EMY LUIZA ISHII IWAMOTO

A Inibição do Transporte de Monossacarídeos no Fígado pelo Steviosídeo e seus Derivados

Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, visando a obtenção do Grau de Doutor em Ciências.

CURITIBA
1989

Dedico este trabalho à minha filha Juliana.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. ADELAR BRACHT, pela prestimosa assistência prestada durante a execução das experiências e pelo exemplo de ideal científico que contribuiu de modo marcante, na minha formação científica.

À professora Drª GLACI THEREZINHA ZANCAN, pelas sugestões, críticas e revisão deste trabalho.

Aos doutores ANDREAS J. SCHWAB e ADELAR BRACHT, pelas análises matemáticas dos experimentos de diluição de indicadores múltiplos.

Aos colegas ANA MARIA KELMER BRACHT, FUMIE SUZUKI KEMMELMEIER, MAURO ALVAREZ e CÉLIA GASPARETTO e demais professores do Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual de Maringá, pelo incentivo e colaboração na realização deste trabalho.

Ao pessoal técnico do Laboratório de Metabolismo Hepático, pelo auxílio prestado nos experimentos.

Aos meus familiares, pela compreensão e apoio a mim dedicados.

À Coordenação do Curso de Pós-graduação, professores do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná e à Universidade Estadual de Maringá pela oportunidade concedida para a realização da presente Tese.

SUMÁRIO

	DEDICATÓRIA	*iii*
	AGRADECIMENTOS	*iv*
	SUMÁRIO	*v*
	LISTA DE TABELAS	*viii*
	LISTA DE FIGURAS	*ix*
	LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	*xi*
	RESUMO	*xiv*
1	**INTRODUÇÃO**	1
1.1	CARACTERIZAÇÃO DA **Stevia rebaudiana** (BERT.) BERTONI	1
1.2	PRINCIPAIS CONSTITUINTES DOCES DA **Stevia rebaudiana**. O STEVIOSÍDEO E SEUS DERIVADOS	2
1.3	A **Stevia rebaudiana** NO BRASIL	7
1.4	A AÇÃO DOS PRODUTOS NATURAIS DA **Stevia rebaudiana** SOBRE SISTEMAS BIOLÓGICOS	8
1.4.1	Estudos toxicológicos	8
1.4.2	Efeitos fisiológicos e farmacológicos dos produtos naturais da **Stevia rebaudiana**	10
1.4.3	Efeitos bioquímicos dos produtos da **Stevia rebaudiana** em sistemas celulares e sub-celulares	14
1.5	ESTUDOS SOBRE O SISTEMA DE TRANSPORTE DE MONOSSACARÍDEOS NO FÍGADO	17

1.6 OBJETIVOS DESTE TRABALHO 20

2 **MATERIAIS E MÉTODOS** 22

2.1 PRODUTOS DA **Stevia rebaudiana** 22

2.2 ENZIMAS, COENZIMAS E OUTROS MATERIAIS 23

2.3 RADIOISÓTOPOS 23

2.4 ANIMAIS 23

2.5 O SISTEMA DE PERFUSÃO DO FÍGADO 24

2.5.1 O aparelho de perfusão 24

2.5.2 O líquido de perfusão 25

2.5.3 A técnica de perfusão do fígado de rato 25

2.5.4 Experimentos de diluição de indicadores múltiplos 27

2.5.5 Experimentos de recirculação do steviosídeo 28

2.6 ANALÍTICA 29

2.6.1 Determinação do consumo de oxigênio 29

2.6.2 Dosagens espectrofotométricas 29

2.6.3 Medidas de radioatividade 31

2.6.4 Análises cromatográficas 31

2.7 O MODELO MATEMÁTICO DO FÍGADO UTILIZADO NA OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS DE TRANSPORTE 32

2.7.1 Equações básicas para um único sinusóide 33

2.7.2 Solução da equação para um único sinusóide 35

2.7.3 O modelo para o órgão inteiro 37

2.8 TRATAMENTO DOS DADOS E CÁLCULOS 40

3 **RESULTADOS** 42

3.1 OS PERFIS DAS CURVAS DOS INDICADORES E DA D-GLUCOSE MARCADA NO FÍGADO DE RATO 42

3.2 PARÂMETROS DO TRANSPORTE DE D-GLUCOSE NO FÍGADO DE RATO 47

3.3 A CONCENTRAÇÃO INTRACELULAR DE D-GLUCOSE. EFEITO DO STEVIOSÍDEO E SEUS DERIVADOS 56
3.4 RELAÇÕES ENTRE A INIBIÇÃO DO TRANSPORTE DE GLUCOSE E O METABOLISMO 58
3.5 OS PERFIS DAS CURVAS DE D-FRUTOSE E INDICADORES. EFEITO DO STEVIOSÍDEO 63
3.6 A INIBIÇÃO DO TRANSPORTE DE FRUTOSE E AS CONSEQUÊNCIAS PARA O METABOLISMO 68
3.7 O EFEITO DO STEVIOSÍDEO SOBRE O METABOLISMO DA GALACTOSE 75
3.8 A QUESTÃO DA METABOLIZAÇÃO DO STEVIOSÍDEO NO FÍGADO 77
3.9 O ESPAÇO DE DISTRIBUIÇÃO DO STEVIOSÍDEO NO FÍGADO 84
4 **DISCUSSÃO E CONCLUSÃO** 89
4.1 PARÂMETROS DO TRANSPORTE DE D-GLUCOSE NO FÍGADO PERFUNDIDO 89
4.2 O TRANSPORTE E O METABOLISMO DA D-GLUCOSE NO FÍGADO 91
4.3 A CONCENTRAÇÃO INTRACELULAR DE D-GLUCOSE 92
4.4 OS PRODUTOS NATURAIS DA **Stevia rebaudiana** COMO INIBIDORES DO SISTEMA DE TRANSPORTE PARA MONOSSACARÍDEOS NO FÍGADO 99
4.5 A INIBIÇÃO DO METABOLISMO DA D-FRUTOSE E DA D-GALACTOSE PELO STEVIOSÍDEO 101
4.6 EFEITOS METABÓLICOS DOS PRODUTOS DA **Stevia rebaudiana** E A INIBIÇÃO DO TRANSPORTE DE AÇÚCARES 105
5 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** 107

LISTA DE TABELAS

1 Composição da solução salina KREBS/HENSELEIT-bicarbonato 25

2 Parâmetros do transporte de glucose através da membrana celular no fígado de rato perfundido isoladamente e os efeitos do isosteviol, do steviolbiosídeo e do steviosídeo 51

3 Dependência do transporte da D-glucose da concentração da D-glucose: efeito do steviosídeo 2,5 mM 53

4 Concentrações de D-glucose para metade da velocidade máxima de influxo (K_m) e velocidades máximas de influxo (V_{max}) na ausência (controle) e na presença de steviosídeo 2,5 mM 55

LISTA DE FIGURAS

1 Fórmulas estruturais do steviol e do isosteviol 3

2 Fórmulas estruturais do steviosídeo, do rebaudiosídeo A, do steviolbiosídeo e do rebaudiosídeo B 4

3 Estereoestrutura do steviosídeo 5

4 O perfil das curvas do [^{32}P]fosfato, da [^{14}C]sacarose e da [^{3}H]-água 44

5 Perfis das curvas da D-[1-^{14}C]glucose e indicadores: efeito do steviosídeo e do isosteviol 45

6 Perfis das curvas do [^{32}P]fosfato, da [^{3}H]água e da curva transformada da [^{3}H]água 48

7 Curvas experimentais e calculadas da D-[1-^{14}C]glucose 49

8 Efeito do steviosídeo sobre os fluxos metabólicos do fígado de rato perfundido isoladamente 59

9 Efeito do steviosídeo sobre a liberação de glucose pelo fígado de rato perfundido isoladamente 60

10 Perfis das curvas da D-frutose e de indicadores: efeito do steviosídeo 65

11 Curvas teórica e experimental de D-frutose 66

12 Efeito do steviosídeo sobre o metabolismo da D-frutose em fígado de rato perfundido isoladamente 69

13 Efeito do steviosídeo sobre o metabolismo da frutose: dependência da concentração 70

14 Curvas dose-resposta das variações causadas pelo steviosídeo no consumo de D-frutose e na produção de D-glucose e de L-lactato + piruvato no fígado de rato perfundido isoladamente 72

15 Dependência das taxas de produção de L-lactato + piruvato e de produção de D-glucose da concentração arterial de D-frutose: efeito do steviosídeo 73

16 Efeito do steviosídeo sobre a liberação de glucose formada a partir de galactose 76

17 Recirculação do steviosídeo, do paracetamol e da [^{131}I]albumina em fígado de rato perfundido isoladamente 79

18 Recirculação do steviosídeo em fígado de rato perfundido isoladamente 81

19 Cromatografia em camada delgada de alíquotas do extrato etéreo do perfusado recirculante e de padrões de steviosídeo, glucosil-steviol, steviolbiosídeo e steviol 82

20 Perfis das curvas do steviosídeo, [^{32}P]fosfato e [^{3}H]água 86

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A	- Volume do espaço sinusoidal
ATP	- Adenosina 5'-trifosfato
B	- Volume do espaço de Disse
C_a	- Concentração arterial de oxigênio
C_e	- Concentração da substância no espaço extracelular
C_i	- Concentração da substância no espaço intracelular
C_v	- Concentração venosa de oxigênio
dC_i/dt	- Taxa de variação da concentração intracelular em função de t
$\partial/\partial t, \partial/\partial x$	- Derivada parcial em relação a t ou a x
$\delta(t)$	- Função impulso de t
ε	- Coeficiente de extinção
exp(t)	- Função exponencial de t
F	- Fluxo total através do fígado (volume/tempo)
F_g	- Taxa de liberação de glucose
F_{O_2}	- Velocidade de respiração
F_s	- Fluxo no sinusóide (volume/tempo)
$f(\tau)$	- Distribuição de frequência do tempo de trânsito pelos sinusóides
$f(\tau)d\tau$	- Fração de sinusóides com um tempo de trânsito entre τ e $\tau + d\tau$
GTT	- Teste de tolerância à glucose

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Performance

∞ - Infinito

k_1 - Constante de velocidade de transporte de V_e para V_i

k_2 - Constante de velocidade de transporte de V_l para V_e

k_3 - Constante de velocidade para a metabolização

K_m - Constante de Michaelis-Menten

L - Comprimento dos sinusóides

n! - Fatorial de n

NAD^+ - Nicotinamida adenina dinucleotídeo forma oxidada

NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo forma reduzida

$NADP^+$ - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato forma oxidada

P - Peso úmido do fígado

POPOP - 2,2' p-fenileno-bis-(5-feniloxazol)

PPO - 2,5-difeniloxazol

q - Quantidade de substância marcada injetada no órgão

q_s - Quantidade de substância marcada que atinge o sinusóide

Q(t) - Fração da substância injetada que aparece no perfusado efluente por unidade de tempo

Q'(t) - Quantidade de substância que deixa o órgão por unidade de tempo

S(t) - Função etapa de t

t - Tempo

$\bar{t}$ - Tempo médio de trânsito da substância marcada

t_0 - Tempo de trânsito nos grandes vasos

τ - Tempo de trânsito pelo sinusóide

θ' - V_i/V_e

$u(x,t)$ - Concentração da substância marcada no sinusóide ao tempo t e na posição x

$v(x,t)$ - Concentração da substância marcada no espaço de Disse ao tempo t e na posição x

V_e - Volume extracelular (A + B)

V_i - Volume intracelular

V_{in} - Velocidade de influxo unidirecional

V_{max} - Velocidade máxima de transporte

W - Velocidade de deslocamento ao longo do sinusóide (espaço/tempo)

W' - $W/(1 + B/A)$

x - Posição ao longo do sinusóide

$z(x,t)$ - Concentração da substância marcada no espaço intracelular ao tempo t e na posição x

RESUMO

Um estudo do efeito do steviosídeo e seus derivados sobre o transporte de monossacarídeos no fígado foi realizado. O transporte foi avaliado no fígado de rato perfundido isoladamente, pela técnica da diluição de indicadores múltiplos com análise matemática, de acordo com o modelo proposto por GORESKY **et al.** (1973). A distribuição da D-glucose no espaço intra- e extracelular, em condições de equilíbrio (**steady-state**), e as relações entre o transporte e a metabolismo das hexoses foram também investigadas. O K_m encontrado para o transporte da D-glucose (troca de estado estacionário) no fígado foi de 38,9 ± 12 mM e a V_{max} de 388 ± 61 µmol. min^{-1} . g^{-1}. A razão entre as concentrações intra- e extracelular de D-glucose, nas mesmas condições, variou entre 0,6 e 0,7. Os produtos da **Stevia rebaudiana** inibiram o transporte de monossacarídeos. Dos compostos testados, o isosteviol foi o mais ativo, seguido pelo steviosídeo, sendo o steviolbiosídeo, o menos potente. O steviosídeo afetou tanto o K_m quanto a V_{max} do transporte da D-glucose, indicando uma inibição do tipo misto. Em baixas concentrações de D-glucose no perfusado, os produtos da **Stevia rebaudiana** testados, afetaram a razão C_i/C_e, em função da inibição sobre o transporte. Por outro lado, na faixa de concentração entre 10 e 100 mM, o steviosídeo não modificou a razão C_i/C_e. Isto foi consequência do fato de que o fluxo metabólico, nessas concentrações, é muito pequeno em comparação com os altos fluxos unidirecionais através da membrana. Em função da inibição sobre o transporte, o metabolismo de hexoses como a D-frutose e a D-galactose no fígado foi inibido pelo steviosídeo. O mesmo não foi observado com respeito ao metabolismo da D-glucose. Nas condições experimentais utilizadas no presente trabalho, o steviosídeo não parece ser hidrolisado em quantidades significativas pelo fígado. Derivados como o steviol, o glucosil-steviol e o steviolbiosídeo não foram identificados após recirculação do steviosídeo por períodos de até duas horas. O espaço de distribuição do steviosídeo, avaliado pela técnica da diluição de indicadores múltiplos, foi estimado em cerca de 5 a 6% do espaço celular total do fígado. O acesso do steviosídeo ao espaço aquoso celular não é livre, em uma simples passagem. Destes dados, pode-se concluir que o efeito do steviosídeo sobre o carreador de monossacarídeos é exercido do lado externo da membrana plasmática.

1. INTRODUÇÃO

1.1. CARACTERIZAÇÃO DA **Stevia rebaudiana** (BERT.) BERTONI

A **Stevia rebaudiana** (Bert.) Bertoni é uma erva da família das compostas (BERTONI, 1905; SCHMELING, 1967; ANGELUCCI, 1979), nativa da região de Amambaí, divisa do Paraguai e sul do Mato Grosso. A planta tem como característica principal o intenso sabor adocicado de suas folhas e de seu extrato aquoso. Esta propriedade se deve a um grupo de substâncias estruturalmente relacionadas, de natureza glicosídica.

Embora as propriedades edulcorantes da **Stevia rebaudiana** sejam conhecidas já há alguns séculos, existindo relatos de que várias tribos indígenas do Paraguai a utilizavam mesmo antes da colonização pelos espanhóis no século XVI (SAMANIEGO, 1946), somente com a introdução da planta no Japão por SUMIDA (1973) em 1970, é que os derivados da **Stevia rebaudiana** passaram a ser considerados seriamente como substitutos potenciais da sacarose, sacarina e outros adoçantes. Desde então, vários aspectos do cultivo, da química, dos efeitos biológicos, da toxicidade, da comercialização e da utilização dos produtos da **Stevia rebaudiana** têm sido investigados (SOEJARTO, 1986; ALVAREZ,

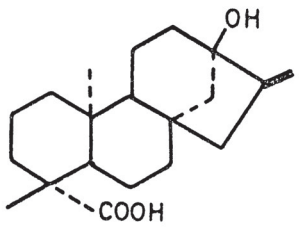
1984).

Atualmente, os extratos purificados da **Stevia rebaudiana** se encontram disponíveis comercialmente em países como o Japão (ISHIMA **et al.**, 1978) e, mais recentemente, no Brasil, onde são consumidos como agentes edulcorantes em diversos alimentos.

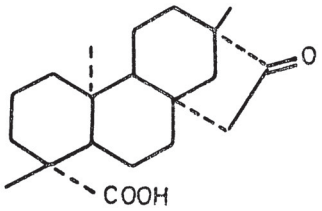
1.2. PRINCIPAIS CONSTITUINTES DOCES DA **Stevia rebaudiana**. O STEVIOSÍDEO E SEUS DERIVADOS.

O steviosídeo, o primeiro constituinte doce da **Stevia rebaudiana** a ser isolado e caracterizado (BRIDEL & LAVIEILLE, 1931), é um glicosídeo resultante da ligação de três moléculas de glucose a uma aglucona, o steviol. O steviol, por sua vez, é um álcool carboxílico diterpênico (DOLDER **et al.**, 1960; MOSETTIG & NESS, 1955) cuja estrutura está mostrada na figura 1. Na molécula do steviosídeo (figura 2), um dos resíduos glicídicos está ligado por ligação ester à carboxila da aglucona. As outras duas unidades glicídicas, unidas entre si por ligação $\beta(1 \rightarrow 2)$ (resíduo de soforose), estão ligadas à hidroxila da aglucona por ligação glicosídica. Como todas as ligações são do tipo β (TANAKA, 1980), o steviosídeo apresenta a estereoestrutura representada na figura 3. A figura 1 mostra, ainda, a estrutura do isosteviol, a aglucona resultante da hidrólise ácida do steviosídeo (BRIDEL & LAVIEILLE, 1931; MOSETTIG & NES, 1955).

Tal como o steviosídeo, todos os outros glicosídeos da **Stevia rebaudiana** possuem em sua estrutura o steviol. Eles diferem entre si pelo número, tipo (glucose ou ramnose) e posi-

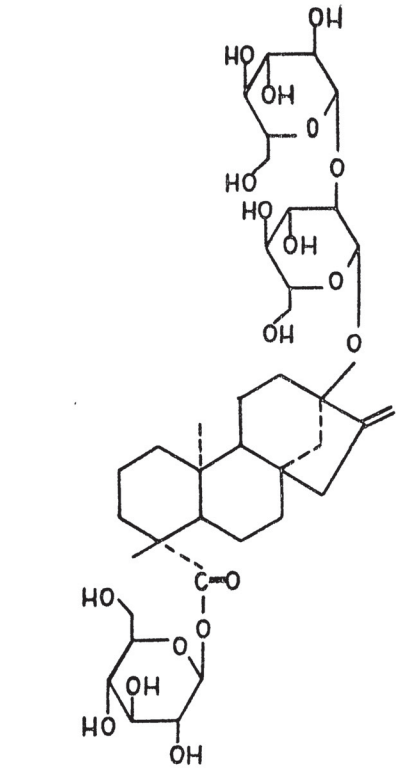


Steviol

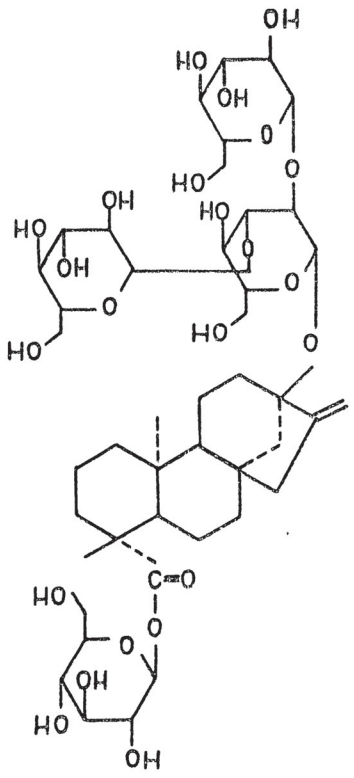


Isosteviol

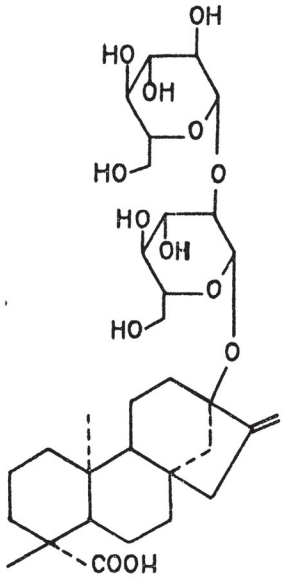
Figura 1. **Fórmulas estruturais do steviol e do isosteviol** (MOSETTIG & NES, 1955).



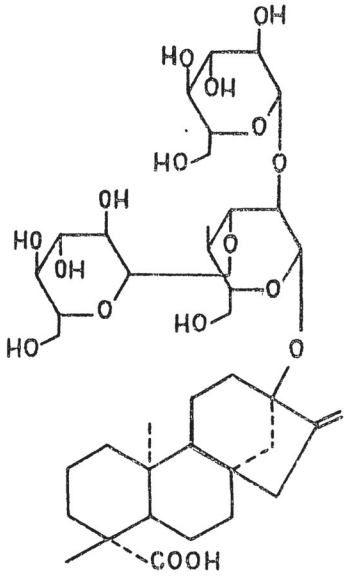
Steviosídeo



Rebaudiosídeo A



Steviolbiosídeo



Rebaudiosídeo B

Figura 2. **Fórmulas estruturais do steviosídeo, do rebaudiosídeo A, do steviolbiosídeo e do rebaudiosídeo B.**

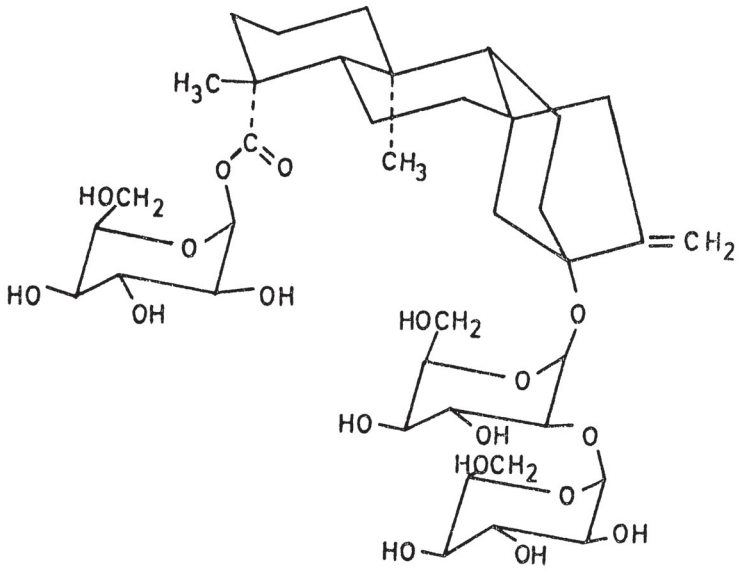


Figura 3. **Estereoestrutura do steviosídeo** (TANAKA, 1980).

ção dos resíduos glicídicos. Duas classes podem ser distinguidas. A primeira delas inclui os glicosídeos que possuem o grupo carboxílico da aglucona esterificado. O steviosídeo e a maioria dos glicosídeos naturalmente existentes fazem parte deste grupo. O steviosídeo e o rebaudiosídeo A (KOHDA **et al.**, 1976) são os mais abundantes. Eles perfazem cerca de 5 e 2% do peso seco das folhas, respectivamente. O rebaudiosídeo A possui uma molécula adicional de glucose, ligada ao resíduo soforil (figura 2).

Encontrados em menor proporção (menos que 0,05% do peso seco das folhas [TANAKA, 1980]), os dulcosídeos A e B (KOBAYASHI **et al.**, 1977) e os rebaudiosídeos D e E (SAKAMOTO **et al.**, 1977) são análogos estruturais do steviosídeo e do rebaudiosídeo A, respectivamente. Os primeiros possuem uma molécula adicional de glucose em ligação $\beta(1 \rightarrow 2)$ com a molécula de glucose que esterifica o grupo carboxílico. Os dois últimos diferem do rebaudiosídeo A por possuírem um grupo α-ramnopiranosil-(1,2)β-glucopiranosil ligado à aglucona no lugar do grupo soforil.

A segunda classe de glicosídeos inclui aqueles que possuem o grupo carboxílico livre, como o steviolbiosídeo (WOOD & FLETCHER, 1956) e o rebaudiosídeo B (KOHDA **et al.**, 1976). Como pode ser visto na figura 2, estes glicosídeos possuem estrutura semelhante à do steviosídeo e à do rebaudiosídeo A, respectivamente, diferindo apenas por não possuírem uma das moléculas de glucose, justamente aquela que esterifica o grupo carboxila da aglucona.

Todos os glicosídeos presentes naturalmente nas folhas da **Stevia rebaudiana** possuem algum poder adoçante. Aqueles que

perfazem a maior fração em peso das folhas secas e que são passíveis de extração e purificação com propósitos comerciais — o steviosídeo e o rebaudiosídeo A — foram caracterizados como sendo 300 e 400 vezes mais doces do que a sacarose, respectivamente (ISHIMA **et al.**, 1978).

1.3. A **Stevia rebaudiana** NO BRASIL.

Não obstante estar aqui boa parte da zona nativa da planta, somente em meados da década de 60 é que a **Stevia rebaudiana** despertou o interesse de pesquisadores brasileiros. ZELNICK (1964), foi o primeiro a extrair com sucesso o steviosídeo no Brasil, depositando o primeiro pedido de patente sobre a **Stevia rebaudiana** de que se tem notícia no mundo.

Estudos pioneiros da ação do steviosídeo e do extrato aquoso da planta sobre sistemas biológicos foram realizados por SCHMELING **et al.** (1977) e vários trabalhos na área de botânica foram desenvolvidos a partir de 1970 (FELIPE **et al.**, 1971; RANDI & FELIPE, 1981; METIVIER & VIANA, 1979; MONTEIRO, 1980).

Em 1979, representando um marco na pesquisa sobre a **Stevia rebaudiana** no Brasil, ANGELUCCI publicou sua tese de doutoramento, relatando pesquisas sobre processos de extração, processos analíticos e processos de aplicação dos princípios doces.

O domínio da tecnologia para a exploração racional dos derivados da **Stevia rebaudiana** no Brasil começou com a introdução da planta na Universidade Estadual de Maringá em 1979 (ALVAREZ, 1984). Foram realizados estudos agronômicos, estudos

sobre processos de extração dos princípios doces e estudos bioquímico farmacológicos (ALVAREZ, 1984; KELMER-BRACHT **et al.**, 1985). A tecnologia desenvolvida por pesquisadores da Universidade Estadual de Maringá resultou, recentemente, na introdução de produtos da **Stevia rebaudiana** no mercado como adoçantes e como aditivos em diversos alimentos.

1.4. A AÇÃO DOS PRODUTOS NATURAIS DA **Stevia rebaudiana** SOBRE SISTEMAS BIOLÓGICOS

1.4.1. Estudos toxicológicos

Paralelamente aos estudos visando o uso dos produtos da **Stevia rebaudiana** como edulcorantes, vários estudos de toxicidade aguda, sub-aguda e crônica foram desenvolvidos. Dentre estes, destacam-se os trabalhos de AKASHI & YOKOYAMA (1975) e de MITSUHASHI **et al.** (1976). Esses autores não detectaram efeitos significativos do steviosídeo ou dos extratos semi-purificados da **Stevia rebaudiana** sobre vários parâmetros, tais como peso corporal, aspectos dos órgãos, parâmetros hematológicos, bioquímicos, de urinálise e parâmetros histopatológicos.

Se por um lado esses estudos atestam uma baixa toxicidade para os glicosídeos, são poucos os dados acerca da toxicidade dos seus prováveis produtos de metabolização. O steviol, a aglucona dos glicosídeos, quando metabolicamente ativada, revelou ser mutagênica sobre cepas de **Salmonella typhimurium** (PEZZUTO **et al.**, 1985). Foi também demonstrada por DORFMAN & NESS (1960) uma ação anti-androgênica do steviol sobre pinta-

inhos machos.

Apesar do steviol em forma livre não se apresentar em quantidades detectáveis nas folhas da **Stevia rebaudiana**, os efeitos acima relatados são importantes pois o composto pode ser liberado dos glicosídeos naturais em consequência de hidrólise ou outro tipo de metabolização. Em ratos, como demonstrado por WINGARD **et al.** (1980), o steviosídeo e o rebaudiosídeo A são ambos degradados a steviol pela microflora intestinal da região cecal **in vitro.** Os mesmos autores observaram que o steviol, quando ministrado por via oral ou intracecal a ratos, é completamente absorvido, sendo excretado posteriormente através dos dutos biliares. Isto pressupõe o acesso da aglucona ao fígado do animal.

Um estudo mais detalhado sobre a absorção, distribuição, metabolismo e excreção do steviosídeo em ratos foi conduzido por NAKAYAMA **et al.** (1986). Utilizando steviosídeo marcado com trício, foi observado que muito pouco steviosídeo é absorvido ou hidrolizado no estômago e na parte alta do intestino. Uma pequena fração é eliminada de forma inalterada nas fezes. A maior parte, no entanto, é transformada em steviolbiosídeo e steviol na região cecal. Ao menos o steviol é absorvido e secretado posteriormente na bile sob forma de metabólitos não identificados. Estes resultados confirmam as observações anteriores de WINGARD **et al.** (1980).

Não estão disponíveis atualmente dados sobre a forma de eliminação dos glicosídeos em humanos após a ingestão por via oral. Também não existem informações quanto à possibilidade de metabolização desses compostos pela flora microbiana intestinal de humanos.

Essas observações levam à necessidade de se investigar não apenas a influência dos glicosídeos naturais sobre os sistemas biológicos, mas também a influência dos seus derivados.

1.4.2. Efeitos fisiológicos e farmacológicos dos produtos naturais da **Stevia rebaudiana**

A par das reconhecidas qualidades organolépticas, a **Stevia rebaudiana** tem despertado também grande interesse em função das propriedades medicinais a ela atribuídas. Antigos relatos (SAMANIEGO, 1946) dão conta de que várias tribos indígenas do Paraguai e do Mato Grosso utilizavam o chá de folhas de **Stevia rebaudiana** como tônico digestivo e que as mulheres consumiam o decocto das folhas com própositos anticonceptivos (PLANAS & KUÉ, 1968). A difusão da planta na medicina popular do Paraguai se intensificou mais ainda com os relatos de que exercia efeito hipoglicemiante em humanos (MIGUEL, 1966). Assim, mesmo sem bases científicas seguras a **Stevia rebaudiana** passou a ser encarada como uma planta medicinal e usada empiricamente como um remédio para o tratamento de diabetes e como agente anticonceptivo.

Além desses efeitos, existem relatos de que os produtos naturais da planta ou seus derivados exercem os seguintes efeitos sobre organismos de mamíferos: efeito sobre o sistema cardiovascular (BOECKH, 1986; MACHADO **et al.**, 1986; CHAGAS **et al.**, 1986; COPETTI **et al.**, 1986); efeito anticariogênico (YABU **et al.**, 1977; OLIVEIRA & PINHEIRO, 1986); efeito sobre a musculatura lisa (TURRIN, 1981); efeito sobre a função renal (SAINATI **et al.**, 1986).

