacadas com 1 mL tripsina, contadas e suspensas em meio MEM para serem semeadas em placas de 96 poços na densidade de 5×10^4 /mL. Executaram-se todas as sementeiras numa câmara de fluxo laminar com segurança biológica, classe II tipo A/B3, (Steril Gard - Baker Company).

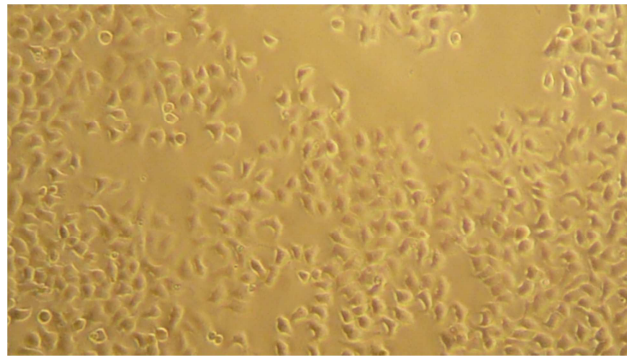


Figura 21 – Células H-4-II-E (hepatócitos de rato). Ampliação 200 X.



Figura 22 – Sala do laboratório de biociências onde decorreu o trabalho analítico. Visualiza-se a câmara de fluxo laminar com segurança biológica, classe II tipo A/B3, (Steril Gard-Baker Company) e a câmara de incubação (Shel Lab CO₂ Series).

4.2.2.3 Preparação das amostras

Antes de iniciar o ensaio, as amostras dos extractos foram dissolvidas com dimetil sulfóxido (DMSO) na concentração de 20 mg/mL. Efectuaram-se pelo menos cinco ensaios separados.

4.2.2.4 Procedimento experimental

Conforme referido anteriormente semearam-se placas de 96 poços com 100 μL de meio MEM com células H-4-II-E na densidade de $5 \times 10^4/\text{mL}$. Cultivaram-se durante 24 h a 37 $^{\circ}\text{C}$ numa atmosfera húmida com 10% de CO_2 (câmara de incubação Shel Lab CO_2 Series).

Como controlo positivo usou-se uma solução de ácido ascórbico (20 mg/mL) e como controlo negativo células em meio MEM sem adição de outros compostos. Como branco usou-se meio MEM sem células. Para testar a possível interferência do solvente dos extractos, adicionou-se dimetil sulfóxido (DMSO) ao meio MEM com células H-4-II-E.

No segundo dia às 24h de cultura adicionaram-se 5 μL de cada extracto ou controlo e incubaram-se as placas durante mais 1 h. Metade das placas foi exposta a radiação de uma lâmpada de UV ($\lambda = 257,7 \text{ nm}$ Philips TUV G15T8 UVC) durante 5 minutos, tendo-se voltado novamente a colocar na estufa.

No terceiro dia às 48 h de cultura adicionaram-se 10 μL de solução de MTT (10mg/mL) a cada poço. Após 4 h de incubação inverteram-se rapidamente as placas para remover o meio. Lavaram-se os poços com PBS a 5 $^{\circ}\text{C}$. Para solubilizar os cristais de formazan formados adicionaram-se 100 μL de DMSO a cada poço e colocaram-se as placas lado a lado num agitador orbital de bancada, durante 20 minutos. As leituras efectuaram-se num leitor de microplacas a 492 nm e 630 nm (Beijin Perlong New Technology DNM-9602) A solução de formazan tem um máximo de absorção entre 540-570 nm mas tem uma boa absorvência a 490nm, e portanto este filtro foi utilizado já que o filtro de 540 nm não estava disponível por impossibilidade técnica. A 620-650 nm a absorvência é devida aos fragmentos celulares e às imperfeições da placa, pelo que este comprimento de onda é utilizado como leitura da absorvência inespecífica (leitura em branco). A leitura final reportada pelo equipamento é o resultado de: absorvência a 492 nm - absorvência a 630 nm.

A percentagem de células que sobreviveram é dada por: (absorvência das células tratadas/ absorvência das células controlo) x 100

Tabela 2 – Esquema do ensaio de viabilidade celular (MTT) em placas de 96 poços Fez-se o dobro das placas, sendo metade das placas irradiadas e a outra metade não irradiada.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		Ac ascórbico.					Ext água					
C		Ac ascórbico.					Ext água					
D		Ac ascórbico.					Ext água					
E		DMSO					Ext acetato etilo					
F		DMSO					Ext acetato etilo					
G		DMSO					Ext acetato etilo					
H												

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		Ext éter					Ext butanol					
C		Ext éter					Ext butanol					
D		Ext éter					Ext butanol					
E		MEM										
F		MEM										
G		MEM										
H												

Os retângulos coloridos referem-se aos poços que contêm MEM e células, mas não são utilizados no ensaio. Ext.- Extracto; MEM- *Minimum Essential Medium*; DMSO-Dimetil sulfóxido.

4.2.2.5 Análise estatística

A análise de toda a informação colhida nesta pesquisa foi feita de forma descritiva. Para variáveis quantitativas calcularam-se médias e desvios padrão.

A homogeneidade de variâncias testou-se pelo método de Levene.

A análise inferencial usada com o intuito de confirmar ou refutar evidências encontradas na análise descritiva foi o teste t de Student no nível de confiança de 95%.

Todos os cálculos foram executados usando o Microsoft® Excel 2010.

4.2.2.6 Resultados e discussão

No modelo experimental usado induziu-se o stresse oxidativo e a morte celular expondo as células H-4-II-E a radiação UV ($\lambda = 257,7$ nm).

A viabilidade comparativa entre células H-4-II-E não irradiadas e irradiadas está representada na **tabela 3** e **figura 23**.

Tabela 3 – Viabilidade comparativa entre células não irradiadas e irradiadas.

	Não Irradiadas		Irradiadas	
	Absorvência média	Desvio padrão	Absorvência média	Desvio padrão
MEM	0,012	0,002	0,009	0,003
Células	0,040	0,021	0,015	0,003

A absorvência foi determinada medindo o formazam após 4h de incubação das células com MTT (concentração final 0,870 μ g/mL). MEM - (meio de cultura); células - (células H-4-II-E). As médias são resultado de pelo menos 5 ensaios separados.

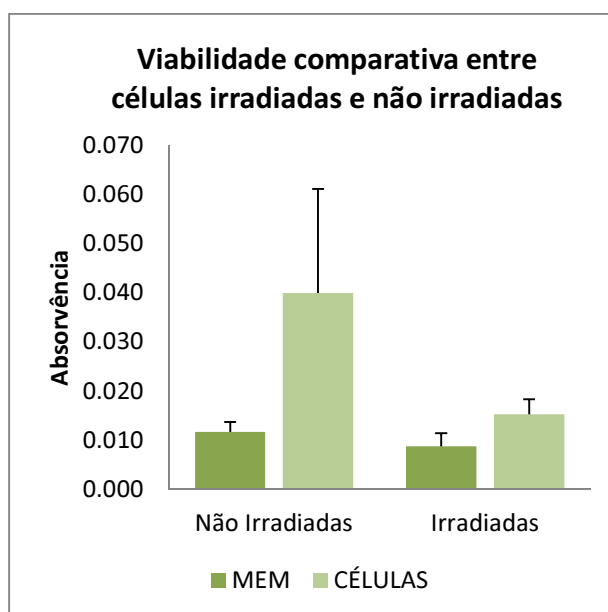


Figura 23 – Viabilidade comparativa entre células não irradiadas e irradiadas. A absorvência foi determinada medindo o formazam após 4h de incubação das células com MTT (concentração final 0,870 μ g/mL). Cada valor é expresso como média + desvio padrão, num total de 5 ensaios realizados.

Pode-se concluir que o modelo experimental utilizado está a funcionar pois a absorvência das células irradiadas (0,015) é menos de metade da absorvência das células não irradiadas (0,040).

O efeito dos quatro extractos de *Genista tenera* e do controlo positivo (ácido ascórbico) no crescimento celular de células não irradiadas encontra-se representado na **tabela 4** e na **figura 24**.

Tabela 4 - Influência dos diferentes extractos de *Genista tenera* no crescimento das células não irradiadas.

	Células não irradiadas		
	Absorvência Média	Viabilidade %	Desvio padrão %
Células	0,040	100,00	52,97
Ác Ascórbico	0,042	104,23	22,63
Ext água	0,041	96,98	29,14
Ext acetato etilo	0,050	122,33	37,78
Ext butanol	0,036	70,94	35,55
Ext éter	0,039	109,89	55,34

Células H-4-II-E não irradiadas (controlo negativo) e ácido ascórbico (controlo positivo). Ext – Extracto.

A % de viabilidade celular foi determinada medindo o formazam após 4h de incubação das células com MTT (concentração final 0,870µg/mL). Concentração dos extractos estudados 400 mg/L. Concentração do controlo positivo (ácido ascórbico) 400mg/L. As médias são resultado de pelo menos 5 ensaios separados.

Na coluna da viabilidade em percentagem onde se coloca * assinala-se diferença estatisticamente significativa entre o valor indicado e o valor obtido para as células não irradiadas sem adição de compostos (teste t de Student, $p < 0,05$).

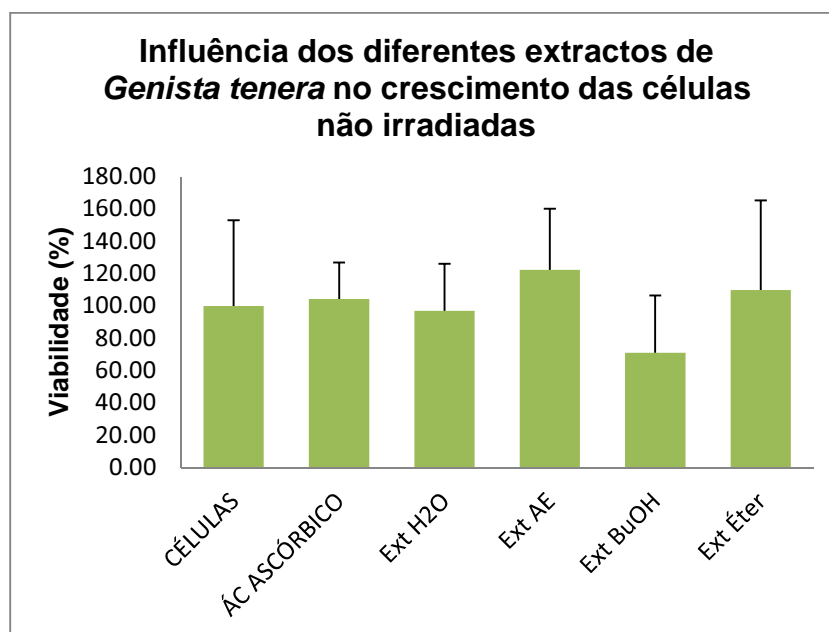


Figura 24 – Influência dos diferentes extractos de *Genista tenera* no crescimento das células não irradiadas. A viabilidade foi determinada *in vitro* em células H-4-II-E e o ácido ascórbico (400 mg/L) foi usado como controlo positivo. Cada valor é expresso como média + desvio padrão. As médias são resultado de pelo menos 5 ensaios separados. Nas colunas da viabilidade em % onde se coloca * assinala-se diferença estatisticamente significativa entre o valor indicado e o valor obtido para as células não irradiadas sem adição de compostos (teste t de Student, $p < 0,05$). Ext – Extracto.

Também é possível verificar (tabela 4 e figura 24) que os extractos de *Genista tenera* modulam o crescimento celular normal. Acredita-se que isso se deve aos flavonóides presentes nesses extractos, que possuem actividade

antioxidante, bloqueando os radicais livres e protegendo as células da lipoperoxidação e do envelhecimento (Ferguson, 2001). As propriedades indutoras do crescimento celular são evidentes no extracto de *Genista tenera* em acetato de etilo (122,33 % viabilidade) e também se evidenciam no extracto em éter (109,89% viabilidade) quando comparadas com as células H-4-II-E sem adição de extractos (100% viabilidade).

Pelos resultados do teste t de Student no nível de confiança em estudo (95%), pode-se inferir que as diferenças de viabilidade celular que os extractos apresentam não são estatisticamente significativas em relação ao controlo negativo (células não irradiadas sem adição de compostos).

O efeito citoprotetor contra as lesões causadas pela irradiação com UV conferido pelos extractos em estudo de *Genista tenera*, assim como pelo controlo positivo (ácido ascórbico) e para o controlo negativo (MEM com células) está representado, em termos de percentagem de viabilidade celular, na **tabela 5** e na **figura 25**.

Tabela 5 – Viabilidade em percentagem das células irradiadas expostas a diferentes extractos de *Genista tenera*.

	Células não irradiadas		Células irradiadas	
	Viabilidade %	Desvio padrão %	Viabilidade %	Desvio padrão %
Células	100,00	52,97	38,18	7,73
Ác Ascórbico	104,23	22,63	45,05	26,35
Ext água	96,98	29,14	59,34*	21,07
Ext acetato etilo	122,33	37,78	67,70*	39,57
Ext butanol	70,94	35,55	67,82*	22,36
Ext éter	109,89	55,34	87,80*	52,77

Células H-4-II-E (controlo negativo) e ácido ascórbico (controlo positivo). Ext – Extracto. A % de viabilidade celular foi determinada medindo o formazam após 4h de incubação das células com MTT (concentração final 0,870µg/mL). Concentração dos extractos estudados 400 mg/L. Concentração do controlo positivo (ácido ascórbico) 400mg/L. As médias são resultado de pelo menos 5 ensaios separados.

Na coluna da viabilidade em % das células irradiadas onde se coloca * assinala-se diferença estatisticamente significativa entre o valor indicado e o valor obtido para as células irradiadas sem adição de compostos (teste t de Student, $p < 0,05$).

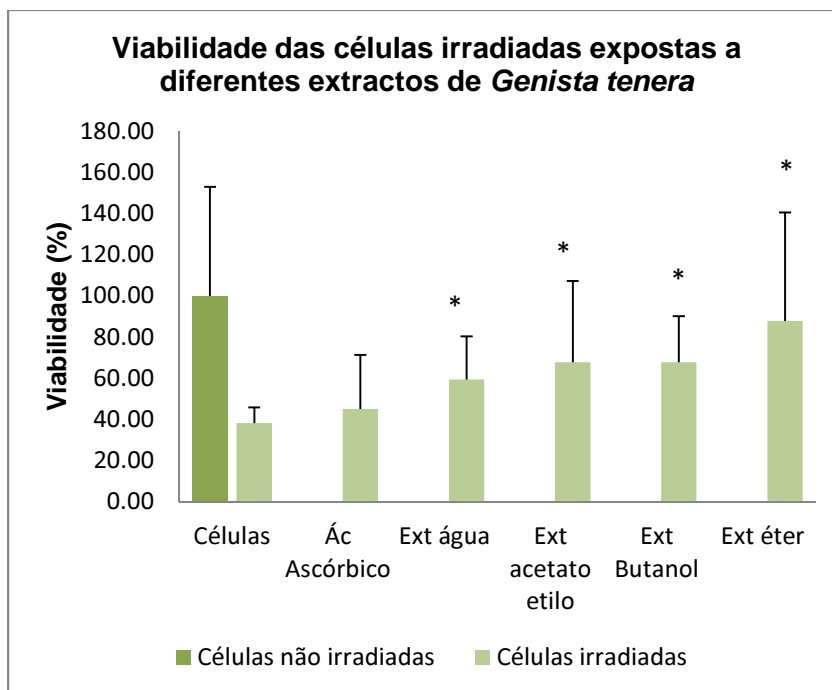


Figura 25 – Viabilidade celular em % proporcionada pelos extractos de *Genista tenera* em água, butanol, acetato de etilo e éter (400 mg/L) após indução do stresse oxidativo por radiação UV ($\lambda = 257,7$ nm). A viabilidade foi determinada *in vitro* em células H-4-II-E e o ácido ascórbico (400 mg/L) foi usado como controlo positivo. Cada valor é expresso como média + desvio padrão. As médias são resultado de pelo menos 5 ensaios separados. Nas colunas onde se coloca * assinala-se diferença estatisticamente significativa entre o valor indicado e o valor obtido para as células irradiadas sem adição de compostos (teste t de Student, $p < 0,05$). Ext – Extracto.

