



**REDE DE BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA DA AMAZÔNIA  
LEGAL UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS  
COORDENAÇÃO ESTADUAL DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA - PPG-BIONORTE**

---

**Odelio Joaquim da Costa**

**Atividade antioxidante e antidiabética de *Anadenanthera colubrina* (Vellozo) Brenan do cerrado tocantinense.**

**Palmas – TO**

**2020**

**Odelio Joaquim da Costa**

**Atividade antioxidante e antidiabética de *Anadenanthera colubrina* (Vellozo) Brenan do cerrado tocantinense.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal - Bionorte, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia – Rede Bionorte, área de concentração Biotecnologia.

**Orientador:** Prof. Dr. Sérgio Donizeti Ascêncio

**Coorientador:** Prof. Dr. Ilsamar Mendes Soares

**Área de concentração:** Biotecnologia

**Linha de pesquisa:** Bioprospecção e Desenvolvimento de Bioprocessos e Bioprodutos

**Palmas – TO**

**2020**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins**

---

- C837a Costa, Odelio Joaquim da.  
Atividade antioxidante e antidiabética de *Anadenanthera colubrina* (Vellozo) Brenan do cerrado tocaninense.. / Odelio Joaquim da Costa. – Palmas, TO, 2020.  
61 f.
- Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Doutorado) em Biodiversidade e Biotecnologia, 2020.  
Orientador: Sérgio Donizeti Ascêncio  
Coorientador: Ilsamar Mendes Soares
1. *Anadenanthera Colubrina*. 2. Flavonoides. 3. Antioxidantes. 4. Diabetes Mellitus. I. Título

**CDD 660.6**

---

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

**Atividade antioxidante e antidiabética de *Anadenanthera colubrina* (Vellozo) Brenan do cerrado tocantinense.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal – Bionorte. Em 10 de Novembro de 2020, foi avaliada para a obtenção do título Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia – Rede Bionorte, área de concentração Biotecnologia e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca examinadora.

Data da aprovação: 10 de Novembro de 2020.

Banca examinadora:

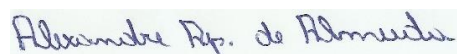


---

Prof. Dr. Sérgio Donizeti Ascêncio - UFT  
(Orientador - Presidente da banca)



Prof. Dr. Estélio Henrique Martin Dantas - UNIRIO



Prof. Dr. Alexandre Aparecido de Almeida - IFTO



Prof. Dr. Raimundo Wagner Souza Aguiar - UFT



---

Prof. Dra. Elisandra Scapim - UFT

## RESUMO

O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença crônica resultante do distúrbio progressivo da produção ou funcionamento do hormônio pancreático insulina, levando ao aumento dos níveis de glicose no sangue. A hiperglicemia é uma das principais características da DM tipo 2. A influência da enzima  $\alpha$ -glucosidase no DM está bem documentada. Ela converte carboidratos de cadeia longa em unidades monossacarídicas mais simples, um processo que permite a rápida absorção de carboidratos, resultando em altos níveis de glicose no sangue. Fazem parte do tratamento antidiabético a utilização de agente oral, com o propósito de redução da glicemia pós prandial. O objetivo do estudo foi investigar o potencial terapêutico do extrato da casca da planta *Anadenanthera colubrina* (BEAc) para auxiliar no tratamento do diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e no controle antioxidante das espécies reativas de oxigênio. Nos Estudos in vitro, foram avaliados a inibição da enzima  $\alpha$ -glucosidase, o BEAc exibiu uma potente inibição, 31 vezes maior que a do inibidor sintético arcabose e seu efeito foi dependente da dose nas concentrações testadas. Nas análises cinéticas dos resultados das plotagens de Lineweaver-Burk e Michaelis-Menten observou uma inibição competitivamente na reação catalisada pela  $\alpha$ -glucosidase. Em relação à eliminação de radicais livres, o BEAc exibiu uma relação dose-resposta mais eficaz que os antioxidantes rutina, hidroxianisol butilado (BHT) e semelhante ao ácido ascórbico nas mesmas concentrações. Na análise química de BEAc por HPLC foram identificados por referência a padrões autênticos quatorze compostos químicos. Este estudo revelou que a planta é rica em compostos fenólicos, apresentou a primeira evidência da atividade antidiabética da casca de *A. colubrina* e confirmou o potencial como antioxidante. Esses resultados apresentaram uma fonte natural que pode auxiliar no tratamento da diabetes tipo 2, controlando a glicemia pós-prandial, inibindo a  $\alpha$ -glucosidase e controlando a oxidação de biomoléculas. Podendo atuar no tratamento específico da doença e atenuando os efeitos antioxidantes dos distúrbios do metabolismo dos macronutrientes.

Palavras chaves: *A. Colubrina*; Flavonoides; Antioxidantes; Diabetes Mellitus.

## ABSTRACT

Diabetes Mellitus (DM) is a chronic disease resulting from the progressive disturbance of the production or functioning of the pancreatic hormone insulin, leading to an increase in blood glucose levels. Hyperglycemia is one of the main characteristics of type 2 DM. The influence of the  $\alpha$ -glucosidase enzyme on DM is well documented, it converts long-chain carbohydrates into simpler monosaccharide units, a process that allows rapid absorption of carbohydrates, resulting in high blood glucose levels. The use of oral agent is part of antidiabetic treatment, with the purpose of reducing post-prandial blood glucose. The purpose objective of the study was to investigate the therapeutic potential of the bark extract of the plant *Anadenanthera colubrina* (BEAc) to assist in the treatment of type 2 diabetes mellitus (DM2) and in the antioxidant control of reactive oxygen species. In in vitro studies, the inhibition of the enzyme  $\alpha$ -glucosidase was evaluated, the BEAc exhibited a potent inhibition, 31 times greater than that of the synthetic inhibitor acarbose and its effect was dose-dependent at the tested concentrations. In the kinetic analyzes of the results of the Lineweaver-Burk and Michaelis-Menten plots, was observed a competitive inhibition in the reaction catalyzed by  $\alpha$ -glucosidase. Regarding the elimination of free radicals, BEAc exhibited a more effective dose-response relationship than antioxidants rutin, butylated hydroxyanisole (BHT) and similar to ascorbic acid in the same concentrations. In the chemical analysis of BEAc by HPLC, fourteen chemical compounds were identified by reference to authentic standards. This study revealed that the plant is rich in phenolic compounds, presented the first evidence of the anti-diabetic activity of the bark of *A. colubrina* and confirmed its potential as an antioxidant. These results showed a natural source that can assist in the treatment of type 2 diabetes, controlling postprandial glycemia, inhibiting  $\alpha$ -glucosidase and controlling the oxidation of biomolecules. Acting both in the specific treatment of the disease and attenuating the antioxidant effects of disturbances in the metabolism of macronutrients.

Keywords: *A. Colubrina*; Flavonoids; Antioxidants; Diabetes mellitus.

**LISTA DE ILUSTRAÇÃO**

## LISTA DE ILUSTRAÇÃO CAPÍTULO 2

- Figure 1. Percentage of inhibition of DPPH radical by *A. colubrina* bark extract and the positive controls ascorbic acid, rutin and butylated hydroxytoluene (BHT).....59
- Figure 2. Inhibitory effect of *A. columbrina* (A) and Acarbose (B) bark extract (5 - 200 µg/mL) on  $\alpha$ -glucosidase activity. Inhibition was calculated using pNPG (2 mM) and expressed as µg/mL.....60
- Figure 3. Modes of inhibition of [alpha]-glucosidase by acarbose (A and B) and shell extract of *A. colubrina* (C and D). (A and C) Lineweaver-Burk plots, (B and D) Michaelis-Menten plots.....61
- Figure 4: High-performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint of the shell extract of *A. colubrina* detected at 280 nm.....62

**LISTA DE TABELA CAPÍTULO 2**

Table 1. IC50 of DPPH inhibition by <i>A. colubrina</i> bark extract and the positive controls ascorbic acid, rutin and butylated hydroxytoluene (BHT).....	63
---	----



## Lista de siglas

- **OH** radical hidroxila
- **O<sub>2</sub><sup>-</sup>** ânions superóxido
- AA** atividade antioxidante total.
- ABTS** 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonicacid) diammonium salt
- ADA** American Diabetes Association
- AG** Aminoguanidina
- AGEs** *Advanced Glycation end Products*
- ATP** Adenosina trifosfato
- BHT** Hidroxitolueno butilado
- CE** Catequina equivalente
- CO<sub>2</sub>** Dióxido de carbono
- DM** Diabete mellitus
- DM1** Diabetes tipo 1
- DM2** Diabetes tipo 2
- DPPH** 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
- ERN** espécies reativas de nitrogênio
- EROs** Espécies Reativas de Oxigênio
- ES** complex Enzima Substrato
- GAE** ácido gálico equivalente
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** peróxido de hidrogênio
- HPLC** High performance liquid chromatography
- IDF** International Diabetes Federation
- K<sub>m</sub>** constante de Michaelis xxxx
- mg** miligrama
- MIC** Concentração inibitória mínima.
- Milli-Q** Água deionizada ultrapurificada.
- mL** Mililitros.
- NEU/PEG** reagentes natural com polietileno glicol.
- ng** – nanogramas
- O<sub>2</sub>•-** superóxido
- O<sub>2</sub>** oxigênio
- OH•** hidroxila
- OMS** Organização Mundial de Saúde

**pNPG** p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside

**RE** Rutina equivalente

**RS** espécies reativas

**SBD** Sociedade Brasileira de Diabetes

**TLC** Thin layer chromatography

**UV-vis** Ultravioleta visível

**V<sub>máx</sub>** valor máximo

**WHO** World Health Organization

## Lista de símbolos

$\alpha$  - Alfa

$\mu$ - micro

$\pm$  - mais ou menos

® - registrado

## Sumário

RESUMO.....	v
ABSTRACT .....	vi
Lista de Ilustração .....	vii
Lista de tabela.....	vii
Lista de siglas .....	ix
Lista de símbolos.....	xii
Apresentação.....	xiii
<b>Introdução .....</b>	<b>14</b>
Objetivos.....	17
Objetivo geral.....	17
Objetivos específicos.....	17
<b>Capítulo 1- Diabetes, Estresse oxidativo, Antioxidantes, Planta medicinal e Considerações sobre o resultado da pesquisa.....</b>	<b>18</b>
DIABETES.....	18
Conceitos e Definições.....	18
Dados epidemiológicos no Mundo e no Brasil.....	21
Classificação.....	21
Tratamento para DM2.....	22
ESTRESSE OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES.....	26
Estresse Oxidativo.....	26
Antioxidantes.....	28
PLANTA MEDICINAL.....	30
Anadenanthera Colubrina.....	32
Referências.....	34
<b>Capítulo 2 - Inhibitory effects of <i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan stem bark extract on <math>\alpha</math>-glucosidase activity and oxidative stress.....</b>	<b>40</b>
ABSTRACT .....	42
INTRODUCTION.....	43
MATERIALS AND METHODS .....	45
Plant material.....	45
Preparation of extract .....	45
DPPH antiradical scavenging activity.....	45
Alpha-glucosidase inhibitory assay .....	46
Kinetics of alpha-glucosidase inhibition .....	46
Phytochemical analysis .....	47
Preliminary phytochemical analysis .....	47
High performance liquid chromatography analysis (HPLC) .....	47
Statistical analysis .....	48
RESULTS.....	49
DISCUSSION .....	50
CONCLUSIONS .....	53
CONFLICT OF INTERESTS.....	53
ACKNOWLEDGEMENTS .....	53
REFERENCES .....	54
Figuras.....	59
Tabela.....	63

## APRESENTAÇÃO

Este trabalho apresenta após uma introdução geral e a apresentação dos objetivos da pesquisa, a tese foi dividida em dois capítulos, no primeiro capítulo apresentamos uma análise feita na literatura que estruturou cientificamente o estudo, e no capítulo dois apresentamos a metodologia, os resultados, as discussões e as conclusões da pesquisa. A formatação do capítulo dois atende às normas próprias do periódico *Journal of Medicinal Plants Research* no qual foi aceito para publicação.

O referencial teórico é específico e independente nos capítulos.

Na integração do trabalho como um todo, a planta *A. Colubrina* é estudada quanto ao potencial de controle do Diabetes Mellitus *in vitro*. São essenciais estudos farmacológicos *in vivo* que comprovem os efeitos da planta utilizada pela população diabética, observando assim os benefícios desejados à saúde dos pacientes.

## 1 INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus (DM) é Uma doença metabólica, crônica e complexa que altera o metabolismo de lipídios, carboidratos e proteínas. O tratamento precisa de cuidados médicos contínuos, com estratégias multifatoriais de redução de risco, além do controle glicêmico (RODWELL et al., 2017; INFANTE-GARCIA e GARCIA-ALLOZA, 2019; ADA, 2020). É caracterizado por hiperglicemia em jejum e pós-prandial, resultantes de defeitos na secreção de insulina, ação da insulina, ou ambos (ADA, 2020).

O DM é um problema de saúde em ordem crescente, em que, o quantitativo de indivíduos apresentando Diabetes na população mundial chega a 468 milhões, incluindo a faixa etária entre 20 e 79 anos. Em 2045 a perspectiva que 700 milhões de pessoas desenvolva DM (IDF, 2019). No ranking dos 10 primeiros países no mundo com o maior número de pessoas com DM, o Brasil estava em quinto lugar. E no ranking da América Latina, o Brasil era o primeiro com 16,8 milhões de habitantes com DM em 2019 (IDF, 2019).

De acordo com a prerrogativa da Organização Mundial de Saúde (OMS), há várias formas de Diabetes: tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2), formas híbridas de DM, tipos específicos de DM (Diabetes monogênico, doenças do pâncreas exócrino, distúrbios endócrinos - induzido por drogas ou produtos químicos, Diabetes relacionado à infecção, formas incomuns específicas de Diabetes imunomediado e outras síndromes genéticas, às vezes associadas ao Diabetes), DM não classificado e DM gestacional (OMS, em inglês WHO, 2019).

Independente da causa fisiopatológica, o estágio inicial do Diabetes é singularizado pela resistência à insulina e hiperglicemia. E afirmar-se-á que para compensar a hiperglicemia, as células  $\beta$ -pancreáticas aumentam a produção de insulina, quando produção de insulina não é suficiente, ocorre um estado pré-diabético (INFANTE-GARCIA; GARCIA-ALLOZA, 2019).

Constata-se a hiperglicemia crônica envolvida na gênese de diversos eventos bioquímicos, os quais resultam em um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade do sistema de defesa antioxidante em neutralizá-la, resultando um estado de estresse oxidativo (MAIESE, 2015). Então o estresse oxidativo é elevado (TANGVARASITTICHAI, 2015 e NIMESH *et al.*, 2019) e associa-se à patogênese de resistência à insulina (TANGVARASITTICHAI, 2015), aumentando a peroxidação lipídica (NIMESH et. al., 2019).

Foram realizadas análises onde se estabelecem que fazem parte do tratamento convencional para o DM as mudanças no estilo de vida (educação em saúde, alimentação e atividade física) e utilização de agentes antidiabéticos que reduzem a glicemia a fim de mantê-la em níveis normais, em jejum < 100 mg/dL e pós-prandial < 140 mg/dL (SBD, 2019).