A maior parte dos efeitos acima citados foram descritos na forma de resumos. A ação anticoncepcional (PLANAS e KÜÉ, 1968) e hipoglicemiante (MIGUEL, 1966) mereceram posteriormente a atenção de maior número de pesquisadores.

A ação anticoncepcional não foi confirmada por vários autores (FARNSWORTH, 1973; AKASHI & YOKOYAMA, 1975; MORI **et al.**, 1981; FUJITA & EDAHIRO, 1979). Quanto ao efeito hipoglicemiante, os resultados obtidos por diferentes pesquisadores são controversos. Enquanto alguns autores verificaram modificações nos níveis glicêmicos em animais ou humanos, outros não detectaram efeitos significativos.

MIGUEL (1966), o primeiro a atribuir uma propriedade hipoglicemiante à **Stevia rebaudiana,** observou melhora em pacientes diabéticos,após tratamento com extrato aquoso total dessecado das folhas (800 mg/dia). Não detectou porém alterações nos níveis glicêmicos de pacientes tratados com steviosídeo puro.

Trabalhando com coelhos aloxanizados, von SCHMELING **et al.**, (1977) observaram decréscimos transitórios na glicemia de animais tratados com extrato aquoso total (12 mg/kg de peso), porém,nenhum efeito em coelhos normais. Tal como evidenciado por MIGUEL (1966), a ação mais efetiva foi detectada em condições de maior hiperglicemia. Não obstante essas observações, OVIEDO (1971) relata uma ação hipoglicemiante em adultos normais, após a ingestão do extrato aquoso total, não especificando o autor a dose utilizada.

Um aumento na tolerância à glucose em indivíduos normais foi demonstrado por CURI **et al.** (1986). Os autores realizaram testes de tolerância à glucose (GTT) antes e após a in-

gestão de um extrato aquoso total da planta (250 mg de folhas extraídas a cada 6 horas por 6 dias), constatando sensível aumento na tolerância à glucose. A ação foi mais elevada quando os níveis glicêmicos decorrentes da ingestão de glucose eram mais elevados. Resultados semelhantes em ratos normais foram observados por UEDA **et al.** (1983).

Por outro lado, nenhuma alteração da tolerância à glucose de pessoas normais foi detectada por BOECK & HUMBOLDT (1978), ressaltando-se o fato de que doses menores de extrato aquoso foram ministradas (200 mg de folhas extraídas por dia durante 4 semanas). Trabalhando com ratos aloxanizados, PINHEIRO (1982), bem como KELMER-BRACHT **et al.** (1983) também não observaram nenhuma modificação na glicemia, seja por ação do steviosídeo puro, seja por ação do extrato total das folhas da planta.

Ratos normais tratados por longos períodos (56 dias) com extrato aquoso total (7% da ração) não tiveram seus níveis glicêmicos alterados, como demonstraram AKASHI & YOKOYAMA (1975). Também nenhuma modificação significativa foi observada por SUZUKI **et al.** (1977) ao alimentar ratos com dieta rica em carboidratos ou gorduras, acrescidos de 0,1% de steviosídeo ou 10% de folhas secas de **Stevia rebaudiana.**

Em face dos dados apresentados pelos diferentes autores, não se pode concluir de modo incondicional a favor da potencialidade hipoglicemiante dos produtos naturais da **Stevia rebaudiana.** No entanto, as divergências nos resultados observados podem ser, em parte ao menos, consequência dos diferentes modelos e procedimentos experimentais utilizados pelos autores.

Uma análise do conjunto dos dados disponíveis revela

alguns pontos em comum. Respostas positivas foram detectadas em determinadas condições experimentais. Por exemplo, em animais com níveis glicêmicos normais em geral nenhum efeito foi observado. Em condições de alta glicemia — humanos com diabetes ou animais aloxanizados, humanos ou animais normais durante o teste de tolerância à glucose — o efeito hipoglicemiante era detectável. Em suma, parece existir uma relação entre o efeito e a condição metabólica do organismo. Isto justifica, em parte, a variabilidade das respostas.

Neste contexto, é possível que a ação hipoglicemiante ou mais precisamente, a ação antihiperglicemiante da **Stevia rebaudiana** seja decorrente de alterações complexas na bioquímica de carboidratos. Além das vias metabólicas, pode haver efeitos também sobre os processos de absorção e transporte através da membrana celular. Uma combinação de efeitos pode resultar em respostas fisiológicas complexas e em estrita dependência do estado metabólico do animal.

Isto é revelado por trabalhos como os de SUZUKI **et al.**, (1977). Os autores analizaram não somente a influência dos derivados da **Stevia rebaudiana** sobre a glicemia, mas também sobre os níveis de glicogênio hepático de ratos submetidos a diferentes dietas. Ratos alimentados com uma dieta rica em carboidratos (64%), contendo 10% de folhas secas da planta (0,5% de steviosídeo) após 4 semanas, apresentaram pequenos decréscimos nos níveis glicêmicos e reduções significativas no glicogênio hepático. Mesmo o steviosídeo, que não possui efeito hipoglicemiante detectável, também levou a decréscimos no teor de glicogênio quando acrescido à ração (0,1%). Por outro lado, ratos alimentados com dieta rica em lipídeos (30,6%) e 0,1% de

steviosídeo, não apresentaram alterações nos níveis de glicogênio hepático e na glicemia.

Tomados em seu conjunto os dados sugerem na verdade que os produtos naturais da **Stevia rebaudiana** afetam de alguma forma o metabolismo de carboidratos em mamíferos. Os efeitos parecem ser de tal tipo que, dependendo do estado do organismo e das doses e do tipo de preparação ingeridos, podem levar também a algum decréscimo na glicemia.

1.4.3. Efeitos bioquímicos dos produtos da **Stevia rebaudiana** em sistemas celulares e sub-celulares.

Estudos realizados em sistemas celulares e sub-celulares dão conta de que os produtos naturais da **Stevia rebaudiana** e seus derivados exercem vários efeitos de natureza bioquímica.

Trabalhando com mitocôndrias isoladas e partículas submitocondriais, VIGNAIS **et al.** (1966) observaram que o steviosídeo, o steviol e o dihidrosteviol atuam como inibidores da fosforilação oxidativa. Os autores atribuíram esta ação à influência desses derivados sobre o sistema translocador de nucleotídeos de adenina. Os mesmos autores demonstraram também inibição da NADH-oxidase pelo steviol.

KELMER-BRACHT **et al.** (1985) retomaram o tema iniciado por VIGNAIS **et al.** (1966) e verificaram que os efeitos do steviosídeo e seus derivados eram mais complexos. Além de efeitos que confirmaram a observação original de VIGNAIS **et al.** (1966) — inibição da respiração acoplada, inibição da NADH-oxidase, inibição da ATPase estimulada por desacoplante — foram verificadas alterações em outros parâmetros. Estas alterações foram:

inibição da L-glutamato desidrogenase, inibição da succinato desidrogenase, inibição da succinato oxidase, inibição do efluxo de prótons induzido por succinato e inibição das alterações de volume dependentes de energia (**swelling**). Das substâncias testadas pelos autores (isosteviol, steviol, steviolbiosídeo e steviosídeo), as agluconas isosteviol e steviol foram sempre as mais ativas, seguidas pelo steviolbiosídeo e pelo steviosídeo. Este último mostrou efeito mais definido somente sobre a respiração acoplada e sobre a atividade ATPásica. Além de todos os efeitos inibidores relacionados acima, KELMER-BRACHT **et al.** (1985) também demonstraram que o isosteviol e o steviol exercem uma ação desacoplante.

Uma ação sobre os processos de conservação de energia nas mitocôndrias tem severas consequências para o metabolismo celular. Por isto, uma série de trabalhos foram realizados para verificar se os produtos naturais da **Stevia rebaudiana** também afetavam a fosforilação oxidativa em sistemas de células intactas. A gluconeogênese foi avaliada em túbulos renais isolados de ratos (YAMAMOTO **et al.**, 1985). A síntese de glucose a partir de vários precursores e também o consumo de oxigênio dessa preparação foram inibidos pelas agluconas steviol e isosteviol. Os glicosídeos steviolbiosídeo e steviosídeo não tiveram ação significativa.

Considerando que, geralmente inibidores respiratórios promovem também ativação da glicólise, KEMMELMEIER **et al.** (1984), avaliaram a glicólise em reticulócitos e eritrócitos de coelhos. A produção de L-lactato (glicólise) e o consumo de glucose foram aumentados pelo steviol (até 1 mM) e pelo isosteviol (até 0,5 mM). Quando presentes em concentrações mais

elevadas, a ação passa a ser inibidora. Em eritrócitos de coelhos como de humanos, que são células desprovidas de metabolismo oxidativo mitocondrial, apenas o efeito inibidor sobre a glicólise foi detectado.

O metabolismo energético do fígado também é afetado pelas agluconas steviol e isosteviol. ISHII & BRACHT (1985) demonstraram que os dois compostos alteram diversas vias metabólicas no fígado de rato perfundido isoladamente. Foram observados inibição da respiração, de processos biossintéticos — como a gluconeogênese — e inibição da formação de corpos cetônicos. A glicólise e a glicogenólise, por outro lado, são ativadas (ISHII & BRACHT, 1985; KELMER-BRACHT **et al.**, 1985). Todos estes efeitos são consistentes com uma ação das agluconas sobre as funções mitocondriais nas células hepáticas. Por outro lado, como já fora encontrado também em túbulos renais isolados (YAMAMOTO **et al.**, 1985) e em eritrócitos e reticulócitos (KEMMELMEIER **et al.**, 1984), os glicosídeos steviosídeo e steviolbiosídeo não tiveram ação sobre o metabolismo energético do fígado de rato (KELMER-BRACHT **et al.**, 1985).

KELMER-BRACHT **et al.**, (1985), em seu artigo de revisão, relatam experimentos preliminares que mostram um efeito até então insuspeito dos produtos naturais da **Stevia rebaudiana** e seus derivados. Trata-se da ação inibitória sobre o transporte de glucose. Esta ação foi primeiramente detectada em experimentos com isosteviol (KELMER-BRACHT **et al.**, 1985), porém, logo se verificou que, ao contrário da ação sobre o metabolismo energético, desta vez também os glicosídeos — steviosídeo e steviolbiosídeo — eram ativos. Os detalhes desta ação a nível da membrana plasmática permaneciam em 1985 ainda no aguar-

do dos experimentos necessários para o esclarecimento dos detalhes e as possíveis consequências metabólicas.

1.5. ESTUDOS SOBRE O SISTEMA DE TRANSPORTE DE MONOSSACARÍDEOS NO FÍGADO

O fato de os produtos naturais da **Stevia rebaudiana** inibirem o transporte de glucose através da membrana plasmática das células hepáticas leva à necessidade de buscar na literatura dados sobre as propriedades do sistema de transporte envolvido. O transportador de glucose da membrana dos eritrócitos foi objeto de inúmeros trabalhos (NAFTALIN & HOLMAN, 1977). Possivelmente, é o sistema de transporte de açúcares mais bem estudado. O do fígado, pelo contrário, é um dos menos estudados até o presente momento. Na verdade, com data anterior a este estudo, apenas cinco trabalhos, tendo por objeto o transporte de glucose no fígado, foram encontrados. BAUR & HELDT (1977) realizaram um estudo sobre o transporte de glucose, frutose e galactose em hepatócitos isolados de ratos. Eles mediram velocidades iniciais em condições zero-trans, isto é, em condições nas quais a concentração extracelular é finita e a concentração intracelular igual a zero. São condições que nunca se verificam no organismo vivo, porém, os experimentos permitiram obter dados conclusivos sobre várias das propriedades do sistema de transporte. Assim, BAUR & HELDT (1977) puderam mostrar que no fígado há um sistema de transporte passivo — não-dependente de energia — específico para monossacarídeos. Este sistema é capaz de transportar os três monossacarídeos mais importantes para o fígado, que são a glucose, a frutose e

galactose. A velocidade de transporte decresce na sequência glucose > galactose > frutose. O transportador do fígado também é sensível aos inibidores que afetam quase todos os sistemas de transporte de monossacarídeos de outros tecidos, que são a florizina, a floretina e a citocalasina B.

O trabalho de BAUR & HELDT (1977) tornou-se possível por causa das modernas técnicas de isolamento de células. O trabalho mais antigo, que é o de CAHILL **et al.**, (1958) foi realizado **in vivo** e as técnicas empregadas não permitiram realmente medir velocidades de transporte. O mesmo se pode dizer acerca do trabalho de HETENYI **et al.**(1969), muito mais recente, que também foi realizado **in vivo.** Estes dois trabalhos têm importância apenas no tocante às medidas sobre a distribuição da glucose entre os espaços intra- e extracelular.

Embora seja cômodo estudar fenômenos de transporte em células isoladas, é bom sempre ter em mente,a pouca semelhança que o sistema de incubação guarda com a situação destas mesmas células no organismo. Por isto mesmo, é altamente desejável obter dados sobre transporte no órgão inteiro. Para se fazer isto, no entanto, é imprescindível recorrer a modelos matemácos, pois no órgão inteiro a hemodinâmica sempre se sobrepõe aos fenômenos de transporte. WILLIAMS **et al.** (1968) fizeram um estudo sobre o transporte de D-glucose e L-glucose no fígado perfundido de rato, utilizando um modelo analógico. Eles foram os primeiros a demonstrar que o transporte de glucose no fígado era estereoespecífico. A D-glucose é transportada muito mais rapidamente do que a L-glucose. O modelo analógico de WILLIAMS **et al.** (1968), no entanto, tem sérias limitações. O modelo encerra uma descrição muito limitada da hemodinâmica e

por isto permite a obtenção apenas de valores aproximados dos parâmetros de transporte (V_{max} e K_m).

A melhor solução para medidas de transporte no fígado inteiro foi aquela proposta por GORESKY & NADEAU (1974). O modelo utilizado realmente leva em conta a hemodinâmica e os diferentes tempos de trânsito pelos sinusóides. O modelo de GORESKY **et al.** (1970) deu feição nova a uma técnica experimental antiga, que é a técnica da diluição de indicadores múltiplos (**multiple indicator dilution technique**). Esta técnica foi e continua sendo muito usada para a determinação de volumes de distribuição e de fluxos através de órgãos **in vivo** ou **in situ** (CHINARD & ENNS, 1954). Com o modelo de GORESKY **et al.** (1970), é também possível obter as constantes de velocidade para o influxo, efluxo e transformação metabólica de uma dada substância tanto **in vivo** como também no fígado perfundido isoladamente (BRACHT **et al.**, 1980).

GORESKY & NADEAU (1974) utilizaram esse modelo para estudar o transporte de glucose no fígado de cães anestesiados, **in vivo**, portanto. Foram as primeiras determinações da V_{max} e do K_m no fígado inteiro. Em outro trabalho, foi investigado o transporte de galactose (GORESKY **et al.**, 1973). Esses estudos **in vivo** têm vantagens e desvantagens. A grande vantagem reside no fato de que o órgão continua sendo perfundido com sangue bombeado pelo órgão natural, o coração. No entanto, a necessidade de anestesia pode ser um problema, pois o anestésico pode influir sobre o transporte e o metabolismo. Além disto, a flexibilidade experimental é reduzida, pois **in vivo** não se pode variar livremente as concentrações de substratos e hormônios. A perfusão do órgão isolado dá maior flexibilidade experimen-

tal e facilita também a realização dos experimentos (BRÄCHT **et al.**, 1980). A maior flexibilidade, no entanto, também implica numa menor semelhança com a situação fisiológica. Na verdade, experimentos **in vivo** e com o órgão isolado são complementares. É a partir dos dados obtidos de uma e de outra forma que se espera poder traçar um quadro relativamente fiel daquilo que acontece no organismo inteiro.

1.6. OBJETIVOS DESTE TRABALHO

Os objetivos deste trabalho visam preencher algumas das lacunas mencionadas nos tópicos anteriores.

O primeiro objetivo é a caracterização da inibição do transporte de monossacarídeos no fígado pelos produtos naturais da **Stevia rebaudiana.** A técnica a ser utilizada é a da diluição de indicadores múltiplos com análise matemática de acordo com o modelo de GORESKY **et al.** (1973).

Como o transporte de monossacarídeos no fígado de rato ainda não foi muito bem caracterizado para as condições do órgão inteiro (condições de **steady-state**), será necessário realizar em paralelo um estudo sobre as características desse transporte e as suas relações com o metabolismo. Fazendo isto, também será possível comparar o transporte de monossacarídeos do fígado de rato com aquele do fígado de cão (GORESKY & NADEAU, 1974).

O terceiro objetivo deste trabalho é investigar as possíveis consequências para o metabolismo da inibição do transporte de monossacarídeos pelo steviosídeo. As consequências serão tanto maiores quanto menor for a atividade do sis-

tema de transporte em comparação com a velocidade de metabolização.

O quarto objetivo diz respeito a dois aspectos das relações entre o steviosídeo e as células hepáticas. O primeiro deles refere-se à permeabilidade da membrana dos hepatócitos ao steviosídeo. É sempre de interesse saber de que lado da membrana que um inibidor de transporte está atuando. O segundo aspecto é a questão da metabolização do steviosídeo pelo fígado, que poderia em princípio ocorrer no interior das células ou também no lado externo, tal como ocorre com a maltose (SPRANDEL **et al.,** 1976).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. PRODUTOS DA **Stevia rebaudiana**

O steviosídeo, o steviolbiosídeo e o isosteviol foram cedidos pelo professor Mauro Alvarez da Universidade Estadual de Maringá. As preparações foram submetidas a mais uma etapa de cristalização e eliminação completa dos solventes, antes de serem utilizados nos experimentos.

O steviol foi obtido por hidrólise enzimática do steviolbiosídeo com preparações brutas de pectinase (poligalacturonidase, E. C. 3.2.1.15), extraídas de **Aspergillus niger** (TANAKA, 1980).

O glucosil-steviol foi obtido da hidrólise enzimática do steviolbiosídeo pelo suco digestivo do caramujo marinho **Megalobulimus paranaguensis**, de acordo com o procedimento descrito por FERRARESI **et al.** (1984).

A pureza das substâncias citadas acima foi testada por cromatografia de camada delgada, cromatografia líquida de alta performance (HPLC), espectroscopia na região ultra violeta e por determinação dos pontos de fusão (ALVAREZ & KUSUMOTO, 1987).

2.2. ENZIMAS, COENZIMAS E OUTROS MATERIAIS

As enzimas hexoquinase, glucose 6-fosfato e L-lactato desidrogenase, pectinase e as coenzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada, NAD^+), nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida, NADH), nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma oxidada, $NADP^+$) e adenosina trifosfato (ATP), foram comprados da Sigma Chemical Co.

Os demais reagentes utilizados, substratos, sais e solventes, foram os de melhor grau disponível, e foram adquiridos da Merck, Sigma, Carlo Erba, Ecibra e Reagen.

2.3. RADIOISÓTOPOS

A [U-^{14}C]sacarose (NEC-100, 4 Ci/mol), a D-[1-^{14}C]glucose (NEC-043, 8 Ci/mol) e a [^{3}H]água (NEC-001, 25 mCi/g) foram comprados da New England Nuclear (Boston, Ma, USA). O [^{32}P]fosfato de sódio (livre de carreador) e a [^{131}I]albumina foram adquiridos da Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), São Paulo, Brasil.

2.4. ANIMAIS

Foram usados ratos machos da cepa Wistar, criados no biotério experimental do Laboratório de Metabolismo Hepático da Universidade Estadual de Maringá.

Os animais foram alimentados com ração balanceada (Purina) e água **ad libitum**. Quando necessário foram postos em jejum por um período máximo de 24 horas.

Antes de se proceder a remoção cirúrgica do fígado, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de pentobarbital (50 mg por kg de peso corporal).

2.5. O SISTEMA DE PERFUSÃO DO FÍGADO.

Neste trabalho foi empregado um sistema de perfusão do fígado isolado de rato, com meio de perfusão livre de hemoglobina, conforme originalmente descrito por SCHOLZ & BÜCHER (1965).

2.5.1. O aparelho de perfusão

O aparelho de perfusão consta basicamente dos seguintes componentes: (1) bombas peristálticas (Milan Equipamentos Científicos); (2) bombas de precisão para infusão (I.C.B., USP); (3) banho-maria com bomba de circulação externa (Shimadzu TB-85); (4) registrador potenciométrico (Linear 1200); (5) microeletrodo de platina; (6) recipientes para o líquido de perfusão; (7) câmara de contenção do fígado; (8) oxigenador de membrana; (9) coletor rápido de frações; (10) polarógrafo de oxigênio; (11) comando do coletor de frações.

Os componentes (7) a (11) foram construídos nas oficinas da Universidade Estadual de Maringá (KELMER-BRACHT **et al.**, 1984). O microeletrodo de platina foi construído nas oficinas do Instituto de Química Fisiológica da Universidade Ludwig-Maximillians de Munique, Alemanha Ocidental, e foi um presente do Dr. ROLAND SCHOLZ.

2.5.2. O líquido de perfusão

Os fígados foram perfundidos com solução salina tamponada — tampão KREBS/HENSELEIT-bicarbonato (KREBS & HENSELEIT, 1932), cuja composição consta da tabela 1. O pH do líquido foi sempre ajustado de forma a atingir o valor final de 7,4, quando saturado com mistura carbogênica (O_2/CO_2 na proporção de 95/5%). A albumina bovina foi acrescida ao líquido na proporção de 25 mg por 100 ml.

Dependendo do protocolo experimental, substratos e drogas foram dissolvidos no líquido de perfusão.

Tabela 1. **Composição da solução salina KREBS/HENSELEIT-bicarbonato.**

NaCl	115 mM	$MgCl_2$	1,18 mM
$NaHCO_3$	25 mM	NaH_2PO_4	1,24 mM
KCl	5,9 mM	$CaCl_2$	2,5 mM
Na_2SO_4	1,2 mM		

2.5.3. A técnica de perfusão do fígado de rato

Nos experimentos de perfusão, uma bomba peristáltica com velocidade de fluxo variável impulsiona o líquido de perfusão através do oxigenador de membrana, antes de alcançar o fígado. A passagem através do oxigenador de membrana tem como finalidade aquecer e oxigenar o líquido de perfusão. Neste componente cilíndrico, de alumínio, o líquido circula em tubos de borracha silicone de paredes finas (0,25 mm), com um trajeto total de 15 metros desde o ponto de entrada até o dispositivo de saída. Na câmara interna do cilindro de alumínio, circula água

aquecida e o contato dos tubos de borracha silicone com o cilindro permite o aquecimento do líquido de perfusão numa simples passagem pelo oxigenador.

Todo o conjunto (cilindro de alumínio + tubos de borracha silicone) está isolado da atmosfera ambiente por um cilindro de plástico transparente. O espaço entre o cilindro de alumínio e o cilindro de plástico é ocupado por atmosfera de carbogênio (95% de oxigênio e 5% de gás carbônico). Por troca passiva, o líquido de perfusão satura-se com carbogênio. Numa simples passagem, cerca de 99% de saturação é alcançada. Ao deixar o oxigenador de membrana em direção à câmara de contenção do fígado a concentração de oxigênio no líquido de perfusão, que está a 37^{o}C, atinge 860 µM.

Na câmara de contenção do fígado,o líquido de perfusão passa por um canal até um dispositivo de eliminação de bolhas para então ser desviado para um tubo que termina numa fina cânula de teflon. Esta cânula é introduzida na veia porta de um animal anestesiado e cujo abdômen já foi aberto. O líquido efluente que deixa o fígado através da veia hepática é coletado através de uma segunda cânula inserida na veia cava superior. O fígado é a seguir isolado do animal e colocado na câmara de contenção. Neste local, o líquido efluente (perfusado) passa por outro canal banhando um microeletrodo de platina e atingindo uma câmara para coleta de amostras. O excesso que não é coletado para as análises é sugado por uma segunda bomba peristáltica e descartado. Em experimentos de recirculação, o perfusado é novamente impulsionado ao fígado pela primeira bomba peristáltica. Maiores detalhes da aparelhagem e da técnica de remoção cirúrgica do fígado foram descritos por KEL-

MER-BRACHT **et al.**, (1984).

2.5.4. Experimentos de diluição de indicadores múltiplos

Nos experimentos de diluição de indicadores múltiplos (**multiple-indicator dilution**) os fígados foram perfundidos no sistema não-recirculante conforme descrito nos itens anteriores. Uma mistura contendo substâncias marcadas com isótopos radioativos foi injetada rapidamente na entrada da veia porta por meio de uma microsseringa de precisão. Simultaneamente, o perfusado começou a ser coletado em microfrações por um coletor de frações colocado abaixo da câmara de contenção. Este coletor de frações é acionado automaticamente graças a um contato eletrônico na seringa. Como os fenômenos hemodinâmicos e de transporte são rápidos, o coletor de frações foi especialmente concebido de forma a fracionar o perfusado efluente a intervalos de 0,5 a 2,0 segundos, com um tempo total de coleta de 81 segundos.

Em cada experimento, foram injetadas três substâncias: a substância em estudo e duas referências — uma para o espaço extracelular ([^{14}C]sacarose ou [^{32}P]fosfato) e outra para o espaço aquoso total ([^{3}H]água). O volume injetado foi igual a 200 µl. As seguintes combinações foram utilizadas: (a) [^{14}C]sacarose (1 µCi), [^{32}P]fosfato (0,1 µCi) e [^{3}H]água (10 µCi); (b) [1-^{14}C]glucose (0,5 µCi), [^{32}P]fosfato (0,1 µCi) e [^{3}H]água (10 µCi); (c) [^{32}P]fosfato (0,1 µCi), [^{3}H]água (10 µCi) e frutose (4,5 µmol); (d) [^{32}P]fosfato (0,1 µCi), [^{3}H]água (10 µCi) e steviosídeo (2,1 µmol).

Ao menos dois e até quatro experimentos foram realiza-

dos em cada fígado. Os experimentos controles precederam os experimentos teste. Quando as condições experimentais eram modificadas com a infusão de substratos ou inibidores, ao menos cinco minutos decorriam até o próximo experimento.

2.5.5. Experimentos de recirculação do steviosídeo

Nos experimentos de recirculação do steviosídeo, os fígados foram perfundidos inicialmente com tampão KREBS/HENSELEIT -bicarbonato, saturado com mistura carbogênica, conforme descrito no ítem 2.5.3. Após 20 minutos, o steviosídeo foi infundido nas concentrações de 0,2, 0,5 ou 1,0 mM até completar um volume de cerca de 100 ml num recipiente conectado à bomba peristáltica. A recirculação foi iniciada por uma troca do líquido arterial pelo perfusado acumulado. Experimentos similares foram realizados com paracetamol (concentração de 1,0 mM) e com albumina bovina contendo traços de [^{131}I]albumina humana. Alíquotas do perfusado recirculante foram coletadas a cada 30 minutos por um período de 120 minutos.

Nos experimentos de recirculação com steviosídeo foram empregados animais mantidos em jejum por 24 horas. Em outra série de experimentos os animais foram tratados previamente com uma solução de steviosídeo 1,0 mM, oferecida **ad libitum,** em substituição à água, por um período de 8 dias.

As amostras coletadas foram analisadas pelo seu teor em steviosídeo e também submetidas a análises cromatográficas para a identificação de possíveis produtos de metabolização, conforme descrito no ítem 2.6.3.

2.6. ANALÍTICA

2.6.1. Determinação do consumo de oxigênio

O consumo de oxigênio pelo fígado perfundido foi monitorado continuamente durante o transcorrer dos experimentos através de um eletrodo de platina (KELMER-BRACHT **et al.**, 1984). A velocidade da respiração foi expressa em µmol de O_2 consumidos por minuto por grama de fígado ($\mu mol \times min^{-1} \times g^{-1}$) e foi calculada pela seguinte expressão:

$$F_{O_2} = \frac{(C_a - C_v) \times F}{P} \qquad [1]$$

Na equação [1], F_{O_2} é a velocidade da respiração, C_a a concentração arterial de oxigênio (mM), C_v a concentração venosa de oxigênio (mM), F o fluxo através do órgão (ml/min) e P o peso úmido do fígado (g).

A concentração arterial de oxigênio foi mantida constante pelo oxigenador e era igual a 0,86 mM. A concentração venosa foi calculada a partir dos registros durante o tempo de perfusão. A calibração era feita assumindo uma concentração de 0,19 mM de O_2 em solução salina a 37°C. O ponto zero foi determinado infundindo ditionito de sódio (KELMER-BRACHT **et al**, 1984).

2.6.2. Dosagens espectrofotométricas

As seguintes substâncias foram determinadas por métodos

espectrofotométricos: D-glucose, L-lactato, piruvato, D-frutose, steviosídeo e paracetamol.

A D-glucose foi determinada pelo método colorimétrico da o-toluidina (DUBOWSKI, 1962) ou pelo método enzimático com hexoquinase, glucose 6-fosfato desidrogenase e as coenzimas ATP e $NADP^+$, essencialmente como descrito por BERGMEYER **et al.**,(1974).

O L-lactato e o piruvato foram dosados enzimaticamente com L-lactato desidrogenase, utilizando as coenzimas NAD^+ e NADH, respectivamente (GUTMAN & WAHLEFELD, 1974; CZOK & LAMPRECHT, 1974).

A frutose foi dosada colorimetricamente pela técnica originalmente descrita por ROE (1934), modificada para minimizar a interferência de substâncias como a D-glucose e o steviosídeo, presentes nas amostras analisadas. A temperatura de incubação foi reduzida de 90 para 60 graus centígrados e o tempo de reação foi aumentado de 10 para 90 minutos. Nestas condições, a absorbância devida à D-glucose não atinge 1% do valor observado com a frutose em concentrações equivalentes. A técnica modificada mostrou sensibilidade na faixa entre 9 µg e 200 µg de frutose.

O steviosídeo foi determinado pela técnica do fenol sulfúrico para açúcares totais (DUBOIS **et al.**, 1956), com correção da interferência devida à D-glucose, quando ela estava presente.

O paracetamol foi extraído das amostras com acetato de etila. A absorbância dos extratos a 290 nm foi empregada nos cálculos da concentração, utilizando um coeficiente de extinção (ε) igual 0,54 $mM^{-1} \times cm^{-1}$.*

---

*ITINOSE, A. M.; DOI-SAKUNO, M. L. e BRACHT, A. (comunicação pessoal).

2.6.3. Medidas de radioatividade

A radioatividade dos isótopos ^{3}H, ^{32}P, ^{131}I, e ^{14}C foi medida num contador para amostras líquidas Beckman LS 6800 de três canais. Quando dois ou mais isótopos estavam presentes nas amostras, a discriminação foi feita pelos métodos usuais, com disposição adequada das janelas.