A partir dos resultados do ensaio *in vitro* de viabilidade celular pode-se concluir que houve inibição do stresse oxidativo induzido por radiação UV ($\lambda = 257,7$ nm) pelos extractos de *Genista tenera* em água (59,34 % viabilidade), acetato de etilo (67,70 % viabilidade), butanol (67,82 % viabilidade) e éter (87,80 % viabilidade). Para todos os extractos em estudo as percentagens de viabilidade celular foram superiores à do controlo positivo (45,05 % viabilidade). Apresentando o extracto em éter seguido dos extractos em butanol e acetato de etilo as melhores percentagens de inibição do stresse oxidativo.

Pelos resultados do teste t de Student no nível de confiança em estudo (95%), pode-se inferir que os extractos apresentam diferenças estatisticamente significativas do controlo negativo (células irradiadas sem adição de compostos) assinalados com o expoente (*), conforme observável na **tabela 5** e na **figura 25**. O ácido ascórbico não apresenta diferença estatisticamente significativa do controlo negativo, provavelmente devido ao efeito da variabilidade experimental.

Não há um método de ensaio da capacidade antioxidante amplamente aceite como único e aplicável à grande variedade de matrizes e compostos a analisar (Ozyurt *et al.*, 2007).

O MTT é um método relativamente simples de executar, rápido, sensível e económico quando comparado com outros usados para determinar a capacidade antioxidante dos extractos de plantas. Requer pouca quantidade de material para a detecção e quantificação da actividade antioxidante dos extractos das plantas (ECVAM, 1990; Muraina *et al.*, 2009). Este método pode ser empregue como uma primeira pesquisa da capacidade antioxidante dos extractos das plantas, antes de se efectuar um estudo detalhado do mecanismo antioxidante (Muraina *et al.*, 2009).

4.3 TESTES ENZIMÁTICOS

4.3.1 ENSAIO DA ACTIVIDADE INIBITÓRIA DA ENZIMA

4.3.2 α -GLUCOSIDASE

A enzima α -glucosidase pode cindir as ligações glucosídicas α -1,4 externas de polissacáridos, removendo gradualmente glucose.

Neste ensaio usou-se como substracto a maltose e quantificou-se a glucose libertada através de uma reacção com as enzimas glucose-oxidase e peroxidase o que origina a um produto corado rosa.

4.3.2.1 Reagentes

Os reagentes a seguir indicados foram adquiridos a Sigma, St. Louis, Mo., USA: fracção acetónica de intestino de rato, tampão maleato 0.1 M (pH 6.9), maltose, *kit* de diagnóstico para determinação de Glucose (GO), acarbose. Todos os reagentes utilizados são de grau analítico.

4.3.2.2 Preparação das amostras

Antes de iniciar o ensaio, as amostras dos extractos foram dissolvidas com dimetil sulfóxido (DMSO) na concentração de 20 mg/mL. Procedeu-se em seguida a uma diluição de 10 µL das amostras com 90 µL de tampão maleato 0,1M (pH 6,9). A concentração testada foi 400 mg/L. Efectuaram-se no total cinco ensaios separados.

4.3.2.3 Procedimento experimental

A solução enzimática foi preparada com fracção acetónica de intestino de rato, como fonte de α -glucosidase.

Homogeneizaram-se cinquenta miligramas da fracção acetónica de intestino de rato com 10 mL de tampão maleato 0,1M a pH 6,9 e centrifugou-se a 6000xg durante 20 minutos a 4°C, numa centrífuga Sigma 2K15. O sobrenadante obtido antes do ensaio, foi usado como solução enzimática na reacção da α -glucosidase. O procedimento experimental foi conduzido segundo o método modificado de Mai *et al.* (2007): 50 µL da solução enzimática, foram pré-incubados a 37°C durante 10 minutos, com 50 µL de solução do extracto e 100 µL de tampão maleato 0.1 M (pH 6,9). A reacção enzimática foi depois iniciada adicionando 50 µL de solução substracto de maltose (1% p/v em tampão maleato pH 6,9). Deixou-se prosseguir a reacção enzimática a 37°C durante 30 minutos, sendo terminada depois por aquecimento a 100°C durante 5 minutos. Colocou-se seguidamente a mistura de reacção num banho de gelo. Após alguns ensaios exploratórios foi retirado o passo de adição de polivinilpirrolidona por interferir com os resultados (dados não incluídos no trabalho).

A glucose gerada foi quantificada com um *kit* de diagnóstico (Glucose (GO) Assay Kit, Sigma, St. Louis, Mo., USA) a 540 nm num espectrofotómetro Hitachi U-2001. Por acção da glucose-oxidase a glucose é oxidada a ácido glucónico e peróxido de hidrogénio. Na presença de peroxidase o peróxido de hidrogénio reage com a o-dianisidina formando-se um produto corado. A o-dianisidina oxidada reage com o ácido sulfúrico para formar um produto corado mais estável. A intensidade da cor rosa, medida a 540 nm é proporcional à concentração de glucose.

Como controlo negativo utilizaram-se 150 µL de tampão maleato 0,1 M (pH 6,9) em vez do extracto. Para a determinação do branco sem enzima, a solução de enzima foi substituída por 50 µL de tampão maleato 0,1M (pH 6,9) e 5 µL de DMSO, seguindo-se o procedimento anteriormente descrito. A acarbose foi usada como composto de referência de inibição e foi testada na concentração de 400 mg/L. Para cada extracto ou controlo foram efectuados 5 ensaios separados. A concentração final de DMSO nos ensaios foi 2%. A taxa de inibição da α-glucosidase foi calculada como uma percentagem do controlo pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = (Ac - Aa) / Ac \times 100$$

Aa é a diferença da absorvência a 540 nm entre o branco e a amostra; Ac é a absorvência do controlo. A concentração final do extracto ou do composto de referência, para a actividade inibitória da α-glucosidase foi determinada sob as condições do ensaio e foi expressa em mg/L.

Tabela 6 – Breve esquema elucidativo da preparação das soluções usadas no ensaio de inibição de actividade da enzima α-glucosidase.

Tampão:	Extractos:	Acarbose:	α-glucosidase:
Usar tampão Tris base 0.1 M (pH 6.9)	20 mg/mL em DMSO	2 mg/mL em Tampão	5 mg/mL Tampão
	↓	↓	↓
	10 µL Extracto + 90 µL Tampão	50 µL no ensaio [400mg/L]	Homogeneizar e Centrifugar 6000xg /4 °C/ 10 min
	↓		
	50 µL no ensaio [400mg/L]		Usar sobrenadantes para fazer a determinação da glucose.

Tabela 7 – Esquema de pipetagem dos diferentes compostos intervenientes no ensaio de inibição de actividade da enzima α -glucosidase.

	Branco	Enzima Livre	Acarbose	Extractos
Extractos				50 μ L
Acarbose			50 μ L	
Tampão	195 μ L	145 μ L	95 μ L	100 μ L
DMSO	5 μ L	5 μ L	5 μ L	-----
Enzima	-----	50 μ L	50 μ L	50 μ L
Incubar 37 $^{\circ}$ C/10 min				
Maltose	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μ L
Incubar 37 $^{\circ}$ C/10 min				
Banho Fervente 100 $^{\circ}$ C/5 min				
Centrifugar 4 $^{\circ}$ C/10 min				
Quantificar glucose no sobrenadante (Glucose (GO) Assay Kit, Sigma, St. Louis, Mo., USA)				

4.3.2.4 Análise estatística

A análise de toda a informação colhida nesta pesquisa foi feita de forma descritiva. Para variáveis quantitativas calcularam-se médias e desvios padrão.

A homogeneidade de variâncias testou-se pelo método de Levene.

A análise inferencial usada com o intuito de confirmar ou refutar evidências encontradas na análise descritiva foi a análise de variância (ANOVA *one-way*) com um factor fixo seguida do teste *a posteriori* de Tukey. As absorvências foram transformadas usando raiz quadrada, para normalizar os dados antes de efectuar a análise estatística. Todos os cálculos foram executados usando o Microsoft® Excel 2010, a análise estatística foi executada com o programa *Statistica* versão 6,0 no nível de significância de 5%.

4.3.2.5 Resultados e discussão

A percentagem de inibição da enzima α -glucosidase para os quatro extractos de *Genista tenera* em estudo, assim como para o contolo positivo, acarbose e para o controlo negativo está representada na **tabela 8** e na **figura 26**.

Tabela 8 – Actividade da enzima α -glucosidase em presença dos extractos de *Genista tenera*

	Absorvência Média	Actividade %	Desvio Padrão %
Controlo negativo	0,258 ^d	100,00	12,8
Controlo positivo	0,076 ^b	17,39	5,03
Extracto água	0,175 ^c	63,42	4,14
Extracto acetato etilo	0,042 ^a	2,36	11,28
Extracto butanol	0,038 ^a	0,97	10,95
Extracto éter	0,154 ^c	50,21	0,85

Actividade enzimática expressa em percentagem da actividade da enzima sem inibidor. A actividade enzimática foi determinada medindo a glucose libertada. Concentração dos extractos 400 mg/L. A actividade foi determinada usando maltose como substracto e a acarbose como controlo positivo. A média das absorvências é o resultado de um total de 5 ensaios realizados. Diferentes índices (a-d) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) quando comparadas pelo teste *a posteriori* de Tukey.

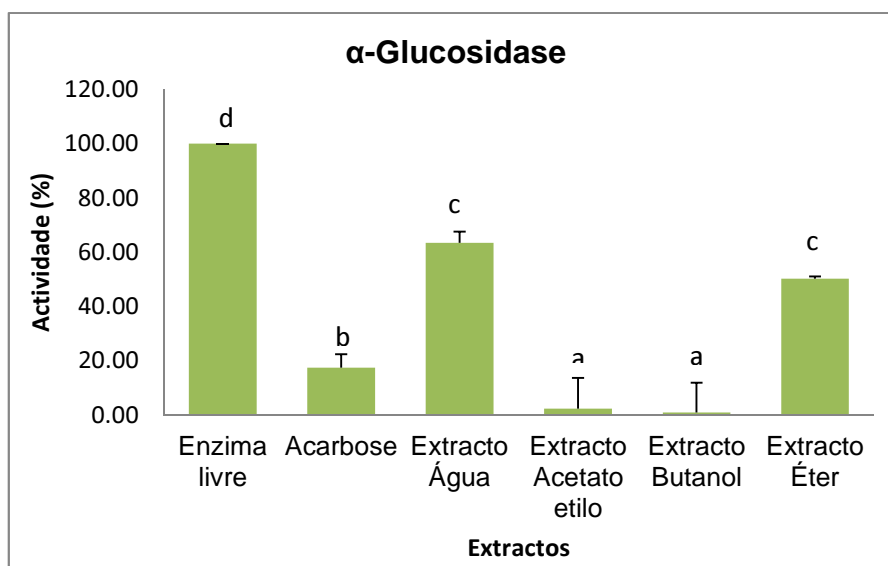


Figura 26 – Actividade da α -glucosidase do intestino delgado de rato em presença dos extractos de *Genista tenera* em água, butanol, acetato de etilo e éter. Actividade enzimática expressa em percentagem da actividade da enzima sem inibidor. Concentração dos extractos 400 mg/L. A actividade foi determinada usando maltose como substracto e a acarbose como controlo positivo. Cada valor é expresso como média + desvio padrão, de um total de 5 ensaios realizados. Diferentes índices (a-d) nas colunas da actividade em % indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) quando comparadas pelo teste *a posteriori* de Tukey.

A partir dos resultados do ensaio de inibição *in vitro* da α -glucosidase do intestino delgado de rato é evidente que há inibição pelos extractos em n-butanol (actividade enzimática reduzida a 0,97 % do total) e acetato de etilo (actividade enzimática reduzida a 2,36 % do total). Contudo os extractos em água (actividade enzimática reduzida a 63,42 % do total) e em éter (actividade enzimática reduzida a 50,21 % do total) apresentam percentagens de inibição bastante inferior à da acarbose (actividade enzimática reduzida a 17,39 % do total).

Pelos resultados do teste *a posteriori* de Tukey pode-se inferir que o extracto em acetato de etilo e o extracto em n-butanol não apresentam diferenças estatisticamente significativa um do outro pois apresentam um expoente igual (a) mas são diferentes de todos os outros extractos ou controlos. Os extractos em água e em éter por apresentarem os expoentes (c) não são estatisticamente diferentes um do outro mas são estatisticamente diferentes dos outros extractos e controlos.

O controlo positivo por apresentar o expoente (b) é estatisticamente diferente do controlo negativo com o expoente (d) e são ambos estatisticamente diferentes dos extractos em estudo, que apresentam outros expoentes no nível de significância em estudo (0,05).

O objectivo do tratamento dos doentes diabéticos e pré-diabéticos é manter os níveis glicémicos próximos do normal, tanto no período de jejum como no pós-prandial. Vários produtos naturais têm sido investigados quanto às suas características de supressão da absorção de glucose a partir do intestino (Novaes *et al.*, 2001; Matsui *et al.*, 2007; Teixeira *et al.*, 2007; Loizzo, *et al.*, 2008; Deutschländer *et al.*, 2009;)

A α -glucosidase é uma glucosidase localizada na membrana ciliada do intestino delgado, é uma enzima chave da digestão dos hidratos de carbono porque os quebra em monossacáridos facilmente absorvíveis (Andrade-Cetto *et al.*, 2008). A inibição da sua actividade no tracto digestivo humano é importante no controlo da diabetes, ao atrasar a absorção de glucose oriunda da decomposição do amido, reduzindo assim os níveis de glucose pós-prandial e os picos de insulina (Andrade-Cetto *et al.*, 2008; Tundis *et al.*, 2010).

A acarbose tem sido administrada como um hipoglicemiante oral, para diminuir a hiperglicémia pós-prandial (Yamashita *et al.*, 1984; Hanefeld, 1998).

Têm sido efectuados diversos ensaios clínicos com esta substância (para uma revisão consultar Van de Laar *et al.*, 2005; Godbout & Chiasson, 2007). A acarbose não tem capacidade ou tem uma capacidade muito reduzida (10^{-4} a 10^{-2} vezes menos) de inibir a α -glucosidase de leveduras, em relação à α -glucosidase do intestino delgado (Cogoli & Semenza, 1975; Kameda *et al.*, 1984; Oki *et al.*, 1999).

Uma vez que a α -glucosidase de leveduras é diferente da α -glucosidase do intestino delgado de rato, optou-se por utilizar no ensaio a segunda enzima com base nos estudos desenvolvidos por Oki *et al.* (1999). Deste trabalho infere-se que os estudos convencionais com α -glucosidase de leveduras podem apresentar resultados bastante inferiores quando comparados com α -glucosidase de intestino delgado de rato, não dando também qualquer informação prática sobre a absorção de glucose.

A sacarose e a isomaltose têm sido usadas como substrato em muitos estudos de inibição por flavonoides, da α -glucosidase do intestino delgado de rato. Neste trabalho usou-se a maltose por ser o principal produto da digestão do amido no intestino delgado.

Diversos compostos sintéticos inibidores da α -glucosidase têm sido usados no tratamento da diabetes, contudo de uma forma geral, têm sido associados efeitos colaterais adversos (Heo *et al.*, 2009; Tundis *et al.*, 2010).

