



Actividad Antihiperglycemiante de *Bauhinia* *megalandra*. (Revisión)

Freddy González-Mujica ¹.

Norma Motta ².

¹Médico-cirujano, Ph.D. en Bioquímica Sección de Bioquímica Médica, Instituto de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela freddygonzalezmujica@gmail.com

²Lic. en Biología, M.Sc Sección de Bioquímica Médica, Instituto de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela normamotta@gmail.com

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina - Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 16 de Junio del 2010 a la Revista Vitae Academia Biomédica Digital.

RESUMEN

La infusión de las hojas de *Bauhinia megalandra* es usada por la medicina popular venezolana en el tratamiento empírico de la diabetes. En el presente trabajo se pasa revista a los resultados obtenidos por nosotros sobre las propiedades antihiperglycemiantes de esa planta. El extracto acuoso de las hojas de *B. megalandra* fue capaz de inhibir la capacidad neoglucogénica y glucogenolítica, estimulada por adrenalina o dibutiril AMPc, de rebanadas de hígado, de reducir la hiperglucemia promovida por la adrenalina en el animal intacto e inhibió la absorción intestinal de glucosa en una manera dosis dependiente afectando al transportador SGLT1. A partir del extracto de metanol de las hojas de *B. megalandra* purificamos e identificamos 8 flavonoides uno de los cuales, kanferol 3-O- α -(2"-galoil)-ramnosa, en el mejor de nuestro conocimiento es la primera vez que se describe su aislamiento como

un producto natural; todos ejercieron efecto inhibitorio sobre la enzima glucosa-6-fosfatasa, siendo más activos los compuestos galolilados con IC50 de aproximadamente 30 μ M. La quercetina 3-O- α -(2"-galoil)-ramnosa se comportó como un inhibidor competitivo del transportador T1 de la glucosa-6-fosfatasa y redujo drásticamente la neoglucogénesis hepática. El kaempferol 3-O- α -ramnosa se comportó como un inhibidor competitivo de la absorción intestinal de glucosa. En ratas que ingirieron el extracto de la planta se produjo una discreta disminución de la glicemia y glucosuria renal y en la orina de las mismas identificamos un benceno ortodisustituido, posiblemente producto del metabolismo de alguno de los flavonoides. Se discuten las posibles implicaciones de estos efectos.

PALABRAS CLAVE: *Bauhinia megalandra*, antihiperglicemiante, flavonoides, glucosa-6-fosfatasa, absorción intestinal de glucosa, SGLT 1, glucogenólisis, neoglucogénesis, diabetes.

ANTIHIPERGLYCAEMIC ACTIVITY OF BAUHINIA MEGALANDRA

SUMMARY

The infusion of *Bauhinia megalandra* leaves is used in the Venezuela folk medicine for the treatment of diabetic patients. In the present paper we review our results in the antihiperglycaemic activity of this plant. The aqueous extract of *B. megalandra* leaves inhibit the neoglucogenic and glycogenolysis, stimulated by epinephrine or dibutyryl AMPc, activity of liver slices, reduced the hyperglycemia promoted by epinephrine in the intact animal and inhibited the glucose intestinal absorption in a dose dependant way by affecting the SGLT 1 transporter. From the methanol extract of the *B. megalandra* leaves, we purified and characterized 8 flavonoids one of which, kaempferol 3-O- α -(2 α -galloyl)-rhamnoside, in the best of our knowledge this is the first report of its isolation from nature; all of them were able to inhibit the enzyme glucose-6-phosphatase, being the most active those with the galloyl group with IC50 of approximately 30 μ M. Quercetin 3-O- α -(2 α -galloyl)-rhamnoside behaved as a competitive inhibitor of the glucose-6-phosphatase T1 transporter and drastically reduced the liver gluconeogenic activity. Kaempferol 3-O- α -(2 α -galloyl)-rhamnoside was a competitive inhibitor of the glucose intestinal absorption. The rats that drank the plant extract showed a slight decrease in the glycaemia and renal glycosuria and in the urine we identified a benzene ortho-disubstituted, probably product of the metabolism of one of the flavonoides. The implications of these findings are discussed.

KEY WORDS: *Bauhinia megalandra*, antihiperglycaemic, flavonoid, glucose-6-phosphatase, glucose intestinal absorption, SGLT 1, glycogenolysis, gluconeogenesis, diabetes.

ACTIVIDAD ANTIHIPERGLICEMIANTE DE *BAUHINIA MEGALANDRA*. (REVISIÓN)

INTRODUCCIÓN

La glicemia es uno de los parámetros homeostáticos estrechamente controlados gracias a un equilibrio entre los mecanismos que aportan glucosa a la sangre y los que la retiran de ella (Fig. 1).

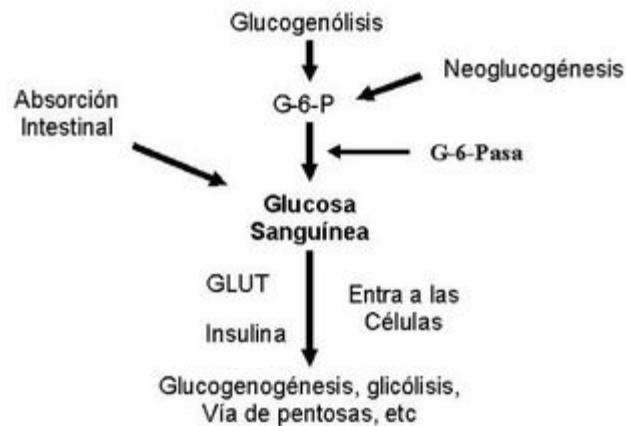


Figura 1. Control de la glicemia. La concentración plasmática de glucosa está estrechamente controlada gracias a un equilibrio entre los mecanismos que la aportan y los que la retiran de la sangre.

La absorción intestinal es uno de los mecanismos que aportan glucosa a la sangre y ocurre en dos etapas (ver Fig.2): la primera es mediada por el transportador Na^+ -glucosa (SGLT1) ubicado en la membrana apical del enterocito y el cual transloca 2 iones Na^+ , a favor de su gradiente de concentración, por molécula de glucosa, a favor o en contra de su gradiente de concentración dependiendo del período de la digestión y de la cantidad de carbohidratos ingeridos, desde el lumen del intestino al interior de la célula. La segunda está a cargo del transportador de glucosa 2 (GLUT 2) ubicado en la membrana basolateral del enterocito y transporta glucosa por difusión facilitada desde el enterocito al espacio intersticial ⁽¹⁾.

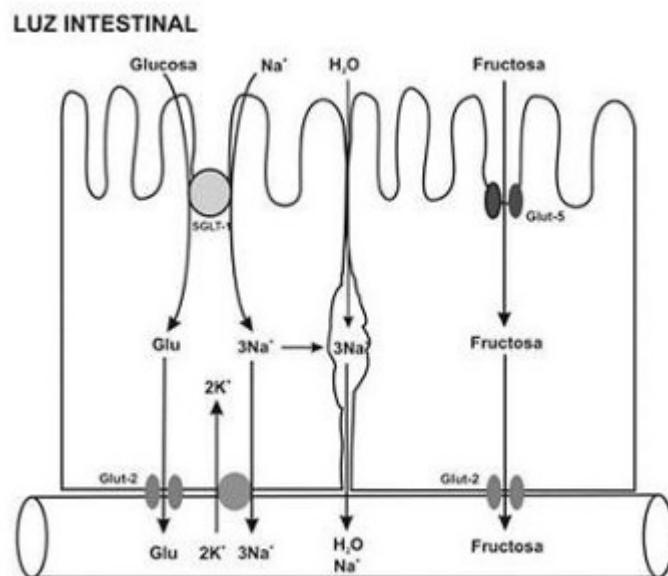


Figura 2. Absorción intestinal de glucosa. Es un proceso que ocurre en dos etapas, la primera es mediada por el SGLT1, el cual transporta una molécula de glucosa y 2 Na^+ , y está presente en el borde apical del enterocito; la segunda es catalizada por el GLUT2 el cual transporta glucosa a favor de su gradiente de concentración y está ubicado en la membrana basolateral

de la misma célula. Además se requiere de la participación de la $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ ATPasa, localizada en la membrana basolateral, para mantener el gradiente de concentración de sodio y potasio.