O líquido de cintilação empregado tinha a seguinte composição: tolueno/etanol (2/1); PPO (2,5-difeniloxazol), 5 g/l; POPOP [2,2' p-fenileno-bis-(5-feniloxazol)], 0,15 g/l. Esta mistura tem capacidade de absorver até 300 µl de perfusado sem separação de fases.

2.6.4. Análises cromatográficas

Análises cromatográficas para a determinação do steviosídeo e possíveis produtos de metabolização no perfusado foram realizadas utilizando cromatografia em camada delgada (sílica-gel Merck, espessura de 0,25 mm). O solvente utilizado foi uma mistura de isobutanol, metanol e água (8:1:1). Após corrida em cuba cromatográfica, saturada com a fase móvel, a placa foi secada à temperatura ambiente e revelada com solução etanólica de ácido sulfúrico a 5%. Em seguida a placa foi aquecida em estufa a 100°C até o aparecimento de manchas escuras.

Placas idênticas foram cromatografadas em paralelo, porém reveladas em vapor de iôdo e as manchas coincidentes com a da solução padrão de steviosídeo foram eluídas com metanol absoluto e dosadas para açúcares totais pelo método do fenol-sulfúrico (DUBOIS **et al.**, 1956).

Ao invés de aplicar alíquotas do perfusado, em uma série de experimentos, foram aplicados extratos etéreos. O perfusado foi extraído duas vezes com volume equivalente de éter. O extrato etéreo foi reduzido ao mínimo em rotavapor e alíquotas foram cromatografadas conforme descrito acima, juntamente com soluções padrão de steviosídeo, steviolbiosídeo, glucosil-steviol e steviol. Ensaios controle foram realizados com amostras equivalentes de perfusado coletadas no início dos experimentos com steviosídeo e durante experimentos controle nos quais o steviosídeo foi omitido do meio de perfusão.

2.7. O MODELO MATEMÁTICO DO FÍGADO UTILIZADO NA OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS DE TRANSPORTE

O modelo matemático utilizado neste trabalho para obter os parâmetros de transporte da D-glucose é essencialmente aquele utilizado por GORESKY & NADEAU (1974) em seus estudos no fígado de cão **in vivo.** A adaptação desse modelo às condições do fígado de rato perfundido isoladamente com meio livre de hemoglobina foi realizada por BRACHT **et al.,** (1980).

O sistema vascular do fígado intacto é formado por muitos sinusóides com comprimentos diferentes e pelos grandes vasos. O modelo simula primeiramente os eventos ao longo de um único sinusóide. Numa segunda etapa, faz-se uma somatória dos eventos de todos os sinusóides, para obter ao final a resposta do órgão inteiro.

A compreensão do modelo exige uma discussão, ainda que resumida, das equações básicas.

2.7.1. Equações básicas para um único sinusóide

Os eventos em um simples sinusóide podem ser analisados através de um modelo que considera três compartimentos: A, o compartimento vascular; B, o espaço de Disse; e C, o compartimento celular. Cada compartimento é formado por uma série de elementos distribuídos nas três dimensões do espaço. As seguintes condições são assumidas:

1. o fluxo do líquido de perfusão está confinado ao compartimento vascular;

2. o mecanismo de transporte das substâncias ao longo dos sinusóides é determinado pelo fluxo, ou seja, as substâncias não se dispersam significativamente ao longo do trajeto **(bolus flow)**;

3. o equilíbrio difusional das substâncias solúveis na direção transversa ao fluxo é muito rápido se comparado com a velocidade do fluxo (convexão) e é completo a cada ponto ao longo do trajeto dos sinusóides;

4. as constantes de velocidade para o transporte das substâncias através da membrana dos hepatócitos não variam ao longo do sinusóide.

Nesse modelo, os sinusóides são idealizados como sendo divididos em muitas secções. O modelo é tornado contínuo por aumentar o número de secções ao infinito. Assim, os eventos que ocorrem em uma única secção dos sinusóides podem ser descritos pela seguinte equação parcial diferencial:

$$A\frac{\partial u(x,t)}{\partial t} + B\frac{\partial v(x,t)}{\partial t} + V_i\frac{\partial z(x,t)}{\partial t} = -AW\frac{\partial u(x,t)}{\partial x} \qquad [2]$$

Na equação [2] A é o volume por unidade de trajeto do espaço

vascular (espaço sinusoidal), B o volume correspondente do espaço de Disse, V_i o volume correspondente intracelular, u a concentração da substância no espaço sinusoidal, v a concentração da substância no espaço de Disse, z a concentração no espaço celular, x a posição ao longo do sinusóide, t o tempo e W a velocidade de deslocamento ao longo do sinusóide (espaço/tempo).

No fígado, não há barreiras mesmo para macromoléculas entre o espaço sinusoidal e o espaço de Disse. Por isto a distribuição das substâncias entre os dois espaços, na prática, é limitada pelo fluxo, isto é, $\partial u(x,t)/\partial t = \partial v(x,t)/\partial t$. Em consequência disto, a equação [2] pode ser reescrita:

$$\frac{\partial u(x,t)}{\partial t} + \theta' \frac{\partial z(x,t)}{\partial t} = -W' \frac{\partial u(x,t)}{\partial x} \qquad [3]$$

Na equação [3], $\theta' = V_i/(A + B) = V_i/V_e$, onde V_e é o espaço extracelular total e $W' = W/(1 + B/A)$.

No caso de substâncias que permeiam a membrana celular com velocidades que não permitem assumir uma distribuição limitada apenas pelo fluxo, como é o caso da D-glucose, a concentração no espaço celular será dependente de velocidades de influxo, efluxo e também da velocidade de metabolização. Matematicamente, isto pode ser descrito da seguinte forma:

$$\frac{\partial z(x,t)}{\partial t} = k_1 u - k_2 z - k_3 z \qquad [4]$$

Na equação [4] k_1 é a constante de velocidade para a entrada na célula, k_2 a constante de velocidade para a saída da célula e k_3 a constante de velocidade para a metabolização. k_1 tem as dimensões de volume de perfusado × tempo^{-1} × volume aquoso intracelular^{-1}. Já k_2 tem as dimensões de volume da fase intra-

celular equivalente ao volume de perfusado × tempo^{-1} × volume do espaço intracelular^{-1}. As unidades de k_3 são as mesmas que de k_2.

Substituindo agora o valor de $\partial z(x,t)/\partial t$ dado pela equação [4] na equação [3] obtém-se:

$$\frac{\partial u(x,t)}{\partial t} + \theta'(k_1 u - k_2 z - k_3 z) = -W'\frac{\partial u(x,t)}{\partial x} \qquad [5]$$

2.7.2. Solução da equação para um único sinusóide

Para resolver a equação [5], é necessário especificar as condições iniciais. Se a substância for introduzida na forma de um pulso num sinusóide inicialmente vazio, pode-se escrever:

$$u(0,t) = \frac{q_s}{F_s}\,\delta(t); \qquad u(x,0) = 0; \qquad \frac{\partial u(x,0)}{\partial t} = 0 \qquad [6]$$

onde F_s é o fluxo pelo sinusóide e q_s a quantidade introduzida no sinusóide. $\delta(t)$ é uma função delta ou função impulso (GORESKY **et al.**, 1970). Ela descreve a entrada súbita de material no sinusóide na forma de um pulso e é igual a zero para $t \neq 0$.

A solução das equações [5] e [6] pode ser obtida através da transformação de Laplace (SANGREN & SHEPPARD, 1953). Três casos podem ser considerados. O primeiro caso e mais simples, é aquele em que a substância não permeia a membrana celular. Para este caso k_1, k_2 e k_3 são iguais a zero e a solução das equações [5] e [6] será (BRACHT **et al.**, 1980):

$$u(x,t) = \frac{q_s}{F_s}\,\delta(t - x/W'), \qquad [7]$$

ou seja, o pulso inicial irá se propagar ao longo do sinusóide como uma onda compacta que não sofre distorções na sua passagem. Ela emerge do sinusóide a um tempo x/W' e é propagada ao

longo do trajeto com velocidade W'. Substâncias deste tipo são úteis como referências para o espaço extracelular.

O segundo caso de interesse para o presente trabalho é aquele no qual a substância não sofre transformação no espaço intracelular ($k_3=0$) mas a passagem pela membrana ocorre com velocidade muito grande, isto é, k_1 e k_2 tendem ao infinito. A solução para este caso é (BRACHT **et al.**, 1980):

$$u(x,t) = \frac{q_s}{F_s}\,\delta[t - (1 + \theta')x/W']. \qquad [8]$$

A substância atravessa o sinusóide e as células adjacentes também na forma de uma função impulso, mas com velocidade reduzida para $W'/(1 + \theta')$, emergindo portanto a um tempo reduzido para $(1 + \theta')x/W'$. Substâncias desse tipo são úteis como indicadores para o espaço total, extracelular + intracelular.

O terceiro caso de interesse é o daquelas substâncias que trocam com o espaço intracelular com velocidade finita. A solução para este caso é (BRACHT **et al.**, 1980),

$$u(x,t) = \frac{q_s}{F_s}\exp[-k_1\theta'x/W']\;\delta(t - x/W') \qquad [9]$$

$$+ \frac{q_s}{F_s}\exp[-(k_2 + k_3)(t - x/W')\exp[-k_1\theta'x/W']$$

$$\times \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(k_1k_2\theta'x/W')^n\;(t - x/W')^{n-1}}{n!\;(n - 1)!}\,S(t - x/W')$$

onde $S(t - x/W')$ é uma função etapa. O primeiro termo da equação consiste numa função impulso atenuada por uma função exponencial. Fisicamente, este termo representa aquela fração do material que passa ao longo da superfície celular sem permear a membrana. O segundo termo da equação representa a fração do material que permeia a membrana celular, ocupa temporariamente o espaço intracelular e a seguir emerge no espaço extracelular em todo ($k_3 = 0$) ou em parte ($k_3 > 0$).

2.7.3. O modelo para o órgão inteiro

As equações [7]-[9] são válidas para um único sinusóide. O fígado inteiro, no entanto, é formado por um grande número de sinusóides de comprimentos diferentes além dos grandes vasos. É preciso, portanto, encontrar uma forma de somar as respostas de cada sinusóide a fim de obter a resposta do órgão inteiro. GORESKY **et al.** (1970) fizeram isto baseado nas seguintes premissas: 1. o fígado é um sistema de sinusóides com diferentes comprimentos (L) e que se situam paralelamente uns em relação aos outros; 2. cada sinusóide perfaz juntamente com as células adjacentes uma unidade independente; 3. as velocidades de transporte e metabolismo são constantes ao longo do tempo e através do órgão; 4. o tempo de trânsito nos grandes vasos é uniforme o suficiente para poder ser aproximado por um único tempo (t_0).

Se a distribuição de frequência do tempo de trânsito pelos sinusóides for dada por $f(\tau)$, pode-se obter a quantidade total de substância que deixa o órgão por unidade de tempo [Q'(t)], através da integração de todos os tempos de trânsito. Neste processo, a grandeza intensiva q_s/F_s nas equações [6]-[9] é substituída por q/F, onde q é a quantidade injetada no órgão inteiro e F o fluxo total através do órgão.

$$Q'(t) = \int_0^{\infty} F\ u(W'\tau,\ t - t_0)\ f(\tau)\ d\tau \qquad [10]$$

Na equação [10], τ é o tempo de trânsito pelos sinusóides e $W'\tau$ o comprimento (L) do sinusóide. O termo $f(\tau)\ d\tau$ representa a fração de sinusóides com um tempo de trânsito entre τ e $\tau + d\tau$, com $\int_0^{\infty} f(\tau)\ d\tau = 1$. O mesmo termo também representa a fração de

perfusado que percorre os sinusóides com um tempo de trânsito entre τ e $\tau + d\tau$.

A função $f(\tau)$ é desconhecida e os seus parâmetros devem variar de espécime para espécime. A função, no entanto, pode ser determinada com o auxílio de uma referência para o espaço extracelular. De fato, podemos substituir o valor de $u(W'\tau, t - t_0)$ dado pela equação [7] na equação [10] e integrar. Para isto,deve-se substituir x por $W'\tau$, t por $t - t_0$ e a grandeza intensiva q_s/ F_s por q_{ref}/F, onde o subscrito $_{ref}$ refere-se ao tipo de substância em consideração. Integrando e rearranjando obtém-se:

$$f(t - t_0) = \frac{Q'_{ref}(t)}{q_{ref}} \qquad [11]$$

Isto significa que a distribuição de frequência dos tempos de trânsito é dado pela curva de uma substância que não tem acesso ao espaço intracelular. Se o valor de $f(t - t_0)$ dado pela equação [11] for substituído na equação [10] obtém-se:

$$Q'(t) = F \int_0^{\infty} u(W'\tau, t - t_0)\, Q_{ref}(\tau + t_0)\, d\tau \qquad [12]$$

Na equação [12], Q_{ref} representa a fração da referência que aparece por unidade de tempo, isto é, Q'_{ref} / q_{ref}.

A equação [12] pode agora ser usada para obter a equação final que descreve a curva de uma substância que foi injetada uma única vez na forma de um pulso e que é transportada através da membrana celular. Para isto,basta substituir o valor de $u(W'\tau, t - t_0)$ dado pela equação [9] na equação [12] e integrar. Aqui,mais uma vez, o valor de x deverá ser substituído por $W'\tau$ e o valor de t diminuído em t_0. O resultado da integração é (BRACHT **et al.**, 1980):

$$Q(t) = Q_{ref}(t)\ \exp[-k_1\theta'(t - t_0)] +$$

$$+ \exp[-(k_2 + k_3)(t - t_0)]$$

$$\times \int_0^{t-t_0} \exp[(k_2 + k_3 - k_1\theta')\tau] \times Q_{ref}(\tau + t_0)$$

$$\times \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(k_1k_2\theta'\tau)^n\ (t - t_0 - \tau)^{n-1}}{n!(n - 1)!}\ d\tau \qquad [13]$$

Q(t) é a fração da substância injetada que reaparece no perfusado efluente por unidade de tempo. Se esta substância não sofrer transformação numa simples passagem pelo fígado, k_3 será nula. GORESKY & NADEAU (1974) usaram basicamente esta equação para estudar o transporte de glucose no fígado de cães anestesiados.

O caso descrito pela equação [8] — $k_3 = 0$ e $k_1,\ k_2 \to \infty$ — também tem aplicabilidade. A inserção do valor de $u(W'\tau,\ t - t_0)$ na equação [12] e integração fornece a seguinte relação:

$$Q(t) = \left[\frac{1}{1 + \theta'}\right]\ Q_{ref}\left[\frac{(t - t_0)}{(1 + \theta')} + t_0\right] \qquad [14]$$

A equação [14] revela que deve ser possível superpor as curvas de uma referência para o espaço extracelular e de uma substância que troque com o espaço celular com grande velocidade usando como fatores a razão dos espaços intra- para extracelular, θ', e o tempo de trânsito pelos grandes vasos, t_0.

Em conclusão, através de um ajuste de mínimos quadrados da equação [13] aos dados,pode-se obter as constantes de velocidade k_1, k_2 e k_3. Os parâmetros θ' e t_0, que também constam da equação [13], no entanto, devem ser obtidos de uma superposição otimizada da curva da referência para o espaço celular e da curva de uma substância que permeia a membrana com grande velocidade. A substância mais indicada com essa propriedade é

a água triciada (BRACHT **et al.**, 1980).

2.8. TRATAMENTO DOS DADOS E CÁLCULOS

A radioatividade medida nas frações do perfusado efluente nos experimentos de diluição de indicadores múltiplos foi expressa como fração da radioatividade total injetada que reapareceu por segundo [Q(t)]. A área sob as curvas de Q'(t) versus tempo foi avaliada,usando a regra do trapézio (BJÖRCK & DAHLQUIST, 1972). Também a integral sob as curvas de Q(t)·t versus tempo foi avaliada,aplicando a regra do trapézio (BJÖRCK & DAHLQUIST, 1972). Esta integral corresponde ao tempo médio de trânsito ($\bar{t}$), definido como sendo (MEIER & ZIERLER, 1954):

$$\bar{t} = \int_0^\infty Q(t)\cdot t \; dt \qquad [15]$$

A maior parte dos ajustes das equações [13] (cálculo de k_1, k_2 e k_3) e [14] (determinação de t_0 e θ') aos dados experimentais foi feita no Computador Cyber 175 (Control Data Corporation) do Leibniz Rechenzentrum da Universidade de Munique. Esses programas eram escritos em FORTRAN, usando sub-rotinas da biblioteca do Leibniz Rechenzentrum e da biblioteca da International Mathematical and Statistical Libraries (Houston, Texas). O método utilizado no ajuste foi o dos mínimos quadrados (BJÖRCK & DAHLQUIST, 1972). A integral da equação [13] foi calculada através da regra do trapézio, utilizando uma forma modificada do algoritmo de ROMBERG (de BOOR, 1971). As interpolações entre os dados experimentais foram feitos através de uma função **spline** (REINSCH, 1971). Todos esses cálculos foram fei-

tos pelo Dr. ANDREAS J. SCHWAB.

Vários experimentos foram analisados também no Laboratório de Metabolismo Hepático da Universidade de Maringá, utilizando um microcomputador MSX-Expert (Gradiente). Os programas eram escritos em BASIC-MSX-TURBO. O método utilizado foi também o de mínimos quadrados (BJÖRCK & DAHLQUIST, 1972) e a integral da equação [13] foi também avaliada usando a regra do trapézio. As interpolações entre os dados experimentais foi feita utilizando a fórmula de LAGRANGE adaptada à análise da diluição de indicadores múltiplos, conforme descrito por FERRARESI & BRACHT (1988). Os resultados dos cálculos feitos em Maringá e em Munique são praticamente idênticos.

Às curvas de saturação do transporte de glucose foi ajustada a equação de MICHAELIS-MENTEN, utilizando o ajuste não-linear de mínimos quadrados proposto por WILKINSON (1961).

As concentrações para 50% de inibição foram obtidas dos dados de inibição versus concentração através de interpolação numérica, utilizando a fórmula de interpolação de LAGRANGE (BJÖRCK & DAHLQUIST, 1972).

Os fluxos através da membrana celular (influxo e efluxo) foram expressos como µmol × minuto^{-1} × ml do espaço aquoso celular^{-1}. Os parâmetros metabólicos, por outro lado, foram em geral expressos como µmol × minuto^{-1} × grama de fígado^{-1}. Os erros experimentais são dados como ±erro padrão da média.

3. RESULTADOS

3.1. OS PERFIS DAS CURVAS DOS INDICADORES E DA D-GLUCOSE MARCADA NO FÍGADO DE RATO

Melhores resultados podem ser obtidos com o emprego da técnica da diluição de indicadores múltiplos quando os experimentos são conduzidos em condições de **steady-state** ou equilíbrio com a injeção de traçadores que não perturbam significativamente esses estados. Em condições de **steady-state** ou de equilíbrio e quando não há um gradiente de concentração muito acentuado ao longo dos sinusóides, pode-se esperar que as velocidades de transporte e metabolismo sejam realmente constantes no tempo e através do órgão.

A figura 4 mostra os resultados de um experimento realizado na procura de um indicador adequado e prático para o espaço extracelular da D-glucose. O fígado foi perfundido com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato contendo também sacarose 1,0 mM. Esse líquido já contém normalmente fosfato na concentração de 1,24 mM (tabela 1). Após a estabilização do consumo de oxigênio, uma mistura contendo [U-^{14}C]sacarose, [^{32}P]fosfato e [^{3}H]água foi injetada rapidamente na entrada da veia porta. Em

termos de massa os traçadores injetados não alteraram significativamente as concentrações das três substâncias envolvidas. Os valores da radioatividade no efluente fracionado foram expressos como fração da quantidade injetada que aparece por segundo e representados contra o tempo após a injeção. Esta normalização faz com que todas as curvas sejam comparáveis, independentemente da quantidade absoluta de radioatividade injetada. No experimento da figura 4 a área sob as três curvas é igual à unidade, pois nenhuma das substâncias injetadas é significativamente captada numa simples passagem pelo fígado.

As curvas das substâncias marcadas injetadas na veia porta são distorcidas de acordo com os eventos no interior do fígado. A menor distorção ocorre com substâncias tais como a [^{14}C]sacarose que não trocam significativamente com o espaço celular durante uma simples passagem (BRACHT **et al.**, 1980). Como a água troca muito rapidamente com o espaço intracelular, o seu perfil foi distorcido em grau muito maior (GORESKY & BACH, 1970).

A curva do [^{32}P]fosfato é praticamente idêntica àquela da [^{14}C]sacarose, fato que já havia sido notado por BRACHT **et al.**, (1981). Como quantidades mínimas de fosfato são captadas pelo fígado durante uma simples passagem pelo órgão, essa substância pode ser usada no lugar da sacarose como referência para o espaço extracelular e como indicador para a distribuição de frequência dos tempos de trânsito pelos sinusóides (as variáveis $Q_{ref}(t)$ e $Q_{ref}(\tau + t_0)$ na equação [13]). A injeção de três isótopos que podem ser facilmente discriminados num espectrômetro de três canais elimina a necessidade de separações muito trabalhosas. Por esta razão o [^{32}P]fosfato foi utilizado co-

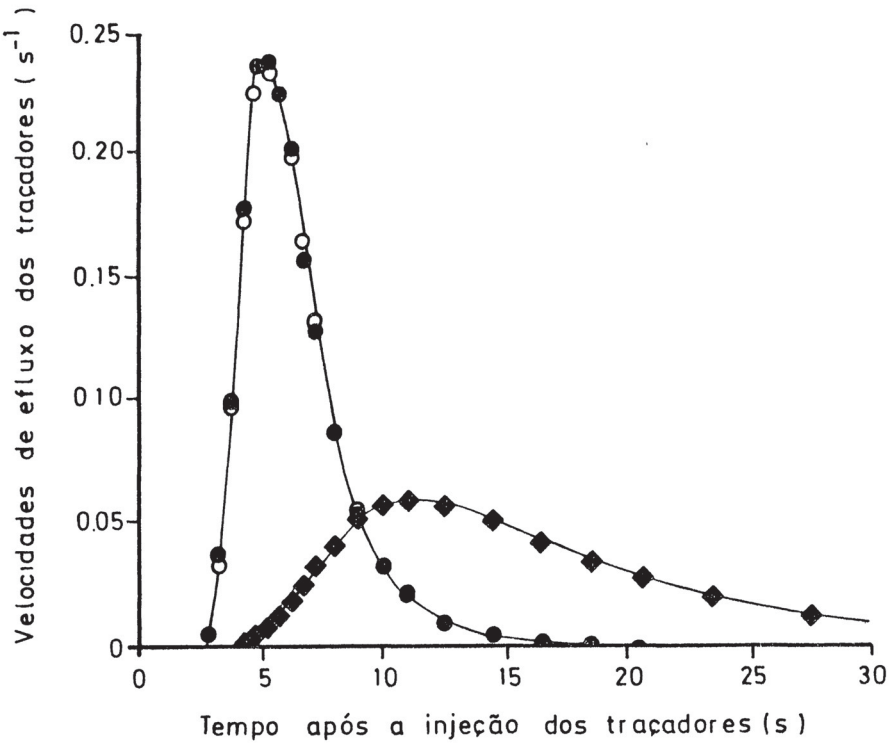


Figura 4. **O perfil das curvas do [^{32}P]fosfato, da [^{14}C]sacarose e da [^{3}H]-água.** O fígado de um rato alimentado foi perfundido no sistema não recirculante, com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (pH 7,4), contendo sacarose 1,0 mM. Amostras dos traçadores foram injetadas simultaneamente no líquido de perfusão, logo na entrada da veia porta. O perfusado efluente foi coletado em microfrações de no mínimo 0,5 segundo e a radioatividade avaliada. As frações das amostras dos traçadores injetados que apareceram no perfusado por segundo foram representadas contra o tempo após a injeção. Legendas: [^{32}P]fosfato (o—o), [^{14}C]sacarose (●——●) e [^{3}H]água (◆——◆).

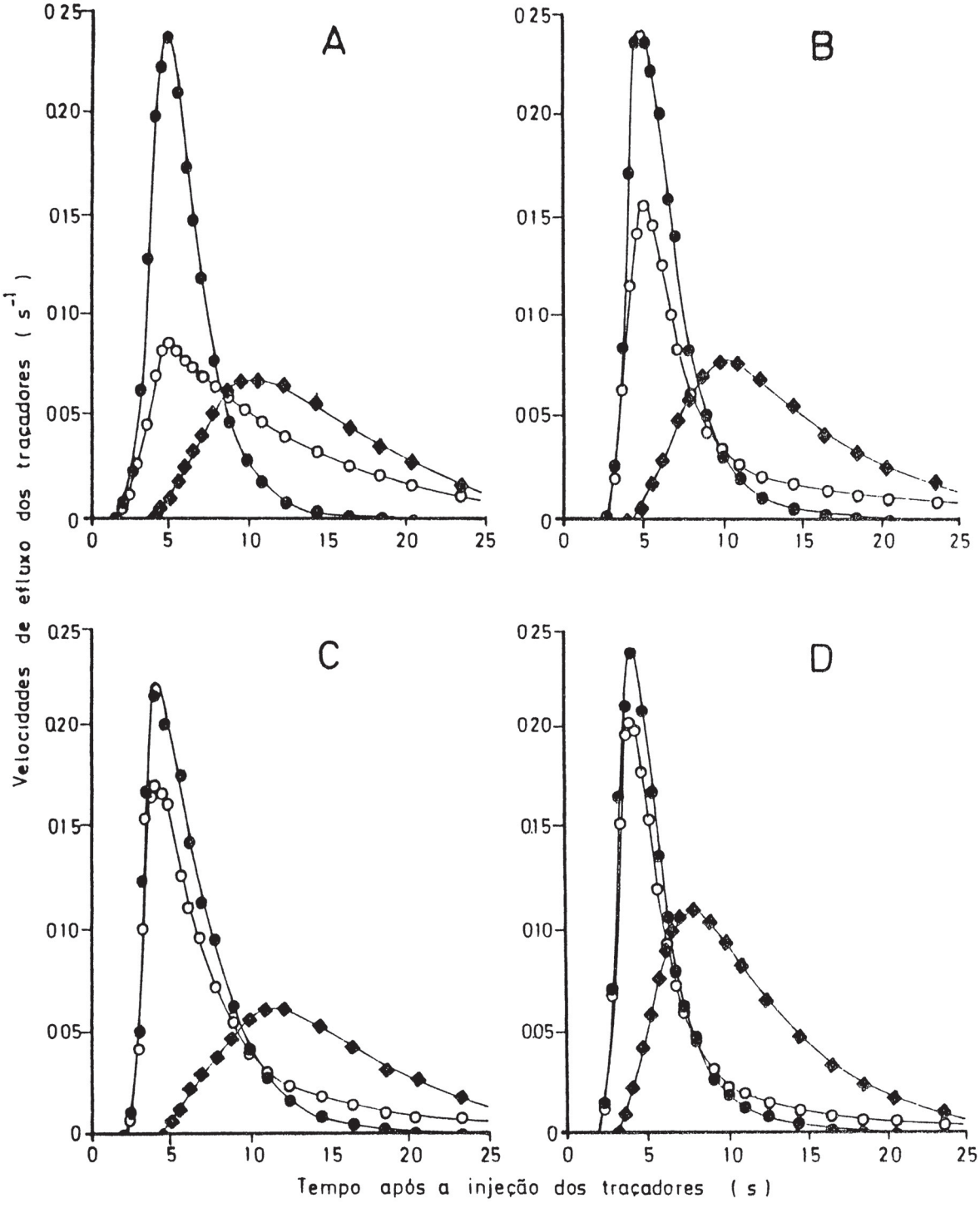


Figura 5. **Perfis das curvas da [1-^{14}C]glucose e indicadores: efeito do steviosídeo e do isosteviol.** Os fígados de ratos alimentados foram perfundidos no sistema não-recirculante com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (pH 7,4) contendo D-glucose (concentrações entre 0,8 e 1,0 mM). Em cada experimento, uma mistura dos traçadores [1- ^{14}C]glucose (○——○), [^{32}P]fosfato (●——●) e [^{3}H]água (◆——◆) foi injetada na entrada da veia porta. As frações da radioatividade injetada que apareceram no perfusado efluente por segundo foram representadas contra o tempo após a injeção. **A**: controle; **B**: steviosídeo 1,5 mM; **C**: steviosídeo 2,5 mM; **D**: isosteviol 1,0 mM.

mo a referência extracelular neste trabalho.

A figura 5 mostra os resultados de quatro experimentos em que a [1-^{14}C]glucose foi injetada juntamente com as suas referências na ausência (**A**, controle) e na presença de steviosídeo 1,5 mM (**B**), steviosídeo 2,5 mM (**C**) e isosteviol 1,0 mM (**D**). O experimento controle (figura 5A) mostra que a posição da curva da [^{14}C]glucose é intermediária entre aquelas do [^{32}P]-fosfato e da [^{3}H]água. Isto reflete o fato de que a D-glucose troca rapidamente com o espaço intracelular, mas uma certa fração parece passar pelo fígado sem ter acesso à célula. As áreas sob as curvas da D-glucose estão próximas à unidade, indicando que a quantidade de radioatividade retida pelo fígado foi negligenciável. Sob as condições dos experimentos mostrados na figura 5 — fígados de ratos alimentados com glucose 0,9 a 1,2 mM no perfusado venoso — os fígados estão liberando D-glucose derivada de glicogênio endógeno (1,2 a 1,8 μmol × min^{-1} × g^{-1}) e estão glicolizando e respirando às expensas de substratos endógenos. Sob tais condições a produção de [^{14}C]lactato, [^{14}C]piruvato ou $^{14}CO_2$ perfaz bem menos do que 1% da radioatividade injetada*. GORESKY & NADEAU (1974) também acharam captação mínima de D-glucose nos seus experimentos com o fígado de cães.

A forma da curva da D-glucose foi alterada quando steviosídeo ou isosteviol estiveram presentes no líquido de perfusão. A razão dos valores dos picos de [^{32}P]fosfato para [^{14}C]glucose, que é 2,6 no experimento controle, diminuiu para 1,5 com steviosídeo 1,5 mM, para 1,3 com steviosídeo 2,5 mM e

---

* Bracht, A, comunicação pessoal.

para 1,15 com isosteviol 1,0 mM. Portanto, a curva da D-glucose tende a aproximar-se daquela da sua referência extracelular, uma indicação de que a velocidade de troca desse composto com o espaço intracelular está sendo diminuída pelo steviosídeo e pelo isosteviol (GORESKY & NADEAU, 1974; BRACHT **et al.**, 1980).