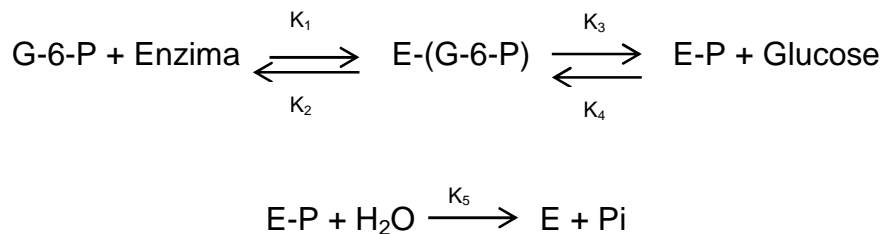
Por isto, há muito tempo que se desejam encontrar inibidores efectivos e não tóxicos.

Neste estudo investigou-se o efeito inibidor sobre a α -glucosidase, dos extractos de *Genista tenera* em n-butanol, acetato de etilo, éter e água para esclarecer o possível uso desta planta como um agente anti-hiperglicémico. Os extractos em n-butanol e em acetato de etilo evidenciaram um efeito semelhante ao do inibidor comercial acarbose e não revelaram genotoxicidade ou citotoxicidade conforme reportado em estudos anteriores (Rauter *et al.*, 2009).

Pela análise dos resultados obtidos, podemos concluir que os extractos de *Genista tenera* em n-butanol e acetato de etilo se revelaram bons candidatos como antidiabéticos naturais pois podem diminuir a absorção de glucose e prevenir as complicações ligadas à hiperglicémia.

4.3.3 ENSAIO DA ACTIVIDADE INIBITÓRIA DA ENZIMA GLUCOSE-6-FOSFATASE

Este ensaio baseia-se na determinação da actividade fosfohidrolase da enzima G-6-Pase (Arion & Walls, 1982; Cauntaway *et al.*, 1987).



No final da reacção enzimática, mediu-se a quantidade de fósforo libertado pela reacção deste elemento com uma solução ácida de molibdato de amónio e ácido ascórbico, que dá origem a um cromóforo azul.

4.3.3.1 Reagentes

Os reagentes a seguir indicados foram adquiridos a Sigma, St. Louis, Mo., USA: glucose-6-fosfato, glucose-6-fosfatase, HEPES (pH 6,5), EDTA, DMSO, florizina.

Todos os reagentes utilizados são de grau analítico.

4.3.3.2 Preparação das amostras

Antes de iniciar o ensaio, as amostras dos extractos foram dissolvidas com dimetil sulfóxido (DMSO) na concentração de 20 mg/mL. Procedeu-se em seguida a uma diluição de 40 µL das amostras com 60 µL de HEPES 16 mM (pH 6,5). A concentração final testada foi 400 mg/L. Foram efectuados no total 12 ensaios separados.

4.3.3.3 Procedimento experimental

A solução enzimática foi preparada com microsomas de fígado de coelho como fonte de glucose-6-fosfatase. Para efectuar esta preparação seguiu-se o método de Marccuci *et al.* (1983) citado por Estrada *et al.* (2005), em resumo homogeneizaram-se 16,74 mg de proteína microsomal com 0,837 mL de solução tampão HEPES 5 mM (pH 6,5) contendo 0,25 mM de sacarose e 1 mM de MgCl₂. Separaram-se alíquotas que se congelaram em azoto líquido (- 80 °C) e se descongelaram só no momento da utilização.

O ensaio enzimático da actividade da glucose-6-fosfatase foi executado com algumas modificações segundo o método de Burchell *et al.* (1988) citado em Estrada *et al.* (2005). A florizina (5,5 µL) e os extractos (5 µL) colocaram-se em contacto com a enzima (2,5 µL) a 37 °C durante 40 minutos, após este tempo iniciou-se a reacção pela adição da solução com G-6-P. O ensaio da G-6-Pase foi executado num volume final de 100 µL com 5 mM de glucose-6 fosfato (G-6-P), 2 mM EDTA, 16 mM HEPES (pH 6,5) (solução A) e a mistura da enzima. A reacção teve lugar durante 60 minutos a 37 °C, sem agitação, e foi terminada pela adição de 1 mL de ácido sulfúrico 0,33 M, com molibdato de amónio a 0,28%, SDS a 1,11% e ácido ascórbico a 1,11% (solução B). A reacção foi incubada a 47 °C durante 20 minutos e mediu-se a absorvência a 820 nm num espectrofotómetro Shimadzu UV-1700. Para estudar o efeito de cada extracto, adicionaram-se ao ensaio na concentração final de 400mg/L. A concentração final de DMSO nos ensaios foi 2%. Como controlo positivo usou-se florizina preparada em DMSO (10%), na mesma concentração dos extractos em ensaio.

Tabela 9 - Breve esquema elucidativo da preparação das soluções usadas no ensaio de inibição de actividade da enzima glucose-6-fosfatase.

Tampão:	Extractos:	Florizina:	Glucose-6-fosfatase:
Usar tampão HEPES 5 mM (pH 6,5)	20 mg/mL em DMSO	1 mM em DMSO 10%	16,74 mg proteína microssomal em 0,837 mL Tampão com 0,136 mM Sacarose e 1mM Cloreto de magnésio
	↓	↓	↓
	40 µL Extracto + 60 µL Tampão	5,5 µL no ensaio [400mg/L]	
	↓		↓
	5 µL no ensaio [400mg/L]		2,5 µL no ensaio [0,05 mg/mL]
			↓
			Homogeneizar e separar alíquotas. Congelar em azoto líquido até usar para fazer a determinação.

Tabela 10 – Esquema de pipetagem dos diferentes compostos intervenientes no ensaio de inibição de actividade da enzima glucose-6-fosfatase.

	Ensaio Branco (Tampão)	Ensaio Branco (Tampão+DMSO)	Florizina	Extracto	Enzima
Enzima			2,5 µL	2,5 µL	2,5 µL
Florizina			5,5 µL		
Extracto				5 µL	
DMSO		2 µL			
Tampão	7,5 µL	5,5 µ			5µL
	Incubar 37 °C/40minutos				
Solução A	92,5 µL	92,5 µL	92 µL	92,5 µL	92,5 µL
	Incubar 37 °C/60minutos				
Solução B	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
	Incubar 47 °C/20 minutos				

4.3.3.4 Análise estatística

A análise de toda a informação colhida nesta pesquisa foi feita de forma descritiva. Para variáveis quantitativas calcularam-se médias e desvios padrão.

A homogeneidade de variâncias testou-se pelo método de Levene.

A análise inferencial usada com o intuito de confirmar ou refutar evidências encontradas na análise descritiva foi a análise de variância (ANOVA one-way) com um factor fixo seguida do teste *a posteriori* de Tukey. Todos os cálculos foram executados usando o Microsoft® Excel 2010, a análise estatística foi executada com o programa *Statistica* versão 6,0 no nível de significância de 5%.

4.3.3.5 Resultados e discussão

A percentagem de inibição da enzima glucose-6-fosfatase para os quatro extractos de *Genista tenera* em estudo, assim como para o controlo positivo (florizina) e para o controlo negativo está representada na **tabela 11** e na **figura 27**.

Tabela 11 - Actividade da enzima glucose-6-fosfatase em presença dos extractos de *Genista tenera*

	Absorvência média	Actividade %	Desvio padrão %
Controlo negativo	0,224 ^b	100,00	9,11
Controlo positivo	0,236 ^b	96,06	8,87
Extracto água	0,256 ^b	98,33	9,81
Extracto acetato etilo	0,121 ^a	48,33	35,35
Extracto butanol	0,182 ^{ab}	80,25	9,61
Extracto éter	0,134 ^a	64,42	23,10

Actividade enzimática expressa em percentagem da actividade da enzima sem inibidor. A actividade enzimática foi determinada medindo o fósforo libertado. Inibição por 400 mg/L de extracto. A actividade foi determinada usando glucose-6-fosfato como substrato e a florizina como controlo positivo. A média das absorvências é o resultado de um total de 12 ensaios realizados. Diferentes índices (a-b) na coluna da absorvência média indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) quando comparadas pelo teste *a posteriori* de Tukey.

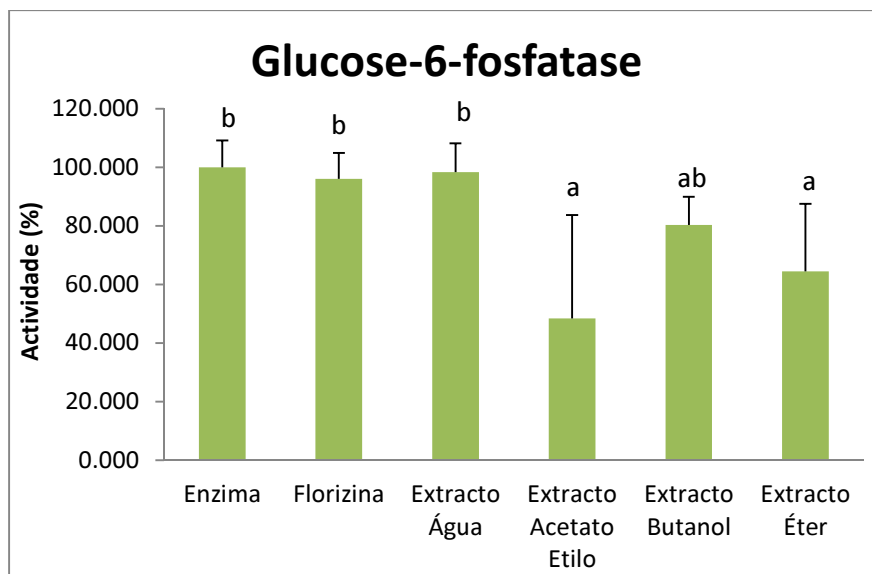


Figura 27 – Actividade da glucose-6-fosfatase de microssomas de fígado de coelho em presença dos extractos de *Genista tenera* em água, butanol, acetato de etilo e éter. Actividade enzimática expressa em percentagem da actividade da enzima sem inibidor. Concentração dos extractos 400 mg/L. A actividade foi determinada usando glucose-6-fosfato como substrato e a florizina como controlo positivo. Cada valor é expresso como média + desvio padrão, de um total de 12 ensaios realizados. Diferentes índices (a-b) nas colunas da actividade em percentagem indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) quando comparadas pelo teste *a posteriori* de Tukey.

A partir dos resultados do ensaio de inibição *in vitro* da glucose-6-fosfatase de microssomas de fígado de coelho é evidente que há inibição pelo extracto em acetato de etilo (actividade enzimática reduzida a 48,33 % do total). A inibição dos extractos em n-butanol (actividade enzimática reduzida a 80,25 % do total) e em éter (actividade enzimática reduzida a 64,42 % do total) não é tão evidente e o extracto em água (actividade enzimática reduzida a 98,33 % do total) apresenta inibição inferior à da florizina (actividade enzimática reduzida a 96,06 % do total).

Pelos resultados do teste *a posteriori* de Tukey pode-se inferir que o controlo negativo não apresenta diferença estatisticamente significativa do controlo positivo (florizina) assim como do extracto em água, pois apresentam um expoente igual (b). Os extractos em acetato de etilo e em éter não são estatisticamente diferentes, têm em comum o expoente (a) e também apresentam em comum com o extracto em n-butanol o expoente (a) porém este extracto não é estatisticamente diferente dos controlos negativo, positivo e do extracto em água pois também tem o expoente (b).

A florizina é um conhecido inibidor do transporte de glucose, mas também é um inibidor da enzima glucose-6-fosfatase. A inibição é linear e não competitiva.

Contudo é um inibidor fraco, a sua forma aglicona, floretina, é mais eficiente (Arion *et al.*, 1980 a).

Em estudos efectuados com este inibidor concluiu-se que a inibição era ao nível do transportador T1 do sistema enzimático (Arion *et al.*, 1997)

Como se pretende estudar a inibição da actividade fosfohidrolase da enzima este foi o inibidor escolhido por inibir a entrada de glucose-6-fosfato para o interior do sistema enzimático, pois sabe-se que a unidade catalítica se encontra na face luminal do sistema enzimático (Arion & Walls, 1982; Foster & Nordlie, 2002; Nordlie & Foster, 2010).

Em estudos anteriormente efectuados, verificou-se que a florizina apresentava uma percentagem de inibição do sistema enzimático muito reduzida, Rodriguez *et al.* (2008) ou não inibia o sistema enzimático, Estrada *et al.* (2005) quando os microssomas não estavam intactos. Sabe-se que o congelamento dos microssomas e as condições do ensaio poderão conduzir ao seu rompimento. Há então necessidade de fazer a determinação com manose-6-fosfato, da real quantidade de microssomas intactos com que se está a trabalhar pois a actividade da manose-6-fosfatase é superior nos microssomas permeabilizados do que nos intactos (Arion & Walls, 1982; Guigas *et al.*, 2007).

Os microssomas utilizados neste estudo possuem uma certa percentagem na forma permeabilizada, mas não foi possível quantificar a percentagem intacta. Possivelmente justificam-se assim os valores da florizina, obtidos no presente estudo.

Conforme referido no capítulo 3.4.2 a glucose-6-fosfatase é um sistema enzimático complexo sendo então necessário fazer o estudo da proporção entre os microssomas intactos e permeabilizados.

Mesmo quando se trabalha com microssomas intactos, há uma proporção de 1:10 de microssomas que estão rompidos, designada por componente permeabilizado (Arion *et al.*, 1971).

Esta pequena fracção da enzima pode contribuir substancialmente para a actividade catalítica total dos microssomas. Devido à sua insensibilidade à florizina e ao seu K_m muito mais baixo, a enzima associada com o componente permeabilizado, tem uma vantagem cinética sobre o sistema intacto, especialmente quando o meio de reacção tem baixas concentrações de substrato. Uma vez que a contribuição do componente permeabilizado seja

conhecida, pode ser subtraída da quantidade total de fosfato formado (Arion *et al.*, 1980a).

Em estudos anteriormente efectuados concluiu-se que a presença de EDTA no ensaio, a utilização de tampão com pH entre 5,7-7,0, a temperatura da reacção entre 25-37 °C, ou a “idade” da preparação microsossomal não vão ter influência nas características cinéticas, desde que se subtraia a contribuição do componente permeabilizado (Arion *et al.*, 1980 a). A baixa concentração de substrato utilizada no ensaio, também é uma possível justificação para os resultados obtidos.

Pode-se afirmar que os extractos de *Genista tenera* em acetato de etilo, éter e n-butanol inibem a enzima G-6-Pase ao nível da unidade catalítica, pois como anteriormente referido o ensaio efectuou-se com a enzima associada com o componente permeabilizado. Não foi possível verificar se há inibição ao nível do transportador T1 por não se ter feito o ensaio com manose-6-fosfato. Há estudos que referem como principal local de acção de alguns flavonóides a inibição do transportador T1, Rodriguez *et al.* (2008), Estrada *et al.* (2005), Gonzales-Mujica *et al.* (2005) ou a inibição do transportador da glucose (Csala *et al.* 2007).

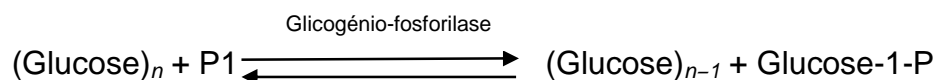
A hiperglicemia crónica da diabetes conduz a alterações na expressão de proteínas envolvidas no metabolismo da glucose, que vão agravar posteriormente o equilíbrio metabólico, um processo anteriormente referido no capítulo 3.3.2 como toxicidade da glucose. Um exemplo é a hiperglicemia promover a indução da G-6-Pase, que por seu lado conduz a um aumento da produção hepática de glucose. Considera-se então importante quebrar este círculo inibindo a enzima G-6-Pase. Contudo, segundo Agius (2007) a inibição desta enzima tem duas limitações como alvo terapêutico, para o controlo da diabetes tipo 2: baixas concentrações de inibidor que causam uma moderada diminuição da glicemia resultam em marcadas alterações da expressão de genes envolvidos na lipogénese, com o conseqüente desenvolvimento de fígado gordo e concentrações elevadas do inibidor podem causar hipoglicemia severa porque a actividade da G-6-Pase é essencial para a produção hepática de glucose tanto devida à gluconeogénese como à glicogenólise. Assim podemos dizer que este importante alvo terapêutico deve ser manejado com cuidado.

