



Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

Caracterização de uma planta com propriedades hipoglicemiantes – *Cytisus multiflorus*

-Tese de Mestrado-

Realizado por:
Inês Pereira Vieira
4862

Orientadoras:

Prof.^a Doutora Célia Maria Miguel Antunes
(Departamento de Química/Universidade de Évora)
Prof.^a Doutora Dora Maria Fonseca Ginja Martins Teixeira
(Departamento de Química/Universidade de Évora)

Évora
2010

“Quanto maiores são as dificuldades a vencer, maior será a satisfação.”
(Cícero)

“Supor é bom, descobrir é melhor.”
(Mark Twain)

Agradecimentos

A realização desta tese de mestrado só foi possível devido à contribuição de várias pessoas que me acompanharam ao longo deste ano lectivo, e que de certo modo me ajudaram a ultrapassar as várias adversidades que foram surgindo.

Deste modo, quero agradecer em primeiro lugar às minhas orientadoras de mestrado, a Professora Célia Antunes e a Professora Dora Teixeira, pelo apoio, orientação e amizade que foram demonstrando ao longo desta fase do meu percurso académico.

À Professora Ana Costa agradeço o companheirismo, prontidão e a boa disposição que sempre demonstrou.

Ao Professor João Nabais agradeço a cedência de referências bibliográficas.

À D. Jesuína e à Anabela agradeço toda a ajuda disponibilizada, assim como a boa disposição demonstrada diariamente.

Aos meus “subordinados” André Bonacho e Cláudia Pereira agradeço os bons momentos passados na vossa companhia. Aquelas “lutas renhidas” passadas no laboratório e os momentos de paródia ficarão para sempre na minha memória. Aliás a minha tese de mestrado não seria a mesma coisa sem a vossa presença. Tive muito gosto em trabalhar convosco.

Agradeço às minhas amigas Ana Conim, Raquel Ferro, Vera Pires e Cátia Silva pelo companheirismo e amizade. À Ana Conim quero também agradecer pela paciência, pois sete anos a aturar-me já é muita coisa. Quanto a ti Raquel foste uma boa surpresa ao longo do mestrado. Obrigada Vera e Cátia por estarem sempre presentes quando precisei apesar da distância. Um muito obrigado pelos bons momentos que temos passado juntas.

Aos meus pais, sem os quais não teria sido possível chegar até aqui, agradeço o esforço, dedicação e acima de tudo por acreditarem em mim.

Ao meu irmão Miguel agradeço a amizade, a cumplicidade e todos os bons momentos.

Ao Zé, obrigada por seres quem és!

Índice

Agradecimentos	i
Abreviaturas e Acrónimos.....	viii
Resumo.....	xiii
Abstract	xv
I- Fundamento Teórico	1
1.1 O pâncreas.....	3
1.2 Célula β pancreática	3
1.3 Insulina.....	3
1.4 Regulação da secreção de insulina	5
1.4.1 Secreção bifásica da insulina	6
1.4.2 Secreção pulsátil.....	7
1.5 Acção da insulina.....	7
1.6 Diabetes tipo 2 (DT2).....	8
1.6.1 Etiologia e prevalência da doença.....	8
1.6.2 Alterações fisiopatológicas	9
1.6.3 Intolerância à glicose	10
1.6.4 Resistência à insulina e hiperinsulinemia.....	11
1.6.5 Disfunção da célula β	13
1.6.6 Hiperglicemia, Hiperlipidemia e Stress oxidativo	14
1.7 Controlo farmacológico da diabetes	16
1.7.1 Biguanidas.....	17
1.7.2 Sulfonilureias.....	17
1.7.3 Meglitinidas	18
1.7.4 Tiazolidinedionas	18
1.7.5 Acarbose	18
1.7.6 Análogos das incretinas.....	19
1.8 Plantas com propriedades medicinais.....	20
1.8.1 Plantas medicinais para a diabetes tipo 2	21
1.8.2 Plantas da flora portuguesa com propriedades hipoglicemiantes	22
1.9 Compostos fenólicos	24
1.10 Propriedades biológicas dos compostos fenólicos	27
1.10.1 Propriedades antioxidantes	27
1.10.2 Propriedades hipoglicemiantes dos produtos naturais	28
1.11 Métodos analíticos	31

1.11.1 Métodos de extracção de compostos fenólicos	31
1.11.2 Extracção sólido-líquido (SLE – <i>Solid liquid extraction</i>).....	31
1.11.3 Extracção por refluxo – extracção por Soxhlet	31
1.11.4 Extracção em fase sólida (SPE)	32
1.12 Métodos de separação e análise.....	32
1.12.1 Cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC- High-performance liquid chromatography)	33
II- Problema e Objectivos.....	39
III- Materiais e Métodos	43
3.1 Recolha e preparação do material vegetal	45
3.2 Equipamento.....	45
3.3 Materiais e Reagentes.....	46
3.4 Procedimento Experimental	47
3.4.1 Preparação do extracto aquoso de <i>Cytisus multiflorus</i>	47
3.4.2 Fraccionamento do extracto aquoso de <i>Cytisus multiflorus</i> e isolamento dos compostos	47
3.4.3 Análise do extracto por HPLC-DAD	48
3.4.4 Doseamento dos fenóis totais existentes em cada fracção do extracto.....	48
3.4.5 Determinação da actividade antioxidante de cada fracção do extracto	49
3.4.6 Identificação de alguns compostos existentes nas fracções do extracto por LC-ESI-MS	49
3.4.7 Avaliação <i>in vivo</i> do efeito hipoglicemiante das fracções do extracto aquoso de <i>C. multiflorus</i> em ratos intolerantes à glicose (GIR).....	50
3.4.7.1 Delineamento experimental	51
3.4.7.2 Rastreio na urina	52
3.4.7.3 Determinação das glicemias e pesos corporais em jejum e das PTGO.....	55
3.4.7.4 Sacrifício dos animais e colheita de amostras	55
3.5 Análise estatística dos resultados	56
IV- Resultados e Discussão	57
4.1 Obtenção dos extractos aquosos de <i>C. multiflorus</i>	59
4.2 Análise cromatográfica das fracções do extracto aquoso de <i>C. multiflorus</i> obtidas por SPE	60
4.3 Análise das fracções seleccionadas por HPLC-MS e identificação de alguns compostos.....	61
4.3.1 Fracção 10% MeOH	61
4.3.2 Fracção 30% MeOH	66
4.3.3 Fracção 40% MeOH	70

4.3.4 Fracção 50% MeOH	74
4.3.5 Fracção 60% MeOH	78
4.3.6 Fracção 70% MeOH	82
4.3.7 Fracção 80% MeOH	85
4.4 Determinação da quantidade de fenóis totais e da actividade antioxidante das fracções do extracto aquoso de <i>C. multiflorus</i>	88
4.5 Avaliação <i>in vivo</i> do possível efeito hipoglicemiante das fracções 30% MeOH e 60% MeOH do extracto aquoso de <i>C. multiflorus</i> em ratos GIR	93
4.5.1 Evolução do peso dos animais durante o ensaio.....	93
4.5.2 Avaliação sumária dos indicadores de toxicidade na urina	94
4.5.3 Provas de tolerância dos animais da estirpe GIR	96
4.5.4 Efeito da administração das fracções 30% MeOH e 60% MeOH do extracto aquoso de <i>C. multiflorus</i> na glicemia em jejum e pós-prandial dos ratos da estirpe GIR.	97
V- Conclusões e Perspectivas Futuras	103
VI- Bibliografia	107
A. Anexos	118

Índice de Figuras

Figura 1: Conversão da preproinsulina em insulina	4
Figura 2: Secreção de insulina na célula β pancreática estimulada pela glicose.	5
Figura 3: Esquema do perfil cinético da secreção de insulina induzido por um estímulo de glicose.....	6
Figura 4: Alterações fisiopatológicas características da evolução do estado diabético	9
Figura 5: Concentração plasmática de glicose durante a PTGO, realizado em indivíduos com intolerância à glicose em jejum (IFG), intolerância à glicose (IGT), tolerância normal à glicose (NGT) ou IFG/IGT combinada (CGI – combined IFG/IGT)	10
Figura 6: Curvas médias dose-resposta da concentração de insulina em função da taxa de glicose utilizada em indivíduos normais (•); indivíduos com intolerância à glicose (IGT) (o); indivíduos não obesos (▲) e obesos (■) com diabetes tipo 2	12
Figura 7: Vias de sinalização reguladas pela insulina.	13
Figura 8: Locais de acção dos fármacos hipoglicemiantes no tratamento da diabetes....	16
Figura 9: Mecanismo de secreção de insulina induzido pelas sulfonilureias (SU).	17
Figura 10: Distribuição geográfica de <i>C. multiflorus</i> em Portugal e respectiva classificação científica	23
Figura 11: Origem biossintética dos compostos fenólicos	25
Figura 12: Classes dos flavonóides	27
Figura 13: Representação esquemática da fonte ESI	36
Figura 14: Representação esquemática da fonte APCI	37
Figura 15: Prova de tolerância à glicose oral da 5ª geração da estirpe GIR. (Adaptado de Pereira, 2009).....	50
Figura 16: Parâmetros analisados no teste <i>Combur</i> ¹⁰ Test.....	52

Figura 17: Perfis cromatográficos, obtidos por HPLC dos extractos aquosos de <i>C.multiflorus</i> obtidos por infusão (A) e por soxhlet (B).....	59
Figura 18: Perfis cromatográficos das fracções 10%, 30%, 40% e 50% MeOH.....	60
Figura 19: Perfis cromatográficos das fracções 60%, 70% e 80% MeOH.....	61
Figura 20: Cromatograma TIC da fracção 10% MeOH obtido por HPLC-ESI-MS, com identificação dos principais picos.....	62
Figura 21: Espectros MS (A) para o composto 3 e MS ² (B) do fragmento com m/z 315 obtidos em modo negativo.....	64
Figura 22: Espectros MS (A) para o composto 4 e MS ² (B) do fragmento com m/z 167 obtidos em modo negativo.....	65
Figura 23: Cromatograma TIC da fracção 30% MeOH obtido por HPLC-DAD-ESI-MS, com identificação dos principais picos.....	66
Figura 24: Espectro MS para o tr 14,47 obtido em modo negativo.....	68
Figura 25: Espectros de MS ² para o ião com m/z 193 (A) e para o ião com m/z 367 (B), obtidos em modo negativo.....	69
Figura 26: Cromatograma TIC da fracção 40% MeOH obtido por HPLC-DAD-ESI-MS, com identificação dos principais picos.....	70
Figura 27: Espectros MS para o composto 5 (A) e MS ² do fragmento com m/z 593 (B), obtidos em modo negativo.....	72
Figura 28: Espectros MS para o composto 7 (A) e MS ² do fragmento com m/z 563 (B), obtidos em modo negativo.....	73
Figura 29: Cromatograma TIC da fracção 50%MeOH obtido por HPLC-DAD-ESI-MS, com identificação dos principais picos.....	74
Figura 30: Espectros MS (A) para o composto 1 e MS ² (B) para o fragmento m/z 625, obtidos em modo negativo.....	76
Figura 31: Espectros MS (A) para o composto 6 e MS ² (B) do fragmento com m/z 489, obtidos em modo negativo.....	77
Figura 32: Cromatograma TIC da fracção 60% MeOH obtido por HPLC-DAD-ESI-MS, com identificação dos principais picos.....	78
Figura 33: Espectros MS (A) para o composto 3 e MS ² (B) do fragmento com m/z 609, obtidos em modo negativo.....	80
Figura 34: Espectros MS (A) para o composto 4 e MS ² (B) do fragmento com m/z 447, obtidos em modo negativo.....	81
Figura 35: Cromatograma TIC da fracção 70% MeOH obtido por HPLC-DAD-ESI-MS, com identificação dos principais picos.....	82
Figura 36: Espectros MS (A) para o composto 3 e MS ² (B) do fragmento com m/z 623, obtidos em modo negativo.....	84
Figura 37: Cromatograma TIC da fracção 80% MeOH obtido por HPLC-DAD-ESI-MS, com identificação dos principais picos.....	85
Figura 38: Espectro MS para o composto 9 obtido em modo negativo.....	87
Figura 39: Espectros MS (A) para o composto 10 e MS ² (B) do fragmento com m/z 557, obtidos em modo negativo.....	88
Figura 40: Recta de calibração obtida para a D-catequina.....	89
Figura 41: Comparação entre a quantidade de fenóis totais e a actividade antioxidante das fracções do extracto aquoso de <i>C. multiflorus</i>	91
Figura 42: Variação dos pesos dos animais ao longo do ensaio. A – Controlo negativo (soro fisiológico), B – Controlo positivo (glicazida), C – Teste 1 (fracção 30% MeOH), D – Teste 2 (fracção 60% MeOH).	94
Figura 43: Curvas de tolerância de machos e fêmeas GIR.....	97
Figura 44: Efeito do soro fisiológico (A), da glicazida (B) e das fracções 30% MeOH (C) e 60% MeOH (D) na prova de tolerância à glicose.....	99
Figura 45: Alterações da glicemia em jejum antes e após administração das fracções testadas.....	100

Índice de Tabelas

Tabela 1: Plantas medicinais e possíveis modos de acção na diabetes.....	21
Tabela 2: Principais classes de compostos fenólicos existentes nas plantas.....	26
Tabela 3: Características dos materiais utilizados.....	46
Tabela 4: Grau de pureza e fabricantes dos reagentes utilizados	46
Tabela 5: Eluentes usados no fraccionamento por SPE do extracto aquoso de <i>C. multiflorus</i>	47
Tabela 6: Condições de análise das fracções do extracto aquoso de <i>C. multiflorus</i> por LC-ESI-MS.....	49
Tabela 7: Grupos de animais em estudo e substâncias administradas.	51
Tabela 8: Material utilizado na determinação das glicemias e pesos em jejum e das PTGO	55
Tabela 9: Material utilizado no sacrifício dos animais	56
Tabela 10: Identificação por HPLC-DAD e LC-ESI-MS e MS ² dos compostos maioritários presentes na fracção 10% MeOH.	62
Tabela 11: Identificação por HPLC-DAD e LC-ESI-MS e MS ² dos compostos maioritários presentes na fracção 30% MeOH.	67
Tabela 12: Identificação por HPLC-DAD e LC-ESI-MS e MS ² dos compostos maioritários presentes na fracção 40% MeOH.	71
Tabela 13: Identificação por HPLC-DAD e LC-ESI-MS e MS ² dos compostos maioritários presentes na fracção 50% MeOH.	75
Tabela 14: Identificação por HPLC-DAD e LC-ESI-MS e MS ² dos compostos maioritários presentes na fracção 60% MeOH.	79
Tabela 15: Identificação por HPLC-DAD e LC-ESI-MS e MS ² dos compostos maioritários presentes na fracção 70% MeOH.	83
Tabela 16: Identificação por HPLC-DAD e LC-ESI-MS e MS ² dos compostos maioritários presentes na fracção 80% MeOH.	86
Tabela 17: Actividade antioxidante e quantidade de fenóis totais existentes em cada fracção do extracto aquoso de <i>C. multiflorus</i>	89
Tabela 18: Teste Combur à urina dos animais usados no ensaio.	95

Abreviaturas e Acrónimos

aa	Aminoácidos
ADP	Adenosina difosfato
APCI	Ionização química à pressão atmosférica (do inglês <i>Atmospheric pressure chemical ionization</i>)
API	Ionização à pressão atmosférica (do inglês <i>Atmospheric pressure ionization</i>)
ATP	Adenosina trifosfato
Bad	<i>Bcl-2-associated death protein</i>
c.d.o.	Comprimento de onda
cAMP	<i>Adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate</i>
Canais K-ATP	Canais de potássio dependentes de ATP
CAT	Catalase (EC 1.11.1.6)
CGI	<i>Combined glucose intolerance</i>
DAD	<i>Diode array</i>
DAG	Diacilglicerol
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DPP-4	<i>Dipeptidyl peptidase 4</i> (EC 3.4.14.5)
DT2	Diabetes tipo 2
ESI	Ionização por electrospray (do inglês <i>Electrospray ionization</i>)
FAD(H)	Dinucleótido de flavina e adenina
FPG	Fasting <i>plasma glucose</i>
G6P	Glicose-6-fosfato (do inglês <i>glucose-6-phosphate</i>)
GIP	<i>Glucose-dependent insulintropic polypeptide</i>
GIR	<i>Glucose intolerant rats</i>
GK	Glucocinase (do inglês <i>glucokinase</i>) (EC 2.7.1.2)
GLP-1	<i>Glucagon-like peptide 1</i>

GLUT 1	Transportador de glicose 1 (do inglês <i>Glucose transporter 1</i>)
GLUT 2	Transportador de glicose 2 (do inglês <i>Glucose transporter 2</i>)
GLUT 4	Transportador de glicose 4 (do inglês <i>Glucose transporter 4</i>)
Grb	<i>Growth factor receptor bound</i>
GSH-Px	Glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9)
GSK-3	<i>Glycogen synthase 3-kinase</i> (EC 2.7.11.26)
HPLC	Cromatografia líquida de elevada eficiência (do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IFG	<i>Impaired fasting glucose</i>
IGT	<i>Impaired glucose tolerance</i>
IP ₃	Trifosfato de inositol (do inglês <i>Inositol triphosphate</i>)
IR	Receptor de insulina (do inglês <i>Insulin receptor</i>)
IRS	<i>Insulin receptor substrate</i>
IT	<i>Ion Trap</i>
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa
m/z	Razão massa carga
MAP kinase	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> (EC 2.7.11.24)
MeOH	Metanol
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro (do inglês <i>messenger Ribonucleic acid</i>)
MS	Espectrometria de massa (do inglês <i>Mass Spectrometry</i>)
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
NAD(P)H	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NDDG	<i>National Diabetes Data Group</i>
NGT	<i>Normal glucose tolerance</i>
NMR	Ressonância magnética nuclear (do inglês <i>Nuclear magnetic resonance</i>)
OGTT	<i>Oral glucose tolerance test</i>

OMS	Organização Mundial de Saúde
p.a.	Reagente pós-análise
PCA	Proteína cinase A (EC 2.7.11.11)
PDK1	<i>30-phosphoinositide dependent kinase</i>
Pi	Fosfato inorgânico
PI3-kinase	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PKB	<i>Protein kinase B</i>
PPAR-γ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor γ</i>
PTGO	Prova de tolerância à glicose oral
Ras	<i>Rat sarcoma oncogene product</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPC	Coluna de fase reversa (do inglês <i>Reverse phase column</i>)
RRP	<i>Readily releasable pool</i>
SHC	<i>SH2 domain containing protein</i>
SHP	<i>SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase</i>
SIM	<i>Single ion monitoring</i>
SLE	Extracção sólido-líquido (do inglês <i>Solid-liquid extraction</i>)
SOD	Superóxido dismutase (EC 1.15.1.1)
SOS	<i>Son-of-sevenless</i>
sp	Espécie
SPE	Extracção em fase sólida (do inglês <i>Solid-phase extraction</i>)
SRM	<i>Selected reaction monitoring</i>
SUR1	<i>Sulfonylurea receptor</i>
TBARS	Substâncias reactivas ao ácido tiobarbitúrico
TIC	<i>Total ion current</i>
TLC	Cromatografia em camada fina (do inglês <i>Thin Layer Chromatography</i>)

TMS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i>
TOF	<i>Time of Flight</i>
TZDs	Tiazolidinedionas
u.m.a	Unidade de massa atómica
UV	Ultra-violeta
VDCC	<i>Voltage dependent Ca^{2+} channel</i>

Resumo

Inês Pereira Vieira (2010). **Caracterização de uma planta com propriedades hipoglicemiantes – *Cytisus multiflorus***. Tese de mestrado (C.M. Antunes & D.M.Teixeira, orientadores). Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, Évora, Portugal.

A *Cytisus multiflorus* é reconhecida etnofarmacologicamente pelo seu efeito anti-diabético, apresentando um elevado potencial de valorização. Contudo, desconhece-se a composição fitoquímica desta planta.

Neste trabalho pretendeu-se analisar a composição química do extracto aquoso das flores de *C. multiflorus* e avaliar o efeito anti-diabético das mesmas.

O extracto fraccionou-se por SPE e analisaram-se as fracções por HPLC-DAD e LC-MS. Determinaram-se o conteúdo em fenóis e as actividades antioxidante e hipoglicemiante.

Obtiveram-se onze fracções do extracto de *C. multiflorus*. Identificaram-se alguns compostos, maioritariamente fenólicos, entre os quais a rutina, derivados da apigenina e luteonina e os ácidos ferrúlico e vanílico. As fracções 60 e 80%MeOH apresentaram o conteúdo mais elevado em fenóis e o efeito antioxidante máximo registou-se nas fracções 50 e 60%MeOH. Não se registou efeito hipoglicemiante das fracções 30 e 60%MeOH. Em suma, efectuou-se a caracterização fitoquímica do extracto aquoso das flores de *C. multiflorus*, com potencial efeito anti-diabético.

Abstract

Inês Pereira Vieira (2010). **Chemical composition and anti-diabetic properties of *Cytisus multiflorus***. Masters' thesis, (C.M. Antunes & D.M. Teixeira, advisers). Sciences and Technology School, University of Évora, Évora, Portugal.

The white broom (*Cytisus multiflorus*) is known ethnopharmacologically for its anti-diabetic effect, showing a high valorization potential.

This work aimed to evaluate the composition of the aqueous extract of *C. multiflorus* flowers and its potential anti-diabetic properties.

The aqueous extract was fractionated by SPE followed by HPLC-DAD and LC-MS analysis. Total phenol content, antioxidant and hypoglycemic activities were determined.

Eleven fractions of the extract were obtained. Some compounds were identified, mainly phenolics, such as rutin, apigenin and luteonin derivatives, as well as vanilic and ferrulic acids. The fractions 60 and 80% MeOH showed the highest content in phenol equivalents and the highest antioxidant effect was found in the 50 and 60% MeOH fractions. The fractions 30 and 60% MeOH showed no hypoglycemic effect. In conclusion, it was made a phytochemical characterization of the aqueous extract of *C. multiflorus* flowers, with potential anti-diabetic effect.

I- Fundamento Teórico

1.1 O pâncreas

O pâncreas é um órgão complexo que manifesta uma função exócrina e uma função endócrina, desempenhando um papel fulcral no metabolismo dos glúcidos, proteínas e lípidos. A função exócrina reside nos ácinos, constituintes maioritários da massa total do pâncreas, que produzem os sucos digestivos constituídos por várias enzimas tais como a amilase, lipase pancreática e tripsina, e que são libertados no intestino delgado. Por sua vez, a função endócrina do pâncreas reside nos ilhéus de Langerhans, pequenos aglomerados celulares dispersos pelo tecido exócrino, constituindo 1-3% da massa total pancreática, responsáveis pela produção e secreção de hormonas na corrente sanguínea. Os ilhéus pancreáticos são constituídos por quatro tipos de células: células β produtoras de insulina, células α secretoras de glucagina, células δ produtoras de somatostatina e células PP produtoras do polipéptido pancreático (Frayn, 2003; Tan, 2005; McClenaghan, 2007).

1.2 Célula β pancreática

A principal função da célula β -pancreática consiste na secreção apropriada de quantidades bioactivas de insulina, em resposta aos nutrientes, hormonas e estímulos nervosos, mantendo os níveis plasmáticos de glicose num intervalo fisiológico restrito, de forma a assegurar o óptimo funcionamento de todos os tecidos. Este evento assegura que a glicose é eficientemente captada, metabolizada e armazenada (na forma de glicogénio ou triglicerídeos) pelos tecidos periféricos (fígado, músculo e tecido adiposo). Porém, considerando a arquitectura anatómica do ilhéu, é provável que a célula β -pancreática seja também responsável pela modulação da função das células vizinhas através de interacções parácrinas/autócrinas (Rutter, 2001; Kulkarni, 2004).

A célula β é electricamente excitável e utiliza as alterações que sucedem no potencial de membrana, acopladas às variações da concentração sanguínea de glicose, para estimular ou inibir a secreção de insulina (Renstrom & Rorsman, 2008).

1.3 Insulina

A insulina é essencial no controlo da homeostasia metabólica. É produzida pela célula β do pâncreas endócrino, a partir da clivagem enzimática da sua precursora proinsulina (figura 1), aumentando a captação e metabolização da glicose, ácidos

gordos e aminoácidos, através da actividade que exerce no fígado, tecido adiposo e músculo.

Esta hormona é constituída por 51 aminoácidos e consiste em duas cadeias polipeptídicas (A e B) ligadas por duas pontes dissulfureto. A cadeia A tem ainda uma ponte dissulfureto intracadeia. O mRNA de insulina é transduzido numa única sequência precursora designada de preproinsulina no retículo endoplasmático rugoso das células β . É composto por 110 aminoácidos e encontra-se relativamente inactivo. Em seguida, é convertida em proinsulina através da remoção do sinal peptídico (figura 1), que é depois convertida em insulina pela acção de duas enzimas conversoras de pró-hormonas (PC1/3 e PC2), que ficam activadas na rede *trans* Golgi. Estas enzimas são responsáveis pela excisão de pares de bases dos aminoácidos que são subsequentemente removidas pela exoprotease carboxipeptidase E. Todo este processo resulta na formação de uma molécula de insulina e do peptídeo C, um resíduo de 31 aa (Brass *et al.*, 2010).

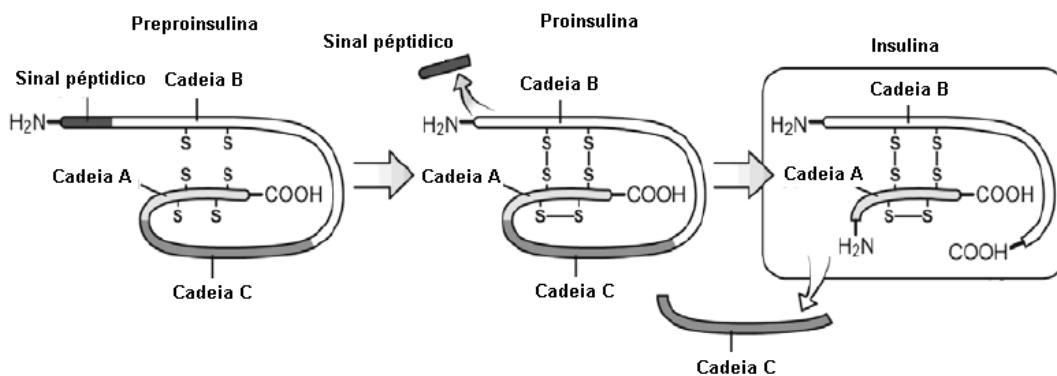


Figura 1: Conversão da preproinsulina em insulina
Adaptado de Brass *et al.*, 2010.

A concentração sanguínea de glicose é a principal responsável pela regulação da expressão de insulina nas células β pancreáticas. A fosforilação da glicose pela glucocinase, que exhibe um elevado $S_{0.5}$ para a glicose ($\approx 7\text{mM}$), aparenta funcionar como sensor da concentração de glicose extracelular, regulando o fluxo metabólico a partir da glicólise. O metabolismo da glicose nas células β promove sinais intracelulares que estimulam a secreção de insulina, a tradução de mRNA e a transcrição genética da insulina (Steiner, 2008).

Esta hormona anabólica é produzida na sua forma biologicamente activa e armazenada, até à sua libertação, em grânulos secretores. A sua libertação requer a

fusão destes grânulos com a membrana plasmática e a transição do conteúdo granular para o meio extracelular (Renstrom & Rorsman, 2008).

1.4 Regulação da secreção de insulina

A célula β produz e segrega insulina, mantendo a concentração sanguínea de glicose, restringindo-a a um intervalo de concentração fisiológica, geralmente entre 4 e 7 mmol/L em humanos (van Haefen, 2002). A glicose constitui o principal secretagogo de insulina, apesar de outros nutrientes, hormonas, neurotransmissores e fármacos induzirem e/ou amplificarem a libertação desta hormona (McClenaghan, 2007; Marchetti *et al.*, 2008).

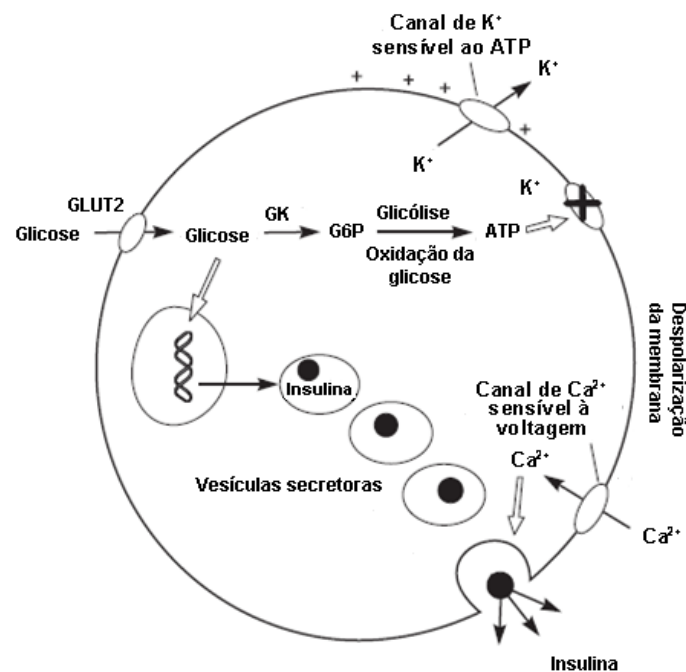


Figura 2: Secreção de insulina na célula β pancreática estimulada pela glicose.

Adaptado de Frayn, 2003.

De acordo com a hipótese actualmente aceite, a glicose induz a libertação de insulina da seguinte forma: a glicose atravessa a membrana plasmática por intermédio de transportadores específicos de glicose (nomeadamente o GLUT1 e o GLUT2) e é fosforilada pela glucocinase, determinando o fluxo metabólico através da glicólise (figura 2). São produzidos equivalentes redutores (NAD(P)H e FAD(H)) no mitocôndrio através do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, a partir dos glúcidos e lípidos, que são transferidos para a cadeia transportadora de electrões. A energia libertada pela cadeia transportadora de electrões é usada para bombear os prótons para o exterior da membrana mitocondrial, criando o gradiente electroquímico transmembranar. Este

gradiente é usado na produção de ATP a partir do ADP e Pi. Estes eventos resultam no aumento da razão ATP/ADP no citoplasma, determinando o fecho dos canais de K⁺ sensíveis ao ATP (K-ATP). Isto, por sua vez, resulta na despolarização da membrana plasmática, no influxo de Ca²⁺ e activação da exocitose (Marchetti *et al.*, 2008).

1.4.1 Secreção bifásica da insulina

A secreção bifásica da insulina constitui uma resposta normal das células β ao aumento rápido e contínuo da concentração de glicose. A primeira fase corresponde a um aumento rápido e acentuado da secreção que ocorre 2 a 3 min após aplicação do estímulo promovido pela glicose, mas que é transitória, permanecendo durante 10 min, aproximadamente (figura 3). A segunda fase, que varia de acordo com a espécie em estudo, é caracterizada por um declínio no qual se observa o decaimento da secreção seguido de um aumento gradual para estabilização num patamar (Henquin *et al.*, 2006; Renstrom & Rorsman, 2008).

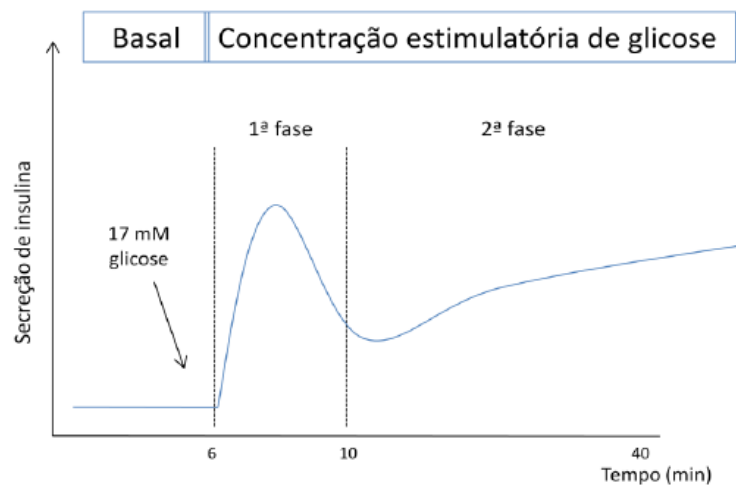


Figura 3: Esquema do perfil cinético da secreção de insulina induzido por um estímulo de glicose

Adaptado de Renstrom & Rorsman, 2008

A primeira fase de secreção de insulina é importante para que se atinjam as concentrações intersticiais óptimas de insulina e para suprimir a produção hepática de glicose. O mecanismo subjacente a esta fase consiste num rápido aumento da concentração citosólica de Ca²⁺ ([Ca²⁺]_c), dependente da actividade do canal K-ATP, que despoleta a exocitose das vesículas secretoras de insulina. Por outro lado, a segunda fase requer a produção contínua deste sinal – aumento da [Ca²⁺]_c – e a amplificação da acção do Ca²⁺ na exocitose através de um mecanismo independente da actividade do canal K-ATP (Henquin *et al.*, 2006). Os mecanismos subjacentes ao processo de amplificação encontram-se pouco definidos, existindo várias hipóteses

que o justificam. Alguns estudos apontam para factores de potenciação, nomeadamente segundos mensageiros, tais como o cAMP, o DAG, o IP₃, as proteínas cinases A e C, a fosfolipase C e a adenilato ciclase, que promovem a mobilização de vesículas para a membrana plasmática e sensibilizam a maquinaria exocitótica para o cálcio (Henquin, 2000). Existe ainda a hipótese do reabastecimento do *pool* de libertação imediata (RRP - readily releasable pool) através de modificações químicas - “*priming*” - dos grânulos ou da sua translocação. (Renstrom & Rorsman, 2008).

1.4.2 Secreção pulsátil

O padrão de secreção de insulina além de bifásico, no estado estacionário, é ainda de carácter pulsátil. Esta libertação pulsátil exhibe vários tipos de variações da concentração de insulina no plasma, podendo tratar-se de oscilações rápidas, com picos de secreção ao longo de 5-10 minutos ou de oscilações prolongadas durante 60-120 minutos. Os mecanismos subjacentes a esta pulsatilidade ainda não se encontram bem elucidados, porém sabe-se que estão relacionados com a oscilação da concentração intracelular de Ca²⁺ que regula a exocitose da insulina (Dahlgren *et al.*, 2005; Guillausseau *et al.*, 2008). Aliás, a secreção pulsátil é mais eficiente na redução dos níveis sanguíneos de glicose do que uma dose constante de insulina, demonstrando relevância na manutenção da homeostasia da glicose (Dahlgren *et al.*, 2005).

1.5 Acção da insulina

A insulina é responsável pelo controlo da captação e utilização da glicose durante os estados de jejum e pós-prandial. Regula a homeostasia da glicose actuando em vários locais, restringindo a produção hepática de glicose (através da redução da gluconeogénese e da glicogenólise) e, aumentando a taxa de captação e utilização de glicose principalmente no músculo e tecido adiposo. Além disso, a insulina também afecta o metabolismo lipídico, pois aumenta a síntese de lípidos no fígado e adipócitos e reduz a libertação de ácidos gordos do tecido adiposo (Sesti, 2006).

As acções principais da insulina são mediadas através da sua ligação aos receptores de insulina nos tecidos alvo, regulando a translocação para a membrana plasmática do GLUT4 e consequentemente a captação celular de glicose (McClenaghan, 2005).

Todavia, distúrbios nestes processos conduzem ao desenvolvimento de transtornos metabólicos. Alterações no metabolismo glicolítico favorecem a desregulação da célula β e podem conduzir ao desenvolvimento da diabetes tipo 2.

1.6 Diabetes tipo 2 (DT2)

A diabetes consiste num conjunto de patologias metabólicas que têm em comum a hiperglicemia e a intolerância à glicose, resultante de uma deficiência relativa ou absoluta de insulina e/ou uma redução da sua acção biológica. Apesar de ser uma doença conhecida há bastante tempo, a etiologia e a patogénese da diabetes ainda não estão completamente elucidadas (Laakso, 2008).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a DT2 define-se como o resultado de anomalias quer na secreção de insulina, quer na sensibilidade à insulina (Kahn, 2000;Virally *et al.*, 2007). A fisiopatologia da DT2 envolve as células β pancreáticas, o fígado e tecidos periféricos tais como o músculo-esquelético e o tecido adiposo (Kahn, 2000;Henry, 2003), em que ocorre uma superprodução hepática de glicose e o músculo-esquelético apresenta resistência à acção da insulina (Henry, 2003). As disfunções descritas na célula β incluem anomalias quantitativas e qualitativas da secreção de insulina, nomeadamente, deficiências na pulsatilidade e cinética da secreção de insulina e redução da massa de célula β (Giorgino *et al.*, 2005;Virally *et al.*, 2007).