3.2. PARÂMETROS DO TRANSPORTE DE D-GLUCOSE NO FÍGADO DE RATO

As conclusões no final do ítem anterior são quase que intuitivas e de caráter qualitativo. Uma avaliação quantitativa pode ser feita ajustando a equação [13] às curvas. Este ajuste permitirá a obtenção das constantes de velocidade para o transporte em ambas as direções, entrada e saída (k_1 e k_2, respectivamente). Para fazer este ajuste, no entanto, será necessário também obter os valores de t_0 e θ'. Isto poderá ser feito com o auxílio da equação [14], que relaciona as curvas da referência para o espaço total ([^{3}H]água) e da referência para o espaço extracelular ([^{32}P]fosfato). A figura 6 mostra um exemplo típico de como a equação [14] descreve as relações entre as curvas da [^{3}H]água e do [^{32}P]fosfato. O gráfico revela que a curva da [^{3}H]água transformada com os valores otimizados de t_0 = 1,7 s e θ' = 1,45 se superpõe quase que perfeitamente à curva experimental do [^{32}P]fosfato.

De posse dos valores de t_0 e θ' pode-se introduzí-los na equação [13] e otimizar valores de k_1 e k_2. O valor de k_3 deve ser muito pequeno, já que quase nenhuma glucose foi captada e o seu valor pode ser tomado como zero. A figura 7 mostra a concordância entre teoria e prática de dois experimentos escolhidos ao acaso, um deles na ausência de steviosídeo (**A**)

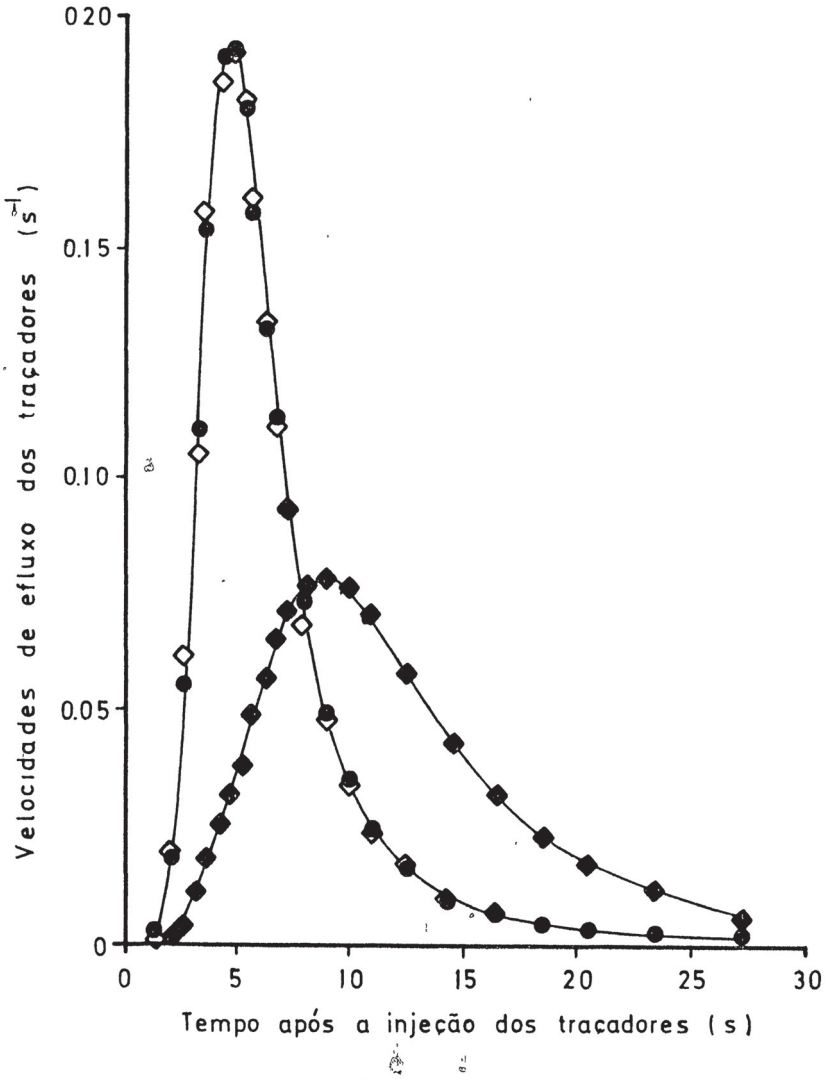


Figura 6. **Perfis das curvas do [^{32}P]fosfato (●—●), da [^{3}H]água (◆—◆) e da curva transformada da [^{3}H]água (◇—◇).** O fígado de um rato alimentado foi perfundido com Krebs/Henseleit-bicarbonato pH 7,4 no sistema não-recirculante. Traços de [^{32}P]fosfato e de [^{3}H]água foram injetados simultaneamente no líquido influente, logo antes da entrada na veia porta. As frações das amostras injetadas que apareceram no perfusado efluente por segundo foram representadas contra o tempo após a injeção. A curva transformada da [^{3}H]água (◇—◇) foi calculada de acordo com a equação [14] com t_0 = 1,7 s e θ' = 1,45. Os valores de t_0 e θ' foram otimizados conforme descrito em **Materiais e Métodos.**

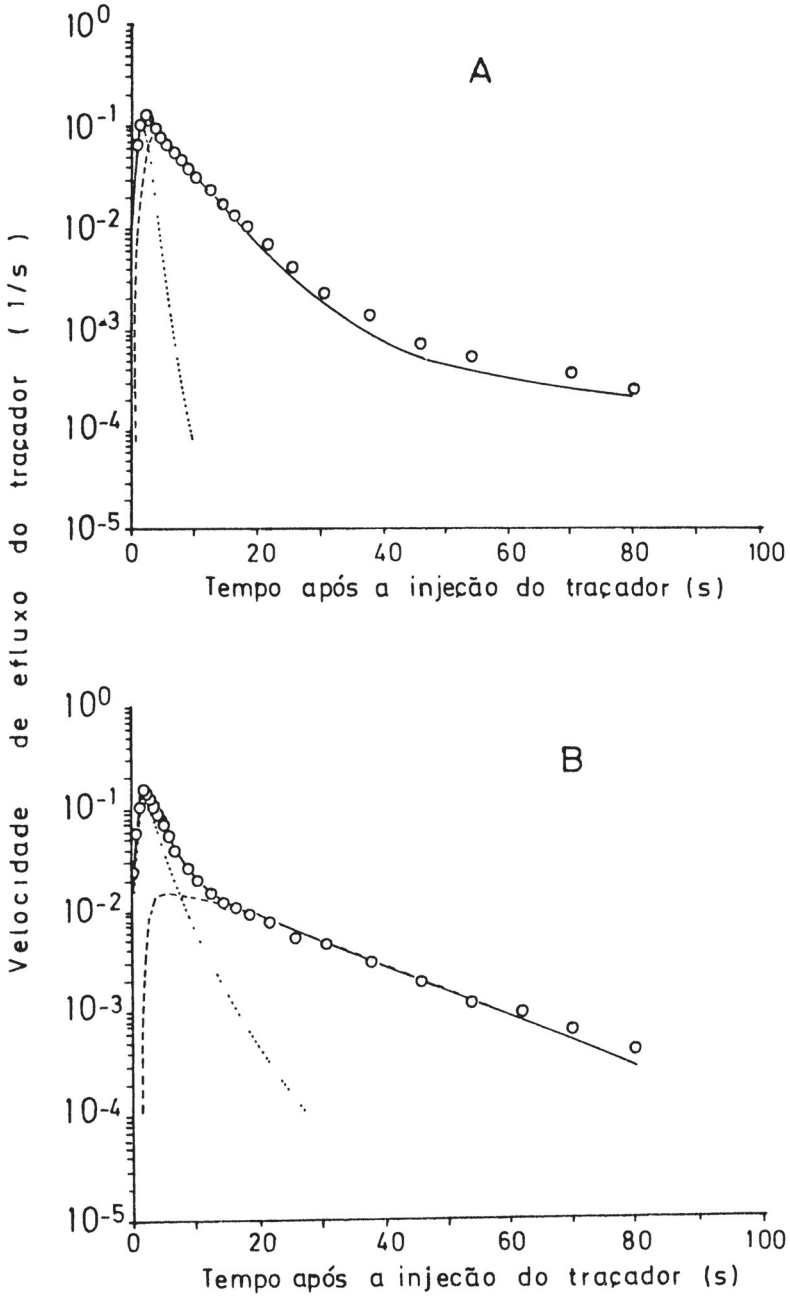


Figura 7. **Curvas experimentais (o o) e calculadas (———) da D-[1-^{14}C]glucose.** Os experimentos de diluição de indicadores múltiplos foram realizados conforme descrito na legenda da figura 5 na ausência (**A**) e na presença (**B**) de steviosídeo 2,5 mM. As frações das quantidades de [1-^{14}C]glucose injetadas que apareceram no perfusado efluente por segundo foram representadas em escala logarítmica contra o tempo decorrido após a injeção, corrigido para t_o. As linhas contínuas representam as curvas teóricas, calculadas com os seguintes parâmetros: (**A**), $k_1\theta' = 0{,}510\ s^{-1}$, $k_2 = 0{,}497\ s^{-1}$; e (**B**), $k_1\theta' = 0{,}0935\ s^{-1}$, $k_2 = 0{,}090\ s^{-1}$. A resolução das curvas teóricas em seus dois componentes, a fração do traçador que trocou ao menos uma vez com o espaço intracelular (- - - - -) e a fração do traçador que não trocou com o espaço celular (· · · · ·), também está representada.

e o outro na presença de steviosídeo 2,5 mM (**B**). Conforme revela a figura 7, as curvas teóricas calculadas com os valores otimizados das constantes k_1 e k_2 concordam bastante bem com as curvas experimentais, indicando que o modelo é uma boa aproximação para os fenômenos que ocorrem após a injeção de D-glucose marcada. A figura 7 mostra também as alterações produzidas por steviosídeo 2,5 mM. As porções da glucose marcada que foi injetada e que não adentraram o espaço celular (**throughput**, linhas pontilhadas) estão representadas, bem como as porções que trocaram ao menos uma vez com o espaço celular (linhas tracejadas). Pode-se verificar que o steviosídeo aumenta a fração não-trocada (**throughput**). Ela passou de 23% no experimento controle para 70% na presença de steviosídeo 2,5 mM. Isto é uma consequência da inibição da troca de glucose entre os espaços intra- e extracelular causada pelo steviosídeo.

Alterações similares nas proporções relativas entre as porções trocada e não-trocada da curva da D-glucose marcada ocorrem também quando a concentração da glucose é aumentada. Este aumento da porção não-trocada em detrimento da porção trocada revela também inibição, porém, desta vez trata-se de uma inibição do transporte da glucose marcada pela glucose não marcada. Este fenômeno, por sua vez, indica a saturação do sistema de transporte, como se verá logo adiante.

A tabela 2 sumariza os resultados de oito experimentos de perfusão e de dezoito experimentos de diluição de indicadores múltiplos realizados com concentrações variáveis de steviosídeo, isosteviol e steviolbiosídeo e com uma concentração de glucose em torno de 1 mM. Em cada experimento de perfusão, uma injeção controle foi feita inicialmente. Após o controle, ste-

Tabela 2. **Parâmetros do transporte de glucose através da membrana celular no fígado de rato perfundido isoladamente e os efeitos do isosteviol, do steviolbiosídeo e do steviosídeo.** Os dados são de oito experimentos de perfusão e de dezoito experimentos de diluição de indicadores múltiplos. As concentrações no perfusado são as médias entre as concentrações no efluente e no influente. As constantes de velocidade foram obtidas ajustando a equação [13] aos dados experimentais. As velocidades de influxo foram calculadas a partir de k_1 e da concentração extracelular de glucose (C_e) e expressos como µmol × min^{-1} × (g de peso úmido do fígado)$^{-1}$. O volume extracelular e o espaço aquoso total do fígado foram calculados a partir dos tempos médios de trânsito (ver equação [15]) do [^{32}P]fosfato e da [^{3}H]água. A razão das concentrações intra- para extracelular (C_i/C_e) foi calculada conforme explicado no texto (equação [17]).

	Concentrações no perfusado (mM)				Constantes de velocidade				
Exp.	D-Glucose C_e	Steviosídeo	Steviolbiosídeo	Isosteviol	Influxo k_1 (s^{-1})	Efluxo k_2	Velocidade de influxo (µmol·min^{-1}·g^{-1})	Inibição do influxo (%)	C_i/C_e calculado de acordo com a equação [17]
1	1,15			0	0,213	0,367	8,60	0	0,65
	1,2			0,5	0,087	0,164	3,71	56	0,92
2	1,1			0	0,289	0,536	10,10	0	0,60
	1,2			1,0	0,056	0,142	2,20	78	0,72
3	1,1			0	0,230	0,390	8,80	0	0,66
	1,1			2,0	0,022	0,053	0,70	92	1,18
4	1,15			0	0,237	0,378	9,80	0	0,70
	1,2			1,0	0,069	0,127	2,90	70	0,89
5	1,0		0		0,232	0,380	11,05	0	0,73
	1,0		2,5		0,115	0,210	5,51	50	0,77
6	1,0	0			0,276	0,497	9,30	0	0,65
	1,05	1,0			0,111	0,193	4,20	54	0,79
	1,0	2,5			0,062	0,090	1,95	79	1,28
	1,05	5,0			0,029	0,053	0,90	91	1,70
7	1,1	0			0,199	0,290	7,50	0	0,84
	1,0	1,5			0,072	0,106	2,60	66	1,12
8	1,0	0			0,247	0,376	8,90	0	0,78
	1,0	1,5			0,083	0,130	3,00	66	1,00
n = 8	1,08±0,06				0,240±0,028	0,402±0,073	9,26±1,0		0,70±0,08

viosídeo, isosteviol ou steviolbiosídeo foram infundidos. No caso do experimento nº 6, a concentração de steviosídeo foi aumentada por etapas. A cada etapa, um experimento de diluição de indicadores múltiplos foi realizado. A concentração de D-glu-se no perfusado, mostrada na tabela 2, é a média aritmética das concentrações no perfusado influente e efluente. A concentração de D-glucose no perfusado efluente é maior por causa da atividade metabólica do fígado.

A tabela 2 mostra também vários parâmetros de transporte obtidos nos cálculos. Para uma concentração média de D-glucose igual a 1,08±0,06 mM, em oito experimentos controle, o k_1 foi igual a 0,240±0,028 ml perfusado × segundo^{-1} × (ml do espaço aquoso intracelular)$^{-1}$, enquanto que k_2 foi igual a 0,402±0,073 ml fase intracelular × segundo^{-1} × (ml do espaço intracelular)$^{-1}$. Como a concentração extracelular é conhecida, as velocidades do influxo unidirecional podem ser calculadas a partir das concentrações e das constantes de velocidade para o influxo (k_1). Para D-glucose 1,08 mM no perfusado, o influxo unidirecional tem uma velocidade igual a 9,26 ± 1,0 µmol× min^{-1} (g de fígado)$^{-1}$, o que corresponde a 16,7 µmol × min^{-1} × (ml do espaço aquoso intracelular)$^{-1}$. O fluxo líquido médio através da membrana celular, conforme revelado pelas medidas de liberação de glucose, foi de 1,5 µmol × min^{-1} × (g de fígado)$^{-1}$. Portanto, o fluxo unidirecional é aproximadamente seis vezes maior que o fluxo líquido, sob essas condições experimentais.

Isosteviol, a aglucona obtida da hidrólise ácida total do steviosídeo diminui a velocidade de transporte da D-glucose. A velocidade do influxo foi diminuída em 92% com isosteviol 2,0 mM. Uma inibição igual a 50%, avaliada por interpolação nu-

Tabela 3. **Dependência do transporte da D-glucose da concentração da D-glucose: efeito do steviosídeo 2,5 mM.** Dados de seis experimentos de perfusão e de doze experimentos de diluição de indicadores múltiplos realizados com diferentes concentrações de D-glucose. Os experimentos de diluição de indicadores múltiplos foram similares àqueles mostrados na figura 5. Todos os cálculos foram realizados conforme descrito na legenda da tabela 2 e no texto.

Exp.	Concentrações no perfusado (mM)		Constantes de velocidade		Velocidade de influxo ($\mu mol \cdot min^{-1} \cdot g^{-1}$)	Inibição do influxo (%)	C_i/C_e calculado de acordo com	
	D-Glucose C_e	Steviosídeo	Influxo k_1 (s^{-1})	Efluxo k_2			Equação [17] (constantes de velocidade)	Equação [18] (tempo médio de trânsito)
1	10	0	0,343	0,616	106,30	0	0,56	0,50
	10	2,5	0,078	0,132	25,12	76	0,63	0,60
2	20	0	0,201	0,313	135,30	0	0,64	0,59
	20	2,5	0,051	0,086	31,35	76	0,59	0,57
3	50	0	0,107	0,186	175,50	0	0,57	0,52
	50	2,5	0,036	0,072	56,97	68	0,50	0,50
4	100	0	0,096	0,146	303,00	0	0,66	0,65
	100	2,5	0,048	0,068	142,00	53	0,69	0,71
5	10	0	0,308	0,468	107,30	0	0,66	0,63
	10	2,5	0,050	0,100	17,66	84	0,50	0,50
6	20	0	0,165	0,265	110,20	0	0,62	0,62
	20	2,5	0,037	0,081	22,96	79	0,46	0,47
n=6	10-100	0					0,62±0,04	0,59±0,06
	10-100	2,5					0,56±0,08	0,56±0,09

mérica, pode ser esperada com uma concentração de isosteviol igual a 0,4 mM para uma concentração extracelular de D-glucose em torno de 1,0 mM. O steviosídeo é menos potente que o isosteviol. Uma inibição igual a 91% ocorre a uma concentração igual a 5,0 mM; 50% de inibição, para uma concentração extracelular de D-glucose de aproximadamente 1,0 mM, deverá ocorrer com steviosídeo 0,85 mM, conforme revelado por interpolação numérica. O steviolbiosídeo, finalmente, foi o menos efetivo. Quando presente numa concentração de 2,5 mM, 50% de decréscimo do influxo foi observado.

A tabela 3 resume os resultados de outra série de experimentos nos quais a concentração de D-glucose foi variada na faixa entre 10 e 100 mM e a concentração do steviosídeo mantida constante e igual a 2,5 mM. Com concentrações crescentes de D-glucose, os valores das constantes de velocidade para o influxo e efluxo, k_1 e k_2, diminuíram. Este fenômeno reflete a saturação do sistema de transporte, o qual se sabe que obedece à cinética de Michaelis-Menten (BAUR & HELDT, 1977). A tabela 4 mostra as constantes cinéticas K_m e V_{max} para o influxo de D-glucose, obtidas ajustando a equação de Michaelis-Menten [$v_{in} = V_{max} \cdot C_e/(K_m + C_e)$] aos dados experimentais usando o procedimento não-linear de mínimos quadrados proposto por WILKINSON (1961). O valor de K_m para a troca da D-glucose com o meio celular em condições de **steady-state**, que dá o melhor ajuste, foi igual a 38,9±12 mM; a velocidade máxima correspondente foi igual a 388±61 μmol × min^{-1} × g^{-1}. O steviosídeo, quando presente numa concentração de 2,5 mM, afeta ambas as constantes. O K_m foi aumentado para 76,1±40 mM e a velocidade máxima foi diminuída para 143±61 μmol × min^{-1} × g^{-1}. Isto indica que a ini-

Tabela 4. **Concentrações de D-glucose para metade da velocidade máxima de influxo (K_m) e velocidades máximas de influxo (V_{max}), na ausência (controle) e na presença de steviosídeo 2,5 mM.** Os dados utilizados são aqueles constantes das tabelas 2 e 3. Os valores de K_m e V_{max} e os correspondentes erros padrões foram obtidos ajustando a equação de Michaelis-Menten [$v_{in} = V_{max} C_e/(K_m + C_e)$] aos dados experimentais usando o procedimento não-linear de mínimos quadrados proposto por WILKINSON (1961).

Condição	K_m (mM)	V_{max} ($\mu mol \cdot min^{-1} \cdot g^{-1}$)
Controle	38,9±12	388±61
Steviosídeo 2,5 mM	76,1±40	143±61

bição causada pelo steviosídeo é, possivelmente, de um tipo misto.

3.3. A CONCENTRAÇÃO INTRACELULAR DE D-GLUCOSE. EFEITO DO STEVIOSÍDEO E SEUS DERIVADOS

Os experimentos de diluição de indicadores múltiplos permitem determinar também a distribuição da substância em estudo nos espaços intra- e extracelular em condições de equilíbrio ou em condições de **steady-state** (SCHWAB **et al.**, 1979; BRACHT **et al.**, 1981).

A razão das concentrações intra- para extracelular (C_i/C_e) pode ser calculada a partir das constantes de velocidade, do fluxo líquido através da membrana e da concentração extracelular. Nas condições do nosso estudo, onde k_3 a constante de velocidade para a captação de glucose é praticamente nula, a taxa de variação da concentração intracelular de glucose (C_i) é dada pela seguinte relação:

$$\frac{dC_i}{dt} = k_1C_e - k_2C_i + F_g, \qquad [16]$$

onde F_g é a taxa de liberação de glucose pelo fígado. Em condições de **steady-state**, dC_i/dt é igual a zero e em consequência F_g também corresponde ao fluxo líquido através da membrana. O valor de C_i/C_e pode então ser calculado através da seguinte expressão:

$$\frac{C_i}{C_e} = \frac{k_1 + F_g/C_e}{k_2} \qquad [17]$$

Deve-se salientar que, para altas concentrações de D-glucose, $k_1 \gg F_g/C_e$, e a concentração intracelular de D-glucose é então virtualmente independente do metabolismo (**i. e.**, $C_i/C_e = k_1/k_2$).

Deve-se salientar também, que a constante de velocidade k_1 é calculada de $k_1\theta'$, sendo θ' a razão dos espaços aquosos intra- para extracelular. Consequentemente, a concentração intracelular determinada é uma média de todo o espaço aquoso intracelular incluídos todos os compartimentos subcelulares. Este espaço não corresponde necessariamente ao espaço intracelular ao qual a D-glucose marcada tem acesso durante uma simples e rápida passagem através do fígado.

Alternativamente, o valor de C_i/C_e pode também ser calculado dos tempos médios de trânsito da D-glucose marcada e indicadores, desde que condições de equilíbrio ou quase-equilíbrio estejam predominando (SCHWAB **et al.**, 1979; BRACHT **et al.**, 1981), o que ocorre em altas concentrações de glucose. A seguinte expressão

$$\frac{C_i}{C_e} = (\bar{t}_g - t_p)/(\bar{t}_w - \bar{t}_p) \qquad [18]$$

permite o cálculo de C_i/C_e a partir dos tempos médios de trânsito da D-glucose marcada ($\bar{t}_g$), do fosfato marcado ($\bar{t}_p$) e da água marcada ($\bar{t}_w$).

Os resultados dos cálculos estão mostrados nas tabelas 2 e 3. Para uma concentração extracelular de D-glucose igual a 1,08 mM, o valor médio de C_i/C_e é 0,70±0,08 (tabela 2). Forte inibição do transporte em ambas as direções leva a um aumento nos valores de C_i/C_e, quando comparado com os controles. Isto é particularmente evidente no caso do experimento 6, no qual a concentração do steviosídeo foi aumentada em etapas. Cada etapa resultou num aumento na razão das concentrações. Com steviosídeo 5 mM, a razão era 2,6 vezes maior do que o controle correspondente.

Na faixa de concentração da D-glucose entre 10 e 100 mM, o fluxo metabólico é muito pequeno em comparação com os altos fluxos unidirecionais através da membrana, **i. e.**, $C_i/C_e = k_1/k_2$. Consequentemente, os valores de C_i/C_e podem também ser calculados a partir dos tempos médios de trânsito. A tabela 3 mostra uma comparação dos resultados obtidos empregando as equações [17] e [18]. Os valores obtidos concordam dentro de uma margem razoável. Além disto, não há alteração na razão C_i/C_e na faixa que vai de 10 a 100 mM, o valor médio (em torno de 0,6) sendo menor do que aquele achado com glucose 1 mM. Isto é de se esperar,caso se considere o fato de que, em altas concentrações de D-glucose, o metabolismo é muito pouco significativo quando comparado com a grande velocidade dos fluxos através da membrana.

Por outro lado, o steviosídeo não produziu alterações significativas na razão C_i/C_e nesta faixa de concentração de glucose entre 10 e 100 mM. Isto deve-se novamente ao fato de o metabolismo não ser significativo quando comparado com os fluxos através da membrana, mas também é uma consequência do fato de o steviosídeo afetar tanto a constante de velocidade para o influxo (k_1) como também a constante de velocidade para o efluxo (k_2),em proporções aproximadamente iguais.

3.4. RELAÇÕES ENTRE A INIBIÇÃO DO TRANSPORTE DE GLUCOSE E O METABOLISMO

Uma vez estando clara a ação inibidora do steviosídeo e seus derivados sobre o transporte de glucose, pode-se indagar acerca das eventuais consequências metabólicas que esta inibi-

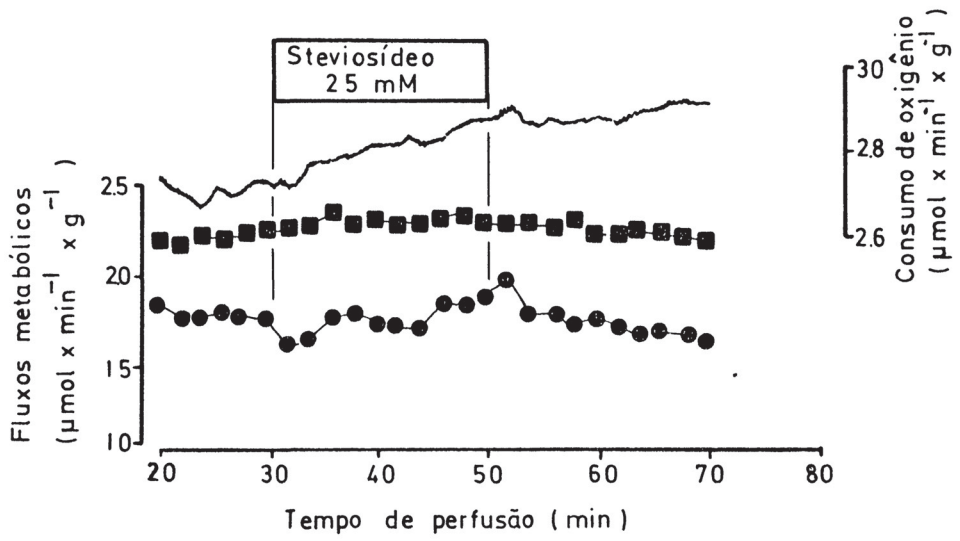


Figura 8. **Efeito do steviosídeo sobre os fluxos metabólicos do fígado de rato perfundido isoladamente.** O fígado de um rato alimentado foi perfundido com tampão KREBS/HENSELEIT-bicarbonato, pH 7,4. Amostras do perfusado efluente foram coletadas em intervalos de dois minutos. A D-glucose foi determinada colorimetricamente. O L-lactato e o piruvato foram dosados enzimaticamente. O consumo de oxigênio foi monitorado continuamente por polarografia. Os fluxos metabólicos foram calculados a partir das diferenças artério-venosas, do fluxo constante e do peso úmido do fígado e expressos como µmol × min^{-1} × g^{-1}. Legendas: consumo de oxigênio (traço); liberação de glucose (●——●); produção de L-lactato + piruvato (■——■).

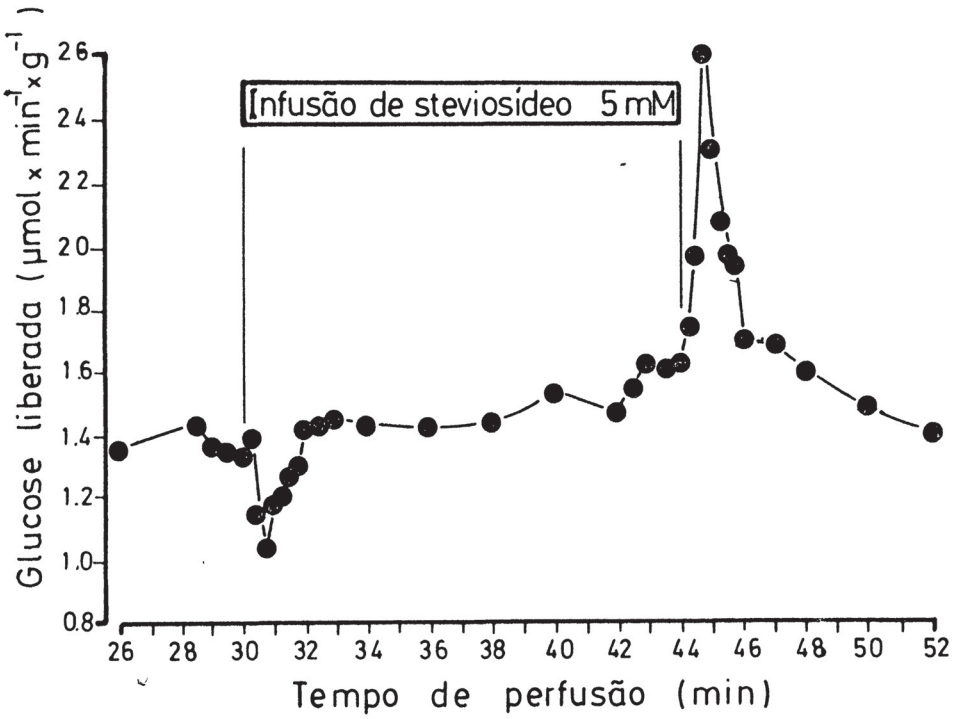


Figura 9. **Efeito do steviosídeo sobre a liberação de glucose pelo fígado de rato perfundido isoladamente.** O fígado de um rato alimentado foi perfundido com tampão KREBS/HENSELEIT-bicarbonato pH 7,4 no sistema não recirculante. O steviosídeo na concentração de 5,0 mM foi infundido no líquido de perfusão entre 30 e 44 minutos, conforme indicado pela barra horizontal. Amostras do perfusado efluente foram coletadas em intervalos de 15 segundos, 30 segundos ou 60 segundos. A concentração da D-glucose foi medida colorimetricamente. Os valores foram expressos como µmol liberados por minuto por grama de peso úmido do fígado.

ção pode provocar. Os experimentos deste trabalho foram realizados com os fígados em condições eminentemente glicogenolíticas, **i. e.**, com os fígados liberando glucose a partir de glicogênio endógeno. Os dados apresentados a seguir, no entanto, podem ser aplicados igualmente para a liberação de glucose proveniente de atividade gluconeogênica.

Em princípio, uma inibição da troca de glucose entre os espaços intra- e extracelular, a menos que seja completa ou virtualmente completa, não deveria afetar a degradação de glicogênio e nem mesmo a taxa de liberação da glucose proveniente desta degradação. O máximo que pode ocorrer é uma elevação da concentração intracelular, em decorrência de uma queda na atividade do sistema de transporte. A elevação da concentração compensa o decréscimo na atividade do sistema, já que a atividade deste último é dependente justamente da concentração da substância a transportar. A degradação de glicogênio somente será afetada se a inibição do transporte for pronunciada a ponto de levar a concentração intracelular de glucose para valores acima de 10 mM,que é mais ou menos o limiar a partir do qual o órgão passa a acumular ao invés de degradar glicogênio (ROSS **et al.**, 1967).