Também se sabe que a G-6-Pase é uma enzima chave localizada num ponto comum a várias vias metabólicas: gluconeogénese, glicólise e via das pentoses-fosfato. A G-6-Pase também desempenha um papel importante na regulação do metabolismo hepático do glicogénio, ao controlar o estado activo e a distribuição subcelular da enzima glicogénio-sintetase (Gomis *et al.*, 2003). Contudo nos ensaios efectuados por Guigas *et al.* (2007) verificou-se que não havia acumulação de glicogénio nos hepatócitos, excluindo-se assim um efeito agudo de flavonóides na síntese de glicogénio. Este autor também coloca a hipótese da G-6-P divergir da produção hepática de glucose por intermédio da G-6-Pase e seguir a via das pentoses fosfato. A enzima glucose-6-fosfato desidrogenase catalisa o primeiro passo desta via geradora de NADPH, útil tanto para os processos anabólicos como para para protecção contra o stresse oxidativo. Em ratos com alimentação com alto teor de gorduras, a inibição da G-6-Pase foi relacionada, com um aumento do fluxo para a via das pentoses fosfato, o que sugere um mecanismo de diversão da G-6-P da neoglucogénese para a via das pentoses fosfato (Mithieux *et al.*, 2002). Esta explicação é consistente com o baixo K_m da glucose-6-fosfato desidrogenase para a G-6-P ($\pm 0,2$ mM), uma concentração próxima do nível fisiológico do fígado. Assim qualquer aumento resultante da inibição da G-6-Pase deverá aumentar o fluxo de G-6-P para a glucose-6-fosfato desidrogenase, aumentando a produção de NADPH e a regeneração do glutatião oxidado, conduzindo por último a uma maior protecção das ROS pela glutatião peroxidase. Considerando esta ligação com a protecção antioxidante é tentador sugerir que as possíveis propriedades antioxidantes dos extractos de *Genista tenera* nos hepatócitos de rato (células H-4-II-E) poderão estar relacionadas com um redireccionamento do carbono da G-6-P para esta via, conduzindo a um aumento da produção de NADPH e das defesas celulares contra a produção de ROS.

Este estudo mostra que os extractos de *Genista tenera* em acetato de etilo, éter e n-butanol inibem a enzima G-6-Pase podendo ser interessantes no controle da diabetes tipo 2 uma vez que a diminuindo da produção hepática de glucose é uma pedra angular na normalização da glicemia dos diabéticos.

4.3.4 ENSAIO DA ACTIVIDADE INIBITÓRIA DA ENZIMA GLICOGÉNIO FOSFORILASE

A forma activa da enzima catalisa de forma reversível a clivagem da molécula de glicogénio para produzir glucose-1-fosfato (G-1-P). No músculo a G-1-P é utilizada na via glicolítica para a obtenção de energia e no fígado é principalmente convertida em glucose que ao ser libertada vai servir outros tecidos.



A actividade desta enzima tanto pode ser medida controlando a formação de G-1-P como na direcção inversa (Sergienko & Srivastava, 1997).

Neste ensaio mediu-se a actividade da GP_a na direcção da síntese do glicogénio, pela libertação de fosfato.

4.3.4.1 Reagentes

Os reagentes a seguir indicados foram adquiridos a Sigma, St. Louis, Mo., USA: glucose-1-fosfato, glicogénio fosforilase, HEPES (pH 7,2), ácido etileno glicol tetra-acético (EGTA), glicogénio, cafeína. Todos os reagentes utilizados são de grau analítico.

4.3.4.2 Preparação das amostras

Antes de iniciar o ensaio, as amostras dos extractos foram dissolvidas com dimetil sulfóxido (DMSO) na concentração de 20 mg/mL. Procedeu-se em seguida a uma diluição de 40 µL das amostras com 60 µL de HEPES 50 mM (pH 7,2). A concentração final testada foi 400 mg/L. Efectuaram-se no total doze ensaios separados.

4.3.4.3 Procedimento experimental

O ensaio enzimático para determinação da actividade da enzima glicogénio fosforilase foi executado segundo o método de Martin *et al.* (1998) com algumas modificações.

A actividade da enzima glicogénio fosforilase a (GPa), (EC 2.4.1.1) foi medida na direcção da síntese do glicogénio, a 25 °C há libertação de fosfato a partir da glucose-1-fosfato. Adicionaram-se 5 µL de enzima a 90 µL de tampão contendo 50 mM HEPES (pH 7,2), 100 mM de KCl, 2,5 mM de EGTA, 2,5 mM de MgCl₂ e 1 mg/mL de glicogénio (solução A). Durante 30 minutos fez-se uma incubação prévia a 25 °C da enzima com a solução A. Posteriormente adicionaram-se 5 µL de extractos e de cafeína e fez-se nova incubação a 25 °C durante 30 minutos. Para dar início à reacção enzimática adicionaram-se 10 µL de glucose-1-fosfato (0,5 mM) à mistura anterior e incubou-se a 25 °C durante 30 minutos. O fosfato libertado foi medido num espectrofotómetro Shimadzu UV-1700 a 820 nm, 20 minutos após a adição de 1 mL de ácido sulfúrico 0,33 M, com molibdato de amónio a 0,28%, SDS a 1,11% e ácido ascórbico a 1,11% (solução B). A reacção foi incubada a 47 °C. Como composto de referência usou-se cafeína na concentração de 15 µM.

Tabela 12 - Breve esquema elucidativo da preparação das soluções usadas no ensaio de inibição da enzima glicogénio fosforilase.

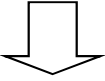
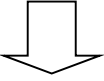
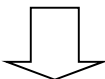
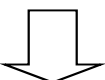
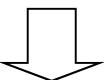

Tampão:	Extractos:	Cafeína:	Glicogénio fosforilase:
Usar tampão HEPES 5 mM (pH 7,2)	20 mg/mL em DMSO	1 M em água destilada	22 UI e solubilizar em 4,4 mL de tampão
			
	40 µL Extracto + 60 µL Tampão	Diluir até 300 µM	5 µL no ensaio têm 0,25 UI
			
	5 µL no ensaio [400mg/L]	5 µL no ensaio [15 µM]	Homogeneizar e separar alíquotas. Congelar em azoto líquido até usar para fazer a determinação.

Tabela 13 – Esquema de pipetagem dos diferentes compostos intervenientes no ensaio de inibição de actividade da enzima glicogénio fosforilase.

	Ensaio Branco (Tampão)	Ensaio Branco (Tampão +DMSO)	DMSO	Cafeína	Extracto	Enzima
Solução A	100 µL	95 µL	95 µL	90 µL	90 µL	95 µL
Enzima				5 µL	5 µL	5 µL
DMSO			5 µL			
Incubar 25 °C/30minutos						
Extracto					5 µL	
Cafeína		5 µL		5 µL		
Incubar 25 °C/30minutos						
G-1-P	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL
Incubar 25 °C/30minutos						
Solução B	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
Incubar 47 °C/20 minutos						

4.3.4.4 Resultados e discussão

A glicogénio fosforilase de músculo de coelho é uma das enzimas mais estudadas do ponto de vista da estrutura, do mecanismo e da regulação (Lowry *et al.*, 1967; Srivastava & Sergienko, 1997; Wang, 1999; Oikonomakos *et al.*, 2000; Rush & Spriet, 2001; Freeman *et al.*, 2006). Por isso foi escolhida para este estudo. Esta enzima existe em duas formas interconvertíveis GPb (baixa actividade e baixa afinidade para o substrato) e a forma fosforilada na Ser14 a GPa (alta actividade e alta afinidade para o substrato) (Oikonomakos *et al.*, 2000).

A GP é regulada por uma complexa inter-relação entre vários efectores alostéricos que alteram o estado de activação da enzima, foi por isso importante pré-incubar a enzima com glicogénio para estabilizar a enzima na sua forma dimérica mais activa, antes de iniciar a reacção por adição de G-1-P.

Como inibidor alostérico utilizou-se a cafeína que se liga ao sítio inibidor da enzima e pode alterar o equilíbrio entre um estado R mais activo e um estado T menos activo, estabilizando este estado (Oikonomakos *et al.*, 2002).

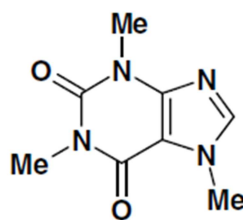


Figura 28 – Estrutura química da cafeína.

A absorvência média da enzima glicogénio fosforilase para os quatro extractos de *Genista tenera* em estudo, assim como para o controlo positivo (florizina) e para o controlo negativo está representada na **tabela 14**.

Tabela 14 - Absorvência média da enzima glicogénio fosforilase em presença dos extractos de *Genista tenera*.

	Absorvência média
EB	1,72
Controlo negativo	1,83
Controlo positivo	2,00
Extracto água	1,98
Extracto acetato de etilo	2,01
Extracto butanol	1,93
Extracto éter	1,76

A actividade enzimática foi determinada medindo o fósforo libertado. A actividade foi determinada usando glucose-1-fosfato como substrato e como controlo positivo usou-se florizina. Inibição por 400 mg/L de extracto. A média das absorvências é o resultado de um total de 12 ensaios realizados.

Os dados obtidos não foram conclusivos, já que não foi possível demonstrar uma actividade enzimática reprodutível com a enzima livre e respectivo inibidor. Ao pesquisar a influência dos extractos de *Genista tenera* na inibição da enzima glicogénio fosforilase observou-se que a mistura de reacção apresentava absorvências com diferenças muito reduzidas entre os diversos sistemas operacionais.

Existem algumas explicações possíveis:

1 - Como primeira hipótese supôs-se que estes resultados se ficaram a dever potencialmente a uma limitação técnica pelo facto de não se ter adicionado AMP à mistura de reacção.

O maior regulador da enzima isolada do músculo de coelho é o AMP, que activa as formas *a* e *b* da enzima em graus diversos. A forma *b* requer AMP para se activar e a forma *a* é posteriormente activada pelo AMP (Newgard *et al.*, 1989; Johnson, 1992; Klinov & Kurganov, 2001).

Foram referidas concentrações de AMP entre 0,45 μ M a 0,1 mM que activaram a GP_a do músculo de coelho três a quatro vezes, na presença deste conhecido effector alostérico (Kasvinsky *et al.*, 1978; Rush & Spriet, 2001)

A enzima só apresentava poder catalítico após a ligação de duas moléculas de AMP e duas moléculas de G-1-P, sob condições de saturação por glicogénio (Sergienko & Srivastava, 1997; Dreyfus *et al.*, 1980; Wang, 1999). Após a ligação da primeira molécula de G-1-P a uma das subunidades é induzida uma alteração conformacional em ambas as sub-unidades para formar um estado intermédio inactivo, a ligação da segunda molécula de G-1-P à enzima resulta numa posterior transição conformacional do estado inactivo ao estado activo (Wang, 1999).

2 - Como segunda hipótese considerou-se que os resultados se deviam à temperatura de incubação seleccionada. Considerou-se alterar a temperatura de incubação da enzima para 30 °C pois em trabalhos anteriormente efectuados foi esta a temperatura utilizada (Wang, 1999; Oikonomakos *et al.*, 2000; Freeman *et al.*, 2006). Porém não se obtiveram melhores resultados com esta alteração técnica (resultados não apresentados).

3 - Como terceira hipótese pressupõe-se que terá ocorrido uma degradação da enzima devido às condições de armazenamento e aos dias de utilização após solubilização, que foram superiores ao referido por outros autores. Em trabalhos anteriores há referências a perda de actividade enzimática ao fim de 7 dias com o armazenamento a 0 °C ou temperatura inferior (Lowry *et al.*, 1967; Rush & Spriet, 2001; Freeman *et al.*, 2006).

Supõe-se ser pelos factos acima expostos, que a enzima GP_a não apresentou actividade.

5 CONCLUSÕES

A diabetes tipo 2 e as suas complicações têm sido uma causa de preocupação cada vez maior das organizações de saúde, devido ao crescente número de pessoas a sofrerem desta patologia nos países desenvolvidos e principalmente nos países em desenvolvimento, com os consequentes efeitos em termos de diminuição drástica de qualidade de vida dos doentes e perdas económicas relacionadas com o aumento da mortalidade e morbilidade, absentismo e encargos financeiros acrescidos por parte dos serviços de saúde.

A pesquisa de novos produtos de origem natural com o fim de controlar esta patologia e reduzir os gastos tem sido uma área de intensa actividade científica. Os flavonóides têm sido amplamente estudados com este fim.

A *Genista tenera* é uma planta utilizada desde longa data pela população da ilha da Madeira na forma de chá para diminuir a hiperglicemia, com resultados muito eficazes, e que permitiu ao longo do tempo a melhoria do estado de saúde destas comunidades sujeitas a algum isolamento geográfico. No entanto há poucos dados científicos dirigidos a clarificar o seu grande potencial aparente, o que leva à necessidade premente de realizar estudos bioquímicos e toxicológicos que permitam a sua utilização em larga escala na forma de alimento nutracêutico.

Em estudos prévios com extractos desta planta, foram identificados vários flavonóides, possivelmente responsáveis pelo, efeito biológico na hiperglicémia e recentemente foi confirmada a sua bioactividade com estudos em ratos, com resultados dramáticos na diminuição de glicemia face ao controlo.

Os objectivos do presente trabalho foram estudar o mecanismo enzimático responsável pela actividade anti-hiperglicemiante de quatro extractos de *Genista tenera*. Paralelamente pretendeu-se avaliar a capacidade antioxidante dos mesmos extractos.

Vamos agora analisar em detalhe os resultados obtidos para o método *in vitro* de culturas celulares, para determinação da capacidade antioxidante e os resultados para cada um dos métodos enzimáticos estudados.

Ao efectuar ensaios de viabilidade celular com células H-4-II-E pelo método do MTT, consegue-se demonstrar que os extractos de *Genista tenera* não são

tóxicos para estas células eucarióticas, sendo este um primeiro passo na avaliação toxicológica que permitirá, quando concluída, a sua inclusão em formulações destinadas a alimentação humana. Quando se comparam os resultados dos quatro extractos de *Genista tenera* com o controlo (células H-4-II-E não irradiadas) obtém-se mesmo alguma viabilidade celular acrescida.

Analisando os resultados do ensaio dirigido ao estudo da actividade antioxidante e citoprotectora dos extractos em células irradiadas com UV, pode-se concluir que os extractos que apresentaram diferenças estatisticamente significativas foram os seguintes (por ordem de maior para menor actividade):

- éter (no qual tinham sido anteriormente identificadas as flavonas apigenina, e crisoeriol e as isoflavonas genisteína, 3'-O-metilrobof, 5-O-metilgenisteína e alpinumisofavona);

- n-butanol (em que foram anteriormente identificados vinte e seis flavonóides cinco flavonóides agliconas, cinco flavonóides monoglicosidos, dois flavonóides diglicosidos, um flavonóide triglicosido, três monoacetil flavonóides, um diacetil flavonóide e um acetil flavonóide glicósido);

- acetato de etilo (em que se identificaram anteriormente como compostos maiores, genisteína-8-C-glucosido e genisteína-7-O-glucosido e como composto menor, luteolina-7-O-glucosido e em traços luteolina-7,3'-di-O-glucosido e rutina).

Desta forma, evidencia-se que estes extractos são potencialmente bons antioxidantes provavelmente devido aos flavonóides que entram na sua composição. Estes extractos podem ser considerados como boas fontes de antioxidantes naturais para serem incorporados em nutracêuticos usados em doenças relacionadas com stresse oxidativo, como é a diabetes tipo 2. Nestes doentes terão um papel protector a diferentes níveis, incluindo no ataque continuado às células pancreáticas pelos radicais livres, que contribui para a depleção de insulina e a necessidade de administração diária de insulina.