1.6.1 Etiologia e prevalência da doença

O desenvolvimento da DT2 resulta da interacção entre factores ambientais e uma predisposição genética apresentada pelos indivíduos que desenvolvem esta patologia. Surge inicialmente a resistência à insulina, que na presença de uma determinada propensão genética para a disfunção da célula β , conduz à intolerância à glicose e conseqüentemente à DT2. Apesar de existir alguma desconformidade sobre a contribuição relativa das alterações na sensibilidade à insulina *versus* função da célula β no desenvolvimento da diabetes, tem-se tornado evidente que alterações em ambos os processos ocorrem ao longo do desenvolvimento da hiperglicemia (Chiasson & Rabasa-Lhoret, 2004).

A DT2 afecta actualmente cerca de 5% da população dos países industrializados e a sua prevalência está a aumentar rapidamente (Stumvoll *et al.*, 2008;Laakso, 2008). As últimas décadas do século XX testemunharam um aumento global desmedido desta desordem metabólica. Alterações significativas no estilo de vida e hábitos alimentares têm acompanhado a globalização, e como resultado tem sido evidente a obesidade e a diabetes, quer em países desenvolvidos, quer em países em desenvolvimento. É estimado, a nível mundial, que cerca de 190 milhões de

peças têm diabetes e que este número irá aumentar para 324 milhões em 2025 (Zimmet *et al.*, 2001; Zimmet *et al.*, 2005).

1.6.2 Alterações fisiopatológicas

A diabetes caracteriza-se por intolerância à glicose e hiperglicemia mais ou menos grave acompanhada de insulino-resistência.

A hiperglicemia em jejum advém da desregulação do nível basal de glicose, resultante da produção excessiva de glicose pelo fígado, inicialmente como consequência da resistência dos hepatócitos à acção da insulina. Por outro lado, a hiperglicemia pós-prandial resulta da deficiente secreção de insulina pelas células β em resposta aos nutrientes, da deficiência na inibição da produção hepática de glicose e da captação ineficiente da glicose pelos tecidos periféricos sensíveis à acção da insulina, especialmente o músculo-esquelético (Giorgino *et al.*, 2005; Campbell, 2009).

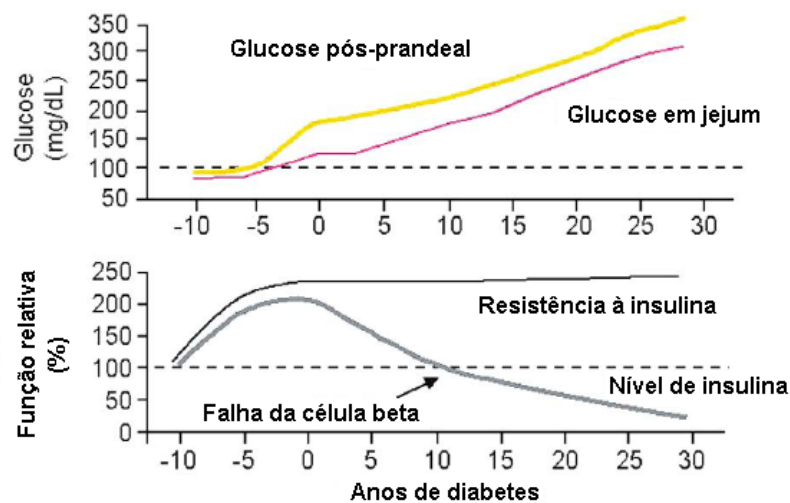


Figura 4: Alterações fisiopatológicas características da evolução do estado diabético

Adaptado de LeRoith, 2002.

A evolução deste estado de hiperglicemia resulta na hiperglicemia crónica, que conduz a deficiências na cinética de secreção pela célula β e na sensibilidade dos tecidos à insulina (figura 4), devido a múltiplas anomalias nos mecanismos de sinalização da insulina. Incluem-se nestas anomalias níveis reduzidos da expressão dos receptores de insulina, actividade reduzida da tirosina cinase, fosforilação deficiente do substrato do receptor de insulina (IRS – insulin receptor substrate) e activação reduzida da via de sinalização PI 3-cinase/Akt. Deste modo, quer a

resistência à insulina, quer a secreção disfuncional da insulina representam os elementos fulcrais na patogénese da DT2 (Campbell, 2009;Giorgino *et al.*, 2005).

1.6.3 Intolerância à glicose

O conceito de tolerância normal à glicose (NGT – *normal glucose tolerance*) encontra-se definido para glicemias em jejum (FPG – *fasting plasma glucose*) compreendidas entre 70 e 100 mg dL⁻¹ assim como para glicemias inferiores a 140 mg dL⁻¹ quando se trata de testes de tolerância à glicose (OGTT – *oral glucose tolerance test*), após as 2 horas de ingestão do bolus de glicose (figura 5). Quando esta homeostasia é perturbada surge a intolerância à glicose e a diabetes (Nathan *et al.*, 2007;Horton, 2009).

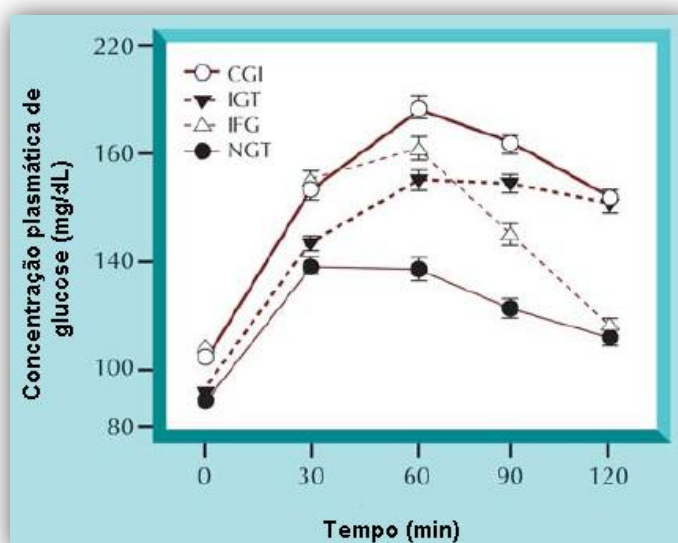


Figura 5: Concentração plasmática de glicose durante a PTGO, realizado em indivíduos com intolerância à glicose em jejum (IFG), intolerância à glicose (IGT), tolerância normal à glicose (NGT) ou IFG/IGT combinada (CGI – combined IFG/IGT)

Adaptado de Abdul-Ghani & DeFronzo, 2009.

O conceito de intolerância à glicose foi introduzido em 1979/1980 pelo National Diabetes Data Group (NDDG) e pela OMS, como um estado intermédio entre o estado normal de tolerância à glicose e a diabetes, sendo um factor de risco para a diabetes tipo 2 (Alberti, 1998;Goke, 1998). O estado de intolerância à glicose (IGT – *impaired glucose tolerance*) é definido para um intervalo de concentração de glicose entre 140 – 200 mg dL⁻¹ no plasma/sangue 2 horas após a ingestão de 75 g de glicose - teste de tolerância à glicose oral (figura 5), mas as glicemias em jejum encontram-se no intervalo normal de glicemia (Gerich, 1997;Alberti, 1998;van Haeften, 2002;Nathan *et al.*, 2007).

Além do IGT, foi também introduzido o conceito de estado de intolerância à glicose em jejum (IFG – *impaired fasting glucose*), que é definido para concentrações de glicose plasmática em jejum no intervalo de 100 – 125 mg dL⁻¹, mas com picos de glicemia bastante elevados aos 30 e aos 60 min após a ingestão de glicose, recuperando para valores normais após as 2 horas (Gerich, 1997;Alberti, 1998;van Haeften, 2002;Nathan *et al.*, 2007). Finalmente, há ainda indivíduos que apresentam uma condição de intolerância à glicose que consiste numa condição dos dois tipos anteriores (CGI - *combined glucose intolerance*, figura 5). Nestes casos a glicemia em jejum é semelhante à registada nos indivíduos com IFG, um pico elevado aos 30 e 60 min, mas com alguma recuperação após 2 horas (figura 5), (Nathan *et al.*, 2007).

A intolerância à glicose precede quase sempre o desenvolvimento da diabetes tipo 2 e tem sido estudada para tentar definir uma predisposição inicial para alterações metabólicas (Walker *et al.*, 1997). Na maioria dos casos, é encontrada uma combinação de resistência à insulina e hiperinsulinemia em indivíduos com intolerância à glicose, assim como com obesidade (Alberti, 1998;Nathan *et al.*, 2007), à semelhança do que se regista em pacientes com DT2.

1.6.4 Resistência à insulina e hiperinsulinemia

A resistência à insulina é essencialmente uma condição de sensibilidade reduzida à insulina e é usualmente acompanhada de níveis plasmáticos de insulina elevados, comumente designada de hiperinsulinemia compensatória (figura 6), (Fujimoto, 2000;Giorgino *et al.*, 2005).

A sensibilidade à insulina é usualmente descrita como a capacidade da insulina diminuir os níveis plasmáticos de glicose, que ocorre pela supressão da produção hepática de glicose e estimulação da utilização da glicose pelo músculo-esquelético e tecido adiposo (Fujimoto, 2000;Giorgino *et al.*, 2005).

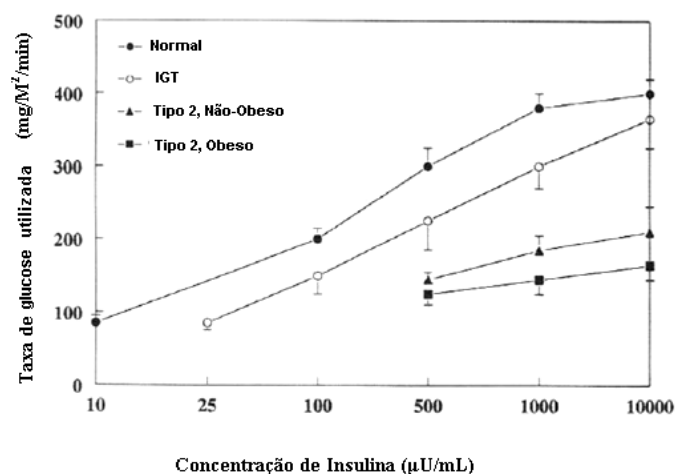


Figura 6: Curvas médias dose-resposta da concentração de insulina em função da taxa de glicose utilizada em indivíduos normais (•); indivíduos com intolerância à glicose (IGT) (o); indivíduos não obesos (▲) e obesos (■) com diabetes tipo 2

Adaptado de Courtney & Olefsky, 2007.

A insulina exerce as suas acções biológicas ao interagir com o receptor de membrana tirosina-cinase, conduzindo à activação de moléculas substrato, vulgarmente designadas de proteínas *docking*, que incluem os IRS, responsáveis pela sinalização de processos metabólicos e mitogénicos, e a família de proteínas Shc, que se encontram acopladas aos efeitos mitogénicos. A partir destas reacções iniciais de fosforilação da tirosina, os sinais da insulina são transduzidos nas duas maiores vias de sinalização de lípidos intracelulares e/ou cinases de serina-treonina, a via do PI3/Akt (figura 7) que é responsável pela translocação do GLUT4 e pelo metabolismo celular, e a via da MAP-cinase (figura 7) que regula a transcrição de alguns genes, especialmente os que estão envolvidos no crescimento e divisão celular, (Hennige & Haring, 2004; Giorgino *et al.*, 2005; Siddle, 2005).

Anomalias múltiplas na sinalização da insulina têm sido identificadas e incluem redução nos níveis da expressão do receptor de insulina e da actividade da tirosina cinase, deficiência na fosforilação de resíduos tirosina das proteínas IRS e redução da activação da via de sinalização de PI3K/Akt. Estas deficiências na sinalização são responsáveis pela diminuição da captação e utilização da glicose no músculo-esquelético e adipócitos (Giorgino *et al.*, 2005).

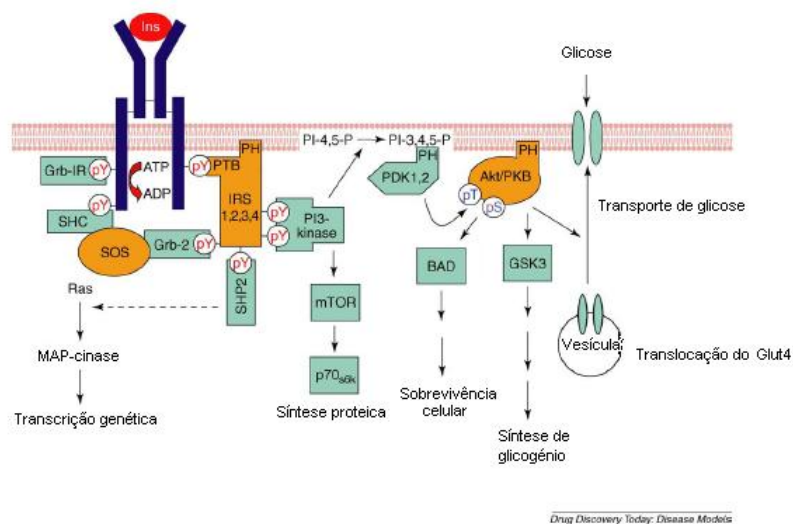


Figura 7: Vias de sinalização reguladas pela insulina.

Abreviaturas:

BAD, *Bcl-2-associated death protein*; Glut, transportador de glicose; Grb, *growth factor receptor bound*; GSK-3, *glycogen synthase 3-kinase*; IR, receptor de insulina; IRS, substrato do receptor de insulina; MAP kinase, *mitogen-activated protein kinase*; mTOR, *mammalian target of rapamycin*; PI3-kinase, *phosphatidylinositol 3-kinase*; PDK1, *30-phosphoinositide dependent kinase*; PKB, *protein kinase B*; Ras, *rat sarcoma oncogene product*; SHC, *SH2 domain containing protein*; SHP, *SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase*; SOS, *son-of-sevenless*. Adaptado de Hennige & Haring, 2004.

Tanto as influências hereditárias como as adquiridas contribuem para o desenvolvimento da resistência à insulina. As deficiências hereditárias responsáveis pelas formas mais comuns de resistência à insulina, que surgem frequentemente em indivíduos com DT2 não se encontram identificadas. Apesar de terem sido identificadas mutações nos receptores de insulina, nos transportadores de glicose e nas proteínas sinalizadoras, estas são pouco comuns. Para além disso, parece haver evidências de que a resistência à insulina adquirida provém do sedentarismo, idade, hiperglicemia, níveis elevados de ácidos gordos e da alimentação (Fujimoto, 2000).

1.6.5 Disfunção da célula β

Na diabetes a célula β ostenta uma resposta inadequada à glicose e com a progressão da doença parece ocorrer uma diminuição na massa de células β (LeRoith, 2002).

A alteração inicial pode consistir numa anomalia específica no transporte de glicose, nas vias metabólicas dos secretagogos, nos canais iónicos, ou em outros processos envolvidos na síntese ou na libertação de insulina (LeRoith, 2002). A produção de ATP desempenha um papel fulcral na capacidade secretora de insulina da célula β . Os efeitos da glicose nos canais K-ATP da membrana plasmática

encontram-se bem estabelecidos e se não é produzido ATP suficiente, a actividade eléctrica e a secreção de insulina não são estimuladas pela glicose (Rorsman, 2005). Aliás, em indivíduos com DT2 quer o carácter bifásico quer o carácter oscilatório da secreção de insulina encontram-se afectados, pois a pulsatilidade do nível plasmático de insulina é irregular ou simplesmente não existe, e a primeira fase de secreção de insulina é inexistente enquanto a segunda pode estar ausente ou muito atenuada (Dahlgren *et al.*, 2005).

A glicose exerce uma quantidade de efeitos adicionais na função da célula β que são essenciais ao seu funcionamento. Primeiro, os canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem são activados pela despolarização dos canais K-ATP, devido ao estímulo por glicose. Segundo, a exocitose da insulina encontra-se sob controlo metabólico rigoroso e terceiro, a capacidade das incretinas em despoletarem a secreção de insulina está dependente da glicose e são ineficazes em concentrações de glicose subestimulatórias (Rorsman, 2005).

Por outro lado, o aumento da apoptose pode ser responsável pela perda de células β , com possíveis factores co-adjuvantes, nomeadamente a exaustão celular resultante da hipersecreção a longo prazo e a deposição de substância amilóide nos ilhéus (LeRoith, 2002; Seica *et al.*, 2003).

Seja qual for a causa, a primeira indicação fisiológica da disfunção da célula β consiste numa falha na resposta aguda da secreção de insulina à glicose. É registada uma perda da primeira fase de secreção de insulina, que é frequente no estado de intolerância à glicose, e que conduz a uma segunda fase hiperinsulinémica resultante do aumento excessivo da glicose pós-prandial. Desta forma, a hiperinsulinemia aparece como a anomalia final proveniente da disfunção da célula β e que acaba por levá-la à exaustão (LeRoith, 2002).

1.6.6 Hiperglicemia, Hiperlipidemia e Stress oxidativo

O stress oxidativo encontra-se associado a várias patologias e resulta de um desequilíbrio entre os estados antioxidante/oxidante, que conduz à produção excessiva de espécies reactivas de oxigénio (ROS – *Reactive oxygen species*) ou à diminuição da capacidade antioxidante. As ROS são responsáveis por danos nos lípidos, proteínas e ácidos nucleicos, originando deficiências estruturais e funcionais ao nível celular (Maritim *et al.*, 2003).

Na DT2 encontram-se subjacentes à glicotoxicidade (estado de hiperglicemia crónica) e à lipotoxicidade (níveis excessivos crónicos de ácidos gordos livres) fenómenos de stress oxidativo, eventualmente associados a defesas antioxidantes

diminuídas, o que conduz frequentemente a lesões tecidulares. Pensa-se que a capacidade das ROS para oxidar directamente lípidos, proteínas e DNA, está relacionada com a patogénese das complicações diabéticas mais tardias. Além do mais, as ROS podem funcionar como moléculas sinalizadoras que activam vários processos bioquímicos sensíveis ao stress, podendo gerar alterações celulares que, em último caso, são igualmente responsáveis pelo aparecimento das complicações da diabetes. Estes processos fisiológicos intracelulares apresentam usualmente como consequência a insulino-resistência e a diminuição da secreção de insulina (Lopes *et al.*, 2008).

De facto, está demonstrado que o stress oxidativo está envolvido no processo de insulino-resistência. Existe uma grande variedade de cinases sensíveis ao stress que, quando são activadas, são responsáveis pela atenuação dos efeitos da cascata de insulina, nas proteínas IRS e, por esse motivo, a presença de stress oxidativo, gerado das mais diversas formas, está associado não só às complicações diabéticas, mas também à resistência à insulina (Lopes *et al.*, 2008).

O aumento da produção de ROS associado à redução plasmática de antioxidantes, pode ter efeitos tóxicos na estrutura/actividade da membrana plasmática das células β , contribuindo para a diminuição da secreção de insulina na diabetes. De facto, estudos *in vitro* sugerem que oxidantes com grupos tiol diminuem a secreção de insulina, ao passo que um incremento no glutatióno extracelular ou na cisteína favorecem a resposta da célula β à glicose. Além do mais, parece plausível que o stress oxidativo também reduz a acção da insulina, porque nas células β , que são mais susceptíveis à acção dos radicais livres em relação aos outros tecidos, ocorre uma redução significativa na expressão dos transportadores de glicose (Ceriello, 2000).

Assim, o aumento da protecção anti-oxidante, nomeadamente pela via farmacológica, poderá contribuir para a sobrevivência, por um lado, e para a melhoria da função da célula β , por outro.

1.7 Controlo farmacológico da diabetes

Actualmente o controlo farmacológico da DT2 visa atingir as duas principais anomalias desta síndrome, ou seja, a resistência à insulina e a disfunção da célula β (Bonora, 2008).

Os mecanismos responsáveis pelo controlo dos níveis de glicose são: (i) a estimulação da secreção de insulina pela célula β pancreática; (ii) a resistência às hormonas responsáveis pelo aumento da glicose; (iii) o aumento do número ou da afinidade e sensibilidade do receptor de insulina; (iv) a diminuição da libertação de glicogénio; (v) o aumento da utilização de glicose nos tecidos e órgãos; (vi) a eliminação de radicais livres, resistência à peroxidação lipídica e correcção de desordens metabólicas de lípidos e proteínas e (vii) o estímulo ao aumento da micro-circulação sanguínea no organismo (Li *et al.*, 2004).

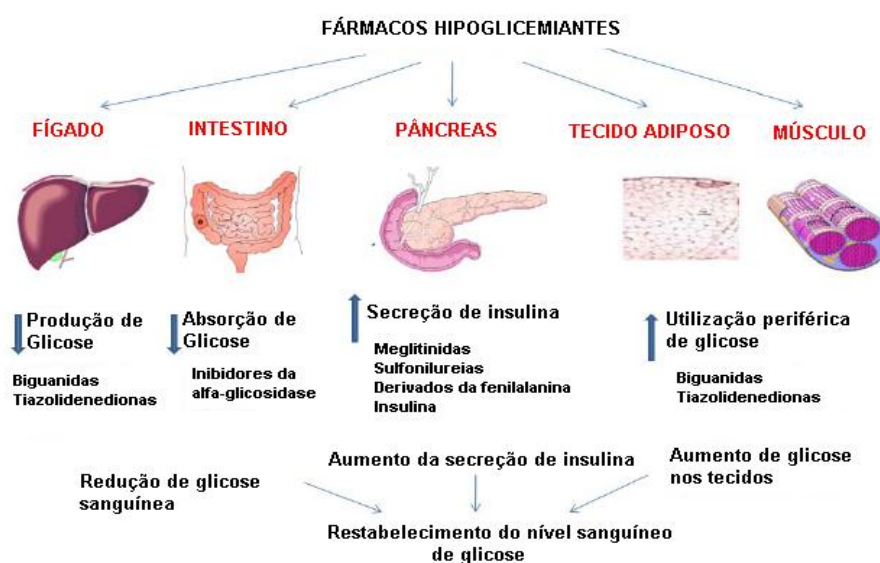


Figura 8: Locais de acção dos fármacos hipoglicemiantes no tratamento da diabetes.

Os fármacos hipoglicemiantes restauram a normoglicemia de vários modos, e incluem os secretagogos de insulina (sulfonilureias, meglitinidas), sensibilizadores de insulina (biguanidas, metformina, tiazolidenedionas), inibidores da α -glicosidase (miglitol, acarbose), (adaptado de Hui *et al.*, 2009).

Os fármacos anti-diabéticos controlam a diabetes restabelecendo os níveis de insulina, melhorando a sensibilidade à insulina, aumentando a secreção de insulina pelo pâncreas e/ou consumo de glicose pelos tecidos (figura 8). Ao longo dos últimos anos têm sido desenvolvidos vários tipos de fármacos que reduzem os níveis de glicose, actuando de modos distintos e que incluem os secretagogos de insulina (sulfonilureias, meglitinidas), os sensibilizadores da acção de insulina (biguanidas, metformina, tiazolidenedionas) e os inibidores da α -glicosidase (miglitol, acarbose), (Hui *et al.*, 2009).

1.7.1 Biguanidas

A metformina, a única biguanida disponível actualmente, constitui o fármaco principal na terapia para pacientes com DT2 (Tahrani *et al.*, 2010).

Este fármaco aumenta a sensibilidade dos tecidos hepáticos e periféricos (principalmente o músculo) à insulina; inibe a absorção gastrointestinal de glicose e diminui a produção hepática de glicose, inibindo a gluconeogénese quer *in vitro* quer *in vivo*, assim como a glicogenólise (Davidson & Peters, 1997; DeFronzo, 1999). Além do mais, aumenta os níveis de GLP-1 (*Glucagon Like Peptide 1*) ao inibir o DPP-4 e/ou ao aumentar a produção de GLP-1, que leva ao aumento do *turnover* de glicose ao interferir com o metabolismo do lactato (Tahrani *et al.*, 2010). Porém não estimula a secreção de insulina (Davidson & Peters, 1997).

1.7.2 Sulfonilureias

As sulfonilureias (glipizida, glicazida) têm sido o pilar da terapia antidiabética durante muitos anos. O seu principal mecanismo de acção consiste na potenciação da secreção de insulina. As sulfonilureias ligam-se a um receptor específico de sulfonilureias nas células β pancreáticas, o SUR1, despoletando o fecho do canal K-ATP, que leva à diminuição do efluxo de potássio e despolarização da membrana celular (figura 9). Deste processo resulta um aumento do influxo de cálcio, com activação da translocação dos grânulos secretores de insulina e consequente extrusão da insulina por exocitose (figura 9), (DeFronzo, 1999; Tahrani *et al.*, 2010).

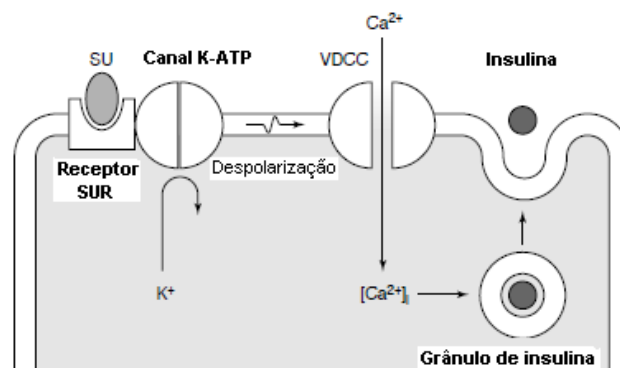


Figura 9: Mecanismo de secreção de insulina induzido pelas sulfonilureias (SU).

VDCC (voltage-dependent Ca^{2+} channel) – canal de cálcio dependente da voltagem (adaptado de Shinkai, 1999).

A insulina libertada pelo pâncreas diminui a elevada taxa de produção hepática de glicose, aumenta a captação de glicose pelo músculo e diminui os níveis

plasmáticos de glicose pós-prandiais. Todo este processo que conduz à secreção da insulina é independente da glicose (DeFronzo, 1999; Tahrani *et al.*, 2010).

1.7.3 Meglitinidas

As meglitinidas são fármacos com um modo de acção semelhante às sulfonilureias mas cujo pico de acção e duração é mais reduzido. A nateglinida e a repaglinida constituem os fármacos principais deste grupo. A nateglinida, um derivado do aminoácido fenilalanina – D, liga-se mais eficientemente aos receptores SUR1 do que as sulfonilureias. Também apresenta maior afinidade quando na presença de glicose. A repaglinida, *in vitro*, liga-se ao receptor SUR1 com maior afinidade na presença do canal Kir6.2 (Tahrani *et al.*, 2010).

1.7.4 Tiazolidenedionas

As tiazolidenedionas (TZDs), agonistas dos receptores-gama peroxissomais activados pelos factores proliferativos (*peroxisome proliferator-activated receptor-gamma* - PPAR- γ), actuam como agentes sensibilizadores de insulina e aumentam a acção periférica da insulina. Estes fármacos ligam-se ao PPAR- γ , que está envolvido na regulação de genes que controlam a homeostasia da glicose e o metabolismo lipídico, e é encontrado em elevadas concentrações no tecido adiposo, hepatócitos e músculo-esquelético (Hanefeld, 2007).

Deste modo, melhoram a sensibilidade à insulina nos tecidos periféricos ao aumentarem a lipogénese no tecido adiposo e ao reduzirem o conteúdo hepático de ácidos gordos e a produção hepática de glicose. A rosiglitazona e a pioglitazona são as TZDs disponíveis actualmente (Tahrani *et al.*, 2010).

1.7.5 Acarbose

A acarbose, um inibidor da α -glicosidase, actua através da inibição competitiva das enzimas (maltase, sucrase, glucoamilase e isomaltase) do lúmen intestinal responsáveis pela dissociação dos oligossacarídeos e dissacarídeos em monossacarídeos. Ao atrasar a digestão dos glúcidos, transfere a sua absorção para zonas mais distantes do intestino delgado e do cólon. Ao retardar o processo de absorção, a acarbose atrasa a entrada de glicose no sistema circulatório, proporcionando à célula β tempo suficiente para aumentar a secreção de insulina em resposta ao aumento do nível plasmático de glicose (DeFronzo, 1999).

1.7.6 Análogos das incretinas

Mais recentemente, os análogos do peptídeo-1 análogo da glucagina (GLP-1), ou inibidores de DPP-4 (*dipeptidyl peptidase-4*), a enzima chave no catabolismo do GLP-1, têm sido desenvolvidos com o objectivo de estimular a secreção de insulina por um mecanismo de mimetização da acção das incretinas (Bonora, 2008).

O GLP-1 e o GIP (*glucose-dependent insulintropic polypeptide*) são as principais incretinas com efeito insulínico sob condições fisiológicas. A secreção destas hormonas é desencadeada pela presença de nutrientes no lúmen intestinal. Apesar dos seus efeitos insulínicos, o GLP-1 pode também contribuir para a regulação da massa de células β . De facto, os efeitos crónicos do GLP-1 incluem o aumento da sobrevivência das células β , assim como a contribuição a longo prazo da regulação da secreção de insulina mantendo a massa de células β funcional (Vilsboll & Holst, 2004; Karaca *et al.*, 2009).

Apenas o GLP-1, ou os seus análogos, podem ser usados na terapia da DT2 visto que as células β apresentam resistência à acção dos GIP, especialmente devido à desregulação dos seus receptores de membrana sob as condições diabéticas. O GLP-1, no pâncreas, estimula a secreção de insulina dependente da glicose e inibe a secreção de glucagina. É ainda capaz de aumentar a massa de célula β activando a sua proliferação e diferenciação, e inibindo a apoptose (Karaca *et al.*, 2009).

Apesar desta evolução farmacológica na terapia da DT2, a eficiência destes compostos é discutível, pois apresentam efeitos colaterais, tais como hipoglicemia, acidose láctica, lesões celulares hepáticas idiossincráticas, défice neurológico permanente, desconforto gástrico, cefaleias, tonturas, entre outros (Hui *et al.*, 2009). Deste modo, existe uma necessidade de encontrar novos compostos para o tratamento da diabetes e as plantas têm sido apontadas como fontes ricas em compostos com potencial actividade anti-diabética, apesar de ainda se encontrarem pouco exploradas e caracterizadas cientificamente.

1.8 Plantas com propriedades medicinais

A procura de plantas medicinais tem aumentado consideravelmente ao longo dos últimos anos nos países industrializados. A Organização Mundial de Saúde registou 21.000 plantas, que são utilizadas para fins medicinais no mundo inteiro (Capasso *et al.*, 2000;Modak *et al.*, 2007).

Esta tendência crescente de utilizar plantas medicinais para tratar uma vasta gama de problemas tem sido impulsionada pelo: (i) aparecimento de novas doenças, com sérias complicações, para as quais não existe ainda um tratamento adequado; (ii) a convicção de que as plantas medicinais são inócuas, ao contrário dos fármacos convencionais; (iii) a noção de que o que é natural só pode ser bom; (iv) a atenção especial que os movimentos ecológicos demonstram para com as plantas medicinais nos países ocidentais; e (v) a confiança de que as plantas medicinais são naturalmente superiores aos fármacos sintéticos. Outro factor consiste na evolução notória no que diz respeito à produção e conservação das plantas medicinais (Capasso *et al.*, 2000).

Hoje em dia, a possibilidade de cultivar plantas medicinais, por vezes aperfeiçoadas geneticamente, proporciona a introdução de plantas no mercado que são ricas em compostos activos desejáveis. Maioritariamente tratam-se de metabolitos secundários, que derivam biossinteticamente de metabolitos primários das plantas (glúcidos, aminoácidos e lípidos) e que não se encontram directamente envolvidos no crescimento, desenvolvimento e reprodução das plantas. São classificados em vários grupos, de acordo com as classes químicas, tais como os alcalóides, terpenos e compostos fenólicos (Capasso *et al.*, 2000;Salim *et al.*, 2008).

Muitas doenças, tais como a diabetes, cancro e doenças coronárias, são de carácter multifactorial e, por isso, necessitam de uma intervenção terapêutica a vários níveis. As plantas medicinais apresentam vantagens em relação a moléculas singulares no tratamento destas patologias, devido à vasta variedade de compostos que apresentam. Aliás, a sua utilização tem sido alvo de uma validação científica, o que tem encorajado a exploração botânica no que respeita a novos fármacos anti-diabéticos (Day, 1998;Rajani & Kanaki, 2008).

Todavia, as vantagens da utilização de plantas medicinais constam na oferta de compostos naturais complexos, numa acção moderada e uma melhor tolerância relativamente aos fármacos sintéticos, e nas reduzidas reacções alérgicas que possam provocar (Lovkova *et al.*, 2001).

1.8.1 Plantas medicinais para a diabetes tipo 2

O Papiro de Ebers, escrito aproximadamente em 1550 a.C, constitui o documento mais antigo que descreve a utilização de plantas no tratamento de condições associadas com a diabetes (Simmonds & Howes, 2006).

Nas últimas décadas tem-se registado um crescente interesse nas plantas medicinais para o tratamento da diabetes. Antes da introdução da terapia com insulina em 1922, dietas rigorosas e tratamentos com plantas medicinais constituíam o pilar das terapêuticas anti-diabéticas (Day, 1998).

Em muitos países são usadas na medicina tradicional, plantas com propriedades medicinais para o controlo da diabetes tipo 2. Este facto tem vindo a aumentar o número de investigações experimentais e clínicas, dirigidas à validação das propriedades anti-diabéticas, que são empiricamente atribuídas a estes remédios. Deste modo, têm sido desenvolvidos estudos químicos dirigidos ao isolamento, purificação e identificação das substâncias responsáveis pela actividade hipoglicemiante (Roman-Ramos *et al.*, 1995).

Tabela 1: Plantas medicinais e possíveis modos de acção na diabetes

Modo de acção	Planta
Redução da absorção de glicose	Aloé (<i>Aloe vera</i>)
	Guar (<i>Cyamopsis tetragonoloba</i>)
	Aveia selvagem (<i>Avena sativa</i>)
	Cevada (<i>Hordeum disticum</i>)
Estimulação da produção de insulina	Ipecacuanha indiana (<i>Gymnema sylvestre</i>)
	Fenacho (<i>Trigonella foenum-graecum</i>)
Estimulação da função hepática	Chicória (<i>Cichorium intybus</i>)
	Ginsengue (<i>Panax ginseng</i>)
Redução da resistência à insulina	Galega (<i>Galega officinalis</i>)
Desconhecida	Pervinca (<i>Catharanthus roseus</i>)
	Dedaleira (<i>Rehmannia glutinosa</i>)

(Adaptado de Pinn, 2005)

A informação etnobotânica aponta para 800 plantas, que podem apresentar propriedades anti-diabéticas (Gurib-Fakim, 2006; Mentreddy, 2007). As famílias de plantas, incluindo as espécies (sp), mais estudadas pelos seus comprovados efeitos hipoglicemiantes, compreendem: Leguminosae (11 sp), Lamiaceae (7 sp), Liliaceae (8 sp), Cucurbitaceae (7 sp), Asteraceae (6 sp), Moraceae (6 sp), Rosaceae (6 sp),

Euphorbiaceae (5 sp) e Araliaceae (5 sp). As espécies mais estudadas são: *Opuntia streptacantha* Lem. (Cactaceae), *Trigonella foenum greacum* L. (Leguminosae), *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae), *Ficus bengalensis* L. (Moraceae), *Polygala senega* L. (Polygalaceae) e *Gymnema sylvestre* R. (Asclepiadaceae), (Bnouham *et al.*, 2006; Gurib-Fakim, 2006; Mentreddy, 2007).

Muitos estudos têm confirmado os benefícios de plantas medicinais com efeitos hipoglicemiantes no controlo da diabetes. Os efeitos destas plantas podem retardar o desenvolvimento das complicações diabéticas e corrigir anomalias metabólicas (tabela 1). Além do mais, ao longo dos últimos anos, alguns dos novos princípios activos isolados de plantas hipoglicemiantes, demonstram uma actividade anti-diabética mais eficaz do que agentes hipoglicemiantes orais usados na terapia clínica (Bnouham *et al.*, 2006; Gurib-Fakim, 2006; Mentreddy, 2007).