Durante el ayuno corto, la degradación del glucógeno (glucogenólisis) hepático aporta glucosa a la sangre. Si el ayuno se prolonga la síntesis de nuevo de glucosa (neoglucogénesis), en particular en hígado y riñón, suplen glucosa a la sangre. La enzima glucosa-6-fosfatasa (G-6-Pasa EC 3.1.3.9), por catalizar la reacción final de la glucogenólisis y la neoglucogénesis juega un papel muy importante en el mantenimiento de la glicemia ⁽²⁾. La G-6-Pasa se encuentra en el retículo endoplasmático (RE) en un 80-90 % y en la envoltura nuclear (10-20 %) de células del hígado, riñón, mucosa intestinal, y células β de los islotes pancreáticos, principalmente. Con base en estudios cinéticos, genéticos y moleculares, Arion y col. ⁽³⁾ y Burchell y col. ⁽⁴⁾ propusieron que la G-6-Pasa (Fig. 3) está constituida por: una subunidad catalítica, proteína transmembrana cuyo centro activo mira a la cisterna del RE y que muestra poca especificidad, pudiendo hidrolizar varios ésteres fosfóricos así como pirofosfato. Un transportador T1 altamente específico para el substrato glucosa-6-fosfato (G-6-P). T2, un transportador de Pi, PPi y carbamilfosfato el cual se ha sugerido que está constituido por 2 subunidades, y un transportador para glucosa, T3. Se piensa que también existe una proteína estabilizadora de la subunidad catalítica (SP). La G-6-Pasa además de la actividad hidrolítica, en condiciones adecuadas de alta concentración de glucosa y de un donador de fosfato: PPi o carbamilfosfato es capaz de sintetizar G-6-P. La entrada de glucosa a los tejidos, mediada por los GLUTs, ⁽⁵⁾ disminuye la glicemia, siendo de especial interés la participación del GLUT 4 en el músculo cardíaco y esquelético así como en el tejido adiposo, en estos es translocado a la membrana plasmática desde vesículas intracelulares por acción de la insulina incrementándose la entrada de glucosa a dichos tejidos.

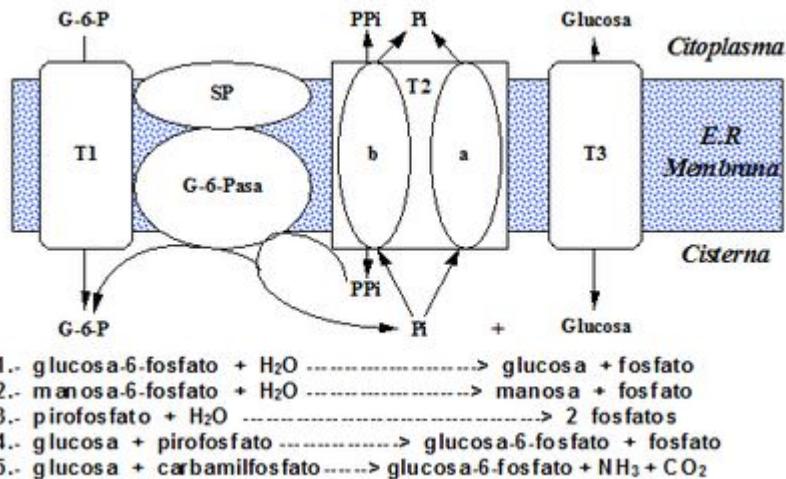


Figura 3. Modelo de la glucosa-6-fosfatasa. Modelo de los transportadores y subunidad catalítica de la G-6-Pasa postulado por Arion y col. ⁽³⁾ y Burchell y Col. ⁽⁴⁾.

Las drogas que disminuyen los mecanismos que aportan glucosa a la sangre se consideran antihiperglicemiantes y las que incrementen la entrada de glucosa a los tejidos, directa o indirectamente, son hipoglicemiantes. McCormack y col. ⁽⁶⁾ sugieren que la G-6-Pasa pudiera

ser un blanco potencial para drogas antihiperglicemiantes. La fracción microsomal, la cual está enriquecida con RE, que se obtiene por centrifugación diferencial está formada por vesículas intactas y rotas, la proporción de cada una de ellas se puede medir utilizando manosa-6-fosfato como substrato de la G-6-Pasa⁽⁷⁾, molécula que no es translocada por T1; en nuestras preparaciones como mínimo tenemos 95 % de vesículas intactas. Las preparaciones que se obtienen se denominan microsomas no tratados; los microsomas se pueden romper por diferentes métodos tales como el uso de detergentes, cavitación en nitrógeno, prensa francesa y más recientemente con el uso de histonas. El término microsomas intactos es teórico y se obtiene substrayendo a la actividad de la G-6-Pasa presente en los microsomas no tratados la actividad de la enzima exhibida por las vesículas rotas presentes. Desde tiempos inmemoriales, el hombre ha utilizado plantas en el tratamiento empírico de distintas enfermedades y en particular de la diabetes En Venezuela, como en muchos países tropicales, las hojas del género *Bauhinia*, popularmente conocida como "casco de vaca" han sido utilizadas por la medicina tradicional en el tratamiento empírico de la diabetes; pertenece a la familia Fabaceae, que comprende las leguminosas. Estas plantas⁽⁸⁾ son árboles que pueden alcanzar los 10 m. de altura, poseen hojas bien desarrolladas y grandes, siempre verdes, y divididas desde el ápice hasta más o menos un tercio de su longitud y asemejan la huella de un bovino, son vegetales hermafrodita. La especie *B. megalandra* se caracteriza por poseer flores blancas en racimos o solitarias con pétalos delgados y largos, el fruto se encuentra como legumbre compacta de color marrón. Es de crecimiento rápido, de vida larga y sistema radical profundo.

EFFECTOS DE *B. MEGALANDRA* SOBRE LA NEOGLUCOCÉNESIS Y LA G-6-PASA

La *B. megalandra* utilizada en estos experimentos fue identificada por El Dr. Stefen Tillett del Herbario Ovalles de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela. Inicialmente medimos los efectos del extracto acuoso de las hojas de *B. megalandra*⁽⁹⁾ sobre la neoglucogénesis de rebanadas de hígado de rata, incubadas en Krebs Ringer bicarbonato suplementado con albúmina bovina saturada con oleato y utilizando lactato o fructosa como substrato neoglucogénico. Como se puede observar en la Tabla 1, la actividad neoglucogénica de las rebanadas controles es lineal hasta los 90 min. e igual con los dos substratos.

Tabla 1 Efectos del extracto acuoso de las hojas de *B. megalandra* sobre la neoglucogénesis hepática

Incubación	Control	<i>B. megalandra</i>	
Tiempo (min.)	Lactato o fructosa	Lactato	Fructosa
30	31,1 ± 9,3	15,9 ± 7,3	18,1 ± 3,8
60	54,5 ± 17,2	11,6 ± 6,5	38,0 ± 6,0
90	90,2 ± 18,5	16,9 ± 8,8	34,0 ± 9,0

Tabla 1 Rebanadas de hígado de ratas ayunadas por 48 horas fueron incubadas en 4ml de

amortiguador Krebs-Ringer bicarbonato, suplementado con albúmina de suero bovino saturada con oleato y usando lactato o fructosa como substrato neoglucogénico, en la ausencia(control) o presencia de 9 UA264rm del extracto de las hojas de *B. megalandra*. En los tiempos indicados, en muestras del medio de incubación se determinó la glucosa por el método de glucosa oxidasa-peroxidasa⁽²⁹⁾. Los resultados se expresan en nmol de glucosa producidos/ mg de peso seco de hígado y corresponden al promedio de 8-13 experimentos \pm la desviación estándar. Las diferencias observadas entre controles y tratadas con el extracto de la planta fueron estadísticamente significativas a $p<0.05$ para fructosa y $p<0.005$ para lactato.

En la presencia del extracto de la planta ocurre una drástica disminución de la neoglucogénesis, siendo más marcada a partir de lactato que de fructosa; estos resultados sugieren que en el extracto de *B. megalandra* están presente compuestos que bloquean dicho proceso en un punto más allá de la entrada de ambos substratos. Como se muestra en la Tabla 2, cuando se usó G-6-P como substrato de la G-6-Pasa de microsomas intactos, el extracto foliar disminuyó de manera estadísticamente significativa la VMAX con una moderada elevación del KM sin afectar la actividad de la enzima de microsomas rotos (9).

Tabla 2. Parámetros cinéticos de la glucosa-6-fosfatasa microsomal hepática en la ausencia o presencia del extracto acuoso de hojas de *B. Megalandra*.

	Glucosa-6-fosfato como substrato				Pirofosfato como substrato			
	Intactos		Rotos		Intactos		Rotos	
	V _{MAX}	K _M	V _{MAX}	K _M	V _{MAX}	K _M	V _{MAX}	K _M
Control	7,4 \pm 0,9 ^a	5,4 \pm 1,1	9,8 \pm 0,8	0,6 \pm 0,1	6,6 \pm 1,4	1,3 \pm 0,5	7,0 \pm 0,9	0,4 \pm 0,1
0,14 UA ₂₆₄	6,2 \pm 1,4	5,6 \pm 0,7	9,8 \pm 0,7	0,7 \pm 0,2	5,7 \pm 1,6	1,0 \pm 0,6	7,4 \pm 0,8	0,4 \pm 0,2
0,28 UA ₂₆₄	5,1 \pm 1,0 ^a	7,5 \pm 0,6	9,5 \pm 0,3	0,7 \pm 0,1	6,0 \pm 1,5	1,2 \pm 0,4	6,6 \pm 1,3	0,3 \pm 0,1

La actividad de la G-6-Pasa microsomal hepática fue ensayada usando glucosa-6-fosfato o pirofosfato como substrato en la presencia o ausencia del extracto acuoso de las hojas de *B. megalandra*. Los parámetros cinéticos fueron calculados a partir de las gráficas de Michaelis y Menton utilizando el programa Enzfitter y se expresan, VMAX: μmol de fosfato liberado/h./mg de proteínas para G-6-Pase y μmol de pirofosfato hidrolizado/h./mg de proteínas para la actividad de pirofosfatasa y el KM: mM. Cada punto representa el promedio de 3-4 experimentos \pm la desviación estándar. En cada experimento se utilizó el hígado de 3-5 ratas ayunas 24h.