Em termos de mecanismo de acção anti-hiperglicemiante directa, pode-se presumir que um ou mais dos compostos presentes nos extractos de *Genista tenera* desempenha um papel importante na inibição da enzima α -glucosidase. É evidente através da análise dos resultados obtidos que há inibição desta enzima pelos extractos em n-butanol e acetato de etilo. Estes extractos apresentaram

uma percentagem de inibição bastante superior à do inibidor comercial acarbose, que foi utilizada no presente estudo como controlo positivo, e que se encontra comercializado com uma das armas terapêuticas de controlo da glicemia, com a seguinte posologia: para doentes com peso superior a 60 kg recomenda-se uma toma 3 vezes ao dia em dose de 50-200 mg até um máximo de 600mg/dia. A utilização de nutracêuticos com os compostos presentes nos extractos em butanol e acetato de etilo permitiria reduzir mais eficazmente com menor dosagem a hiperglicemia pós-prandial dos doentes com diabetes tipo 2, podendo até ser incluída na própria refeição. Há diversos estudos publicados com extractos de plantas que inibem esta enzima, mas este é o primeiro estudo com extractos de *Genista tenera*. A inibição desta enzima revela-se de crucial importância no retardar da absorção dos hidratos de carbono da dieta que contribuem para a hiperglicemia pós-prandial dos indivíduos com diabetes tipo 2.

A glucose-6-fosfatase é a enzima que catalisa o passo final da gluconeogénese e da glicogenólise. A sua inibição é extremamente importante no controlo da hiperglicemia da diabetes. Os extractos de *Genista tenera* em acetato de etilo, éter e butanol inibem a enzima glucose-6-fosfatase de forma significativa. Pode-se teorizar que esta inibição se dá ao nível da unidade catalítica e não do transportador, pois o ensaio efectuou-se com a enzima associada com o componente permeabilizado. Apesar de não ser um alvo terapêutico muito utilizado, pelas implicações fisiológicas em termos de hipoglicemia e de alteração do metabolismo lipídico, poderá ser interessante como interveniente em associações terapêuticas para controlar de forma suave a entrada de glucose em circulação a partir das reservas hepáticas de glicogénio.

Também se encontram diversas publicações com estudos de plantas ou extractos de plantas que inibem a enzima glucose-6-fosfatase, mas é a primeira vez que se faz um estudo com *Genista tenera*.

A verificação do fundamento científico subjacente ao uso popular de plantas medicinais, nomeadamente pesquisando e isolando os compostos bioactivos presentes nestas plantas responsáveis pela acção no metabolismo dos hidratos de carbono, é de grande importância para o desenvolvimento de novos compostos terapêuticos com propriedades antidiabéticas. Além disso, o

esclarecimento das acções dos extractos desta planta aumenta a segurança e a eficácia da sua utilização na diabetes como nutracêutico, com a possibilidade desta utilização se vir a generalizar como auxiliar terapêutico ou no âmbito da prevenção.

Os estudos com a *Genista tenera* comprovaram os efeitos benéficos da utilização popular desta planta uma vez que os resultados dos ensaios se relacionam com funções fisiologicamente importantes na regulação do metabolismo dos hidratos de carbono no organismo e com as propriedades antioxidantes. Este estudo evidenciou a *Genista tenera* como potencial adjuvante na terapia da diabetes e também como uma nova fonte de compostos bioactivos, potenciais protótipos para síntese de novas moléculas a incluir em alimentos nutracêuticos.

6 BIBLIOGRAFIA

6.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agius, L. (2007) New hepatic targets for glycaemic control in diabetes. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 21: 587-605.

Aherne, S. A.; O'Brien, N. M. (2002) Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, 18: 75-81.

Albuquerque, R. & Pimazoni Netto, A. (2008) Diabetes na Prática Clínica. Sociedade Brasileira de Diabetes. Disponível em <http://www.diabetesebook.org.br/novo/modulo-1/4-fisiologia-e-fisiopatologia-das-celulas-beta-implicacoes-clinicas-e-terapeuticas>. Consulta efectuada a 10 de Janeiro de 2010.

American Diabetes Association (2008) Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 31:S55-S60

Andersen, B.; Rassev, A.; Westergaard, N.; Lundgren, K. (1999) Inhibition of glycogenolysis in primary rat hepatocytes by 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol. *Biochem. Journal*, 342: 545-550.

Andlauer, W. & Fürst, P. (2002) Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. *Food Research International*, 35:171-176.

Argaud, D.; Zhang, Q.; Pan, W.; Maitra, S.; Pilkis, S. J.; Lange, A. (1996) Regulation of rat liver glucose-6-phosphatase gene expression in different nutritional and hormonal states: gene structure and 5'-flanking sequence. *Diabetes*, 45:1563-1571.

Arion, W. J.; Wallin, B. K.; Carlson, P. W.; Lange, A. J. (1972) The specificity of glucose-6-phosphatase of intact liver microsomes. *The Journal of Biological Chemistry*, 247, (8): 2558-2565.

Arion, W. J.; Wallin, B. K.; Lange, A. J.; Ballas, L. M. (1975) On the involvement of a glucose 6-phosphate transport system in the function of microsomal glucose 6-phosphatase. *Mol. Cell. Biochem.*, 6: 75-83.

Arion, W. J.; Lange, A. J.; Walls (1980) Microsomal membrane integrity and the interactions of phlorizin with the glucose-6-phosphatase system. *The Journal of Biologiccahemistry*, 255 (21): 10387-10395.

Arion, W. J.; Lange, A. J.; Walls, H. E.; Ballas, L. M. (1980) Evidence for the participation of independent translocation for phosphate and glucose 6-phosphate in the microsomal glucose-6-phosphatase system. Interactions of the system with orthophosphate, inorganic pyrophosphate, and carbamyl phosphate. *J. Biol. Chem.*, 255: 10396-10406.

Arion, W. J. & Walls, H. E. (1982) The Importance of Membrane Integrity in Kinetic Characterizations of the Microsomal Glucose-6-phosphatase System. *The Journal of Biological Chemistry*, 257 (19): 11217-11220.

Arion, W. J.; Canfield, W. K.; Ramos, F. C.; Schindler, P. W.; Burger, H. J.; Hemmerle, H.; Schubert, G.; Below, P.; Herling, A. W. (1997) Chlorogenic acid and hydroxynitrobenzaldehyde : new inhibitors of hepatic glucose 6-phosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 339: 315-322.

Arion, W. J.; Canfield, W. K.; Callaway, E. S.; Burger, H. J.; Hemmerle, H.; Schubert, G.; Herling, A. W.; Oekonomopulos, R. (1998) Direct evidence for the involvement of two glucose 6-phosphate-binding sites in the glucose-6-phosphatase activity of intact liver microsomes. Characterization of T1, the microsomal glucose 6-phosphate transport protein by a direct binding assay. *J. Biol. Chem.*, 273: 6223-6227.

Arion, W. J.; Canfield, W. K.; Ramos, F. C.; Su, M. L.; Burger, H. J.; Hemmerle, H.; Schubert, G.; Below, P.; Herling, A. W. (1998) Chlorogenic acid analogue S 3483 : a potent competitive inhibitor of the hepatic and renal glucose-6-phosphatase systems. *Arch. Biochem. Biophys.*, 351: 279-285.

Asano, N.; Yamashita, T.; Yasuda, K.; Ikeda, K.; Kizu, H.; Kameda, Y.; Kato, A.; Nash, R. J.; Lee, H. S.; Ryu, K. S. (2001) Polyhydroxylated alkaloids isolated from mulberry trees (*Morus alba* L.) and silkworms (*Bombyx mori* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 4208–4213.

Baker, D. J.; Greenhaff, P. L.; MacInnes, A.; Timmons, J. A. (2006) The experimental type 2 diabetes therapy. Glycogen phosphorylase inhibition can impair aerobic muscle function during prolonged contraction. *Diabetes*, 55: 1855-1861.

Baker D. J.; Greenhaff, P. L.; Timmons, J. A. (2006). Glycogen phosphorylase inhibition as a therapeutic target: A review of the recent patent literature. *Expert Opin. Ther. Pat.*, 16: 459-466.

Baker, D. J.; James A. Timmons, J. A.; Greenhaff, P. L. (2005) Glycogen phosphorylase inhibition in type 2 diabetes therapy. A systematic evaluation of metabolic and functional effects in rat skeletal muscle. *Diabetes*, 54: 2453- 2459.

Barf, T. (2004) Intervention of hepatic glucose production. Small molecule regulators of potential targets for type 2 diabetes therapy. *Mini Rev Med Chem* , 4: 897-908.

Beardsall, K.; Yuen, K.; Williams R., Dunger, D. (2003) Applied physiology of glucose control. *Current Paediatrics*, 13: 543-548

Berteloot, A.; St-Denis, J. F.; Van de Werve, G. (1995). Evidence for a membrane exchangeable glucose pool in the functioning of rat liver glucose-6-phosphatase. *The Journal of Biological Chemistry*, 270, (36): 21098–21102

Bhathena, S.; Velasquez, M. T. (2002) Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. *The American Journal of Clinical Nutrition* , 76:1191–1201.

Bollen, M.; Keppens, S.; Stalmans, W. (1998) Specific features of glycogen metabolism in the liver *Biochem. Journal*, 336: 19–31.

Borges, C.; Martinho, P.; Martins, A.; Rauter, A. P.; Almoester-Ferreira, M. A. (2001) Structural characterization of flavonoids and flavonoids-O-glycosides extracted from *Genista tenera* by fast-atom bombardment tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 15: 1760-1767.

Brownlee, M. (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414: 813-820.

Brownlee, M. (2005) The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*, 54: 1615-1625.

Burchell, A. & Burchell, B. (1982) Identification and purification of a liver microsomal glucose 6-phosphatase. *Biochem. J.* 205: 567-573.

Burda, S.; Oleszek, W. (2001) Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J. Agric. Food Chem.*, 49: 2774-2779.

Buritis, M.; Asres, K.; Bucar, F. (2001) The antioxidant activity of the essential oils of *Artemisa afra*, *Artemisa abyssinica* and *Juniperus procera*. *Phytotherapy Research*, 15: 103-108

Cazarolli, L. H.; Zanatta, L.; Alberton, E. H.; Figueiredo, M. S. R. B.; Folador, P.; Damazio, R. G.; Pizzolatti, M. G.; Silva, F. R. M. B. (2008) Flavonoids: prospective drug candidates. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 8: 1429-1440.

Cazarolli, L. H.; Zanatta, L.; Alberton, E. H.; Figueiredo, M. S. R. B.; Folador, P.; Damazio, R. G.; Pizzolatti, M. G.; Silva, F. R. M. B. (2008) Flavonoids: cellular and

molecular mechanism of action in glucose homeostasis. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 8: 1032-1038.

Ceriello, A. (2000) Oxidative stress and glycemic regulation. *Metabolism*, 49 (2): 27-29.

Ceriello, A. & Motz, E. (2004) Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24: 816-823.

Chang, Q.; Zuo, Z.; Chow, M. S. S.; Ho, W. K. K. (2005) Difference in absorption of the two structurally similar flavonoid glycosides, hyperoside and isoquercitrin, in rats. *European Journal Pharm. Biopharm*, 59: 549-555.

Cheng, I. F.; Breen, K. (2000) On the ability of four flavonoids, baicilein, luteolin, naringenin, and quercetin, to suppress the Fenton reaction of the iron-ATP complex. *Biometals*, 13, 77-83.

Chiasson, J. L. (2006) Acarbose for the prevention of diabetes, hypertension, and cardiovascular disease in subjects with impaired glucose tolerance: the study to prevent non-insulin-dependent diabetes mellitus (STOP-NIDDM) trial. *Endocr Pract.*, 12 (1): 25-30.

Chiasson, J. L.; Josse, R. G.; Gomis, R.; Hanefeld, M.; Karasik, A.; Laakso, M. (2002) Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomised trial. *Lancet*; 359: 2072–2077.

Cline, G. W.; Jucker, B. M.; Trajanoski, Z.; Rennings, A. J. M.; Shulman, G. I. (1998). A novel ¹³C NMR method to assess intracellular glucose concentration in muscle, in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 274: 381-389.

Clydesdale, F. M. (1997) A proposal for the establishment of scientific criteria for health claims for functional foods. *Nutr. Rev.*, 55: 413-422.

Cogoli, A. & Semenza, G. A (1975) Probable oxocarbonium ion in the reaction mechanism of small intestinal sucrase and isomaltase. *J. Biol. Chem.*, 250: 7802-7809.

Cori, G. T. & Cori, C. F. (1952) Glucose-6-phosphatase of the liver in glycogen storage disease. *J. Biol. Chem.*, 199: 661-667.

Costacou, T. & Mayer-Davis, E. J. (2003) Nutrition and prevention of type 2 diabetes. *Annual Review of Nutrition*, 23: 147-170.

Crozier, A.; Jaganath, I.; Clifford, M.N. (2009) Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 26: 1001-1043.

Csala, M.; Bánhegyi, G.; Benedetti, A. (2006) Endoplasmic reticulum: a metabolic compartment. *FEBS Letters*, 580: 2160-2165.

Daniele, N.; Bordet, J. C.; Mithieux, G. (1997) Unsaturated fatty acids associated with glycogen may inhibit glucose-6-phosphatase in rat liver. *J. Nutr.*, 127: 2289-2292.

De Fronzo, R. A. (1999) Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Annals of Internal Medicine*, 131: 281-303.

Detimary, P; Jonas, J. C.; Henquin, J. C. (1995) Possible links between glucose-induced changes in the energy state of pancreatic β cells and insulin release. Unmasking by decreasing a stable pool of adenine nucleotides in mouse islets. *Journal of Clinical Investigation*, 96: 1738-1745.

De Magalhães, J. P. & Church, G.M. (2006) Cells discover fire: employing reactive oxygen species in development and consequences for aging. *Experimental gerontology*, 41: 1-10.

De Sousa, E.; Zanatta, L.; Seifriz, I.; Creczynski-Pasa, T. B.; Pizzolatti, M. G.; Szpoganicz, B.; Silva, F. R. M. B. (2004) Hypoglycemic effect and antioxidant potential of kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside from *Bauhinia fortificata* leaves. *Journal of Natural Products*, 64 (5):829-832.

De Zwart, L. L.; Meerman, J. H. N.; Commandeur, J. N. M.; Vermeulen, N. P. E. (1999) Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology & Medicine*, 26: 202-226.

Deutschländer, M. S.; Van de Venter, M.; Roux, S.; Louw, J.; Lall, N. (2009) Hypoglycaemic activity of four plant extracts traditionally used in South Africa for diabetes. *J. Ethnopharmacol.*, 124: 619-624.

Diamant, M., & Heine, R. J. (2003). Thiazolidinediones in type 2 diabetes mellitus: current clinical evidence. *Drugs*, 63: 1373–1405.

Dreyfus, M.; Vandebunder, B.; Buc, H. (1980) Mechanism of Allosteric Activation of Glycogen Phosphorylase Probed by the Reactivity of Essential Arginyl Residues. *Physicochemical and Kinetic Studies. Biochemistry*, 19: 3634-3642.

Dugas Jr., A. J.; Castaneda-Acosta, J.; Bonin, G. C.; Price, K. L.; Fischer, N. H.; Winston, G. W. (2000) Evaluation of the total peroxy radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships. *Journal Natural Products*, 63: 327-331.

European Centre for the Validation of Alternative Methods, ECVAM (1990) MTT assay. *Invitox protocol*, 17: 1-6. Disponível em: <http://researcher.nsc.gov.tw/public/woody/Attachment/97171346771.pdf> Consulta efectuada a 13 de Dezembro de 2009.

Edwards, E.; Rodrigues, J.; Ferreira, J.; Goodall, D.; Rauter, A. P.; Justino, J.; Thomas-Oates, J. (2006) Capillary electrophoresis-mass spectrometry characterisation of secondary metabolites from the anti-hyperglycaemic plant *Genista tenera*. *Electrophoresis Wiley, Weinheim*, 27: 2164-2170.