Os medicamentos antidiabéticos são classificados em sulfonilureias e glinidas, inibidores da alfa-glicosidase, biguanidas, glitazonas, aqueles que exercem efeito incretínico, mediado pelos hormônios GLP-1 (peptídeo semelhante a glucagon 1, e GIP (peptídeo inibidor gástrico) (SBD, 2019).

Abordou-se neste estudo o tratamento do DM2, a forma mais frequente de Diabetes, responsável por atingir aproximadamente cerca de 90% a 95% dos pacientes diagnosticados com Diabetes no mundo (WHO 2019), em que a hiperglicemia é o resultado da associação de uma produção inadequada de insulina e da incapacidade do organismo de responder fisiologicamente ao hormônio, resultando na resistência à insulina.

O DM2 está associado às rápidas mudanças culturais, econômicas e sociais, envelhecimento da população, crescente urbanização não planejada, mudanças na dieta, em que se potencializa o consumo de alimentos altamente processados e bebidas açucaradas, obesidade, atividade física reduzida, desnutrição fetal e aumento da exposição fetal à hiperglicemia durante a gravidez (WHO, 2019).

Pautou-se que apesar dos avanços na ciência moderna para as várias terapias antidiabéticas, utilizando medicamentos convencionais sintéticos, às vezes, os tratamentos longitudinais costumam não serem bem-sucedidos, por apresentarem custo elevado e efeitos colaterais adversos, como diarreia, distensão abdominal e flatulência para os pacientes portadores de DM (UNUOFIN; LEBELO, 2020). Desta forma, mediante a comprovação das dificuldades citadas, reconhece-se a necessidade da exploração de estratégias terapêuticas naturais, onde são empregadas plantas medicinais, em que se constata potenciais antidiabéticos, que proporcionam melhor relação de custo-benefício e menos efeitos colaterais à população (ALVES 2007; MARÍN-PEÑALVER *et al.*, 2016; UNUOFIN; LEBELO, 2020).

Registra-se que diversas plantas medicinais são utilizadas para o tratamento de várias doenças (AGRA *et al.*, 2008; ALBUQUERQUE *et al.*, 2008, SANTOS *et al.*, 2013 e KAPOOR, 2017). Muitos produtos vegetais demonstraram ação antidiabética e atividade antioxidante (BANU *et al.*, 2015; GIORDANI *et al.*, 2015 e YIN *et al.*, 2014). Vários métodos de inibição da  $\alpha$ -glicosidase foram propostos para extratos vegetais (RAMU *et al.*, 2014; SHELIYA *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2019; BHATIA *et al.*, 2019), onde os compostos fenólicos se ligam à enzima  $\alpha$ -glicosidase, resultando em alteração conformacional da enzima e diminuindo seu desempenho no substrato (PENG *et al.*, 2016).

As atividades antidiabética e antioxidante das plantas medicinais são atribuídas à presença de polifenóis, flavonoides, terpenóides, cumarinas e outros constituintes em que se verificam a redução dos níveis de glicose no sangue (ALVES, 2007; YIN *et al.*, 2014; RAMU

*et al.*, 2014; BANU *et al.*, 2015; GIORDANI *et al.*, 2015; MARÍN-PEÑALVER *et al.*, 2016; PENG *et al.*, 2016; SHELIYA *et al.*, 2016; BHATIA *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2019).

Seleciona-se a planta *A. colubrina* para ser estudada, a fim de disponibilizar à sociedade diabética brasileira, considerações comprovadamente eficazes, que favoreçam o tratamento contra o DM, reverberando na qualidade de vida do indivíduo. Encontrada no Cerrado tocantinense, a *A. colubrina* pertence à família Mimosoidea, uma espécie botânica em que se verifica propriedade medicinal, tradicionalmente é administrada por via oral, preparada por decocção, infusão ou suco, obtida por maceração de partes da referida planta (AGRA *et al.*, 2008). É usada empiricamente para tratar inflamação, doença respiratória, anemia, alguns tipos de câncer, gripe, dor de estômago, cicatrizes, problemas pulmonares, infecção geral, atua como antisséptica (AGRA *et al.*, 2008; ALBUQUERQUE *et al.*, 2008; CARTAXO *et al.*, 2010).

*A. colubrina* apresenta baixa toxicidade sistêmica in vivo (LIMA *et al.*, 2014; DE SOUZA *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2020) e foi cientificamente testada e comprovada como antifúngica, antinociceptiva periférica, anti-inflamatória, antibiótica, antioxidante, proposta para o controle de crescimento de células tumorais humanas, (LIMA *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2013; CAMPOS *et al.*, 2014; DAMASCENA *et al.*, 2014; LIMA *et al.*, 2014; BARRETO *et al.*, 2015; NUNES *et al.*, 2015; DE SOUZA *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2019). As principais classes de compostos descritos para as espécies são flavonóides, fitoesteróis e taninos (WEBER *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2013).

Evidencia-se na literatura científica que moléculas bioativas, de fontes naturais, diminuem os níveis de glicose no sangue, *via* regulação de um ou mais dos seguintes mecanismos: melhoria da função das células beta, resistência à insulina, (re) absorção de glicose e homeostase do peptídeo 1, do tipo glucagon (UNUOFIN; LEBELO, 2020).

Há de se ponderar na literatura que a planta *A. colubrina* apresenta na sua constituição fitoquímica alguns fitoesteróis que podem apresentar ações antidiabéticas e antioxidantes que auxiliam no tratamento do Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2).



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar as principais classes de metabólitos secundários avaliando o potencial do extrato da casca do caule nas atividades antioxidantes e antidiabéticas (*in vitro*) de *A. colubrina* oriundos do Cerrado tocantinense.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter perfil cromatográfico por CLAE (*Fingerprint*) do extrato da casca de *A. colubrina* do Cerrado tocantinense.
- Determinar o perfil fitoquímico da casca da *A. colubrina* do Cerrado tocantinense.
- Avaliar o potencial do extrato da *A. colubrina* na atividade antioxidante.
- Avaliar o potencial do extrato da *A. colubrina* na atividade antidiabética.

### **3 CAPÍTULO 1 - DIABETES, ESTRESSE OXIDATIVO, ANTIOXIDANTES, PLANTA MEDICINAL E CONSIDERAÇÕES SOBRE O RESULTADO DA PESQUISA**

#### **3.1 DIABETES**

##### **3.1.1 Conceitos e Definições**

O Diabetes do grego diabétes, poliúria, polidipsia e polifagia, Mellitus: sacarino ou açucarado (AIRES, 2018) é um problema de saúde crescente, em todo o mundo, que pode levar a graves complicações, no corpo, ao longo do tempo, tais como: distúrbios microvasculares e macrovasculares, que resultam em retinopatia, nefropatia, neuropatia, doença coronariana (AIRES, 2018; SDB, 2019), doença cerebrovascular e doença arterial periférica (SBD, 2019).

O DM é uma doença que afeta o metabolismo de lipídios, proteínas e carboidratos, requer cuidados médicos contínuos, com estratégias multifatoriais de redução de risco, além do controle glicêmico (GUYTON; HALL, 2017; RODWELL et al., 2017; INFANTE-GARCIA E GARCIA-ALLOZA, 2019; ADA, 2020).

O Diabetes também tem sido responsabilizado por contribuir para agravos, direta ou indiretamente, no sistema musculoesquelético, no sistema digestório, na função cognitiva e na saúde mental, além de ser associado a diversos tipos de câncer (SBD, 2019). Conseqüentemente causando uma desregulação do metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas. As tentativas de estudos para compreender a patogênese do Diabetes baseiam-se nas alterações glicêmicas, apesar da grande variedade de manifestações clínicas e condições associadas (SBD, 2019).

É designado principalmente por uma perda da homeostase da glicose, levando a hiperglicemia em jejum e aumentando acentuadamente a pós-prandial, resultando no defeito na secreção ou na ação do hormônio insulina (GUYTON; HALL, 2017; ADA, 2020).

O pâncreas é o órgão que além de apresentar funções digestivas, participa do controle da regulação hormonal, do metabolismo dos macronutrientes, produzindo os hormônios insulina e glucagon (GUYTON; HALL, 2017). Este órgão é formado por dois tipos principais de tecido, os ácinos, que secretam o suco digestivo no duodeno, e as ilhotas de Langerhans, que contêm três tipos celulares principais, as células alfa, beta e delta. As células betas secretam insulina, as células alfas secretam glucagon e as células deltas secretam somatostatina (AIRES, 2018).

O hormônio insulina foi isolado pela primeira vez no pâncreas, em 1920, pelos canadenses John Macleod, Frederick Banting e Charles Best (AIRES, 2018), é uma proteína pequena, que tem peso molecular de 5.808. Formada por duas cadeias de aminoácidos, sua meia-vida plasmática é de aproximadamente 6 minutos, na forma livre, se liga aos receptores, nas células-alvo. O restante é degradado pela enzima insulinase, em sua maior parte no fígado, e em menor quantidade nos rins, músculos e outros tecidos, eliminado da circulação no período de 10 a 15 minutos (GUYTON; HALL, 2017).

A secreção de insulina é regulada pela quantidade de glicose a níveis plasmáticos, quando existe quantidade excessiva de carboidratos, a mesma aumenta. No caso de demasia de carboidratos, a insulina faz com que sejam armazenados sob a forma de glicogênio, principalmente no fígado e nos músculos. Além disso, todo o excedente de carboidrato, que não pode ser acondicionado é convertido sob o estímulo da insulina em gordura e armazenado no tecido adiposo. No caso das proteínas, a insulina exerce efeito direto na promoção da captação de aminoácidos pelas células (GUYTON; HALL, 2017).

Tanto no fígado, quanto no músculo esquelético, a insulina atua para estimular glicogênio sintase e inibir glicogênio fosforilase. No tecido adiposo, a insulina estimula a captação de glicose, sua conversão em ácidos graxos e sua esterificação a triacilglicerol. Ela inibe a lipólise intracelular e a liberação de ácidos graxos não esterificados. No tecido adiposo e no músculo esquelético, a lipase lipoproteica extracelular é sintetizada e ativada em resposta à insulina (RODWEL et. al., 2017).

Durante grande parte do dia, o tecido muscular depende da glicose e dos ácidos graxos como fonte de energia. Esses tecidos sensíveis à insulina captam glicose da corrente sanguínea em qualquer grau significativo apenas na presença da insulina. (GUYTON; HALL, 2017; RODWEL et. al., 2017)

Numa pessoa fisiologicamente normal, em jejum, a concentração de glicose sanguínea geralmente fica entre 80 e 90 mg/100 mL de sangue. Essa concentração aumenta para 120 a 140 mg/100 mL depois da refeição, mas os sistemas de feedback para o controle da glicose sanguínea restabelecem a concentração de glicose rapidamente de volta aos níveis de controle, em geral, dentro de 2 horas depois da última absorção de carboidratos. Na ausência de alimentação, o fígado produz a glicose (gliconeogênese) necessária para manter o nível sérico de glicose em jejum (GUYTON; HALL, 2017).

Nos pacientes portadores de DM, principalmente sem tratamento adequado, o organismo humano pode apresentar também anormalidades no metabolismo das gorduras, que provocam condições como a acidose (GUYTON; HALL, 2017), é uma das complicações mais graves e agudas do Diabetes (GALLO DE MORAES; SURANI, 2019).

Ocorre principalmente em pacientes com Diabetes tipo 1, mas não é incomum em alguns pacientes com Diabetes tipo 2 (BRANDSTAETTER, 2019). Geralmente ocorre no cenário de hiperglicemia com deficiência relativa ou absoluta de insulina, resultando na produção corporal de cetonas e subsequente aumento da acidose metabólica (BRANDSTAETTER, 2019; GHIMIRE; DHAMOON, 2019).

Durante os estados catabólicos, os ácidos graxos gerados após a lipólise nos tecidos adiposos entram nos hepatócitos pela corrente sanguínea e sofrem beta-oxidação para formar os vários corpos cetônicos. Essa cascata bioquímica é estimulada pela combinação de baixos níveis de insulina e altos níveis de glucagon (GHIMIRE; DHAMOON, 2019).

### **3.1.2 Classificação**

A Organização Mundial da Saúde reconhece várias formas do Diabetes: DM tipo 1, DM tipo 2, formas híbridas de DM, tipos específicos de DM (Diabetes monogênico, doenças do pâncreas exócrino, distúrbios endócrinos, induzido por drogas ou produtos químicos, Diabetes relacionado à infecção, formas incomuns específicas de Diabetes imunomediado e outras síndromes genéticas, às vezes associadas ao Diabetes), DM não classificado e DM gestacional (WHO, 2019).

Já a American Diabetes Association (ADA) apresenta uma classificação com alguns termos diferentes da WHO (2019), porém, no geral, as classificações são parecidas. Classificação da ADA (2020): DM tipo 1, DM tipo 2, DM gestacional, tipos específicos de DM devido a outras causas, por exemplo, síndromes monogênicas do Diabetes (como Diabetes neonatal e Diabetes de maturidade dos jovens), doenças do pâncreas exócrino (como fibrose cística e pancreatite) e induzidas por medicamentos ou produtos químicos Diabetes (como com uso de glicocorticoide, no tratamento do HIV / AIDS ou após transplante de órgãos).

### **3.1.3 Dados epidemiológicos no Mundo e no Brasil**

O número de pessoas em que se constata o desenvolvimento do Diabetes na população mundial chega a 468 milhões, apresentando idade entre 20 e 79 anos, a perspectiva é que no ano de 2045 sejam 700 milhões de indivíduos com DM. O Brasil é o quinto país do mundo e o primeiro da América Latina que diagnosticou 16,8 milhões de habitantes com DM (IDF, 2019).

DM2 é uma das doenças metabólicas mais prevalentes no mundo (ASSEFA, et al., 2020), responsável por 90% a 95% dos casos de DM mundial (WHO, 2019). Está associado a rápidas mudanças culturais, econômicas e sociais, tais como envelhecimento da população,

crescente urbanização não planejada, mudanças na dieta (aumento do consumo de alimentos altamente processados e bebidas açucaradas) obesidade, atividade física reduzida, estilo de vida sedentário, desnutrição fetal e aumento da exposição fetal à hiperglicemia durante a gravidez (WHO, 2019).

O DM tipo 2 apresenta um estágio inicial de resistência à insulina. Para compensar a hiperglicemia, as células  $\beta$ -pancreáticas respondem aumentando a produção de insulina e estabelecendo um estado pré-diabético. Quando as células  $\beta$ -pancreáticas esgotadas não podem mais produzir insulina, o Diabetes evolui (INFANTE-GARCIA ; GARCIA-ALLOZA, 2019).

A resistência à insulina na DM2 associada à obesidade leva ao desenvolvimento de hiperlipidemia, seguida de aterosclerose, doença cardíaca coronariana e a síndrome metabólica (RODWEL et. al., 2017).

### **3.1.4 Tratamento para DM2**

É necessária seriedade na prevenção efetiva de DM2 pelos portadores do mesmo, significa ter atenção à saúde de modo eficiente. Isso envolve prevenção do seu início (prevenção primária), prevenção de suas complicações agudas e crônicas (prevenção secundária) ou reabilitação e limitação das incapacidades produzidas pelas suas complicações (prevenção terciária) (SBD, 2019).