El extracto de la planta, no tuvo efecto alguno cuando el substrato de la enzima fue PPi, tanto en microsomas intactos como rotos; lo cual sugiere que el efecto del extracto de *B. megalandra* se ejerce sobre uno de los transportadores del sistema de la G-6-Pasa probablemente sobre T1⁽⁹⁾. Posiblemente la inhibición de la neoglucogénesis hepática sea el resultado de la inhibición de la G-6-Pasa por los compuestos presentes en el extracto de la planta. Al medir el efecto que durante el tiempo, ejerce el extracto de la planta sobre la actividad de la enzima en microsomas no tratados (Figura 4) se observó que: en los controles la actividad de la G-6-Pasa fue lineal durante 30 min., en la presencia del extracto de *B. megalandra* la actividad de la enzima también fue lineal hasta los 20 min. pero por debajo del control, después de este punto ocurre una inflexión con una línea entre 20 y 30 min. con una pendiente menor, sugiriendo que por efectos de la presencia del extracto foliar

probablemente se inhibe otro de los transportadores del sistema de la G-6-Pasa acumulándose los productos de la reacción enzimática los cuales inhibirían la subunidad catalítica (9). En vista de que los parámetros cinéticos de la G-6-Pasa usando PPi como substrato no fueron afectados por el extracto de la planta, posiblemente el transportador inhibido sea T3.

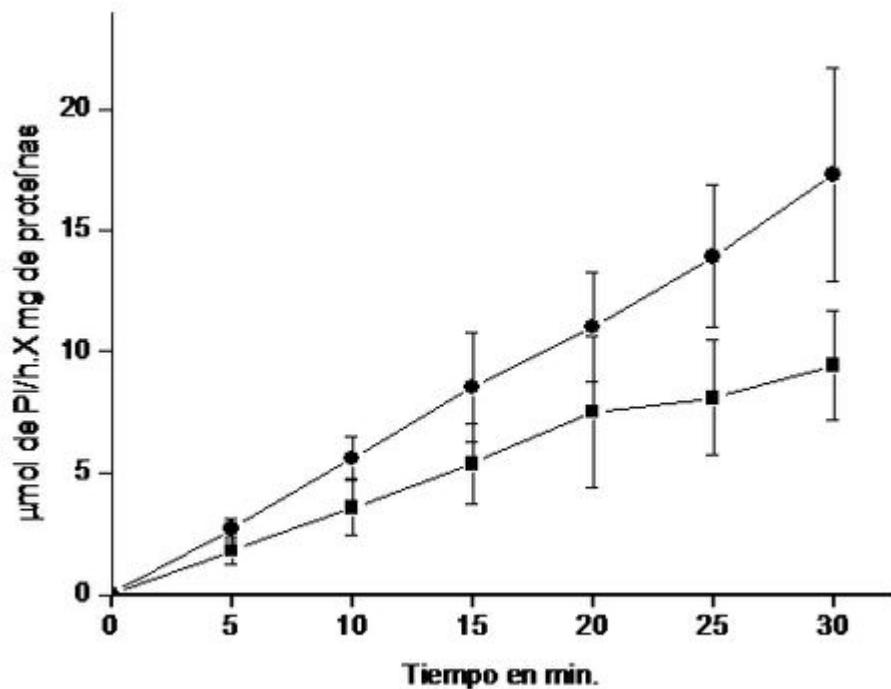


Figura 4. Efectos del extracto acuoso de las hojas de *B. megalandra* en la actividad de la G-6-Pasa durante el tiempo. La actividad de la G-6-Pasa microsomal hepática fue medida en la ausencia (■) o en la presencia de 0,28 UA264 nm del extracto de las hojas de *B. megalandra* (●) usando 15 mM de G-6-P como substrato. Cada punto representa el promedio de 5 experimentos \pm la desviación estándar. Todas las diferencias observadas entre las actividades de la enzima incubada en la ausencia o presencia del extracto de las hojas fueron estadísticamente significativas a $p < 0,02$; con la excepción de la obtenida a los 20 min. que no fue estadísticamente significativa.

Tabla 3. Efectos de los flavonoides purificados de las hojas de *B. megalandra* sobre la G-6-Pasa microsomal hepática

	Microsomas intactos			Microsomas rotos	
	Actividad	%	IC ₅₀	Actividad	%
Control	2,77 ± 0,28			5,66 ± 0,45	
Astilbina	2,23 ± 0,42 ^a	19,5	959 ± 27	5,80 ± 0,43	0
Quercetina 3-O- α -ramnosa	1,95 ± 0,36 ^b	29,6	246 ± 5	5,42 ± 0,53	0
Kanferol 3-O- α -ramnosa	2,04 ± 0,25 ^b	26,4	186 ± 4	5,84 ± 0,46	0
Quercetina 3-O- α -arabinosa	2,04 ± 0,23 ^b	26,4	1069 ± 31	5,77 ± 0,18	0
Quercetina 3-O- α -(2" ^g galoil)ramnosa	1,02 ± 0,22 ^c	63,2	27 ± 1	6,43 ± 0,52 ^a	0
Kanferol 3-O- α -(2" ^g galoil)ramnosa	0,93 ± 0,27 ^c	66,4	31 ± 2	6,61 ± 0,41 ^b	0
Quercetina	2,43 ± 0,05 ^a	12,3	1330 ± 39	5,81 ± 0,52	0
Kanferol	2,71 ± 0,49	2,2	555 ± 6	5,98 ± 0,16	0
Floricina	2,00 ± 0,11 ^b	27,8	446 ± 19	5,71 ± 0,40	0

La actividad de la G-6-Pasa fue ensayada usando 5 mM G-6-P en microsomas hepáticos intactos y rotos en la ausencia (control) o presencia de 50 μ M de cada uno de los 8 flavonoides purificados a partir de las hojas de *B. megalandra* o de 50 μ M floricina (control positivo). La actividad se expresa como μ mol de fosfato liberados/h / mg de proteínas y cada valor corresponde al promedio de 5-9 experimentos ± la desviación estándar. Los superíndices indican diferencias estadísticamente significativas a $p < 0,025$; b $p < 0,005$ y c $p < 0,001$. Además se calculó el % de inhibición que ejercen los compuestos. Para determinar los valores de IC₅₀ el ensayo de la G-6-Pasa se realizó utilizando 1 mM G-6-P en la presencia de cantidades crecientes de los flavonoides (incluyendo valores inferiores y superiores al IC₅₀), los valores se expresan en μ M y corresponden al promedio de 3 experimentos ± la desviación estándar.

Tabla 4. Parámetros cinéticos de la glucosa-6-fosfatasa microsomal hepática en la ausencia o presencia de Quercetina 3-O- α -(2"^ggaloil)-ramnosa

	Glucosa-6-fosfato como substrato				Pirofosfato como substrato			
	Microsomas intactos		Microsomas rotos		Microsomas intactos		Microsomas rotos	
	V _{MAX}	K _M	V _{MAX}	K _M	V _{MAX}	K _M	V _{MAX}	K _M
Control	7,59 ± 0,91	4,78 ± 1,10 ^a	11,57 ± 1,55	0,79 ± 0,27	7,61 ± 2,45	2,28 ± 1,35	8,40 ± 1,73	0,40 ± 0,11
QGR	7,36 ± 1,79	7,44 ± 0,42 ^a	10,47 ± 1,45	0,57 ± 0,17	6,72 ± 1,33	1,87 ± 0,41	7,58 ± 0,73	0,24 ± 0,07

La G-6-Pasa microsomal hepática fue ensayada usando G-6-P (1 – 30 mM) o pirofosfato (0,5 – 5 mM) como substrato, en la ausencia (control) o presencia de 15 μ M quercetina 3-O- α -(2"^ggaloil)-ramnosa. Los parámetros cinéticos fueron calculados a partir de las gráficas de Michaelis-Menten utilizando el programa Enzfitter. La V_{MAX} como los μ mol de G-6-P o PPi hidrolizado/h / mg de proteínas y el K_M en mM. Cada valor representa el promedio de 3-5 experimentos ± la desviación estándar y en cada experimento se uso el hígado de 3-4 ratas. * Indica diferencias estadísticamente significativas a $p < 0,005$.

Purificación de flavonoides de *B. megalandra* y cuantificación de sus efectos.