Devido à alta atividade do sistema de transporte que ainda está longe de estar saturado na concentração fisiológica de 5 mM, a detecção de fenômenos decorrentes de uma inibição do transporte somente é possível em concentrações baixas de glucose. A figura 8 mostra os resultados de um experimento típico,no qual a atividade metabólica de um fígado retirado de um animal alimentado foi medida na ausência de quaisquer substratos exógenos. A glicólise (produção de L-lactato + piruvato)

a liberação de D-glucose e o consumo de oxigênio foram medidos e expressos como $\mu mol \times min^{-1} \times g^{-1}$. A infusão de steviosídeo 2,5 mM não provoca alterações significativas nos fluxos de **steady-state**. Estes resultados confirmam os dados da literatura sobre a incapacidade do steviosídeo em inibir a fosforilação oxidativa em sistemas de células intactas (KELMER-BRACHT **et al.**, 1985; YAMAMOTO **et al.**, 1985) e mostram também que uma inibição parcial do transporte de glucose, ainda que bastante pronunciado, não tem efeito sobre os níveis de **steady-state** da liberação de glucose.

No experimento da figura 8, no entanto, as amostras do perfusado foram coletadas em intervalos de 2 minutos, o que pode impedir a detecção de variações rápidas e transitórias. O experimento mostrado na figura 9, pelo contrário, oferece uma melhor resolução do efeito do steviosídeo sobre a liberação de glucose. Neste experimento o perfusado foi coletado em intervalos de 15, 30, 60 ou 120 segundos, conforme as necessidades de resolução reveladas por experimentos preliminares. Pode-se ver que uma redução transitória na taxa de liberação de glucose ocorreu quando do início da infusão de steviosídeo. O mesmo fenômeno, mas em direção oposta, ocorreu quando a infusão de steviosídeo foi interrompida. As variações transitórias não excederam os 2 minutos no experimento mostrado na figura 9. Em outros experimentos, dependendo do fluxo, peso do fígado e da atividade metabólica, o fenômeno era ainda evidente aos 3 minutos do início ou encerramento da infusão de steviosídeo. A figura 9 mostra resultados obtidos com steviosídeo 5 mM, mas o fenômeno transitório foi também observado com steviosídeo 2,5 mM. Como se verá adiante, o fenômeno transitório não é conse-

quência de uma hidrólise do steviosídeo. A interpretação mais simples para os fenômenos transitórios da figura 9 tem relação com o aumento na concentração intracelular de D-glucose causado pelo steviosídeo e seus derivados, conforme consta da tabela 2. A diminuição transitória da figura 9, quando do início da infusão, pode ser consequência do aumento na concentração intracelular, que é completada neste intervalo de tempo. Da mesma forma, o aumento transitório quando a infusão é terminada pode ser consequência do decréscimo na concentração intracelular, que retorna aos níveis anteriores à infusão do inibidor.

3.5. OS PERFIS DAS CURVAS DA D-FRUTOSE E INDICADORES. EFEITO DO STEVIOSÍDEO

Foi mostrado que a frutose é transportada pelo mesmo sistema que transporta a glucose (BAUR & HELDT, 1977) e que a velocidade com que a frutose é transportada é bem menor que a velocidade de transporte da glucose. Além disto, a velocidade de metabolização da frutose pelo fígado é consideravelmente superior à velocidade de metabolização da glucose (ZEHNER **et al.**, 1973; SESTOFT, 1974; WOODS **et al.**, 1970), tendo em vista esta combinação de fatos — menor velocidade de transporte e maior velocidade de metabolização — pode-se esperar que uma inibição do transporte tenha realmente consequências para o metabolismo.

A realização de experimentos de diluição de indicadores múltiplos com frutose marcada apresenta problemas de natureza experimental. A frutose é transformada pelas células do fígado em vários compostos. Entre eles, estão glucose, L-lactato, piruvato e quantidades menores de glicerol. Por isto, procedi-

mentos complexos de separação são indispensáveis, caso se utilize frutose marcada com carbono quatorze ou trício. Uma maneira simples de obter dados preliminares é injetar frutose não-marcada, já que esta pode ser dosada colorimetricamente com elevado grau de precisão. A figura 10 mostra os resultados de experimentos representativos, nos quais as referências usuais ([^{32}P]fosfato e [^{3}H]água) foram injetados simultaneamente com cerca de 4,5 µmol de D-frutose não marcada. O experimento da figura 10**A** foi feito na ausência de steviosídeo e o da figura 10**B** na presença de steviosídeo 2,5 mM.

O perfil das curvas da D-frutose difere bastante daquele da D-glucose (figura 5). Na curva da D-frutose, os pontos experimentais estão sempre abaixo daqueles da referência para o espaço extracelular e a área sob a curva não é igual à unidade, denotando transformação metabólica. No caso do experimento controle (figura 10**A**), a área sob a curva de D-frutose é igual a 0,7, o que significa que 30% da frutose injetada foi transformada pelo metabolismo celular. A razão dos valores do pico do fosfato marcado e da D-frutose foi igual a 1,4.

O steviosídeo provoca dois tipos de alterações (figura 10**B**). A área sob a curva aumenta, passando a 0,9 no experimento da figura 10**B**, o que significa que a quantidade captada de frutose diminuiu para 10% da quantidade injetada. A curva está também bem mais próxima da referência para o espaço extracelular. A razão dos picos de fosfato marcado para frutose é agora igual a 1,1. A exemplo da curva controle, no entanto, também na presença de steviosídeo a curva da D-frutose corre sempre abaixo da curva da referência extracelular. Se o decréscimo na captação fosse consequência de algum fenômeno intracelular, a

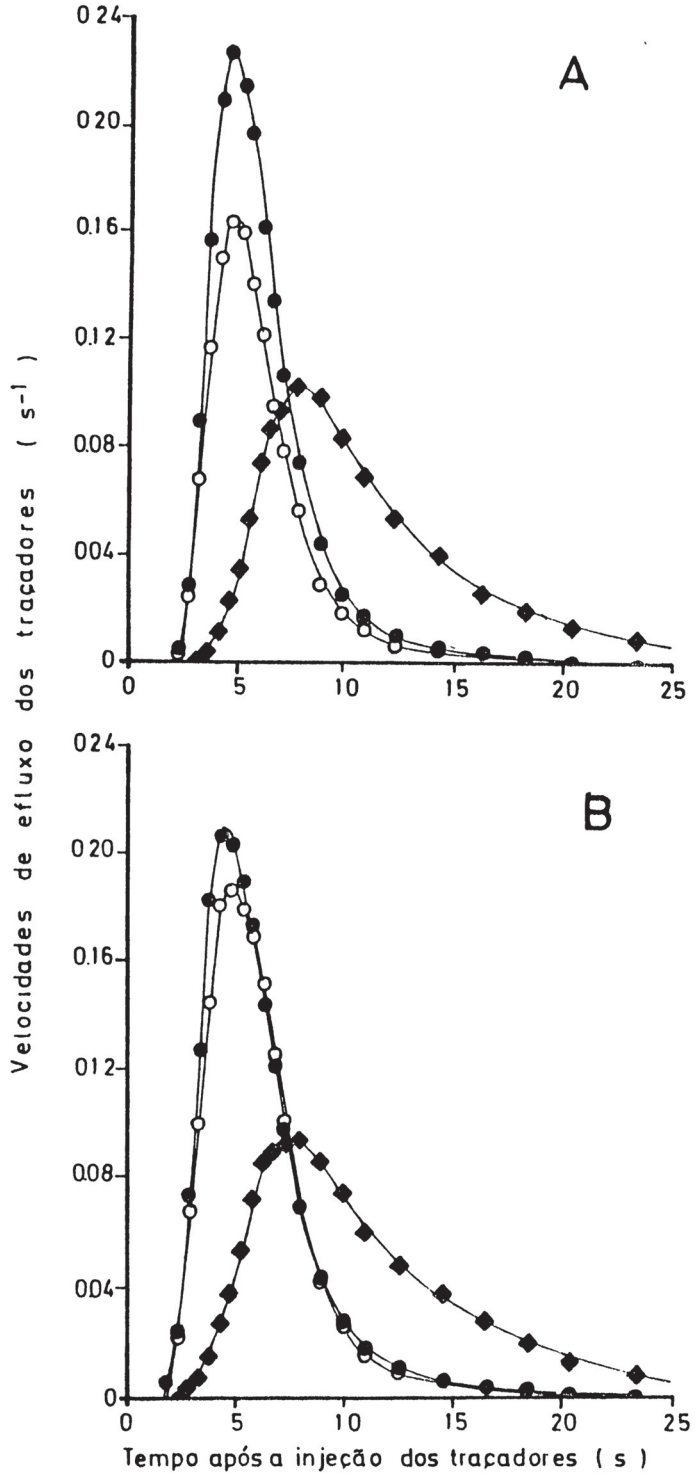


Figura 10. **Perfis das curvas da D-frutose e de indicadores: efeito do steviosídeo.** Dois experimentos de diluição de indicadores múltiplos com injeção simultânea de [^{32}P]fosfato, [^{3}H]água e 4,5 µmol de D-frutose foram realizados consecutivamente num fígado de rato perfundido com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato pH 7,4 no sistema não-recirculante. O primeiro foi feito na ausência (**A**) e o segundo na presença (**B**) de steviosídeo 2,5 mM. As frações da amostras dos traçadores e da D-frutose injetada que apareceram no perfusado efluente por segundo foram representadas contra o tempo após a injeção. D-Frutose: o—o; [^{32}P]fosfato: ●—●; [^{3}H]água ◆—◆.

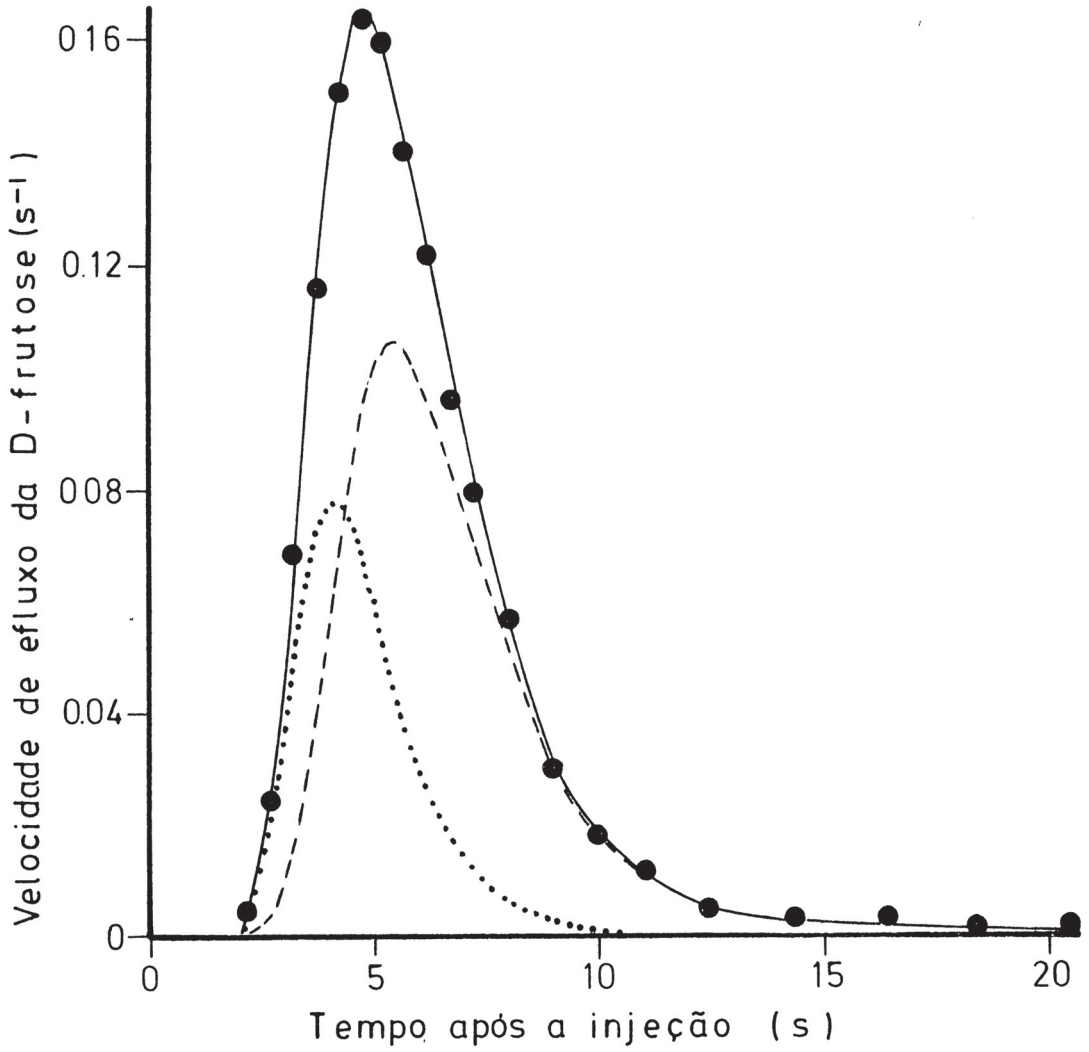


Figura 11. **Curvas teórica e experimental de D-frutose.** A equação [13] foi ajustada à curva da D-frutose da figura 10**A.** A linha sólida representa a curva calculada com os seguintes valores para os parâmetros: k_1 = 0,335 s^{-1}; k_2 = 3,61 s^{-1}; k_3 = 0,86 s^{-1}; t_o = 1.911 s; e θ' = 1.269. A resolução da curva teórica nos seus componentes, a porção trocada (----) e a porção não-trocada (····), também é mostrada.

curva da D-frutose deveria cortar a curva da referência em algum ponto após o pico. Na verdade, o que ocorre é uma aproximação dos picos da curva da D-frutose e da referência. Isto indica muito mais que houve um aumento na porção não-trocada **(throughput)**, aumento este que sempre denota um decréscimo na velocidade com que a substância permeia a membrana celular (BRACHT **et al.**, 1980; SCHWAB **et al.**, 1979). É razoável concluir desta análise, que o steviosídeo inibe o transporte também de D-frutose.

Pode-se tentar também obter dados quantitativos de experimentos como aqueles mostrados na figura 10. O ajuste da equação [13] aos dados levará à estimativa de constantes de velocidade (k_1, k_2 e k_3). O problema é que será difícil estimar o real significado destas constantes assim avaliadas, pois os experimentos da figura 10 não foram feitos em condições de estado estacionário. Por isto não se pode ter nenhuma certeza de que a condição 3. das premissas do modelo de Goresky (ver página 37) está realmente assegurada. Na verdade isto é bastante improvável, pois as variações na concentração de D-frutose não são constantes no tempo e no espaço e por isto mesmo não se pode esperar constância das velocidades de transporte e metabolismo. Assim, ao se proceder a um ajuste da equação [13] aos dados da figura 10 não se pode fazer nenhuma comparação dos parâmetros obtidos com aqueles descritos para a D-glucose. No máximo pode-se comparar os dois experimentos, A e B, mesmo assim com reservas.

A figura 11 mostra como a equação [13] ajusta aos dados do experimento mostrado na figura 10**A**. Na realidade a concordância é boa (erro padrão da estimativa igual a $1{,}97 \times 10^{-3}$),

embora o valor de k_2 (3,61 s^{-1}) seja muito maior do que o de k_1 (0,335 s^{-1}), o que pode significar que a curva está realmente distorcida. Por outro lado, as curvas obtidas com steviosídeo no meio de perfusão também ajustam bem à equação [13], mas apenas o primeiro termo da equação $\{Q_{ref}(t)\cdot\exp[k_1\theta'(t - t_0)]\}$ é suficiente para descrever a curva, isto é, apenas k_1 pode ser determinado. O valor de k_1 no experimento da figura 10B é igual a 0,0117 s^{-1}(erro padrão da estimativa = 1,1 $\times 10^{-2}$), bem menor do que no controle, o que pode ser encarado também como uma indicação de que o steviosídeo inibe o transporte de D-frutose.

3.6. A INIBIÇÃO DO TRANSPORTE DE FRUTOSE E AS CONSEQUÊNCIAS PARA O METABOLISMO

Além dos experimentos de diluição de indicadores múltiplos, o efeito do steviosídeo sobre o metabolismo da D-frutose pode também ser estudado através de medidas dos fluxos de **steady-state.** A figura 12 apresenta os resultados de um experimento representativo no qual a D-frutose e o steviosídeo foram infundidos a taxas constantes. Fígados de ratos em jejum foram utilizados com o objetivo de minimizar interferência do metabolismo do glicogênio. Como mostra a figura 12, a produção de D-glucose, L-lactato e piruvato foi mínima antes da infusão de D-frutose. O início da infusão de D-frutose causa um aumento súbito na produção de D-glucose como também no consumo de oxigênio. Ambas variáveis, no entanto, diminuem progressivamente para valores estacionários mais baixos. Este estado estacionário é mantido durante 2 horas ao menos. A produção de

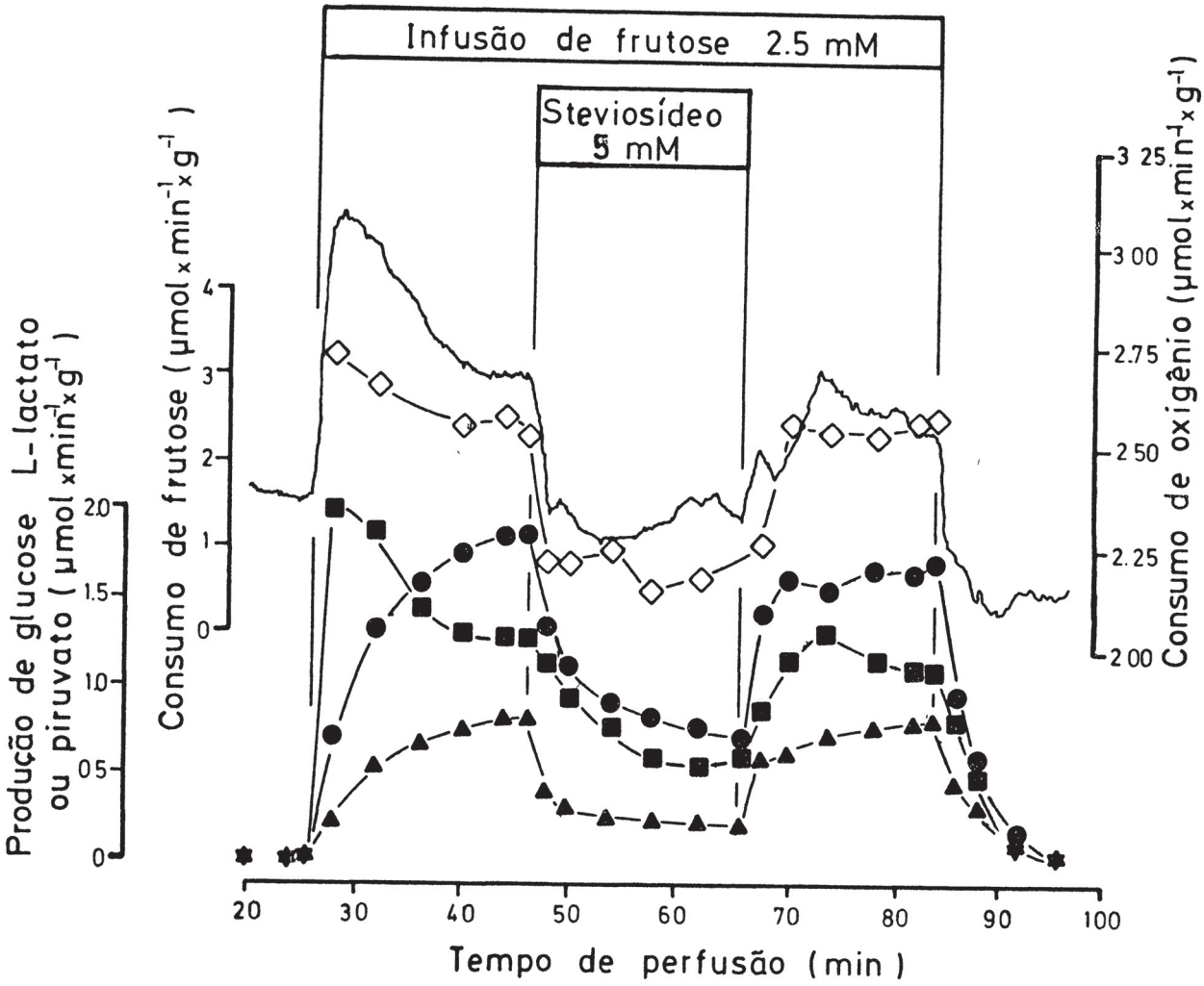


Figura 12. **Efeito do steviosídeo sobre o metabolismo da D-frutose em fígado de rato perfundido isoladamente.** O fígado de um rato mantido em jejum por 24 horas foi perfundido com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato pH 7,4 no sistema não-recirculante. A D-frutose (concentração de 2,5 mM) foi infundida no perfusado entre 26 e 84 minutos e o steviosídeo (concentração de 5,0 mM) entre 46 e 66 minutos de perfusão. O perfusado efluente foi coletado em intervalos de 2 ou 4 minutos. As concentrações de L-lactato, de piruvato e de D-glucose foram determinadas enzimaticamente e a concentração de frutose por método colorimétrico. A concentração de oxigênio no perfusado efluente foi monitorada continuamente com um eletrodo de platina. Os fluxos metabólicos foram calculados das diferenças artério-venosas e do fluxo constante e expressos como µmol × min^{-1} × (grama de peso úmido do fígado)$^{-1}$. Legendas: consumo de oxigênio (traço); consumo de D-frutose (◇——◇); produção de L-lactato (●——●); produção de piruvato (▲——▲); produção de D-glucose (■——■).

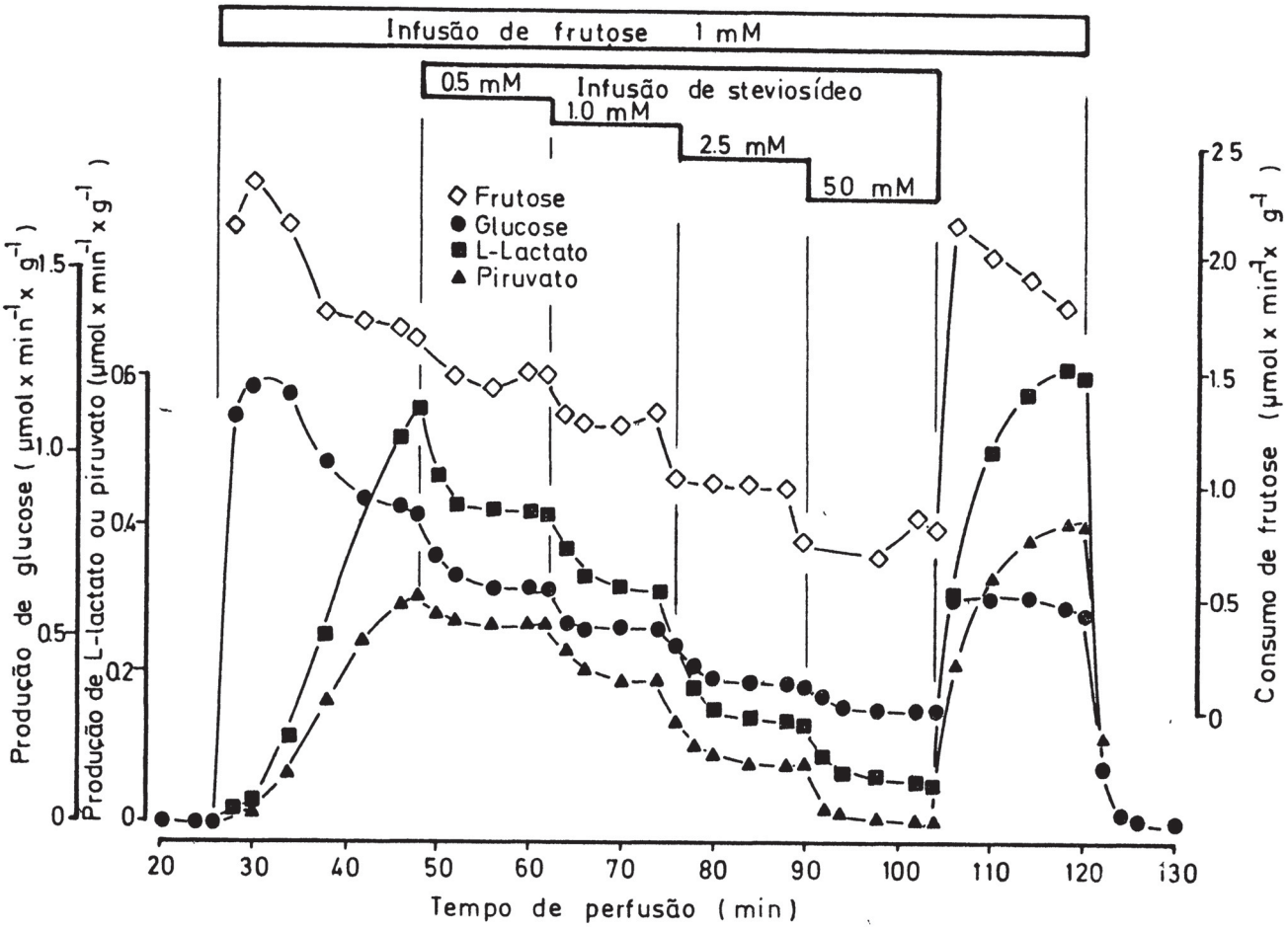


Figura 13. **Efeito do steviosídeo sobre o metabolismo da frutose: dependência da concentração.** O fígado de um rato mantido em jejum por 24 horas foi perfundido com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato pH 7,4, saturado com uma mistura de O_2/CO_2 (95/5), no sistema não-recirculante. A frutose (concentração de 1,0 mM) foi infundida no perfusado entre 6 a 122 minutos. O steviosídeo foi infundido em etapas de concentrações crescentes (0,5; 1,0; 2,5; e 5,0 mM) conforme indicado pelas barras horizontais. Amostras do perfusado efluente foram coletadas em intervalos de 2 ou 4 minutos e as concentrações de glucose, L-lactato e piruvato determinadas enzimaticamente. As concentrações de frutose foram medidas colorimetricamente. As taxas de produção de L-lactato (■——■), piruvato (▲——▲), D-glucose (●——●) e as taxas de consumo de D-frutose (◇——◇) foram calculadas das diferenças artério-venosas e do fluxo e expressas como µmol × minuto^{-1} × (grama de peso úmido do fígado)$^{-1}$.

L-lactato e piruvato aumenta lentamente e atinge um **plateau** 20 minutos após o início da infusão de D-frutose. Concomitantemente com os picos de produção de D-glucose e consumo de oxigênio, o consumo de frutose também mostrou valores elevados no início da infusão. Esses valores, no entanto, logo diminuíram para um estado estacionário em torno de 2,7 $\mu mol \times min^{-1} \times g^{-1}$. A infusão de steviosídeo a 46 minutos causou uma inibição do consumo de D-frutose e da produção de D-glucose, L-lactato e piruvato. O consumo de oxigênio também foi inibido. Em relação a esta última variável, convém lembrar que quando não havia nenhum substrato no meio de perfusão (figura 8), o steviosídeo não tinha qualquer efeito. Além disto, uma série de experimentos realizados com várias concentrações de steviosídeo e de D-frutose revelaram que o efeito sempre foi restrito ao consumo extra de oxigênio causado pela D-frutose. Uma outra característica dos efeitos do steviosídeo sobre o metabolismo da frutose é que todos eles são reversíveis, isto é, eles cessam quando a infusão do steviosídeo é encerrada.

Para quantificar melhor o efeito do steviosídeo, experimentos foram realizados nos quais a concentração de D-frutose foi mantida constante (1 mM) e a concentração de steviosídeo foi aumentada em etapas de 0,5 a 5,0 mM. Cada concentração de steviosídeo foi mantida constante por 16 minutos. O consumo de D-frutose, a produção de D-glucose e de L-lactato + piruvato foram avaliados e representados contra o tempo na figura 13. Pode-se verificar que a cada aumento na concentração de steviosídeo corresponde um aumento na resposta dos diversos parâmetros. Ao final do experimento, confirma-se aqui também a reversibilidade dos efeitos do steviosídeo. A figura

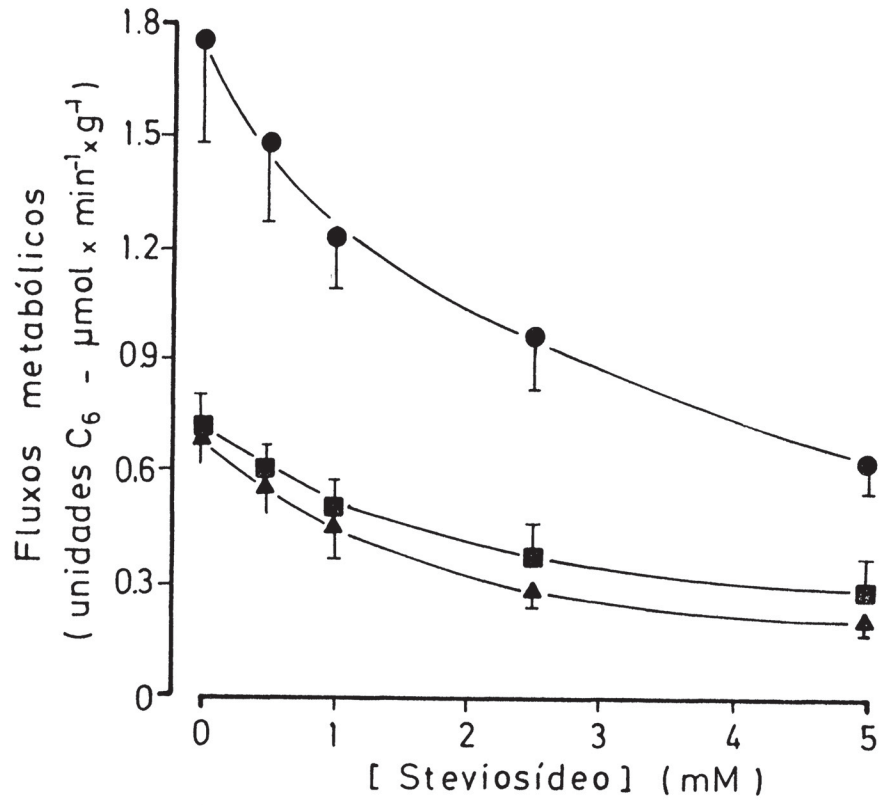


Figura 14. **Curvas dose-resposta das variações causadas pelo steviosídeo no consumo de D-frutose (●—●) e na produção de D-glucose (■—■) e de L-lactato + piruvato (frutólise, ▲—▲) no fígado de rato perfundido isoladamente.** As taxas de produção de D-glucose, L-lactato e piruvato e de consumo de frutose foram determinadas em experimentos idênticos àquele mostrado na figura 13. Os pontos experimentais correspondem aos valores de **steady-state** atingidos entre os 10-14 minutos após cada modificação na concentração de steviosídeo. Os valores obtidos foram expressos em µmol de unidades de 6 carbonos liberados ou consumidos por minuto por grama de peso úmido do fígado. Os pontos representam a média de três experimentos e as barras verticais o erro padrão da média.