Intervenções no estilo de vida, adotando uma alimentação saudável, controle da obesidade e a prática regular de atividade física, reduzem a incidência do Diabetes Mellitus tipo 2 e nos indivíduos portadores do DM2 previne o surgimento (ou retarda a progressão) de suas complicações crônicas (SBD, 2019).

A DM2 é caracterizada por resistência à insulina, produção deficiente de insulina e falha nas células beta pancreáticas. Ocorre, com isso, uma diminuição no transporte de glicose para o músculo, tecido adiposo e células hepáticas, acarretando altos níveis de glicose no sangue (ASSEFA, et al., 2020). A hiperglicemia pós-prandial é um problema no tratamento do DM2, para isso, muitos medicamentos diferentes foram desenvolvidos para tentar controlar este distúrbio, no nível digestivo, com a função de inibir a quebra de carboidratos, reduzindo assim a absorção de glicose pelas células.

Uma das abordagens terapêuticas para tratar DM2 é retardar a absorção de glicose através da inibição de enzimas responsáveis por catalisar a liberação de glicose nos órgãos digestivos. Somente os monossacarídeos podem entrar no sistema de circulação sanguínea e ser utilizados pelo corpo humano (TENG E CHEN, 2017).

Existem dois tipos de inibidores enzimáticos, reversíveis e irreversíveis. Os inibidores reversíveis são aqueles que inibem a catálise temporariamente, são divididos em três grupos: 1) Inibidor Competitivo compete com o substrato pelo sítio ativo, tem estrutura similar ao substrato, aumentando a concentração de substrato, a competição é deslocada a favor do substrato,  $K_m$  aumenta e  $V_{máx}$  não altera; (2) Inibidor Incompetitivo liga-se em um sítio distinto do sítio ativo do substrato, ao contrário do inibidor competitivo, que se liga apenas ao complexo ES. Na presença de um inibidor incompetitivo, a  $V_{máx}$  é reduzida e o  $K_m$  aparente também diminui. O Inibidor se liga somente à enzima, já ligada ao substrato (ES), não compete pelo sítio ativo, portanto, não possui estrutura similar ao substrato, diminui  $V_{máx}$  e diminui o  $K_m$ ; (3) Inibidor Misto é um tipo de inibidor não competitivo, podendo se ligar à enzima sozinha ou à enzima já ligada ao substrato, não compete pelo sítio ativo, portanto, não possui estrutura similar ao substrato, diminui a  $V_{máx}$  e não altera o  $K_m$  (STRYER et al., 2014; LEHNINGER et al., 2014).

Os inibidores irreversíveis são aqueles que inibem a catálise definitivamente, podem ser divididos em três categorias: reagentes específicos de grupos, análogos de substratos reativos (também denominados marcadores de afinidade) e inibidores suicidas. (1) Os reagentes específicos de grupos reagem com cadeias laterais específicas de aminoácidos. (2) Os marcadores de afinidade ou análogos de substratos reativos são moléculas estruturalmente semelhantes ao substrato da enzima, que são ligados de modo covalente, aos resíduos do sítio ativo. Por conseguinte, são mais específicos para o sítio ativo da enzima do que os reagentes específicos de grupos. (3) Os inibidores suicidas ou inibidores baseados no mecanismo são substratos modificados, que fornecem o meio mais específico de modificar o sítio ativo de uma enzima. O inibidor une-se à enzima como um substrato e é inicialmente processado pelo mecanismo catalítico normal. Em seguida, o mecanismo de catálise gera um intermediário quimicamente reativo, que inativa a enzima por modificação covalente (STRYER et al., 2014).

A  $\alpha$ -glicosidase é uma enzima ligada à membrana do epitélio do intestino delgado, que trabalha para facilitar a absorção de glicose pelo intestino delgado, catalisando a clivagem hidrolítica de oligossacarídeos em monossacarídeos (KIM KY, KURIHARA e KIM SM, 2008; ASSEFA, et al., 2020), absorvíveis na etapa final do processo digestivo (TENG E CHEN, 2017).

Os inibidores da  $\alpha$ -glicosidase podem retardar a captação de carboidratos da dieta e suprimir ou diminuir a hiperglicemia pós-prandial (TENG E CHEN, 2017) ao inibir competitivamente a atividade enzimática, evitando a quebra rápida dos açúcares e, assim, controlam o nível de açúcar e consequentemente a liberação de insulina no sangue pós-prandial.

Atualmente existem cinco classes principais de drogas hipoglicêmicas, quimicamente diversas, incluindo insulina e seus análogos, agentes insulíntrópicos, agente sensibilizante à insulina, inibidores da  $\alpha$ -glucosidase e DPP- inibidores IV, com diferentes mecanismos de ação (TENG E CHEN, 2017).

Os inibidores de  $\alpha$ -glucosidase são descritos como os mais eficazes na redução da hiperglicemia pós-prandial, considerando todos os medicamentos antidiabéticos disponíveis, usados no tratamento do DM2 (PROENÇA et al., 2017), podendo suprimir a digestão de carboidratos, atrasar a captação de glicose e, conseqüentemente, reduzir os níveis de açúcar no sangue. (ALQAHTANI et al., 2020).

Atualmente os inibidores de  $\alpha$ -glicosidade mais utilizados em tratamentos são acarbose, miglitol, voglibose, tratam-se de pseudo-carboidratos que inibem competitivamente as enzimas  $\alpha$ -glucosidase. A acarbose é um pseudotetrassacarídeo com um nitrogênio ligado entre a primeira e a segunda unidades de glicose, obtido a partir de processos de fermentação de um microorganismo.

Como os inibidores da  $\alpha$ -glucosidase impedem a digestão de carboidratos complexos, eles devem ser ingeridos no início das refeições principais. Porém, a quantidade de carboidratos complexos na ceia determinará a eficácia dos inibidores da  $\alpha$ -glucosidase.

Os inibidores de  $\alpha$ -glucosidase também podem ser utilizados em combinação com sulfonilureia, insulina ou metformina, são contraindicados em pacientes com hipersensibilidade ao medicamento, em pessoas com cetoacidose diabética, doenças intestinais crônicas associadas aos distúrbios acentuados da digestão ou absorção. Como os inibidores da  $\alpha$ -glucosidase impedem a degradação de carboidratos complexos em glicose, alguns carboidratos permanecerão no intestino e serão entregues ao cólon. No cólon, as bactérias digerem os carboidratos complexos, causando efeitos colaterais gastrointestinais, como flatulência (78% dos pacientes) e diarreia (14% dos pacientes) (DEROSA; MAFFIOLI, 2012.).

Numerosos inibidores de  $\alpha$ -glucosidase foram rastreados a partir de plantas, algumas das quais são de importância clínica. Embora vários medicamentos direcionados à enzima hidrolisante de carboidratos estejam em uso clínico, é necessário um grande número de inibidores pois pacientes diabéticos podem desenvolver resistência aos tratamentos atuais. Muito esforço foi ampliado em busca de inibidores eficazes de  $\alpha$ -glucosidase a partir dos recursos naturais (TENG E CHEN, 2017; PROENÇA et al., 2017).

Portanto o desenvolvimento de inibidores a partir de produtos naturais oferece uma opção alternativa para o controle da hiperglicemia. Nos últimos anos vários estudos foram realizados para identificar inibidores de alfa-glucosidases, a partir de fontes naturais, como

plantas, e muitos candidatos demonstraram ser metabólitos secundários, incluindo alcaloides, flavonoides, fenóis e terpenoides (ASSEFA, et al., 2020).

## 3.2 ESTRESSE OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES

### 3.2.1 Estresse Oxidativo

Através das reações químicas as células vivas armazenam energia dentro de um composto químico conhecido como trifosfato de adenosina (ATP), que conserva a energia disponível por períodos muito curtos (SOLOMON et.al., 2011; BAYNES e DOMINICZAK, 2015). O ATP pode ser considerado a moeda energética da célula (SOLOMON et.al., 2011) que é gasta continuamente pelas células (SOLOMON et.al., 2011; BAYNES e DOMINICZAK, 2015).

A energia é transformada por transferência de elétrons (SOLOMON et.al., 2011; BAYNES e DOMINICZAK, 2015; RHOADES e BELL, 2017). A oxidação é o processo químico durante o qual uma substância perde elétrons, a redução é o processo complementar, em que uma substância ganha elétrons (SOLOMON et.al., 2011; BAYNES e DOMINICZAK, 2015). Como nas células vivas os elétrons liberados durante a reação de oxidação não podem existir livremente, cada reação de oxidação deve ser acompanhada de uma reação de redução, na qual os elétrons são aceitos por outro átomo. Frequentemente, oxidação e redução são conhecidas como reações redox porque ocorrem simultaneamente, na qual a glicose oxida e o oxigênio é reduzido (BAYNES e DOMINICZAK, 2015).

A respiração celular que ocorrem dentro das células é um processo químico que converte a energia das ligações químicas dos nutrientes em energia química armazenada na forma de ATP. Os nutrientes são catabolizados em dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e água. O CO<sub>2</sub> é produzido por remoção de átomos de hidrogênio da glicose e a água parece ser composto do oxigênio que aceita os átomos de hidrogênio (RHOADES e BELL, 2017).

A síntese de trifosfato de adenosina (ATP) envolve reações nas quais o oxigênio molecular é reduzido para formar água. Essa redução é alcançada por adição de quatro elétrons pelo sistema de transporte de elétrons mitocondriais. Cerca de 98% do oxigênio consumido é reduzido à água nas mitocôndrias. O transporte de elétrons mitocondriais permite que o oxigênio aceite menos de quatro elétrons formando um radical livre (RHOADES e BELL, 2017).



Um radical livre é qualquer átomo, molécula ou grupo de moléculas, com um elétron não emparelhado em sua órbita mais externa. Os radicais livres incluem superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ) e radical hidroxila ( $\bullet OH$ ). O elétron não emparelhado no radical livre é representado por um ponto. O radical  $\bullet OH$  é o mais reativo e o mais prejudicial para as células. O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), embora não seja um radical livre, também é reativo aos tecidos e tem o potencial de gerar o radical hidroxil ( $\bullet OH$ ). Essas três substâncias são coletivamente chamadas de espécies reativas de oxigênio (EROs) (RHOADES e BELL, 2017).

Sob condições normais, as EROs são neutralizadas pelas enzimas protetoras: superóxido dismutase, catalase e peroxidases, e nenhum dano ocorre. No entanto, quando os EROs aumentam consideravelmente, ocorre o estresse oxidativo (BAYNES e DOMINICZAK, 2015; RHOADES e BELL, 2017), que acontece num estado fisiológico, no qual a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) aumentam, seja por excesso de produção ou deficiência na remoção dos mesmos (UNUOFIN; LEBELO, 2020).

As moléculas altamente reativas fazem parte do metabolismo celular normal, são geradas principalmente na mitocôndria durante a formação de ATP, onde ocorrem transporte de elétrons e fosforilação oxidativa. Esses elétrons reagem com oxigênio ( $O_2$ ), formando ânions superóxido ( $\bullet O_2^-$ ), que por sua vez reage com moléculas como  $Fe^{2+}$  e gera outras espécies reativas (RS), como o radical hidroxila ( $\bullet OH$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e peróxidos orgânicos (UNUOFIN; LEBELO, 2020).

A principal característica do estresse oxidativo é o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e ação antioxidante. A formação de moléculas de oxigênio, altamente reativas é o resultado bastante frequente de uma múltipla variedade de reações bioquímicas essenciais e está associada ao aumento do estresse oxidativo (BAYNES e DOMINICZAK, 2015).

O estresse oxidativo pode ter origem externa, sendo provocado por hábitos de vida pouco saudáveis, como, por exemplo, a exposição ao tabaco, exposição aos raios ultravioletas, radiação ionizante, entre outros, ou, pode ser proveniente de fontes endógenas, tais como as mitocôndrias (SOLOMON et.al., 2011; BAYNES e DOMINICZAK, 2015; RHOADES e BELL, 2017).

### 3.3 ANTIOXIDANTES

As complicações metabólicas do DM2 incluem hiperglicemia, resistência à insulina e alterações na secreção da insulina (ASSEFA, et al., 2020). É uma das principais causas de tais alterações metabólicas é o aumento da produção de EROs. Esse aumento de EROs induz deterioração das células  $\beta$  pancreáticas incrementando a resistência à insulina. Conseqüentemente desenvolve no diabético, uma hiperglicemia crônica, resultado do desequilíbrio entre a produção de EROs e a capacidade dos sistemas de defesa antioxidantes em neutralizá-las, mantendo um estado de estresse oxidativo elevado (MAIESE, 2015; TANGVARASITTICHA, 2015 e NIMESH et al., 2019; UNUOFIN; LEBELO, 2020).

O estresse oxidativo está altamente correlacionado com danos cumulativos nos órgãos, causando uma grande variedade de doenças inflamatórias e metabólicas (FURUKAWA et al., 2004; KASSAB & PIWOWAR, 2012). Estudos clínicos têm demonstrado que a injúria que determina a morte celular no DM é resultado do aumento da liberação de EROs (MAIESE, 2015).

O corpo humano possui mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos que minimizam a geração de EROs. Antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutase, catalase, glutatona peroxidase, glutatona S-transferase e glutatona redutase) e antioxidantes não enzimáticos (glutatona reduzida, ácidos fenólicos, vitamina C e vitamina E) têm considerados agentes ideais contra o estresse oxidativo e suas complicações (WU et al., 2014).

Uma vez formadas, as EROs causam a depleção dos sistemas de defesa antioxidantes, tornando os tecidos mais suscetíveis ao dano oxidativo. Especificamente no DM, as maiores fontes de estresse oxidativo incluem os processos de auto-oxidação da glicose, superprodução de EROs pela mitocôndria, glicação não enzimática com a formação dos *Advanced Glycation End Products* (AGEs) e aumento da atividade da via dos poliois (KASSAB & PIWOWAR, 2012; ROCHETTE et al., 2014).

No tratamento do DM2 é necessário envolver substâncias com funções antioxidantes. Nas plantas são encontrados uma importante categoria de compostos fenólicos, considerados de alta capacidade antioxidante e capacidade de eliminação de radicais livres, com o mecanismo de inibição das enzimas responsáveis para produção de ERO (THYAGARAJU E MURALIDHARA, 2008). Assim, compostos que tenham atividades antidiabéticas e antioxidantes, sem causar efeitos adversos graves, seriam benéficos na terapia diabética (MATOUGH et al., 2012; ALQAHTANI et al., 2020).

### 3.4 PLANTA MEDICINAL

Apesar dos imensos avanços no desenvolvimento de medicamentos antidiabéticos ortodoxos, esses medicamentos costumam ser mal sucedidos no manejo e tratamento do DM2, devido aos inúmeros efeitos colaterais a eles associados (UNUOFIN; LEBELO, 2020). Incentivando um contínuo interesse em terapias alternativas, utilizando produtos naturais para o tratamento de DM2 (KAPOOR, 2017). Isto tem estimulado o desenvolvimento de pesquisas em diversas áreas de conhecimento, principalmente na área de biotecnologia.