A partir del extracto metanólico de las hojas frescas de *B. megalandra* logramos purificar 8 flavonoides (¹⁰), la mayoría de ellos como quercetina y kanferol o sus derivados y se midió el efecto que estos compuestos ejercen sobre la actividad de la G-6-Pasa. Las agliconas mostraron la menor actividad inhibitoria, los compuestos glicosilados con rhamnosa presentan una actividad intermedia y cuando la rhamnosa se encuentra esterificada al ácido gálico, la inhibición supera el 60 %. Vale la pena destacar que el efecto inhibitorio solo se observa en los microsomas intactos (Tabla 3) lo cual sugiere fuertemente que estos flavonoides afectan uno de los transportadores, probablemente T1, del sistema de la G-6-Pasa. Hasta donde sabemos, esta es la primera vez que se describe la presencia de kanferol 3-O- α -(2"^ggaloil)-ramnosa como producto natural cuya estructura, conjuntamente con la de quercetina 3-O- α -(2"^ggaloil)-

ramnosa, se muestra en la Figura 5

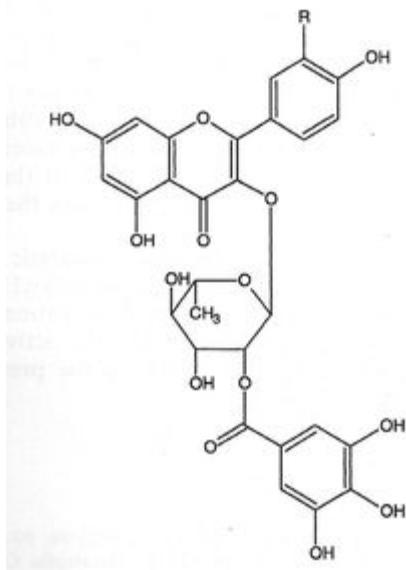


Figura 5. Estructura química de la Quercetina 3-O- α -(2''galloyl)ramnosa (R = OH) y del Kanferol 3-O- α -(2''galloyl)ramnosa (R = H)

Se encontró una correlación entre el % de inhibición de la actividad de la G-6-Pasa de microsomas intactos y el valor del IC₅₀ ejercidos por los compuestos estudiados; las agliconas: kanferol y quercetina, la quercetina glicosilada con arabinosa (una pentosa) y la astilbina presentan valores de IC₅₀ elevados y porcentajes de inhibición bajos; la quercetina y el kanferol glicosilados con rhamnosa (una hexosa) poseen valores intermedios de IC₅₀ y porcentajes de inhibición intermedios y los flavonoides unidos a rhamnosa y ácido gálico exhibieron IC₅₀ del orden de 30 μ M y mostraron inhibición de la actividad de la enzima cercana al 60 %. Se utilizó como control positivo floricina, un conocido inhibidor de T1 de la enzima (11), el cual mostró un efecto inhibitorio similar al ejercido por el kanferol y la quercetina unidos a rhamnosa pero un valor de IC₅₀ (466 μ M) el cual es cercano al doble del mostrado por los primeros; siendo la primera vez que se reporta el IC₅₀ de la floricina para la G-6-Pasa de microsomas intactos. Como se muestra en la Tabla 4, quercetina 3-O- α -(2''galloyl)-ramnosa (QGR) incrementó considerablemente el KM para G-6-P sin modificar la VMAX de la G-6-Pasa de microsomas intactos, tampoco afectó los parámetros cinéticos de la enzima de microsomas rotos. Cuando se usó PPi como substrato (Tabla 4), los parámetros cinéticos de la G-6-Pasa tanto de microsomas intactos como rotos no fueron afectados por la presencia de QGR. Estos resultados sugieren fuertemente que QGR es un inhibidor competitivo del transportador T1 del sistema de la G-6-Pasa (12). La capacidad neoglucogénica de rebanadas de hígado de ratas ayunadas por 48 horas e incubadas en la ausencia (control) o presencia de 30 μ M QGR se muestra en la Fig. 6.

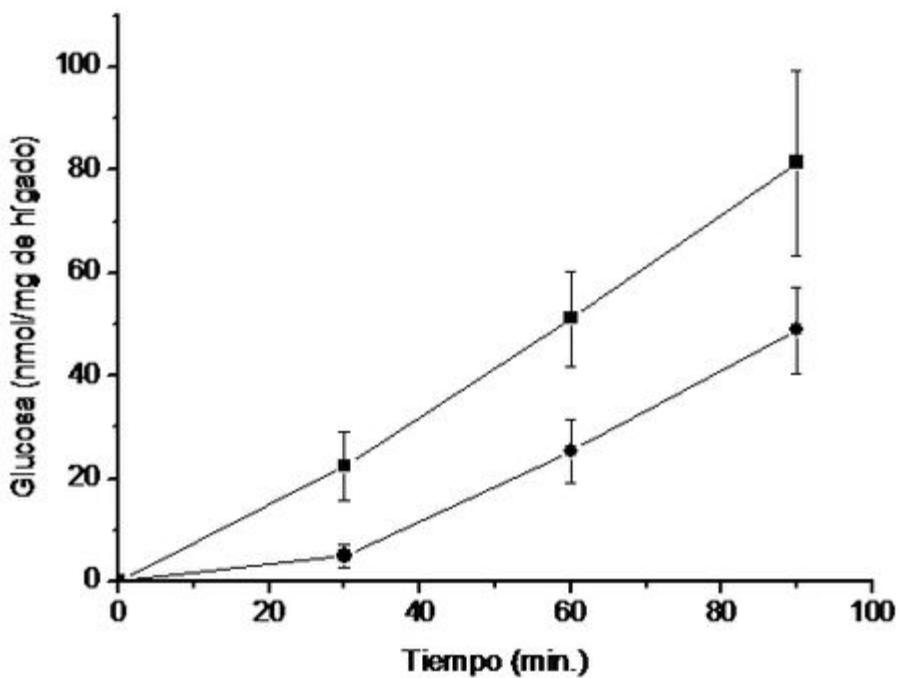


Figura 6. Efectos de la quercetina 3-O- α -(2"-galoil)-ramnosa sobre la neoglucogénesis hepática. Rebanadas de hígado de ratas ayunadas por 48 h. fueron incubadas en amortiguador Krebs-Ringer bicarbonato suplementado con albúmina bovina saturada con oleato y usando lactato como substrato neoglucogénico en la ausencia (■) o presencia de 30 μ M QGR (●). A los intervalos de tiempos indicados se tomó muestras del medio de incubación con la finalidad de estimar la glucosa producida por el método de glucosa oxidasa-peroxidasa (29). Los valores se expresan como nmol de glucosa producidos por mg de peso seco de hígado y corresponden al promedio de 6-9 experimentos \pm la desviación estándar. Todas las diferencias entre las rebanadas controles y tratadas con QGR fueron estadísticamente significativas a $p < 0.005$.

La producción de glucosa por las rebanadas controles fue prácticamente lineal y muy similar a lo reportado antes (9). QGR inhibió drásticamente la capacidad neoglucogénica de rebanadas de hígado de ratas a todos los tiempos estudiados: a 30 min. la inhibición fue de aproximadamente 85 %; cercana al 50 % a los 60 min. y de un 41 % a los 90 min. Aun cuando la inhibición de la capacidad neoglucogénica de las rebanadas de hígado por la presencia del flavonol en el medio de incubación parece disminuir con el tiempo de incubación, sin embargo una observación detallada de la Fig. 6 muestra que la pendiente de la línea que representa el efecto del flavonol, luego de los 20 min. iniciales, es 0.74 lo cual es considerablemente menor que 0.97 de la condición control.

EFFECTOS DE B. MEGALANDRA SOBRE LA GLUCOGENOLISIS HEPÁTICA

Como podemos observar en la Figura 7, al inyectar adrenalina intraperitonealmente (13), se incrementó la glicemia con un máximo de 82 % a los 60 min. La administración oral del

extracto de las hojas de *B. megalandra* 60 min. antes de la inyección de la catecolamina, redujo en aproximadamente un 50 % la elevación de la glicemia producida por el efecto de la adrenalina (14).

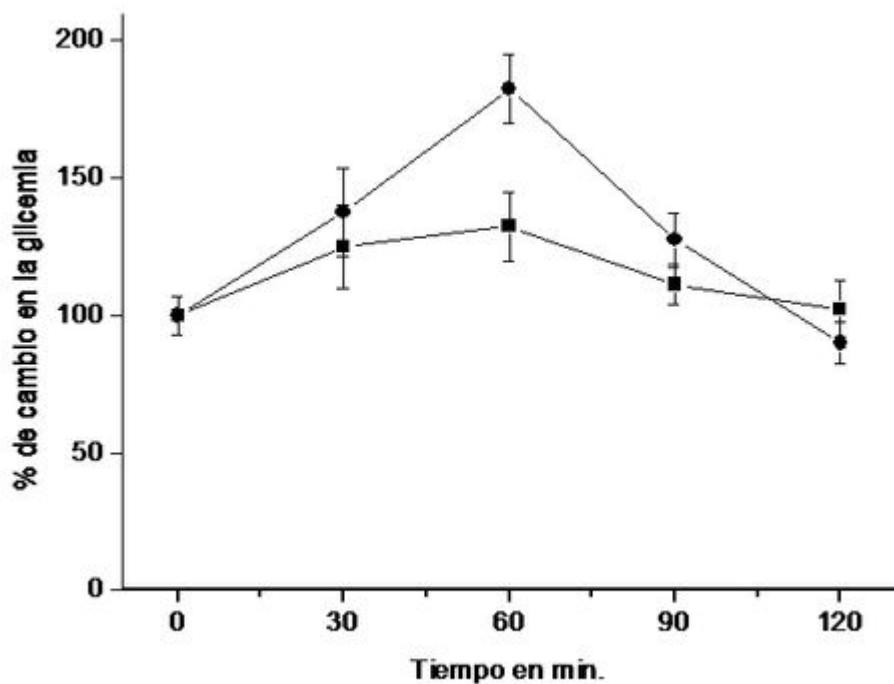


Figura 7. Efectos del extracto acuoso de las hojas de *B. megalandra* sobre la liberación de glucosa a la sangre estimulada por adrenalina. Ratas macho de la cepa Sprague Dawley fueron anestesiadas ligeramente (pentobarbital sódico 30 mg/Kg de peso) antes de administrarle por sonda gástrica agua (control ●) ó 3,44 mg/kg de peso del extracto de la planta (■). Luego de 1 h. a los animales se les inyectó por vía intraperitoneal 0,15 mg/Kg de peso de adrenalina y se midió la glicemia (29) cada 30 min. por 2 h. El 100 % representa el valor promedio de la glicemia de ratas alimentadas ($7,2 \pm 0,5$ mmol/L). Los valores representan el promedio \pm la desviación estándar de 5 " 6 experimentos y en cada uno de los cuales se uso 3 ratas. A los 60 min. la diferencia entre control y experimental fue estadísticamente significativa a $p < 0,001$.