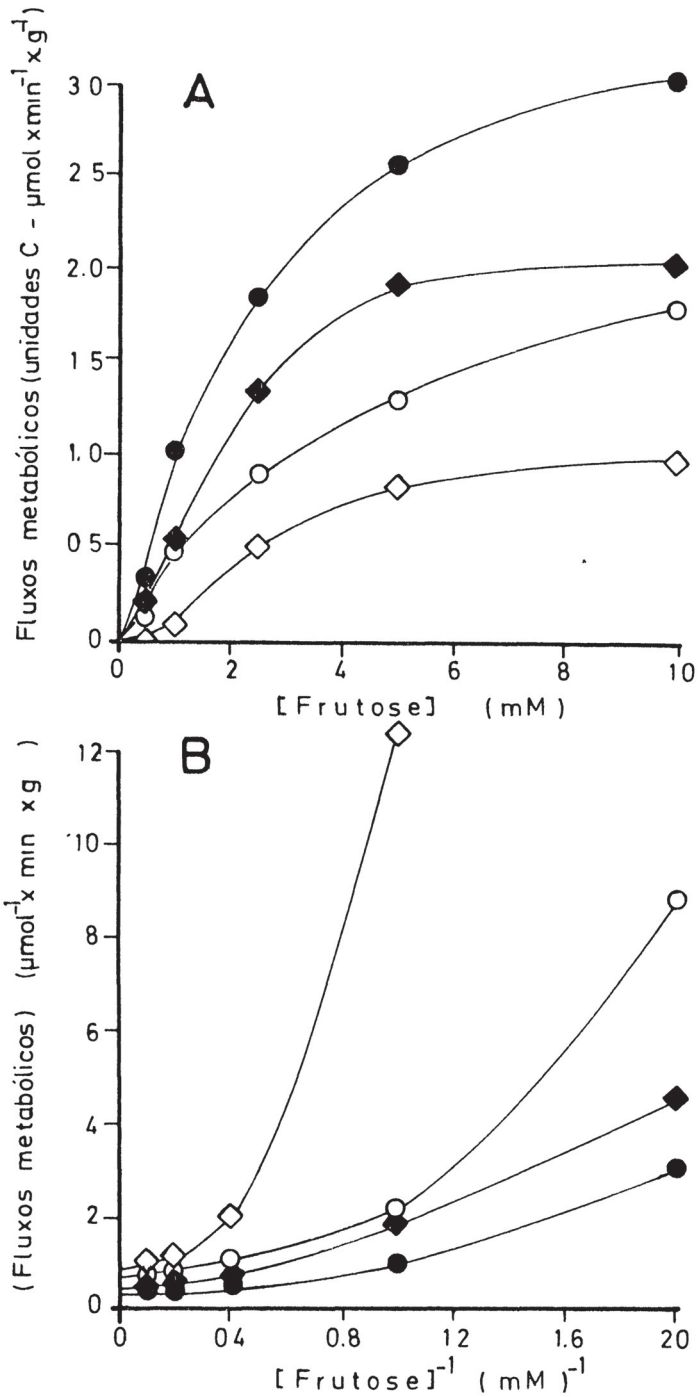


Figura 15. **Dependência das taxas de produção de L-lactato + piruvato (◆, ◇) e de produção de D-glucose (●, ○) da concentração arterial de D-frutose: efeito do steviosídeo.** As taxas de frutólise (produção de L-lactato + piruvato) e de produção de D-glucose, foram determinadas em uma série de experimentos similares ao da figura 12, nos quais várias concentrações de frutose (0,05 a 10,0 mM) foram infundidas. A concentração de steviosídeo foi sempre de 5,0 mM em todos os experimentos. Os fluxos metabólicos foram expressos em µmol de unidades de 6 carbonos liberados por minuto por grama de fígado e representados contra as concentrações de frutose (**A**). A figura (B) mostra uma representação duplamente-recíproca. Legendas: produção de D-glucose (controle, ●—●); frutólise (controle, ◆—◆); produção de D-glucose (steviosídeo 5,0 mM, ○—○); frutólise (steviosídeo 5,0 mM; ◇—◇).

14 mostra os valores médios dos valores de **steady-state** (entre 10-14 minutos após alteração na concentração de steviosídeo) de três experimentos com o mesmo esquema de tempo daquele mostrado na figura 13. O consumo de frutose com frutose 1 mM presente no perfusado arterial (portal) é de 1,8 µmol por minuto por grama após terem sido atingidas condições estacionárias. A soma da produção de D-glucose, L-lactato e piruvato, expressa em termos de unidades de seis carbonos (unidades C_6) atinge 1,45 µmol × min^{-1} × g^{-1} . Isto significa que 80% da D-frutose transformada retornou ao meio de perfusão na forma de D-glucose, L-lactato e piruvato. Esta proporção permaneceu aproximadamente constante para todas as concentrações de steviosídeo entre 0,5 e 5,0 mM. Com steviosídeo 5,0 mM, por exemplo, para uma taxa de consumo de D-frutose de 0,65 µmol × min^{-1} × g^{-1} (63% de inibição em relação ao controle), a produção de D-glucose, L-lactato e piruvato atingiu 0,51 µmol × min^{-1} × g^{-1}, o que corresponde a 83% do total do metabolismo da D-frutose. No entanto, a frutólise (produção de L-lactato + piruvato) foi inibida mais fortemente do que a produção de D-glucose. Isto é revelado, por exemplo, pelas concentrações de steviosídeo que produzem 50% de inibição. No caso da produção de D-glucose, 50% de inibição ocorre com steviosídeo 3 mM, mas a frutólise já está inibida em 50% com uma concentração em torno de 1,8 mM.

O experimento mostrado na figura 12 foi repetido mais doze vezes, mas com diferentes concentrações de D-frutose (entre 0,5 e 10 mM) e com diferentes concentrações de steviosídeo (entre 1,5 e 5,0 mM). A figura 15 mostra as velocidades de produção de D-glucose e as velocidades da frutólise representadas contra a concentração arterial de D-frutose na ausência (contro-

le) e na presença de steviosídeo 5,0 mM. Por causa da pequena diferença artério-venosa, o consumo de D-frutose não pôde ser medido muito acuradamente em concentrações acima de 2,5 mM. As curvas da figura 15**A** são típicas para saturação e mostram uma tendência à sigmoidicidade. Este último fenômeno resulta em relações não-lineares na representação duplamente recíproca (figura 15**B**).

Em relação ao efeito do steviosídeo, dois aspectos podem ser reconhecidos: o grau de inibição é uma função da concentração de D-frutose. Por exemplo, com frutose 5,0 mM, a frutólise foi inibida em 90% por steviosídeo 5 mM; com frutose 10 mM, no entanto, a inibição diminuiu para 51%. A produção de D-glucose foi inibida em 61% por steviosídeo 5 mM e com frutose 0,5 mM, mas somente 40% com frutose 10 mM. Um quadro similar foi obtido com experimentos análogos realizados com steviosídeo 1,5 mM. Outro parâmetro cuja sensibilidade ao steviosídeo também depende da concentração de D-frutose é o consumo extra de oxigênio causado por este substrato. Conforme revelado pela figura 12, a ação do steviosídeo 5 mM e com frutose 2,5 mM foi virtualmente completa. Isto não ocorre a concentrações maiores de D-frutose. Por exemplo, com frutose 10 mM, o consumo extra de oxigênio foi inibido em apenas 60% por steviosídeo 5 mM.

3.7. O EFEITO DO STEVIOSÍDEO SOBRE O METABOLISMO DA GALACTOSE

De acordo com BAUR & HELDT (1977) a velocidade de transporte da galactose é intermediária entre a da glucose, que é muito grande, e a da frutose, que é menor. A metabolização, por

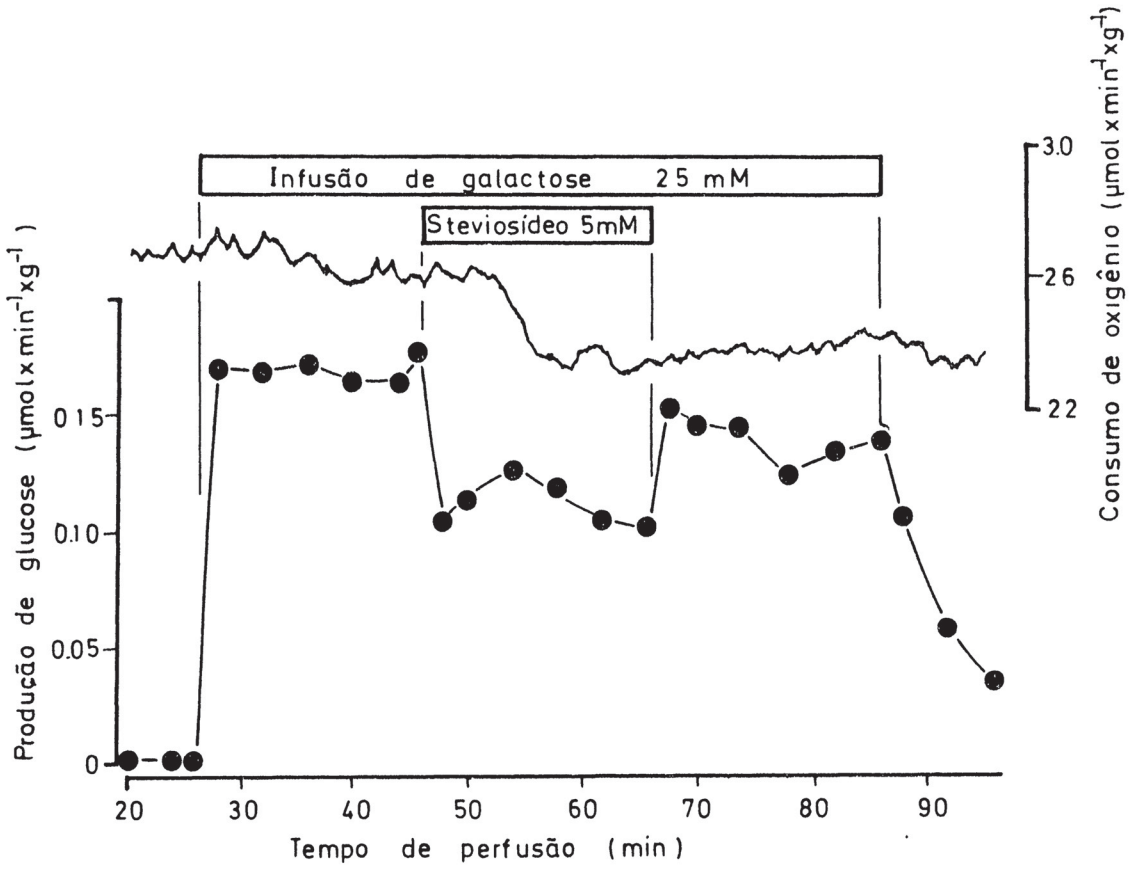


Figura 16. **Efeito do steviosídeo sobre a liberação de glucose formada a partir de galactose.** O fígado de um rato mantido em jejum por 24 horas foi perfundido com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato pH 7,4, no sistema não-recirculante. A galactose 2,5 mM foi infundida no período entre 26 e 86 minutos. O steviosídeo (concentração de 5,0 mM) foi infundido entre 44 e 66 minutos de perfusão. Amostras do perfusado efluente foram coletadas em intervalos de 2 ou 4 minutos e as concentrações de D-glucose foram determinadas enzimaticamente. O consumo de oxigênio foi seguido polarograficamente. As taxas de liberação de glucose (●——●) e do consumo de oxigênio (traço) foram calculadas das diferenças artério-venosas e do fluxo através do órgão e expressas como µmol por minuto por grama de peso úmido do fígado.

sua vez, é bem mais lenta que a da frutose, o que permite esperar uma influência bem menor do transporte. A galactose é transformada principalmente em glucose 1-fosfato, que pode seguir vários caminhos (LELOIR, 1951; KALCKAR **et al.**, 1953). Os principais são a incorporação ao glicogênio ou a liberação como glucose livre via glucose 6-fosfato. Se o fígado for perfundido com líquido de perfusão livre de substratos, **i. e.**, sem glucose, a maior parte da galactose transformada em glucose 1-fosfato aparecerá como glucose livre. A figura 16 mostra a quantidade de glucose que é produzida quando galactose 2,5 mM é infundida num fígado retirado de um rato em jejum de 24 horas. A velocidade de infusão de galactose foi de aproximadamente 12,5 µmol $\times$ min^{-1} $\times$ g^{-1}, mas a produção de glucose foi de apenas 0,16 µmol $\times$ min^{-1} $\times$ g^{-1}. O steviosídeo 5 mM, no entanto, inibe nitidamente, embora em grau pouco pronunciado (35%). Não há produção de L-lactato e piruvato a partir de galactose e nem o consumo de oxigênio é ativado. Também não foram exploradas concentrações maiores de galactose, pois o que se pode esperar é um efeito ainda menos pronunciado.

3.8. A QUESTÃO DA METABOLIZAÇÃO DO STEVIOSÍDEO NO FÍGADO

O fígado certamente metaboliza o steviol, pois foi demonstrado que esse composto se torna mutagênico, quando incubado ("ativado") com a fração microssomal do fígado de rato (PEZZUTO **et al.**, 1985). Além disto, uma análise da molécula do steviol e também do isosteviol revela vários sítios passíveis de ataque pelos sistemas enzimáticos responsáveis pela metaboli-

zação de drogas no fígado (THURMAN & KAUFFMAN, 1980). Os grupos hidroxila e carboxila e a dupla ligação são os pontos de ataque mais prováveis. Porém, na molécula do steviosídeo, apenas a dupla ligação é passível de ataque. Por isto, é de interesse averiguar se o steviosídeo é ou não hidrolizado no fígado. Isto poderia ocorrer tanto no interior das células como fora delas, já que foi demonstrado que a maltose é hidrolizada por uma maltase situada no lado externo das células do fígado (SPRANDEL **et al.**, 1976).

Infelizmente, o steviosídeo marcado com isótopos radioativos não está comercialmente disponível. Desta forma, foi necessário desenvolver metodologia que permitisse a dosagem do steviosídeo no perfusado por uma técnica de açúcares totais, eliminando a interferência causada pela glucose, que é o único açúcar que aparece em quantidades significativas no líquido de perfusão,em função da atividade metabólica do fígado.

Em experimentos preliminares,logo ficou claro que se o fígado tivesse alguma capacidade de hidrolizar o steviosídeo, esta seria bem pouco pronunciada e impossível de ser detectada no sistema não-recirculante. Por isto,foram realizados experimentos de recirculação, como aquele mostrado na figura 17. Esta figura mostra os resultados médios de três experimentos nos quais paracetamol, steviosídeo e [^{131}I]albumina foram recirculados durante duas horas. O paracetamol desapareceu rapidamente, o que mostra que o fígado isolado mantém em bom estado os seus sistemas de metabolização de drogas (THURMAN & KAUFFMAN, 1980). A [^{131}I]albumina manteve-se constante durante as duas horas do experimento. Isto mostra que houve perda mínima de líquido por evaporação, por exudação superficial e por fluxo

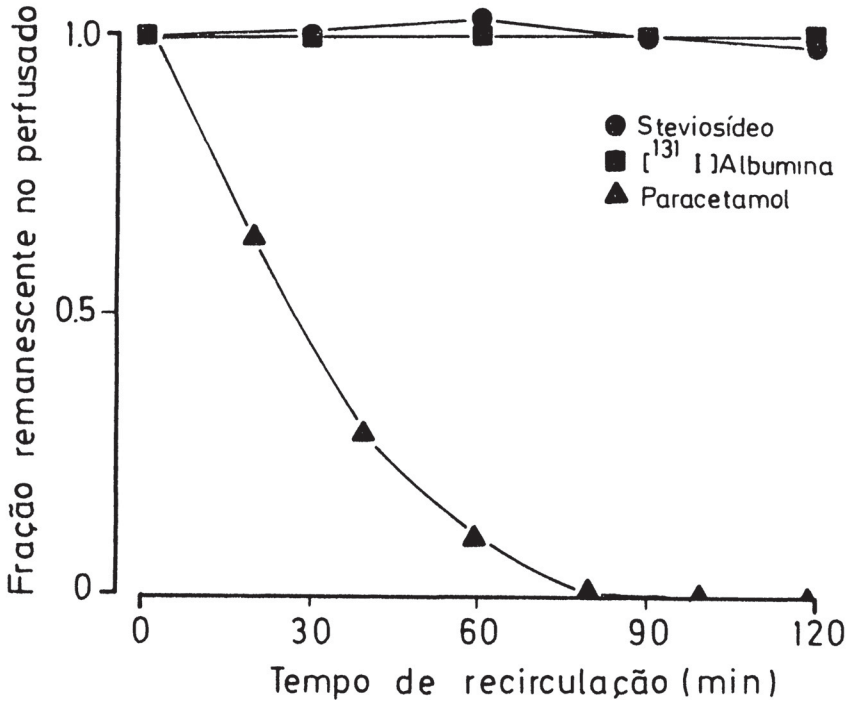


Figura 17. **Recirculação do steviosídeo (●——●), do paracetamol (▲——▲) e da [^{131}I]albumina (■——■) em fígado de rato perfundido isoladamente.** Os fígados de ratos mantidos em jejum por 24 horas foram previamente perfundidos com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (pH 7,4) no sistema não-recirculante. Após ser acrescido de steviosídeo na concentração final de 0,5 mM e de traços de [^{131}I]albumina ou de paracetamol na concentração de 1,0 mM, um volume médio de cerca de 100 ml foi recirculado durante 120 minutos. O steviosídeo foi determinado no perfusado pelo método do fenol-sulfúrico (●——●), subtraindo os controles adequados. O paracetamol foi extraído com acetato de etila e medido num espectrofotômetro a 290 nm. A radioatividade da [^{131}I]albumina foi contada em cintilador Beckman LS6800. Os pontos experimentais representam a média de 3 experimentos.

biliar. A concentração do steviosídeo, no entanto, manteve-se também constante, sugerindo que uma hidrólise desse composto ocorre quando muito, de forma extremamente lenta.

Como o steviosídeo foi dosado por técnica relativamente inespecífica, o método do fenol-sulfúrico de DUBOIS **et al.** (1956), convém explicitar as correções e controles realizados para tornar o método seguro. Para minimizar interferência da glucose, foram utilizados fígados de animais em jejum, que liberam quantidades bem pequenas desse composto. Assim mesmo, durante o longo tempo de recirculação, alguma glucose acumula no perfusado. Esta foi dosada pelo método altamente específico da glucose 6-fosfato desidrogenase e hexoquinase (BERGMEYER **et al.** 1974). Em experimentos de recirculação, feitos sem steviosídeo no perfusado, foi possível verificar que açúcares totais dosados pelo método de DUBOIS **et al.** (1956) e glucose dosada enzimaticamente eram exatamente iguais. Isto quer dizer que o fígado libera apenas glucose. Por isto, pode-se subtrair nos experimentos em que o steviosídeo estava presente no perfusado o valor correspondente à glucose do valor de açúcares totais para obter o valor da concentração do steviosídeo. Este valor era, aliás, sempre igual ao da concentração arterial inicial de steviosídeo, isto é, no líquido de perfusão antes de passar pelo fígado.

A única possibilidade de interferência que resta é a de que, na presença de steviosídeo, fossem liberadas substâncias que dessem reação positiva com o reagente do fenol sulfúrico. Por isso, alíquotas do perfusado de experimentos semelhantes aos da figura 17 foram cromatografadas em placa de sílica gel (ver figura 19). As manchas correspondendo ao steviosídeo foram e-

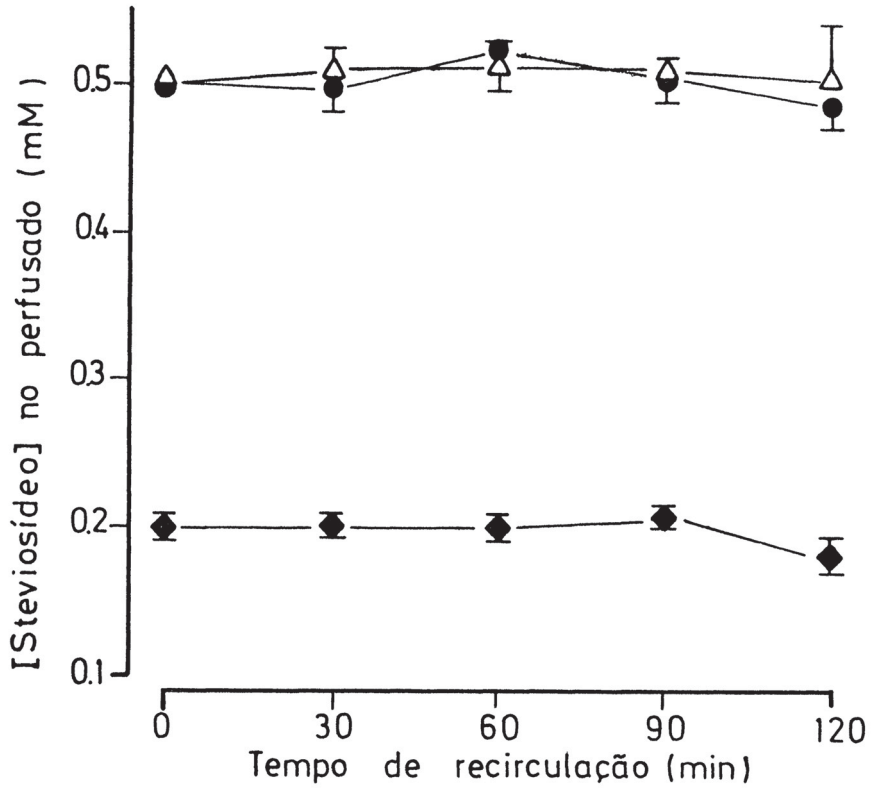


Figura 18. **Recirculação do steviosídeo em fígado de rato perfundido isoladamente.** Os fígados de ratos mantidos em jejum prévio de 24 horas foram previamente perfundidos com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (pH 7,4) no sistema não-recirculante. Após ser acrescido de steviosídeo na concentração de 0,5 (△—△, ●—●) ou 0,2 mM (◆—◆),um volume médio de cerca de 100 ml foi recirculado por até 120 minutos. Alíquotas foram coletadas em intervalos de 30 minutos e as concentrações de steviosídeo determinadas pelo método do fenol-sulfúrico, subtraindo-se os controles adequados. Os pontos experimentais representados por (△—△) foram obtidos de experimentos com fígados de animais que haviam ingerido **ad libitum** durante oito dias solução 1 mM de steviosídeo no lugar da água. Os pontos representam a média de 3 experimentos e as barras os erros padrão das médias.

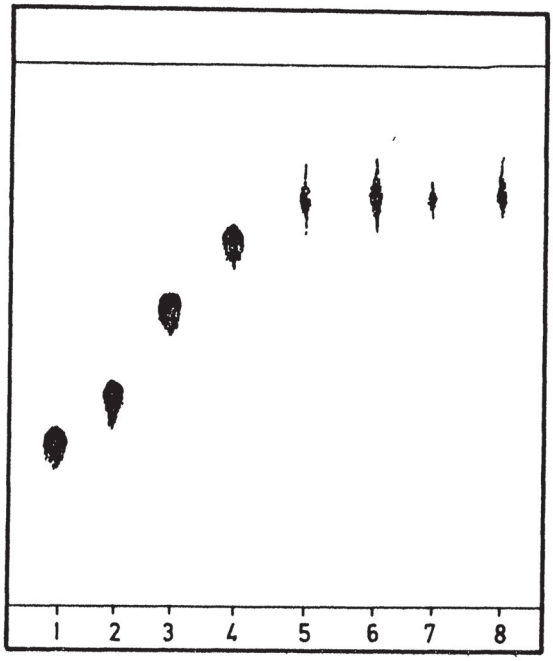


Figura 19. **Cromatografia em camada delgada de alíquotas do extrato etéreo do perfusado recirculante e de padrões de steviosídeo, glucosil-steviol, steviolbiosídeo e steviol.** O extrato etéreo concentrado do perfusado recirculante contendo steviosídeo 1,0 mM, de experimentos similares aos mostrados na Fig.18, foi aplicado em placa de sílica-gel (sílica-gel Merck, espessura de 0,25 mm). As amostras 5 e 7 correspondem aos extratos resultantes do perfusado inicial (tempo zero; steviosídeo ainda ausente do perfusado) e as amostras 6 e 8 do perfusado final (120 minutos de recirculação do steviosídeo). O steviosídeo (amostra 1), o steviolbiosídeo (amostra 2), o glucosil-steviol (amostra 3) e o steviol (amostra 4) foram aplicados em paralelo. O solvente foi isobutanol:metanol:água (8:1:1). A revelação foi feita com solução de ácido sulfúrico a 5% em etanol, com posterior aquecimento.

luídas e o steviosídeo dosado pelo fenol-sulfúrico. A quantidade encontrada no eluato foi exatamente a mesma dosada nas alíquotas não-cromatografadas. A razão [steviosídeo encontrado nas alíquotas desproteinizadas]/[steviosídeo no eluato] foi igual a 0,99±0,02 (n = 4); e a razão [steviosídeo encontrado nas alíquotas não-desproteinizadas]/[steviosídeo no eluato] foi de 1,01±0,05 (n = 4). Por isto, é altamente provável que os resíduos de glucose ligados encontrados nas amostras, realmente correspondem ao steviosídeo e não a algum composto liberado pelo fígado.

Alguns experimentos adicionais foram feitos e os resultados estão mostrados na figura 18. A ingestão **ad libitum** de steviosídeo, que foi dissolvido na água de beber numa concentração de 1 mM, durante 8 dias, não parece ter nenhum efeito sobre a capacidade do fígado de hidrolizar o composto. Da mesma forma, as pequenas variações no steviosídeo recirculante não autoriza a concluir afirmativamente, já que em nenhum tempo entre 0 e 120 minutos houve afastamento significativo da concentração arterial inicial.

Se houver hidrólise ela é muito pouco significativa durante duas horas a ponto de não se poder detectar uma variação significativa no steviosídeo. Os possíveis produtos, porém, podem ser pesquisados em alíquotas mais concentradas. O steviol e o glucosil-steviol podem ser extraídos com éter e estes extratos podem ser concentrados várias vezes em relação ao perfusado original. A figura 19 mostra os resultados típicos de uma cromatografia de extratos etéreos do perfusado concentrados cerca de 10 vezes em relação ao perfusado. Note-se que steviosídeo, steviolbiosídeo, glucosil-steviol e steviol separam

bastante bem no sistema utilizado, conforme se pode deduzir pelas manchas dos padrões aplicados (amostras 1-4). O steviosídeo, por outro lado, não aparece nas alíquotas do perfusado extraído com éter porque esse composto não tem nenhuma afinidade pelo éter. Os extratos etéreos do perfusado produzem apenas uma mancha que certamente não é steviol. Além de aparecer em posição nitidamente diferente da do steviol, deve-se notar que ela aparece também quando o steviosídeo está ausente do perfusado (amostras 5 e 7). Portanto, se o fígado consegue produzir steviol ou glucosil-steviol a partir de steviosídeo, a quantidade deve ser muito pequena, mesmo após duas horas.

Se não se pode concluir por uma hidrólise significativa do steviosídeo pelo fígado, não se pode excluir a possibilidade de uma alteração da molécula do composto. Esta transformação, no entanto, teria que ser pouco pronunciada, a ponto de não alterar o comportamento cromatográfico do composto de forma muito significativa. Poderia haver, por exemplo, uma redução da dupla ligação por alguma redutase pouco específica. O composto resultante, o dihidrosteviosídeo, não poderia ser diferenciado do steviosídeo no sistema cromatográfico utilizado. Esta possibilidade, no entanto, prèssupõe passagem do steviosídeo através da membrana plasmática, que é outro aspecto que merece alguma análise experimental.

3.9. O ESPAÇO DE DISTRIBUIÇÃO DO STEVIOSÍDEO NO FÍGADO

O fato de o steviosídeo não ser capaz de afetar o metabolismo energético do fígado, apesar do nítido efeito inibidor da fosforilação oxidativa em mitocôndrias isoladas (KELMER-

BRACHT **et al.**, 1985), é um fato a ser explicado. Deve-se salientar que o atractilosídeo, o clássico inibidor do transporte de ADP/ATP (VIGNAIS **et al.**, 1966), é ativo também em células do fígado perfundido (ISHII & BRACHT, 1986). Além disto, derivados do steviosídeo como o steviol, o glucosil-steviol e o isosteviol, também inibem o metabolismo energético em células intactas (ISHII & BRACHT, 1985).

Uma possibilidade real de explicação do fenômeno seria que o steviosídeo permeia a membrana celular muito lentamente. De fato KEMMELMEIER **et al.** (1984) puderam verificar que, em uma suspensão de eritrócitos humanos, o espaço de distribuição do steviosídeo é igual ao espaço ocupado pela sacarose, que fica restrita basicamente ao espaço extracelular. Parece, portanto, que o steviosídeo não consegue difundir livremente através das membranas biológicas. Para entrar na célula ele necessitaria de um transportador. Há sem dúvida muitos transportadores com especificidade ampla nas células do fígado, pois muitos compostos completamente estranhos ao órgão conseguem penetrar.