Para estes extractos de plantas, têm sido propostos diversos modos de acção. Algumas hipóteses apontam para efeitos na actividade das células β pancreáticas (síntese, libertação, regeneração/revitalização celular) ou o aumento do efeito protector/inibitório contra a insulinase, e o aumento da sensibilidade à insulina ou mimetização da actividade da insulina pelos extractos das plantas. Outros mecanismos podem envolver a melhoria da homeostasia da glicose, designadamente, o aumento da utilização periférica da glicose, aumento da síntese hepática de glicogénio e/ou diminuição da glicogenólise actuando nas enzimas, inibição da absorção intestinal de glicose, redução do índice glicémico. Todas estas acções podem ser responsáveis para a redução e/ou abolição das complicações diabéticas (Bnouham *et al.*, 2006).

1.8.2 Plantas da flora portuguesa com propriedades hipoglicemiantes

Plantas de várias famílias são tradicionalmente usadas para o tratamento da diabetes em Portugal. De entre elas, podem destacar-se a salsa (*Petroselinum crispum*, (Mill.) Nym., Apiaceae), a carqueja (*Pterospartum tridentatum* (L.) Willk., Fabaceae), a noqueira (*Juglans regia* L., Jugladiaceae), a pereira-abacate (*Persea americana* Mill., Lauraceae), a oliveira (*Olea europaea* L., Oleaceae), o pinheiro-bravo (*Pinus pinaster* Aiton, Pinaceae), a urtiga-brava (*Urtica membranacea* Poir, Urticaceae), a giesta branca (*Cytisus multiflorus* (L'Hér.) Sweet, Fabaceae) e o tremço (*Lupinus albus*, Fabaceae), (Marles & Farnsworth, 1995; Camejo-Rodrigues *et al.*, 2003; Carvalho, 2005).

A família Fabaceae, também conhecida por Leguminosae, é a família de plantas que apresenta um maior número de espécies citadas a nível mundial e que não estão

ainda caracterizadas na flora portuguesa (Marles & Farnsworth, 1995). Constitui a terceira maior família das Angiospérmicas, superada apenas pelas famílias Asteraceae e Orchidaceae. As Fabaceae, com cerca de 730 géneros e aproximadamente 20.000 espécies, ocorre em todos os habitats terrestres ocupados por plantas, embora o maior número de espécies se encontre nos trópicos, local provável da origem deste grupo de plantas ([http://www.britannica.com/ Classification-of-Fabaceae](http://www.britannica.com/Classification-of-Fabaceae)). Nesta família de plantas, têm sido descritos vários tipos de alcalóides, aminoácidos, aminas, flavonóides, isoflavonóides, coumarinas, fenilpropanóides, antraquinonas, di-, tri- e sesquiterpenos, glicósidos cianogénicos, inibidores de proteases e lectinas (Wink, 2003).

Existem em Portugal, várias plantas pertencentes a esta família, utilizadas já há muitos séculos na medicina tradicional, destacando-se a *Cytisus multiflorus* (a giesta branca), que se distribui por todo o norte do país (figura 10), onde os seus caules são também usados para a confecção de cestas (Franco, 1971;Carvalho, 2005).

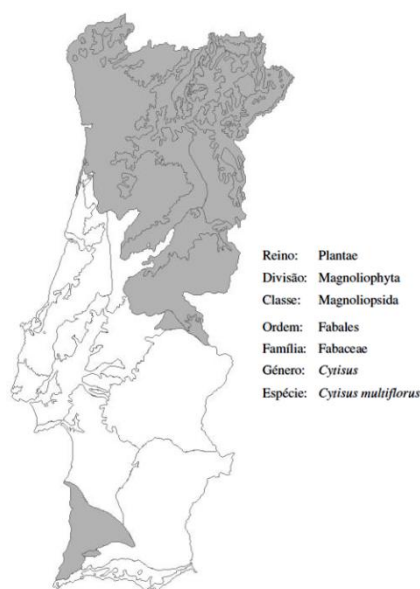


Figura 10: Distribuição geográfica de *C. multiflorus* em Portugal e respectiva classificação científica

Adaptado de www.jb.utad.pt

A giesta branca é um arbusto erecto e muito ramificado, que pode chegar aos 3 metros de altura. As folhas são unifoliadas e estão sustentadas nos caules floríferos. As flores brancas são hermafroditas e zigomorfas, medem aproximadamente entre 1-1,5 cm e apresentam-se em grupos de três. Em Portugal floresce entre Março e Abril (Franco, 1971). Para esta planta, não foram encontrados estudos fitoquímicos, que

apontem para uma caracterização química dos seus componentes, bem como uma clarificação dos efeitos biológicos que produz.

1.9 Compostos fenólicos

É nas plantas vasculares que são encontrados a grande maioria de compostos fenólicos. Eles compreendem compostos C_6 (compostos fenólicos simples), C_6-C_1 (ácido hidroxibenzóico e seus derivados), C_6-C_3 (fenilpropanóides, ácidos hidroxicinâmicos), $C_6-C_3-C_6$ (flavonóides, incluindo flavanonas, flavonas, flavonóis, catecóis, antocianinas, antraquinonas) e compostos fenólicos poliméricos (taninos), (Lovkova *et al.*, 2001).

Os compostos fenólicos resultam do metabolismo secundário das plantas e encontram-se frequentemente ligados a glúcidos (glicósidos), com solubilidade em água. Podem tratar-se de *O*-glicósidos ou menos frequentemente de *C*-glicósidos. Nos primeiros, um ou mais dos grupos hidroxilo está ligado a um ou mais glúcidos, por uma ligação glicosídica com o grupo hidroxilo do carbono anomérico do glúcido. Os *C*-glicósidos não possuem ligação glicosídica, já que a substituição do oxigénio do carbono anomérico elimina o grupo acetal, o que torna a molécula resistente a ataques ácidos, sendo esta a característica principal que distingue os *C*-glicósidos dos restantes glicósidos. A glicose é o glúcido mais vulgarmente encontrado, seguido da ramnose e do dissacarídeo rutinose. Os compostos fenólicos também se encontram nas plantas como agliconas (Ryan *et al.*, 1999; Ross & Kasum, 2002; Hsu & Yen, 2008).

As plantas sintetizam os compostos fenólicos ao longo do seu desenvolvimento normal e em resposta a condições de stress tais como infecções, radiação UV e auto-defesa (Naczki, 2004; Manach, 2004). Derivam biogeneticamente de duas vias metabólicas principais, a via do ácido xiquímico e a via do ácido malónico (figura 11), (Harborne, 1993).

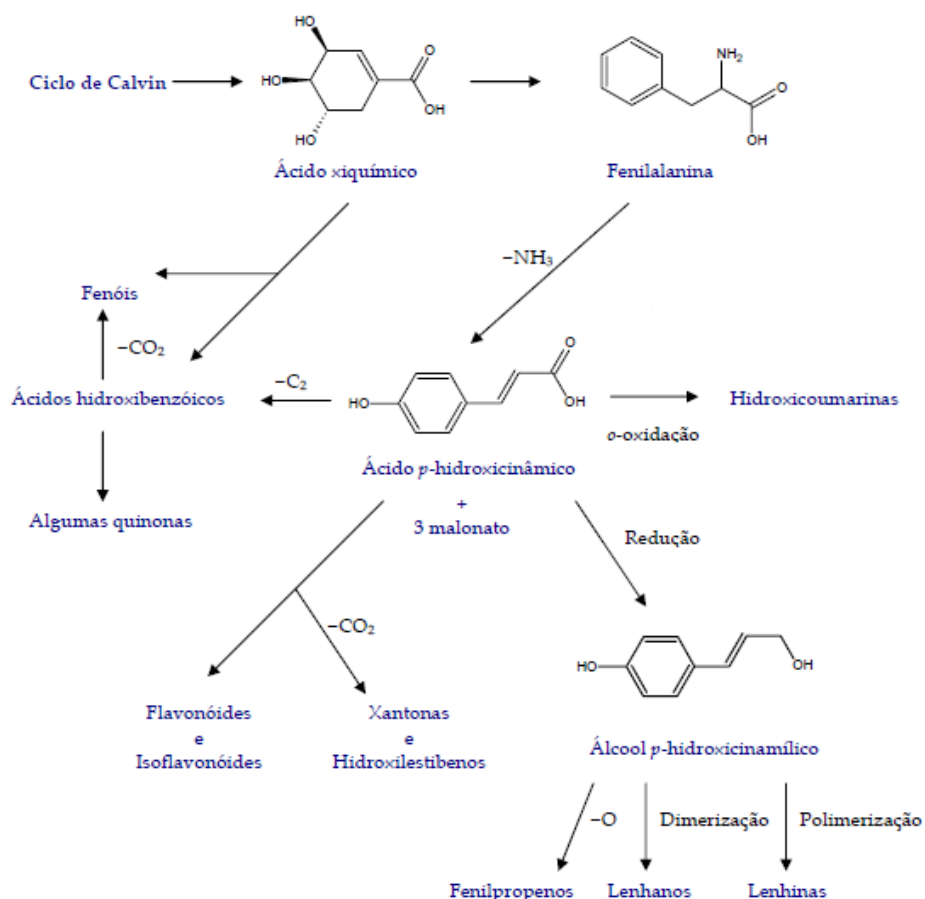


Figura 11: Origem biossintética dos compostos fenólicos
(Adaptado de Teixeira, 2006)

A via metabólica do ácido xiquímico fornece directamente fenilpropanóides, como os ácidos hidroxicinâmicos e as coumarinas e a via do ácido malónico origina fenóis simples e muitas quinonas. Contudo, muitos dos compostos fenólicos, como os flavonóides, são de origem biossintética mista, derivando de uma combinação destas duas vias (Harborne, 1993).

A sua distribuição não é uniforme nos tecidos das plantas, aos níveis celulares e subcelulares. Os fenóis insolúveis são componentes das paredes celulares, enquanto os fenóis solúveis encontram-se compartimentalizados no interior dos vacúolos das plantas (Nacz & Shahidi, 2004; Manach *et al.*, 2004).

Hoje em dia, são conhecidas mais de 8000 estruturas polifenólicas, apresentando um anel aromático com pelo menos um grupo hidroxilo substituído como principal característica. Estes compostos podem ser divididos em várias classes diferentes baseadas na sua estrutura química, que se encontram apresentados na tabela 2, (Ross & Kasum, 2002; Hsu & Yen, 2008).

Tabela 2: Principais classes de compostos fenólicos existentes nas plantas

Número de átomos de carbono	Esqueleto básico	Classe
6	C ₆	Fenóis simples, benzoquinonas
7	C ₆ -C ₁	Ácidos fenólicos
8	C ₆ -C ₂	Acetofenonas, ácidos fenilacéticos
9	C ₆ -C ₃	Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropenos, coumarinas, isocoumarinas, cromonas
10	C ₆ -C ₄	Naftoquinonas
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Xantonas
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Estilbenos, antraquinonas
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonóides, isoflavonóides
18	(C ₆ -C ₃) ₂	Lenhanos, neolenhanos
30	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonóides
n	(C ₆ -C ₃) _n	Lenhinas
	(C ₆) _n	Catecolmelaninas
	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Taninos condensados

(Adaptado de Harborne, 1993; Teixeira, 2006)

Os flavonóides são a maior classe de compostos fenólicos e apresentam uma estrutura base de difenilpropanos (C₆-C₃-C₆), que consiste em 2 anéis aromáticos ligados através de 3 carbonos (Harborne, 1993).

A estrutura principal dos flavonóides pode ser modificada e sofrer vários tipos de substituições, tais como a glicosilação, hidroxilação, metilação, glucuronidação, entre outros. O grau de polimerização que estes compostos apresentam confere uma vasta variabilidade no que respeita às suas propriedades químicas, físicas e biológicas. Encontram-se nas plantas na forma conjugada, sobretudo com um resíduo glicosídico ligado a um ou mais grupos fenólicos (Harborne, 1993).

Os flavonóides encontram-se subdivididos em 6 subclasses principais, de acordo com as variações que ocorrem no anel de carbono heterocíclico, originando os flavonóis, as flavonas, as flavanonas, as catequinas, as antocianinas e as isoflavonas (figura 12), (Ross & Kasum, 2002).

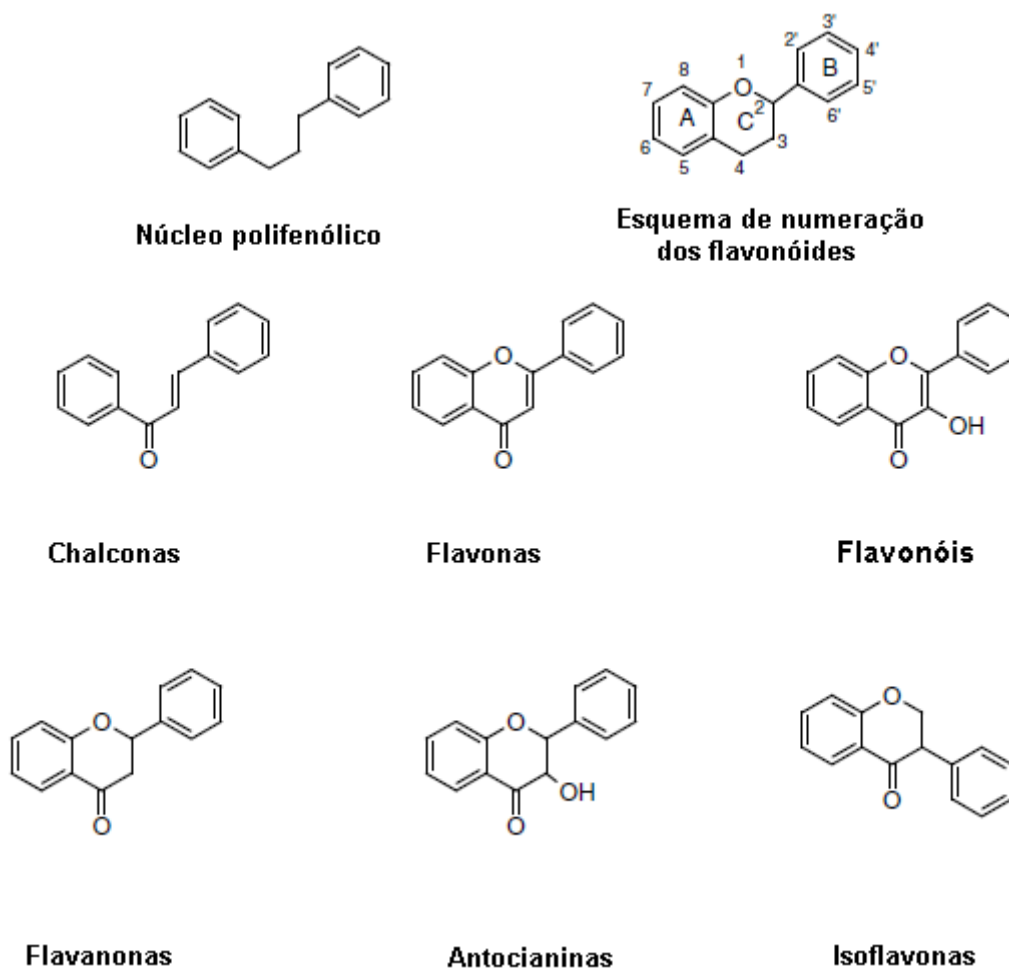


Figura 12: Classes dos flavonóides
Adaptado de Briemann *et al.*, 2006.

1.10 Propriedades biológicas dos compostos fenólicos

Actualmente, são atribuídas aos compostos fenólicos uma vasta gama de propriedades biológicas, tais como actividade antioxidante, anti-inflamatória, anti-tumoral, hepatoprotectora, hipoglicemiante, e que têm sido aplicados na medicina, farmacologia e bioquímica (Scalbert *et al.*, 2005; Kochetova *et al.*, 2007).

1.10.1 Propriedades antioxidantes

Actualmente, têm sido atribuídas propriedades antioxidantes aos compostos fenólicos, mais especificamente à classe dos flavonóides. Os mecanismos de acção anti-oxidante podem incluir (1) a supressão da formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) através da inibição de enzimas ou da acção quelante de elementos metálicos envolvidos na produção dos radicais livres; (2) sequestro de espécies

reactivas de oxigénio, e (3) regulação e protecção das defesas antioxidantes (Pietta, 2000; Heim *et al.*, 2002).

As células respondem aos compostos fenólicos principalmente através de interacções directas com os receptores ou enzimas envolvidos na transdução de sinal, que pode resultar na modificação do estado redox das células e pode desencadear uma série de reacções redox dependentes. Ambos os efeitos anti- e pro-oxidantes têm sido descritos na literatura. Como antioxidantes, os compostos fenólicos melhoram a sobrevivência celular e como pro-oxidantes podem induzir apoptose e prevenir o crescimento tumoral (Scalbert *et al.*, 2005).

Os flavonóides inibem as enzimas responsáveis pela produção do anião superóxido, como a xantina-oxidase e a proteína cinase C. Alguns estudos evidenciam a inibição da ciclo-oxigenase, lipoxigenase, monoxigenase microssomal, glutathione S-transferase e a NADH oxidase, todas elas compreendidas na produção de ROS (Pietta, 2000; Heim *et al.*, 2002). Por exemplo, a quercetina, a genisteína, a daidzeína e a rutina encontram-se descritas por ostentarem carácter anti-oxidante (Pinent *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2008).

A quercetina encontra-se possivelmente envolvida na modulação e na proliferação celular da célula β , atenuando a degeneração das células β e diminuindo o stress oxidativo (Vessal *et al.*, 2003; Pinent *et al.*, 2008).

A genisteína e a daidzeína promovem o aumento da massa de células β , em modelos animais da diabetes. É sugerida uma acção profiláctica destes compostos na diabetes, pois previnem a destruição das células β pancreáticas através da modulação da apoptose e consequentemente o desenvolvimento da patologia (Choi *et al.*, 2008). Encontra-se descrita a alteração das actividades da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione-peroxidase (GSH-Px), assim como a diminuição da concentração das substâncias reactivas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), com consequente redução do stress oxidativo em ratos diabéticos administrados com genisteína (Lee, 2006).

1.10.2 Propriedades hipoglicemiantes dos produtos naturais

Os compostos fenólicos e outros constituintes distintos isolados das plantas têm sido descritos por manifestarem propriedades hipoglicemiantes. Encontram-se incluídos os flavonóides, xantonas, saponinas, guanidinas, polissacarídeos, péptidos, iões inorgânicos, alcalóides, entre outros. No entanto, os mecanismos de acção destes compostos ainda permanecem um pouco incertos. Eles podem promover a libertação

de insulina ou a utilização periférica de glicose (Li *et al.*, 2004; Gurib-Fakim, 2006; Mukherjee *et al.*, 2006).

1.10.2.1 Alcalóides

Vários alcalóides têm sido isolados de plantas medicinais e a sua possível actividade hipoglicemiante tem sido estudada em diferentes modelos animais.

A berberina, isolada de *Tinospora cordifolia*, é conhecida por apresentar uma actividade hipoglicemiante eficaz. Estudos em linhas celulares Caco-2 sugerem que, a sua actividade hipoglicemiante é atribuída em parte à sua capacidade de inibir a α -glicosidase, assim como, de diminuir o transporte da glicose através do epitélio intestinal (Mukherjee *et al.*, 2006).

1.10.2.2 Polissacarídeos

Os polissacarídeos com actividade hipoglicemiante têm sido isolados de plantas tais como *Aloe vera*, *Ocimum sanctum* e *Alpinia galanga*. A actividade hipoglicemiante destes compostos tem sido atribuída à capacidade de aumentar os níveis plasmáticos de insulina, reduzir os níveis de glicose sanguínea e melhorar a tolerância à glicose (Mukherjee *et al.*, 2006).

1.10.2.3 Flavonóides

Os flavonóides representam outro grupo de compostos com propriedades hipoglicemiantes, capazes de melhorar os metabolismos glicolítico e oxidativo, que se encontram alterados no estado diabético (Mukherjee *et al.*, 2006).

Estudos *in vitro* demonstram que alguns flavonóides modificam a capacidade insulino-secretora da célula β . A genisteína é a isoflavona mais estudada actualmente. Estudos recentes apontam para um aumento da secreção de insulina na presença de um estímulo de glicose na linha celular de célula β pancreática MIN6, assim como em ilhéus cultivados de ratinho e rato em concentrações até $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. Pensa-se que pode estar envolvida na via de sinalização celular cAMP/PKA (Liu *et al.*, 2006; Pinent *et al.*, 2008). Porém, elevadas concentrações de genisteína, inibem a secreção de insulina em ilhéus de rato (Pinent *et al.*, 2008). É atribuída à genisteína e a outra isoflavona, a daidzeína, a capacidade de diminuir a produção hepática de glicose, com alteração do perfil enzimático do metabolismo hepático da glicose (Choi *et al.*, 2008).

A quercetina, de acordo com alguns estudos, é responsável por um aumento no número de ilhéus pancreáticos em ratos normais e em ratos cujo estado diabético

foi induzido (Vessal, 2003; Pinent, 2008). É-lhe atribuído um efeito estimulatório na secreção de insulina em parte através da alteração do metabolismo do Ca^{2+} (Mukherjee *et al.*, 2006; Cechinel, V, 2009).

A rutina, a forma glicosídica da quercetina, promove um aumento dos níveis de insulina plasmática em jejum em ratos cujo estado diabético foi induzido com estreptozotocina (Pinent *et al.*, 2008).

As catequinas também têm sido descritas como estimuladoras da secreção de insulina de ilhéus isolados de rato (Pinent *et al.*, 2008).

Alguns derivados glicosídicos do canferol têm demonstrado um efeito agudo na diminuição da glicemia em ratos diabéticos e uma estimulação da captação e utilização da glicose, o que sugere que estes compostos actuem ao nível do transportador de glicose (de Sousa E. *et al.*, 2004; Cechinel, V, 2009).

O ácido ferrúlico, apesar de não pertencer à classe dos flavonóides, e constituir um ácido hidroxicinâmico, tem sido descrito por ostentar actividade antioxidante elevada conjuntamente com uma actividade hipoglicemiante em animais que manifestam hiperglicemia. Estudos *in vitro* em células pancreáticas RIN-5F sugerem que os compostos amida, derivados do ácido ferrúlico têm efeitos estimulatórios na secreção de insulina (Mukherjee *et al.*, 2006).

1.10.2.4 Saponinas

As saponinas apresentam na sua estrutura uma aglicona, geralmente triterpenos ou esteróides, ligados a resíduos glicosídicos (Yoshikawa & Matsuda, 2006).

A kaikasaponina III, isolada das flores de *Pueraria thunbergiana* (Leguminosae), apresenta efeitos hipoglicemiantes e hipolipidémicos em ratos diabéticos induzidos com STZ. É-lhe também atribuída uma acção antioxidante (Yoshikawa & Matsuda, 2006).

1.11 Métodos analíticos

1.11.1 Métodos de extracção de compostos fenólicos

A extracção de compostos fenólicos das plantas compreende a libertação destes compostos das estruturas vacuolares, onde se encontram armazenados, provocando a ruptura dos tecidos vegetais ou então através de um processo de difusão. A extracção sólido-líquido ou a extracção em fase sólida constituem métodos usualmente aplicados na extracção de compostos fenólicos (Escribano-Bailón & Santos-Buelga, 2003).

Os compostos fenólicos solúveis são geralmente extraídos usando água, metanol, etanol ou acetona. A presença de glúcidos ligados conferem aos compostos fenólicos uma maior solubilidade em água e, misturas dos solventes acima mencionados com água constituem solventes melhores para os glicósidos. Porém, agliconas menos polares tais como isoflavonas, flavanonas, flavonas e flavonóis bastante metoxilados tendem a ser mais solúveis em solventes não-aquosos (Escribano-Bailón & Santos-Buelga, 2003).

1.11.2 Extracção sólido-líquido (SLE – *Solid liquid extraction*)

A extracção por solventes de amostras sólidas, que é vulgarmente designada de extracção sólido-líquido, consiste numa das técnicas mais antigas para preparação de amostras sólidas. É usada na remoção e separação de compostos de interesse de amostras insolúveis. Normalmente, é efectuada com recurso à maceração, tendo em atenção a escolha do solvente e a utilização de calor e/ou agitação para aumentar a solubilidade dos compostos e a taxa de transferência de massa (Luque de Castro & Priego-Capote, 2010).

No que diz respeito à obtenção de compostos fenólicos, a extracção sólido-líquido envolve a separação dos compostos fenólicos por difusão de uma matriz sólida (tecidos de planta) utilizando uma matriz líquida (solvente).

1.11.3 Extracção por refluxo – extracção por Soxhlet

A extracção por soxhlet constitui uma técnica padrão e é a principal referência para avaliar o desempenho de outros métodos de extracção sólido-líquido. Num sistema Soxhlet convencional o material vegetal é colocado num cartucho de suporte e preenchido com o solvente condensado fresco proveniente de um balão de destilação. Quando o solvente condensado ultrapassa um certo volume, ele escoar de volta para o balão, onde é aquecido, e é novamente evaporado. Deste modo, os solutos são

concentrados no balão e o solvente, quando entra em contacto com a fase sólida, está sempre puro (Wang & Weller, 2006).

1.11.4 Extracção em fase sólida (SPE)

A extracção em fase sólida é um método utilizado na extracção de compostos existentes numa matriz líquida ou como complemento na extracção por solventes. Pode ainda ser aplicado como método de purificação/fraccionamento ou para pré-concentração de compostos (Thurman & Mills, 1998;Escribano-Bailón & Santos-Buelga, 2003).

Este processo decorre através da adsorção do analito a uma fase sólida existente numa coluna descartável, seguida da sua eluição com um solvente apropriado para a análise que se pretende efectuar, recorrendo a pressão aplicada ou sob vácuo (Thurman & Mills, 1998).

Os mecanismos de retenção do analito envolvem interacções de van der Waals, ligações de hidrogénio, forças dipólo-dipólo, exclusão molecular e trocas aniónicas ou catiónicas. As colunas de fase reversa C₁₈ constituem o tipo de colunas usado mais frequentemente. A sua superfície de adsorção é uma das mais hidrófobas e apresenta uma elevada capacidade de adsorção. Possibilita a separação dos analitos através da sua polaridade, em que a fase estacionária é derivatizada com cadeias hidrocarbonadas, que retém os compostos de média a baixa polaridade devido ao efeito hidrófobo. O analito é posteriormente eluído pela passagem de um solvente apolar na coluna, que quebra a interacção entre o analito e a fase estacionária (Thurman & Mills, 1998;Nováková & Vlcková, 2009).

Actualmente, é o método mais vulgarmente utilizado devido a algumas vantagens que apresenta: elevada recuperação do analito, purificação de extractos e pré-concentração eficaz, redução no consumo de solventes orgânicos, facilidade de automação e compatibilidade com a análise cromatográfica (Thurman & Mills, 1998;Nováková & Vlcková, 2009).

1.12 Métodos de separação e análise

A complexidade dos extractos naturais exige cada vez mais técnicas consistentes e eficazes que permitam a separação e caracterização dos compostos existentes, nomeadamente dos compostos fenólicos. Hoje em dia, a cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC) constitui a técnica mais aceitável e consistente na análise de compostos fenólicos.

1.12.1 Cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC- High-performance liquid chromatography)

Os avanços mais distintos em cromatografia têm ocorrido no domínio do HPLC, apesar de esta técnica existir há aproximadamente 40 anos. Até ao advento do HPLC, a maioria das separações fitoquímicas eram realizadas por cromatografia em camada fina (TLC- thin layer chromatography), em papel ou em coluna aberta. Porém, estes métodos apresentam uma quantificação inadequada e uma resolução deficiente para compostos semelhantes. Já por sua vez, a cromatografia gasosa proporciona uma excelente resolução mas é restrita a substâncias voláteis, a não ser que sejam submetidas a derivatização química. Deste modo, surge a técnica de HPLC que permite separar compostos solúveis em água, termolábeis e não voláteis com elevada rapidez, precisão e resolução. Constitui a técnica analítica mais utilizada na análise de compostos fenólicos, permitindo a utilização de diferentes modos de separação e detecção (Harborne, 1993;Marston, 2007).

As colunas de fase normal têm sido algumas vezes utilizadas para separar compostos fenólicos por HPLC. No entanto, estes sistemas de fase normal apresentam o problema de os compostos mais polares poderem ficar irreversivelmente retidos na coluna, o que pode resultar numa alteração gradual das características da separação. Assim, as colunas de fase reversa (RPC- Reverse phase column) são normalmente escolhidas para separar compostos fenólicos. Usualmente são utilizadas colunas C_8 ou C_{18} e fases móveis aquosas com modificadores orgânicos como metanol ou acetonitrilo (Robards & Antolovich, 1997).

A eluição a utilizar pode ser isocrática, para separar compostos de uma família específica ou por gradiente, que é normalmente preferida para separar misturas complexas de compostos fenólicos. Os sistemas mais comuns incluem um gradiente binário de solventes, em que um dos solventes é normalmente água acidificada ou com aditivos como o fosfato (solvente A), e o outro é geralmente constituído por metanol ou acetonitrilo, puros ou acidificados (solvente B). A separação demora normalmente cerca de uma hora, utilizando um fluxo de $1.0-1.5 \text{ mL}^{-1}$ (Tsao & Deng, 2004). Em fase reversa, os compostos mais polares são geralmente eluídos em primeiro lugar, visto que a fase estacionária é menos polar que a fase móvel e, por isso os compostos são eluídos por ordem decrescente de polaridade. Desta forma, os diglicósidos precedem os monoglicósidos, que são eluídos da coluna antes das agliconas (Robards & Antolovich, 1997;Santos-Buelga *et al.*, 2003; Teixeira, 2006).

1.12.1.1 Detecção em HPLC

1.12.1.1.1 Detecção ultravioleta-visível (UV) e *diode array* (DAD)

A espectrometria UV-VIS tem sido bastante utilizada na quantificação de compostos fenólicos, visto que ostentam ligações duplas conjugadas ou anéis aromáticos que absorvem na região do ultravioleta e visível. A aplicação do detector UV-VIS em métodos separativos, especialmente a combinação do DAD com HPLC, vai muito aquém da quantificação por absorção de radiação (Tsao & Deng, 2004).

De facto, a introdução de HPLC-DAD melhorou significativamente a análise deste tipo de compostos, pois possibilita não só obter as características de retenção, como os espectros UV de cada um dos compostos. Este tipo de detector é capaz de simultaneamente detectar e traçar cromatogramas a diferentes comprimentos de onda (c.d.o.), aumentando substancialmente o desempenho da separação do sistema assim como a sensibilidade de detecção dos compostos. Os espectros de cada pico, obtidos *on-line*, são gravados e podem depois ser comparados com bibliotecas de espectros. O ruído e as flutuações da linha de base dos cromatogramas podem também ser corrigidos, subtraindo ao cromatograma do c.d.o. escolhido para a gravação, o obtido a um c.d.o. de referência onde o composto praticamente não absorva. Além disso, com os detectores de DAD pode ser obtida alguma informação acerca do grau de pureza dos picos: examinando os espectros UV obtidos ao longo do pico e calculando as razões entre absorvâncias a diferentes c.d.o.; se estas razões forem constantes ao longo de todo o pico pode-se assumir que o pico está puro, a não ser que dois compostos com exactamente o mesmo espectro UV tenham coeluído naquele pico (Santos-Buelga *et al.*, 2003; Teixeira, 2006).

Apesar da análise por HPLC-DAD permitir a obtenção de alguma informação útil para a identificação de compostos fenólicos, a sua identificação inequívoca não pode ser apenas baseada em espectros UV. Para uma elucidação estrutural completa é necessário, na maioria dos casos, recorrer a outras técnicas como a espectrometria de massa (MS – Mass spectrometry) ou a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR- Nuclear magnetic resonance),(Tsao & Deng, 2004; Teixeira, 2006).

1.12.1.1.2 Detectores de massa (MS)

A espectrometria de massa, em geral, tem-se demonstrado muito útil na identificação de compostos fenólicos, permitindo obter informação sobre a massa molecular e a estrutura dos compostos. Esta técnica resume-se à separação dos compostos na forma de iões através da razão massa/carga (m/z), seguida da sua

identificação através de um espectro de massa que apresenta a abundância relativa dos iões em função de m/z (Wood, 2006). O aparelho de MS é constituído essencialmente pelo sistema de injeção da amostra, fonte de ionização, um analisador de massa, um detector de iões e um sistema de análise de dados.

Porém, o acoplamento entre HPLC e MS não foi fácil, visto que as condições normais de funcionamento do espectrómetro de massa (vácuo elevado, temperatura elevada, funcionamento em fase gasosa e taxas de fluxo reduzidas) são o oposto das usadas em HPLC, nomeadamente funcionamento em fase líquida, pressões elevadas, taxas de fluxo elevadas e temperaturas relativamente baixas. Deste modo, foram desenvolvidas interfaces que realizam a nebulização e vaporização do líquido, a ionização da amostra, a remoção do excesso de solvente vaporizado e a extracção dos iões para o analisador de massa. A maioria das interfaces funciona com sistemas de HPLC de fase reversa e abrangem a ionização de pequenas moléculas apolares (agliconas) e de grandes moléculas polares (glicósidos) (Marston & Hostettmann, 2006).

A ionização à pressão atmosférica (API - Atmospheric pressure ionization) tornou o LC-MS mais sensível e fácil de manusear. Uma interface API é constituída por cinco partes: (a) o dispositivo de introdução do líquido ou sonda com spray; (b) a região produtora de iões à pressão atmosférica real, onde os iões são gerados por meio de ionização por electrospray (ESI), de ionização química à pressão atmosférica (APCI), ou por outros meios; (c) uma abertura para a amostra iónica; (d) uma interface para vácuo à pressão atmosférica; (e) um sistema óptico iónico, onde os iões são consequentemente transportados para o analisador de massa. As técnicas de ESI e APCI compreendem uma ionização suave que produz os principais iões moleculares de pequenos metabolitos das plantas, como por exemplo os flavonóides (De Pascual-Teresa & Rivas-Gonzalo, 2003; Marston & Hostettmann, 2006).

Actualmente, ESI é a técnica mais comumente utilizada na análise de flavonóides polares ou iónicos, principalmente devido à facilidade com que consegue ionizar este tipo de compostos. Esta técnica permite a detecção do ião molecular, assim como da molécula protonada $[M+H]^+$, aducto $[M+Na]^+$ ou da molécula desprotonada $[M-H]^-$, e provoca apenas fragmentação moderada das moléculas. Ademais, esta técnica providencia informação estrutural de compostos altamente polimerizados a partir da análise dos perfis de fragmentação e do nível da carga dos iões formados (Fossen & Andersen, 2006).

Na interface de ESI (figura 13), o eluente, proveniente do HPLC, entra num capilar mantido à pressão atmosférica e a elevada voltagem. Devido ao campo eléctrico

gerado pela diferença de potencial, o líquido é transformado num spray de gotas carregadas, que são dessolvatadas, à medida que passam na região de pressão atmosférica da fonte, em direcção ao contra eléctrodo. A dessolvatação é assistida por um fluxo de um gás de secagem, normalmente azoto, que passa em contínuo na região do spray. Os iões carregados dos analitos são conduzidos para o espectrómetro de massa, através da passagem por duas zonas de pressão cada vez menor (Ardrey, 2003; Teixeira, 2006).

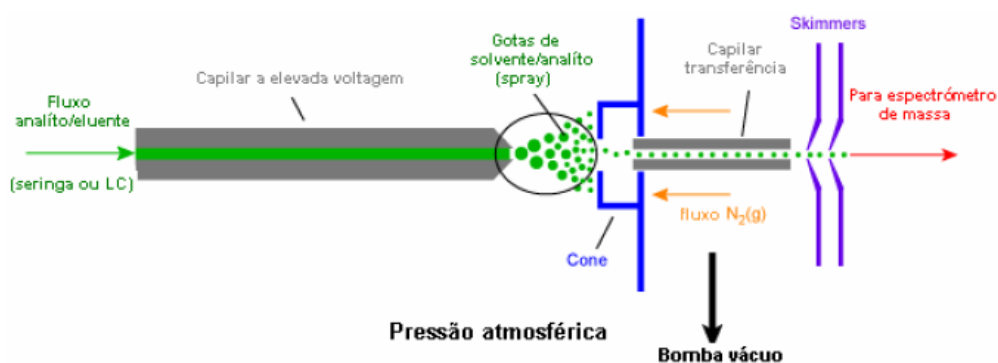


Figura 13: Representação esquemática da fonte ESI
Adaptado de Gates, 2004b.

As diferenças entre APCI e ESI encontram-se no método de formação do spray e no mecanismo de formação dos iões (Ardrey, 2003). A fonte APCI é mais adequada para compostos que são parcialmente voláteis e apresentam uma polaridade média. Comparativamente ao ESI, o APCI produz mais iões fragmentados no espectro devido aos duros processos de vaporização e ionização (Fossen & Andersen, 2006). Na interface de APCI (figura 14), o líquido proveniente do HPLC entra na interface, através de uma agulha e é transportado por um fluxo de azoto aquecido que o conduz ao nebulizador, mantido também a temperatura elevada, onde as gotas são formadas e dessolvatadas.