Estos resultados son una evidencia indirecta de la absorción intestinal de alguno(os) compuesto(s) presentes en el extracto vegetal los cuales al alcanzar el hígado disminuyen la glucogenólisis por lo cual no se eleva la glicemia por efecto de la adrenalina. La presencia de adrenalina en el medio de incubación de rebanadas de hígado de ratas alimentadas, incrementa la liberación de glucosa en un 60 % y un 53 % a los 60 y 90 min de estudio respectivamente (Figura 8).

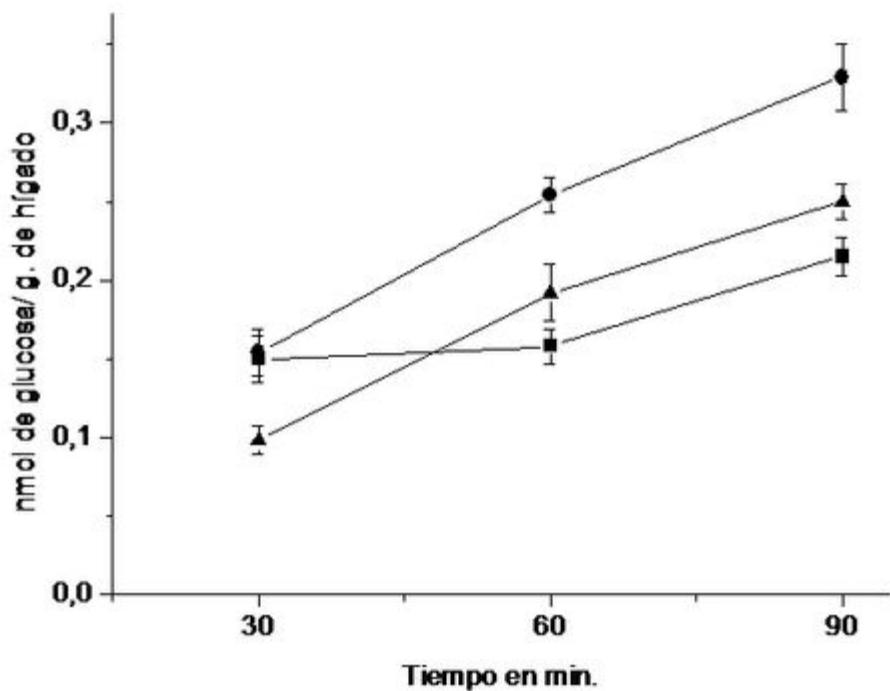


Figura 8. Efectos de la adrenalina y del extracto de las hoja de *B. megalandra* sobre la glucogenólisis hepática. Rebanadas de hígado de ratas fueron incubadas en amortiguador Krebs-Ringer bicarbonato a pH 7,4 en atmósfera de O₂/CO₂ 95/5 %, sin adición alguna para el control (■), o en la presencia de 2,4 ng de adrenalina (●), o la combinación de 2,4 ng de adrenalina y 13,8 mg del extracto de las hojas de *B. megalandra* (▲). A los tiempos indicados se determinó la glucosa en el medio de incubación por el método de glucosa oxidasa-peroxidasa (29). Los valores representan el promedio de 5 " 8 experimentos \pm la desviación estándar en cada uno de los cuales se utilizó 3 ratas. Las diferencias, a los 60 y 90 min., entre los valores obtenidos con adrenalina y los encontrados en los controles y con la mezcla, fueron estadísticamente significativas a $p < 0,001$.

Por el contrario la liberación de glucosa por las rebanadas de hígado en la presencia simultánea de adrenalina y del extracto vegetal, fue paralela y siempre significativamente menor a la producción de glucosa en presencia de adrenalina sola, mostrando 38; 25 y 24 % de inhibición a los 30; 60 y 90 min. respectivamente. Así mismo a los 30 min. de incubación, la presencia simultánea de adrenalina y el extracto de la planta reduce en un 38 % la producción de glucosa en relación al control (14). En la Figura 9 se muestra el efecto del dibutiril-AMPc sobre la producción de glucosa por rebanadas de hígado de rata (14); como puede observarse la presencia del nucleótido condicionó un incremento en la liberación de glucosa por las rebanadas de hígado a todos los tiempos estudiados, con un máximo a los 60 min.

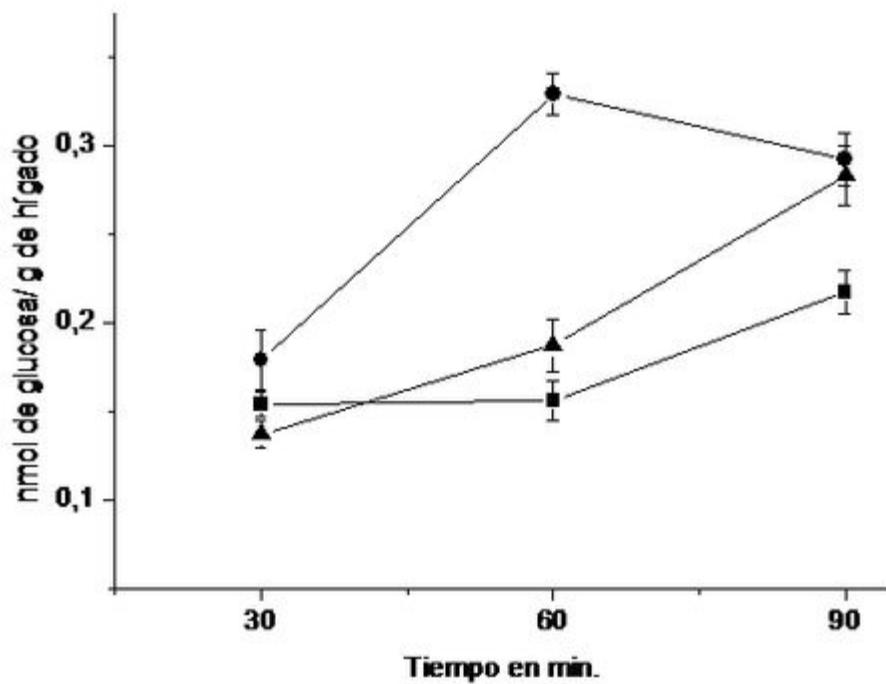


Figura 9. Efectos del dibutiril AMPc y del extracto de las hojas de *B. megalandra* sobre la glucogenólisis hepática. Rebanadas de hígado de ratas fueron incubadas en amortiguador Krebs-Ringer bicarbonato a pH 7,4 en atmósfera de O₂/CO₂ 95/5 %, sin adición alguna para el control (■), o en la presencia de 0,01 μM de dibutiril AMPc (●), o la combinación de 0,01 μM de dibutiril AMPc más 13,8 mg del extracto de las hojas de *B. megalandra* (▲). A los tiempos indicados se determinó la glucosa en el medio de incubación por el método de glucosa oxidasa-peroxidasa (29). Los valores representan el promedio de 5 " 8 experimentos ± la desviación estándar en cada uno de los cuales se utilizó 3 ratas. Las diferencias, a los 60 min., entre los valores obtenidos con dibutiril AMPc y los encontrados en los controles y con la mezcla, fueron estadísticamente significativas a $p < 0,001$.

La presencia simultánea del extracto acuoso de *B. megalandra* y dibutiril AMPc provocó una disminución del efecto del nucleótido la cual fue más marcada a los 60 min cuando se observó una reducción de un 43 %. Los resultados obtenidos en estas condiciones *ex vivo* (Figuras 8 y 9) evidencian que los compuestos presentes en las hojas de *B. megalandra* afectan un evento posterior a la producción del AMPc, probablemente la actividad de la G-6-Pasa. La única reacción que tienen en común las vías glucogenólisis y neoglucogénesis es la catalizada por la enzima G-6Pasa. En consecuencia el conjunto de resultados, presentados hasta ahora, sugieren fuertemente que los flavonoides presentes en las hojas de *B. megalandra* inhiben la G-6-Pasa lo cual se traduce en una reducción de la capacidad de aportar glucosa a la sangre por la glucogenólisis y la neoglucogénesis hepática. Dichos flavonoides pudieran ser útiles en el tratamiento de la diabetes no insulino dependiente ya que muestran un efecto antihiperglucemiante.