Englist, K. N.; Englyst, H. N. (2005) Carbohydrate bioavailability. *British Journal of Nutrition*, 94: 1-15.

Es-Safi, N. E.; Kollmann, A.; Khelifi, S.; Ducrot, P. H. (2007) Antioxidative effect of compounds isolated from *Globularia alypum* L. Structure-activity relationship. *LWT- Food Sci. Technol*, 40: 1246-1252.

Estrada, O.; Hasegawa, M.; Gonzalez-Mujica, F.; Motta, N.; Perdomo, E.; Solorzano, A.; Méndez, J.; Méndez, B.; Zea, G. (2005) Evaluation of flavonoids from *Bauhinia megalandra* leaves as inhibitors of glucose-6-phosphatase system. *Phytotherapy Research*, 19: 859–863.

Evans, P. & Halliwell, B. (2001) Micronutrients: oxidant/anti-oxidant status. *British Journal of Nutrition*, 85: 67-74.

Evans, J.; Goldfine, I.; Maddux, B.; Grosky, G. (2003) Are oxidative stress-activated signalling pathways mediators of insulin resistance and β -cell dysfunction? *Diabetes*, 52:1-8.

Ferguson, L. R. (2001) Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation research*, 475: 89-111.

Ferrari, C. K. B. (2004) Functional foods, herbs and nutraceuticals: towards biochemical mechanisms of healthy aging. *Biogerontology*, 5: 275-289.

Ferreira, A. L. A. & Matsubara, L. S (1997) Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil*, 43(1): 61-68.

Ferrer, J. C.; Favre, C.; Gomis, R. R.; Fernández-Novell, J. M.; García-Rocha, M.; De La Iglesia, N.; Cid, E.; Guinovart, J. J. (2003) Control of glycogen deposition. *FEBS Letters*, 546: 127-132.

Foster, J. D.; Bode, A. M.; Nordlie, R. C. (1994) Time-dependent inhibition of glucose 6-phosphatase by 3-mercaptopycolinic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 1208: 222-228.

Foster, J. D.; Young, S. E.; Brandt, T. D.; Nordlie, R. C. (1998) Tungstate: a potent inhibitor of multifunctional glucose-6-phosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.* 354: 125-132.

Foster, J. D.; Nordlie, R. C. (2002) The Biochemistry and Molecular Biology of the Glucose-6-Phosphatase System. *Exp. Biol. Med.*, 227(8): 601-608.

Fowler, M. J. (2008) Diabetes treatment, part 3: insulin and incretins. *Clinical Diabetes*, 26: 35-39.

Frandsen, T.P.; Svensson, B. (1998) Plant alpha-glucosidases of the glycoside hydrolase family 31. Molecular properties, substrate specificity, reaction mechanism, and comparison with family members of different origin. *Plant Mol. Biol.*, 37: 1-13.

Freeman, S.; Bartlett, J. B.; Convey, G.; Hardern, I.; Teague, J. L.; Loxham, S. J. G.; Allen, J. M.; Poucher, S. M.; Charles, A. D. (2006) Sensitivity of glycogen phosphorylase isoforms to indole site inhibitors is markedly dependent on the activation state of the enzyme. *Br. J. Pharmacol.*, 149: 775-785.

Fulceri, R.; Gamberucci, A.; Scott, H. M.; Giunti, R.; Burchell, A.; Benedetti, A. (1995) Fatty acyl-CoA esters inhibit glucose-6-phosphatase in rat liver microsomes. *Biochem. J.*, 307: 391-397.

Gee, J.M.; Du Pont, M.S.; Day, A.J.; Plumb, G.W.; Williamson, G.; Johnson, I.T. (2000) Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. *Journal. Nutrition*, 130: 2765-2771.

Gerich, J. E.; Dailey, G. (2004) Advances in diabetes for the millennium: understanding insulin resistance. *Medscape General Medicine*, 6, (11). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1474824/>. Acesso em: 20 dez. 2009.

Gerrard, J. A.; Prince, M. J.; Abell, A. D. (2000) Kinetic characterization of enediol-based inhibitors of α -amylase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 10: 1575-1576.

Godbout, A. & Chiasson, J. L. (2007) Who should benefit from the use of alpha-glucosidase inhibitors? *Current Diabetes Reports*, 7: 333–339.

Gomis, R. R.; Favre, C.; Garcia-Rocha, M.; Fernandez-Novell, J. M.; Ferrer, J. C.; Guinovart, J. J. (2003) Glucose 6-phosphate produced by gluconeogenesis and by glucokinase is equally effective in activating hepatic glycogen synthase. *J Biol Chem*, 278: 9740-9746.

Gonzalez-Mujica, F.; Motta, N.; Estrada, O.; Perdomo, E.; Méndez, J.; Hasegawa, M. (2005) Inhibition of hepatic neoglucogenesis and glucose-6-phosphatase by quercetin 3-O- α - (2"-galloyl)rhamnoside isolated from *Bauhinia megalandra* leaves. *Phytotherapy Research*, 19: 624– 627.

Graça, M.; Caçador, H.; Faleiro, M.; Galego, L.; Almeida, V.; Costa, M. (2006) Antibacterial and antioxidant activities of essential oils isolated from *Origanum* spp and *Calamintha baetica*. Conference “Tradicional food processing and technological innovation in peripheral regions”, Faro: 1-14.

Grover, J. K.; Yadav, S.; Vats, V. (2002) Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. *Journal of Ethnopharmacology*, 81: 81-100.

Guigas, B.; Naboulsi, R.; Villanueva, G. R.; Taleux, N.; Lopez-Novoa, J. M.; Leverve, X. M.; El-Mir, M-Y. (2007) The flavonoid silibinin decreases glucose-6-phosphate hydrolysis in perfused rat hepatocytes by an inhibitory effect on glucose-6-phosphatase. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 20: 925-934.

Gutteridge, J. M. C. (1982) The role of superoxide and hydroxyl radicals in phospholipid peroxidation catalysed by iron salts. *FEBS Letters* 150 (2): 454-458.

Guzmán-Chozas, M.; Vicario, I. M.; Guillén-Sans, R. (1997) Spectrophotometric profiles of off-flavor aldehydes by using their reactions with 2-thiobarbituric Acid .*J. Agric. Food Chem.*, 45 (7): 2452–2457.

Harborne, J. B. (1994) Plants and their constituents. In: *Phytochemical Dictionary of Leguminosae*, Harborne, J. B. (ed.). Chapman & Hall, London: 313-330.

Ha, H.; Kim, K. H. (1999) Pathogenesis of diabetic nephropathy: the role of oxidative stress and protein kinase C. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 45:147-151.

Halliwel, I B.; Aeschbach, R.; Loliger, J.; Aruoma, O. I. (1995). The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 33: 601-617.

Halliwel, B. (1996) Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition* 16, 33-50.

Halliwel, B. (2001) Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: Therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs & Aging*, 18: 685-716.

Halliwel, B.; Rafter, J.; Jenner, A. (2005) Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? *American Journal of Clinical Nutrition*, 81: 268-276.

Hanamura, T.; Mayama, C.; Aoky, H.; Hirayama, Y.; Shimizu, M. (2006) Antihyperglycemic effect of polyphenols from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70: 1813-1820.

Hanefeld, M. (1998) The role of acarbose in the treatment of non-insulindependent diabetes mellitus. *J. Diabetes Complications*, 12: 228-237.

Havsteen, B. H. (2002) The biochemistry and medical significance of the flavonóides. *Pharmacology & Therapeutics*, 96: 67-202.

Hawkins, R. A.; Kamath, K. R.; Scott, H. M.; Burchell, A. (1995) Multiple transport protein defects in a patient with glycogen storage disease type 1: GSD Ib/Ic_β. *J. Inher. Metab. Dis.*, 18: 558-566.

Hemmerle, H.; Burger, H. J.; Below, P.; Schubert, G.; Rippel, R.; Schindler, P. W.; Paulus, E.; Herling, A. W. (1997) Chlorogenic acid and synthetic chlorogenic acid derivatives : novel inhibitors of hepatic glucose-6-phosphate translocase. *J. Med. Chem.*, 40: 137-145.

Heo, S. J.; Hwang, J. Y.; Choi, J. I.; Han, J. S.; Kim, H. J.; Jeon, Y. J. (2009) Diphlorethohydroxycarmalol isolated from *Ishige okamurae*, a brown algae, a potent α -glucosidase and α -amylase inhibitor, alleviates postprandial hyperglycemia in diabetic mice. *European Journal of Pharmacology*, 615: 252-256.

Hii, C. S. T.; Howell, S. L. (1985) Effects of flavonoids on insulin secretion and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ handling in rat islets of Langerhans. *Journal Endocr.*, 107: 1–8.

Hiroyuki, F.; Tomohide, Y.; Kazunori, O. (2001) Efficacy and safety of Touchi extract, an alpha-glucosidase inhibitor derived from fermented soybeans, in non-insulin-dependent diabetic mellitus. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 12: 351–356.

Hollman, P. C.; De Vries, J. H.; Van Leeuwen, S. D.; Mengelers, M. J.; Katan, M. B. (1995) Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *American Journal of Clinical Nutrition*, 62: 1276-82.

Hungenholtz, J.; Smid, E. J. (2002) Nutraceutical production with food-grade microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 497-507.

Huyer, G.; Liu, S.; Kelly, J.; Moffat, J.; Payette, P.; Kennedy, B.; Tsaprailis, G.; Gresser, M. J.; Ramachandran, C. (1997) Mechanism of inhibition of proteintyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate. *J. Biol. Chem.*, 272: 843-851.

Jardim, R.; Francisco, D. (2000) *Flora Endémica da Madeira*. Múchia Publicações, Funchal: 164-166.

Jayaprakasam, B.; Vareed, S.K.; Olson, L.K.; Nair, M.G. (2005) Insulin secretion by bioactive anthocyanins and anthocyanidins present in fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:28-31.

Jiang, F.; Dusting, G. J. (2003) Natural phenolic compounds as cardiovascular therapeutics: potential role of their anti-inflammatory effects. *Current Vascular Pharmacology*, 1: 135-156.

Johnson, L. N. (1992). Glycogen phosphorylase: control by phosphorylation and allosteric effectors. *FASEB J*, 6: 2274-2282.

Jorge, A. P.; Horstb, H.; De Sousa, E.; Pizzolattib, M. G.; Silva, F, R, M,B, (2004) Insulinomimetic effects of kaempferitrin on glycaemia and on ¹⁴C-glucose uptake in rat soleus muscle. *Chemico-Biological Interactions*, 149: 89–96.

Jung, M.; Park, M.; Lee, H. C.; Kang, E. S.; Kim, S. K. (2006) Antidiabetic agents from medicinal plants. *Current Medicinal Chemistry*, 13: 1203-1218.

Jung, U. J.; Lee, M. K.; Park, Y. B.; Kang, M. A.; Choi, M. S. (2006) Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type-2 diabetic mice. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38 (7): 1134-1145.

Kameda, Y.; Asano, N.; Yoshikawa, M.; Takeuchi, M. (1984) Valiolamine, A New R-Glucosidase Inhibiting Aminocyclitol Produced by *Streptomyces hygrosopicus*. *J. Antibiot.*, 37: 1301-1307.

Kandra, L.; Zajáč, J.; Remenyik, J.; Gyemánt, G. (2005) Kinetic investigation of a new inhibitor for human salivary α -amylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 334: 824-828.

Kannappan, S. & Anuradha, C. V. (2010) Naringenin enhances insulin-stimulated tyrosine phosphorylation and improves the cellular actions of insulin in a dietary model of metabolic syndrome. *Eur. J. Nutr.* 49:101-109.

Kasvinsky, P. J.; Shechosky, S.; Fletterick, R. J. (1978). Synergistic regulation of phosphorylase a by glucose and caffeine. *J Biol Chem*, 253:9102-9106.

Kato, A.; Nasu, N.; Takebayashi, K.; Adachi, I.; Minami, Y.; Sanae, F.; Asano, N.; Watson, A. A.; Nash, R. J. (2008) Structure-activity relationships of flavonoids as potential inhibitors of glycogen phosphorylase. *J. Agric. Food Chem.* 56: 4469-4473.

Khan, A.H. & Pessin, J. E. (2002) Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signaling pathways. *Diabetologia*, 45: 1475-1483.

Kim, J. S.; Kwon, C. S.; Son, K. H. (2000) Inhibition of alpha-glucosidase and alpha-amylase by luteolin, a flavonoide. *Biosc. Biotechnol. Biochem.*, 64 (11): 2458-2461.

Kim, J. I.; Kang, M. J.; Kim, J. C.; Ha, Y. R.; Lee, J. H.; Kwon, T. W.; Bae, S. Y.; Joo, H. J.; Kim, Y. S. (2006) Composition comprising chongkukjang extract or apigenin isolated from it, having blood glucose-lowering activities. Patent nr. KR2005071101-A.

Klinov, S. V.; Kurganov, B. I. (2001) Combined kinetic mechanism describing activation and inhibition of muscle glycogen phosphorylase b by adenosine 5'-monophosphate. *Biophysical Chemistry*, 92: 89-102.

Kohen, R.; Nyska, A. (2002) Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, 30 (6): 620–650.

Kosugi, H., Katob, T.; Kikugawab, K (1987) Formation of yellow, orange, and red pigments in the reaction of alk-2-enals with 2-thiobarbituric acid.

Kotra, G.; Daniel, H. (2007) Flavonoid glycosides are not transported by the human Na⁺/glucose transporter when expressed in *Xenopus laevis* oocytes, but effectively inhibit electrogenic glucose uptake. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 322 (2): 829-835.

Koyama, Y.; Abe, K.; Sano, Y.; Ishizaki, Y.; Njelekela, M.; Shoji, Y.; Hara, Y.; Isemura, M. (2004) Effects of green tea on gene expression of hepatic gluconeogenic enzymes in vivo. *Planta Med.* 70(11):1100-1102.

Kurukulasuriya, R, Link, J. T.; Madar, D. J. (2003) Potential drug targets and progress towards pharmacologic inhibition of hepatic glucose production. *Curr. Med. Chem.*, 10: 123-153.

Kwak, N. & Jukes, D. J. (2001) Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept. *Food Control*, 12: 99-107.

Lee, D. S. & Lee, S. H.; (2001) Genistein, a soy isoflavone, is a potent alpha-glucosidase inhibitor. *FEBS Letters*, 501: 84–86.

Lee, J. S. (2006) Effects of soy protein and genisteina on blood glucose, antioxidant enzyme activities, and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sciences*, 79: 1578-1584.

Lerín, C.; Montell, E.; Nolasco, T.; García-Rocha, M.; Guinovart, J. J.; Gómez-Foix, A. M. (2004) Regulation of glycogen metabolism in cultured human muscles by the glycogen phosphorylase inhibitor CP-91149. *Biochem. Journal*, 378: 1073–1077.

Li, J. M.; Che, C. T.; Lau, C. B. S.; Leung, P. S.; Cheng, C. H. K. (2006) Inhibition of intestinal and renal Na⁺-glucose cotransporter by naringenin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38, (5-6): 985-995.

Liu, Z.; Barret, E. J.; Dalkin, A. C.; Zwart, A. D.; Chou, J. Y. (1994) Effect of acute diabetes on rat hepatic glucose-6-phosphatase activity and its messenger RNA level. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 205: 680-686.

Liu, R. H. (2004) Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *The Journal of Nutrition*, 134: 3479S-3485S.

Liu, D.; Zhen, W.; Yang, Z.; Carter, J. D.; Si, H.; Reynolds, K. A. (2006) Genistein acutely stimulates insulin secretion in pancreatic β -Cells through a cAMP-dependent protein kinase pathway. *Diabetes*, 55: 1043–1050.

Liu, I. M.; Liou, S. S.; Cheng, J. T.; (2006) Mediation of β -endorphin by myricetin to lower plasma glucose in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 104: 199–206.