Baseado nos recentes avanços e envolvimento de estresse oxidativo, na complicação do Diabetes Mellitus, esforços estão sendo feitos para encontrar terapias antidiabéticas e antioxidantes, adequadas para a eficácia de um relevante tratamento (UNUOFIN; LEBELO, 2020). A exploração de produtos naturais como fontes terapêuticas para o tratamento é promovida por apresentarem pouco ou nenhum efeito colateral (KAPOOR, 2017; UNUOFIN; LEBELO, 2020).

A maioria das espécies de plantas hipoglicêmicas, contém compostos bioativos, como: glicosídeos, alcalóides, terpenóides, flavonóides, carotenóides, peptidoglicanos, hipoglicanos, guanidina e aminoácidos, que frequentemente estão implicados como tendo um efeito antidiabético (UNUOFIN; LEBELO, 2020).

Na fisiologia vegetal o metabolismo das plantas está dividido em metabolismo primário e metabolismo secundário (PEREIRA E CARDOSO, 2012). Existem três grandes grupos de metabólitos secundários: compostos fenólicos, terpenos e alcalóides, utilizados na defesa contra estresses bióticos e abióticos (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Compostos fenólicos são biossintetizados nas plantas por meio de diferentes rotas, razão pela qual constituem um grupo bastante heterogêneo do ponto de vista metabólico. As duas rotas metabólicas básicas são: a rota do ácido malônico e a do ácido chiquímico, sendo esta última participante na biossíntese da maioria dos fenóis vegetais (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Em termos químicos os compostos fenólicos são substâncias que possuem pelo menos um anel aromático, no qual, ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (OH-). São categorizados em classes de acordo com o tipo e número de anéis fenólicos, e em subclasses de acordo com as substituições específicas na estrutura básica, associações com carboidratos e formas polimerizadas (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

Um dos produtos encontrados geralmente nas plantas medicinais são os flavonóides, compõem uma classe de substâncias de origem natural com extensa diversidade

estrutural (ZUANAZZI e MONTANHA, 2004). Até o ano de 2005 haviam sido identificadas mais de nove mil substâncias pertencentes a este grupo (MARTENS e MITHOFER, 2005). São substâncias derivadas da rota metabólica dos fenilpropanóides, que compõem um amplo grupo destes metabólitos, com diversas funções biológicas (MARTENS e MITHOFER, 2005; ZUANAZZI e MONTANHA, 2004). Desempenham importantes atividades farmacológicas, nas quais, se destacam, as atividades antioxidantes, antidiabéticas e hipocolesterolemiantes (HARBONE e WILLIAN, 2000).

Pesquisadores apresentaram uma lista de 411 produtos naturais isolados de plantas, que demonstraram atividade inibidora da  $\alpha$ - glicosidase. Esses inibidores de produtos naturais incorporam estruturas de terpenos, alcalóides, quininas, flavonóides, fenóis, fenilpropanóides e esteróides ricos em grupos funcionais de ácido orgânico, éster, álcool e alilo. A maioria dos compostos relatados contém flavonoides, terpenos e estruturas de anéis de fenilpropanóides (YIN ET AL., 2014). As classes de compostos isolados incluem: terpenos (61) de 14 gêneros, alcalóides (37) de 11 gêneros, quininas (49) de 4 gêneros, flavonoides (103) de 24 gêneros, fenóis (37) de 9 gêneros, fenilpropanóides (73) de 20 gêneros, esteroides (8) de 5 gêneros e outros tipos de compostos (43) (YIN ET AL., 2014).

Como os flavonóides são moduladores promissores da atividade da  $\alpha$  glicosidase, um painel de 44 flavonóides, organizado em cinco grupos, foi rastreado quanto à sua atividade inibidora da  $\alpha$ -glucosidase, com base em estudos de relação estrutura-atividade *in vitro*. Análises cinéticas inibitórias e cálculos de acoplamento molecular também foram aplicados para compostos selecionados (PROENÇA et al., 2017).

### 3.4.1 *Anadenanthera colubrina*

A planta estudada *A. colubrina* pertence à seção Mimosoideae da família Fabaceae. A classificação do gênero *Anadenanthera*, proposta por Altschul (1964), na revisão taxonômica considerou que era composta por duas espécies, (1) *Anadenanthera peregrina* (L.) Speg. e (2) *Anadenanthera colubrina* (vell) Brenan. Elas foram distinguidas por meio de poucos caracteres morfológicos consistentes e suas correlações com localizações geográficas particulares (WEBER et al., 2011).

A primeira descrição científica data de 1737, no Hortus Cliffortianus, na observação de um espécime no Jardim de Clifford na Holanda, pesquisadores como Stanford (1916) e Siri Von Reis Altschul (1964) compartilham da teoria que este exemplar teve crescimento a partir de sementes oriundas do Oeste da Índia ou Norte da América do Sul (WEBER et al., 2011).

No Brasil, o gênero *Anadenanthera* é geralmente chamado de "angico", (LORENZI, 2009) e revelou potencial de aproveitamento para fins medicinais e tem demonstrado que ela é ricas em catequinas, flavonoides, fenóis, saponinas, esteróides, taninos, triterpenos, e xantonas (SANTOS et al., 2013). É encontrada numa faixa compreendida desde o Maranhão até São Paulo, passando por Minas Gerais e Mato Grosso do Sul, sendo uma das espécies lenhosas típicas do bioma Caatinga (LORENZI, 1998).

A planta *A. colubrina* é amplamente distribuída no Cerrado brasileiro. O Cerrado é o segundo maior bioma da América do Sul, ocupando cerca de 22% do território nacional. Sua área contínua está concentrada nos estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Bahia, Maranhão, Piauí, Rondônia, Paraná, São Paulo e Distrito Federal (MMA, 2019). Considerado um hotspot da biodiversidade global, apresenta extrema abundância de espécies endêmicas. Do ponto de vista da diversidade biológica, é reconhecido como a savana mais rica do mundo, abrigando 11.627 espécies de plantas nativas já catalogadas (MMA, 2019).

*A. colubrina* é uma das espécies botânicas com propriedades medicinais mais citadas pela população residente em área endêmica desta espécie (AGRA et al., 2008).

A planta é utilizada empiricamente, sendo administrada oralmente, preparada por decocção, infusão, maceração ou como sumo, obtido após a maceração das folhas ou outras partes da planta com água (AGRA et al., 2008). São usadas principalmente no tratamento de doenças pediátricas, inflamações de garganta ou como expectorante (ALBUQUERQUE et al., 2008; CARTAXO et al., 2010). Para uso externo, a forma preferida é a aplicação em

cataplasma, indicada principalmente para dores reumáticas, inflamações dermatológicas e úlceras externas. Na preparação do cataplasma as folhas são aquecidas com manteiga ou azeite e aplicadas sobre a parte afetada do indivíduo (AGRA et al.,2008).

Algumas pesquisas científicas com *A. colubrina* também já foram realizadas, onde foi observado baixa toxicidade sistêmica in vivo (LIMA et. al, 2014; DE SOUZA et. al., 2017;; Silva et. al., 2020), comprovando que a mesma apresenta efeitos antifúngico, antinociceptivo periférico, anti-inflamatório, auxilia no controle de crescimento de células tumorais humanas e ainda atua como antibiótico (LIMA et al., 2013; Santos et al., 2013; CAMPOS et al., 2014; DAMASCENA et. al., 2014; LIMA et al., 2014; BARRETO et al., 2015; NUNES et al., 2015; DE SOUZA et. al., 2017; SILVA et al., 2019); há ainda efeitos antioxidantes (SILVA et al., 2011; DAMASCENA et. al., 2014) que são identificados na *A. Colubrina*, destaca-se as principais classes de compostos químicos descritos para as espécies que combatem o DM, que são: flavonóides, fitoesteróis e taninos (CORRÊA, 1984; LORENZI, 1998; MONTEIRO, 2005; WEBER et al., 2011; SANTOS et al., 2013).

Aspectos importantes motivam o desenvolvimento de pesquisas com esta planta: primeiro - o fato de que a *A. colubrina* mesmo apresentando diversos compostos fenólicos em sua constituição, estudos que avaliam seu potencial antidiabético ainda é incipiente, segundo - não existe nenhum relato científico para os constituintes químicos e funções biológicas desta espécie no Cerrado tocantinense.

*Identificação da A. colubrina*

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS - UFT  
CAMPUS DE PORTO NACIONAL  
HERBÁRIO HTO

**HTO:** 12.000

**Família:** FABACEAE

**Espécie:** *Anadenanthera colubrina* (Vellozo) Brenan

**Determinador/data:** Rodney Haulien Oliveira Viana 12/08/2018

**Nome Popular:** Angico Branco

**Habitat:** Cerrado.

**Localidade:** Brasil- Tocantins- Porto Nacional, Luzimangues.

**Coletor:** Costa, Odélio Joaquim

**Data:** 04.10. 2017

**Observações:** Arvore perenifólia a semicaducifólia,, aproximadamente 35 metros de altura. Casca cinza-escuro, flores brancas-amareladas, perfumadas.

## REFERÊNCIAS

AGRA, M.F.; SILVA, K.N.; BASÍLIO, I.J.L.D.; FRANÇA, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 8(3): 472- 508, 2008.

AIRES, M. M. *Fisiologia*. Guanabara Koogan 5. ed. Rio de Janeiro, 2018. ISBN 978-85-277-3401-1

ALBUQUERQUE, U.P.; MEDEIROS, P.M.; RAMOS, M.A.; JÚNIOR, W.S.F.; NASCIMENTO, A.L.B.; AVILEZ, W.M.T.; MELO, J.G. Are ethnopharmacological surveys useful for the discovery and development of drugs from medicinal plants? *Brazilian Journal of pharmacognosy*. 24: 110-115, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.04.003>

ALQAHTANI, A. S.; HIDAYATHULLA, S.; REHMAN, M. T. Alpha-Amylase and Alpha-Glucosidase Enzyme Inhibition and Antioxidant Potential of 3-Oxolupenal and Katonic Acid Isolated from *Nuxia oppositifolia*. *Biomolecules*, v. 10, n. 1, p. 61, 2020.

ALTSCHUL, S.V.R. A taxonomic study of the genus *Anadenanthera*. *Contrib. Gray Herb*, n.193, p. 3-65, 1964.

ALVES, N. M. Estudo farmacognóstico e da toxicidade experimental (aguda e subaguda) do Guatambu (*Aspidosperma subincanum* Mart). 66f. Dissertação. (Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília. 2007.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. *Diabetes Care*, v. 43, n. Suppl 1, p. S14, 2020.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). 5. Prevention or delay of type 2 diabetes. *Diabetes Care*, v. 40, n. Supplement 1, p. S44-S47, 2017.

ASSEFA, S. T.; YANG, E. Y.; CHAE, S. Y.; SONG, M.; LEE, J.; CHO, M. C.; JANG, S. Alpha Glucosidase Inhibitory Activities of Plants with Focus on Common Vegetables. *Plants*, v. 9, n. 1, p. 2, 2020.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K. S. Phenolic compounds in plants and Agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* 99:191–203, 2006.

BANU, S.; JABIR, N.R.; MANJUNATH, N.C.; KHAN, M.S.; ASHRAF, G.M.; KAMAL, M.A.; TABREZ, S. Reduction of post-prandial hyperglycemia by mulberry tea in type-2 diabetes patients. *Saudi Journal of Biological Sciences* 22, 32–36, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.04.005>

BARRETO, H. M.; COELHO, K. M.; FERREIRA, J. H.; SANTOS, B. H.; ABREU, A. P.; COUTINHO, H. D.; LOPES, J. A. Enhancement of the antibiotic activity of aminoglycosides by extracts from *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* against multi-drug resistant bacteria. *Natural product research*, v. 30, n. 11, p. 1289-1292, 2016.



BAYNES, J.W.; DOMINICZAK, M. H. *Bioquímica Médica*. 4ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

BHATIA, A.; SINGH, B.; ARORA, R.; ARORA, S. In vitro evaluation of the  $\alpha$ -glucosidase inhibitory potential of methanolic extracts of traditionally used antidiabetic plants. *BMC complementary and alternative medicine*. 19, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2482-z>

BRANDSTAETTER, E.; BARTAL, C.; SAGY F.; JOTKOWITZ A.; BARSKI, L. Recurrent diabetic ketoacidosis. *Archives of endocrinology and metabolism*, n. AHEAD, 2019.

BRUNTON, L. L.; HILAL-DANDAN, R.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman-13**. Artmed Editora, 2018.

CAMPOS, V. A.; PERINA, F. J.; ALVES, E.; SARTORELLI, J.; MOURA, A. M.; OLIVEIRA, D. *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan produces steroidal substances that are active against *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler and that may bind to oxysterol-binding proteins. *Pest management science*, v. 70, n. 12, p. 1815-1822, 2014.

CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M. S.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. *Journal of ethnopharmacology*, 131(2), 326-342, 2010.

CECÍLIO, A. B.; RESENDE, B. L.; COSTA, C.; COTTA, M. M.; GIACOMINI, F. L.; GOMES, C. L.; SILVA, A. L.; VAZ, O. P. C.; OLIVEIRA, Q. F. Espécies vegetais indicadas no tratamento do Diabetes. *Rev Eletr Farmácia*, v. 5, n. 3, p. 23-8, 2008

DAMASCENA, N. P.; SOUZA, M. T. S.; ALMEIDA, A. F.; CUNHA, R. S.; CURVELLO R. L. Atividades anti-nociceptivas antioxidantes e orofaciais do extrato aquoso de casca de haste de *Anadenanthera colubrina* (Velloso) Brenan (Fabaceae) . *Nat. Prod. Res*; 28 : 753-756, 2014.

DE SOUZA SALES, E. A. L.; MEDEIROS, A. C. D.; CASTRO, R. D.; ROSALEN, P. L.; SARAIVA, K. L. A.; GODOY, G. P.; BRITO COSTA, E. M. M. Antifungal activity, phytochemical characterization and thermal profile of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*, v. 17, n. 1, p. 1-14, 2017.

DEROSA, G.; MAFFIOLI, P.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors and their use in clinical practice. *Archives of medical science: AMS*, v. 8, n. 5, p. 899, 2012.

DORVILLÉ, M. E. C. M.; OLIVEIRA, S. K. Revisão técnica: Guilhian Leipnitz. – 30. ed. – Porto Alegre : AMGH, 2017.

FURUKAWA, S.; FUJITA, T.; SHIMABUKURO, M.; IWAKI, M., YAMADA, Y.; NAKAJIMA, Y.; SHIMOMURA, I. Síndrome metabólica. A obesidade aumenta o estresse oxidativo e pode desencadear a síndrome metabólica. *J Clin Invest*, 114(12), 1752-61, 2004.

GALLO DE MORAES, A.; SURANI, S. Efeitos da cetoacidose diabética no sistema respiratório. *World journal of Diabetes*, 10 (1), 16–22, (2019). <https://doi.org/10.4239/wjd.v10.i1.16>.

GHIMIRE, P.; DHAMOON, A. S. KETOACIDOSIS. In: StatPearls [Internet] .  
Publicação Stat Pearls, 2019.