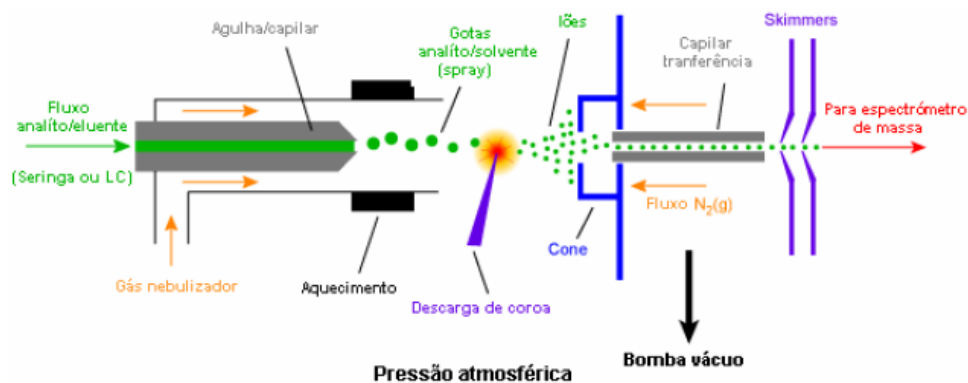


Figura 14: Representação esquemática da fonte APCI

Adaptado de Gates, 2004a.

O spray formado passa através de uma região aquecida onde o vapor é continuamente dessolvatado. As espécies neutras resultantes são submetidas a uma descarga de coroa onde a ionização dos analitos é obtida por processos de ionização química, com o solvente vaporizado a actuar como gás reagente. Devido à descarga aplicada, as moléculas de solvente adquirem carga e, através de uma subsequente transferência de carga, as moléculas do analito ficam também carregadas. Os iões são depois conduzidos para o interior do espectrómetro de massa, através de uma apropriada diferença de potencial aplicada (Ardrey, 2003; Teixeira, 2006).

Os analisadores de massa mais utilizados hoje em dia são baseados num feixe de transporte de iões tais como campo magnético, tempo de voo (TOF – *Time of flight*) e filtro de massa quadropólo, ou na tecnologia de “aprisionamento” de iões como armadilha de iões (IT – *Ion trap*). Apresentam capacidades diferentes relativamente à resolução, precisão e intervalo de massa analisados (Tsao & Deng, 2004).

O analisador de armadilhas de iões é um quadropólo tridimensional. Consiste num conjunto de eléctrodos, um central e dois terminais. Os iões, depois de introduzidos no *ion trap*, seguem uma trajectória complexa mas estável devido à aplicação de uma diferença de potencial de radiofrequência. À medida que se aumenta esta diferença de potencial, a trajectória dos iões de menor massa torna-se instável e estes são encaminhados para o detector. Através da variação sistemática da diferença de potencial de radiofrequência é produzido um espectro de massa. Tal como o analisador de quadropólo, o analisador de armadilha de iões permite uma análise rápida e é compatível com pressões relativamente elevadas. A grande desvantagem dos analisadores de quadropólo e armadilha de iões é a sua baixa resolução, pois usualmente não permitem a separação de iões com m/z semelhante e energias diferentes (Ardrey, 2003; Teixeira, 2006).

A quantidade de informação estrutural obtida, a sensibilidade e selectividade da detecção podem ser ampliadas através da utilização de espectrometria de massa *tandem* (TMS – *Tandem mass spectrometry*), ou seja, dois analisadores de massa (MS^2) ou mais (MS^n) acoplados em série. É produzida uma maior fragmentação dos iões precursores, fornecendo informação adicional sobre a estrutura dos compostos para a sua identificação (Tsao & Deng, 2004). Em MS^2 é escolhido um ião específico da fragmentação inicial, que é novamente fragmentado em iões de menor massa, os quais são usados para obter informação estrutural mais detalhada sobre o composto em análise. Em misturas complexas, estes iões resultantes podem permitir a identificação inequívoca de compostos já conhecidos. Se se tratar de compostos desconhecidos, estes fragmentos fornecem informação para uma futura elucidação da sua estrutura. Existem vários tipos de instrumentos que permitem realizar experiências de MS-MS como sejam o triplo quadrupólo, o espectrómetro de massa híbrido, o analisador TOF *tandem* MS, o TOF quadrupólo e *ion trap tandem* MS, entre outros (Ardrey, 2003; Teixeira, 2006).

O processamento dos resultados em LC-MS pode ser realizado em vários modos, mas os mais comuns são o cromatograma de corrente iónica total (TIC- Total ion current), a monitorização do ião seleccionado (SIM- Single ion monitoring) e a monitorização da reacção seleccionada (SRM- Selected reaction monitoring).

O cromatograma de TIC representa graficamente a corrente iónica total em função do tempo e, portanto, são detectados compostos de todos os valores de m/z dentro de uma determinada gama, o que torna a identificação e quantificação do composto de interesse por vezes difícil. Em SIM é seleccionada uma gama muito restrita de valores m/z , normalmente até um único valor, e são apenas detectados os compostos correspondentes àquele valor de m/z . A monitorização por reacção seleccionada (SRM) é provavelmente o método mais utilizado em análise quantitativa por LC-MS porque permite a produção de um único fragmento, que pode ser quantificado com elevada sensibilidade, mesmo a partir de uma matriz muito complicada. Neste tipo de monitorização é especificado o ião precursor do composto, para a posterior fragmentação por MS-MS, e é detectado um único fragmento resultante do primeiro (Teixeira, 2006).

II- Problema e Objectivos

2. Problema e Objectivos

A flora nativa portuguesa inclui várias plantas às quais se atribuem propriedades hipoglicemiantes, sem que estas tenham, no entanto, sido ainda cientificamente demonstradas. A *Cytisus multiflorus*, vulgarmente designada por giesta branca, é uma dessas plantas, utilizada na medicina tradicional. As propriedades hipoglicemiantes do extracto aquoso de *C. multiflorus* foram recentemente demonstradas num trabalho prévio de investigação, desenvolvido nos Laboratórios do Departamento de Química da Universidade de Évora e do ICAAM. Neste trabalho, observou-se uma diminuição significativa das glicemias pós-prandiais e um aumento das insulinemias pós-prandiais dependentes da dose, em roedores que apresentaram anomalias das provas de tolerância à glicose oral (Antunes *et al*, 2009).

Esta planta ainda não foi caracterizada quimicamente, desconhecendo-se quais os componentes responsáveis pela actividade hipoglicemiante. Assim, neste trabalho, pretendeu-se contribuir para o esclarecimento da composição química deste extracto e avaliar a sua actividade biológica, com vista à identificação de compostos de potencial interesse farmacológico.

Especificamente pretendeu-se:

- i. Efectuar a caracterização química do extracto aquoso das flores de *C. multiflorus*. Para tal, procedeu-se à preparação de um extracto aquoso recorrendo à extracção sólido-líquido; fraccionou-se o extracto aquoso recorrendo à técnica de separação em fase sólida (SPE); avaliou-se a composição química das fracções do extracto por Cromatografia Líquida de Elevada Eficiência com detecção por *diode array* (HPLC-DAD) e identificaram-se alguns compostos presentes nas fracções do extracto aquoso recorrendo à técnica de Cromatografia Líquida de Elevada Eficiência acoplada a Espectrometria de Massa (HPLC-MS).
- ii. Determinar a actividade antioxidante e a quantidade de fenóis totais presentes nas fracções do extracto aquoso de *C. multiflorus*, dado que alguns dos compostos cujos efeitos se verificam beneficiar a actividade celular possuem actividade antioxidante. A quantidade de fenóis totais foi determinada através do método de Folin-Ciocalteu modificado e a actividade antioxidante pelo método do DPPH.
- iii. Avaliar *in vivo* o efeito hipoglicemiante de algumas fracções do extracto aquoso de *C. multiflorus* obtidas anteriormente. Para tal, utilizou-se uma estirpe de

ratos Wistar intolerantes à glicose, aos quais foram administrados diferentes fracções do extracto, tendo-se medido as glicemias em jejum e pós-prandiais.

III- Materiais e Métodos

3.1 Recolha e preparação do material vegetal

As flores da giesta branca foram adquiridas na aldeia de Barreiros, concelho de Valpaços, distrito de Vila Real em Trás-os-Montes, no mês de Março de 2008. A identificação botânica da planta foi realizada pela Professora Marízia Menezes, do Departamento de Planeamento Biofísico e Paisagístico da Universidade de Évora.

O material vegetal foi seco em local arejado e ao abrigo do sol e posteriormente reduzido a pó, utilizando uma picadora convencional de cozinha.

3.2 Equipamento

As análises por HPLC foram realizadas num aparelho Agilent 1100 system (Agilent Technologies, Alemanha) equipado com detectores UV e DAD, um desgaseificador G1322A, uma bomba quaternária G1311A, um injector manual Rheodyne 7725i acoplado a um *loop* de 20 μ L e *software* HP Chemstation. A coluna analítica utilizada foi uma coluna de fase reversa Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ (Agilent Technologies, Alemanha), dimensões 250x4.6mm e com tamanho da partícula 5 μ m.

As análises por LC-ESI-MS foram realizadas com um aparelho de HPLC Surveyor ThermoFinnigan equipado com detector de DAD e um amostrador automático, que se encontrava acoplado a um espectrómetro de massa LCQ Advantage ThermoFinnigan com fonte de ionização *electrospray* e analisador de massa com armadilha de iões (*ion trap*). Controlou-se o sistema com o *software* Xcalibur ThermoFinnigan. A coluna analítica utilizada foi uma coluna de fase reversa Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ (Agilent Technologies, Alemanha), dimensões 150x4.6mm e com tamanho da partícula 5 μ m.

A determinação da actividade antioxidante e o doseamento de compostos fenólicos totais das fracções do extracto foram realizados num espectrómetro Hitachi U-2000.

Os extractos foram secos a vácuo utilizando um evaporador rotativo Heidolph VV 2000 e um banho termostatzado Heidolph WB 2000.

3.3 Materiais e Reagentes

Os materiais e reagentes utilizados encontram-se descritos nas tabelas 3 e 4, respectivamente.

Tabela 3: Características dos materiais utilizados.

Material	Características	Fabricante
Papel de filtro	Watman 42 ashless 150mmØ	Watman
Cartuchos SPE LC18	Supelco 20mL, 5g	Sigma-Aldrich
Filtros de amostra Nylon	0.45 µm diâmetro dos poros 25mm diâmetro do filtro	VWR

Tabela 4: Grau de pureza e fabricantes dos reagentes utilizados

Reagente	Grau de pureza	Fabricante
Acetonitrilo	HPLC gradiente	SDS
Metanol	HPLC gradiente	Merck
Metanol	p.a.	SDS
Ácido fórmico	98%	Merck
Hidróxido de sódio	p.a.	Merck
Carbonato de sódio	p.a.	Merck
D-catequina	96%	Fluka
Reagente de Folin-Ciocalteu	Solução aquosa (100mL): - 10g $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 25g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 5mL H_3PO_4 85% - 10mL HCL 35% - 15g $\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Panreac
DPPH (Radical 2,2'-difenil-1-picrilhidrazil)	95%	Sigma-Aldrich
Glicose	p.a.	Sigma
Tris	p.a.	Merck
Hidróxido de potássio	p.a.	Merck
Éter etílico		José M. Vaz Pereira
EDTA	p.a.	Merck
Cloreto de sódio	p.a.	Merck
Glicazida Labesfal 80mg		Labesfal

A água utilizada no fraccionamento do extracto e nas análises por HPLC e LC-MS foi previamente bidestilada e depois desionizada através de um sistema Milli-Q (Simplicity® UV, Millipore Corp., France).

3.4 Procedimento Experimental

3.4.1 Preparação do extracto aquoso de *Cytisus multiflorus*

O extracto aquoso de *Cytisus multiflorus* foi preparado de duas formas, por infusão e por refluxo (soxhlet), de forma a comparar a eficiência destes métodos de extracção sólido-líquido.

Para obter o extracto por infusão, utilizaram-se 25g de flor triturada em 750 mL de água, sendo levado à ebulição durante 10 min.

Para obter o extracto por refluxo utilizaram-se 15g de flor triturada em 500 mL de água, que permaneceram em extracção durante 3h a 60°C.

Após arrefecimento dos extractos, estes foram filtrados e secos em evaporador rotativo sob vácuo. Os extractos secos foram conservados a 4°C até posterior fraccionamento por SPE.

3.4.2 Fraccionamento do extracto aquoso de *Cytisus multiflorus* e isolamento dos compostos

O fraccionamento dos extractos totais de *Cytisus multiflorus* foi efectuado por SPE. Para tal, os cartuchos de SPE foram previamente condicionados com 50 mL de metanol e 30 mL de água ultra-pura. Depois de condicionados, os cartuchos foram secos sob vácuo e aplicaram-se as amostras de extracto total. Os cartuchos foram novamente secos sob vácuo, durante 1 hora aproximadamente, para permitir a retenção dos compostos nos cartuchos. Os compostos foram depois eluídos lentamente com 10 mL de cada mistura com percentagem crescente de metanol em água, conforme exemplificado na tabela 5 (Teixeira, 2006).

Tabela 5: Eluentes usados no fraccionamento por SPE do extracto aquoso de *C. multiflorus*

Eluentes	Proporção água (%)	Proporção metanol (%)
1º	100	0
2º	90	10
3º	80	20
...	...	...
11º	0	100

3.4.3 Análise do extracto por HPLC-DAD

A análise dos extractos obtidos foi realizada por cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC), utilizando um detector de *diode-array* e um *loop* de 20 μL . A fase móvel consistia num sistema binário de solventes: A- acetonitrilo e B- água contendo 2.5% de acetonitrilo (v/v) e 0.5% de ácido fórmico (v/v). A separação foi realizada por gradiente durante 30 minutos, iniciando com 100% de B e 0% de A e terminando com 0% de B e 100 % de A, utilizando um fluxo de 1 mL min^{-1} . O perfil cromatográfico foi gravado a 280 nm e a 254 nm (largura da banda: 4 nm e c.d.o de referência 400 nm). Todas as análises foram realizadas à temperatura ambiente e todas as injeções de amostra foram executadas manualmente. As amostras do extracto total foram previamente filtradas.

3.4.4 Doseamento dos fenóis totais existentes em cada fracção do extracto

A determinação da quantidade de fenóis totais em cada fracção do extracto foi efectuada de acordo com o método de Folin-Ciocalteu modificado (Sharma *et al*, 1995). Os resultados foram expressos em equivalentes de D-catequina. Para tal, construiu-se uma recta de calibração para a D-catequina (Absorvância 700nm vs concentração (mg mL^{-1})). Preparou-se uma solução padrão stock 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de D-catequina. Por diluição desta solução com água bidestilada, prepararam-se soluções padrão de concentrações 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Alíquotas de 2 mL de cada um dos padrões foram misturadas com 0.4 mL de carbonato de sódio (10% (m/v)) em hidróxido de sódio (0.1 mol L^{-1}) e 0.2 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (1.0 mol L^{-1}). As misturas foram colocadas num banho de água (90-100°C) durante 1 minuto. Depois da fervura, as misturas foram arrefecidas até à temperatura ambiente e foi medida a respectiva absorvância a 700 nm.

A determinação da quantidade de fenóis totais nas fracções do extracto foi realizada utilizando um procedimento semelhante, depois de efectuadas as diluições adequadas, de modo a apresentarem a mesma concentração, 1.2 mg mL^{-1} , para que seja possível comparar o conteúdo em fenóis totais existente em cada uma.

Todas as determinações foram realizadas em triplicado.

3.4.5 Determinação da actividade antioxidante de cada fracção do extracto

A actividade antioxidante das fracções do extracto foi determinada espectrometricamente, utilizando um método de descoloração de radicais, DPPH (Brand-Williams *et al.*, 1995). Deste modo, preparou-se uma solução de radical DPPH em metanol ($100.0 \mu\text{mol L}^{-1}$). Foram adicionados 0.1 mL de cada fracção a 2.9 mL de DPPH e as misturas foram protegidas da luz, à temperatura ambiente durante 30 minutos até a reacção de descoloração terminar. Após este tempo determinou-se a absorvância de cada mistura (A_t). Mediu-se também a absorvância da mistura de 2.9 mL de DPPH com 0.1 mL de metanol, que constituiu a referência (A_0). Todas as determinações foram efectuadas em triplicado, a um c.d.o. de 515 nm num espectrómetro de UV-Vis.

A actividade antioxidante das fracções foi efectuada em soluções com concentração 1.2 mg mL^{-1} , obtidas por diluição com água bidestilada.

Com os resultados obtidos determinou-se a percentagem de inibição para cada fracção do extracto.

3.4.6 Identificação de alguns compostos existentes nas fracções do extracto por LC-ESI-MS

As fracções do extracto aquoso de *C. multiflorus* foram injectadas no LC-ESI-MS para identificação de alguns compostos. Inicialmente procedeu-se à análise em full MS em modo negativo, de cada fracção e após a análise dos espectros UV e de massa destas mesmas fracções seleccionaram-se picos cromatográficos que foram submetidos a MS^2 .

Tabela 6: Condições de análise das fracções do extracto aquoso de *C. multiflorus* por LC-ESI-MS

Condições de análise	LC-ESI-MS/LC-ESI-MS-MS
Temperatura do capilar (°C)	300
Potencial do cone/Voltagem da fonte (kV)	-4.5
Corrente da fonte (uA)	100
Potencial /Voltagem do capilar (V)	-45
Intervalo de análise (m/z)	100-800/100-2000
Gás de colisão	He
Percentagem de colisão (%)	35

A fase móvel consistia num sistema binário de solventes: A- acetonitrilo e B- água contendo 0.1% de ácido fórmico (v/v). A separação foi realizada em gradiente durante

45 minutos, com injeção automática de 20 μL de amostra, iniciando com 100% de B e 0% de A e terminando com 0% de B e 100 % de A, utilizando um fluxo de 0.3mL min^{-1} . O perfil cromatográfico foi gravado a 254 e 280 nm, usando um detector DAD.

As fracções foram previamente filtradas antes de serem injectadas no HPLC.

As condições de análise das fracções encontram-se descritas na tabela 6.

3.4.7 Avaliação *in vivo* do efeito hipoglicemiante das fracções do extracto aquoso de *C. multiflorus* em ratos intolerantes à glicose (GIR)

Após análise dos espectros de massa das fracções analisadas e identificação de alguns compostos, foram seleccionadas duas fracções – 30% e 60% MeOH – para avaliação de um possível efeito hipoglicemiante em ratos intolerantes à glicose (GIR). Esta estirpe de ratos foi estabelecida no biotério do laboratório de Farmacologia da Universidade de Évora num projecto que visou a obtenção de uma estirpe de animais que permita o estudo da fisiopatologia da diabetes tipo 2, através de cruzamentos consanguíneos de ratos Wistar, de gerações sucessivas de animais seleccionados por apresentarem anomalias das provas de tolerância à glicose oral, favorecendo o estabelecimento e/ou agravamento desta característica. Os animais utilizados neste trabalho constituem a descendência da 5ª geração e caracterizam-se por apresentarem provas de tolerância com glicemias elevadas aos 30 e 60 minutos (figura 15), quando comparados com os ratos Wistar normais (Vieira, 2008;Pereira, 2009).

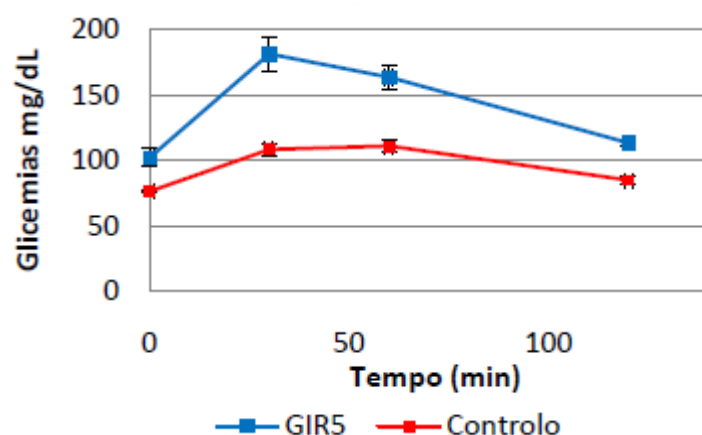


Figura 15: Prova de tolerância à glicose oral da 5ª geração da estirpe GIR. (Adaptado de Pereira, 2009)

Este modelo de ratos intolerantes à glicose (GIR) apresenta intolerância à glicose e resistência à insulina, encontrando-se num estado pré-diabético (Pereira, 2009). Além do mais, por ser um modelo animal que desenvolve espontaneamente a

intolerância à glicose, apresenta a vantagem da ausência de interferências dos efeitos colaterais induzidos pelas drogas administradas.

Para avaliar a possível capacidade hipoglicemiante das duas fracções seleccionadas, foram utilizados 24 ratos GIR com 12 a 20 semanas de idade, 12 fêmeas com peso compreendido entre 190-250 g e 12 machos com peso compreendido entre 260-450 g. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Farmacologia da Universidade de Évora, local onde decorreu o estudo, com temperatura (22-24°C) e luminosidade (ciclos alternados de 12 horas, de luz e escuridão), rigorosamente controlados. Aos animais foi fornecida água e alimento *ad libitum*.

3.4.7.1 Delineamento experimental

Uma semana antes de começar o ensaio, os animais foram manipulados e foram ensaiados todos os procedimentos necessários para que estes se adaptassem às condições do ensaio, nomeadamente à permanência em gaiolas metabólicas, à contenção e sonda gástrica.

Antes de se iniciar o ensaio, foram efectuadas determinações da glicemia em 2 momentos diferentes: jejum (após 16-18 h de ausência de ração) e pós-prandial (30, 60 e 120 min após a administração do *bolus* de glicose – 1.75g de glicose/kg de peso corporal). No último dia do ensaio foram determinadas as glicemias em jejum antes e após a administração das duas fracções testadas.

Os 24 ratos foram divididos em quatro grupos de acordo com a tabela 6, dois dos quais constituídos por 8 animais, 4 machos e 4 fêmeas (grupos teste), o terceiro grupo (controlo positivo) e o quarto grupo (controlo negativo) constituídos por 4 animais, 2 machos e 2 fêmeas.

Tabela 7: Grupos de animais em estudo e substâncias administradas.

	Grupos	Substância administrada
1	Controlo negativo	Soro fisiológico
2	Controlo positivo	Glicazida Labesfal 30mg/Kg
3	Teste	Fracção 30% MeOH 2mg/Kg
4	Teste	Fracção 60% MeOH 2mg/Kg

Os animais foram administrados durante 8 dias de acordo com as regras de manipulação animal estipuladas no decreto-lei em vigor, com as soluções soro fisiológico, glicazida ou as duas fracções do extracto, de acordo com o mencionado na

tabela 7, por meio de injeção intra-peritoneal, à exceção da glicazida que foi administrada oralmente, por sonda gástrica.

No final do ensaio foram determinadas as glicemias e pesos corporais em jejum assim como as PTGO, procedeu-se à colheita das urinas para avaliação de possíveis alterações no funcionamento do sistema renal e sacrificaram-se os animais, seguidos da colheita de algumas amostras.

3.4.7.2 Rastreio na urina

A urina foi colhida antes e depois do ensaio nos animais pertencentes aos vários grupos estudados. Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas, permitindo assim a colheita de urina e posterior análise com as tiras teste *Combur*¹⁰ Test (Roche).

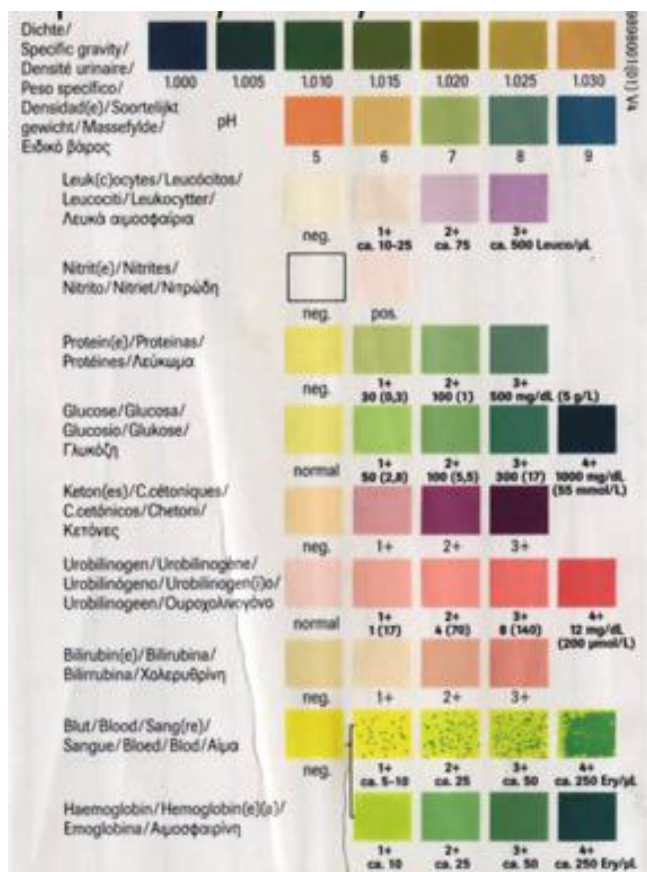


Figura 16: Parâmetros analisados no teste *Combur*¹⁰ Test.

O *Combur*¹⁰ Test (www.diavant-portuguese.com) fornece informações preliminares no que respeita a distúrbios tais como hemorragia glomerular, hepatopatias, erros inatos do metabolismo e infecções do trato urinário. Apresenta 10 parâmetros distintos (figura 16), constituindo áreas individuais de teste para análise:

Densidade:

O teste detecta a concentração de iões na urina. Na presença de catiões, protões são libertados por um agente complexante que produz uma alteração de cor no indicador azul de bromotimol de azul via azul-verde para amarelo. Com este parâmetro é possível avaliar a função renal, nomeadamente ao nível tubular. A presença de glicose e proteína na urina altera a densidade normal, que se encontra estabelecida para valores de 1.010, dado que a densidade do filtrado plasmático no glomérulo é dessa ordem de grandeza (Devlin, 2006).

pH:

O teste é específico para a detecção de iões hidrogénio. O teste contém os indicadores vermelho de metilo, fenolftaleína e azul de bromotimol.

Leucócitos:

A reacção detecta a presença de estereases que ocorrem nos granulócitos. Estas enzimas quebram um éster indoxil e o indoxil libertado reage com o sal de diazónio, produzindo um corante violeta. Quer os leucócitos intactos quer os lisados são detectados. A presença de leucócitos na urina indica actividade inflamatória nas vias urinárias (Devlin, 2006).

Nitritos:

A maioria dos microrganismos mais comuns que provocam infecções do tracto urinário, *E. coli*, e a maioria dos micróbios patogénicos urinários, convertem os nitratos em nitritos, o que produz uma coloração rosa na área teste. A reacção detecta indirectamente a presença de microrganismos produtores de nitrito na urina. O teste é baseado no princípio do teste de Griess (consiste na reacção entre NO_2^- com uma amina aromática em meio ácido para formar um derivado azo corado ou fluorescente, (Moody & Shaw, 2006).

Proteínas:

O teste é baseado no princípio do erro proteico dos indicadores de pH e é particularmente sensível à albumina. Quinina, quinidina, cloroquina e tolbutamida não afectam o teste, nem um pH elevado (superior a 9). A maioria das proteínas não são filtradas pelo rim, e por isso, em situações normais, não devem estar presentes na urina. Este parâmetro permite assim avaliar a função renal, nomeadamente ao nível tubular (Devlin, 2006).

Glicose:

A determinação de glicose é baseada na reacção específica glicose oxidase/peroxidase. A presença deste glúcido na urina indica alterações no metabolismo da glicose, apontando para o desenvolvimento de diabetes, visto que para valores de glicemia muito elevados, a capacidade de reabsorção do túbulo renal é ultrapassada, conduzindo à excreção de glicose na urina (Devlin, 2006).

Corpos cetónicos:

Este teste é baseado no princípio do teste de Legal (Legal (1883) usou nitroprussiato de sódio para a detecção de corpos cetónicos na urina de pacientes diabéticos, observando-se na reacção de ácido acético e/ou acetona com o nitroprussiato de sódio em solução alcalina, a formação de um complexo de cor violeta, (Leeuwenkamp *et al.*, 1984) e é mais sensível ao ácido acético do que à acetona. Fenilcetonas produzem cor vermelha na área teste. Estes são contudo bastante diferentes da cor violeta produzida pelos corpos cetónicos.

Os corpos cetónicos são produtos da metabolização dos ácidos gordos. Normalmente não estão presentes na urina. A sua detecção pode indicar diabetes ou jejum prolongado (Devlin, 2006).

Urobilinogénio:

O sal diazónio estável reage quase imediatamente com o urobilinogénio para dar origem a um corante vermelho. O teste é específico para o urobilinogénio e não é susceptível aos factores interferentes conhecidos por afectarem o teste de Ehrlich. Constitui um indicador da função hepática ou de hemólise (Devlin, 2006).

Bilirrubina:

O teste da bilirrubina é baseado no acoplamento da bilirrubina com o sal diazónio para dar um corante azo. É indicador de anomalias da função hepática ou de hemólise (Devlin, 2006).

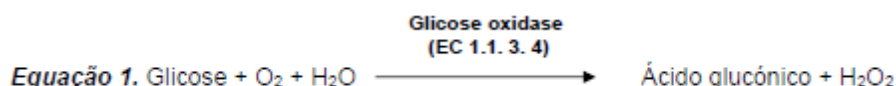
Sangue:

A hemoglobina e a mioglobina catalisam a oxidação do indicador pelo H_2O_2 presente no papel de teste. As tiras do *Combur*¹⁰ Test distinguem os eritrócitos da hemoglobina com escalas de cores separadas, permitindo diagnósticos diferenciais da hematúria e hemoglobinúria. Além do mais, o seu elevado limite de detecção permite uma detecção prematura de hematúria ou hemoglobinúria. A presença de sangue na urina é indicadora de infecções ou problemas renais graves (Devlin, 2006).

3.4.7.3 Determinação das glicemias e pesos corporais em jejum e das PTGO

A determinação das glicemias e pesos em jejum, assim como, as PTGO foram realizadas antes e após a administração das fracções.

O peso corporal e a glicemia foram determinados após um jejum de 16-18 horas. Foram também efectuadas provas de tolerância à glicose, administrada por via oral (PTGO), com sonda gástrica, de 1.75g de glicose/kg peso corporal (em água a 25%).



As concentrações da glicose no sangue total foram determinadas na veia da cauda aos 30, 60, 120 e 150 minutos, após administração do bolus utilizando um glicómetro e tiras teste, que se baseiam no método da glicose-oxidase (Equação 1).

Tabela 8: Material utilizado na determinação das glicemias e pesos em jejum e das PTGO

Material	Material biológico
Sonda gástrica	Sangue total
Glicómetro (Accutrend Sensor, Boehringer Mannheim)	
Tiras teste (Accu-chek para glicose, Roche)	
Balança (Mettler PJ 3000)	
Balança analítica (Mettler AE 200)	

No último dia do ensaio, as glicemias em jejum foram determinadas antes e após as administrações das fracções. Deste modo, foi possível avaliar se as substâncias administradas afectam as glicemias em jejum.

O material utilizado encontra-se descrito na tabela 8.

3.4.7.4 Sacrifício dos animais e colheita de amostras

No final do ensaio, os animais em estudo foram anestesiados com éter e procedeu-se a uma operação cirúrgica, onde se retirou o sangue por punção cardíaca. Este foi colocado em tubos com EDTA 6mM, para prevenir a coagulação. De seguida procedeu-se a uma centrifugação, durante 10 minutos a 3000g, a 4°C, para obtenção do soro. Este último foi recolhido, alíquotado e guardado a -20°C para determinações futuras de parâmetros serológicos/bioquímicos. Foram recolhidos o fígado e o

pâncreas dos ratos pertencentes a cada grupo e conservados em formol, para eventuais estudos posteriores.

Na tabela 9 encontra-se enumerado o material utilizado nesta parte do trabalho.

Tabela 9: Material utilizado no sacrifício dos animais

Material	Equipamento
Material cirúrgico	
Microtubos (Eppendorf)	Supercentrifuga (Hermle Z323 K)

3.5 Análise estatística dos resultados

Os resultados obtidos ao longo deste trabalho foram expressos em valores médios $\pm$ erros padrão da média (EPM).

Para a avaliação do significado estatístico da diferença entre os valores médios das glicemias dos vários grupos de resultados foi utilizado o método de análise de variância simples (ANOVA I) para um nível de significância de 0.05, utilizando o programa Microsoft® Excel (2007). Os resultados obtidos encontram-se em anexo.

IV- Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão

A extracção da planta foi efectuada com água, pois sabe-se que na medicina tradicional são preparadas infusões das flores desta planta para controlo da hiperglicemia, e pretendeu-se que os extractos preparados fossem o mais próximo possível do utilizado tradicionalmente pelas populações.

4.1 Obtenção dos extractos aquosos de *C. multiflorus*

Após preparação dos extractos aquosos e da evaporação do solvente, estes foram pesados e obtiveram-se 8,5855g de extracto no processo de infusão e 7,0191g de extracto no processo de soxhlet.

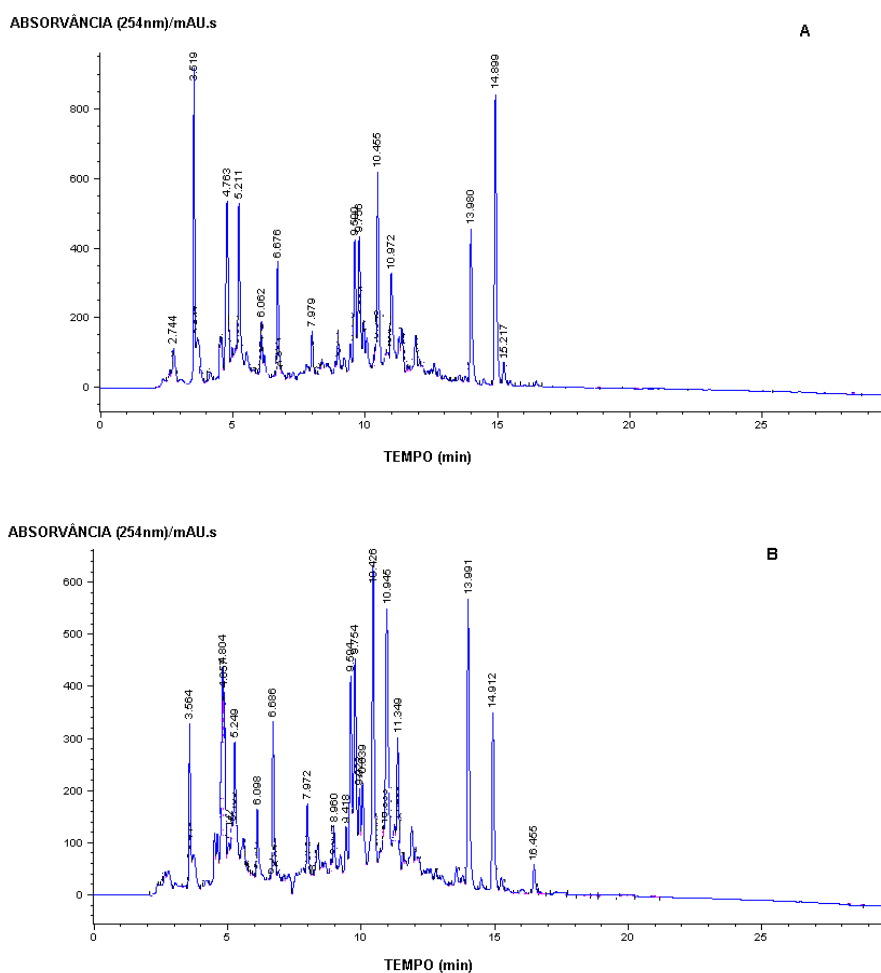


Figura 17: Perfis cromatográficos, obtidos por HPLC dos extractos aquosos de *C. multiflorus* obtidos por infusão (A) e por soxhlet (B).

Coluna: Zorbax Eclipse XDB-C₁₈. Condições de eluição: solvente A, acetonitrilo; solvente B, água com acetonitrilo (2.5%) e ácido fórmico (0.5%). Gradiente: 100% solvente B (0min) e 100% solvente A (30min), fluxo 1 mL min⁻¹.

Posteriormente estes extractos foram injectados no aparelho de HPLC-DAD, de modo a adquirir um perfil cromatográfico geral dos seus constituintes (Figura 17).