Loizzo, M. R.; Saab, A. M.; Tundis, R.; Menichini, F.; Bonesi, M.; Piccolo, V.; Statti, G. A.; de Cindio, B.; Houghton, P. J.; Menichini, F. (2008) In vitro inhibitory activities of plants used in Lebanon traditional medicine against angiotensin converting enzyme (ACE) and digestive enzymes related to diabetes. *J. Ethnopharmacol.*, 119: 109-116.

Lomako, J.; Lomako, W. M.; Whelan, W. J. (1991) Proglycogen: a low molecular-weight form of muscle glycogen. *FEBS Lett.*, 279 (2): 223-228.

Lowry, O. H.; Schulz, D. W.; Passonneau, J. V. (1967) The Kinetics of Glycogen Phosphorylases from Brain and Muscle. *The Journal of Biological Chemistry*, 242 (2): 271-280.

Lv, L.; Wu, S. Y.; Wang, G. F.; Zhang, J. J.; Pang, J. X.; Liu, Z. Q.; Xu, W.; Wu, S. G.; Rao, J. J. (2010) Effect of Astragaloside IV on hepatic glucoseregulating enzymes in diabetic mice induced by a high-fat diet and streptozotocin. *Phytotherapy Research*. 24: 219-224.

Mai, T. T.; Thu, N. N.; Tien, P. G.; Chuyen, N. V.(2007) Alpha-glucosidase inhibitory and antioxidante activities of vietnamese edible plants and their relationships with polyphenols contents. *Journal Nutr. Sci. Vitaminol*, 53: 267-276.

Manach, C; Williamson, G.; Morand, C.; Scalbert, A.; Rémésy, C. (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition* 81: 230S-242S.

Manolescu, A. R.; Witkowska, K.; Kinnaird, A.; Cessford, T.; Cheeseman, C. (2007) Facilitated hexose transporters: new perspectives on form and function. *Physiology*, 22: 234-240.

Mao, C. P; Gu, Z. L.(2005) Puerarin reduces increased c-fos, c-jun, and type IV collagen expression caused by high glucose in glomerular mesangial cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 26 (8): 982-986.

Marcucci, O.L.; González-Mujica, F.; Perez-Ayuso, E. (1983) Alterations of liver nuclear envelopes accompanying thioacetamide administration in rats. *Acta Cient Venez* 34: 109-117.

Marles, R. J.; Farnsworth, N. R. (1995) Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine*, 2: 133-189.

Martin, W. H.; Hoover, D. J.; Armento, S .J.; Stoc, I. A.; McPherson, R. K.; Danley, D. E.; Stevenson, R. W.; Barrett, E. J.; Treadway, J. L. (1998) Discovery of a human liver glycogen phosphorylase inhibitor that lowers blood glucose in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 95 (4):1776–1781.

Martins, A.; Almoester-Ferreira, M. A.; Borges, C.; Rauter, A. P.; Brum-Bousquet, M.; Tillequin, F.; González, A. G.; Bermejo, J. (2002) Flavonoids from *Genista tenera*. In: *Natural Products in the New Millennium: Prospects and Industrial Application, Proceedings of the Phytochemical Society of Europe*, Rauter, A. P.; Palma, F. B.; Justino, J.; Araújo, M.E.; Santos, S. P. (eds.). Kluwer Academic, Dordrecht, 47: 111-117

Martins, A.; Wink, M.; Tei, A.; Brum-Bousquet, M.; Tillequin, F.; Rauter, A. P. (2005) A phytochemical study of the quinolizidine alkaloids from *Genista tenera* by gas chromatography-mass spectrometry. *Phytochemical Analysis*, 16: 264-266.

Massillon, D.; Bollen, M.; De Wulf, H.; Overloop, K.; Vanstapel, F., Van Hecke, P.; Stalmans, W. (1995) Demonstration of a glycogen/glucose 1-phosphate cycle in hepatocytes from fasted rats : selective inactivation of phosphorylase by 2-deoxy-2-fluoro- α -D-glucopyranosylfluoride. *J. Biol. Chem.*, 270: 19351-19356.

Matsui, T.; Ueda, T.; Oki, T.; Sugita, K.; Terahara, N.; Matsumoto, K. (2001) α -Glucosidase inhibitory action of natural acylated anthocyanins. 1. Survey of natural pigments with potent inhibitory activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 1948–1951.

Matsui, T.; Kobayashi, M.; Hayashida, S.; Matsumoto, K. (2002) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66 (3): 689-692. Luteolin, a flavon, does not suppress post prandial glucose absorption through an inhibition of α -glucosidase action.

Matsui, T.; Ogunwande, I. A.; Abesundara, K. J. M.; Matsumoto, K. (2006) Anti-hyperglycemic potential of natural products. *Mini Rev. Med. Chem.*, 6:109-120.

Matsui, T.; Tanaka, T.; Tamura, S.; Toshima, A.; Miyata, Y.; Tanaka, K.; Matsumoto, K. (2007) α -glucosidase inhibitory profile of catechins and theaflavins. *J. Agric. Food Chem.*, 55: 99-105.

McCormack, J. G.; Westergaard, N.; Kristiansen, M.; Brand, C. L.; Lau, J. (2001) Pharmacological approaches to inhibit endogenous glucose production as a means of anti-diabetic therapy. *Current Pharmaceutical Design*, 7: 1451-1474.

McDougall, G. J.; Stewart, D. (2005) The inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes. *Biofactors*, 23: 189-195.

Meezan, E.; Meezam, E. M.; Jones, K.; Moore, R.; Barnes, S.; Prasain, J. K. (2005) Contrasting effects of puerarin and daidzin on glucose homeostasis in mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 8760-8767.

Mithieux, G., Zitoun, C. (1996) Mechanisms by which fatty-acyl-CoA esters inhibit or activate glucose-6-phosphatase in intact and detergent-treated rat liver microsomes. *Eur. J. Biochem.*, 235: 799-803.

Mithieux, G.; Daniele, N.; Payraastre, B.; Zitoun, C. (1998) Liver microsomal glucose-6-phosphatase is competitively inhibited by the lipid products of phosphatidylinositol-3-kinase. *J. Biol. Chem.*, 273: 17-19.

Mithieux, G.; Guignot, L.; Bordet, J. C. (2002) Wiernsperger N: Intrahepatic mechanisms underlying the effect of metformin in decreasing basal glucose production in rats fed a high-fat diet. *Diabetes*, 51:139-143.

Moller D. (2001) New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature*, 414:821-827.

Moore, M. C.; Cherrington, A. D.; Wasserman, D. H. (2003) Regulation of hepatic and peripheral glucose disposal. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 17: 343-364.

Moraes, F. P. & Colla, L. M.(2006) Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. *Revista Eletrônica de Farmácia*, 3 (2): 109-122.

Mukherjee, P. K.; Maiti, K.; Mukherjee, K.; Houghton, P. J. (2006) Leads from Indian medicinal plants with hypoglycemic potentials. *Journal of Ethnopharmacology*, 106: 01-28.

Muraina, I. A.; Suleiman, M. M.; Eloff, J. N. (2009) Can MTT be used to quantify the antioxidant activity of plant extracts? *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy & Phytopharmacology*. Disponível: <http://www.thefreelibrary.com/Can+MTT+be+used+to+quantify+the+antioxidant+activity+of+plant...-a0226382360>. Consulta efectuada a 22 de Outubro de 2010.

Muralikrishna, G. & Nirmala, M. (2005) Cereal α -amylases – an overview. *Carbohydrate Polymers*, 60: 163-173.

Narisawa, K.; Otomo, H.; Igarashi, Y.; Aral, N.; Otake, M.; Tada, K.; Kuzuya, T. (1983) Glycogen storage disease type 1b: microsomal glucose-6-phosphatase system in two patients with different clinical findings. *Pediatr.*, 17: 545-549

National Research Council (1976) *Fat Content and Composition of Animal Products*. Printing and Publishing Office: National Academy of Science Washington D.C. Disponível: http://books.nap.edu/openbook.ph?chapselect=yo&page=230&record_id=22&Jump+to+specified+Page.x=o&Jump+to+specified+Page.y=o. Consulta efectuada a 12 de Janeiro de 2010.

Neuhouser, M. L. (2004) Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies. *Nutrition and Cancer*, 50: 1-7.

Newgard, C. B; Hwang, P. K.; Fletterick, R. J. (1989). The family of glycogen phosphorylases: structure and function. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 24: 69-99.

Nichenametla, S. N.; Taruscio; T. G.; Barney; D. L. Exon, J. H. (2006) A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46: 161-183.

Nishikawa, T.; Edelstein, D.; Du, X. L., Yamagishi, S. I.; Matsumura, T.; Kaneda, Y.; Yorek, M. A.; Beebe, D.; Oates, P. J.; Hammes, H. P.; Giardino, I.; Brownlee, M. (2000) Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*, 404: 787–790.

Nishikawa, T.; Edelstein, D.; Brownlee, M. (2000) The missing link: a single unifying mechanism for diabetic complications. *Kidney International*, 58: 26–30.

Nishizono, S.; Tanaka, K.; Okada, T.; Murai, H. (2007) Diabetes prevention composition for use in pharmaceutical or food/beverage products, contains rutin as active ingredient. Patent nr. JP2007070263-A.

Nordberg, J. & Arner, E. S. (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine* 31: 1287-1312.

Nordlie, R. C. (1979) Multifunctional glucose-6-phosphatase: celular biology. *Life Science*, 24: 2397-2402

Nordlie R. C.; Foster, J. D.; Lange, A. J. (1999) Regulation of glucose production by the liver. *Annual Review of Nutrition*, 19: 379-406.

Nordlie, R. C. & Foster, J. D. (2010) A retrospective review of the roles of multifunctional glucose-6-phosphatase in blood glucose homeostasis: Genesis of the tuning/retuning hypothesis. *Life Sciences*, 87: 339-349.

Novaes, A. P.; Rossi, C.; Poffo, C.; Pretti Júnior, E.; Oliveira, A. E.; Schlemper, V.; Niero, R.; Cechinel-Filho, V.; Bürger, C. (2001) Preliminary evaluation of the hypoglycemic effect of some Brazilian medicinal plants. *Therapie*, 56: 427-430.

Oikonomakos, N. G.; Schnier, J. S.; Zographos, S. E.; Skamnaki, V. T.; Tsitsanou, K. E.; Johnsoni, L. N. (2000) Flavopiridol inhibits glycogen phosphorylase by

binding at the inhibitor site. *The Journal of Biological Chemistry*, 275 (44): 34566-34573.

Oikonomakos, N. G. (2002) Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy. *Current Protein and Peptide Science*, 3: 561-586.

Oikonomakos, N. G.; Kosmopoulou, M. N.; Chrysina, E. D.; Leonidas, D. D.; Kostas, I. D.; Wendt, K. U (2005). Crystallographic studies on acyl ureas, a new class of glycogen phosphorylase inhibitors, as potential antidiabetic drugs. *Protein Science*, 14: 1760-1771.

Oki, T.; Matsui, T.; Osajima, Y. (1999) Inhibitory Effect of r-Glucosidase Inhibitors Varies According to Its Origin. *J. Agric. Food Chem.*, 4: 550-553.

Omoigui, O.S. (2006) Prevention and treatment of aging and age-related disorders e.g. peripheral vascular disease, coronary artery disease, arthritis, Alzheimer disease involves administration of components inhibiting specific interleukin mediated inflammation. Patent nrs. US2006078533-A1 and WO2006121558-A2

Onda, K; Suzuki, T; Shiraki, R. (2008) Synthesis of 5-chloro-*N*-aryl-1H-indole-2-carboxamide derivatives as inhibitors of human liver glycogen phosphorylase a. *Bioorg. Med. Chem.*, 16: 5452-5464.

Ong, K. C.; Khoo, H. E. (1996) Insulinomimetic effects of myricetin on lipogenesis and glucose transport in rat adipocytes but not glucose transporter translocation. *Biochemical Pharmacology*, 51(4): 423-429.

Ong, K. C.; Khoo, H.E. (2000) Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. *Life Sciences*, 67: 1695-1705.

Ozyurt, D.; Demirata, B.; Apak, R. (2007) Determination of total antioxidant capacity by a new spectrophotometric method based on Ce (IV) reducing capacity measurement. *Talanta*, 71: 1155-1165.

Palmeira, C. M.; Rolo, A. P.; Berthiaume, J.; Bjork, J.; Kendall, W. B. (2007) Hyperglycemia decreases mitochondrial functions: the regulatory role of mitochondrial biogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 225: 214-220.

Park, S. A.; Choi, M. S.; Cho, S. Y.; Seo, J. S.; Jung, U. J.; Kim, M. J.; Sung, M. K.; Park, Y. B.; Lee, M. K. (2006) Genistein and daidzein modulates hepatic glucose and lipid regulating enzyme activities in C57BL/KsJ-db/db mice. *Life Sciences*, 79: 1207-1213.

Payan, F. (2004) Structural basis for the inhibition of mammalian and insect α -amilase by plant protein inhibitors. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1969: 171-180.

Pinent, M.; Blay, M.; Bladé, M. C.; Salvadó, M. J.; Arola, L.; Ardévol, A. (2004) Grape seed-derived procyanidins have an antihyperglycemic effect in streptozotocin-induced diabetic rats and insulinomimetic activity in insulin-sensitive cell lines. *Endocrinology*, 145 (11): 4985-4990.

Prince, P. S. M.; Kamalakkannan, N. (2006) Rutin improves glucose homeostasis in streptozotocin diabetic tissues by altering glycolytic and gluconeogenic enzymes. *Journal Biochem Molecular Toxicology*, 20(2): 96–102.

Radziuk, J. & Pye, S. (2001) Hepatic glucose uptake, gluconeogenesis and the regulation of glycogen synthesis. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 17: 250–272.

Raederstorff, D.; Wang-Schmidt, Y.; Wolfram, S. (2007) Use of resveratrol in combination with (–)-epigallocatechin gallate, coenzyme Q-10, genistein, lycopene, hydroxytyrosol and/or polyunsaturated fatty acids for delaying aging and/or for the treatment or prevention of age-related diseases, Patent nr.WO2007042272-A2.

Ram, V. J.; Farhanullah; Tripathi, B. K.; Srivastava, A. K. (2003). Synthesis and antihyperglycemic activity of suitably functionalized 3H-quinazolin-4-ones. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 11: 2439–2444.

Ramaa, C. S.; Shirode, A. R.; Mundada, A. S.; Kadam, V. J. (2006). Nutraceuticals - an emerging era in the treatment and prevention of cardiovascular diseases. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 7: 15-23.

Rath, V. L.; Ammirati, M.; Danley, D. E.; Ekstrom, J. L.; Gibbs, E. M.; Hynes, T. R.; Mathiowetz, A. M.; McPherson, R. K.; Olson, T. V.; Treadway, J. L.; Hoover, D. J. (2000) Human liver glycogen phosphorylase inhibitors bind at a new allosteric site. *Chem. Biol.*, 7: 677-682.

Rauter, A. P.; Martins, A.; Borges, C.; Ferreira, J.; Justino, J.; Bronze, M. R.; Coelho, A. V.; Choi, Y. H.; Verpoorte, R. (2005) Liquid chromatography diode-array detection-electrospray ionization mass spectrometry/nuclear magnetic resonance analyses of the anti-hyperglycaemic flavonoid extract of *Genista tenera*. Structure elucidation of a flavonoid-C-glycoside. *Journal of Chromatography A*, 1089: 59-64.

Rauter, A. P.; Ferreira, J.; Martins, A.; Lopes, J.; R.; Serralheiro, L. M.; Araújo, E.; Borges, C.; Justino, J.; Silva, F. V.; Goulart, M.; Thomas-Oates, J.; Rodrigues, J. A.; Edwards, E.; Noronha, J. P.; Pinto, R.; Mota-Filipe, H. (2009). Bioactivity studies and chemical profile of the antidiabetic plant *Genista tenera* *Journal of Ethnopharmacology*, 122 384–393.