GIORDANI, C.; SANTIN, R.; CLEFF, M. B. Levantamento de extratos vegetais com ação anti-Candida no período de 2005-2013. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Campinas, v. 17, n. 1, p.175-185, 2015.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Guyton & Hall - Tratado de fisiologia médica. 16. ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2017. 1176 p., il., 27 cm. ISBN 9788535262858.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoids in research since 1992. *Phytochemistry*, v.55, p. 481, 2000.

INFANTE-GARCIA, C.; GARCIA-ALLOZA, M. Review of the Effect of Natural Compounds and Extracts on Neurodegeneration in Animal Models of Diabetes Mellitus. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 2533.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF). Atlas. 9. ed. Bruxelas: International Diabetes Federation; 2019.

KAPOOR, B.; KAUR, G.; GUPTA, M.; GUPTA, R. Indian medicinal plants useful in treatment of gout: a review for current status and future prospective, *Asia Journal Pharmaceutical and Clinical Research*. 10: 407-416, 2017. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2017.v10i11.20170>

KASSAB, A.; PIWOWAR, A. Cell oxidant stress delivery and cell dysfunction onset in type2 Diabetes. *Biochimie*. 2012; 94: 1837-1848.

KIM, K. Y.; NAM, K. A.; KURIHARA, H.; KIM, S. M. Potent  $\alpha$ -glucosidase inhibitors purified from the red alga *Grateloupia elliptica*. *Phytochemistry*, 69(16), 2820-2825, 2008.

LEHNINGER, T. M.; NELSON, D. L.; COX, M.M - Princípios de Bioquímica de Lehninger. 6 ed., 2014. Ed Artmed.

LIMA, R. F.; ALVES, E. P.; ROSALEN, P. L.; RUIZ, A. L. T. G.; DUARTE, M. C.T.; GÓES, V. F. F.; MEDEIROS, A. C. D.; PEREIRA, J. V.; GODOY, G. P.; COSTA, E. M. M. B. Antimicrobial and antiproliferative potential of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2014, 2014.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 2. Ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 1998. 352p

LORENZI, H. Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil [Árvores brasileiras. Manual de identificação e cultivo de plantas de árvores nativas do Brasil]. Instituto Plantarum; São Paulo; 2009.

MAIESE, K. New Insights for Oxidative Stress and Diabetes Mellitus. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015: 875961, 2015. doi: 10.1155/2015/875961.

MARÍN-PEÑALVER, J. J. *et al.* Update on the treatment of type 2 Diabetes Mellitus. *World journal of Diabetes*, v. 7, n. 17, p. 354, 2016.

MARTENS, S.; MITHÖFER, A. Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry*, 66(20), 2399-2407, 2005.

MARTINS, N.; BARROS, L.; HENRIQUES, M.; SILVA, S.; FERREIRA, C.F.R.I. Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida* species. *Industrial Crops and Products* v. 74, p. 648–670, 2015.

MATOUGH, F.A.; BUDIN, S.B.; HAMID, Z.A.; ALWAHAIBI, N.; MOHAMED, J. O papel do estresse oxidativo e antioxidantes nas complicações diabéticas. *Qaboos Univ Med J* . 2012; 12 (1): 5-18. doi: 10.12816 / 0003082

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). Biomas. Disponível em: . Acesso em: 06 jun, 2019.

NIMESH, S., TOMAR, R.; DHIMAN, S. Medicinal Herbal Plants and Allopathic Drugs to Treat Diabetes Mellitus: A glance. *Advances in Pharmacology and Clinical Trials*, v.4 n.1, March 08, 2019. DOI: 10.23880/apct-16000151

NUNES, L. E.; VIANA, A. P. P.; ROCHA, W. R. V.; SENA CUNHA, V. D.; CATÃO, R. M. R.; BRITO COSTA, E. M. M. (2015). In vitro evaluation of antifungal activity and interactive effect of *Anadenanthera colubrina* (Benth). *African Journal of Microbiology Research*, 9(36), 2006-2012.

PENG, X.; ZHANG, G.; LIAO, Y.; GONG, D. Inhibitory kinetics and mechanism of kaempferol on  $\alpha$ -glucosidase. *Food Chem.* 2016, 190, 207–215, doi:10.1016/j.foodchem.2015.05.088

PROENÇA, C.; FREITAS, M.; RIBEIRO, D.; OLIVEIRA, E. F. T.; SOUSA, J. L. C.; TOMÉ, S. M.; RAMOS, M. J.; SILVA, M. A. S.; FERNANDES, P. A.; FERNANDES, E. Inibição da  $\alpha$ -glucosidase por flavonoides: an *in* Estudo da relação estrutural-atividade *in vitro* e *in silico* , *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32: 1, 1216-1228, 2017. DOI: 10.1080 / 14756366.2017.1368503

RAMU, R.; SHIRAHATTI, P. S.; ZAMEER, F.; RANGANATHA, L. V.; NAGENDRA, M.; PRASAD, M.N. Inhibitory effect of banana (*Musa* sp. var. Nanjangud rasa bale) flower extract and its constituents Umbelliferone and Lupeol on  $\alpha$ -glucosidase, aldose reductase and glycation at multiple stages. *South African Journal Botany*. 95, 54–63, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2014.08.001>

RHOADES, R. A.; BELL, D. R. *Medical Physiology: Principles for clinical medicine*. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins. Pp: 968. 2017.

ROCHETTE, L.; ZELLER, M.; COTTIN, Y.; VERGELY, C. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2014; 1840(9): 2709-2729. doi:10.1016/j.bbagen.2014.05.017.

RODWELL, V. W.; BENDER, D. A.; BOTHAM, K. M.; KENNELLY, P. J.; WEIL, P. A. *Bioquímica Ilustrada de Harper*. New York, New York: AMGH, 2017.

SANTOS, J. S.; MARINHO, R. R.; EKUNDI-VALENTIM, E.; RODRIGUES, L.; YAMAMOTO, M. H.; TEIXEIRA, S. A.; MUSCARA, M. N.; COSTA, S. K.; THOMAZZI, S. M. Beneficial effects of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan extract on the inflammatory and nociceptive responses in rodent models. *Journal of Ethnopharmacology*, 148, 218–222, 2013

SEVILLANO-COLLANTES, C.; CAÑIZO-GÓMEZ, F. J. Update on the treatment of type 2 Diabetes Mellitus. *World journal of Diabetes*, 7(17), 354, 2016.

SHELIYA, M.; BEGUM, R.; PILLAI, K.; AERI, V.; MIR, S.; ALI, A.; SHARMA, M. (2016). In vitro  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibition by aqueous, hydroalcoholic, and alcoholic extract of *Euphorbia hirta* L. *Drug Development and Therapeutics*. 7: 26-30. <https://doi.org/10.4103/2394-6555.180156>

SILVA, S.; GONÇALVES, E. L.; AGUIAR, H. T. V.; FREITAS, R. F. ESTUDO FITOQUÍMICO, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E TÓXICA DA CASCA DA *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. *Biodiversidade*, v. 19, n. 2, 2020.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2017-2018. São Paulo: Clannad; 2019.

SOLOMON, E. P.; BERG, L.; MARTIN, D. W. Study Guide for Biology, *9th Edition*.. Published: 2011. Print ISBN: 9780538731676

STRYER, L.; TYMOCZKO, J. L.; BERG, J. M. **Bioquímica**, revisão técnica Deborah Schechtman; tradução Antonio José Magalhães da Silva Moreira, Aydamari Faria Jr., Maria de Fátima Azevedo, Patricia Lydie Voeux. – 7. ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed. 2009.

TANGVARASITTICHAI, S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 Diabetes Mellitus. *World journal of Diabetes*, v. 6, n. 3, p. 456, 2015.

TENG, H.; CHEN, L. Inibidores de  $\alpha$ -glucosidase e  $\alpha$ -amilase do óleo de semente: uma revisão da substância lipossolúvel no tratamento da Diabetes, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57:16, 3438-3448, 2017. DOI: 10.1080 / 10408398.2015 .1129309

THYAGARAJU, B. M. Ferulic acid supplements abrogate oxidative impairments in liver and testis in the streptozotocin-diabetic rat. *Zoolog Sci*. 2008;25:854–60

UNUOFIN, J. O.; LEBELO, S. L. Antioxidant Effects and Mechanisms of Medicinal Plants and Their Bioactive Compounds for the Prevention and Treatment of Type 2 Diabetes: An Updated Review. *Oxidative medicine and cellular longevity* vol. 2020 1356893. 13 Feb. 2020, doi:10.1155/2020/1356893

VIGITEL (Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico), 2019. <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2020/Abril/16/Boletim-epidemiologico-SVS-16.pdf>

WANG, M.; JIANG, J.; TIAN, J.; CHEN, S.; YE X., HU Y.; CHEN, J. Inhibitory mechanism of novel allosteric inhibitor, Chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb. Et Zucc.) leaves

proanthocyanidins against  $\alpha$ -glucosidase. *Journal of Functional Foods*.56: 286–294, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.03.026>

WEBER, C. R.; SOARES, C. M. L.; LOPES, A. B. D.; SILVA, T. S.; NASCIMENTO, M. S.; EULÁLIA XIMENES, C. P. (2011). *Anadenanthera colubrina*: a study of the therapeutic potential. *Brazilian Journal of Pharmacy*, 92: 235–244.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Classification of Diabetes mellitus, pp. 13-14, 2019. ISBN 978-92-4-151570-2

WU, Y.; XU, Q.; SONG, W. Oxidative stress and Alzheimer's disease. *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants*. Springer, Berlin, Heidelberg 2147-2174, 2014.

YIN, Z.; ZHANG, W.; FENG, F.; ZHANG, Y.; KANG, W. (2014).  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. *Food Science and Human Wellness*, 3(3-4), 136-174.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 5. ed. rev. ampl. Florianópolis: Ed. da UFSC; Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 2004. p. 577-614

## Capitulo 2

---

academicJournals

---

OPEN ACCESS JOURNALS  
<http://www.academicjournals.org/JMPR>

**Journal of Medicinal Plants  
Research**

---

### Acceptance Certificate

*Date:* 08-Oct-2020

*Manuscript Number* JMPR/10.08.20/7025

*Manuscript Title:* *Inhibitory effects of the Anadenanthera colubrina (Vell.) Brenan stem bark extract on the  $\alpha$ -glucosidase activity and oxidative stress*

**Inhibitory effects of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan stem bark extract on  $\alpha$ -glucosidase activity and oxidative stress**

**Autores: Odelio Joaquim da Costa<sup>a</sup>, Robson dos Santos Barbosa<sup>a</sup>, Ilsamar Mendes Soares<sup>b</sup>, Eber Euripedes de Souza<sup>a</sup>, Luiz Fernando Albarello Gellen<sup>a</sup>, João Pedro Pereira Passos Lemos<sup>a</sup>, Raimundo Wagner S. Aguiar<sup>c</sup>, Adão Lincon Bezerra Montel<sup>a</sup>, Sérgio Donizeti Ascêncio<sup>d\*</sup>**

<sup>a</sup>Laboratório de Pesquisas em Produtos Naturais, Universidade Federal do Tocantins, City Palmas, State of Tocantins. Postcode 77020-210, Brazil. E-mail: <odelio@ifto.edu.br> (O. J. Costa); <robsondx@gmail.com> (R.S. Barbosa); <eber@ifto.edu.br> (E.E. Souza); <gellenbiomedico@hotmail.com> (L.F.A. Gellen); <joaopedro.passos@mail.uft.edu.br> (J.P.P. Lemos) <montel@uft.edu.br> (A. L. B. Montel).

<sup>b</sup>Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Tocantins, City Araguatins, State of Tocantins. Postcode 77.950-000, Brazil, Telephone 55 (63) 3474-4800. E-mail: <ilsamar.soares@ifto.edu.br> (I.M. Soares).

<sup>c</sup>Departamento de Biotecnologia, Universidade Federal de Tocantins, City Gurupi, State of Tocantins. Postcode 77413-070, Brazil. E-mail: <rwsa@uft.edu.br> (R.W.S. Aguiar).

<sup>d</sup>Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal - Bionorte, Laboratório de Pesquisas em Produtos Naturais, Universidade Federal do Tocantins, City Palmas, State of Tocantins. Postcode 77020-210, Brazil. Telephone 55 (63) 3232-8279. E-mail: <sergioda@mail.uft.edu.br> (S. D. Ascêncio).

\*Corresponding autor: sergioda@uft.edu.br

## ABSTRACT

In this study, we investigated the promising potential of *Anadenanthera colubrina* bark extract (BEAc) as a product to combat diabetes mellitus (DM). We evaluated the inhibitory effects of BEAc on  $\alpha$ -glucosidase and the oxidation of biomolecules, as well as its main phytoconstituents. In terms of free radical scavenging, BEAc exhibited a dose-effect relationship. BEAc was more efficient than rutin and butylated hydroxytoluene and similar to ascorbic acid at the same concentrations. Evaluation of the IC<sub>50</sub> confirmed the good activity of BEAc compared to positive controls and statistically determined to be equal to ascorbic acid. In in vitro  $\alpha$ -glucosidase inhibition studies, BEAc generated 31 times more potent inhibition than acarbose and was dose-dependent at the concentrations tested. Lineweaver-Burk and Michaelis-Menten plots obtained for kinetic analysis showed that BEAc competitively inhibited the  $\alpha$ -glucosidase catalyzed reaction. Chemical analysis of BEAc by HPLC revealed that the plant is rich in phenolic compounds and confirmed its capacity to inhibit  $\alpha$ -glucosidase. Fourteen compounds were identified by reference to authentic standards: gallic acid, catechin, syringic acid, chlorogenic acid, *p*-coumaric acid, naringin, vitexin, rutin, isorhamnetin, hesperidin, myricetin, morin, rosmarinic acid, and quercetin. Thus, this study provides the first evidence of the antidiabetic activity of *A. colubrina* bark and determines its possible modes of action on carbohydrate metabolism via inhibition of  $\alpha$ -glucosidase and the control of biomolecule oxidation. These data support the potential use of this plant for the development of promising multi-target therapy products combining postprandial hyperglycemia control and biomolecule oxidation control.

## KEYWORDS

Kinetic analysis; phenolic content; diabetes mellitus; oxidation of biomolecules



## INTRODUCTION

Diabetes Mellitus (DM) is a chronic disease resulting from the progressive disorder of the production or functioning of the pancreatic hormone insulin, triggering impaired regulation of carbohydrate and lipid metabolism and leading to increased blood glucose levels (Ramu et al., 2014). The main complications of this disease are chronic hyperglycemia, weight loss, polydipsia, polyuria, lethargy, and various macrovascular and microvascular complications (Kidane et al., 2018).