Por estes motivos todos, foram realizados alguns experimentos no fígado perfundido, visando medir o espaço de distribuição do steviosídeo no órgão. Mais uma vez, faz muita falta steviosídeo marcado. Assim mesmo, foi possível realizar experimentos de diluição de indicadores múltiplos nos quais o steviosídeo (em torno de 2 μmol) foi injetado junto com as referências [^{32}P]fosfato e [^{3}H]água. A figura 20A mostra o resultado de um deles. A curva do steviosídeo não coincide exatamente com a da referência para o espaço extracelular. O valor do pico é um pouco mais baixo e o tempo do pico está levemente deslocado para a direita (meio segundo). A área sob a curva do

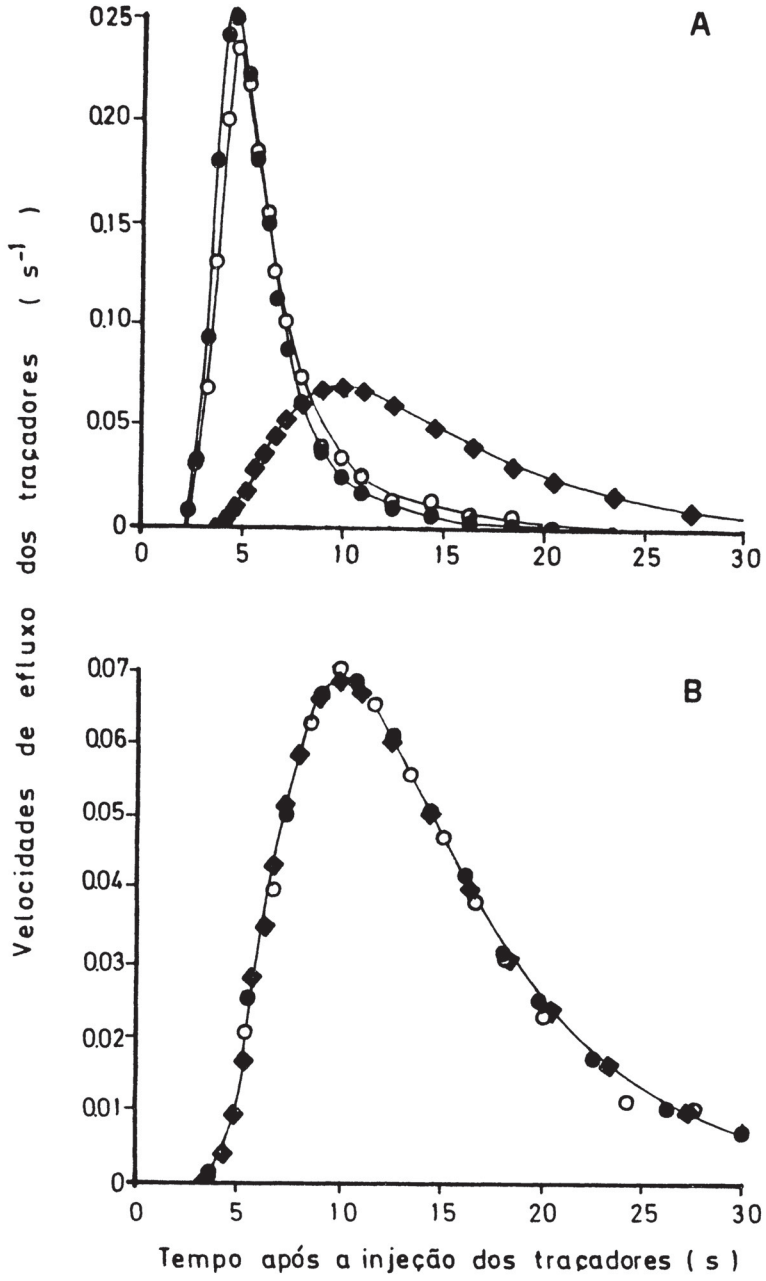


Figura 20. **Perfis das curvas do steviosídeo (○——○), [^{32}P]fosfato (●——●) e [^{3}H]água (◆——◆).** O fígado de um rato mantido em jejum de 24 horas foi perfundido com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato (pH 7,4) no sistema não recirculante. Amostras dos traçadores [^{32}P]fosfato e [^{3}H]água e 2,1 µmol de steviosídeo foram injetados simultaneamente na entrada da veia porta. As frações das substâncias injetadas que apareceram no perfusado efluente por segundo, foram representadas contra o tempo após a injeção (**A**). A figura (**B**) mostra os pontos experimentais das curvas do [^{32}P]fosfato (●——●) e do steviosídeo (○——○) transformados de acordo com a equação [14] com os seguintes parâmetros: t_o = 2,35 s; θ' para a curva do [^{32}P]fosfato = 2,57; θ' para a curva do steviosídeo = 2,35.

steviosídeo é igual à unidade, o que já é esperado pelos experimentos de recirculação descritos no ítem anterior.

A forma da curva do steviosídeo, quando comparada com as referências, é típica de substâncias que estão sujeitas a uma distribuição dependente do fluxo (GORESKY **et al.**, 1970; BRACHT **et al.**, 1980), já que tanto o valor do pico, como também a posição do pico foram deslocados. Se isto for correto deveria ser possível superpor a curva do steviosídeo à curva do fosfato ou á curva da água, de acordo com o que prevê a equação [14]. Isto foi feito com o experimento da figura 20**A** e os resultados estão mostrados na figura 20**B**. Como se pode ver, a superposição das curvas do steviosídeo e da água com valores otimizados de t_0 e θ' é comparável à superposição das curvas do fosfato marcado e da água triciada. O valor de t_0 obtido dos ajustes é praticamente o mesmo. O valor de θ', no entanto, é de 2,57 no caso do [^{32}P]fosfato e de 2,35 para o steviosídeo. Isto significa que o volume que o steviosídeo ocupa é em torno de 15% maior que o volume de distribuição do fosfato, numa simples passagem pelo fígado.

É muito difícil saber o significado desses 15% de espaço,além do espaço extracelular indicado pelo [^{32}P]fosfato, que é,aliás também,o espaço indicado pela sacarose e outros açúcares (BRACHT **et al.**,1980). Pode ser que o steviosídeo tenha acesso apenas a um tipo de célula do fígado, as células de Kupffer, por exemplo,que perfazem um percentual muito pequeno do total de células do órgão. Pode ser também,que o steviosídeo ocupe apenas uma pequena porção da superfície dos hepatócitos. A aglucona lipofílica, por exemplo, poderia mergulhar na membrana, sendo impedida de seguir adiante pelos resíduos

de glucose.

Em vista dos resultados obtidos, pode-se concluir que o acesso do steviosídeo ao espaço celular total do fígado não é livre. Numa simples passagem o composto teria acesso a apenas 5-6% deste espaço. O acesso a esses 5-6%, no entanto, é muito rápido e limitado apenas pelo fluxo. É impossível dizer se isto representa uma parte do espaço aquoso dos hepatócitos, se representa uma parte do espaço não-aquoso dos hepatócitos, ou ainda, se representa algum outro tipo de célula. Se o steviosídeo tem acesso à maior parte do espaço aquoso dos hepatócitos, onde estão localizadas as mitocôndrias, por exemplo, então isto deve ocorrer muito lentamente e a ausência de efeito do steviosídeo sobre o metabolismo energético, pode ser atribuída à incapacidade da substância em alcançar aquelas organelas no curto espaço de tempo dos experimentos (ver figura 8).

Se há uma permeação lenta em direção ao espaço aquoso dos hepatócitos, isto somente poderá ser respondido com experimentos realizados com steviosídeo marcado.

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

4.1. PARÂMETROS DO TRANSPORTE DE D-GLUCOSE NO FÍGADO PERFUNDIDO

Neste estudo, o transporte de D-glucose foi avaliado no fígado inteiro, em condições de estado estacionário, usando o modelo de GORESKY **et al.** (1970) para calcular os parâmetros. De posse dos parâmetros torna-se apropriado, a esta altura, fazer uma comparação com os resultados obtidos por outros autores utilizando outros sistemas experimentais, outros modelos e ainda células de outros tecidos.

Qualitativamente, o transporte da D-glucose no fígado de rato apresenta características semelhantes a vários outros tecidos, como o tecido adiposo (CROFFORD & RENOLD, 1965), músculo esquelético (MORGAN **et al.**, 1964) e eritrócitos (LeFEVRE, 1961). Em termos quantitativos, no entanto, as informações disponíveis variam em função do modelo biológico e das técnicas utilizadas.

BAUR & HELDT (1977) ao medirem as velocidades de influxo zero-trans (concentração extracelular finita; concentração intracelular nula), acharam um K_m igual a 30 mM para a D-glucose. O valor obtido neste trabalho, 38,9 mM, concorda razoa-

velmente com o valor achado por BAUR & HELDT (1977) na sua incubação de hepatócitos isolados. Em relação a isto, no entanto, as células do fígado diferem dos eritrócitos. Nessas células, o K_m para o influxo zero-trans da D-glucose está em torno de 1,6 mM (NAFTALIN & HOLMAN, 1977). Para a troca de equilíbrio, no entanto, o K_m da D-glucose é de 35 mM, isto é, aproximadamente vinte vezes maior (NAFTALIN & HOLMAN, 1977). WILLIAMS **et al.** (1968), usando o seu modelo analógico, calcularam um K_m de 17 mM para a D-glucose no fígado perfundido de rato. Este valor, no entanto, é na verdade um valor mínimo, já que o modelo utilizado por aqueles autores não permite o cálculo do valor exato. Comparações, portanto, não podem ser feitas neste caso.

As constantes cinéticas do transporte de D-glucose foram também calculadas por GORESKY & NADEAU (1974) no trabalho com o fígado de cães anestesiados. As técnicas e o modelo utilizados foram essencialmente os mesmos empregados no presente trabalho. No fígado do cão, o K_m do carreador de monossacarídeos para a D-glucose é bem maior do que aquele encontrado neste trabalho para o fígado de rato. GORESKY & NADEAU (1974) acharam o valor de 121 mM. Além de um K_m diferente, os transportadores de monossacarídeos dos fígados de cão e de rato diferem também em suas capacidades máximas de transporte. No presente trabalho, uma velocidade máxima de troca entre os espaços intra- e extracelular (V_{max}) de 388 $\mu mol \times min^{-1} \times$ (g de fígado)$^{-1}$, correspondendo a 700 $\mu mol \times min^{-1} \times$ (ml do espaço intracelular)$^{-1}$, foi encontrada. No fígado de cão, GORESKY & NADEAU (1974) acharam uma velocidade máxima de troca de 1700 $\mu mol \times min^{-1} \times$ (ml de espaço intracelular)$^{-1}$, o que cor-

responde a 2,4 vezes aquela do fígado de rato.

A velocidade máxima de troca no fígado de rato, por outro lado, é muito maior que a máxima velocidade de influxo zero-trans. BAUR & HELDT (1977) obtiveram uma velocidade máxima de influxo zero-trans de 33,8 µmol × min^{-1} × (ml do espaço aquoso intracelular)$^{-1}$ a 20°C. Corrigindo este valor para 37°C, com base na curva de dependência da temperatura apresentada por aqueles autores, chega-se a 60 µmol × min^{-1} × (ml do espaço aquoso intracelular)$^{-1}$. Isto é menos de um décimo da máxima velocidade de troca encontrada neste trabalho. Uma diferença similar entre a máxima velocidade de influxo zero-trans e a máxima velocidade de troca foi encontrada também para o sistema de transporte de D-glucose dos eritrócitos (NAFTALIN & HOLMAN, 1977). Deve-se acrescentar que, tanto para os eritrócitos como também para o fígado, predominam sempre condições que permitem troca entre os espaços intra- e extracelulares. Dificilmente o organismo chegará a uma situação sequer próxima da condição zero-trans no que se refere à D-glucose.

4.2. O TRANSPORTE E O METABOLISMO DA D-GLUCOSE NO FÍGADO

Com velocidades de troca tão altas, não se pode esperar influência muito pronunciada do transporte sobre o metabolismo da D-glucose. Por exemplo, a velocidade de influxo unidirecional da D-glucose na concentração fisiológica de 5 mM, calculada das constantes cinéticas da tabela 4, é igual a 44,2 µmol × min^{-1} × (g de fígado)$^{-1}$. A máxima taxa de liberação líquida de glucose, sob a influência de hormônios, está entre 5 e 7 µmol × min^{-1} × (g fígado)$^{-1}$ (KIMMIG **et al.**, 1983), enquanto

a taxa de captação raramente excede 1,0 μmol × min^{-1} × (g de fígado)$^{-1}$ (JUNGERMANN & KATZ, 1982). Uma limitação do metabolismo pelo transporte sob condições fisiológicas normais, portanto, é bastante improvável. Sob condições experimentais não-fisiológicas, porém, alterações transitórias nos fluxos metabólicos podem ocorrer (figura 9). Tais alterações ocorrem quando o sistema de transporte passa repentinamente a sofrer forte inibição (80-90%) e são consequências das alterações na concentração intracelular que se seguem ao início ou término da infusão do inibidor. Estas alterações transitórias, no entanto, são significativas apenas em concentrações muito baixas e não-fisiológicas de D-glucose.

4.3. A CONCENTRAÇÃO INTRACELULAR DE D-GLUCOSE

Neste estudo, a razão entre as concentrações intra e extracelulares de D-glucose em condições de **steady-state** e na ausência de inibidores, variou entre 0,6 e 0,7. Uma razão de C_i/C_e menor do que a unidade pode ter, basicamente, duas razões. Em primeiro lugar, se a glucose marcada tem realmente acesso ao espaço aquoso total da célula, os valores calculados de C_i/C_e podem indicar que existe um gradiente de concentração entre as células e o meio extracelular. Considerando-se, no entanto, que o transporte de D-glucose no fígado é passivo, **i. e.**, não dependente de energia (BAUR & HELDT, 1977), pode-se excluir a possibilidade da formação de um gradiente de concentração mantido por energia metabólica. Alternativamente, o gradiente poderia resultar do potencial de membrana ou da diferença de pH (ΔpH) entre os espaços intra- e extracelular. Um composto que se conhece ser distribuído de acordo com o gradiente de pH

(SOBOLL **et al.**, 1980) é o ácido dimetiloxazolidinadiólico (pK = 6,3). A razão C_i/C_e deste ácido no fígado perfundido de rato está entre 0,4 e 0,6, refletindo um meio citosólico mais ácido do que o meio extracelular. Outras substâncias, como os íons cloreto, distribuem-se de acordo com o equilíbrio eletroquímico. Os valores relatados para a distribuição dos íons cloreto, em diferentes preparações de hepatócitos, variam entre 0,2 e 0,3 (CLARET & MAZET, 1972; WILLIAMS & WOODBURY, 1971). Os valores de C_i/C_e encontrados para a D-glucose neste trabalho são próximos aos valores do ácido dimetiloxazolidinadiólico. No entanto, como a D-glucose é uma molécula neutra e não-dissociável, a possibilidade de que seja distribuída de acordo com a diferença de pH ou mesmo de acordo com o potencial de membrana é muito remota.

Os valores de C_i/C_e menores do que a unidade podem também estar indicando que a D-glucose não tem acesso ao espaço aquoso intracelular total. Como já foi comentado em **Resultados**, a concentração intracelular medida representa uma média sobre todos os compartimentos subcelulares, estimados em função do volume aquoso celular. Se a [1-^{14}C]glucose injetada não tiver acesso a todo este espaço, o valor médio da concentração intracelular calculada será inferior ao valor efetivo.

De fato, nem todo o espaço aquoso das células do fígado é acessível à D-glucose. Sabe-se que os açúcares não permeiam a membrana interna das mitocôndrias e o espaço aquoso destas organelas perfaz considerável fração do espaço total (cerca de 10%). Em adição às mitocôndrias e outras organelas, deve-se considerar também a água de hidratação do glicogênio e das membranas celulares.

O glicogênio é depositado no fígado na forma de uma macromolécula altamente ramificada. Nos interstícios destas ramificações há muitas moléculas de água. Segundo cálculos de CAHILL (1986), cada grama de glicogênio tem associado a si entre 2 e 4 gramas de água. A [^{3}H]água (na verdade os prótons, ^{3}H) tem livre acesso a este espaço, mas é possível que a glucose não tenha acesso àquela porção de água que está ligada mais fortemente. Já a água de hidratação das membranas celulares, perfaz também fração significativa. Por exemplo, 14% da água intramicrossomal (DEPIERRE & DALLNER, 1975) é água de hidratação. Este parece ser o principal fator que restringe o espaço intramicrossomal dos açúcares a 77% do espaço aquoso total.

Ainda em relação ao retículo endoplasmático, outro aspecto deve ser levantado. Estudos recentes mostram que existe uma interrelação complexa entre a atividade hidrolítica da glucose 6-fosfatase e o transporte da D-glucose e de seu derivado fosforilado (glucose 6-fosfato) através da membrana do retículo endoplasmático. A existência de um carreador específico para a glucose 6-fosfato foi demonstrada por ARION **et al.** (1980). No entanto, a cinética de transporte através das membranas do retículo e as razões da compartimentalização do sistema enzimático responsável pela liberação de D-glucose a partir de glucose 6-fosfato, é uma questão ainda em aberto. De qualquer forma, os dados sugerem que a compartimentalização da D-glucose pode ser muito complexa.

De posse dos dados relatados nos parágrafos anteriores, torna-se razoável admitir que a taxa de difusão da D-glucose não é a mesma nas diversas regiões da célula. Em algumas regiões o equilíbrio poderia ser atingido mais rapidamente do que

em outras, devendo-se lembrar também que deve haver regiões às quais a glucose não tem acesso de forma alguma (mitocôndrias, por exemplo). Se isto está correto, pode-se admitir também que a D-glucose marcada, numa única e rápida passagem pelo fígado, pode não ter acesso significativo ao espaço total que ela chegará a ocupar quando houver equilíbrio total. Poderia estar ocorrendo com a [1-^{14}C]glucose nos diferentes compartimentos intracelulares aquilo que ocorre com o [^{32}P]fosfato no espaço extracelular. O [^{32}P]fosfato certamente tem acesso ao espaço celular, mas isto ocorre de forma muito lenta, de modo que numa simples passagem pelo órgão isto não chega a ser notado. Há necessidade de um tempo elevado para que ocorra o equilíbrio.

Comparando os dados de distribuição intracelular deste trabalho com os dados existentes na literatura, nota-se que o assunto é polêmico, pois os dados disponíveis mostram uma certa discordância, ou ao menos aparentam discordância. CAHILL **et al.** (1958) investigaram a concentração intracelular de D-glucose em fígados de ratos e cães **in vivo**. Amostras de D-glucose foram injetadas intravenosamente de forma a variar a concentração plasmática entre 5 e 30 mM. A concentração intracelular da D-glucose foi medida em amostras do tecido após um tempo de equilíbrio de cinco minutos e expressa em função do conteúdo de água por cada grama de tecido. Em ratos normais, empregando técnica colorimétrica, os autores relataram equivalência entre o plasma e o fígado a uma concentração plasmática de 8 mM. Os dados apresentados pelos autores permitem o cálculo da razão C_i/C_e tal como foi definida neste trabalho. Para uma concentração plasmática (C_e) maior do que 10 mM, o valor de C_i/C_e variou entre 0,6 e 0,7. Em concentrações menores do que 7 mM, a razão C_i/C_e tor-

nou-se maior que a unidade. A tendência da curva apresentada por CAHILL **et al.** (1958), no entanto, é tal que para uma concentração plasmática de 1 mM resulta um valor de C_i/C_e em torno de sete. Os mesmos autores mediram a distribuição da D-glucose marcada em cães e encontraram equilíbrio nas concentrações de glucose radioativa (razão C_i/C_e igual a 0,97). As medidas foram feitas 10 minutos após a injeção da glucose marcada no animal e o material radioativo foi isolado e medido como um derivado fenilozazônico.

Experimentos mais elaborados em ratos **in vivo** foram feitos por HETENYI **et al.** (1969). Os autores infundiram glucose marcada intravenosamente e a taxas constantes por um período de cerca de duas horas. A concentração plasmática e hepática de glucose radioativa foi medida após separação da glucose marcada dos eventuais produtos de metabolização, como o L-lactato. Através de um modelo matemático, os autores estimaram uma razão C_i/C_e de 0,82. Estes valores foram encontrados tanto para animais controle como para animais que tinham recebido injeção de insulina.

WILLIAMS **et al.** (1968) encontraram valores semelhantes aos de HETENYI (1969), medindo a distribuição de glucose em fígados perfundidos de rato. Esses autores perfundiram os fígados com meio contendo eritrócitos de boi num sistema recirculante a um fluxo constante de 7 ml/minuto. Glucose marcada foi infundida constantemente por períodos de 2 a 10 minutos, ao fim dos quais, o teor em açúcares marcados de amostras do tecido foi medido. Após dois minutos, o volume de distribuição da glucose marcada correspondia a 74% do volume aquoso total do fígado e aos 10 minutos ele atingia 91%, independentemente da concentra-

ção de glucose no perfusado. Estes valores correspondem a razões C_i/C_e iguais a 0,7 e 0,85, respectivamente.

BAUR & HELDT (1977), em seu trabalho com hepatócitos isolados, encontraram uma razão C_i/C_e praticamente igual à unidade após um minuto de incubação das células com D-glucose marcada. Após 3,5 minutos, no entanto, a razão C_i/C_e aparente tinha aumentado para 1,2.

As diferenças nos resultados dos diversos autores citados acima podem refletir, em parte ao menos, os diferentes métodos, condições e espécies de animais utilizados. Medidas em amostras de tecido após um tempo de infusão ou incubação relativamente longo, por exemplo, são mais sujeitas a erros devido à interferência do metabolismo. A incorporação da D-glucose marcada no glicogênio ou derivados fosforilados, caso não tenha sido eliminada, resulta num aumento na razão C_i/C_e. Os próprios WILLIAMS **et al.** (1968) admitiram que o valor obtido para a distribuição de D-glucose após os 10 minutos de infusão pode ser erroneamente alto, visto que não foi eliminada a fração da radioatividade eventualmente incorporada no glicogênio. Também as medidas de HETENYI **et al.** (1969) e CAHILL **et al.** (1958) estiveram sujeitas ao mesmo fator de erro. Além disto, nos experimentos com D-glucose não marcada de CAHILL **et al.** (1958), foi utilizada uma técnica colorimétrica pouco específica para medir a glucose, mesmo aquela do extrato do tecido. Isto pode ter contribuído, adicionalmente, para os dados discrepantes das razões C_i/C_e em condições próximas e abaixo dos valores fisiológicos normais.

Em medidas rápidas, como as que foram feitas neste trabalho, a interferência do metabolismo é minimizada, porém, ou-

tros fatores, como a heterogeneidade celular, podem influir. Dos dados do trabalho de GORESKY & NADEAU (1974) não se pode calcular com precisão o valor de C_i/C_e, porque os autores não injetaram [^{3}H]água nos seus experimentos com o fígado de cães anestesiados. Pode-se inferir, no entanto, que os seus dados indicam para uma distribuição mais homogênea da D-glucose marcada isto é, o valor de C_i/C_e seria mais próximo à unidade do que aquele obtido neste trabalho. Além da maior velocidade de transporte no fígado de cão, já discutida anteriormente, deve-se ressaltar também que o fluxo por unidade de volume no fígado do cão anestesiado é cerca de três a quatro vezes menor do que aquele empregado para o fígado de rato neste trabalho. Isto significa que o tempo médio de trânsito da glucose marcada por unidade de massa nos experimentos de GORESKY & NADEAU (1974) foi também de três a quatro vezes superior ao daquele encontrado neste trabalho. Este é um fato que tem importância para a hipótese acima levantada de uma difusão diferenciada da glucose nos diferentes compartimentos celulares. Com um tempo de trânsito maior, as chances da glucose marcada alcançar determinadas regiões é também maior. Por isto, GORESKY & NADEAU (1974) poderiam ter detectado com a glucose marcada uma fração maior da célula do que aquela detectada neste trabalho.

Independentemente de ter sido feita uma interpretação correta dos dados do presente trabalho e dos dados dos outros pesquisadores, parece estar claro que o espaço de distribuição e a compartimentalização da D-glucose são assuntos ainda em aberto para futuras investigações.

4.4. OS PRODUTOS NATURAIS DA **Stevia rebaudiana** COMO INIBIDORES DO SISTEMA DE TRANSPORTE PARA MONOSSACARÍDEOS NO FÍGADO

Em virtude dos resultados deste trabalho, o steviosídeo e seus derivados podem ser adicionados à lista dos inibidores do transportador de monossacarídeos. O efeito do steviosídeo não depende primariamente dos seus resíduos glucosil. Isto pode ser concluído da observação de que o isosteviol, o produto da hidrólise ácida total do steviosídeo, também inibe o transporte de D-glucose. O isosteviol foi inclusive mais potente do que o steviosídeo e o steviolbiosídeo, uma indicação de que a porção aglucona tem um papel decisivo no mecanismo de ação. Algum tipo de interação dos resíduos glucosil com o carreador, no entanto, não pode ser excluído. Há duas observações sugerindo isto. Primeiro, a inibição causada por steviosídeo é, mais provavelmente, do tipo misto (K_m e V_{max} foram ambos alterados), indicando algum grau de competição. Em segundo lugar, o steviolbiosídeo, que não possui o resíduo glucosil ligado à aglucona pela ligação éster no steviosídeo, foi menos potente que este último composto. O fato de o steviosídeo ser mais potente que o steviolbiosídeo também revela que não é apenas a carboxila livre que confere ao isosteviol uma atividade inibitória mais acentuada. Finalmente, como o steviosídeo, o steviolbiosídeo e o isosteviol são representativos das estruturas encontradas nas folhas da **Stevia rebaudiana**, pode-se esperar que os demais produtos naturais e derivados também tenham a capacidade de inibir, em menor ou maior grau, o transporte de monossacarídeos no fígado como também em outros tecidos.

A observação de que a aglucona isosteviol é mais ativa

do que o glicosídeo steviosídeo, lembra os resultados obtidos por BAUR & HELDT (1977) com floretina e florizina. O glicosídeo florizina é o inibidor clássico dos sistemas de transporte dos tecidos de mamíferos (GORESKY & NADEAU, 1974). No fígado, no entanto, a aglucona floretina é mais potente do que a florizina. A potência da floretina como inibidor é comparável à do isosteviol, enquanto que a florizina e o steviosídeo têm atividades similares. Todos eles, no entanto, são muito menos potentes do que a citocalasina B, que é o inibidor mais potente dos sistemas de transporte de açúcares até agora descrito (BAUR & HELDT, 1977).

Embora menos potente do que o isosteviol, o steviosídeo é a molécula mais interessante do ponto de vista do experimentador que procura um inibidor específico e relativamente inerte. Enquanto que o isosteviol, como também o steviol, afeta várias vias metabólicas além do transporte de monossacarídeos (YAMAMOTO **et al.**, 1985; KELMER-BRACHT **et al.**, 1985), sabe-se que o steviosídeo é relativamente inerte em relação a fenômenos que só podem ser atingidos intracelularmente. Ele só afeta o metabolismo dos açúcares adicionados exogenamente, conforme demonstrado neste trabalho e também a captação de ácidos graxos exógenos, sendo este último fenômeno, também decorrência da inibição do transporte de ácidos graxos*.

A falta de ação do steviosídeo sobre o metabolismo energético em diversos sistemas celulares (YAMAMOTO **et al.**, 1985; KELMER-BRACHT **et al.**, 1985; KEMMELMEIER **et al.**, 1984; ISHII & BRACHT, 1985) tem sido sempre interpretada como uma incapaci-

---

*Bracht, A. (comunicação pessoal).

dade do composto em permear a membrana celular com velocidade apreciável. Isto é correto para células de sangue, pois numa suspensão de eritrócitos, mesmo após 2 horas, o volume de distribuição do steviosídeo ainda era o volume extracelular (KEMMELMEIER **et al.**, 1984). No fígado, só foi possível demonstrar que a permeação, se ocorrer, dá-se de forma muito lenta para a maior parte do volume celular. Mas, mesmo após períodos de infusão relativamente longos (56 minutos, figura 13) não há nenhum sinal de que o composto esteja afetando o metabolismo energético. Assim sendo, a entrada de uma quantidade significativa de steviosídeo na célula deve levar um tempo muito superior à duração usual de experimentos de investigação do metabolismo.

Além das dificuldades em penetrar na célula, o steviosídeo também não parece ser hidrolisado pelas células hepáticas. Isto é importante para o uso do steviosídeo como inibidor específico, pois o produto de uma possível hidrólise, sendo a glucose, dificultaria em muitas vezes a interpretação dos resultados. Neste trabalho, por exemplo, foi medida a produção de glucose a partir de frutose. No caso de uma hidrólise significativa do steviosídeo, as medidas efetuadas estariam desde já viciadas, pois seria impossível distinguir entre a glucose proveniente da transformação da frutose e aquela proveniente da hidrólise do steviosídeo. A distinção só seria possível com isótopos radioativos, o que, por sua vez, levaria à necessidade de trabalhosos processos de separação.

4.5. A INIBIÇÃO DO METABOLISMO DA D-FRUTOSE E DA D-GALACTOSE PELO STEVIOSÍDEO

Tem-se como certo que D-glucose, D-frutose e D-galacto-

se são transportadas pelo mesmo carreador. A principal base para esta crença é a inibição recíproca do transporte por parte dos três açúcares e a sensibilidade do transporte de cada um deles aos mesmos inibidores (BAUR & HELDT, 1977). Os dados aqui descritos confirmam amplamente aquela crença, pois o steviosídeo parece afetar também o transporte dos três açúcares, embora no caso da D-galactose os dados sejam apenas relativos ao metabolismo.

Já foi mencionado que, no que concerne as relações entre transporte e metabolismo, a D-frutose difere da D-glucose. No fígado, a D-frutose é transportada mais lentamente do que a D-glucose, mas é metabolizada mais rapidamente (SCHOLZ & NOHL, 1976). Esta situação leva a concentrações intracelulares de D-frutose bem abaixo das concentrações extracelulares (WOODS **et al.**, 1970). Sob tais condições, uma inibição do metabolismo por um inibidor do transporte é um fenômeno esperado.

O efeito do steviosídeo sobre o metabolismo da D-frutose é provavelmente consequência apenas da inibição do transporte. Um efeito adicional sobre alguma das enzimas das vias metabólicas que transformam a D-frutose para a D-glucose ou para L-lactato e piruvato é altamente improvável. Em primeiro lugar, deve ser considerado que o steviosídeo não afeta a glicólise a partir de fontes endógenas (glicogênio) assim como não afeta a neoglucogênese a partir de piruvato e glicerol*. Estas observações já excluem a maior parte das enzimas também envolvidas no metabolismo da D-frutose, exceto a frutoquinase e a triosequinase (SCHOLZ & NOHL, 1976). Em segundo lugar, a entrada do

---

*Ishii-Iwamoto, E. L.; Bracht, A. (dados não publicados).

steviosídeo na célula ocorre de forma muito lenta ou talvez nem ocorra, mas a inibição da captação da frutose ocorre rapidamente. Em geral, não mais do que 2 minutos após o início/término da infusão eram necessários para que o efeito se completasse ou revertesse. Em dois minutos, a quantidade de steviosídeo que poderia ter alcançado o espaço aquoso celular é, sem dúvida, muito pequena.

O grau de inibição do metabolismo da D-frutose diminuiu com um aumento nas concentrações de D-frutose. É improvável que este fenômeno reflita o tipo de inibição. A afinidade do carreador de monossacarídeos pela D-frutose é menor do que pela D-glucose. Em hepatócitos isolados, BAUR & HELDT (1977) não encontraram saturação na faixa até 100 mM. SESTOFT & FLERON (1974), no entanto, apresentaram um K_m de 67 mM no fígado perfundido de rato. A concentração máxima de D-frutose utilizada neste trabalho foi de 10 mM, bem abaixo do K_m encontrado. Sob tais condições, **i.e.**, $K_m \gg$[frutose], o grau de inibição é praticamente independente do tipo de inibição, o que pode ser concluído de um simples exame da equação de Michaelis-Menten.