Reddy, K. A.; Lohray, B. B.; Bhushan, V.; Reddy, S.; Mamidi, N. V. (1999). Novel antidiabetic and hypolipidemic agents. 5 Hydroxyl versus benzyloxy containing chroman derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, 42: 3265-3278.

Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.*, 20: 933-956.

Roach, P. J. (2002) Glycogen and its metabolism. *Current Molecular Medicine*, 2: 101-120.

Roberfroid, M. (2002). Functional food concept and its application to prebiotics. *Digestive and Liver Disease*, 34, (2): 105-110.

Robertson, R. P.; Harmon, J.; Tran, P. O.; Tanakada, Y.; Takahashi, H. (2003) Glucose toxicity in β -cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes*, 52: 581-587.

Roden, E. & Bernroider, E. (2003) Hepatic glucose metabolism in humans - its role in health and disease. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 17 (3): 365-383.

Rodríguez, M.; Hasegawa, M.; González-Mújica, F.; Motta, N.; Castillo, A.; Castillo, J.; Zea, E.; Mora, K.; Sousa, L.; González, A.; Camejo, D. (2008) Antidiabetic and antiradical activities of plants from Venezuelan Amazon. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 18 (3): 331-338

Rolo, A. P. & Palmeira, C. M. (2006) Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycaemia and oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 212: 167-178.

Rösen, P.; Naworth, P. P.; King, G.; Möler, W.; Trischler, H. J.; Packer, L. (2001) The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes Metabolism Research and Reviews*, 17: 189-212.

Rush, J. W. E. & Spriet, L. L. (2001) Skeletal muscle glycogen phosphorylase a kinetics: effects of adenine nucleotides and caffeine. *J Appl Physiology*, 91: 2071-2078.

Sakai, K; Matsumoto, K.; Nishikawa, T.; Suefuji, M.; Nakamaru, K.; Hirashima, Y.; Kawashima, J.; Shirotani, T.; Ichinose, K.; Brownlee, M.; Araki, E. (2003) Mitochondrial reactive oxygen species reduce insulin secretion by pancreatic β -cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 300: 216-222.

Saltiel, A. R.; Kahn, C. R. (2001). Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414: 799-806

Saqib, U.; Siddiqi, M. I. (2008) Probing ligand binding interactions of human alpha glucosidase by homology modelling and molecular docking. *International Journal of Integrative Biology*, 2 (2):116-121.

Satyanarayana, M.; Tiwari, P.; Tripathi, B. K.; Srivastava, A. K.; Pratap, R. (2004) Synthesis and antihyperglycemic activity of chalcone based aryloxypropanolamines. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 12, 883–889.

Scalbert, A.; Manach, C.; Morand, C.; Remesy, C.; Jimenez, L. (2005) Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45: 287-306.

Sergienko, E. A. & Srivastava, D. K. (1997) Kinetic mechanism of the glycogen-phosphorylase-catalysed reaction in the direction of glycogen synthesis : cooperative interactions of AMP and glucose 1-phosphate during catalysis *Biochem. J.*, 328: 83-91.

Schaffingen, E. V. & Gerin, I. (2002) The glucose-6-phosphatase system. *Biochem J*, 362:513-532.

Sharma, D. K. (2006) Bioprospecting for drug research and functional foods for the prevention of diseases-role of flavonoids in drug development. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 65: 391-401.

Shetty, A. K.; Rashmia, R ; Rajanb, M. G. R ; Sambaiaha, K; Salimatha, P. V (2004) Antidiabetic influence of quercetin in streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutrition Research*, 24 (5): 373-381.

Shimizu, M.; Kobayashi, Y.; Suzuki, M.; Satsu, H.; Miyamoto, Y. (2000) Regulation of intestinal glucose transport by tea catechins. *BioFactors*, 13: 61–65.

Silva, F. R. M. B.; Szpoganicz, B.; Pizzolatti, M. G.; Willrich, M. A. V.; de Sousa, E. (2002) Acute effect of *Bauhinia forficata* on serum glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 83: 33-37.

Singh, J.; Nordlie, R. C.; Jorgenson, R. A. (1981) Vanadate : a potent inhibitor of multifunctional glucose-6-phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* 678: 477-482.

Skyler, J. S. (2004) Diabetes Mellitus: Pathogenesis and treatment strategies. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47: 4113-4117.

Soczynska-Kordala, M.; Bakowska, A.; Oszmianski, J.; Gabrielska, J. (2001) Metal ion-flavonoid associations in bilayer phospholipid membranes. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 6: 277-281.

Somsák, L.; Nagy, V.; Hadady, Z.; Docsa, T.; Gergely, P. (2003) Glucose analog inhibitors of glycogen phosphorylases as potential antidiabetic agents: recent developments. *Curr. Pharm. Design*, 9: 1177-1189.

Somsák, L.; Czifrák, K.; Tóth, M.; Bokor, É.; Chrysina, E. D.; Alexacou, K. M.; Hayes, J.M.; Tiraidis, C.; Lazoura, E.; Leonidas, D. D.; Zographos; S. E.; Oikonomakos, N. G.; (2008) New inhibitors of glycogen phosphorylase as potential antidiabetic agents. *Current Medicinal Chemistry*, 15: 2933-2983.

Sorensen, J, F.; Kragh, K. M.; Sibbesen, O.; Delcour, J.; Goesaert, H.; Svensson, B.; Tahir, T. A.; Brufau, J.; Perez-Vendrell, A. M.; Bellincampi, D.; D'Ovidio, R.; Camardella, L.; Giovane, A.; Bonnin, E.; Juge, N. (2004) Potential role of glucosidase inhibitors in industrial biotechnological applications. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1696: 275-287.

Spencer, J. P.; Abd-el-Mohsen, M. M. Rice-Evans, C. (2004) Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 423: 148-161.

Speth, M. & Schulze, H. U. (1986) Is thermostability of glucose-6-phosphatase indeed dependent on a stabilizing protein ? FEBS Lett. 202: 32-36.

Speth, M. & Schulze, H. U. (1992) Protease inhibitors but not proteases inhibit the glucose-6-phosphatase of native rat liver microsomes. Biochem. Biophys. Res. Commun., 183: 590-597.

Speth, M. & Schulze, H. U. (1992) The purification of a detergent-soluble glucose-6-phosphatase from rat liver. Eur. J. Biochem. 208: 643-650.

Srivastava, A. K.; Pandey, S. K. (1998) Potential mechanism(s) involved in the regulation of glycogen synthesis by insulin. Molecular and Cellular Biochemistry, 182: 135-141.

Staehr, P.; Hother-Nielsen, O.; Levin, K.; Holst, J. J.; Beck-Nielsen, H. (2001) Assessment of hepatic insulin action in obese type 2 diabetic patients. Diabetes, 50: 1363-1370.

Stanner, S. A.; Hughes, J.; Kelly, C. N. M.; Buttriss, J. (2004) A review of the epidemiological evidence for the 'antioxidant hypothesis'. Public Health Nutrition, 7: 407-422.

Stolar, M. W.; Hoogwerf, B. J.; Gorshow, S. M.; Boyle, P. J.; Wales, D. O. (2008) Managing type 2 diabetes: going beyond glycemic control. Journal of Managed Care Pharmacy, 14 (5): S2-S19.

Strobl, S.; Maskos, K.; Wiegand, G.; Huber, R.; Gomis-Rüth, F. X.; Glockshuber, R. (1998) A novel strategy for inhibition of α -amilases: yellow meal worm α -amilase in complex with the Ragi bifunctional inhibitor at 2.5 Å resolution. Structure, 6 (7), 911-921.

Sumi, Y (2008) Research and technology trends of nutraceuticals. Science & Technology Trends, 28:10-22.

Taha, C. & Klip, A. (1999) The insulin signaling pathway. *Journal of Membrane Biology*, 169:1-12.

Tarasov, A.; Dusonchet, J.; Ashcroft, F. (2004) Metabolic regulation of the pancreatic β -Cell ATP-sensitive K^+ channel. *A pas de deux. Diabetes*, 53 (3): S113-S122.

Teixeira, V. L.; Rocha, F. D.; Houghton, P. J.; Kaplan, M. A. C.; Pereira, R. C. (2007) Alpha-amylase inhibitors from Brazilian seaweeds and their hypoglycemic potential. *Fitoterapia*, 78: 35-36.

Titarenko, E.; Chrispeels, M. (2000) cDNA cloning, biochemical characterization and inhibition by plant inhibitors of the α -amylases of the Western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30: 979-990.

Todd, J. F. & Bloom, S. R. (2007) Incretins and peptides in the treatment of diabetes. *Diabetic Medicine*, 24: 223-232.

Treadway, J. L.; Mendys, P.; Hoover, D. J. (2001) Glycogen phosphorylase inhibitors for treatment of type 2 diabetes mellitus. *Expert Opin Investig Drugs*, 10 (3): 439–454.

Tsuda, H.; Ohshima, Y.; Nomoto, H.; Fujita, K.; Matsuda, E.; Iigo, M.; Takasuka, N.; Moore, M. A. (2004) Cancer prevention by natural compounds. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 19: 245-263.

Tsuneki, H.; Ishizuka, M.; Teresawa, M.; Wu, J. B.; Sasaoka, T.; Kimura, I. (2004) Effect of green tea on blood levels and serum proteomic patterns in diabetic (db/db) mice and on glucose metabolism in healthy humans. *BMC Pharmacology*, 4: 18-28.

Tundis, R.; Loizzo, M. R.; Menichini, F. (2010) Natural products as α -amylase and α -glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: an update. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 10: 1-14.

USDA, United States Department of Agriculture (2000) Egg-grading manual. Agricultural marketing service. agricultural handbook number 75. Disponível: <http://www.ams.usda.gov/AMSV1.0/getfile?dDocName=STELDEV3004502>.

Consulta efectuada a 12 de Janeiro de 2010.

Van de Laar, F. A.; Lucassen, P. L.; Akkermans, R. P.; Van de Lisdonk, E. H.; Rutten, G. E.; Van Weel, C. (2005) α -Glucosidase inhibitors for patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 28: 166-175.

Van Hoorn, D. E. C.; Nijveldt, R. J.; Van Leeuwen, P. A. M.; Hofman, Z.; M'Rabet, L.; De Bont, D. B.; Van Norren, K. (2002) Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids. *Eur. J. Pharmacol.*, 451: 111-118.

Van Schaftingen, E. & Gerin, I. (2002) The glucose-6-phosphatase system. *Biochem. J.*, 362: 513-532.

Venkatesh, S.; Reddy, G. D.; Reddy, B. M.; Ramesh, M.; Appa Rao, A. V. N. (2003) Anti- hyperglycaemic activity of *Caralluma attenuata*. *Fitoterapia*, 74: 274-179.

Vertesy, L.; Burger, H. J.; Kenja, J.; Knauf, M.; Kogler, H.; Paulus, E. F.; Ramakrishna, N. V.; Swamy, K. H.; Vijayakumar, E. K.; Hammann, P. (2000) Kodaistatins, novel inhibitors of glucose-6-phosphate translocase T1 from *Aspergillus terreus* thom DSM 11247. Isolation and structural elucidation. *J. Antibiot.*, 53: 677-686.

Vertesy, L.; Kurz, M.; Paulus, E. F.; Schummer, D.; Hammann, P. (2001) The chemical structure of mumbaistatin, a novel glucose-6-phosphate translocase inhibitor produced by *Streptomyces* sp. DSM 11641. *J. Antibiot.*, 54: 354-363.

Vessal, M.; Hemmatia, M.; Vaseib, M. (2003) Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 135: 357–364.

Wagman, A. S.; Nuss, J. M. (2001) Current Therapies and Emerging Targets for the Treatment of Diabetes. *Curr. Pharm. Design*, 7: 417-450.

Wang, L.; Tu, Y.C.; Lian, T.W.; Hung, J.T.; Yen, J.H.;Wu, M.J. (2006) Distinctive Antioxidant and Antiinflammatory Effects of Flavonols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 9798-9804.

Wang, Z. X. (1999) Influence of substrates on *in vitro* dephosphorylation of glycogen phosphorylase *a* by protein phosphatase-1. *Biochem. J.*, 341: 545-554.

Willcox, J. K.; Ash, S. L.; Catignani, G. L. (2004) Antioxidants and prevention of chronic disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44: 275-295.

Williams, R. J.; Spencer, J. P. E.; Rice-Evans, C.; (2004) Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biology and Medicine*, 36: 838-849.

Whitcomb, D. C. & Lowe, M. E. (2007) Human pancreatic digestive enzymes. *Dig Dis Sci*, 52: 1-17.

WHO, World Health Organization. (2010) Diabetes. Disponível: http://www.who.int/diabetes/facts/world_figures/en/ Consulta efectuada a 12 de Março de 2010.

WHO, World Health Organization. (2010) Diabetes. Disponível: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/print.html>. Consulta efectuada a 12 de Março de 2010.

WHO, World Health Organization. (2000) General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine. Disponível:

<http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Jwhozip42e/>. Consulta efectuada a 12 de Março de 2010.

Xing, X-H.; Zhang, Z-M.; Hu, X-Z.; Wu, R-Q.; Xu, C. (2009) Antidiabetic effects of *Artemisia sphaerocephala* Krasch. gum, a novel food additive in China, on streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 125: 410-416.

Yamabe, N.; Yokozawa, T.; Oya, T.; Kim; M. (2006) *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 319:228–236.

Yamashita, K.; Sugawara, S.; Sakairi, I. (1984) Effects of an alpha-glucosidase inhibitor, acarbose, on blood glucose and serum lipids in streptozotocin induced diabetic rats. *Horm Metab Res*, 16: 179-182.

Yin, J.; Heo, S. I.; Wang, M. H. (2008) Antioxidant and antidiabetic activities of extracts from *Cirsium japonicum* roots. *Nutrition Research and Practice*, 2 (4): 247-251.

Zareba, G.; Serradell, N.; Castañer, R.; Davies, S. L.; Prous, J.; Mealy, N. (2005) *Phytotherapies for diabetes. Drugs of the Future*, 30: 1253-1282.

Zarzuelo, A.; Jimenez, I.; Gámez, M.J.; Utrilla, P.; Fernades, I.; Torres, M. I. Osuna, I. (1996) Effects of luteolin 5-O- β -rutinoside in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sciences*, 58 (25): 2311-2316.

Zhao, H.; Yakar,S.; Gavrilova, O.; Sun, H.; Zhang, Y.; Kim, H.; Setser, J.; Jou, W.; Le-Roith, D. (2004) Phloridzin improves hyperglycemia but not hepatic insulin resistance in a transgenic mouse model of type 2 diabetes. *Diabetes*, 53:2901–2909

Zoccoli, M. A. & Karnovsky, M. L. (1980) Effect of two inhibitors of anion transport on the hydrolysis of glucose 6-phosphate by rat liver microsomes. *Covalent*

modification of the glucose 6-P transport component. J. Biol. Chem. 255, 1113-1119.

Zographos, S. E.; Oikonomakos, N. G.; Tsitsanou, K. E. (1997) The structure of glycogen phosphorylase *b* with an alkyl-dihydropyridine-dicarboxylic acid compound, a novel and potent inhibitor. Structure, 5 (11): 1413-1425.

6.2 MEDIAGRAFIA

Regulação do metabolismo da glucose. Adaptado de <http://health.howstuffworks.com/diabetes1.htm>. Consulta efectuada a 26 de Janeiro de 2010.

Mecanismo de secreção de insulina pelo pâncreas. Adaptado de <http://www.lookfordiagnosis.com>. Consulta efectuada a 04 de Dezembro de 2009.

Região do substrato onde ocorrerá a clivagem decorrente da acção da enzima α -glucosidase (seta preta) (Adaptado de http://www.sigmaaldrich.com/Área_of_interest/Biochemicals/Enzyme_Explorer/Key_Resources/Carbohydrate_Analysis.htm . Consulta efectuada a 19 de Dezembro de 2009).