Efectos de *B. megalandra* sobre la absorción intestinal de glucosa.

Usando como modelo experimental segmentos intestinales aislados *in situ*, demostramos (15) que la absorción intestinal de glucosa es inhibida por el extracto acuoso de las hojas de la planta en una manera dependiente de la dosis (ver Figura 10).

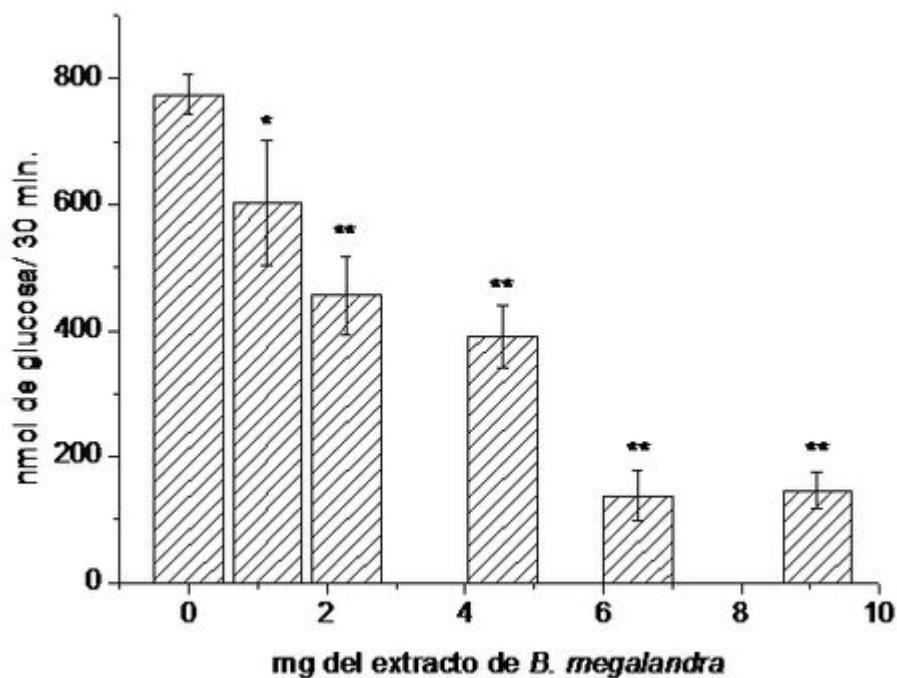


Figura 10. Efectos del extracto de *B. megalandra* sobre la absorción intestinal de glucosa. En segmentos intestinales *in situ* se inyectó 1 mL de 10 mM glucosa, 0,9 % NaCl solamente (0) o con la adición de cantidades crecientes del extracto de las hojas de *B. megalandra* (1,14; 2,28; 6,5 y 9,1 mg). A los 30 min se recuperó el líquido remanente y se cuantificó la glucosa absorbida utilizando el método de glucosa oxidasa-peroxidasa (29). Los valores corresponden al promedio de 8 experimentos \pm la desviación estándar. * significa $p<0,005$ y ** significa $p<0,0005$ de acuerdo a la prueba t de Student.

Al estar presente simultáneamente el extracto acuoso de *B. megalandra* y floricina, un conocido inhibidor de SGLT 1 (16), se observó un efecto inhibitorio aditivo lo cual sugiere que en la planta están presentes compuestos capaces de inhibir dicho transportador (ver Figura 11).

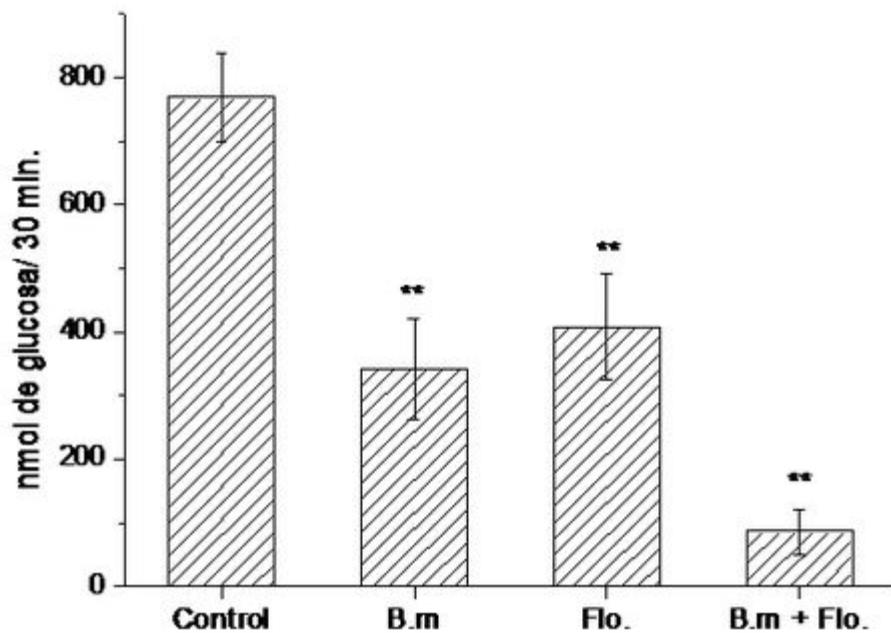


Figura 11. Efectos del extracto de *B. megalandra* y la floricina sobre la absorción intestinal de glucosa. En segmentos intestinales *in situ* se inyectó 1 mL de 10 mM glucosa, 0,9 % NaCl solamente (Control) o con la adición de 4,55 mg del extracto de las hojas de *B. megalandra* (B.m) ó 0,1 mM floricina (Flo.) ó 4,55 mg B.m. + 0,1 mM floricina (B.M. + Flo.). A los 30 min se recuperó el líquido remanente y se cuantificó la glucosa absorbida utilizando el método de glucosa oxidasa-peroxidasa (29). Los valores corresponden al promedio de 8 experimentos \pm la desviación estándar. ** significa $p < 0,0005$ de acuerdo a la prueba t de Student.

Al incubar vesículas de membrana apical de enterocitos en un medio externo con ^{14}C -glucosa y Na^+ comprobamos el típico comportamiento con un pico máximo de captación de glucosa a los 30 seg. para luego decaer (17). En presencia del extracto de la planta o de floricina se elimina el pico de captación, resultado que claramente indica que en el extracto de la planta existen compuestos capaces de inhibir el transportador SGLT 1, confirmando lo sugerido de acuerdo al experimento anterior (15). La inhibición de la absorción intestinal de glucosa por el extracto de ésta planta, afectando al SGLT 1, es similar al reportado para los polifenoles del té verde (18) y las isoflavonas de soya (19) pero diferente al ejercido por la acarbosa, la cual inhibe la digestión de los carbohidratos y no la absorción de los mismos (20). La administración simultánea, por vía oral, de glucosa y del extracto foliar condiciona una curva de tolerancia glucosada casi plana (Figura 13).

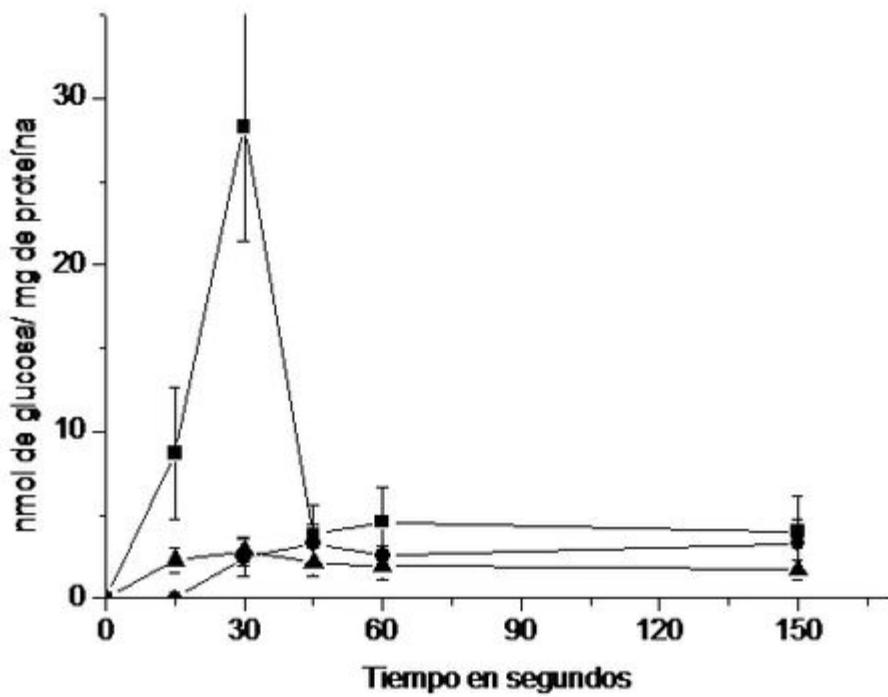


Figura 12. Efectos del extracto acuoso de las hojas de *B. megalandra* y de la floricina, sobre las captación de ^{14}C -glucosa por vesículas de borde apical de enterocito. Se midió la captación de ^{14}C -glucosa por vesículas de membrana apical de enterocito (17) por el método de filtración rápida (29) en la ausencia de adición alguna (-■-) o de la presencia de 4,55 mg del extracto de las hojas de *B. megalandra* (-▲-) o de 1 mM floricina (-●-). Los resultados se expresan como nmol de glucosa captados/ mg de proteínas de membrana y representan el promedio \pm la desviación estándar de 9 experimentos en los cuales se utilizó al menos 2 ratas.