4.2 Análise cromatográfica das fracções do extracto aquoso de *C. multiflorus* obtidas por SPE

Com o intuito de separar os vários constituintes do extracto aquoso de *C. multiflorus* procedeu-se ao seu fraccionamento por SPE. Foram obtidas onze fracções a partir do extracto bruto, resultantes da eluição de uma mistura com percentagem crescente de metanol em água (0-100%). Estas fracções foram injectadas no equipamento de HPLC-DAD para obtenção dos perfis cromatográficos e para uma identificação parcial dos tipos de compostos eluídos em cada fracção.

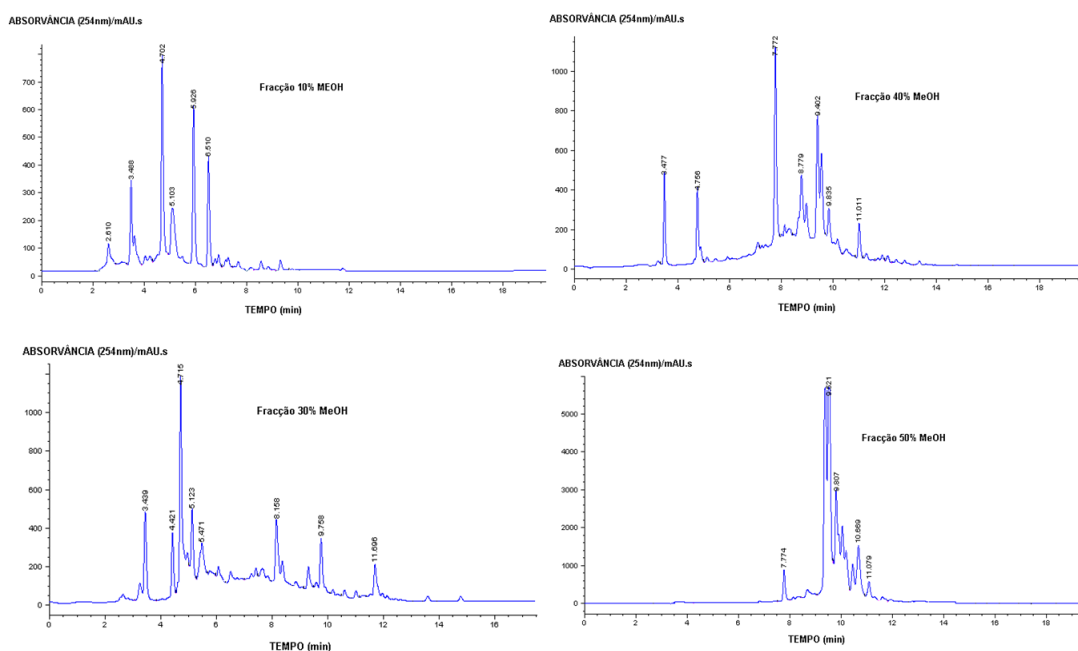


Figura 18: Perfis cromatográficos das fracções 10%, 30%, 40% e 50% MeOH.

Coluna: Zorbax Eclipse XDB-C₁₈. Condições de eluição: solvente A, acetonitrilo; solvente B, água com acetonitrilo (2.5%) e ácido fórmico (0.5%). Gradiente: 100% solvente B (0min) e 100% solvente A (30min), fluxo 1 mL min⁻¹.

Ao analisar os cromatogramas das onze fracções foram seleccionadas sete fracções, nomeadamente as fracções 10%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% e 80% MeOH (Figuras 18 e 19). As restantes fracções (100% H₂O, 20%, 90% e 100% MeOH) foram rejeitadas por não apresentarem picos representativos de compostos fenólicos ou por apresentarem o mesmo tipo de compostos existentes nas fracções seleccionadas.

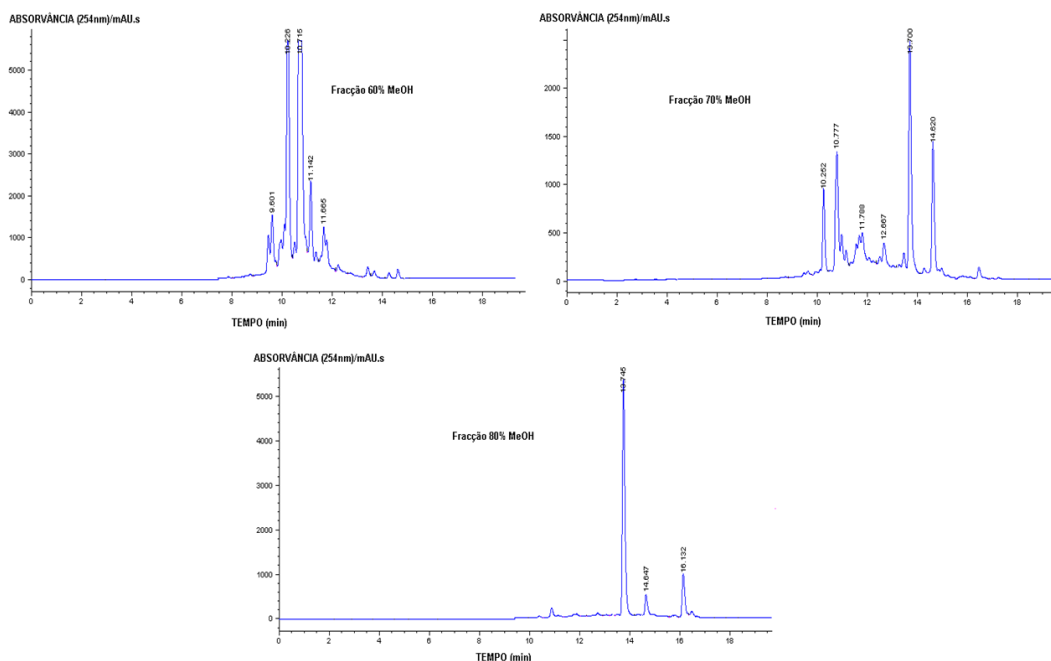


Figura 19: Perfis cromatográficos das fracções 60%, 70% e 80% MeOH.

Coluna: Zorbax Eclipse XDB-C₁₈. Condições de eluição: solvente A, acetonitrilo; solvente B, água com acetonitrilo (2.5%) e ácido fórmico (0.5%). Gradiente: 100% solvente B (0min) e 100% solvente A (30min), fluxo 1 mL min⁻¹.

4.3 Análise das fracções seleccionadas por HPLC-MS e identificação de alguns compostos

Um dos objectivos deste trabalho consistiu em caracterizar as fracções seleccionadas e identificar os seus constituintes. Para tal, procedeu-se à sua análise por HPLC-DAD e LC-ESI-MS. Deste modo, foi possível obter a informação relativa aos perfis cromatográficos, espectros UV, espectros de *full* MS e MS² de cada fracção.

4.3.1 Fracção 10% MeOH

Na figura 20 apresenta-se o cromatograma obtido por *full* MS, no modo TIC, para a fracção obtida por SPE com 10% de MeOH. Neste cromatograma podem ser observados vários picos que correspondem provavelmente a compostos fenólicos presentes no extracto da planta.

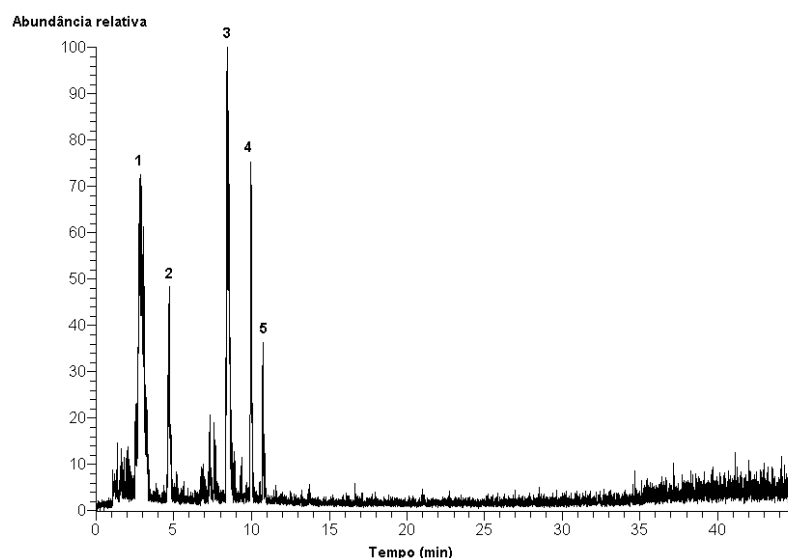


Figura 20: Cromatograma TIC da fração 10% MeOH obtido por HPLC-ESI-MS, com identificação dos principais picos.

Através da análise dos espectros de massa e UV foi possível identificar dois compostos existentes na fração de 10% MeOH. Na tabela 10 apresentam-se os resultados relativos à identificação dos compostos presentes nesta fração por HPLC-DAD e LC-ESI-MS.

Tabela 10: Identificação por HPLC-DAD e LC-ESI-MS e MS² dos compostos majoritários presentes na fração 10% MeOH.

Composto	Tr (min)	HPLC-DAD $\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	LC-ESI-MS [-] m/z	LC-ESI-MS ² [-] (Abundância relativa %)	Identificação
1	2,88	257	180	163 (100), 119 (15), 93 (15)	NI
2	4,71	234, 285	329	161 (100), 285 (15), 174 (5)	NI
3	8,47	238, 317	315	153 (100), 165 (10)	Derivado glicosilado do ácido di-hidroxibenzóico
4	9,97	250, 290sh	167	123 (100), 152 (75)	Ácido vanílico
5	10,59	239, 295	293	131 (100), 173 (5)	NI

(NI – não identificado)

O composto 3 foi identificado como sendo um derivado do ácido hidroxicinâmico. O espectro de UV obtido *on-line* corresponde ao descrito na literatura para um derivado glicosilado do ácido di-hidroxibenzóico. Adicionalmente, a presença de um pico com abundância 100% a m/z 315 no espectro de MS (figura 21A), correspondente ao íon de massa molecular, e a presença de um fragmento bastante abundante com m/z 153 no espectro de MS^2 do íon com m/z 315 (figura 21B), corroboram esta hipótese. A perda de 162 u.m.a. no espectro de MS^2 corresponde muito provavelmente à libertação de uma molécula de glicose (Kammerer *et al.*, 2004).

O composto 4 é muito provavelmente um derivado do ácido benzóico. Os máximos de absorvância no espectro de UV correspondem aos do ácido vanílico (Sakakibara *et al.*, 2003). O espectro de MS apresenta um íon molecular com m/z 167 (figura 22A), que quando sujeito a MS^2 (figura 22B), origina dois fragmentos m/z 123 e m/z 152, resultantes da perda de $-CO_2$ e $-OH$, respectivamente (Hollecker *et al.*, 2009).

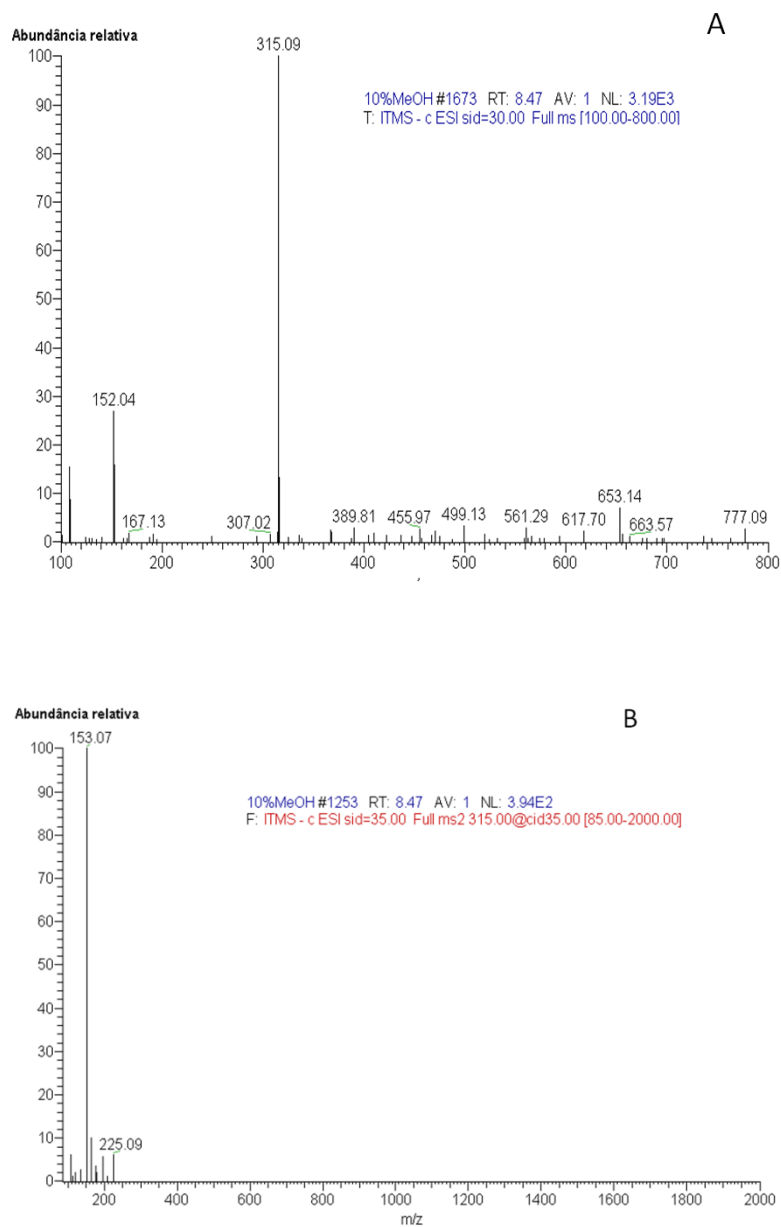


Figura 21: Espectros MS (A) para o composto 3 e MS² (B) do fragmento com m/z 315 obtidos em modo negativo.

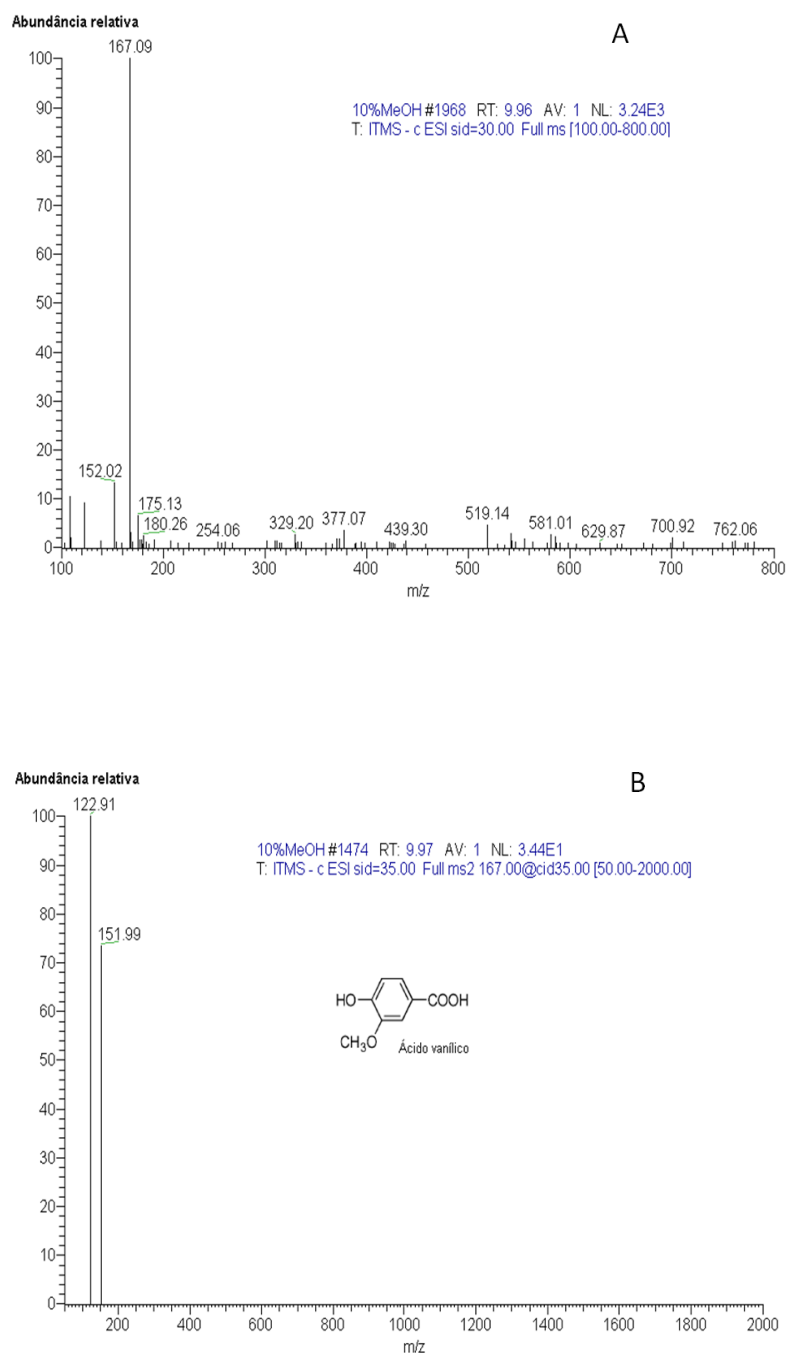


Figura 22: Espectros MS (A) para o composto 4 e MS² (B) do fragmento com m/z 167 obtidos em modo negativo.

4.3.2 Fracção 30% MeOH

Na figura 23 apresenta-se o cromatograma obtido por *full MS*, no modo TIC, para a fracção obtida por SPE com 30% de MeOH.

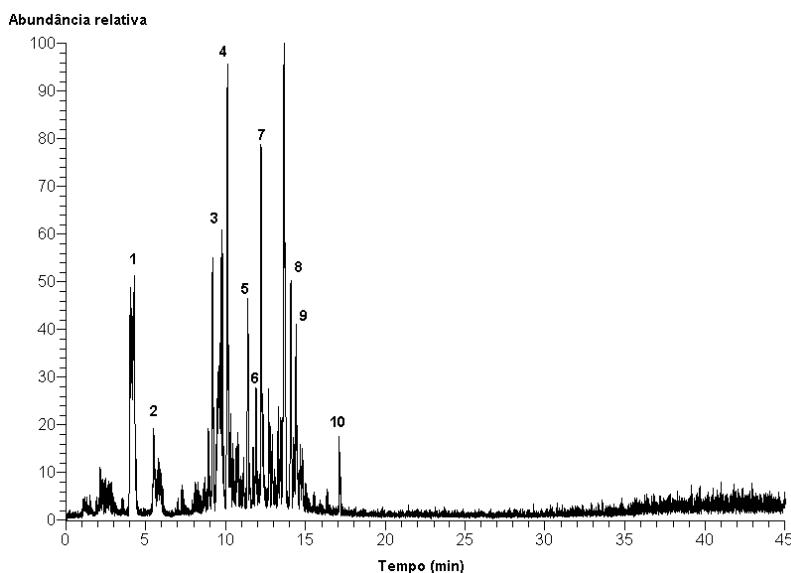


Figura 23: Cromatograma TIC da fracção 30% MeOH obtido por HPLC-DAD-ESI-MS, com identificação dos principais picos.

Através da análise dos espectros de massa e UV foi possível identificar dois compostos existentes na fracção de 30% MeOH. Na tabela 11 apresentam-se os resultados relativos à identificação dos compostos presentes nesta fracção por HPLC-DAD e LC-ESI-MS.

O pico cromatográfico 9 corresponde eventualmente a uma mistura de vários compostos. O espectro de *full MS* para o tempo de retenção 14,47 min (figura 24) apresenta três iões de abundância elevada para valores de m/z 193, 367 e 561. O composto com m/z 193 corresponde provavelmente ao ácido ferrúlico e o composto com m/z 367 é provavelmente o ácido 4-ferruloilquínico (Kammerer *et al.*, 2004; Hollecker *et al.*, 2009). Quanto ao composto com m/z 561 não foi possível a sua identificação.

Tabela 11: Identificação por HPLC-DAD e LC-ESI-MS e MS² dos compostos maioritários presentes na fracção 30% MeOH.

Composto	Tr (min)	HPLC-DAD $\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	LC-ESI-MS [-] m/z	LC-ESI-MS ² [-] (Abundância relativa %)	Identificação
1	4,28	253	328	134 (100), 107 (5)	NI
2	5,50	255	344	150 (100), 270 (35)	NI
3	9,78	257	203	159 (100), 116 (30), 185 (15)	NI
4	10,12	257	611	344 (100), 460 (45), 593 (25), 211 (22)	NI
5	11,42	264	387	249 (100), 267 (55), 369 (25), 137 (12)	NI
6	11,87	257, 310sh	417	399 (100), 385 (70), 227 (60), 249(55), 267 (40), 357 (10), 167 (10)	NI
			549	531 (100), 459 (70), 420 (45), 179 (35)	NI
7	12,27	257, 270, 310sh	387	207 (100), 369 (50), 163 (40), 325 (5)	NI
8	14,04	245, 270, 318sh	491	267 (100), 473 (90), 429 (60), 431 (55), 249 (40), 315 (30)	NI
9	14,47	263, 310sh	561	543 (100), 383 (50), 426 (25), 315 (15)	NI
		242, 319	193	134 (100), 149 (40), 178 (10)	Ácido ferrúlico
		243, 289, 321	367	173 (100), 247 (75), 323 (75)	Ácido 4-ferruloilquinico
10	17,08	222, 268, 304sh	253	253 (100), 209 (30), 180 (15)	NI

(NI – não identificado)

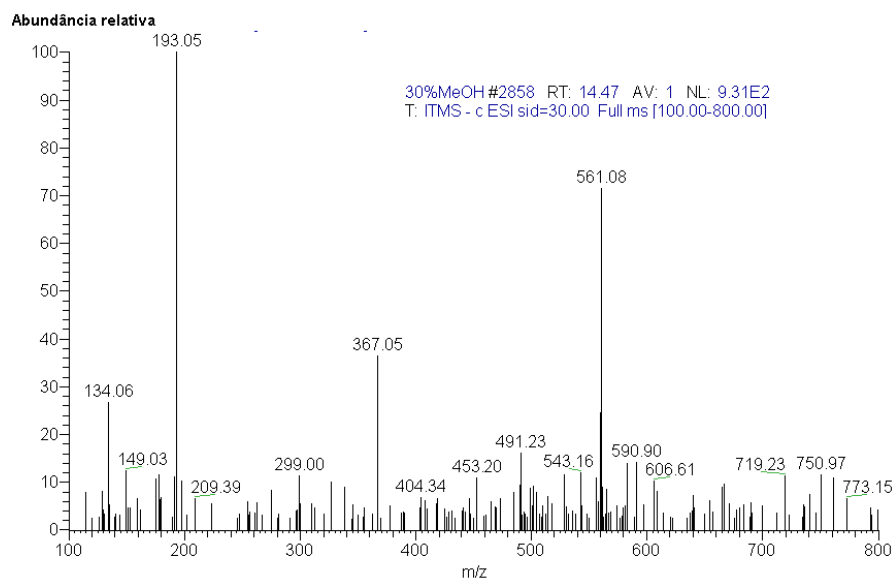


Figura 24: Espectro MS para o tr 14,47 obtido em modo negativo.

O ácido ferrúlico é um ácido hidroxicinâmico e quando analisado por MS^2 (figura 25A) origina três fragmentos, nomeadamente m/z 134, 149 e 178. Os iões m/z 178 e 134 representam o ião desmetilado [ácido ferrúlico- $H^+ - \bullet CH_3$] $^-$ e o ião desmetilado e descarboxilado [ácido ferrúlico- $H^+ - \bullet CH_3 - CO_2$] $^-$, respectivamente. Estas reacções de fragmentação são bastante características de ácidos carboxílicos e compostos fenólicos metoxilados (Kammerer *et al.*, 2004).

O ácido 4-ferruloílquinico origina três fragmentos no seu espectro de MS^2 (figura 25B), o fragmento m/z 173, resultante da perda do ácido ferrúlico ($[M-H-194]^-$); o fragmento m/z 247, resultante da dissociação de metade da molécula de ácido quínico ($[M-H-120]^-$) e finalmente o fragmento m/z 323 que resulta da perda de CO_2 ($[M-H-44]^-$), (Kammerer *et al.*, 2004).

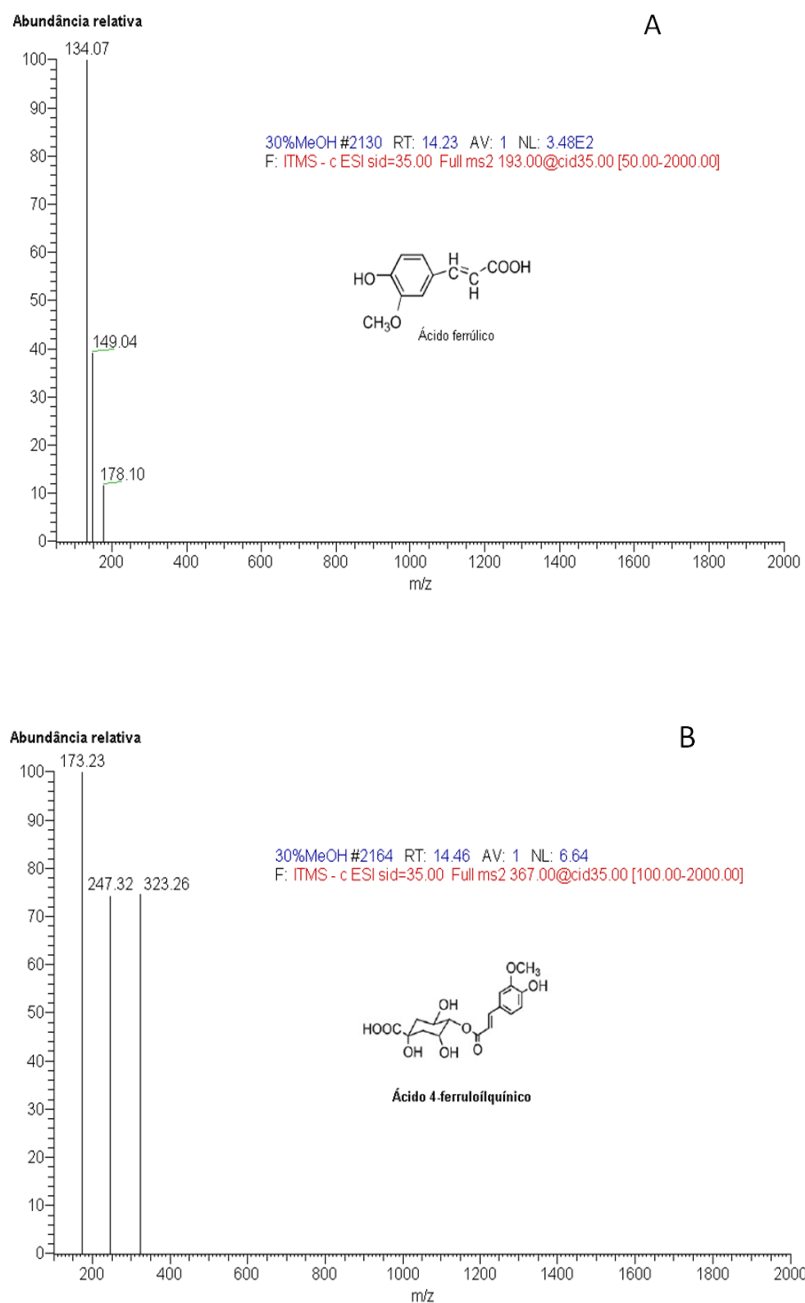


Figura 25: Espectros de MS² para o íon com m/z 193 (A) e para o íon com m/z 367 (B), obtidos em modo negativo.

4.3.3 Fracção 40% MeOH

Na figura 26 apresenta-se o cromatograma obtido por *full MS*, no modo TIC, para a fracção obtida por SPE com 40% de MeOH. Neste cromatograma podem ser observados 7 picos maioritários.

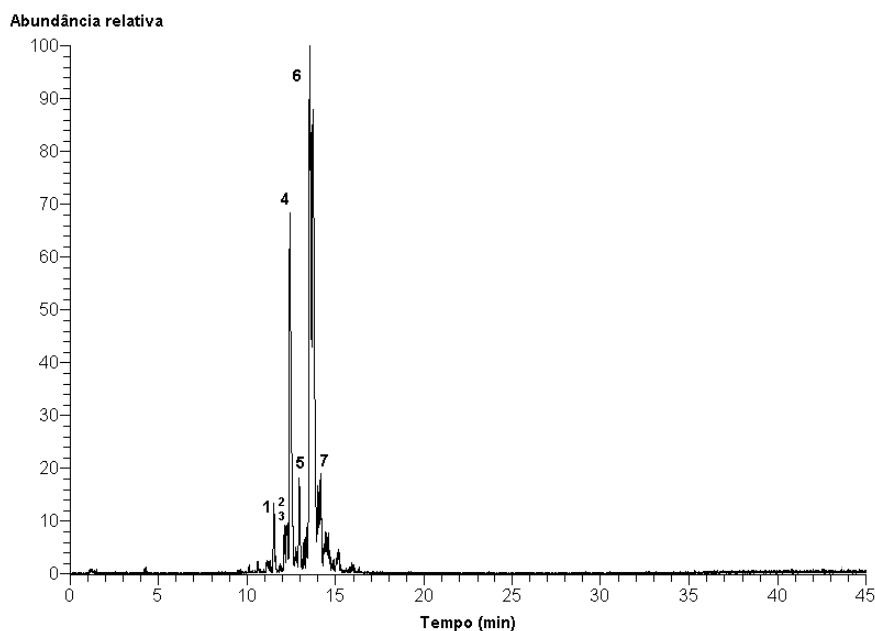


Figura 26: Cromatograma TIC da fracção 40% MeOH obtido por HPLC-DAD-ESI-MS, com identificação dos principais picos.

A partir da análise dos espectros de massa e UV foram identificados dois compostos existentes na fracção de 40% MeOH, que correspondem aos picos 5 e 7 do cromatograma TIC. Na tabela 12 apresentam-se os resultados relativos à identificação dos compostos presentes nesta fracção por HPLC-DAD e LC-ESI-MS.

Tabela 12: Identificação por HPLC-DAD e LC-ESI-MS e MS² dos compostos maioritários presentes na fracção 40% MeOH.

Composto	Tr (min)	HPLC-DAD $\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	LC-ESI-MS [-] m/z	LC-ESI-MS ² [-] (Abundância relativa %)	Identificação
1	11,43	272, 310sh	625	505 (100), 535 (20)	NI
2	12,05	257, 310sh	595	475 (100), 355 (90), 385 (85), 505 (30), 577 (15)	NI
3	12,27	257, 286, 344	387	207 (100), 163 (80), 265 (12), 369 (8)	NI
4	12,39	257, 343	625	463 (100), 301 (22), 505 (5)	NI
5	12,90	264, 322	593	473 (100), 353 (35), 503 (32), 383 (18), 575 (10)	6,8-di-C-glicosil-apigenina
6	13,48	257, 321, 339, 384	579	429 (100), 327 (47), 459 (45), 357 (20), 309 (15)	NI
7	14,09	264, 330	491 563	267 (100), 473 (80), 431 (65), 249 (48), 315 (38), 223 (12), 411 (10) 413 (100), 293 (12)	NI Derivado glicosado da Apigenina

(NI – não identificado)

O pico cromatográfico 5, com m/z 593 (figura 27A) corresponde provavelmente à 6,8-di-C-glicosil-apigenina (vicenina-2). Quando analisado por MS² (Figura 27B) apresenta iões com m/z 503 ([M-H-90]⁻), 473 ([M-H-120]⁻), 353 ([M-H-120-120]⁻) e 383 ([M-H-120-90]⁻), sugerindo a presença da apigenina (270) + hexose + hexose. As perdas de 90 e 120 u.m.a. correspondem a clivagens cruzadas no anel da unidade glucídica, que confirmam a presença de duas hexoses (glicose ou galactose). A exibição no espectro MS² de iões m/z [M-H-60]⁻, [M-H-90]⁻ e [M-H-120]⁻ com abundâncias relativas distintas é característica dos C-glicósidos, (Han *et al.*, 2008; Parejo *et al.*, 2004). A maioria dos flavonóides encontram-se na forma O-glicosídica, porém a glicosilação também pode dar-se com a ligação do glúcido directamente ao núcleo benzénico – flavonóide C-glicósido – através de uma ligação carbono-carbono ácido-resistente. Aliás, os C-glicósidos são menos frequentes e restringem-se a um grupo restrito de glúcidos e agliconas, podendo ser encontrados nas flores das plantas (Robards & Antolovich, 1997; Han *et al.*, 2008).

O pico 7 com m/z 563 (figura 28A) corresponde possivelmente a um derivado glicosado da apigenina, mas cuja identificação não se encontra bem elucidada (Han *et*

al., 2008). Quando sujeito a fragmentação por MS², origina 2 fragmentos com m/z 413 e m/z 293 (figura 28B).

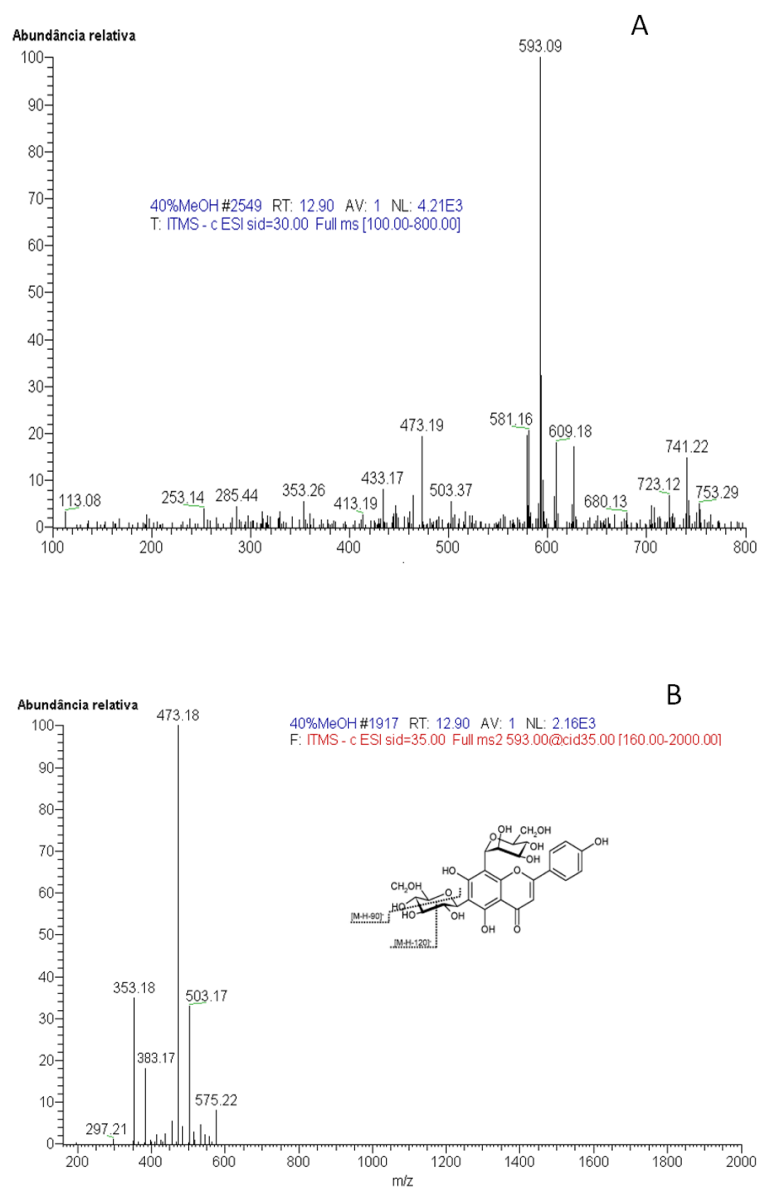


Figura 27: Espectros MS para o composto 5 (A) e MS² do fragmento com m/z 593 (B), obtidos em modo negativo.