The influence of the  $\alpha$ -glucosidase enzyme on DM has been well documented. The enzyme converts long chain carbohydrates into simpler monosaccharide units, a process that allows for rapid absorption of carbohydrates resulting in high glucose levels in the blood; this is characterized as postprandial hyperglycemia, the earliest symptom of DM. Therefore, suppression of carbohydrate absorption by enzymatic inhibition is an important approach to prevent DM (Ramu et al., 2014). In fact, the use of inhibitors of these hydrolases is widely accepted as an efficient method to maintain normal blood glucose levels (Ramu et al., 2017); thus, several synthetic  $\alpha$ -glucosidase inhibitors, such as acarbose, voglibose, and miglitol, are administered to diabetic patients (Banu et al., 2015; Ramu et al., 2017). However, these inhibitors have some restrictions of use, as they may cause adverse reactions, such as liver disorders, flatulence and abdominal cramps (Liu et al., 2014; Ramu et al., 2017). To circumvent these problems, many studies with medicinal plants are underway (Kapoor, 2017), especially those plants that already have a long history of use, as this favors the development of safe products and is a low-cost option (Soares et al., 2017).

The *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan plant belongs to the Mimosoideae section of the Fabaceae family, and is a botanical species with medicinal properties. It is administered orally, prepared by decoction, infusion or in the form of juice obtained after the maceration of leaves or other parts of the plant (Agra et al., 2008). Its barks are used for the treatment of inflammation, and respiratory diseases, and the leaves are used to treat anemia, inflammation and some cancers (Agra et al., 2008; Albuquerque et al., 2008). However, regarding the pharmacological potential of the secondary metabolites of *A. colubrina*, no studies have been found that evaluate the action of its main chemical constituents against DM. This demonstrates the need for further research on stem barks that are used by populations. In addition, studies on the chemical constitution of this plant have revealed a composition that is promising for the fight against DM, being rich in catechins, flavonoids, phenols, saponins, steroids, tannins, triterpenes, and xanthenes (Santos et al., 2013; Melo et al., 2010).

Considering the use of the plant for medicinal purposes (Agra et al., 2008; Albuquerque et al., 2008; Santos et al., 2013) and the incidence of this plant in several Brazilian states (Lorenzi, 2009), this paper forms part of an initial strategy for the development of antidiabetic herbal products in the Amazon region from *A. colubrina*. Therefore, the objective of the present work was to evaluate the potential of the extract of *A. colubrina* bark as an inhibitor of  $\alpha$ -glucosidase and as an antioxidant as a prospect for the development of antidiabetic products.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant material

The *A. colubrina* bark was collected from the city of Porto Nacional State of Tocantins, Brazil (Geographic coordinates: -10.182406 "S, -48.459146" W) in October 2017. The plant was authenticated by the botanist of the herbarium of the Federal University of Tocantins in Porto Nacional, and a voucher specimen was deposited in the herbarium with the number HTO 1200.

The collection of the plant material was conducted under authorization National System for the Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge (SISGEN) (process number A7EB8D7).

### Preparation of extracts

To obtain the *A. colubrina* bark extracts (BEAc), the method of Soares et al. (2017) was used. Therefore the plant material (20 g of powder) was extracted 5 times for one hour each time with a mixture of methanol-acetonitrile (80/20) in an ultrasound bath (USC1600, ULTRASONIC CLEANER, UNIQUE, São Paulo, Brazil) with a frequency of 40 kHz (135 W) at room temperature. The extraction solutions obtained by ultrasound were combined, vacuum filtered, and concentrated in the rotary evaporator at -600 Hg, 70 RPM, and 50°C. BEAc extracts were lyophilized and stored under vacuum conditions in the desiccator until analysis.

### DPPH antiradical scavenging activity

The 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl acid (DPPH) assay followed the description of Peixoto-Sobrinho et al. (2011). Briefly, six dilutions (ranging from 10 to 250 µg/mL in methanol) of samples or positive control substances (rutin, butylated hydroxytoluene, and ascorbic acid, all from Sigma-Aldrich) were prepared. An aliquot (0.5 mL) of each dilution was mixed with DPPH (3 mL at 40 µg/mL in methanol). A blank was prepared, replacing the DPPH solution with methanol, to compare the color of the extractive solution with the reaction of the test. After 30 min the absorption was measured at 517 nm. The percentage removal of the DPPH radical was calculated from the absorption using the following equation:

$$AA (\%) = [(A_0 - (A_{sample} - A_{blank})) / A_0] \times 100$$

Where AA is the antioxidant activity,  $A_{\text{sample}}$  is the absorption of the sample,  $A_{\text{blank}}$  is the absorption of the blank and  $A_0$  is the absorption of DPPH at  $40\mu\text{g} / \text{mL}$  without sample. By linear regression, the  $\text{IC}_{50}$  value was also calculated, determining the sample concentration required to decrease the absorption at 517 nm by 50%. The  $\text{IC}_{50}$  was expressed in  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

### **Alpha-glucosidase inhibitory assay**

The  $\alpha$ -glucosidase inhibitory assay for BEAc was evaluated according to a previously described method by Ramu et al. (2014). In brief,  $0.20\ \mu\text{L}$  of BEAc with varying concentrations ( $10\text{-}200\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ) dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) was mixed with  $106\ \mu\text{L}$  of sodium phosphate buffer (pH 6.8) and  $54\ \mu\text{L}$  of  $\alpha$ -glucosidase solution ( $0.18\ \text{U}/\text{mL}$ ). This mixture was incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 10 min, then cooled at  $21^\circ\text{C}$  for 5 min and mixed with  $20\ \mu\text{L}$  of *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (pNPG)  $4\ \mu\text{M}$  solution in sodium phosphate buffer (pH 6.8). The reaction was maintained at  $37^\circ\text{C}$  for 20 min. The reaction was terminated by adding  $100\ \mu\text{L}$   $0.2\ \text{M}\ \text{Na}_2\text{CO}_3$ . Enzyme activity was determined by measuring the absorption of the liberated *p*-nitrophenol from pNPG at 405 nm using a microplate reader (Biochrom ASYS UVM 340, Holliston, USA). The absorption was compared with the blank, containing buffer instead of a test sample. To evaluate the decrease in absorption, a positive control was prepared with all reagents without the sample. Acarbose was used as a positive control. The results were expressed as percentage  $\alpha$ -glucosidase inhibition obtained using the formula given below:

$$\text{Inhibition (\%)} = [(A_{\text{control}} - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}})) / A_{\text{control}}] \times 100$$

The  $\text{IC}_{50}$  value was calculated by linear regression, determining the sample concentration required to decrease the absorption at 405 nm by 50%. The  $\text{IC}_{50}$  was expressed in  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

### **Kinetics of alpha-glucosidase inhibition**

The enzyme kinetics of the inhibition of  $\alpha$ -glucosidase activity by BEAc was studied using concentrations of substrate against  $\text{IC}_{25}$  and  $\text{IC}_{50}$  inhibitory concentrations of the BEAc. The type of inhibition,  $K_m$ , and  $V_{\text{max}}$  were determined by a double reciprocal Lineweaver-Burk plot of the substrate concentration and the velocity ( $1/V$  versus  $1/[\text{pNPG}]$ ) (Ramu et al., 2014).

## **PHYTOCHEMICAL ANALYSIS**

### **PRELIMINARY PHYTOCHEMICAL ANALYSIS**

Preliminary phytochemical analysis of the BEAc was carried out for detection of the presence of the major classes of phytochemicals, such as alkaloids, flavonoids, phenolic compounds, tannins, saponins and steroids, following standardized methods (Matos 2009).

### **High performance liquid chromatography analysis (HPLC)**

BEAc extracts were analyzed by HPLC using a Shimadzu® chromatograph (Shimadzu®, Kyoto, Japão) equipped with LC-10AT pump, DGU-14A degasser, UV-vis SPD-10A detector, CTO-10A column oven, Rheodyne manual injector (loop 20 µL) and a CLASS SLC-10A integrator. The column used was the Phenomenex Luna C18 5 µm (250 mm × 4.6 mm) column with direct-connect C18 Phenomenex Security Guard Cartridges (4 × 3.0 mm<sup>2</sup>) filled with similar material as the main column at 22°C. UV detection was carried out at 280 nm. The response of the detector was recorded and integrated using Class-VP software. The mobile phase consisted of 0.1% phosphoric acid in water (phase A) and 0.1% phosphoric acid in water/acetonitrile/ methanol (54:35:11 v/v) (phase B) under the following gradient profile: 0–5 min, 0% B; 5–10 min, 30% B, 10–20 min, 40% B, 20–60 min 40% B, 60–70 min 50% B, 70–90 min 60% B, 90–100 min 80% B, 100–110 min 100% B. 110–120 min 100% B. The flow rate was 1.0 mL/min. The compounds were identified by comparing the retention times of samples and authentic standards such as gallic acid, catechin, syringic acid, chlorogenic acid, *p*-coumaric acid, naringin, vitexin, rutin, isorhamnetin, hesperidin, myricetin, morin, rosmarinic acid and quercetin (Sigma®). Before the analysis, all the extracts (at 1 mg/mL) and authentic standards (0,18 mg/mL) were filtered through 0.20 µm membrane filters of polyvinylidenedifluoride.

### **Statistical analysis**

All experiments were carried out in triplicate and data were analyzed by Microsoft Excel 2013 using the non-linear regression analysis-aided determination of IC<sub>50</sub>. The analytical data were also subjected to an analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test using Prism software (GraphPad prism software version 8.0, USA).

## RESULTS

### Antioxidant activity

The scavenging capacity of BEAc on DPPH free radicals, shown in Fig 1, exhibited a dose-effect relationship, increasing with increasing extract concentration. BEAc was more efficient than rutin and BHT and was similar to ascorbic acid at the same concentrations. As shown in Table 1, the IC<sub>50</sub> assessment confirmed the good activity of BEAc comparing with the positive controls, being statistically equal to ascorbic acid.

### Alpha-glucosidase inhibitory assay

The *in vitro*  $\alpha$ -glucosidase inhibitory assay showed that BEAc exhibited a potent inhibition of glucosidase, with IC<sub>50</sub> values (19.04  $\mu$ g/mL) 31 times more potent than acarbose (positive control, IC<sub>50</sub> = 600 mg/mL). The maximum inhibition found for the BEAc to be 94.2% at a concentration of the 210  $\mu$ g/mL against 88.7% for the acarbose in the concentration of 0.9 mg/mL (Fig 2).

### Kinetics of alpha-glucosidase inhibition

The Lineweaver-Burk and Michaelis-Menten plots obtained for the kinetic analysis are in Fig. 2 A-D. The results established that BEAc competitively inhibits the reaction catalyzed by  $\alpha$ -glucosidase. The enzyme kinetic curve fit calculations indicated that Km decreased with higher BEAc concentrations, but there was no effect on Vmax.

## PHYTOCHEMICAL ANALYSIS

### Preliminary phytochemical analysis

A preliminary phytochemical analysis of the bark of *A. colubrina* (BEAc) revealed the presence of phenolic compounds, flavonoids, flavonols, flavones, tannins, and Phytosterols.

### High performance liquid chromatography – HPLC analysis

Chemical analysis of BEAc revealed that it is rich in phenolic compounds. The chromatograms are shown in Fig. 4. The diverscompounds detected had retention times (rt) ranging from 15 to 80 minutes. We identified fourteen compounds by referring to the standards, namely gallic acid (rt = 15.5), catechin (rt = 22.0), syringic acid (rt = 24.1), clorogenic acid (rt = 25.2), p-coumaric acid (rt = 27.8), naringin (rt = 31.6), vitexin (rt = 37.1), rutin (rt = 42.7), isorhamnetin (rt = 56.5), hesperidin (rt = 61.6), myricetin (rt = 65.3), morin (rt = 66.9), rosmarinic acid (rt = 68.4), and quercetin (rt = 74.9).

## DISCUSSION

### Antioxidant activity

*A. colubrina* has been reported as a plant rich in antioxidant (Weber et al., 2011) compounds, mainly phenolic compounds (Melo et al., 2010). The radical scavenging activity of the extract evaluated against the stable free radical DPPH increased with increases in its concentration (Figure 1).

Antioxidant activity of plant extracts is primarily derived from secondary metabolites, which exhibit synergistic interactions giving the plant different biological roles (Selamoglu et al., 2018). Gobbo-Neto and Lopes (2007) highlight that secondary metabolites represent a chemical interface between plants and the environment, with syntheses that are frequently affected by environmental conditions. The results of this work clearly demonstrate this aspect. The collected sample was from a specimen from the Cerrado of Tocantins State. However, Melo et al. (2010) showed that, in contrast to our study, a different potential is observed regarding the capacity to sequester free radicals in specimens collected in the northeastern semi-arid region a different potential is observed regarding the capacity to sequester free radicals. It is worth noting that in their work, the authors demonstrated that the species *A. colubrina* is among the plants with the best antioxidant activity from the Brazilian northeastern semi-arid region and established a form of classification for the antioxidant activity, based on the performance of the crude extract of plants in sequestering free radicals *in vitro*: I - good activity ( $IC_{50}$  with values up to three times the efficient concentration of the positive control), II - moderate activity ( $IC_{50}$  ranging between three and seven times the inhibitory concentration of the positive control), III - low activity ( $IC_{50}$ , seven times the inhibitory concentration of the positive control). By this classification, *A. colubrina* had a moderate antioxidant activity when collected in the northeastern semiarid region, while in the present study, following the same criteria, the plant collected in the Cerrado of Tocantins presented good antioxidant activity.

Synthetic antioxidants have been used by the food industry to delay or prevent lipid oxidation (Anwar et al., 2018). However, consumer demand and food safety risks have suggested replacing them with alternative natural antioxidants (Berdahl et al., 2010). Natural antioxidants, including flavonoids and phenolic acids, are extracted primarily from plant sources. It is important to note that these antioxidants not only preserve food but also have the potential to protect the human body from various diseases induced by free radicals, such as cancer and diabetes (Sudhakaran et al., 2019; Sak, 2017; Nde et al., 2015). In this study, we



found that *A. colubrina* peels have a great potential for application to this purpose because the  $IC_{50}$  value obtained with the extract was more efficient than the synthetic standards tested, BHT and rutin, and statistically equal to ascorbic acid.

According to Choi et al. (2015) the evaluation of antioxidant activity is an integral part of the screening of potential antidiabetic resources. This aspect was clearly observed in the present work. The extract of *A. colubrina* had a remarkable inhibitory effect on  $\alpha$ -glucosidase and this was dose-dependent, being more efficient than acarbose, a known  $\alpha$ -glucosidase inhibitor currently used for the treatment of diabetic patients. The  $IC_{50}$  data indicated that the extract is 31 times more potent than this synthetic standard. When we compare the data obtained in this work with those of Doan et al. (2018), developed with the stem bark extract of *Chrysophyllum cainite* L., we find that the strong antioxidant activity exhibited by plant extracts is strongly related to the potent ability to inhibit the action of  $\alpha$ -glucosidase. In fact, both the work of Doan et al. (2018) and our current study, have demonstrated a good strong inhibition of  $\alpha$ -glucosidase which occurred parallel to a good antioxidant activity, regardless of the differences in the plants.

### **Antidiabetic activity**

Glucosidase has been recognized as a therapeutic target for the modulation of postprandial hyperglycemia (Banu et al., 2015), a primary risk factor in the development of type 2 diabetes mellitus (Liu et al., 2014). At the same time, the fight against oxidative stress is closely related to the control of both DM and various medical conditions, including aging, atherosclerosis, cancer, and neurodegenerative disorders (Chen et al., 2018; Sudhakaran et al., 2019). As the data obtained indicate that *A. colubrina* bark has an efficient action on both oxidative stress and carbohydrate metabolism, it is a promising product for multi-target therapy combining control of postprandial hyperglycemia and control of oxidation of biomolecules among other functions.