Este efeito da D-frutose no grau de inibição pode estar relacionado com a afinidade das enzimas responsáveis, no espaço intracelular, pelas transformações metabólicas. A introdução de um inibidor de transporte, quando o metabolismo está acoplado ao transporte, desloca a concentração intracelular a um novo estado estacionário. A concentração intracelular de D-frutose, sob condições normais, já é mais baixa do que a concentração extracelular. Com a infusão de steviosídeo, um decréscimo adicional deve ocorrer, a inibição do metabolismo, sendo uma consequência deste último fenômeno. Com concentrações altas de D-fru-

tose, a ponto de o sistema enzimático estar próximo à saturação, um certo decréscimo na concentração intracelular afetará menos a metabolização do que com baixas concentrações de D-frutose. Isto, na verdade, é uma consequência do fato de que, em concentrações em torno ou abaixo da constante de Michaelis (concentração para 50% de saturação), um sistema enzimático responde melhor a alterações na concentração do que em concentrações mais altas.

Um outro aspecto que chama a atenção é a sensibilidade desigual dos diversos parâmetros do metabolismo da D-frutose ao steviosídeo. A produção de D-glucose foi menos afetada do que a a produção de L-lactato + piruvato ou o consumo de oxigênio. O fenômeno pode refletir as complexas interrelações entre as concentrações dos diversos intermediários que provavelmente diminuem, e os coeficientes de controle de velocidade das etapas limitantes (GROEN **et al.**, 1982). Alternativamente, o fenômeno poderia também ser consequência da heterogeneidade do tecido hepático. Conforme mostrado por ARUNDI **et al.** (1987), a produção de glucose predomina na região periportal, enquanto que a frutólise ocorre mais rapidamente na região perivenosa. Como há um gradiente negativo de frutose ao longo dos sinusóides no sentido região periportal → região perivenosa, sendo menor a concentração de frutose na região onde predomina a produção de L-lactato e piruvato, este processo deveria também ser mais sensível a uma inibição do transporte, pelas razões já expostas no parágrafo anterior. É evidente, no entanto, que com os dados disponíveis não é possível dar uma explicação definitiva para o fenômeno.

4.6. EFEITOS METABÓLICOS DOS PRODUTOS DA **Stevia rebaudiana** E A INIBIÇÃO DO TRANSPORTE DE AÇÚCARES

Na **Introdução**, foram comentados os relatos sobre os possíveis efeitos metabólicos dos produtos naturais da **Stevia rebaudiana**. A questão que se impõe é se a ação do steviosídeo e seus derivados sobre o transporte de monossacarídeos pode explicar algumas das alterações relatadas. Em relação a esta questão, deve ser levada em conta a sensibilidade similar dos sistemas de transporte dos vários tecidos de mamíferos aos diversos inibidores. A florizina e a floretina, por exemplo, não afetam apenas o transporte passivo de açúcares no fígado e em eritrócitos, mas também o transporte ativo no epitélio intestinal e em túbulos renais (BAUR & HELDT, 1977; SILVERMAN **et al.**, 1970).

Se o efeito inibidor do steviosídeo e seus derivados sobre sistemas de transporte de açúcares for tão amplo como o da floretina e da florizina, então ele poderá representar um fator importante nos efeitos fisiológicos sobre o metabolismo de carboidratos, que vários autores afirmam ocorrer. Isto é particularmente verdadeiro nos casos em que os componentes da **Stevia rebaudiana** são ingeridos por via oral e as variáveis medidas são dependentes de absorção intestinal de carboidratos, seguido de uma transformação metabólica em vários tecidos. Isto inclui os experimentos de tolerância à glucose (CURI **et al.**, 1986; UEDA **et al.**, 1983) e os níveis de glicogênio (SUZUKI **et al.**, 1977). A taxa de síntese de glicogênio a partir de D-frutose, por exemplo, pode ser reduzida tanto por uma inibição da absorção intestinal, quanto por uma posterior inibição do trans-

porte no fígado. O steviosídeo, aparentemente não é absorvido (NAKAYAMA **et al.**, 1986), o que restringe a sua ação ao epitélio intestinal. No entanto, ele é degradado pela flora microbiana cecal (WINGARD **et al.**, 1980; NAKAYAMA **et al.**, 1986). O steviol, produto desta degradação, é totalmente absorvido e posteriormente metabolizado no fígado. Além de exercer, provavelmente, inibição do transporte de hexoses, o steviol também induz alterações pronunciadas no metabolismo de carboidratos em consequência de sua ação sobre o metabolismo energético. Ele inibe a neoglucogênese, ativa a glicogenólise e a glicólise e inibe o consumo de oxigênio (KELMER BRACHT **et al.**, 1985). Há também ainda a possibilidade de uma ação a nível do processo de reabsorção de D-glucose nos túbulos renais. Somando tudo isto, a resposta final no animal **in vivo** pode ser muito complexa e isto pode explicar a variabilidade de respostas observadas pelos diferentes autores, conforme amplamente discutido na **Introdução.**

Diante desse quadro, seria desejável que a ação dos produtos naturais da **Stevia rebaudiana** sobre o transporte de carboidratos em outros tecidos fosse investigada. Dependendo dos resultados, outras experiências **in vivo** poderiam ser planejadas mais adequadamente para esclarecer os dados contraditórios sobre os efeitos fisiológicos da **Stevia rebaudiana.**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 AKASHI, H. & YOKOYAMA, Y. Dried-leaf extracts of Stevia. Toxicological tests. **Shokuin Kogyo, 18**(20):34-43, 1975.

2 ALVAREZ, M. **Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni.** Estado atual do conhecimento. Maringá, 1984. Monografia, Universidade Estadual de Maringá. Mimeografado.

3 ALVAREZ, M. & KUSUMOTO, I.T. Análise quantitativa dos glicosídeos edulcorantes da **Stevia rebaudiana** e dos seus produtos de hidrólise através da cromatografia líquida de alta performance (HPLC). **Arq. Biol. Tecnol., 30**(2): 337-348, 1987.

4 ANGELUCCI, E. **O stevióside de plantas brasileiras de Stevia rebaudiana Bertoni e a potencialidade de seu emprego em alimentos.** Ensaios em formulações hídricas e carbonatadas. São Paulo, 1979. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo.

5 ARION, W.J.; ALEX, J.L.; HEATHER, E.W. & LAWRENCE, M.B. Evidence for the participation of independent translocase for phosphate and glucose 6-phosphate in the microsomal glucose 6-phosphatase system. **J . Biol. Chem., 255**(21): 10396-10406, 1980.

6 ARUNDI, I.; KAUFFMAN, F.C. & THURMAN, R.G. Gluconeogenesis from fructose predominates in periportal regions of the liver lobule. **J . Biol. Chem., 262**(20):9529-9534, 1987.

7 BAUR, H. & HELDT, H.W. Transport of hexoses across the liver cell membrane. **Eur. J. Biochem. 74**:397-403, 1977.

8 BERGMEYER, H.V.; BERNT, E.; SCHMIDT, F. & STORCK, H. Determination with hexoquinase and glucose 6-phosphate dehydrogenase. **In:** BERGMEYER, H.V, **Methods of Enzymatic Analysis, 2.** New York, Academic Press, 1974. p.1196-1198.

9 BERTONI, M.S. El kaá-he-é. Sa nature et ses propriétes. **An. Cient. Paraguayos série I**(5):1-14, 1905.

10 BJÖRCK, A. und DAHLQUIST, G. **Numerische Methoden, 1.** R. Oldenburg Verlag, Munique, 1972.

11 BOECKH, E.M.A. **Stevia rebaudiana** (Bert.) Bertoni: avaliação clínica da ação aguda sobre parâmetros cárdio-circulatórios, metabólicos e eletrolíticos em 60 pessoas sadias. **III Seminário Brasileiro sobre Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni.** Campinas, 1986. p.36.1. Resumo.

12 BOECKH, E.M.A. & HUMBOLDT, G. Avaliação clínica do efeito crônico do edulcorante natural **Stevia rebaudiana** Bertoni sobre o teste de tolerância à glucose. Parâmetros clínicos e eletrocardiográficos em indivíduos normais. **Ciência e Cultura, 32**:208-210, 1978.

13 BOOR, C. de. **In:** RICE, J.R. **Mathematical Software.** New York, Academic Press, 1971. p.417-419.

14 BRACHT, A.; KELMER BRACHT, A.M.; SCHWAB, J. & SCHOLZ, R. Transport of inorganic anions in perfused rat liver. **Eur. J. Bioch., 114**:471-479, 1981.

15 BRACHT, A.; SCHWAB, A.J. & SCHOLZ, R. Untersuchung von Flussgeschwindikeiten in der isolierten perfundierten Rattenleber durch Pulsmarkierung mit radioaktiven Substraten und mathematischer Analyse der Auswachkinetiken. **Hoppe-Seyler's Z. Phisiol. Chem., 361**:357-377, 1980.

16 BRIDEL, M. et LAVIEILLE, R. Le principle sucré du kaá-he-é (**Stevia rebaudiana** Bertoni). II. L'hidrólyse diastasique du stévióside. III. Le stéviol de l'hidrólyse diastasique et l'isosteviol de l'hidrólyse acide. **Bull. Soc. Chim. Biol., 13**:781-796, 1931.

17 CAHILL, G.F. Jr. Physiology of gluconeogenesis. **In:** KRAUS-FRIEDMAN, N. **Hormonal Control of Gluconeogenesis, 1.** Florida, CRC Press, 1986. p.3-13.

18 CAHILL, G.F.; ASHMORE, J.; SCOTT EARLE, A. & ZOTTU, S. Glucose penetration into liver. **Amer. J. Physiol., 192** (3):491-496, 1958.

19 CHAGAS, A.M.; TABARELLI, Z. & FRICK, W. Ação do extrato aquoso bruto de **Stevia rebaudiana** (Bert.) Bertoni sobre o coração isolado de cobaia. **III Seminário Brasileiro sobre Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni.** Campinas, 1986. p.32.1. Resumo.

20 CHINARD, F.P. & ENNS, T. Transcapillary pulmonary exchange of water in the dog. **Amer. J. Physiol., 178**: 197-202, 1954.

21 CLARET, M. & MAZET, J.L. Ionic fluxes and permeabilities of cell membranes in rat liver. **J. Physiol., 223**:279-295, 1972.

22 COPETTI, H.; CHAGAS, A.M. & ROSA, L.M.S. Ação aguda e sub-aguda do extrato aquoso da **Stevia rebaudiana** (Bert.) Bertoni sobre pneumograma e eletrocardiograma. **III Seminário Brasileiro sobre Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni.** Campinas, 1986. p.33.1. Resumo.

23 CROFFORD, O.B. & RENOLD, A.E. Glucose uptake by incubated rat epididymal adipose tissue. Rate-limiting steps and site of insulin action. **J. Biol. Chem., 240**:14-21. 1965.

24 CURI, R.; ALVAREZ, M.; BAZOTTE, R.B.; BOTION, L.M.; GODOY, J.L. & BRACHT, A. Effect of **Stevia rebaudiana** on glucose tolerance in normal adult humans. **Braz. J. Med. Biol. Res., 19**:771-774, 1986.

25 CZOK, R. & LAMPRECHT, W. Pyruvate, phosphoenolpyruvate and D-glycerate 2-phosphate. **In:** BERGMEYER, H.V. **Methods of Enzymatic Analysis, 2.** New York, Academic Press, 1974. p.1446-1448.

26 DEPIERRE, J.W. & DALLNER, G. Structural aspects of the membrane of the endoplasmic reticulum. **Biochem. Biophys. Acta, 415**:411-472, 1975.

27. DOLDER, F.; LICHTI, H.; MOSETTING, E.; QUITT, P. The structure and stereochemistry of steviol. **J. Amer. Chem. Soc., 82**:246-247, 1960.

28 DORFMAN, R.I. & NESS, W.R. Anti-androgenic activity of diidrosteviol. **Endocrinology, 67**:282-285, 1960.

29 DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, S.K.; REBERS, P.A. & SMITH, F.S. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analyt. Chem., 28**(6): 250-256, 1956.

30 DUBOWSKI, K.M. An o-toluidine method for body-fluid glucose determination. **Clin. Chem., 3**(8):215-225, 1962.

31 FARNSWORTH, N.R. Current status of sugar substitutes. **Amer. Perf. Cosmet., 88**(7):27-35, 1973.

32 FELIPE, G.M.; LUCAS, N.M.C.; BEHAR, L. & OLIVEIRA, M.A.C. Observações a respeito da germinação de **Stevia rebaudiana** Bert. **Hoehnea, 1**:81-93, 1971.

33 FERRARESI, M.L.; KELMER BRACHT, A.M. & BRACHT, A. Degradação enzimática do steviosídeo e seus derivados com o suco disgestivo de **Megalobulimus paranaguensis. Rev. Unimar, 6**(1):123-141, 1984.

34 FERRARESI, O.Fº & BRACHT, A. Lagrange's interpolation formula and its application to indicator dilution curves. **Arq. Biol. Tecnol., 31**(1):194, 1988. Resumo.

35 FUJITA, H. & EDAHIRO, T. Safety and utilization of stevia sweetener. **Food Industry, 22**(22):65-72, 1979.

36 GORESKY, C.A. & BACH, G.G. Membrane transport and the hepatic circulation. **Ann. N. Y. Acad. Sci., 170**:18-46, 1970.

37 GORESKY, C.A.; BACH, G.G. & NADEAU, B.E. The concentrative transport of rubidium-86. **J. Clin. Invest.**, **52**:975-990, 1973.

38 GORESKY, C.A.; BACH, G.G. & NADEAU, B.E. The transport and net removal of galactose. **J. Clin. Invest.**, **52**: 991-1009, 1973.

39 GORESKY, C.A. & NADEAU, B.E. The exchange of glucose across the cell membranes. **J. Clin. Invest.**, **53**:634-646, 1974.

40 GORESKY, C.A.; ZIERLER, W.H. & BACH, G.G. Capillary exchange modeling. **Circul. Research**, **27**:739-764, 1970.

41 GROEN, A.K.; van der MEER, R.; WESTERHOFF, H.V.; WANDERS, R.J.A.; AKERBOOM, T.P.M. & TAGER, J.M. Control of metabolic fluxes. **In:** SIES, H. **Metabolic compartimentation**. London, Academic Press, 1982. p.9-37.

42 GUTMANN, I. & WAHLEFELD, A.W. L-(+)-Lactate determination with lactate dehydrogenase and NAD. **In:** BERGMEYER, H.V. **Methods of Enzymatic Analysis**, **2**. New York, Academic Press, 1974. p.1464-1466.

43 HETENYI, G.; NORWICH, K.H.; STUDNEY, D.R. & HALL, J.D. The exchange of glucose across the liver cell membrane. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, **47**:361-367, 1969.

44 ISHII, E.L. & BRACHT, A. Ação do isosteviol e do steviol sobre o metabolismo de carboidratos em fígado de rato perfundido isoladamente. **Revista Unimar**, **7**(1):97-121, 1985.

45 ISHII, E.L. & BRACHT, A. Stevioside, the sweet glycoside of **Stevia rebaudiana**, inhibits the action of atractyloside in the isolated perfused rat liver. **Res. Com. Chem. Pathol. Pharmacol.**, **53**(1):79-91, 1986.

46 ISHIMA, N.; KATAYAMA, O. & YOKOYAMA, Y. Sensory evaluation of **Stevia rebaudiana** sweeteners. **Fifth International Congress of Food Science and Technology, Heldt at Kyoto**, 1978. p.158. Abstract.

47 JUNGERMANN, K. & KATZ, N. Functional hepatocellular heterogeneity. **Hepatology**, **2**:385-389, 1982.

48 KALCKAR, H.M.; BRAGANÇA, B. & MUNCH-PETERSEN, A. Uridyl transferases and the formation of uridine diphosphate galactose. **Nature**, **172**:1038, 1953.

49 KELMER BRACHT, A.M.; ALVAREZ, M. & BRACHT, A. Effects of **Stevia rebaudiana** natural products on rat liver mitochondria. **Biochem. Pharmacol.**, **34**(6):873-882, 1985.

50 KELMER BRACHT, A.M.; ISHII, E.L.; ANDRADE, P.V.M. & BRACHT, A. Construction of a liver perfusion apparatus for studies on metabolic regulation and mechanism of drug action. **Arq. Biol. Tecnol.**, **27**(4):419-438, 1984.

51 KELMER BRACHT, A.M.; KEMMELMEIER, F.S.; ISHII, E.L.; ALVAREZ, M. & BRACHT, A. Effect of **Stevia rebaudiana** natural products on cellular and sub-cellular metabolism. **Arq. Biol. Tecnol.**, **28**(3):431-455, 1985.

52 KELMER BRACHT, A.M.; OTANI, M. & BRACHT, A. O steviol e o extrato aquoso total das folhas da **Stevia rebaudiana** afetam a glicemia de ratos normais e diabéticos? **II Encontro Científico da Univer. Est. de Maringá**, 1983. p.81. Resumo.

53 KEMMELMEIER, F.S.; YAMAMOTO, N.S.; ISHII, E.L.; KELMER BRACHT, A.M. & BRACHT, A. Ação dos produtos naturais da **Stevia rebaudiana** sobre a glicólise em reticulócitos e eritrócitos. **Rev. Unimar**, **6**(1):83-97, 1984.

54 KIMMIG, R.; MAUCH, T.J.; KERZL, W.; SCHWABE, U. & SCHOLZ, R. Action of glucagon on fluxes rates in perfused rat liver. 1. Kinetics of the inhibitory effect of glycolysis and the stimmulatory effect on glycogenolysis. **Eur. J. Biochem.**, **136**:609-616, 1983.

55 KOBAYASHI, M.; HORIKAWA, S.; DEGRANDI, I.H.; UENO, J.; MITSUHASHI, H. Dulcosides A and B, new diterpene glycosides from **Stevia rebaudiana**. **Phytochemistry**, **16**: 1405-1408, 1977.

56 KOHDA, H.; KASAI, R.; YAMASAKI, K.; MURAKAMI, K. & TANAKA, O. New sweet diterpene glucosides from **Stevia rebaudiana**. **Phytochemistry**, **15**:981-983, 1976.

57 KREBS, H.A. & HENSELEIT, H. Untersuchungen Über die Harnstoffbildung im Tierkörper. **Z. Physiol. Chem.**, **210**:33, 1932.

58 LeFEVRE, P.G. Sugar transport in the red blood cell. Structure-activity relationship in substrates and antagonists. **Pharmacol. Rev.**, **13**:39-70, 1961.

59 LELOIR, L.F. Enzymatic transformation of uridine diphosphate glucose into galactose derivative. **Arch. Biochem. Biophys.**, **33**:186-190, 1951.

60 MACHADO, E.K.; CHAGAS, A.M. & REIS, D.S. **Stevia rebaudiana** (Bert.) Bertoni na pressão arterial de cão. **III Seminário Brasileiro sobre Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni.** Campinas, 1986. p.35.1. Resumo.

61 MEIER, P. & ZIERLER, K.L. On the theory of the indicator-dilution method for measurement of blood flow and volume. **J. Appl. Physiol.**, **6**(12):731-744, 1954.

62 METIVIER, J. & VIANA, A.M. The effect of long and short day lenght upon the growth of whole plants and the level of soluble proteins, sugars and stevioside in leaves of **Stevia rebaudiana** Bert. **J. Exp. Botany, 30**(119):1211-1222, 1979.

63 MIGUEL, O. Um nuevo hipoglicemiante oral. **Revista Médica del Paraguay, 7**:200-202, 1966.

64 MITSUHASHI, H. Safety of stevioside. **In: Tama Biochemical Co. Ltda. Reports on safety of Stevia**, 1976. p.9-10.

65 MONTEIRO, R. **Taxonomia e biologia da reprodução da Stevia rebaudiana Bert.** Campinas, 1980. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas.

66 MORI, N.; SOKANONE, M.; TAKEUSHI, M.; SHIMPO, K. & TANABE, T. Effect of stevioside on fertility in rats. **Shokuhin Eiseigaku Zashii, 22**(5):409-414, 1981.

67 MOSETTIG, E. & NES, W.R. Stevioside. II. The structure of the aglucon. **J. Org. Chem., 20**:884-899, 1955.

68 MORGAN, H.E.; HENDERSON, M.J.; REGEN, D.M. & PARK, C.R. Regulation of glucose uptake in muscle. I. Effects of insulin and anoxia on glucose transport and phosphorylation in the isolated perfused heart of normal rats. **J. Bioch. Clin., 236**:253-261, 1961.

69 NAFTALIN, R.J. & HOLMAN, G.D. Transport of sugar in human red cells. **In:** ELLORY, J.C. and LEW, V.L. **Membrane transport in red cells.** London, Academic Press, 1977. p.257-297.

70 NAKAYAMA, K.; KASAHARA, D. & YAMAMOTO, F. Absorption, distribution, metabolism and excretion of stevioside in rats. **J. Food Hyg. Soc. JPN, 27**(1):1-8, 1986.

71 OLIVEIRA, S.S. & PINHEIRO, C.E. Influência do guaraná **(Paullinia cupana)**, da **Stevia rebaudiana** (Bert.) Bertoni e do steviosídeo na incidência da cárie dentária em ratos **(Rattus norvegicus, albinus). III Seminário Brasileiro sobre Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni.** Campinas, 1986. p.6.1. Resumos.

72 OVIEDO, C.A.; FRONCIONE, G.; MORENO, R. & MAAS, L.C. Accion hipoglicemiante de la **Stevia rebaudiana** Bertoni (Kaá-h-é). **Excerpta Médica. The International Medical Abstracting Service. International Congress Series. Seventh Congress of the International Diabetes Federation, 209**:93, 1971. Abstract.

73 PEZZUTO, J.M.; COMPADRE, C.M.; SWANSON, S.M.; NANAYAKKARA, D.N.P. & KINGHORN, A.D. Metabolically activated steviol, the aglycone of stevioside, is mutagenic. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82**:2478-2482, 1985.

74 PINHEIRO, C.E. Efeito do steviosídeo e do extrato aquoso de **Stevia rebaudiana** (Bert.) Bertoni sobre a glicemia de ratos normais e diabéticos. **II Seminário Brasileiro sobre Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni.** Campinas, 1982. p.X1-2. Resumo.

75 PLANAS, G.M. & KUÉ, J. Contraceptive properties of **Stevia rebaudiana. Science, 162**:1007, 1968.

76 RANDI, A.M. & FELIPE, G.M. Efeito da temperatura, luz e reguladores do crescimento na germinação da **Stevia rebaudiana** Bert. **Ciência e Cultura, 33**:404-411, 1981.

77 REINSCH, H.R. Smoothing by cubic spline functions. **Numer. Math., 16**:451-454, 1971.

78 ROE, J.H. A colorimetric method for the determination of fructose in blood and urine. **J. Biol. Chem., 107**:15-22, 1934.

79 ROSS, B.D.; FREEDLAND, R.A. & KREBS, H.A. Carbohydrate metabolism in the perfused rat liver. **Biochem. J,, 105**: 869-875, 1967.

80 SAINAITI, A.R.; MELIS, M.S.; MACIEL, R.E. & RAMALHO, A.C. Efeito do steviosídeo sobre a função renal de ratos. **III Seminário Brasileiro sobre Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni.** Campinas, 1986. p.29.1. Resumo.

81 SAKAMOTO, I.; YAMASAKI, K. & TANAKA, O. Application of 13C-NMR spectroscopy to chemistry of plant glycosides: rebaudiosides D and E, new sweet diterpene glycosides of **Stevia rebaudiana** Bertoni. **Chem. Pharm. Bull., 25** (12):2437-2439, 1977.

82 SAMANIEGO, C.C. **Stevia rebaudiana** - "Caa-jhe-he" (Yerba dulce). **Revista Farmacêutica**. Buenos Aires. **88**:199-202, 1946.

83 SANGREN, W.C. & SHEPPARD, C.W. A mathematical derivation of the exchange of a labeled substance between a liquid flowing in a vessel and a external compartment. **Bull. Mathem. Biophys., 15**:387-394, 1953.

84 SCHMELING, G.A. von. Caá-ehe. Edulcorante natural não calórico. **01. San. S. Lucas**, S. Paulo. **XCIV**(5):67-68, 1967.

85 SCHMELING, G.A. von; CARVALHO, F.V. & SPINOSA, A.D. **Stevia rebaudiana** Bertoni. Avaliação do efeito hipoglicemiante em coelhos aloxanizados. **Ciência e Cultura, 22**(5):599-601, 1977.

86 SCHOLZ, R. & BUECHER, Th. Hemoglobin-free perfusion of rat liver. **In:** CHANCE, B.; ESTABROOK, R.W. & WILLIANSON, J.R. **Control of energy metabolism.** New York, Academic Press, 1965. p.393-414.

87 SCHOLZ, R. & NOHL, H. Mechanism of the stimulatory effect if fructose in ethanol oxidation in perfused rat liver. **Eur. J. Bioch., 86**:519-530, 1976.

88 SCHWAB, A.J.; BRACHT, A. & SCHOLZ, R. Transport of D-lactate in perfused rat liver. **Eur. J. Bioch., 102**: 537-547, 1979.

89 SESTOFT, L. Regulation of fructose metabolism in the perfused rat liver. Interrelation with inorganic phosphate, glucose, ketone body and ethanol metabolism. **Bioch. Biophys. Acta, 343**:1-16, 1974.

90 SESTOFT, L. & FLERON, P. Determination of the kinetic constants of fructose transport and phosphorylation in the perfused rat liver. **Bioch. Biophys. Acta, 345**(1): 27-38, 1974.

91 SILVERMAN, M.; AGANON, M.A. & CHINARD, F.P. D-Glucose interaction with renal tubule cell surfaces. **Amer. J. Physiol., 218**(3):735-742, 1970.

92 SOBOLL, S.; ELBERS, R.; SCHOLZ, R. & HELDT, H. W. Distribution of di- and tricarboxilates and pH gradients in perfused rat liver. **Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 361**:69-76, 1980.

93 SOEJARTO, D.D. & KINGHORN, A.D. Current status of stevioside as a sweetening agent for human use, 1986. **S.n.t.**

94 SPRANDEL, V.; WOLFRAM, G. & SCHOLZ, R. Metabolism of maltose in perfused rat liver and isolated hepatocytes. **Res. Exp. Med., 168**:157-163, 1976.

95 SUMIDA, T. Reports on **Stevia rebaudiana** Bertoni introduced from Brazil as a new sweeteners resource in Japan. **Misc. Publ. Hokkaido Natl. Agrc. Exp. Stn., 2**:69-83, 1973.

96 SUZUKI, H.; KASAI, T.; SUMIHARA, M. & SUGISAWA, H. Influence of oral administration of stevioside on levels of blood glucose and glycogen of intact rats. **Nippon Nogei Kagaku Kaishi, 51**(3):171-173, 1977.

97 TANAKA, O. Chemistry of **Stevia rebaudiana** Bertoni. New source of natural sweeteners. **Recent. Adv. Nat. Prod. Res., Proc. Int. Symp., 1979.** p.111-119 e p.219-227, 1980.

98 THURMAN, R.G. & KAUFFMAN, F. Factors regulation drug metabolism in intact hepatocytes. **Pharmac. Rev., 31** (4):229-251, 1980.

99 TURRIN, M.Q.A. Esteviosídeo: potenciação da resposta contrátil em músculo liso isolado de cobaia. **I Seminário Brasileiro sobre Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni.** Campinas, 1981. p.XII-1-XII.4. Resumo.

100 UEDA, M.; WELFFORT, R.M.M.; ZUBIOLI, A.; BERSANI, C.A.; BAZOTTE, R.B.; GAETI, W.P. & ALVAREZ, M. Efeito do extrato aquoso da **Stevia rebaudiana** (Bert.) Bertoni sobre o teste de tolerância a glucose em ratos normais adultos. **Revista Unimar, 5**(1):111-115, 1983.

101 VIGNAIS, P.V.; DUEE, E.D.; VIGNAIS, P.M. & HUET, J. Effect of atractyligenin and its structural analogues on oxidative phosphorylation and the translocation of adenine nucleotides in mitochondria. **Bioch. Biophys. Acta, 118**:465-483, 1966.

102 WILKINSON, G.N. Statistical stimations in enzyme kinetics. **Bioch. J. ., 80**:324-332, 1961.

103 WILLIAMS, T.F.; EXTON, J.H.; PARK, C.R. & REGEN, D.M. Stereospecific transport of glucose in the perfused rat liver. **Amer. J. Physiol., 215**:1200-1209, 1968.

104 WILLIAMS, J.A. & WOODBURY, D.M. Determination of extracellular space and intracellular eletrolytes in rat liver **in vivo. J. Physiol., 212**:85-99, 1971.

105 WINGARD, R.E.; BROWN, J.P.; ENDERLIN, F.E.; HALE, R.L. & SEITZ, C.T. Intestinal degradation and absorption of the glycosides sweeteners stevioside and rebaudioside A. **Experientia, 36**:519-520, 1980.

106 WOOD, H.B. & FLETCHER Jr, H.G. Stevioside III. The anomeric 2, 3, 4, 6-tetra-O-acetyl, 1-O-mesitoyl-glucopyranoses and their behavior with alkali. **J. Amer. Chem. Soc., 78**:207-210, 1956.

107 WOODS, H.F.; EGGLESTON, L.V. & KREBS, H.A. The cause of hepatic accumulation of fructose 1-phosphate on fructose loading. **Bioch. J., 119**:501-510, 1970.

108 WOODS, H.F. & KREBS, H.A. Lactate production in the perfused rat liver. **Bioch. J., 125**:129-139, 1971.

109 YABU, M.; TAKASE, M.; TODA, K.; TANIMOTO, K.; YASUTAKE, A. & IWAMOTO, Y. Studies on stevioside natural sweetener. **Hiroshima Daigaku Shigaku Zaishii, 9**(1):12-17, 1977.

110 YAMAMOTO, N.S.; KELMER BRACHT, A.M.; ISHII, E.L.; KEMMELMEIER, F.S.; ALVAREZ, M. & BRACHT, A. Effect of steviol and its structural analogues on glucose production and oxygen uptake in rat renal tubules. **Experientia, 41**:55-57, 1985.

111 ZEHNER, J.; LOY, E.; MULLHOFER, G. & BUCHER, T. The problem of cell heterogeneity of liver tissue in the study of fructose metabolism. **Eur. J. Biochem.**, **34** (2):248-255, 1973.

112 ZELNICK, R. **Pesquisa sobre o novo steviosídeo da Stevia rebaudiana**, 1964. Relatório projeto FAPESP nº 64/025.