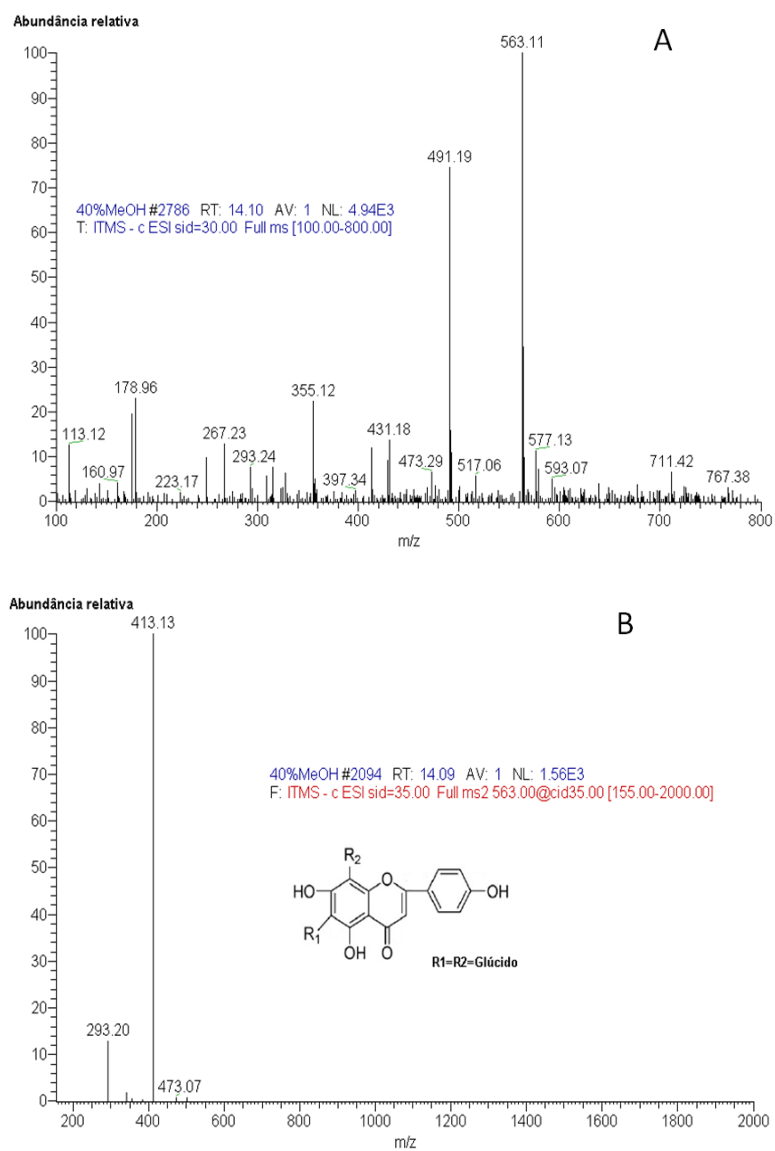


Figura 28: Espectros MS para o composto 7 (A) e MS² do fragmento com m/z 563 (B), obtidos em modo negativo.

4.3.4 Fracção 50% MeOH

Na figura 29 apresenta-se o cromatograma obtido por *full MS*, no modo TIC, para a fracção obtida por SPE com 50% de MeOH.

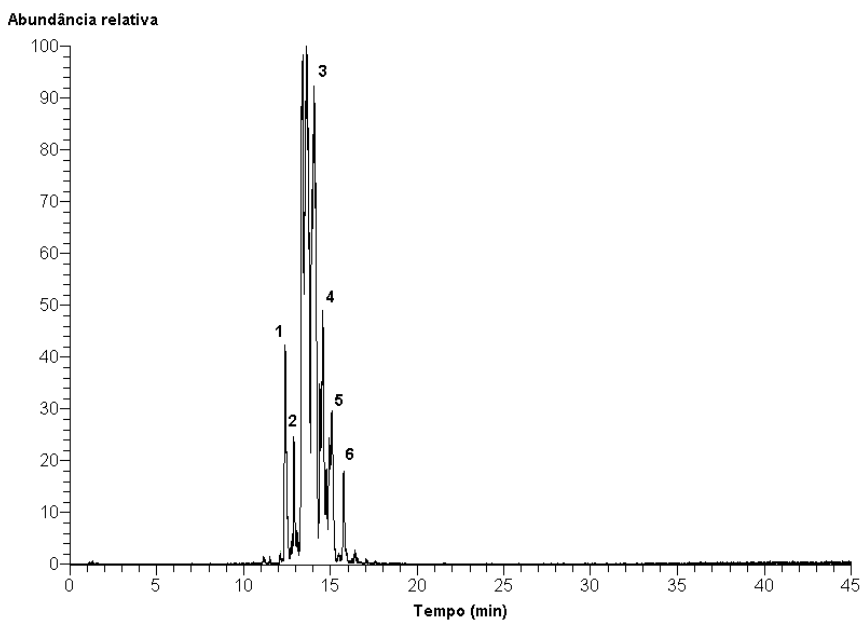


Figura 29: Cromatograma TIC da fracção 50%MeOH obtido por HPLC-DAD-ESI-MS, com identificação dos principais picos.

Ao analisar os espectros de massa e UV identificaram-se quatro compostos existentes na fracção de 50% MeOH, que correspondem aos picos 1, 2, 3 e 6 do cromatograma TIC. Na tabela 13 apresentam-se os resultados relativos à identificação dos compostos presentes nesta fracção por HPLC-DAD e LC-ESI-MS.

Os compostos que correspondem aos picos 2 e 3 já foram descritos anteriormente como derivados da apigenina, dado que foram identificados na fracção 40% MeOH.

Tabela 13: Identificação por HPLC-DAD e LC-ESI-MS e MS² dos compostos maioritários presentes na fracção 50% MeOH.

Composto	Tr (min)	HPLC-DAD $\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	LC-ESI-MS [-] m/z	LC-ESI-MS ² [-] (Abundância relativa %)	Identificação
1	12,34	257, 332, 352, 384	625	463 (100), 301 (30)	Derivado diglicosado da quercetina
2	12,88	264, 331	593	473 (100), 353 (42), 503 (27), 383 (15), 575 (13)	6,8-di-C-glicosil-apigenina
3	14,05	257, 330, 348, 385	563	413 (100), 293 (15)	Derivado glicosado da apigenina
4	14,52	257, 332, 349, 365	723	579 (100), 621 (15), 429 (15), 561 (10), 357 (8)	NI
			591	471 (100), 429 (67), 357 (42), 327 (17), 297 (5)	NI
5	15,07	264, 329/330	707	563 (100), 605 (15), 484 (10), 413 (5)	NI
			575	431 (100), 341 (75), 513 (45), 311 (40), 283 (10)	NI
6	15,71	257, 293	533	353 (100), 515 (53)	NI
		264, 332	489	285 (100), 327 (5), 429 (3)	Luteonina-7-O-6''-acetilglucósido

(NI – não identificado)

O composto 1, com m/z 625 parece corresponder um derivado diglicosado da quercetina. O seu espectro MS² (figura 30B) apresenta fragmentos com m/z 463 ([M-162]⁻), com a perda de uma hexose, e 301 ([M-162-162]⁻), resultante da perda de duas hexoses (Schutz *et al.*, 2005).

O composto 6, com m/z 489 corresponde provavelmente à luteonina-7-O-6''-acetilglucósido. O seu espectro MS² (figura 31B) apresenta um fragmento mais abundante com m/z 285, que corresponde à massa da luteonina, o que implica a perda do grupo acetil-glucósido (Lin & Harnly, 2010).

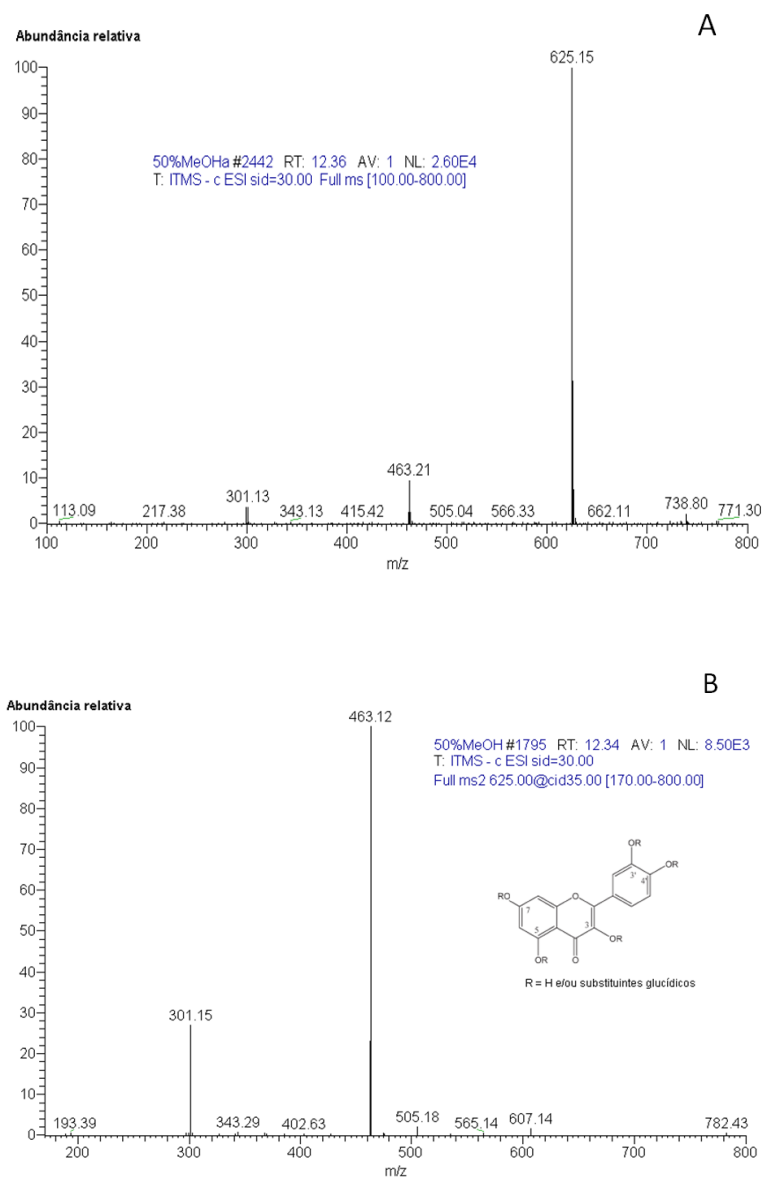


Figura 30: Espectros MS (A) para o composto 1 e MS² (B) para o fragmento m/z 625, obtidos em modo negativo.

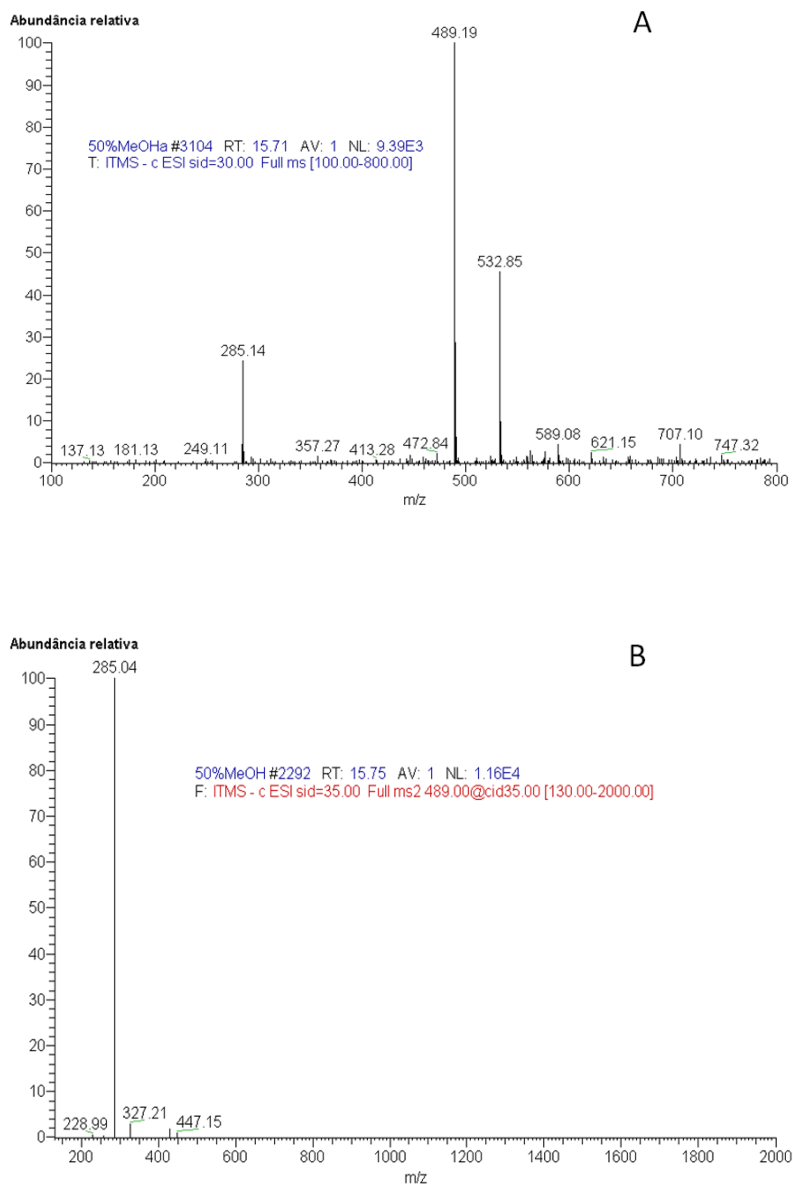


Figura 31: Espectros MS (A) para o composto 6 e MS² (B) do fragmento com m/z 489, obtidos em modo negativo.

4.3.5 Fracção 60% MeOH

Na figura 32 apresenta-se o cromatograma obtido por *full MS*, no modo TIC, para a fracção obtida por SPE com 60% de MeOH.

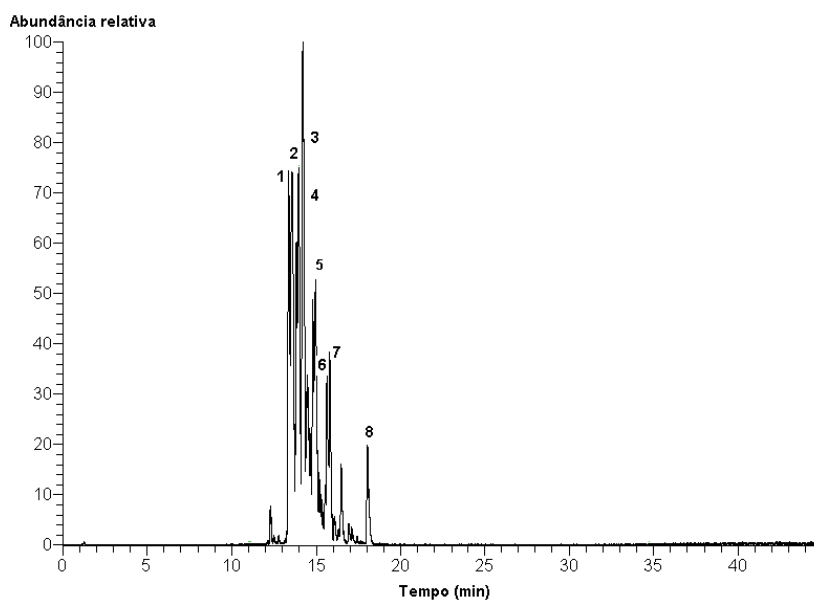


Figura 32: Cromatograma TIC da fracção 60% MeOH obtido por HPLC-DAD-ESI-MS, com identificação dos principais picos.

Nesta fracção, 60% MeOH, foram identificados quatro compostos, a partir da análise dos espectros de massa e UV, que correspondem aos picos 2, 3, 4 e 6 do cromatograma TIC. Encontram-se na tabela 14 os resultados relativos à identificação dos compostos presentes nesta fracção por HPLC-DAD e LC-ESI-MS.

Nesta fracção, dois dos compostos identificados, compostos 2 e 6, foram já descritos anteriormente na fracção 50% MeOH.

Tabela 14: Identificação por HPLC-DAD e LC-ESI-MS e MS² dos compostos maioritários presentes na fracção 60% MeOH.

Composto	Tr (min)	HPLC-DAD $\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	LC-ESI-MS [-] m/z	LC-ESI-MS ² [-] (Abundância relativa %)	Identificação
1	13,51	257, 321, 348	579	429 (100), 327 (53), 459 (42), 357 (25), 309 (10)	NI
2	14,11	264, 311, 332	563	413 (100), 293 (12), 443 (5)	Derivado glicosado da Apigenina
3	14,36	253, 332, 352	609	301 (100), 271 (7), 343 (5)	Rutina
4	14,65	253, 312, 345	447	285 (100)	Luteonina 7-O-glucósido Ou Hidroxigenisteína glicosilada
5	14,90	257, 321, 337	707	563 (100), 626 (90), 466 (75), 364 (65)	NI
	14,74		575	456 (100), 557 (20), 311 (18)	NI
6	15,83	264, 286	489	285 (100), 327 (5)	Luteonina-7-O-6"-acetilglucósido
7	15,76	257, 321	691	545 (100), 379 (45), 610 (40), 529 (35)	NI
	16,00	264, 286	559	415 (100), 295 (50), 325 (25)	NI
8	18,12	264, 305	253	209 (100), 165 (30)	NI

(NI – não identificado)

O composto 3 com m/z 609 corresponde provavelmente à rutina (quercetina-3-rutinósido) e o seu espectro MS² (figura 33B) apresenta um fragmento muito abundante a m/z 301, que resulta da perda do rutinósido (glicose + ramnose, [M-H-162-146]). Além do mais, os derivados glicosados da quercetina apresentam normalmente, no seu espectro de UV, dois máximos de absorvância a 254 e 354 nm, que coincidem exactamente com os $\lambda_{\text{máx}}$ observados no espectro de UV, obtido *on-line* para o composto 3 por HPLC-DAD (Regos *et al.*, 2009; Simirgiotis & Schmeda-Hirschmann, 2010).

O composto 4 com m/z 447 poderá corresponder à luteonina-7-O-glicósido ou à hidroxigenisteína glicosilada. O seu espectro MS² (figura 34B) apresenta o fragmento m/z 285 (luteonina ou hidroxigenisteína), que resulta da perda de uma glicose ([M-H-162]), (Schutz *et al.*, 2005; D'Agostina *et al.*, 2008; Lin & Harnly, 2010). Porém, a

confirmação da identificação do composto teria que ser efectuada recorrendo a um ensaio de co-eluição com os respectivos padrões.

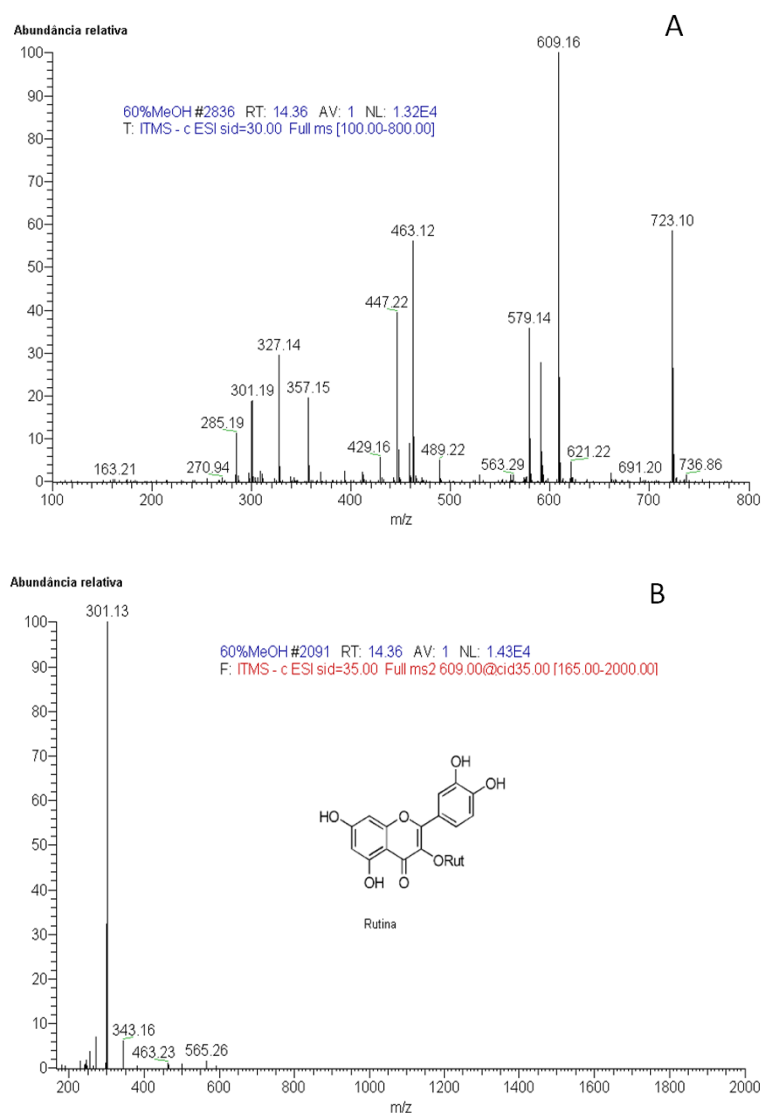


Figura 33: Espectros MS (A) para o composto 3 e MS² (B) do fragmento com m/z 609, obtidos em modo negativo.

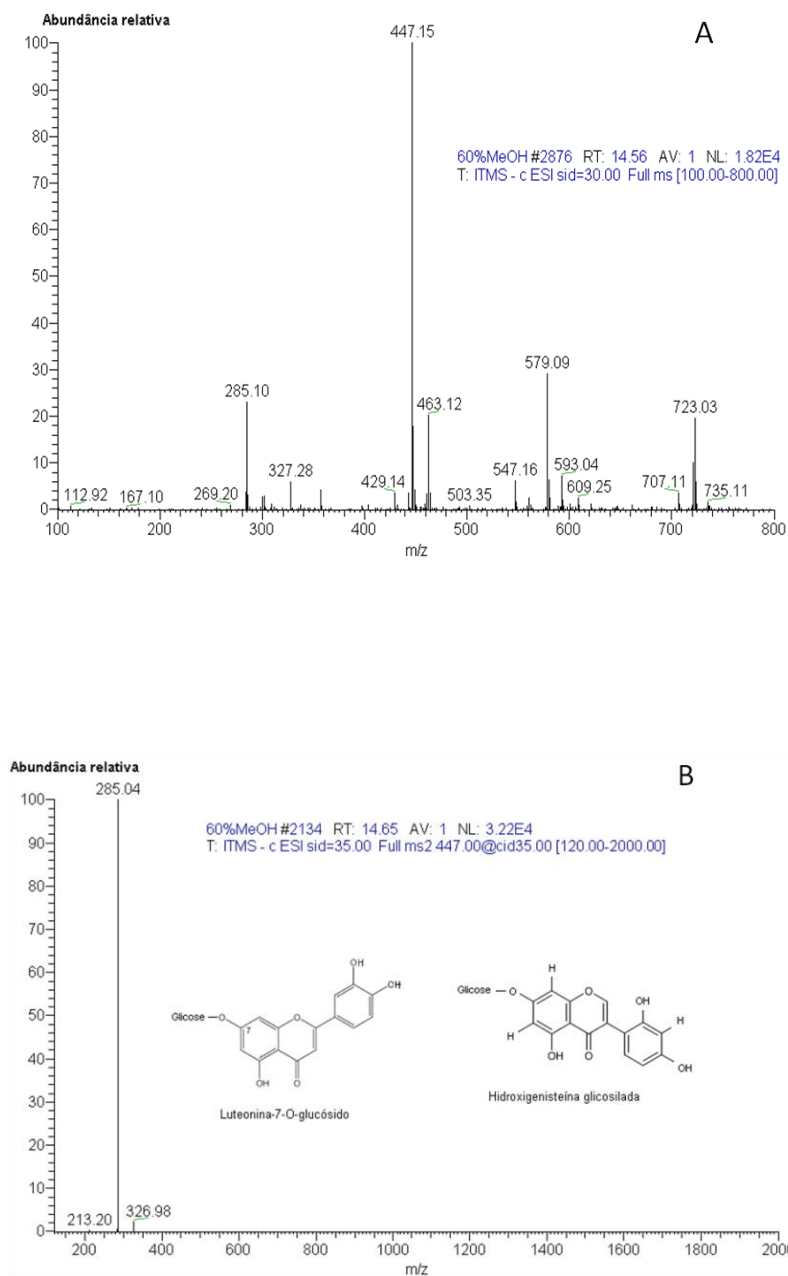


Figura 34: Espectros MS (A) para o composto 4 e MS² (B) do fragmento com m/z 447, obtidos em modo negativo.

4.3.6 Fracção 70% MeOH

O cromatograma obtido por *full MS*, no modo TIC, para a fracção obtida por SPE com 70% de MeOH está apresentado na figura 35.

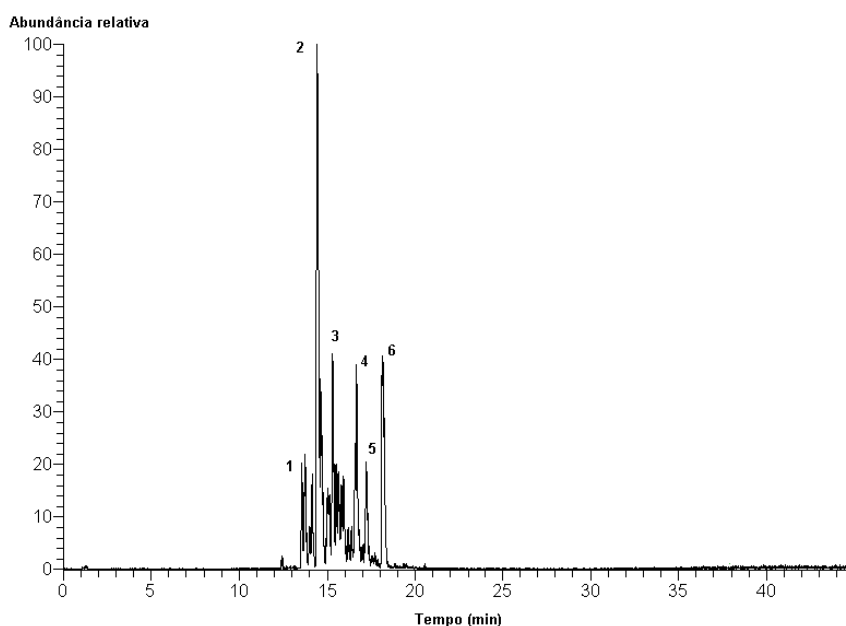


Figura 35: Cromatograma TIC da fracção 70% MeOH obtido por HPLC-DAD-ESI-MS, com identificação dos principais picos.

Nesta fracção, 70% MeOH, foram identificados três compostos, a partir da análise dos espectros de massa e UV, que correspondem aos picos 2, 3 e 4 do cromatograma TIC. Encontram-se na tabela 15 os resultados relativos à identificação dos compostos presentes nesta fracção por HPLC-DAD e LC-ESI-MS.

No entanto, dois dos compostos identificados nesta fracção, compostos 2 e 4, foram já descritos anteriormente na fracção 60% MeOH.

Tabela 15: Identificação por HPLC-DAD e LC-ESI-MS e MS² dos compostos majoritários presentes na fracção 70% MeOH.

Composto	Tr (min)	HPLC-DAD $\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	LC-ESI-MS [-] m/z	LC-ESI-MS ² [-] (Abundância relativa %)	Identificação
1	13,58	268, 345	579	429 (100), 327 (45), 357 (30), 459 (30), 309 (15)	NI
2	14,47	257, 352	609	301 (100), 271 (7), 343 (5)	Rutina
3	15,37	265, 343	623	315 (100), 300 (20), 271 (10)	Iso-ramnetina-3-O-rutinósido (narcisina)
4	16,66	264, 337	691	547 (100), 589 (10), 277 (10)	NI
			489	285 (100)	Luteonina-7-O-6''-acetilglucósido
5	17,27	264, 286, 318	559	415 (100), 457 (35), 295 (25), 325 (5)	NI
6	18,16	264, 304, 325	253	253 (100), 209 (55), 185 (10)	NI

(NI – não identificado)

O composto 3 com m/z 623 corresponde provavelmente à narcisina. O seu espectro MS² (figura 36B) apresenta um fragmento principal com m/z 315 (iso-ramnetina). Esta fragmentação resulta da perda de uma ramnose e de uma glicose ([M-146-162]), (Parejo *et al.*, 2004; Regos *et al.*, 2009; Inbaraj *et al.*, 2010).

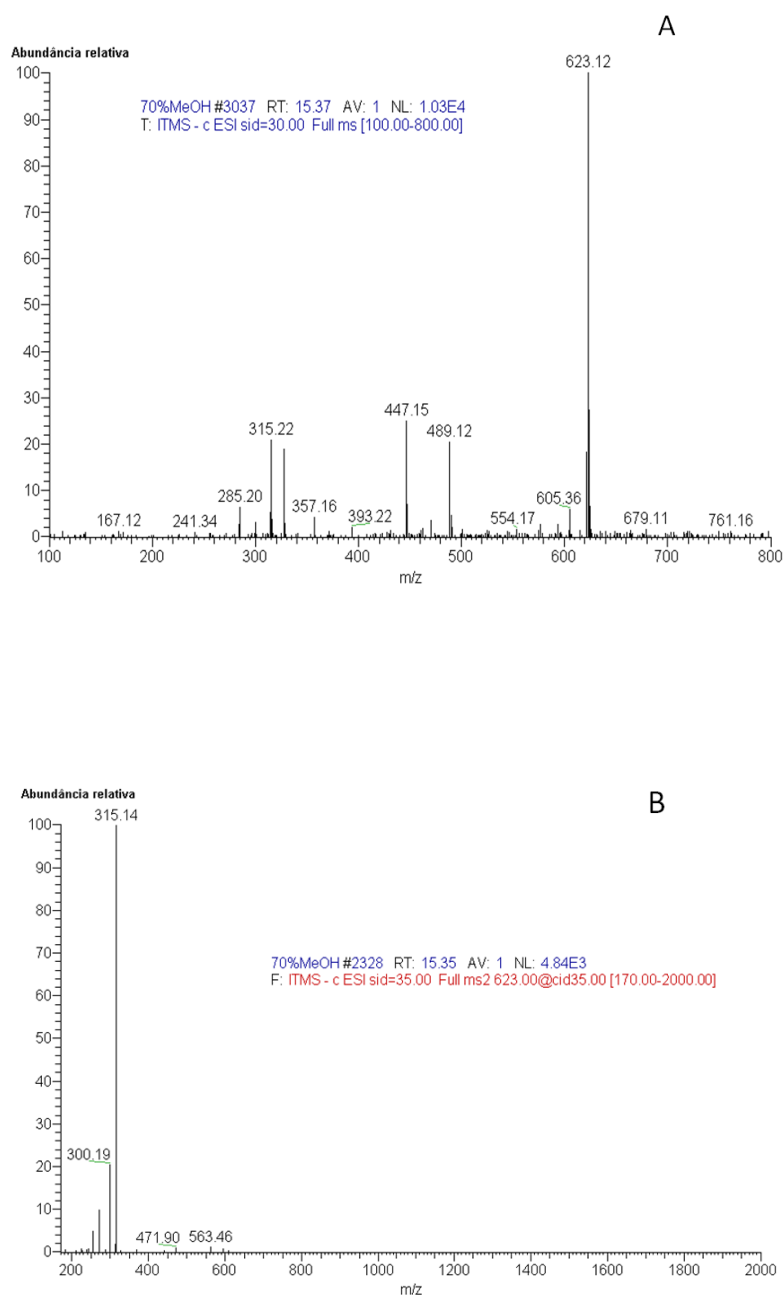


Figura 36: Espectros MS (A) para o composto 3 e MS² (B) do fragmento com m/z 623, obtidos em modo negativo.

4.3.7 Fracção 80% MeOH

O cromatograma obtido por *full MS*, no modo TIC, para a fracção obtida por SPE com 80% de MeOH está apresentado na figura 37.

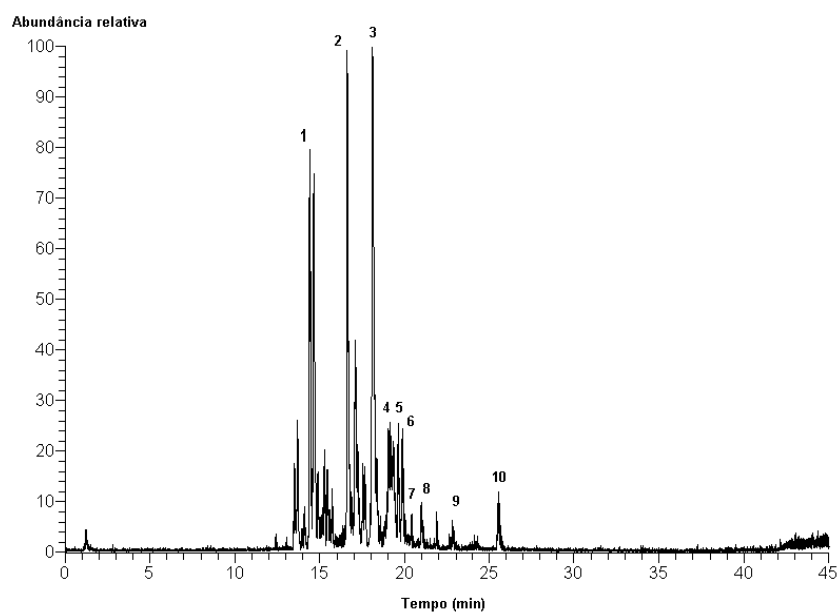


Figura 37: Cromatograma TIC da fracção 80% MeOH obtido por HPLC-DAD-ESI-MS, com identificação dos principais picos.

Nesta fracção, 80% MeOH, foram identificados quatro compostos, a partir da análise dos espectros de massa e UV, que correspondem aos picos 1, 2, 9 e 10 do cromatograma TIC. Encontram-se na tabela 16 os resultados relativos à identificação dos compostos presentes nesta fracção por HPLC-DAD e LC-ESI-MS.

No entanto, dois dos compostos identificados nesta fracção, compostos 1 e 2, foram já descritos anteriormente na fracção 60% e 50% MeOH, respectivamente.

Tabela 16: Identificação por HPLC-DAD e LC-ESI-MS e MS² dos compostos maioritários presentes na fracção 80% MeOH.

Composto	Tr (min)	HPLC-DAD $\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	LC-ESI-MS [-] m/z	LC-ESI-MS ² [-] (Abundância relativa %)	Identificação
1	14,41	258, 347	447	285 (100)	Luteonina 7-O-glucósido Ou Hidroxigenisteína glicosilada
2	16,56	265, 342	489	285 (100)	Luteonina-7-O-6''-acetilglucósido
3	17,07	264, 286, 318	253	253 (100), 209 (50), 165 (15)	NI
4	19,21	264, 305	329	229 (100), 311 (80), 211 (65), 171 (50)	NI
5	19,55	244, 269, 300sh	643	285 (100), 447 (25)	NI
6	19,84	242, 270	287	269 (100), 241 (18), 141 (8)	NI
7	20,34	243, 269	701	581 (100), 551 (70), 431 (20)	NI
8	20,88	268, 311	253	253 (100), 209 (65), 181 (20), 143 (5)	NI
9	22,86	271	169	-	Ácido gálico
10	25,22	252, 270	557	395 (100), 377 (85), 539 (20)	Ácido acetil-di-cafeoilquínico

(NI – não identificado)

O composto 9 com m/z 169 corresponderá eventualmente ao ácido gálico, um derivado do ácido benzóico. Não foi possível obter o seu espectro MS², provavelmente devido à quantidade mínima de composto existente, no entanto quer o seu ião molecular (figura 38), quer o espectro UV obtido *on-line* para este composto coincidem com os descritos na literatura para o ácido gálico (Regos *et al.*, 2009). Em estudos posteriores, a sua identificação deverá ser confirmada, nomeadamente analisando uma maior quantidade desta fracção por HPLC-DAD-ESI-MS ou realizando estudos de co-eluição com o padrão de ácido gálico.