Several methods of glucose inhibition have been proposed for extracts of medicinal plants used in the treatment of diabetes mellitus (Ramu et al., 2014; Sheliya et al., 2016; Wang et al., 2019; Bhatia et al., 2019). However, none was previously postulated for *A. colubrina*. In this study, the Lineweaver-Burk plot plotted from the kinetic data, has generated new information about this new biological role of this plant. The plot indicated that the extract is a competitive inhibitor of  $\alpha$ -glucosidase competing directly with the substrate of the  $\alpha$ -glucosidase, thus inhibiting the reaction. This is a strong biochemical reason for *A. colubrina*

bark to be used in diabetes treatment in the future. Furthermore, *A. colubrina* bark have the potential to be used as an antidiabetic product both in the direct version and in components with synthetic products for deleterious effects.

Phytochemicals from *A. colubrina* extract have been the subject of several studies. The main classes of compounds already described for the species are flavonoids, phytosterols, and tannins (Weber et al., 2011; Santos et al., 2013). The preliminary results of the phytochemical analysis of BEAc in our study are consistent with the literature description for this plant.

Information on the chemical composition of BEAc obtained by HPLC analysis confirmed its capacity as an inhibitor of  $\alpha$ -glucosidase. The classes of compounds found in the bark of *A. colubrina* contained substances capable of acting synergistically in different biological roles. For the activities evaluated here, the extract of *A. colubrina* proved to be very efficient, indicating that it is a source of a wide range of substances that act simultaneously on the oxidation of biomolecules and the metabolism of carbohydrates, with a significant contribution from phenolic compounds.

In HPLC analysis, comparison of the retention time of the detected peaks with that of the authentic standards led to the identification of tannins, phenolic acids, catechins, and flavonoids. Scientific evidence on the performance of the compounds identified (gallic acid, catechin, syringic acid, chlorogenic acid, naringin, vitexin, rutin, isorhamnetin, hesperidin, myricetin, morin, rosmarinic acid and quercetin) in human metabolism are consistent with the results found on the biological activities evaluated in the present study. In addition, it has been shown that the use of secondary metabolic in the treatment of postprandial hyperglycemia has been shown to inhibit  $\alpha$ -glucosidase (Choo et al., 2012; Nurul Islam et al., 2013; Srinivasan et al., 2014; Zhu et al., 2014; Zeng et al., 2016; Arumugam et al., 2016; Ahangarpour et al., 2019).

In continuation of the effort to investigate the biological effects of the phytoconstituents of *A. colubrina* bark extract, we verified that the compounds identified in the HPLC analysis can act on several factors related to diabetes mellitus. Gallic acid and *p*-coumaric acid are believed to be effective against diabetes mellitus, both in early stages and in disease progression. Abdel-Moneim et al. (2017), have shown that these compounds can significantly improve glucose tolerance and reduce cerebral oxidative stress, being able to act against neurodegeneration in diabetics. Quercetin is able to protect the body against oxidative stress and glycemic control (Carrasco-Pozo et al., 2016). Rutin can inhibit  $\alpha$ -glucosidase and reduce glucose uptake in the small intestine, as well as inhibiting intracellular pathways responsible for diabetic complications (Ghorbani, 2017), while catechins, in addition to inhibiting  $\alpha$ -glucosidase in intestinal microvilli (Matsui, 2015), can also be transformed by

bacteria that colonize the human intestine into metabolites of remarkable antioxidant activity and high bioavailability (Santangelo et al., 2019). Hesperidin and mirycetin have an inhibitory effect on the development of neurodegenerative diseases (Hajialyani, 2019; Ben-Azu, 2019). It is important to note that other biological activities have already been demonstrated for this plant; the compounds identified may provide benefits other than those reported here, and not all peaks have been identified by the method applied. So, further research may expand the pharmacological spectrum of this plant.

## **CONCLUSIONS**

This study provides the first evidence of the activity of *A. colubrina* bark, showing a possible mode of action on carbohydrate metabolism via inhibition  $\alpha$ -glucosidase and the control of biomolecule oxidation. These data support the potential use of this plant for medical conditions related to diabetic complications and the development of promising products for multi-target therapy combining the control of postprandial hyperglycemia and the control of the oxidation of biomolecules.

## **CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare no conflict of interest.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors thank the Brazilian Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the financial support provided as part of this research project (Pró-Amazônia Program: Biodiversidade e Sustentabilidade - Process 23038.009443 / 2013-67, Project 3277/2013).

## REFERENCES

- Moneim, AA, Yousef AI, Abd El-Twab SMA, Reheim ESA, Ashour MB (2017). Gallic acid and p-coumaric acid attenuate type 2 diabetes-induced neurodegeneration in rats. *Metabolic Brain Disease*, 32: 1279–1286. <https://doi.org/10.1007/s11011-017-0039-8>
- Agra MF, Silva KN, Basílio IJLD, França PF, Barbosa-Filho JM (2008). Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 8(3): 472- 508.
- Ahangarpour A, Sayahi M, Sayahi M (2019). The antidiabetic and antioxidant properties of some phenolic phytochemicals: A review study. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 13: 854–857. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.11.051>
- Albuquerque UP, Medeiros PM, Ramos MA, Júnior WSF, Nascimento ALB, Avilez WMT, Melo JG (2014). Are ethnopharmacological surveys useful for the discovery and development of drugs from medicinal plants? *Brazilian Journal of pharmacognosy*. 24: 110-115. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.04.003>
- American Diabetes Association – ADA.(2019). Classification and Diagnosis of Diabetes, in: *Diabetes Care* (pp. S13–S28). <https://doi.org/10.2337/dc19-S002>
- Anwar H, Hussain G, Mustafa, I (2018). Antioxidants from Natural Sources, in: *Antioxidants in Foods and Its Applications*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.75961>
- Arumugam B, Palanisamy UD, Chua KH, Kuppusamy UR (2016). Potential antihyperglycaemic effect of myricetin derivatives from *Syzygium malaccense*. *Journal of Functional Foods*, 22: 325–336. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.01.038>
- Banu S, Jabir NR, Manjunath NC, Khan MS, Ashraf GM, Kamal MA, Tabrez S (2015). Reduction of post-prandial hyperglycemia by mulberry tea in type-2 diabetes patients. *Saudi Journal Biological Sciences*, 22: 32–36. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.04.005>
- Ben-Azu, B, Nwoke EE, Aderibigbe AO, Omogbiya IA, Ajayi AM, Olonode ET, Umukoro S, Iwalewa EO (2019). Possible neuroprotective mechanisms of action involved in the neurobehavioral property of naringin in mice. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 109: 536–546. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.055>
- Bhatia A, Singh B, Arora R, Arora S, (2019). In vitro evaluation of the  $\alpha$ -glucosidase inhibitory potential of methanolic extracts of traditionally used antidiabetic plants.

BMC Complementary and Alternative Medicine. 19:74. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2482-z>

Carrasco-Pozo C, Tan KN, Reyes-Farias M, De La Jara N, Ngo ST, Garcia-Diaz DF, Llanos P, Cires MJ, Borges K (2016). The deleterious effect of cholesterol and protection by quercetin on mitochondrial bioenergetics of pancreatic  $\beta$ -cells, glycemic control and inflammation: In vitro and in vivo studies. *Redox Biology*.9: 229–243. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.08.007>

Chen Z, Yan P, Zou L, Zhao M, Jiang J, Liu S, Zhao Q (2018). Using Ultrafast Responsive Phosphorescent Nanoprobe to Visualize Elevated Peroxynitrite In Vitro and In Vivo via Ratiometric and Time Resolved Photoluminescence Imaging. *Advanced Healthcare Materials*, 7(16), 1800309.

Choi CI, Lee SR, Kim KH (2015). Antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities of constituents from *Euonymus alatus* twigs. *Industrial Crops and Products*. 76: 1055–1060. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.08.031>

Doan HV, Riyajan S, Iyara R, Chudapongse N (2018). Antidiabetic activity, glucose uptake stimulation and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory effect of *Chrysophyllum cainito* L. stem bark extract. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 18: 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2328-0>

Ghorbani A (2017). Mechanisms of antidiabetic effects of flavonoid rutin. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 96: 305–312. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.001>

Gobbo-Neto L, Lopes NP (2007). Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. *Química Nova* 30, 374–381. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>

Hajialyani M, Farzaei MH, Echeverría J, Nabavi SM, Uriarte E, Sobarzo-sánchez E (2019). Hesperidin as a Neuroprotective Agent: A Review of Animal and Clinical Evidence. *Molecules*. 24:648. <https://doi.org/10.3390/molecules24030648>

Kapoor B, Kaur G, Gupta M, Gupta R (2017). Indian medicinal plants useful in treatment of gout: a review for current status and future prospective, *Asia Journal Pharmaceutical and Clinical Research*. 10: 407-416. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2017.v10i11.20170>

Kidane Y, Bokrezion T, Mebrahtu J, Mehari M, Gebreab YB, Fessehaye N, Achila O O (2018). In Vitro Inhibition of  $\alpha$ -Amylase and  $\alpha$ -Glucosidase by Extracts from *Psiadia punctulata* and *Meriandra bengalensis*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Article ID 2164345. 9 pages. <https://doi.org/10.1155/2018/2164345>

Liu X, Zhu L, Tan J, Zhou X, Xiao L, Yang X, Wang B (2014). Glucosidase inhibitory activity and antioxidant activity of flavonoid compound and triterpenoid compound from *Agrimonia pilosa* Ledeb. BMC Complementary and Alternative Medicine. 14:12. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-12>

Lorenzi H (2009). Brazilian trees: manual for the identification and cultivation of Brazilian tree plants, volume 3. 1. Ed. Nova Odessa / SP: Instituto Plantarum.

Matos FJA (2009). Introduction to experimental phytochemistry, 3<sup>a</sup> edition. UFC EDITIONS, Fortaleza/CE.

Matsui T (2015). Condensed catechins and their potential health-benefits. European Journal of Pharmacology. 765: 495–502. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.09.017>

Melo JG, Araújo TAS, Castro VTNA, Cabral DLV, Rodrigues MD, Nascimento SC, Amorim ELC, Albuquerque UP (2010). Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid northeastern Brazil. Molecules 15: 8534–8542. <https://doi.org/10.3390/molecules15128534>

Nde C, Zingue S, Winter E, Creczynski-Pasa T, Michel T, Fernandez X, Njamen D, Clyne C (2015). Flavonoids, Breast Cancer Chemopreventive and/or Chemotherapeutic Agents. Current Medicinal Chemistry. 22: 3434–3446. <https://doi.org/10.2174/0929867322666150729115321>

Peixoto-Sobrinho TJS, Castro VTNA, Saraiva AM, Diego M, Tavares EA, Amorim ELC (2011). Phenolic content and antioxidant capacity of four *Cnidocolus* species (Euphorbiaceae) used as ethnopharmacologicals in Caatinga, Brazil. African Journal of Pharmacy and Pharmacology. 5: 2310–2316. <https://doi.org/10.5897/AJPP11.608>

Ramu R, Shirahatti PS, Dhanabal SP, Zameer F, Dhananjaya BL, Nagendra Prasad MN (2017). Investigation of Antihyperglycaemic Activity of Banana (*Musa* sp. Var. Nanjangud rasa bale) Flower in Normal and Diabetic Rats. Pharmacognosy Magazine. 13(Suppl 3):S417–S423. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.216331>

Ramu R, Shirahatti PS, Zameer F, Ranganatha L V, Nagendra Prasad MN(2014a). Inhibitory effect of banana (*Musa* sp. var. Nanjangud rasa bale) flower extract and its constituents Umbelliferone and Lupeol on  $\alpha$ -glucosidase, aldose reductase and glycation at multiple stages. South African Journal Botany. 95, 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2014.08.001>

Ramu, R, Shirahatti PS, Zameer F, Nagendra Prasad MN (2014b). Investigation of antihyperglycaemic activity of banana (*Musa* sp. var. Nanjangud rasa bale) pseudostem in normal and diabetic rats. Journal of the Science Food and Agriculture. 95: 165-173. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6698>

Sak K (2017). Intake of Individual Flavonoids and Risk of Carcinogenesis: Overview of Epidemiological Evidence. Nutrition and Cancer.69: 1119–1150. <https://doi.org/10.1080/01635581.2017.1367934>

Santangelo R, Silvestrini A, Mancuso C (2019). Ginsenosides, catechins, quercetin and gut microbiota: Current evidence of challenging interactions. Food and Chemical Toxicology. 123: 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.10.042>

Santos JS, Marinho RR, Ekundi-Valentim E, Rodrigues L, Yamamoto MH, Teixeira SA, Muscara MN, Costa SK, Thomazzi SM (2013). Beneficial effects of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan extract on the inflammatory and nociceptive responses in rodent models. Journal of Ethnopharmacology. 148: 218–222. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.04.012>

Selamoglu Z, Amin K, Ugur S, Ozgen O (2018). Plant Secondary Metabolites with Antioxidant Properties and Human Health. In The Most Recent Studies in Science and Art. Gece Kitapligi, Ankara, TU 1, 75-96.

Sheliya M, Begum R, Pillai K, Aeri V, Mir S, Ali A, Sharma M (2016). In vitro  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibition by aqueous, hydroalcoholic, and alcoholic extract of *Euphorbia hirta* L. Drug Development and Therapeutics. 7: 26-30. <https://doi.org/10.4103/2394-6555.180156>

Soares IM, Ribeiro MF, Costa OJ, Souza EE, Aguiar AA, Barbosa RS, Alvim TC, Ascencio SD, Aguiar RWS (2017). Application of a degreasing process and sequential ultrasound-assisted extraction to obtain phenolic compounds and elucidate of the potential antioxidant of *Siparuna guianensis* Aublet. Available from: ht. Journal of Medicinal Plant Research, v. 11, p. 357-366.

