

P164

EFEITO ANTI-HIPERGLICEMIANTE DE UM EXTRACTO DE FLAVONÓIDES DE *Genista tenera*

Martins, A.^a; Mota-Filipe, H.^b; Pinto, R.^b; Sepodes, B.^b; Rauter, A. P.^a; Borges, C.^a; Justino, J.^c e Wilkins, R.^d

^a Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Ed. C 8, 5º Piso, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal

^b Unidade de Farmacologia e Farmacotoxicologia, Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Av.^a das Forças Armadas, 1600 Lisboa, Portugal

^c Escola Superior Agrária de Santarém, Instituto Politécnico de Santarém, Quinta do Galinheiro, S. Pedro, 2000 Santarém, Portugal

^d School of Biology, University of Newcastle, King George VI Building, Newcastle Upon Tyne NF1 7 RU, U.K.

Email do autor a quem se deve dirigir a correspondência: aprauter@fc.ul.pt

RESUMO

A *Genista tenera* é uma planta endémica do arquipélago da Madeira, cuja infusão, utilizada na medicina popular local, é reconhecida pela sua acção hipoglicémica. Neste trabalho é apresentado o efeito anti-hiperglicemiante de um extracto de flavonóides desta planta, o qual foi testado em ratos com diabetes induzida pela estreptozotocina. A composição em flavonóides do extracto etanólico da parte aérea da planta foi analisada por HPLC e espectrometria de massa. Os ensaios biológicos efectuados em ratos comprovaram a actividade hipoglicémica do extracto e a não toxicidade do mesmo em organismos vivos, a qual foi testada em larvas de *Artemia salina*.

1. INTRODUÇÃO

A *Genista tenera*, vulgarmente designada "piorno", é um endemismo madeirense muito comum, pertencente à família das Leguminosas. Cresce nas escarpas rochosas do litoral, desde os 50 m de altitude, até cerca de 1000 m, podendo excepcionalmente aparecer em locais rochosos bem expostos, acima dos 1500 m de altitude (Vieira, 1992). A população local recorre a esta planta como um

adjuvante no tratamento da diabetes, utilizando a parte aérea seca, sob a forma de infusão. Esta é tomada ao longo do dia, sempre que o paciente manifeste sinais de sede. Não foi encontrada, até ao momento, qualquer referência a um estudo científico sobre a actividade hipoglicemiante desta planta, nem sobre os componentes químicos eventualmente responsáveis por tal acção. No entanto, o "screening" fitoquímico da infusão revelou a presença de alcalóides e de flavonóides, compostos estes já citados na literatura como possuindo actividade antidiabética (Handa & Chawla, 1989). Neste trabalho apresentam-se os resultados do efeito anti-hiperglicemiante de um extracto de flavonóides, obtido a partir do extracto etanólico da parte aérea seca desta planta, o qual foi testado em ratos Wistar, com diabetes induzida pela estreptozotocina (STZ). Paralelamente, foram realizados ensaios de toxicidade do mesmo extracto, em larvas de *Artemia salina*, com o objectivo de concluir acerca da concentração mínima a partir da qual a acção tóxica começa a sobrepor-se à acção benéfica do extracto.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Preparação e análise por HPLC e MS do extracto

A parte aérea seca da planta foi triturada e extraída com etanol a 96% em aparelho Soxhlet. O extracto obtido foi evaporado à secura, sob vácuo, à temperatura de 40 °C, e o resíduo dissolvido em água a 80 °C. Após arrefecimento, fez-se uma extração sequencial com éter dietílico, acetato de etilo e *n*-butanol. O extracto de flavonóides obtido com acetato de etilo foi aquele que apresentou maior rendimento e foi sobre ele que incidiu o presente estudo.

Utilizou-se um aparelho de HPLC Waters 600 E e um detector de UV Waters 486, uma bomba Waters 600 e um software Millennium 2.10. Usou-se uma coluna μ Bondapak C₁₈, 10 mm, de 3,9 x 300 μ m (Waters). A amostra e os padrões foram dissolvidos em metanol e filtrados (filtros Millex-H Millipore) de 0,45 μ m. A eluição decorreu em regime isocrático, à temperatura ambiente, com fluxo de 0,6 mL/min. A detecção foi efectuada a 254 nm e os sistemas de eluição testados foram acetoneitrilo/água (80/20) e metanol/água (Fico *et al.*, 2001) nas seguintes proporções: 95/15, 90/10, 85/15, 80/20, 75/25, 70/30, 60/40, 50/50 e 20/80.

Os espectros de massa foram obtidos utilizando um espectrómetro de massa "tipo quadrupolo" equipado com uma interface de "electrospray", o LCQ Duo da Thermofinnigan. A velocidade de fluxo da solução do electrospray foi de 5 μ L/min e as condições foram optimizadas de modo a que os iões em estudo (moléculas protonadas) apresentassem uma abundância máxima.