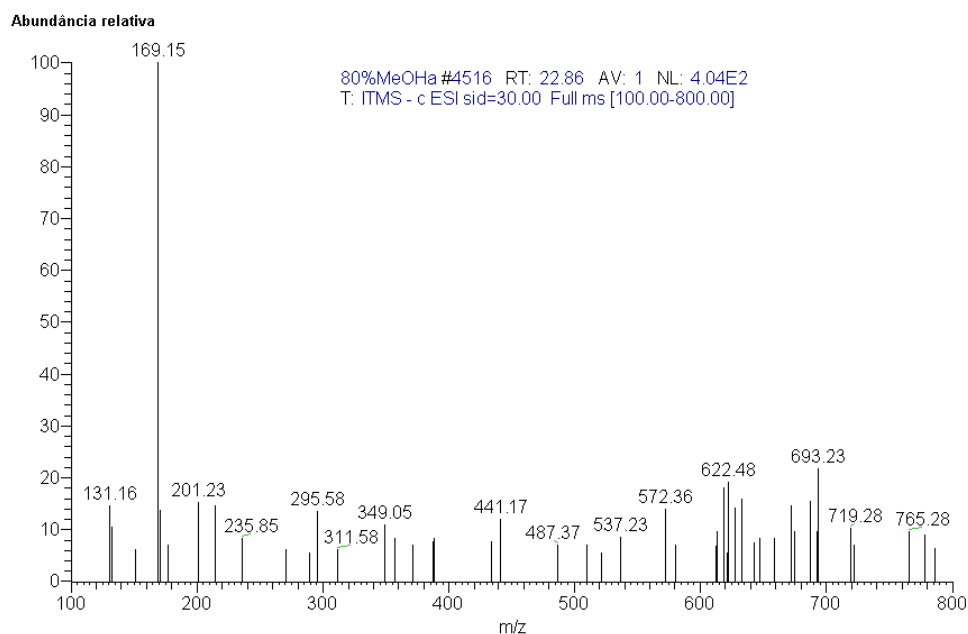


Figura 38: Espectro MS para o composto 9 obtido em modo negativo.

O composto 10 com m/z 557 corresponde possivelmente ao ácido acetil-di-cafeoilquinico. Foram obtidos 3 fragmentos mais abundantes no espectro de MS^2 (Figura 39B): o fragmento com m/z 395, onde ocorre a perda de uma molécula de glicose ($[M-H-162]^-$); o fragmento a m/z 377, resultante da perda de glicose e água ($[M-H-162-18]^-$) e o fragmento a m/z 539 que resulta da perda de uma molécula de água (Zhang *et al.*, 2007).

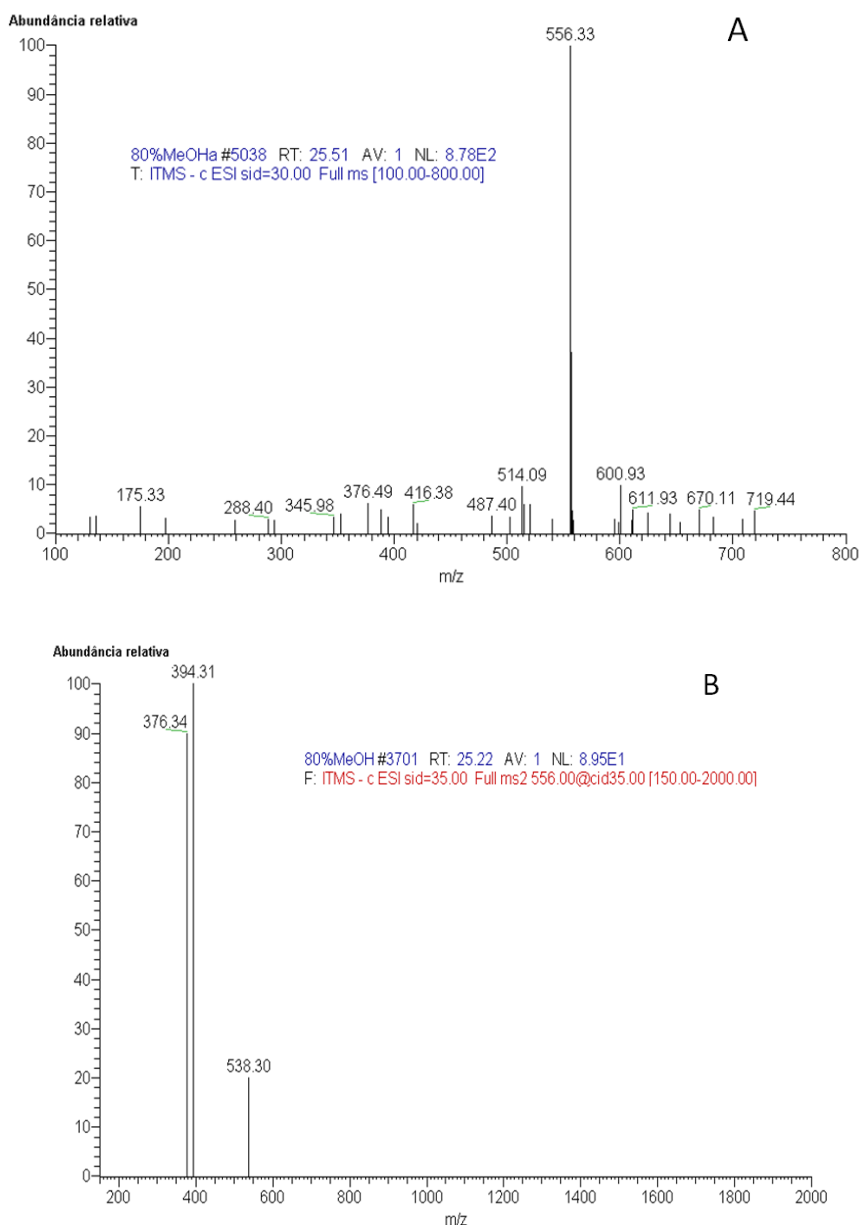


Figura 39: Espectros MS (A) para o composto 10 e MS² (B) do fragmento com m/z 557, obtidos em modo negativo.

4.4 Determinação da quantidade de fenóis totais e da actividade antioxidante das fracções do extracto aquoso de *C. multiflorus*.

A determinação da quantidade de fenóis totais nas fracções do extracto foi realizada de acordo com o método de Folin-Ciocalteu modificado (mistura de fosfomolibdato e fosfotungstato (cor amarela) – ocorre formação de coloração azul na presença de compostos fenólicos), (Sharma *et al.*, 1995).

Inicialmente, foi construída uma recta de calibração de D-catequina (figura 40), a partir de soluções padrão. Esta foi utilizada no cálculo das concentrações totais de

compostos fenólicos existentes em cada uma das fracções, depois de aplicadas as diluições apropriadas às fracções, de modo que todas apresentassem a mesma concentração inicial – 1.2 mg mL^{-1} .

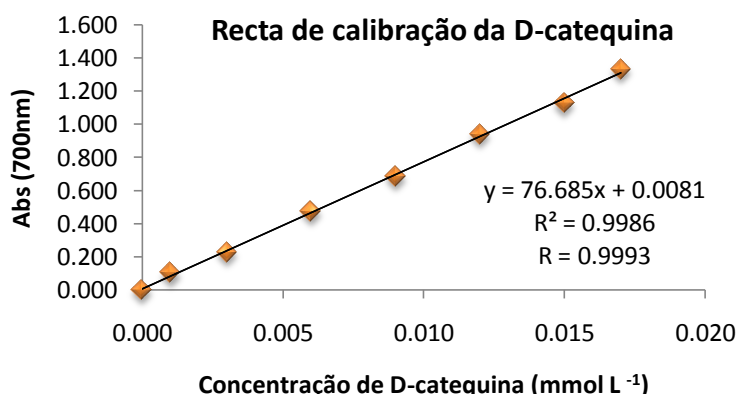


Figura 40: Recta de calibração obtida para a D-catequina.

Os resultados obtidos para a quantidade de fenóis totais foram expressos em equivalentes de D-catequina e são apresentados na tabela 17. As fracções 60% e 80% MeOH são as que apresentam maior quantidade de fenóis totais, 302.355 ± 28.282 e $724.718 \pm 17.079 \text{ mg g}^{-1}$ de fracção, respectivamente. A fracção 10% MeOH é a que apresenta a menor quantidade de fenóis totais, $183.180 \pm 6.550 \text{ mg g}^{-1}$ de fracção (tabela 17, figura 41).

Tabela 17: Actividade antioxidante e quantidade de fenóis totais existentes em cada fracção do extracto aquoso de *C. multiflorus*.

Fracções	Massa seca (g mL ⁻¹)	Fenóis Totais (mg g ⁻¹ de fracção)	Inibição (%) DPPH
10% MeOH	0.0043	183.180 ± 6.550	16.351 ± 0.411
30% MeOH	0.0055	233.531 ± 17.079	25.575 ± 0.657
40% MeOH	0.0031	230.633 ± 29.408	74.004 ± 1.740
50% MeOH	0.0012	180.080 ± 11.119	82.809 ± 0.054
60%MeOH	0.0085	302.355 ± 28.282	85.674 ± 0.076
70% MeOH	0.0037	139.122 ± 3.116	67.336 ± 3.001
80% MeOH	0.0024	724.718 ± 17.079	32.944 ± 2.577

A determinação da actividade antioxidante foi efectuada através do método de descoloração do radical DPPH[•]. Este método é um dos ensaios mais utilizados para determinar a actividade antioxidante em extractos de plantas. O DPPH[•] é um radical livre estável que reage com compostos capazes de doar um átomo de hidrogénio. Este método é baseado no sequestro do DPPH[•] pela adição de espécies radicalares ou antioxidantes, que descoloram a solução de DPPH[•]. Quando o radical DPPH[•] reage com uma substância antioxidante, é reduzido. Devido a esta redução, a solução do radical, de cor violeta escura, muda para uma tonalidade amarela. A diminuição da concentração da espécie inicial traduz-se numa variação de absorvância, que pode ser quantificada a 515nm, num espectrómetro de UV-Vis (Krishnaiah *et al.*, 2010).

Os resultados da actividade antioxidante foram expressos em % de inibição. Os valores de % de inibição foram calculados de acordo com a equação.

$$\% \text{ Inibição} = \left(\frac{A_0 - A_f}{A_0} \right) \times 100$$

Onde: A₀ - absorvância inicial (t = 0s) da solução radical.

A_f - absorvância no final da reacção com a amostra (t = 30min).

A comparação do poder antioxidante dos extractos foi realizada para um volume constante de 100 µL, depois de aplicadas as diluições apropriadas às fracções, de modo que todas apresentassem a mesma concentração inicial – 1.2 mg mL⁻¹.

Assim sendo, as fracções 50% e 60% MeOH são as que apresentam maior % de inibição, 82.809 ± 0.054 e 85.674 ± 0.076, respectivamente. Por sua vez, a fracção 10% MeOH é a que apresenta menor % de inibição, com 16.351 ± 0.411 (tabela 17, figura 41).

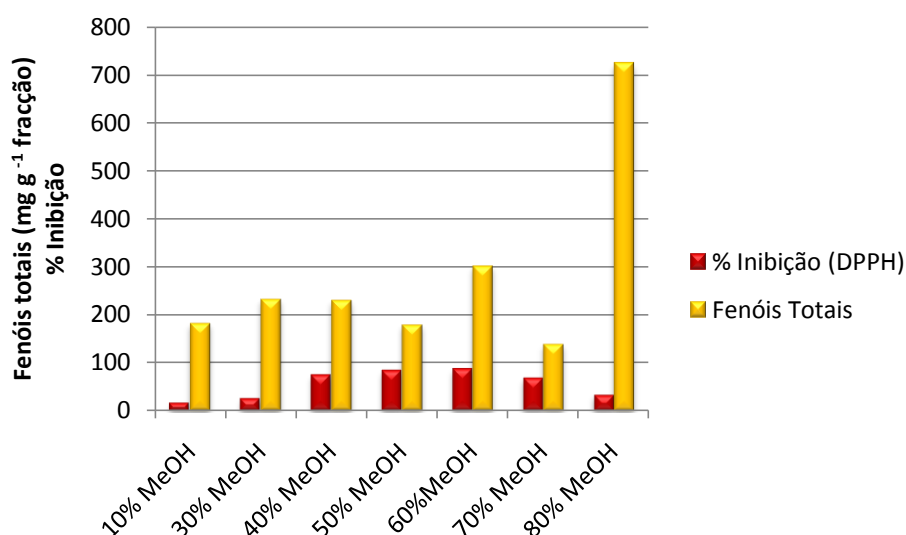


Figura 41: Comparação entre a quantidade de fenóis totais e a actividade antioxidante das fracções do extracto aquoso de *C. multiflorus*.

Ao comparar a quantidade de fenóis totais em cada fracção com a actividade antioxidante que apresentam, não existe correlação, ou seja uma grande quantidade de fenóis totais não é necessariamente reflectida na actividade antioxidante, e vice-versa. De facto, as fracções 50% e 60% MeOH apresentam uma % de inibição semelhante mas a quantidade de fenóis totais é distinta. O mesmo acontece se compararmos a fracção 60% MeOH com a fracção 80% MeOH, pois a fracção 60% MeOH apresenta cerca de metade da quantidade de fenóis totais existentes na fracção 80% MeOH e no entanto, a sua % inibição é 2,6 vezes superior à demonstrada pela fracção 80% MeOH.

Aliás, encontra-se descrito na literatura exemplos de extractos de plantas, com quantidade de fenóis semelhante e actividade antioxidante muito distinta (Djeridane *et al.*, 2006). Parece que a actividade antioxidante não depende somente da concentração de fenóis totais existentes na fracção, mas também da estrutura e da interacção que os compostos fenólicos ostentam. Na realidade, apenas compostos com uma estrutura específica e posições particulares dos grupos hidroxilo na molécula têm capacidade de doar um hidrogénio ou um electrão a um radical livre (Rice-Evans *et al.*, 1997). O poder antioxidante dos compostos fenólicos está dependente das suas características estruturais, nomeadamente de três factores estruturais que influenciam a acção antiradicalar, e que são os seguintes:

- a presença do grupo *o*-dihidroxi no anel B, que participa na deslocalização dos electrões, conferindo uma maior estabilidade à formação do radical fenóxi.

- a existência de uma dupla ligação 2,3 em conjugação com a função 4-oxo no anel C, também responsável pela deslocalização electrónica do anel B. A actividade antioxidante está relacionada com a estrutura em termos da deslocalização electrónica do núcleo aromático. Quando estes compostos reagem com radicais livres, transformam-se em radicais fenóxi, que são estabilizados por efeitos de ressonância do núcleo aromático.
- a presença de grupos hidroxil nas posições 3 e 5 em adição à função 4-oxo, nos anéis A e C, conferem uma maior actividade antiradical (Teixeira, 2006).

Os compostos bioactivos presentes nas plantas, especialmente os compostos fenólicos, são de um enorme interesse devido às suas propriedades farmacológicas. Aliás, o possível valor terapêutico que podem apresentar na prevenção ou controlo de várias doenças, como a diabetes tipo 2, é de particular importância.

Ao proceder à caracterização química do extracto aquoso das flores de *C. multiflorus*, foi possível inferir sobre a constituição química das fracções com a identificação de alguns compostos, maioritariamente flavonóides, assim como à actividade antioxidante e à quantidade de fenóis totais que cada fracção do extracto apresenta.

A actividade antioxidante é mais elevada nas fracções 40%, 50%, 60% e 70% MeOH, enquanto a quantidade de fenóis totais é mais elevada nas fracções 30%, 40%, 60% e 80% MeOH. Nas fracções foram também identificados alguns compostos descritos como hipoglicemiantes, nomeadamente o ácido ferrúlico (fracção 30% MeOH), derivados glicosados da apigenina (fracções 40%, 50% e 60% MeOH), derivados da luteonina (fracções 50%, 60%, 70% e 80% MeOH) e a rutina (fracções 60% e 70% MeOH).

Deste modo, tendo em conta toda esta informação relativa à composição química das fracções do extracto de *C. multiflorus*, seleccionaram-se duas fracções, 30% e 60% MeOH, para serem testadas *in vivo*, de modo a avaliar a exibição de uma possível actividade hipoglicemiante. A escolha da fracção 30% MeOH deveu-se à presença de ácido ferrúlico, que se encontra descrito na literatura por ostentar uma actividade hipoglicemiante significativa em dois modelos animais da diabetes, designadamente em murganhos diabéticos induzidos com STZ e em murganhos KK-Ay (Mukherjee *et al.*, 2006). No entanto, a actividade antioxidante obtida para esta fracção e a quantidade de fenóis totais não foi um factor determinante na sua escolha, visto que apresenta valores inferiores relativamente a outras fracções. No que respeita à fracção 60% MeOH, o facto de apresentar a rutina na sua constituição e

outros compostos, nomeadamente o derivado glicosado da apigenina, a luteonina 7-O-glucósido/hidroxigenisteína glicosilada e a luteonina-7-O-6''-acetilglucósido, que são comuns a outras fracções, levou à selecção desta fracção para o ensaio *in vivo*. Aliás, a rutina encontra-se descrita por apresentar uma elevada actividade hipoglicemiante e efeitos antioxidantes (Prince & Kamalakkannan, 2006; Pinent *et al*, 2008) e alguns derivados da apigenina e da luteonina são também referidos com efeitos hipoglicemiantes (Rauter *et al*, 2010). Constitui ainda a fracção com maior actividade antioxidante e com elevado teor em fenóis totais.

Encontram-se de seguida descritos os resultados obtidos no ensaio *in vivo*, onde foram testados os efeitos destas duas fracções – 30% e 60% MeOH.

4.5 Avaliação *in vivo* do possível efeito hipoglicemiante das fracções 30% MeOH e 60% MeOH do extracto aquoso de *C. multiflorus* em ratos GIR

Após seleccionar as fracções a serem testadas *in vivo*, cuja finalidade consistiu em avaliar o possível efeito hipoglicemiante das fracções 30% MeOH e 60% MeOH do extracto aquoso de *C. multiflorus*, procedeu-se à sua administração em ratos GIR.

4.5.1 Evolução do peso dos animais durante o ensaio

O ensaio decorreu durante uma semana como descrito no delineamento experimental (secção 3.4.7.1) tendo sido diariamente administrado aos animais, por via intraperitoneal, as fracções em estudo, soro ou glicazida.

Um dos factores que permite analisar o bem-estar dos animais é a variação do peso durante o ensaio. Deste modo, os animais foram pesados antes de se iniciarem as administrações intraperitoneais do soro e das fracções do extracto e no final do ensaio, que teve a duração de 8 dias, como preconizado em DIR 96/54/EC para ensaios agudos realizados *in vivo*.

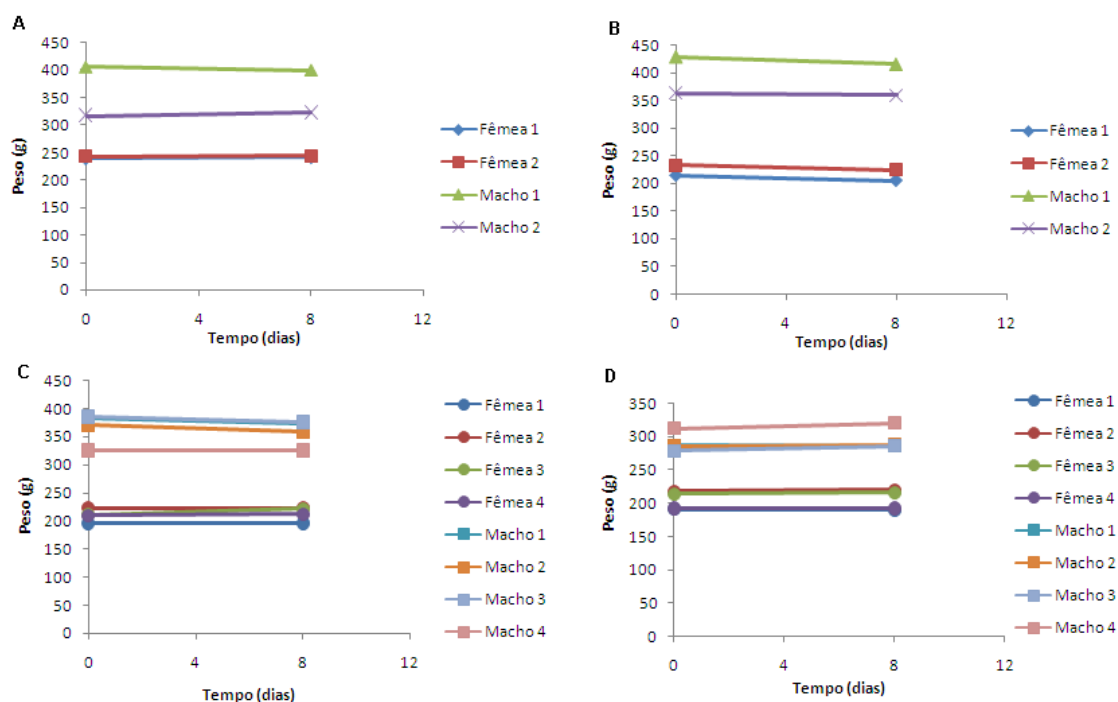


Figura 42: Variação dos pesos dos animais ao longo do ensaio. A – Controlo negativo (soro fisiológico), B – Controlo positivo (glicazida), C – Teste 1 (fracção 30% MeOH), D – Teste 2 (fracção 60% MeOH).

Na figura 42 encontra-se representado o peso dos vários animais antes e depois do ensaio que se manteve constante. A diferença de peso corporal, registada entre os diferentes animais resultou essencialmente da utilização de animais de géneros diferentes. Os resultados obtidos sugerem que a administração das fracções não afectou o metabolismo dos animais.

4.5.2 Avaliação sumária dos indicadores de toxicidade na urina

Na tentativa de avaliar o estado de saúde geral dos animais antes de iniciar o ensaio procurou-se efectuar uma análise qualitativa à urina. Esta análise foi repetida no final do ensaio com o intuito de avaliar possíveis sinais de toxicidade provocados pela administração das fracções. O rastreio efectuou-se utilizando o *Combur¹⁰ Test*. Os parâmetros analisados encontram-se descritos na tabela 18.

Tabela 18: Teste Combur à urina dos animais usados no ensaio.

	Dia 0				Dia 8			
	Soro Fisiológico	Glicazida	Fracção 30% MeOH	Fracção 60% MeOH	Soro Fisiológico	Glicazida	Fracção 30% MeOH	Fracção 60% MeOH
Densidade	1.010	1.010	1.010	1.010	1.015	1.010	1.010	1.010
pH	7	7-8	7	7	7	7	7	7
Leucócitos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)/(+1) ¹	(-)	(-)	(-)/(+1) ³
Nitritos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Proteína	(-)/(+1)	(-)/(+1)	(-)/(+1)	(-)/(+1)	(-)/(+1)	(-)/(+1)	(-)/(+1)	(-)/(+1)
Glicose	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Cetonas	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)/(+1) ²	(-)	(-)	(-)/(+1) ⁴
Urobilinogénio	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal
Bilirrubina	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Sangue	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Hemoglobina	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

¹ 1 em 4 animais apresentou leucócitos.

² 2 em 4 animais apresentaram cetonas.

³ 4 em 8 animais apresentaram leucócitos.

⁴ 4 em 8 animais apresentaram cetonas.

Legenda: Nos leucócitos (+1) = 10-25 leucócitos por μL e nas cetonas (+1) = 50 mg dL^{-1} de cetonas.

(-) = negativo.

Antes do início do ensaio todos os parâmetros observados revelaram-se normais, em todos os grupos, com excepção da presença de proteína, que pode indiciar problemas na função renal que parece característica do modelo animal utilizado, já que se observou em todos os animais. Todos os outros parâmetros se revelaram sem alterações.

No final do ensaio, não se registaram alterações na proteína, mantendo-se semelhante ao período anterior do início do mesmo. Nos animais administrados com soro fisiológico (controlo negativo) registou-se o aparecimento de leucócitos em um dos quatro animais bem como o aparecimento de cetonas em 50% dos animais do grupo. Estas alterações também se registaram no grupo administrado com a fracção 60% MeOH, tendo-se registado o aparecimento de cetonas, e leucócitos em metade dos animais do grupo. Contrariamente, nos animais com glicazida (controlo positivo) ou com a fracção 30% MeOH estas alterações não se observaram.

Embora, o nível de cetonas detectado correspondesse ao nível mais baixo (≥ 50 mg dL^{-1}), o facto de terem surgido em metade dos animais do grupo controlo negativo, sugere que se trata de uma alteração constitutiva característica desta estirpe, provavelmente relacionado com as alterações no metabolismo dos glúcidos inerente à intolerância à glicose. É de realçar que nos animais administrados com glicazida ou

com a fracção 30% MeOH não foram registadas nem cetonas nem leucócitos na urina, sugerindo uma acção benéfica destes tratamentos.

Finalmente, no que respeita aos leucócitos, detectaram-se em um dos quatro animais do controlo negativo, o que poderia ser apenas casual, porém foram também detectados em metade dos animais administrados com a fracção 60% MeOH, sugerindo que a administração da fracção 60% MeOH poderá favorecer o aparecimento de infecção ou inflamação dos tecidos.

4.5.3 Provas de tolerância dos animais da estirpe GIR

Neste trabalho procurou-se efectuar o estudo utilizando grupos de machos e de fêmeas, de modo a avaliar potenciais diferenças que pudessem existir. Para tal, efectuaram-se provas de tolerância à glicose oral. A figura 43 mostra os resultados obtidos para as provas de tolerância dos machos e das fêmeas. Estas curvas são caracterizadas por valores de jejum semelhantes (83 ± 2 e 78 ± 2 mg dL⁻¹, para as fêmeas e machos respectivamente, $p > 0.05$), valores considerados normais de acordo com o intervalo estipulado actualmente 70-100 mg dL⁻¹ (Nathan *et al.*, 2007; Horton, 2009).

Passados 30 minutos após administração do bolus de glicose, as glicemias aumentaram quer nos machos quer nas fêmeas, atingindo valores de 233 ± 6 e 188 ± 5 mg dL⁻¹ respectivamente, sendo a glicemia nas fêmeas significativamente mais elevada que nos machos ($p < 0.01$). Observou-se uma diminuição das glicemias ao longo do tempo tomando valores de 187 ± 8 e 172 ± 5 mg dL⁻¹ aos 60 minutos, para as fêmeas e machos respectivamente. Aos 120 minutos ocorre uma diminuição para valores próximos do jejum, 108 ± 4 e 108 ± 2 mgdL⁻¹, para as fêmeas e machos respectivamente, mas ainda superiores ($p < 0.05$). Os valores de glicemia medidos em machos e fêmeas após 60 e 120 minutos não foram significativamente diferentes ($p > 0.05$).

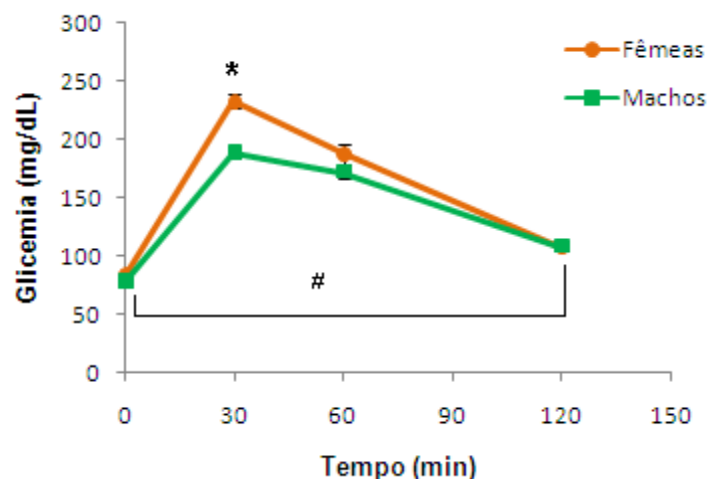


Figura 43: Curvas de tolerância de machos e fêmeas GIR.

Os pontos representam o valor médio $\pm$ EPM. Para gêneros diferentes * $p < 0.05$; para o mesmo gênero # $p < 0.05$, ($n=12$ para os machos e $n=12$ para as fêmeas).

Quando comparadas com provas de tolerância realizadas em animais normais, as provas tomam valores significativamente mais elevados (Vieira, 2008; Pereira, 2009), quer para machos quer para fêmeas, e superiores a 140 mg dL^{-1} considerado o valor máximo normal, segundo a OMS e o NDDG. A intolerância à glicose encontra-se definida para um intervalo normal de glicemia em jejum compreendido entre $70\text{-}100 \text{ mg dL}^{-1}$ e hiperglicemia pós-prandial superior a 140 mg dL^{-1} (Nathan *et al*, 2007).

Assim, independentemente do gênero, estes animais apresentam anomalias na curva de tolerância à glicose, sendo por isso adequados para a avaliação do efeito hipoglicemiante das fracções 30% e 60% MeOH do extracto aquoso de *C. multiflorus*.

4.5.4 Efeito da administração das fracções 30% MeOH e 60% MeOH do extracto aquoso de *C. multiflorus* na glicemia em jejum e pós-prandial dos ratos da estirpe GIR.

A possível actividade hipoglicemiante das duas fracções foi avaliada recorrendo à PTGO após um período de 8 dias de administração. Os animais foram inicialmente submetidos a uma PTGO para averiguar o estado em que se encontravam, assim como no final do período de administração, de forma que cada animal pudesse ser utilizado como controlo de si próprio, diminuindo assim a variabilidade.

No controlo negativo, administrado com soro fisiológico, não foram registadas alterações nas curvas de tolerância de ambos os gêneros (figura 44A). As fêmeas apresentaram valores de glicemia de $92 \pm 2 \text{ mg dL}^{-1}$, $208 \pm 12 \text{ mg dL}^{-1}$, $154 \pm 3 \text{ mg dL}^{-1}$ e

94 ± 2 mg dL⁻¹, aos 0, 30, 60 e 120 minutos, respectivamente. No final do ensaio, a prova de tolerância foi similar, sendo a glicemia em jejum 93 ± 2 mg dL⁻¹, aos 30 minutos de 206 ± 16 mg dL⁻¹, seguida de 151 ± 1 mg dL⁻¹ aos 60 minutos e 89 ± 8 mg dL⁻¹ aos 120 minutos. Nos machos, as glicemias também foram semelhantes em ambas as situações, apresentando glicemias de 78 ± 1 mg dL⁻¹, 184 ± 4 mg dL⁻¹, 171 ± 18 mg dL⁻¹ e 106 ± 3 mg dL⁻¹, aos 0, 30, 60 e 120 minutos, respectivamente. Por sua vez, no final do ensaio ostentam uma glicemia em jejum de 88 ± 4 mg dL⁻¹, seguida de 182 ± 21 mg dL⁻¹ aos 30 minutos, 185 ± 15 mg dL⁻¹ aos 60 minutos e 119 ± 22 mg dL⁻¹ aos 120 minutos.

No controlo positivo, a glicazida promoveu a normalização das PTGO, independentemente do género (figura 44B). Registaram-se nas fêmeas valores de 73 ± 6 mgdL⁻¹, 148 ± 44 mg dL⁻¹, 138 ± 18 mg dL⁻¹ e 68 ± 5 mg dL⁻¹ aos 0, 30, 60 e 120 minutos, respectivamente, sendo mais baixos que os valores registados nos mesmos animais antes da administração de glicazida (82 ± 10 mg dL⁻¹, 251 ± 8 mgdL⁻¹, 162 ± 6 mg dL⁻¹ e 104 ± 10 mgdL⁻¹ aos 0, 30, 60 e 120 minutos, respectivamente), tendo-se observado a normalização das glicemias para valores normais. A glicazida levou a uma diminuição de 59%, 85% e 65% nas glicemias 30, 60 e 120 minutos após o bolus de glicose. Nos machos, observou-se um efeito similar com redução da glicemia pós-prandial aos 30, 60 e 120 minutos, de 175 ± 11 mg dL⁻¹ para 134 ± 10 mg dL⁻¹, de 164 ± 3 mg dL⁻¹ para 133 ± 1 mg dL⁻¹ e de 117 ± 10 mg dL⁻¹ para 87 ± 8 mg dL⁻¹, respectivamente. Deste modo, ocorreu uma diminuição de 76%, 81% e 74% nas glicemias aos 30, 60 e 120 minutos após o bolus de glicose.

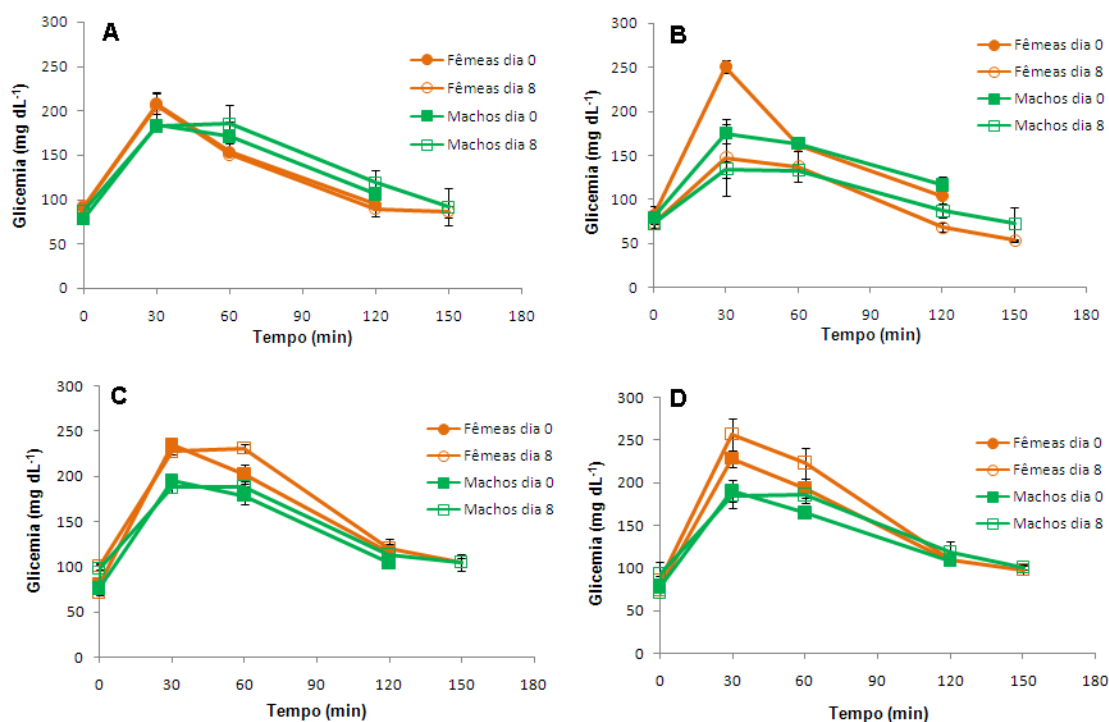


Figura 44: Efeito do soro fisiológico (A), da glicazida (B) e das frações 30% MeOH (C) e 60% MeOH (D) na prova de tolerância à glicose.

Curvas de tolerância dos animais GIR pertencentes aos grupos A (n=4), B (n=4), C (n=8) e D (n=8).

Nos animais que foram administrados com a fração 30% MeOH registou-se um aumento de glicemias em jejum (de 80 ± 2 mg dL⁻¹ para 100 ± 3 mg dL⁻¹ nas fêmeas e de 76 ± 2 mg dL⁻¹ para 98 ± 5 mg dL⁻¹ nos machos, $p < 0.05$), resultante da administração da fração (figura 45), sem que tenham ocorrido alterações significativas da prova de tolerância (figura 44C), independentemente de se tratar de machos ou de fêmeas. As glicemias pós-prandiais tomaram valores acima dos considerados normais e semelhantes aos registados na PTGO características desta estirpe. No caso dos machos tomaram valores de 188 ± 6 mg dL⁻¹, 188 ± 7 mg dL⁻¹ e 113 ± 7 mg dL⁻¹, aos 30, 60 e 120 minutos, respectivamente, e nas fêmeas 228 ± 3 mg dL⁻¹, 231 ± 5 mg dL⁻¹ e 121 ± 10 mg dL⁻¹, aos 30, 60 e 120 minutos.

Estes resultados mostram que a fração exerceu um efeito hiperglicemiante, o que sugere a presença de glúcidos nesta fração. A fração 30% MeOH apresenta na sua constituição o ácido ferrúlico, referido na literatura como composto hipoglicemiante, com possíveis efeitos estimulatórios na secreção de insulina (Mukherjee *et al.*, 2006). Contudo, é provável que a dose administrada tenha sido insuficiente, encontrando-se o composto com actividade hipoglicemiante numa concentração reduzida, prevalecendo outros compostos capazes de exercerem uma acção hiperglicemiante.

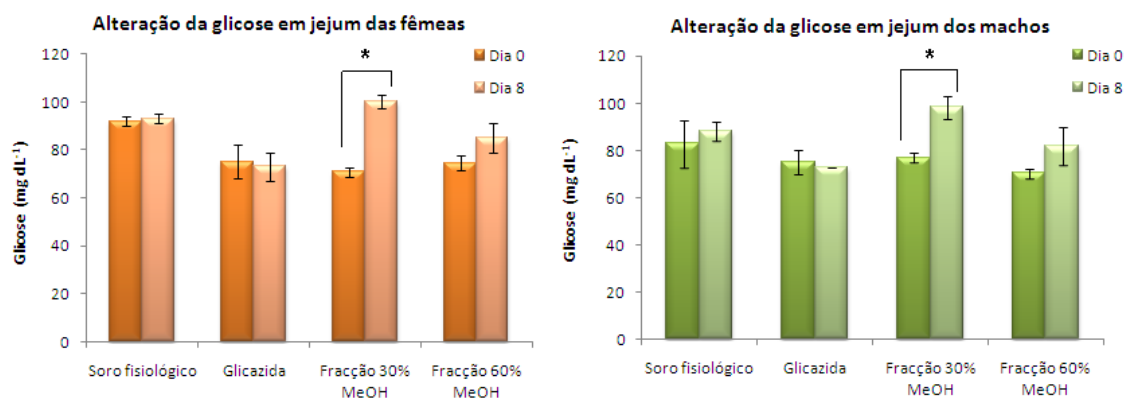


Figura 45: Alterações da glicemia em jejum antes e após administração das fracções testadas.