Srinivasan S, Muthukumaran J, Muruganathan U, Venkatesan RS, Jalaludeen AM (2014). Antihyperglycemic effect of syringic acid on attenuating the key enzymes of carbohydrate metabolism in experimental diabetic rats. *Biomedicine and Preventive Nutrition*. 4: 595–602. <https://doi.org/10.1016/j.bionut.2014.07.010>

Sudhakaran M, Sardesai S, Doseff AI (2019). Flavonoids: New Frontier for Immuno-Regulation and Breast Cancer Control. *Antioxidants* 8: 103. <https://doi.org/10.3390/antiox8040103>

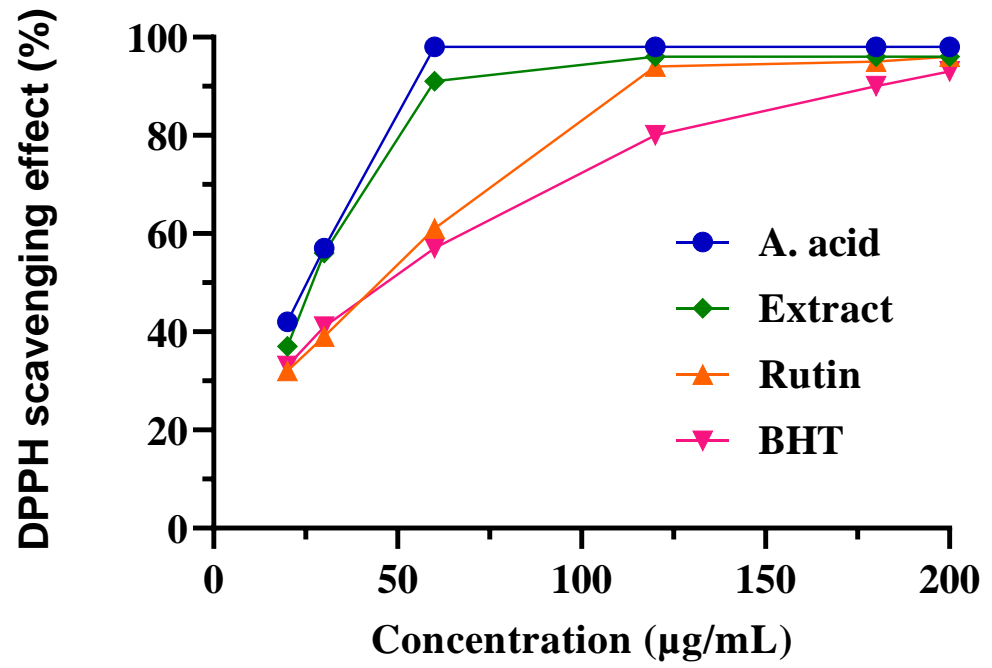
Wang M, Jiang J, Tian J, Chen S, Ye X, Hu Y, Chen J (2019). Inhibitory mechanism of novel allosteric inhibitor, Chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb. Et Zucc.) leaves proanthocyanidins against  $\alpha$ -glucosidase. *Journal of Functional Foods*.56: 286–294. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.03.026>

Weber CR, Soares CML, Lopes ABD, Silva TS, Nascimento MS, Eulália Ximenes CP (2011). *Anadenanthera colubrina*: a study of the therapeutic potential. *Brazilian Journal of Pharmacy*, 92: 235–244.

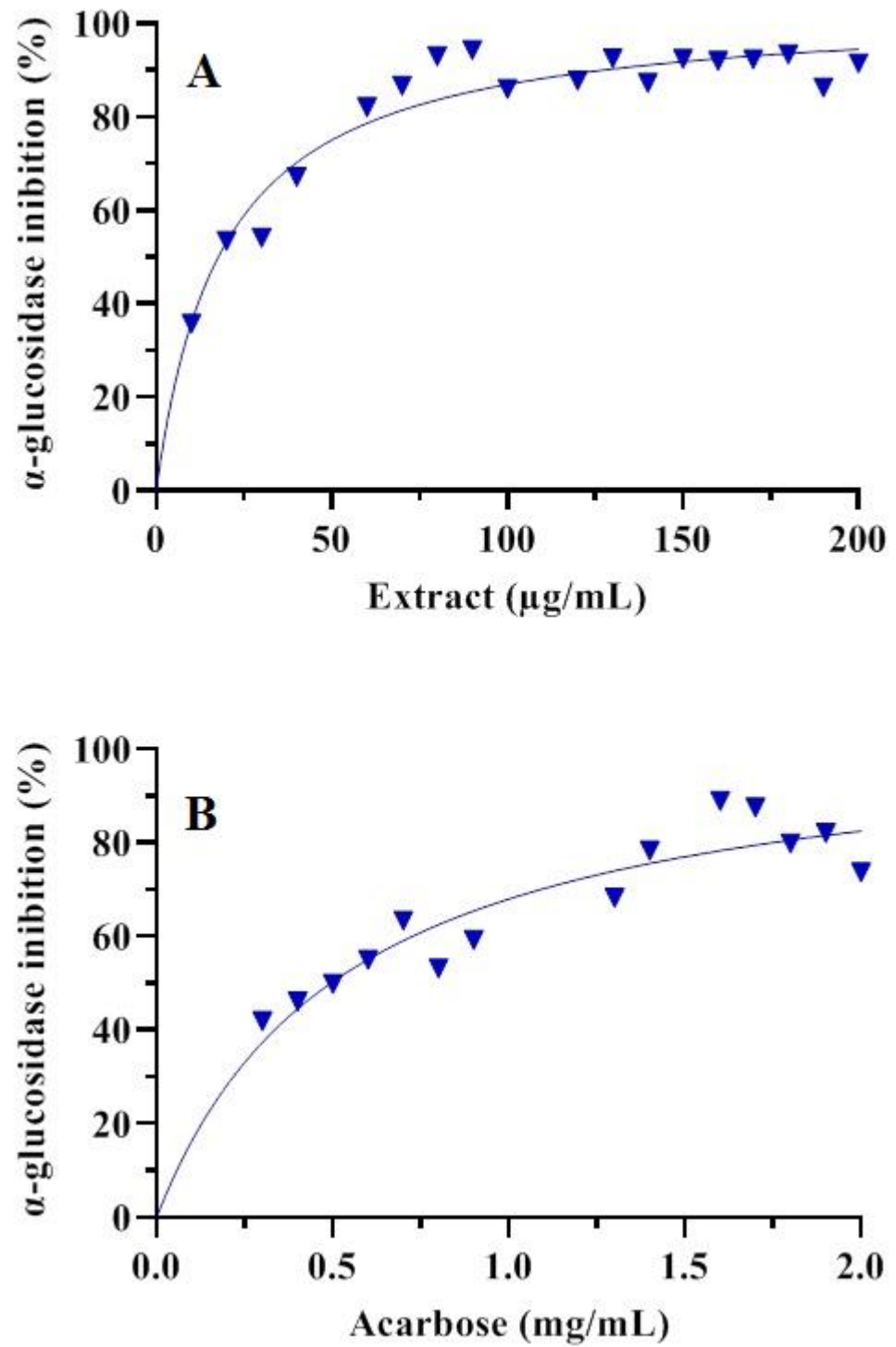
Zeng L, Zhang G, Liao Y, Gong D (2016). Inhibitory mechanism of morin on  $\alpha$ -glucosidase and its anti-glycation properties. *Food Function*. 7, 3953–3963. <https://doi.org/10.1039/c6fo00680a>

Zhu F, Asada T, Sato A, Koi Y, Nishiwaki H, Tamura H (2014). Rosmarinic acid extract for antioxidant, antiallergic, and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities, isolated by supramolecular technique and solvent extraction from Perilla leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62: 885–892. <https://doi.org/10.1021/jf404318j>

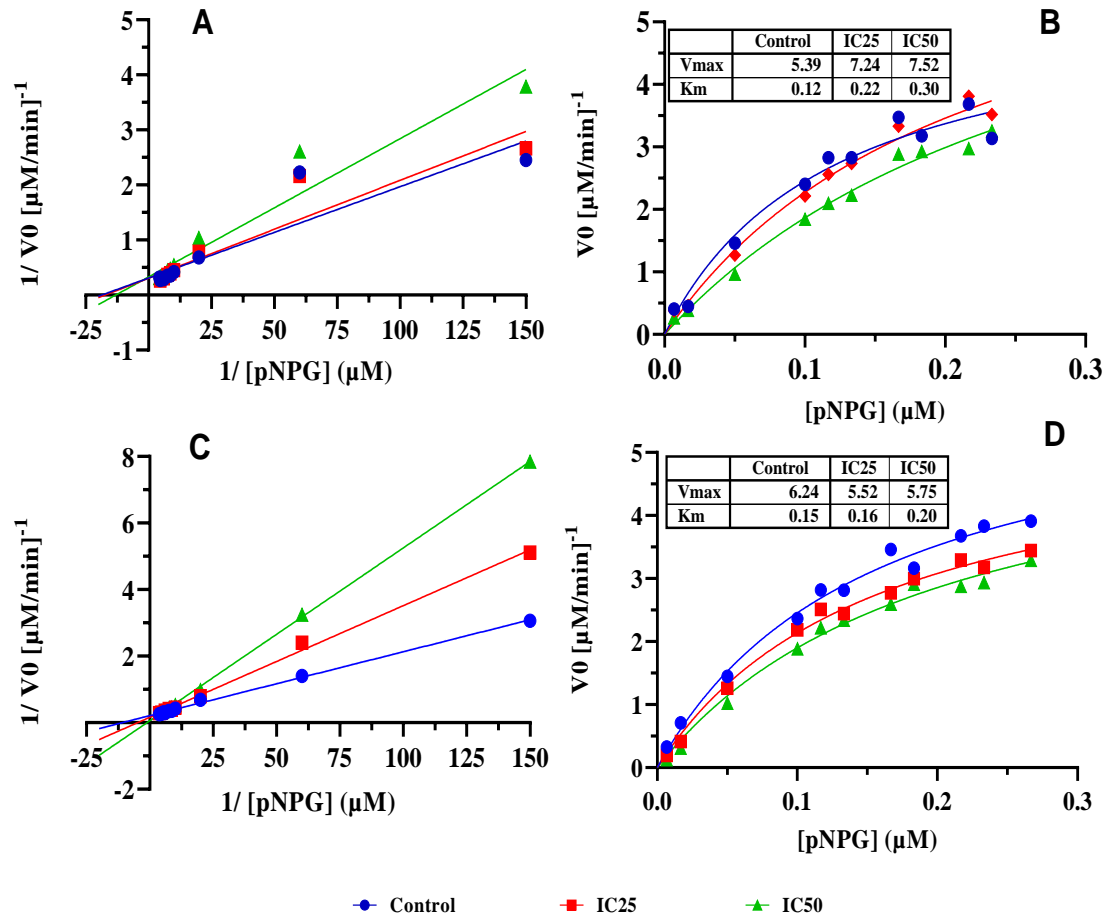




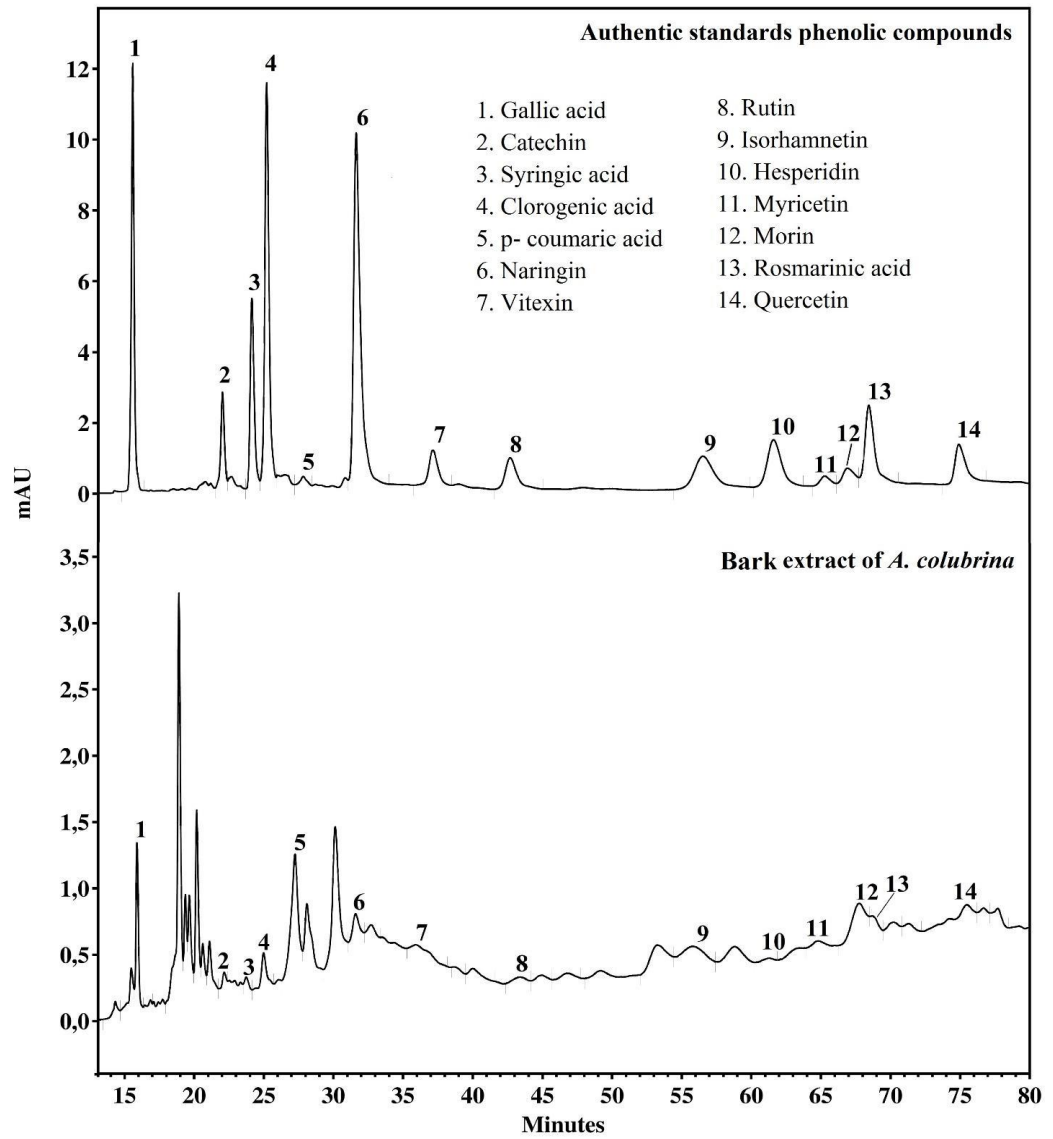
**Figure 1:** Percentage of inhibition of DPPH radical by *A. colubrina* bark extract and the positive controls ascorbic acid, rutin and butylated hydroxytoluene (BHT).



**Figure 2:** Inhibitory effect of *A. columbrina* (A) and Acarbose (B) bark extract (5 - 200  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) on  $\alpha$ -glucosidase activity. Inhibition was calculated using pNPG (2 mM) and expressed as  $\mu\text{g} / \text{mL}$ .



**Figure 3:** Modes of inhibition of [alpha]-glucosidase by acarbose (A and B) and shell extract of *A. colubrina* (C and D). (A and C) Lineweaver-Burk plots, (B and D) Michaelis-Menten plots.



**Figure 4:** High-performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint of the shell extract of *A. colubrina* detected at 280 nm.

**Table 1.** IC<sub>50</sub> of DPPH inhibition by *A. colubrina* bark extract and the positive controls ascorbic acid, rutin and butylated hydroxytoluene (BHT).

Samples	( $\mu\text{g/mL}$ )	IC <sub>50</sub>	DPPH
Extract		$27.97 \pm 0.60$	<sup>a</sup>
Rutin		$44.74 \pm 0.80$	<sup>b</sup>
A. Acid		$25.13 \pm 1.04$	<sup>a</sup>
BHT		$46.79 \pm 1.96$	<sup>c</sup>

Values are represented as mean  $\pm$  SD of triplicates. Values followed by the same letter show no significant differences. Comparing the data of ascorbic acid, BHT and rutin with the extract,  $P < 0.01$  is verified by Tukey test.