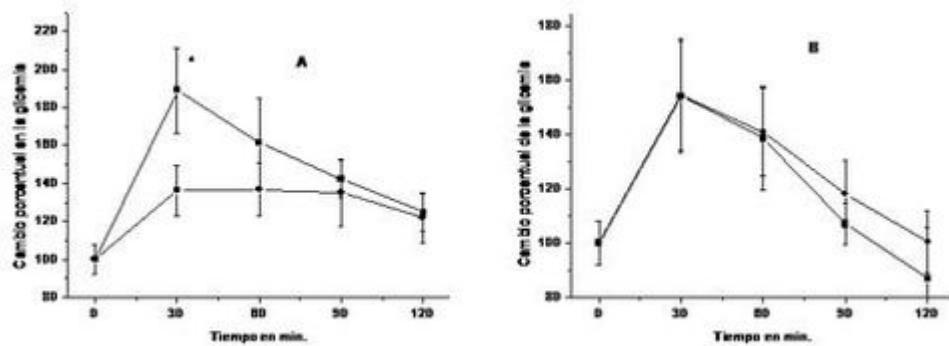


Figura 13. Efectos del extracto acuoso de las hojas de *B. megalandra* sobre la tolerancia glucosada. Las ratas recibieron 1 g de glucosa/ Kg de peso por vía oral (A) o por inyección subcutánea (B) junto con 263 mg del extracto de la planta (-●-) o un volumen equivalente de agua (-■-) por vía oral. A los tiempos indicados se determinó la glicemia (29), la cual al tiempo

cero fue 4.17 ± 0.52 mM; los valores se expresan en términos porcentuales del mismo y corresponden al promedio de siete experimentos \pm la desviación estándar. * diferencia estadísticamente significativa a $p < 0.005$.

Por el contrario, cuando la glucosa se administró subcutáneamente y el extracto vegetal por vía oral no se observó efecto alguno sobre la curva de tolerancia glucosada. Estos resultados muestran claramente que el extracto de la planta afecta la absorción intestinal de glucosa y no otros factores relacionados con la glicemia tales como la producción y/o liberación de insulina ni el consumo de glucosa por los tejidos (15). Estudiamos el efecto que los flavonoides: kanferol 3-O- α -ramnosa, queracetina 3-O- α -ramnosa y kanferol 3-O- α -(2" galool)-ramnosa, purificados antes por nosotros (10), ejercen sobre la absorción intestinal de glucosa, encontramos que solo el kanferol 3-O- α -ramnosa disminuyó de una manera apreciable (28 %), la absorción intestinal de glucosa (Figura 14). En relación a la estructura química y la actividad biológica vale la pena destacar: a) la presencia del grupo galoolo unido a la ramnosa anula la capacidad inhibitoria del kanferol 3-O- α -ramnosa sobre la absorción intestinal de glucosa; b) la ramnosa no es determinante para condicionar la actividad biológica, ya que esta presente en ambos flavonoides y solo uno de ellos inhibe la absorción intestinal de glucosa y c) la presencia de un H (kanferol) en lugar de un OH (queracetina) en la posición 3"TM del anillo B del flavonoide, es determinante para condicionar la inhibición de la absorción intestinal de glucosa. (21) Como se muestra en la Figura 14, la presencia conjunta de kanferol 3-O- α -ramnosa y floricina inhiben la absorción intestinal de glucosa (68 %) en más del doble del efecto de cualquiera de los dos compuestos solos (kanferol 3-O- α -ramnosa 28 % y floricina 25 %).

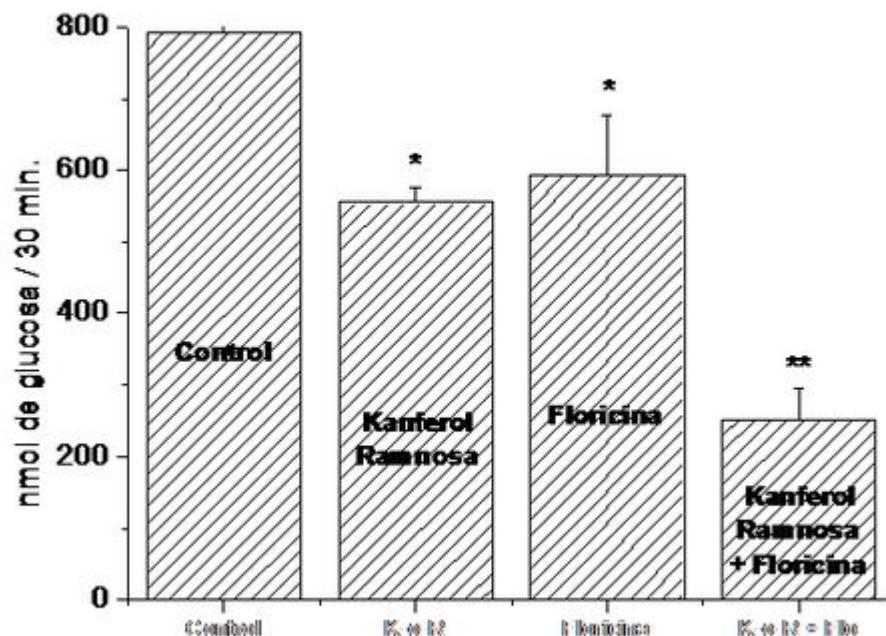


Figura 14. Efectos del kanferol 3-O- α -ramnosa y de la floricina sobre la absorción intestinal de glucosa. En segmentos intestinales aislados *in situ*, se inyectó 1 mL de NaCl 0,9 %, 10 mM

glucosa y DMSO 2 % para los controles y en los experimentales con la adición de: kanferol 3-O- α -ramnosa 5 mM o floricina 0,1 mM o kanferol 3-O- α -ramnosa 5 mM + floricina 0,1 mM. Después de 30 min la glucosa remanente en los segmentos intestinales fue medida por el método de glucosa oxidasa-peroxidasa (29) y la cantidad absorbida fue calculada por diferencia. Los valores corresponden al promedio \pm la desviación estándar de 3 experimentos. * significa $p < 0,05$; ** significa $p < 0,001$ de acuerdo al prueba t de Student.

Estos resultados son una clara evidencia del efecto sinérgico del kanferol 3-O- α -ramnosa y la floricina, un inhibidor conocido del SGLT 1 (16). En la Tabla 5 se muestran los valores cinéticos: K_M y V_{MAX} , de la absorción intestinal de glucosa en ausencia, control, y presencia de kanferol 3-O- α -ramnosa. Los valores controles son diferentes a los reportados por Ader y Col. (22) y por Li y Col. (23), al respecto es importante destacar que en ambos trabajos los parámetros cinéticos publicados corresponden a los del SGLT1 y en nuestro caso conciernen a todo el proceso de la absorción intestinal de glucosa. El kanferol 3-O- α -ramnosa se comporta como un inhibidor competitivo de la absorción intestinal de glucosa ya que incrementa el K_M con una disminución de la V_{MAX} no significativa estadísticamente (21). De los resultados anteriores podemos concluir que el kanferol 3-O- α -ramnosa es un inhibidor competitivo del SGLT 1. Utilizando extracciones con solventes de polaridad creciente y cromatografía en silice gel, purificamos parcialmente apigenina 8-glucósido, el cual inhibió la absorción intestinal de glucosa en una manera sinérgica con la floricina, lo cual sugiere que afecta al SGLT 1 (24). El uso de los flavonoides kanferol 3-O- α -ramnosa y apigenina 8-glúcosido pudiera ser útil en el tratamiento de la diabetes tipo II ya que disminuiría el aporte de glucosa a la sangre al reducir la absorción intestinal de misma, comportándose como antihiperglicemiantes.

Tabla 5. Efectos del kanferol 3-O- α -ramnosa sobre los parámetros cinéticos de la absorción intestinal de glucosa.

	K_M (mM)	V_{MAX} ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
Control	$38,93 \pm 4,92^*$	$42,33 \pm 5,02^{**}$
Experimentales	$67,24 \pm 11,12^*$	$50,04 \pm 4,59^{**}$

En segmentos intestinales *in situ* se inyectó 1 mL de NaCl 0,9 % y concentraciones crecientes de glucosa (12,5 – 50 mM) para los controles, y en los experimentales se adicionó kanferol 3-O- α -ramnosa 5 mM. Después de 15 min se estimó la cantidad de glucosa absorbida, y los valores de K_M y V_{MAX} fueron calculados a partir de las gráficas de Michaelis y Menten utilizando el programa Enzfitter. Los valores corresponden al promedio \pm la desviación estándar de 4 experimentos, * significa $p < 0,005$ y ** significa $p < 0,5$ de acuerdo a la prueba t de Student.

ABSORCIÓN INTESTINAL DE FLAVONOIDEOS DE *B. MEGALANDRA* Y METABOLISMO DE LOS MISMOS.