*p <0.05

No teste 2, os animais foram administrados com a fracção 60%MeOH. Também neste caso não foram registadas alterações nas glicemias em jejum (figura 45), nem nas curvas de tolerância dos animais administrados com esta fracção (figura 44D).

Não se observaram diferenças nas glicemias pós-prandiais nem dos machos (de 191 ± 13 mg dL⁻¹ para 185 ± 14 mg dL⁻¹, de 165 ± 5 mg dL⁻¹ para 186 ± 9 mg dL⁻¹ e de 108 ± 2 mg dL⁻¹ para 119 ± 13 mg dL⁻¹, aos 30, 60 e 120 minutos, respectivamente) nem das fêmeas (de 228 ± 10 mg dL⁻¹ para 257 ± 19 mg dL⁻¹, de 194 ± 11 mg dL⁻¹ para 223 ± 18 mg dL⁻¹ e de 108 ± 3 mg dL⁻¹ para 109 ± 7 mg dL⁻¹, aos 30, 60 e 120 minutos, respectivamente).

À semelhança do referido para a fracção 30% MeOH, também neste caso, a presença de rutina, de derivados da apigenina e da luteonina na sua constituição, levariam a crer que exerceria uma potencial acção hipoglicemiante, que porém não se observou. Aos compostos referidos estão atribuídas a capacidade de aumentar a tolerância à glicose, propriedades antioxidantes e protectoras ao nível dos tecidos hepáticos, renais e pancreáticos de ratos com diabetes induzida por STZ (Prince & Kamalakkannan, 2006; Li *et al.*, 2007; Rauter *et al.*, 2010). Aliás, a célula β pancreática exibe uma sensibilidade particular ao stress oxidativo, e como antioxidantes, os flavonóides poderão possuir a capacidade de prevenir a progressão da disfunção das células β , e por isso otimizar a viabilidade das células β ou estimular a secreção de insulina.

Em suma, as fracções 30% e 60% MeOH não tiveram efeito hipoglicemiante nas condições testadas, mas também não agravaram a hiperglicemia pós-prandial. Também não se observaram indicadores de toxicidade relevantes, indicando que a dose poderá ser aumentada. É possível que a dose administrada não tenha sido

suficiente para exercer efeito hipoglicemiante, pelo que será necessário alargar o estudo, procurando estudar doses mais elevadas do que as utilizadas neste trabalho.

Com base nos dados obtidos também não se pode descartar a hipótese dos princípios activos com acção hipoglicemiante mais relevante não estarem presentes nas fracções testadas, nem a possibilidade do efeito hipoglicemiante do extracto total depender da acção sinérgica de diversos compostos presentes no mesmo e que após o fraccionamento possam perder eficácia.

V- Conclusões e Perspectivas Futuras

5. Conclusões e Perspectivas Futuras

A *Cytisus multiflorus* é apontada na medicina tradicional pelo seu carácter hipoglicemiante. Ao efectuar o fraccionamento e a caracterização química do extracto aquoso desta planta e, a avaliação da actividade anti-diabética foi possível concluir que:

- ✓ A maioria dos compostos identificados são flavonóides, sendo alguns descritos como hipoglicemiantes, como é o caso do ácido ferrúlico, dos derivados glicosados da apigenina, dos derivados da luteonina e da rutina, compostos referidos na literatura como tendo acção anti-diabética.
- ✓ A actividade antioxidante é mais elevada nas fracções 40%, 50%, 60% e 70% MeOH, enquanto a quantidade de fenóis totais é mais elevada nas fracções 30%, 40%, 60% e 80% MeOH, sugerindo que estas serão as fracções a caracterizar do ponto de vista da sua acção biológica, nomeadamente, anti-diabética.
- ✓ A administração das fracções 30% e 60% MeOH não revelaram efeito hipoglicemiante nas condições testadas, mas também não agravaram a hiperglicemia pós-prandial. Dado que só foi utilizada uma dose, não é possível excluir a possibilidade dos compostos efectivos se encontrarem em concentrações inferiores à dose efectiva.

Estes dados sugerem que as fracções 30% e 60% MeOH devem ser testadas em concentrações mais elevadas e que outras fracções, nomeadamente, 40%, 50%, 70% e 80% MeOH também devem ser avaliadas no que diz respeito ao eventual potencial hipoglicemiante que possam apresentar.

A continuação da avaliação da composição química do extracto de *C. multiflorus* e dos efeitos hipoglicemiantes das fracções é promissora. Os resultados obtidos sugerem a realização de alguns estudos que podem complementar o trabalho aqui apresentado, nomeadamente:

- ✓ Completar um pouco mais a caracterização química das fracções, com a confirmação de compostos a partir da co-eluição com padrões no LC-MS.
- ✓ A avaliação do efeito insulínico, *in vitro* e/ou *ex vivo* usando a linha celular BRIN-BD11 e ilhéus ou células β mantidos em cultura, expostos às fracções que aparentam ser mais promissoras.
- ✓ A avaliação do efeito das fracções na acção da insulina, ou seja na insulino-resistência, seguindo a captação de glicose em células do músculo em cultura

(células do músculo esquelético de rato L6) ou adipócitos expostos às fracções que aparentam ser mais promissoras.

- ✓ A clarificação dos mecanismos subjacentes ao efeito anti-diabético, seja pela indução da secreção ou pela amplificação da acção da insulina.
- ✓ Estudar os efeitos secundários ou efeitos tóxicos das fracções, testando várias doses das fracções.

VI- Bibliografia

- Abdul-Ghani MA & DeFronzo RA (2009). Pathophysiology of prediabetes. *Curr Diab Rep* 9, 193-199.
- Alberti KG (1998). Impaired glucose tolerance: what are the clinical implications? *Diabetes Res Clin Pract* 40 Suppl, S3-S8.
- Antunes CM, Areias LR, Vieira IP, Costa AC, Tinoco MT & Cruz-Morais J (2009). Efeito Hipoglicemiante de um Extracto Aquoso de *Cytisus multiflorus*. *Revista de Fitoterapia* 9, (Supl.1): 91 (Abstract).
- Ardrey RE (2003). Interface Technology. In *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry: An introduction*, ed. Ardrey RE, John Wiley and Sons, Ltd.
- Bnouham M, Ziyat A, Mekhfi H, Tahri A, & Legssyer A (2006). Medicinal plants with potential antidiabetic activity - A review of ten years of herbal medicine research (1990-2000). *International Journal of Diabetes and Metabolism* 14.
- Bonora E (2008). Protection of pancreatic beta-cells: Is it feasible? *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 18, 74-83.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, & Berset C (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* 28, 25-30.
- Brass BJ, Abelev Z, Liao EP, & Poretsky L (2010). Endocrine Pancreas. In *Principles of Diabetes Mellitus*, ed. Poretsky L, pp. 37-56. Springer.
- Brielmann HL, Setzer WN, Kaufman PB, Kirakosyan A, & Cseke LJ (2006). Phytochemicals: The Chemical Components of Plants. In *Natural Products from Plants*, eds. Cseke LJ, Kirakosyan A, Kaufman PB, Warber SL, Duke JA, & Brielmann HL, pp. 1-50. Taylor & Francis.
- Camejo-Rodrigues J, Ascensão L, Àngels Bonet M, & Vallès J (2003). An ethnobotanical study of medicinal and aromatic plants in the Natural Park of "Serra de São Mamede" (Portugal). *Journal of Ethnopharmacology* 89.
- Campbell RK (2009). Fate of the beta-cell in the pathophysiology of type 2 diabetes. *J Am Pharm Assoc* (2003) 49 Suppl 1, S10-S15.
- Capasso R, Izzo AA, Pinto L, Bifulco T, Vitobello C, & Mascolo N (2000). Phytotherapy and quality of herbal medicines. *Fitoterapia* 71, S58-S65.
- Carvalho AMP. *Etnobotánica del Parque Natural de Montesinho - Plantas, Tradición y Saber Popular en un territorio del nordeste de Portugal*. 2005. Universidad Autónoma de Madrid.
- Cechinel F, V (2009). Chemical composition and biological potential of plants from the genus *Bauhinia*. *Phytother Res* 23, 1347-1354.
- Ceriello A (2000). Oxidative stress and glycemic regulation. *Metabolism* 49, 27-29.
- Chiasson JL & Rabasa-Lhoret R (2004). Prevention of type 2 diabetes: insulin resistance and beta-cell function. *Diabetes* 53 Suppl 3, S34-S38.

-
- Choi MS, Jung UJ, Yeo J, Kim MJ, & Lee MK (2008). Genistein and daidzein prevent diabetes onset by elevating insulin level and altering hepatic gluconeogenic and lipogenic enzyme activities in non-obese diabetic (NOD) mice. *Diabetes Metab Res Rev* 24, 74-81.
 - Courtney CH & Olefsky JM (2007). Insulin Resistance. In *Mechanisms of Insulin Action*, eds. Saltiel AR & Pessin JE, pp. 185-210. Springer.
 - D'Agostina A, Boschini G, Resta D, Annicchiarico P, & Arnoldi A (2008). Changes of isoflavones during the growth cycle of *Lupinus albus*. *J Agric Food Chem* 56, 4450-4456.
 - Dahlgren GM, Kauri LM, & Kennedy RT (2005). Substrate effects on oscillations in metabolism, calcium and secretion in single mouse islets of Langerhans. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1724, 23-36.
 - Davidson MD & Peters MD (1997). An Overview of Metformin in the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *The American Journal of Medicine* 102, 99-110.
 - Day C (1998). Traditional plant treatments for diabetes mellitus: pharmaceutical foods. *British Journal of Nutrition* 80.
 - De Pascual-Teresa S & Rivas-Gonzalo JC (2003). Application of LC-MS for the identification of polyphenols. In *Methods in polyphenol analysis*, eds. Santos-Buelga C & Williamson G, The Royal Society of Chemistry.
 - de Sousa E., Zanatta L, Seifriz I, Creczynski-Pasa TB, Pizzolatti MG, Szpoganicz B, & Silva FR (2004). Hypoglycemic effect and antioxidant potential of kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* leaves. *J Nat Prod* 67, 829-832.
 - DeFronzo RA (1999). Pharmacologic Therapy for Type 2 Diabetes Mellitus. *Annals of Internal Medicine* 131, 281-303.
 - Devlin TM (2006). *Textbook of Biochemistry with clinical correlations*, 6th ed. Wiley-Liss.
 - Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, & Vidal N (2006). Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry* 97, 654-660.
 - Escribano-Bailón MT & Santos-Buelga C (2003). Polyphenol extraction from foods. In *Methods in polyphenol analysis*, eds. Santos-Buelga C & Williamson G, The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
 - Fossen T & Andersen OM (2006). Spectroscopic Techniques Applied to Flavonoids. In *Flavonoids chemistry, biochemistry and applications*, eds. Andersen OM & Markham KR, Taylor and Francis.
 - Franco JA (1971). *Nova Flora de Portugal* Sociedade Astória.
 - Frayn KN (2003). Important Endocrine Organs and Hormones. In *Metabolic Regulation - A human perspective*, ed. Frayn KN.

- Fujimoto WY (2000). The importance of insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Am J Med* 108 Suppl 6a, 9S-14S.
- Gates P (2004b). <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/esi-ionisation.html>. University of Bristol.
- Gates P. <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/apci-ionisation.html>. 2004a. University of Bristol.
- Gerich JE (1997). Metabolic abnormalities in impaired glucose tolerance. *Metabolism* 46, 40-43.
- Giorgino F, Laviola L, & Leonardini A (2005). Pathophysiology of type 2 diabetes: rationale for different oral antidiabetic treatment strategies. *Diabetes Res Clin Pract* 68 Suppl1, S22-S29.
- Goke B (1998). Implications of blood glucose, insulin resistance and beta-cell function in impaired glucose tolerance. *Diabetes Res Clin Pract* 40 Suppl, S15-S20.
- Guillausseau PJ, Meas T, Virally M, Laloi-Michelin M, Medeau V, & Kevorkian JP (2008). Abnormalities in insulin secretion in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab* 34 Suppl 2, S43-S48.
- Gurib-Fakim A (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine* 27.
- Han J, Ye M, Qiao X, Xu M, Wang Br, & Guo DA (2008). Characterization of phenolic compounds in the Chinese herbal drug *Artemisia annua* by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 47, 516-525.
- Hanefeld M (2007). Pioglitazone and sulfonylureas: effectively treating type 2 diabetes. *Int J Clin Pract Suppl* 20-27.
- Harborne JB (1993). In *Methods in Plant Biochemistry*, eds. Dey PM & Harborne JB, Academic Press Limited.
- Heim KE, Tagliaferro AR, & Bobilya DJ (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 13, 572-584.
- Hennige AM & Haring HU (2004). The mouse as a model of insulin signaling. *Drug Discovery Today: Disease Models* 1, 199-204.
- Henquin JC (2000). Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* 49, 1751-1760.
- Henquin JC, Nenquin M, Stiernet P, & Ahren B (2006). In Vivo and In Vitro Glucose-Induced Biphasic Insulin Secretion in the Mouse. *Diabetes* 55, 441-451.
- Henry RR (2003). Insulin resistance: from predisposing factor to therapeutic target in type 2 diabetes. *Clin Ther* 25 Suppl B, B47-B63.

- Hollecker L, Pinna M, Filippino G, Scrugli S, Pinna B, Argiolas F, & Murru M (2009). Simultaneous determination of polyphenolic compounds in red and white grapes grown in Sardinia by high performance liquid chromatography-electron spray ionisation-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1216**, 3402-3408.
- Horton ES (2009). Defining the role of basal and prandial insulin for optimal glycemic control. *J Am Coll Cardiol* 53, S21-S27.
- Hsu CL & Yen GC (2008). Phenolic compounds: evidence for inhibitory effects against obesity and their underlying molecular signaling mechanisms. *Mol Nutr Food Res* 52, 53-61.
- Hui H, Tang G, & Go VLW (2009). Hypoglycemic herbs and their action mechanisms. *Chinese Medicine* 4.
- Inbaraj BS, Lu H, Kao TH, & Chen BH (2010). Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in *Lycium barbarum* Linnaeus by HPLC-DAD-ESI-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **51**, 549-556.
- Kahn SE (2000). The importance of the beta-cell in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Am J Med* 108 Suppl 6a, 2S-8S.
- Kammerer D, Carle R, & Schieber A (2004). Characterization of phenolic acids in black carrots (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **18**, 1331-1340.
- Karaca M, Magnan C, & Kargar C (2009). Functional pancreatic beta-cell mass: Involvement in type 2 diabetes and therapeutic intervention. *Diabetes & Metabolism* 35, 77-84.
- Kochetova et al MV. Determination of biologically active phenols and polyphenols in various objects by chromatographic techniques. *Russian Chemical Reviews* 76[1], 79. 2007.
- Krishnaiah D, Sarbatly R, & Nithyanandam R (2010). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing* **In Press, Corrected Proof**.
- Kulkarni RN (2004). The islet [beta]-cell. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36, 365-371.
- Laakso M (2008). Epidemiology of type 2 diabetes. In *Type 2 Diabetes: Principles and Practice*, eds. Goldstein BJ & Muller-Wieland D, pp. 1-12. Informa Healthcare, Inc., New York.
- Lee JS (2006). Effects of soy protein and genistein on blood glucose, antioxidant enzyme activities, and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sciences* 79, 1578-1584.
- Leeuwenkamp OR, Van Bennekom WP, Van Der Mark EJ, & Bult A (1984). Nitroprusside, antihypertensive drug and analytical reagent. Review of (photo) stability, pharmacology and analytical properties. *Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition* 6, 129-140.

- LeRoith D (2002). Beta-cell dysfunction and insulin resistance in type 2 diabetes: role of metabolic and genetic abnormalities. *The American Journal of Medicine* 113, 3-11.
- Li W, Dai RJ, Yu YH, Li L, Wu CM, Luan WW, Meng WW, Zhang XS, & Deng YL (2007). Antihyperglycemic effect of *Cephalotaxus sinensis* leaves and GLUT-4 translocation facilitating activity of its flavonoid constituents. *Biol Pharm Bull* 30, 1123-1129.
- Li WL, Zheng HC, Bukuru J, & De Kimpe N (2004). Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. *Journal of Ethnopharmacology* 92.
- Lin LZ & Harnly JM (2010). Identification of the phenolic components of chrysanthemum flower (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Food Chemistry* 120, 319-326.
- Liu D, Zhen W, Yang Z, Carter JD, Si H, & Reynolds KA (2006). Genistein Acutely Stimulates Insulin Secretion in Pancreatic β -Cells Through a cAMP-Dependent Protein Kinase Pathway. *Diabetes* 55, 1043-1050.
- Lopes JP, Oliveira SM, & Fortunato JS (2008). Stress oxidativo e seus efeitos na insulino-resistência e disfunção das células β pancreáticas. *Acta Med Port* 21, 293-302.
- Lovkova MY, Buzuk GN, Sokolova SM, & Kliment'eva N.I. (2001). Chemical Features of Medicinal Plants (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology* 37.
- Luque de Castro MD & Priego-Capote F (2010). Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A* 1217, 2383-2389.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, & Jiménez L (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* 79.
- Marchetti P, Dotta F, Lauro D, & Purrello F (2008). An overview of pancreatic beta-cell defects in human type 2 diabetes: Implications for treatment. *Regulatory Peptides* 146, 4-11.
- Maritim AC, Sanders RA, & Watkins JB, III (2003). Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol* 17, 24-38.
- Marles RJ & Farnsworth NR (1995). Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine* 2, 137-189.
- Marston A & Hostettmann K (2006). Separation and quantification of flavonoids. In *Flavonoids chemistry, biochemistry and applications*, eds. Andersen OM & Markham KR, Taylor and Francis.
- Marston A (2007). Role of advances in chromatographic techniques in phytochemistry. *Phytochemistry* 68, 2786-2798.
- McClenaghan NH (2005). Determining the relationship between dietary carbohydrate intake and insulin resistance. *Nutr Res Rev* 18, 222-240.

-
- McClenaghan NH (2007). Physiological regulation of the pancreatic β -cell: functional insights for understanding and therapy of diabetes. *Experimental Physiology* 92, 481-496.
 - Mentreddy SR (2007). Medicinal plant species with potential antidiabetic properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87.
 - Modak M, Dixit P, Londhe J, Ghaskadbi S, & Devasagayam TPA (2007). Indian Herbs and Herbal Drugs Used for the Treatment of Diabetes. *Journal of Clinical Biochemistry Nutrition* 40, 163-173.
 - Moody AJ & Shaw FL (2006). Reevaluation of the Griess reaction: How much of a problem is interference by nicotinamide nucleotides? *Analytical Biochemistry* 356, 154-156.
 - Mukherjee PK, Maiti K, Mukherjee K, & Houghton PJ (2006). Leads from Indian medicinal plants with hypoglycemic potentials. *Journal of Ethnopharmacology* 106.
 - Naczek M & Shahidi F (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A* 1054, 95-111.
 - Nathan DM, Davidson MB, DeFronzo RA, Heine RJ, Henry RR, Pratley R, & Zinman B (2007). Impaired Fasting Glucose and Impaired Glucose Tolerance. *Diabetes Care* 30, 753-759.
 - Nováková L & Vlcková H (2009). A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. *Analytica Chimica Acta* 656, 8-35.
 - Parejo I, Jauregui O, Sánchez-Rabaneda F, Viladomat F, Bastida J, & Codina C (2004). Separation and Characterization of Phenolic Compounds in Fennel (*Foeniculum vulgare*) Using Liquid Chromatography–Negative Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 3679-3687.
 - Pereira AMRM. Caracterização de Parâmetros Bioquímicos de Animais pertencentes à Estirpe GIR (5ª Geração). Relatório de Estágio. 2009. Universidade de Évora.
 - Pietta PG (2000). Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 63, 1035-1042.
 - Pinet M, Castell A, Baiges I, Montagut G, Arola L, & [1], Ardeu A (2008). Bioactivity of Flavonoids on Insulin-Secreting Cells. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 7, 299-308.
 - Pinn G (2005). Herbal Medicine in Endocrinology and Metabolic Disease. In *Handbook of Medicinal Plants*, eds. Yaniv Z & Bachrach U, pp. 385. The Haworth Press, Inc.
 - Prince PSM & Kamalakkannan N (2006). Rutin improves glucose homeostasis in streptozotocin diabetic tissues by altering glycolytic and gluconeogenic enzymes. *J Biochem Mol Toxicol* 20, 96-102.
-

- Rajani M & Kanaki NS (2008). Phytochemical Standardization of Herbal Drugs and Polyherbal, Formulations. In *Bioactive Molecules and Medicinal Plants*, eds. Ramawat KG & Merillon JM, pp. 349. Springer.
- Rauter AP, Martins A, Borges C, Mota-Filipe H, Pinto R, Sepodes B, & Justino J (2010). Antihyperglycaemic and protective effects of flavonoids on streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytotherapy Research*.
- Regos I, Urbanella A, & Treutter D (2009). Identification and Quantification of Phenolic Compounds from the Forage Legume Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**, 5843-5852.
- Renstrom E & Rorsman P (2008). Regulation of Insulin Granule Exocytosis. In *Pancreatic beta cell in health and disease*, eds. Seino S & Bell GI, Springer.
- Rice-Evans C, Miller N, & Paganga G (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* **2**, 152-159.
- Robards K & Antolovich M (1997). Analytical Chemistry of Fruit BioflavonoidsA Review. *The Analyst* **122**, 11-34.
- Roman-Ramos R, Flores-Saenz JL, & Alarcon-Aguilar FJ (1995). Anti-hyperglycemic effect of some edible plants. *Journal of Ethnopharmacology* **48**.
- Rorsman P (2005). Review: Insulin secretion: function and therapy of pancreatic beta-cells in diabetes. *The British Journal of Diabetes & Vascular Disease* **5**, 187-191.
- Ross JA & Kasum CM (2002). Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr* **22**, 19-34.
- Rutter GA (2001). Nutrient-secretion coupling in the pancreatic islet [beta]-cell: recent advances. *Molecular Aspects of Medicine* **22**, 247-284.
- Ryan D, Robards K, Prenzler P, & Antolovich M (1999). Applications of mass spectrometry to plant phenols. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **18**, 362-372.
- Sakakibara H, Honda Y, Nakagawa S, Ashida H, & Kanazawa K (2003). Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *J Agric Food Chem* **51**, 571-581.
- Salim AA, Chin YW, & Kinghorn AD (2008). Drug Discovery from Plants. In *Bioactive Molecules and Medicinal Plants*, eds. Ramawat KG & Merillon JM, pp. 1-3. Springer.
- Santos-Buelga C, García-Viguera C, & Tomás-Barberán FA (2003). On-line identification of flavonoids by HPLC coupled to diode array detection. In *Methods in polyphenol analysis*, eds. Santos-Buelga C & Williamson G, The Royal Society of Chemistry.
- Scalbert A, Johnson IT, & Saltmarsh M (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr* **81**, 215S-221S.
- Schutz K, Kammerer DR, Carle R, & Schieber A (2005). Characterization of phenolic acids and flavonoids in dandelion (*Taraxacum officinale* WEB. ex

WIGG.) root and herb by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **19**, 179-186.

- Seiya RM, Martins MJ, Pessa PB, Santos RM, do Rosário LM, Suzuki KI, & Martins MI (2003). Alterações da morfologia do ilhéu de langerhans na evolução da síndrome diabética num modelo animal de diabetes tipo 2. *Acta Médica Portuguesa* **16**, 381-388.
- Sesti G (2006). Pathophysiology of insulin resistance. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* **20**, 665-679.
- Sharma HM, Hanna AN, Kauffman EM, & Newman HAI (1995). Effect of herbal mixture student rasayana on lipoxygenase activity and lipid peroxidation. *Free Radical Biology and Medicine* **18**, 687-697.
- Shinkai H (1999). Recent developments in oral hypoglycemic agents. *Drug Discovery Today* **4**, 283-288.
- Siddle K (2005). The Insulin Receptor and Downstream Signalling. In *Insulin Resistance - Insulin Action and Its Disturbances in Disease*, eds. Kumar S & O'Rahilly S, pp. 23-37. John Wiley & Sons Ltd, London.
- Simirgiotis MJ & Schmeda-Hirschmann G (2010). Direct identification of phenolic constituents in Boldo Folium (*Peumus boldus* Mol.) infusions by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1217**, 443-449.
- Simmonds MSJ & Howes MJR (2006). Plants Used in the Treatment of Diabetes. In *Traditional Medicines for Modern Times - Antidiabetic Plants*, ed. Soumyanath A, pp. 19-82. Taylor & Francis.
- Steiner DF (2008). The Biosynthesis of Insulin. In *Pancreatic beta cell in health and disease*, eds. Seino S & Bell GI, Springer.
- Stumvoll M, Goldstein BJ, & van Haeften TW (2008). Pathogenesis of type 2 diabetes. In *Type 2 Diabetes: Principles and Practice*, eds. Goldstein BJ & Muller-Wieland D, pp. 13-26. Informa Healthcare, Inc., New York.
- Tahrani AA, Piya MK, Kennedy A, & Barnett AH (2010). Glycaemic control in type 2 diabetes: Targets and new therapies. *Pharmacology & Therapeutics* **125**, 328-361.
- Tan GD (2005). The pancreas. *Anaesthesia & intensive care medicine* **6**, 329-332.
- Teixeira DMFMG (2006). Novos Métodos para a Extração de Compostos Fenólicos de Plantas da Família Moraceae - *Maclura pomifera* *Ficus carica* e *Ficus elastica* uma contribuição para o seu estudo. Universidade de Évora. Tese de Doutoramento.
- Thurman EM & Mills MS (1998). *Solid-Phase Extraction, Principles and Practice* John Wiley and Sons, Inc..

- Tsao R & Deng Z (2004). Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *Journal of Chromatography B* 812, 85-99.
- van Haeften TW (2002). Early disturbances in insulin secretion in the development of type 2 diabetes mellitus. *Molecular and Cellular Endocrinology* 197, 197-204.
- Vessal M, Hemmati M, & Vasei M (2003). Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 135, 357-364.
- Vieira IP. Caracterização de animais intolerantes à glicose. Relatório de Estágio. 2008. Universidade de Évora.
- Vilsboll T & Holst JJ (2004). Incretins, insulin secretion and Type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 47, 357-366.
- Virally M, Blicke JF, Girard J, Halimi S, Simon D, & Guillausseau PJ (2007). Type 2 diabetes mellitus: epidemiology, pathophysiology, unmet needs and therapeutical perspectives. *Diabetes Metab* 33, 231-244.
- Walker M, Berrish TS, Stewart MW, Humphriss DB, Barriocanal L, & Alberti KG (1997). Metabolic heterogeneity in impaired glucose tolerance. *Metabolism* 46, 914-917.
- Wang L & Weller CL (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology* 17, 300-312.
- Wink M (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64, 3-19.
- Wood KV (2006). Analysis of phenolic compounds with mass spectrometry. In *Phenolic Compounds Biochemistry*, eds. Vermerris W & Nicholson R, Springer.
- Yoshikawa M & Matsuda H (2006). Saponins. In *Traditional Medicines for Modern Times - Antidiabetic Plants*, ed. Soumyanath A, pp. 273-292. Taylor & Francis.
- Zhang Y, Shi P, Qu H, & Cheng Y (2007). Characterization of phenolic compounds in *Erigeron breviscapus* by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 21, 2971-2984.
- Zimmet P, Alberti KG, & Shaw J (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414, 782-787.
- Zimmet P, Cameron A, & Shaw J (2005). The Diabetes Epidemic; Genes and Environment Clashing. In *Prevention of Type 2 Diabetes*, ed. Ganz M, pp. 3-10. John Wiley and Sons, Ltd.

Webgrafia

- www.diavant-portuguese.com
- www.jb.utad.pt

- www.britannica.com/Classification-of-Fabaceae

A. Anexos**A1. Tratamento estatístico das curvas de tolerância dos animais da estirpe GIR**

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Fêmeas t=0min	12	996.5	83.04167	51.47538
Machos t=0min	12	931.5	77.625	56.32386

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	176.0417	1	176.0417	3.266102	0.084421	4.300949
Dentro de grupos	1185.792	22	53.89962			
Total	1361.833	23				

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Fêmeas t=30min	12	2791.5	232.625	371.142
Machos t=30min	12	2261.5	188.4583	292.7027

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	11704.17	1	11704.17	35.26176	5.63E-06	4.300949
Dentro de grupos	7302.292	22	331.9223			
Total	19006.46	23				

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Fêmeas t=60min	12	2248	187.3333	706.8788
Machos t=60min	12	2060.5	171.7083	262.9299

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	1464.844	1	1464.844	3.020892	0.096177	4.300949
Dentro de grupos	10667.9	22	484.9044			
Total	12132.74	23				

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Fêmeas t=120min	12	1292	107.6667	159.0152
Machos t=120min	12	1295	107.9167	55.76515

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0.375	1	0.375	0.003492	0.953412	4.300949
Dentro de grupos	2362.583	22	107.3902			
Total	2362.958	23				

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Fêmeas t=0min	12	996.5	83.04167	51.47538
Fêmeas t=120min	12	1292	107.6667	159.0152

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	3638.344	1	3638.344	34.57014	6.46E-06	4.300949
Dentro de grupos	2315.396	22	105.2453			
Total	5953.74	23				

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Machos t=0min	12	931.5	77.625	56.32386
Machos t=120min	12	1295	107.9167	55.76515

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	5505.51	1	5505.51	98.23461	1.42E-09	4.300949
Dentro de grupos	1232.979	22	56.04451			
Total	6738.49	23				

A2. Tratamento estatístico das curvas de tolerância dos animais do Teste 1

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Fêmeas Teste 1 antes da administração (t=0min)	4	331	82.75	37.75
Fêmeas Teste 1 depois da administração (t=0min)	4	401	100.25	29.58333

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	612.5	1	612.5	18.19307	0.00529	5.987378
Dentro de grupos	202	6	33.66667			
Total	814.5	7				

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Machos Teste 1 antes da administração (t=0min)	4	304	76	20.5
Machos Teste 1 depois da administração (t=0min)	4	393	98.25	118.25

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	990.125	1	990.125	14.27207	0.009204	5.987378
Dentro de grupos	416.25	6	69.375			
Total	1406.375	7				

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Fêmeas Teste 1 antes da administração (t=30min)	4	961	240.25	222.4167
Fêmeas Teste 1 depois da administração (t=30min)	4	911	227.75	48.25

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	312.5	1	312.5	2.309113	0.179426	5.987378
Dentro de grupos	812	6	135.3333			
Total	1124.5	7				

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Machos Teste 1 antes da administração (t=30min)	4	782	195.5	111.8333
Machos Teste 1 depois da administração (t=30min)	4	752	188	154

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	112.5	1	112.5	0.846395	0.393059	5.987378
Dentro de grupos	797.5	6	132.9167			
Total	910	7				

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Fêmeas Teste 1 antes da administração (t=60min)	4	823.5	205.875	317.8958
Fêmeas Teste 1 depois da administração (t=60min)	4	924	231	88.66667

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	1262.531	1	1262.531	6.210761	0.047026	5.987378
Dentro de grupos	1219.688	6	203.2813			
Total	2482.219	7				

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Machos Teste 1 antes da administração (t=60min)	4	718	179.5	454.3333
Machos Teste 1 depois da administração (t=60min)	4	751	187.75	200.9167

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	136.125	1	136.125	0.41549	0.543039	5.987378
Dentro de grupos	1965.75	6	327.625			
Total	2101.875	7				

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Fêmeas Teste 1 antes da administração (t=120min)	4	454	113.5	271.8333
Fêmeas Teste 1 depois da administração (t=120min)	4	483	120.75	414.9167

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	105.125	1	105.125	0.306152	0.600045	5.987378
Dentro de grupos	2060.25	6	343.375			
Total	2165.375	7				

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Machos Teste 1 antes da administração (t=120min)	4	418	104.5	47
Machos Teste 1 depois da administração (t=120min)	4	452	113	193.3333

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	144.5	1	144.5	1.202497	0.314873	5.987378
Dentro de grupos	721	6	120.1667			
Total	865.5	7				

A3. Tratamento estatístico das curvas de tolerância dos animais Teste 2

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Fêmeas Teste 2 antes da administração (t=0min)	4	318	79.5	14.5
Fêmeas Teste 2 depois da administração (t=0min)	4	340	85	134

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	60.5	1	60.5	0.814815	0.401484	5.987378
Dentro de grupos	445.5	6	74.25			
Total	506	7				

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Machos Teste 2 antes da administração (t=0min)	4	310.5	77.625	85.22917
Machos Teste 2 depois da administração (t=0min)	3	245	81.66667	264.3333

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	28.00298	1	28.00298	0.17851	0.690211	6.607891
Dentro de grupos	784.3542	5	156.8708			
Total	812.3571	6				

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Fêmeas Teste 2 antes da administração (t=30min)	4	914.5	228.625	280.0625
Fêmeas Teste 2 depois da administração (t=30min)	4	1027	256.75	1422.917

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	1582.031	1	1582.031	1.857957	0.221794	5.987378
Dentro de grupos	5108.938	6	851.4896			
Total	6690.969	7				

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Machos Teste 2 antes da administração (t=30min)	4	763	190.75	660.75
Machos Teste 2 depois da administração (t=30min)	4	739	184.75	767.5833

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	72	1	72	0.100817	0.761611	5.987378
Dentro de grupos	4285	6	714.1667			
Total	4357	7				

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Fêmeas Teste 2 antes da administração (t=60min)	4	794	198.5	419.6667
Fêmeas Teste 2 depois da administração (t=60min)	4	892	223	1324.667

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	1200.5	1	1200.5	1.376457	0.285167	5.987378
Dentro de grupos	5233	6	872.1667			
Total	6433.5	7				

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Machos Teste 2 antes da administração (t=60min)	4	659	164.75	89.58333
Machos Teste 2 depois da administração (t=60min)	4	742	185.5	312.3333

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	861.125	1	861.125	4.285092	0.083882	5.987378
Dentro de grupos	1205.75	6	200.9583			
Total	2066.875	7				

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Fêmeas Teste 2 antes da administração (t=120min)	4	444	111	48.66667
Fêmeas Teste 2 depois da administração (t=120min)	4	437	109.25	174.9167

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	6.125	1	6.125	0.054789	0.822712	5.987378
Dentro de grupos	670.75	6	111.7917			
Total	676.875	7				

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Machos Teste 2 antes da administração (t=120min)	4	433	108.25	18.25
Machos Teste 2 depois da administração (t=120min)	4	475	118.75	650.25

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	220.5	1	220.5	0.659686	0.447689	5.987378
Dentro de grupos	2005.5	6	334.25			
Total	2226	7				

A4. Tratamento estatístico das glicemias em jejum antes e após a administração das frações

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Fêmeas Teste 1 antes da administração (t=0min)	4	283	70.75	10.91667
Fêmeas Teste 1 depois da administração (t=0min)	4	401	100.25	29.58333

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	1740.5	1	1740.5	85.95062	8.9E-05	5.987378
Dentro de grupos	121.5	6	20.25			
Total	1862	7				

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Machos Teste 1 antes da administração (t=0min)	4	308	77	15.33333
Machos Teste 1 depois da administração (t=0min)	4	393	98.25	118.25

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	903.125	1	903.125	13.52152	0.010366	5.987378
Dentro de grupos	400.75	6	66.79167			
Total	1303.875	7				

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Fêmeas Teste 2 antes da administração (t=0min)	4	298	74.5	46.33333
Fêmeas Teste 2 depois da administração (t=0min)	4	340	85	134

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	220.5	1	220.5	2.445471	0.168897	5.987378
Dentro de grupos	541	6	90.16667			
Total	761.5	7				

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Machos Teste 2 antes da administração (t=0min)	4	281	70.25	14.91667
Machos Teste 2 depois da administração (t=0min)	3	245	81.66667	264.3333

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	223.4405	1	223.4405	1.948326	0.221582	6.607891
Dentro de grupos	573.4167	5	114.6833			
Total	796.8571	6				