2.2. Análise da toxicidade do extracto

Ovos de *Artemia salina* foram incubados durante três dias a 30 °C, num pequeno reservatório contendo 38 g de NaCl/L de água. Após o período de incubação, transferiu-se uma pequena quantidade da solução salina, com uma pipeta de Pasteur, para uma placa de Petri. Os ensaios de toxicidade foram realizados em microplacas contendo 96 cavidades cada uma. Para cada cavidade foram transferidos 50 µL da solução salina contendo cerca de 5 larvas viáveis. A contagem das larvas foi efectuada com o auxílio de uma lupa. Foram preparadas soluções aquosas do extracto de flavonóides com as concentrações de 20; 2; 0,2; 0,02 e 0,002 mg/mL. Para cada cavidade foram transferidos 50 µL de cada uma das soluções, tendo sido realizados seis ensaios para cada concentração e um ensaio em branco. As placas foram colocadas na incubadora a 29 °C e observadas ao fim de 1, 2, 4 e 24 horas, tendo-se procedido à contagem das larvas viáveis e não viáveis.

2.3. Actividade anti-hiperglicemiante do extracto

Testaram-se quinze ratos Wistar, pesando entre 270 e 350 g, os quais foram divididos em três grupos com cinco ratos cada. O grupo A não recebeu qualquer tratamento e funcionou como controlo, sendo mantido nas mesmas condições de temperatura, alimentação e "stress" que os restantes grupos. O grupo B foi tratado com STZ (40 mg/Kg) no dia zero e os valores de glicémia foram determinados oito dias depois. Ao grupo C foi administrada STZ (40 mg/Kg) no dia zero e o extracto de flavonóides (60 mg/Kg/dia) foi administrado durante 7 dias, e os valores da glicémia foram determinados no dia 7. As glicémias foram medidas num aparelho Accutrend Sensor com as respectivas fitas reactivas Accu-Chek (Boehringer-Manheim). A colheita de sangue foi efectuada na veia da cauda.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Recorrendo às técnicas de HPLC e MS foi possível confirmar a presença dos seguintes flavonóides: genisteína-7-*O*-glucósido, 5-*O*-metilgenisteína-7-*O*-glucósido, luteolina-7-*O*-glucósido e luteolina-3',7-*O*-diglucósido.

Os resultados obtidos nos ensaios de toxicidade encontram-se resumidos no quadro I. Dele podemos inferir que a toxicidade do extracto para este tipo de organismos é elevada para concentrações iguais ou superiores a 2 mg/mL, começando a diminuir a partir da concentração de 0,2 mg/mL.

Quadro I. Toxicidade do extracto de flavonóides em larvas de *Artemia salina*.

| | Mortalidade (%) | | | |
|-------------|-----------------|-----|-----|------|
| | 1 h | 2 h | 4 h | 24 h |
| Controlo | 0 | 0 | 0 | 9 |
| 20 mg/mL | 48 | 100 | 100 | 100 |
| 2 mg/mL | 44 | 100 | 100 | 100 |
| 0,2 mg/mL | 0 | 0 | 0 | 39 |
| 0,02 mg/mL | 0 | 0 | 0 | 18 |
| 0,002 mg/mL | 0 | 0 | 0 | 14 |

Relativamente ao efeito nos níveis de glicémia é possível observar (Gráfico 1) que, após uma semana de administração do extracto, este provocou uma diminuição substancial nos níveis de glicémia basal dos animais tratados, comparativamente ao grupo controlo (STZ).

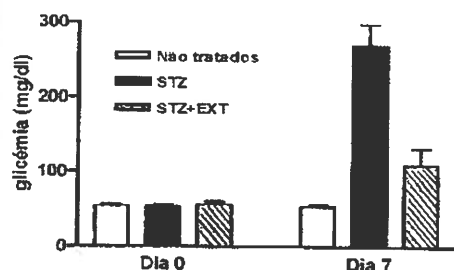


Gráfico 1. Glicémia basal nos diferentes grupos experimentais no início (Dia 0) e no final (Dia 7) do período de observação.

4. CONCLUSÕES

O extracto de flavonóides provocou uma diminuição acentuada (cerca de 60%) nos níveis de glicémia basal dos animais tratados, comparativamente aos níveis observados no grupo ao qual foi apenas administrada STZ. Constatou-se ainda que a toxicidade do extracto, em larvas de *Artemia salina* (organismos de controlo de toxicidade muito sensíveis), é significativa somente a partir da concentração de 0,2 mg/mL, do que se infere a não toxicidade do extracto para o ser humano, pelo menos em condições normais de ingestão.

5. REFERÊNCIAS

- FICO, G., BRACA, A., BILIA, A. R., TOMÉ, F., MORELLI, I., 2001. New flavonol glycosides from the flowers of *Aconitum napellus* ssp. *tannieu*. *Planta Med.*, 67: 287-290.
 HANDA, S. S., CHAWLA, A. S., 1989. Hypoglycaemic plants. A review. *Fitoterapia* LX(3): 195-224.
 VIEIRA, R., 1992. Flora da Madeira. O interesse das plantas endémicas macaronésicas. Serviço Nacional de Parques, Reservas e Conservação da Natureza (Ed.), Lisboa.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Dra. Susana Fontinha e ao Padre Manuel Nóbrega, do Jardim Botânico da Madeira, a colheita e identificação do material vegetal. Agradecem ainda o apoio da Eng. Isabel Portugal e da Dra. Cláudia Santos, do Instituto Politécnico de Santarém, nos ensaios de HPLC. Este trabalho foi parcialmente financiado pela FCT e pelo British Council.