Para que los flavonoides, presentes en el extracto de la planta, ejerzan su actividad biológica

deben ser absorbidos a nivel intestinal, alcanzar la sangre y luego llegar a los tejidos blancos de dichas moléculas. Durante su permanencia en los organismos vivos, los flavonoides pueden ser modificados químicamente por la maquinaria enzimática de las células con las cuales entren en contacto. Hasta el momento hemos presentado evidencias indirectas, de la absorción intestinal de flavonoides como es el caso destacado en la Figura 7, experimento en el cual la administración oral del extracto de las hojas de *B. megalandra* antes de inyectar adrenalina por vía intraperitoneal reduce drásticamente la hiperglicemia condicionada por la catecolamina (14). Intentando obtener evidencias directas de la absorción intestinal de los flavonoides presentes en el extracto acuoso de las hojas de *B. megalandra*, analizamos la orina de ratas controles y de otras a las cuales se les administró durante una semana el extracto de la planta en lugar de agua. Usando fraccionamiento con varios solventes y cromatografías en silice gel, encontramos (25) en la orina de los animales que recibieron el extracto acuoso de las hojas de *B. megalandra*, la presencia de una mancha de color azul-grisáceo en las cromatografías de capa fina que no estaba presente ni en la orina de los controles ni en el extracto vegetal original, indicando la presencia de un metabolito de alguno de los compuestos, probablemente un flavonoide, presentes en las hojas de la planta. La estructura de ese compuesto se estableció, utilizando resonancia magnética nuclear de ¹H y ¹³C, como un benceno orto disustituido; sin embargo en el presente no tenemos información sobre el tipo de sustituyentes y en consecuencia tampoco sobre la posible vía metabólica involucrada (25) en la transformación del compuesto original. Este benceno orto disustituido es diferente a los ácidos fenólicos, que se han reportado (26) son eliminados por la orina de animales que ingieren flavonoides. En los animales así tratados encontramos una discreta disminución de la glicemia del 9 % y un incremento importante de la eliminación urinaria de glucosa, de aproximadamente unas 4 veces. El efecto hipoglicemiante está de acuerdo con lo reportado por otros investigadores para otras especies del género *bauhinia* (27,28) y la glucosuria pudiera ser interpretada como una evidencia indirecta de la absorción intestinal de los flavonoides los cuales por vía sanguínea alcanzan el riñón donde inhibirían los SGLT 1 condicionando glucosuria renal.

REFERENCIAS

1. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 1. Fourth Edition. WH. Freedman & Co. New York. 2005
2. Ashmore J, Weber G. The role of hepatic glucose-6-phosphatase in the regulation of carbohydrate metabolism. In *Vitamins and Hormones*, Harris RS, Morrison GF (eds). Academic Press: New York; 26: 91 " 132.
3. Arion WJ, Wallin BK, Lange AJ, Ballas LM. On the involvement of a glucose 6-phosphate transport system in the function of microsomal glucose 6-phosphatase. *Mol Cell Biochem* 1975; 6: 75 " 83.
4. Burchell A, Waddell ID. The molecular basis of the hepatic microsomal glucosa-6-

- phosphatase system. *Biochem Biophys Acta* 1991; 1092: 129-137.
5. Joost HG, Thorens B. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members. *Mol Membr Biol*. 2001; 18: 247 " 56.
 6. McCormack JG, Westergaard N, Kristiansen M, Brand CL, Lau J. Pharmacological approaches to inhibit endogenous glucose production as means of anti-diabetic therapy. *Curr Pharm Design*. 2001; 7: 1451 " 1474.
 7. Arion WJ, Ballas LM, Lange AJ, Tallin WK. Microsomal membrana permeability and the hepatic microsomal glucose-6-phosphatase system with D-mannose-6 phosphate. *J Biol Chem* 1976; 251: 4891 " 4897.
 8. Hoyos J. Flora Tropical Ornamental. Sociedad de Ciencias Naturales La Salle: Caracas Venezuela. 1978.
 9. González-Mujica F, Motta N, Becerra A. Inhibition of hepatic neoglucogenesis an glucose-6-phosphatase by aqueous extracto of *Bauhinia megalandra* leaves. *Phytother Res* 1998; 12: 291 " 293.
 10. Estrada O, Hasegawa M, González-Mujica F, Motta N, Perdomo E, Solórzano A, Méndez J, Méndez B, Zea EG. Evaluation of flavonoids from *B. megalandra* leaves as inhibitors of glucose-6-phosphatase system. *Phytother Res* 2005; 19: 859 " 863.
 11. Arion WJ, Lange AJ, Walls HE. Microsomal membrana integrity and the interaction of phlorizin with glucose-6-phosphatase system. *J boil. Chem.* 1980; 255: 10387 " 10395.
 12. González-Mujica F, Motta N, Estrada O, Perdomo E, Méndez J, Hasegawa M. Inhibition of hepatic neoglucogenesis and glucose-6-phosphatase by quercetin 3-O- α -(2"galloyl)-rhamnoside isolated from *Bauhinia megalandra* leaves. 2005; 19: 624 " 627.
 13. Cori C, Cori G. The mechanism of epinephrine action. i. the influence of epinephrine on the carbohydrate metabolism of fasting rats, with a note on new formation of carbohydrates. *J Biol Chem* 1928; 79: 309 " 319.
 14. Fernández-Peña C, González-Mujica F, Motta N, Tillett S. Efecto de extracto acuoso de hojas de *Bauhinia megalandra* sobre la glucogenólisis hepática en ratas. *Arch. Venez Farmacol. Ter.* 2008; 27: 129 " 131.
 15. González-Mujica F, Motta N, Márquez AH, Capote-Zulueta J. Effects of *Bauhinia megalandra* leaf aqueous extract on intestinal glucose absorption and uptake by enterocyte brush border membrana. *Fitoterapia* 2003; 74: 84 " 90.
 16. Panayotova-Heiermann M, Loo DDF, Wright M. Kinetics of steady-state currents and charge movements associated with the rat Na⁺/glucose cotransporter. *J Biol Chem*. 1995; 270: 27099 " 27105.
 17. Kessler M, Acuto O, Storelli C, Murer H, Muller M, Semenza G. A modified procedure for the rapid preparation of efficiently transporting vesicles from small intestinal brush

- border membranes. Their use in investigating some properties of D-glucose and choline transport systems. *Biochem Biophys Acta*. 1978; 506: 136 – 154.
18. Kobayashi Y, Suzuki M, Satsu H, Arai S, Hara Y, Suzulki K, et al. Green tea polyphenols inhibit the sodium-dependent glucose transporter of intestinal epithelial cells by a competitive mechanism. *J Agric Food Chem*. 2000; 48: 5618 – 5623.
19. Vedavanam K, Srijayanta S, O'Reilly J, Raman A, Wiseman H. Antioxidant action and potential antidiabetic properties of an isoflavonoid-containing soyabean phytochemical extract (SPE). *Phytother Res*. 1999; 13: 601 – 608.
20. Campbell LK, White JR, Campbell RK. Acarbose: its role in the treatment of diabetes mellitus. *Ann Pharmacother* 1996; 30: 1255 – 1262.
21. Rodriguez P. Identificación del compuesto presente en el extracto de *Bauhinia megalandra*, responsable de la inhibición de la absorción intestinal de glucosa. Trabajo especial de grado. Escuela de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. 2009.
22. Ader P, Blüllck M, Pietzsch S, Wolffram S. Interaction of quercetin glucosides with the intestinal sodium/glucose co-transporter (SGLT-1) *Cancer Letters* 2001; 162: 175 – 180.
23. Li JM, Che CT, Lau CBS, Leung PS, Cheng CHK. Inhibition of intestinal and renal Na^+ -glucose cotransporter by naringenin. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006; 38: 985 – 995.
24. Daubront V, González-Mujica F, Motta N, Rodríguez M, Hasegawa M. Purificación parcial de un compuesto presente en las hojas de *Bauhinia megalandra* capaz de inhibir la absorción intestinal de glucosa. *Arch. Venez. Farmacol. Ter.* 2009; 28: 40 – 42.
25. Coronil G. Absorción intestinal de flavonoides presentes en las hojas de *Bauhinia megalandra* y sus efectos sobre la eliminación urinaria de glucosa en ratas. Trabajo Especial de Grado. Escuela de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. 2009..
26. [Touriño S](#), [Fuguet E](#), [Vinardell MP](#), [Cascante M](#), [Torres JL](#). Phenolic metabolites of grape antioxidant dietary fiber in rat urine. *J Food Agric Chem*. 2009; 57: 11418 – 11426.
27. [da Cunha AM](#), [Menon S](#), [Menon R](#), [Couto AG](#), [Bürgger C](#), [Biavatti MW](#). Hypoglycemic activity of dried extracts of *Bauhinia forficata* Link. *Phytomedicine*. 2010; 17:37-41.
28. [Almeida ER](#), [Guedes MC](#), [Albuquerque JF](#), [Xavier H](#). Hypoglycemic effect of *Bauhinia cheilandra* in rats. *Fitoterapia*. 2006; 77: 276 - 278.
29. Hopfer U, Nelson K, Perrotto J, Isselbaccher KJ. Glucose transport in isolated brush border membrane from rat small intestine. *J. Biol. Chem*. 1973; 248: 25-32

