



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Avaliação da capacidade antioxidante e antiglicante de plantas medicinais e seu potencial de inibição das enzimas digestivas relacionadas ao diabetes *mellitus* tipo 2**

**Aluno:** Rodrigo Rodrigues Franco

**Orientador:** Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola

**Co-Orientadora:** Dra. Renata Roland Teixeira

UBERLÂNDIA – MG  
2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Avaliação da capacidade antioxidante e antiglicante de algumas plantas medicinais e seu potencial de inibição das enzimas digestivas relacionadas ao diabetes *mellitus* tipo 2**

**Aluno:** Rodrigo Rodrigues Franco

**Orientador:** Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola

**Co-Orientadora:** Dra. Renata Roland Teixeira

**Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Uberlândia  
como parte das exigências para a  
obtenção do título de Mestre em  
Genética e Bioquímica (Área  
Bioquímica)**

**UBERLÂNDIA – MG**

**2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

F825a Franco, Rodrigo Rodrigues, 1991  
2018 Avaliação da capacidade antioxidante e antiglicante de algumas plantas medicinais e seu potencial de inibição das enzimas digestivas relacionadas ao diabetes mellitus tipo 2 [recurso eletrônico] / Rodrigo Rodrigues Franco. - 2018.

Orientador: Foued Salmen Espíndola.

Coorientadora: Renata Roland Teixeira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.846>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Bioquímica. 2. Diabetes. 3. Stress oxidativo. 4. Hiperglicemia. I. Espíndola, Foued Salmen, (Orient.). II. Teixeira, Renata Roland, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

---

CDU: 577.1

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Avaliação da capacidade antioxidante e antiglicante de plantas medicinais e seu potencial de inibição das enzimas digestivas relacionadas ao diabetes *mellitus* tipo 2**

**Aluno:** Rodrigo Rodrigues Franco

### **COMISSÃO EXAMINADORA**

**Presidente:** Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola  
(Orientador)

**Examinadores:**

**Examinadores:** Profa. Dra. Rosy Iara Maciel de Azambuja Ribeiro  
Profa. Dra. Maique Weber Biavatti

**Data da Defesa:** 26/07/2018

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

---

(Foued Salmen Espíndola)

***Dedico,***

*À Deus, a causa primeira de todo meu ser;*

*À minha esposa Rafaella, o amor da minha vida;*

*Aos meus pais e familiares, fontes de grandes ensinamentos;*

*Os amarei eternamente!*

## **Agradeço,**

*À Deus, por toda compaixão que me doa, pela chance de existir e pela oportunidade de evoluir;*

*À minha esposa Rafaella, por todo amor e por todas as vezes que esteve do meu lado, me aconselhando e me fortalecendo;*

*Aos meus pais, Patrícia e João e aos meus familiares, que no decorrer da minha vida, me deram condições para que eu chegasse aonde cheguei;*

*Ao meu orientador Foued e minha co-orientadora Renata, por terem aberto as portas do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LABIBI) e por terem me direcionado ao caminho correto;*

*Aos amigos que fiz no LABIBI, Adriele Allisson, André, Danielle, Douglas, Érika, Heitor, Joyce, Júlia, Leonardo, Luiz e Victor, por terem me apoiado inúmeras vezes, pelos momentos felizes e por terem me proporcionado crescimento pessoal e profissional;*

*Ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia, por ter me dado uma educação de qualidade, com seriedade e compromisso no decorrer do mestrado;*

*À todos os Professores que conheci na UFU, por serem meus exemplos como um futuro profissional e por terem me recebido de braços abertos quando entrei na Pós-graduação, oferecendo sua amizade e apoio;*

*À todos os técnicos administrativos da Universidade Federal de Uberlândia que me ajudaram com todas as minhas dúvidas;*

*Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, por ter me proporcionado o orgulho de ser biólogo;*

*Agradeço, de maneira geral, a cada pessoa que contribuiu para a minha formação como indivíduo e como mestre em Genética e Bioquímica nesses dois anos em Uberlândia!*

*Um abraço!*

*“É exatamente disso que a vida é feita: de momentos! Momentos os quais temos que passar, sendo bons ou não, para o nosso próprio aprendizado, por algum motivo. Nunca esquecendo do mais importante: nada na vida é por acaso.”*

*Francisco Cândido Xavier  
(Chico Xavier)*

## Sumário

Lista de abreviaturas e siglas.....	x
Lista de figuras.....	xii
Lista de tabelas.....	xv
Resumo.....	xvi
Abstract.....	xvii
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Considerações gerais.....	1
1.2. Diabetes mellitus e suas complicações .....	3
1.3. Enzimas digestivas relacionadas com o diabetes mellitus tipo 2 .....	8
1.4. Relação estrutura e função dos compostos fenólicos .....	10
1.5. Plantas usadas no tratamento complementar do diabetes mellitus tipo 2.....	11
1.5.1. Graviola.....	11
1.5.2. Bardana.....	12
1.5.3. Pata-de-vaca .....	13
1.5.4. Camomila .....	14
1.5.5. Chá-verde.....	15
1.5.6. Chapéu-de-couro.....	16
1.5.7. Melão-de-São-Caetano .....	16
1.5.8. Alecrim .....	17
1.5.9. Jambolão.....	17
1.5.10. Gengibre.....	18
2. OBJETIVOS .....	19
2.1. Gerais.....	19
2.2. Específicos .....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	20
3.1. Obtenção do material vegetal.....	20
3.2. Preparação dos extratos .....	21
3.3. Fracionamento do extrato etanólico .....	21
3.4. Determinação da capacidade de inibição enzimática .....	22
3.4.1. Ensaio de inibição da enzima $\alpha$ -amilase .....	22
3.4.2. Ensaio de inibição da enzima $\alpha$ -glicosidase.....	23



3.4.3. Ensaio de inibição da enzima lipase.....	23
3.4. Prospecção fitoquímica .....	24
3.4.1. Determinação do conteúdo de fenóis totais .....	24
3.4.2. Determinação do conteúdo de taninos condensados.....	25
3.4.3. Determinação do conteúdo de flavonoides .....	25
3.5. Determinação da capacidade antioxidante.....	26
3.5.1. Sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) .....	26
3.5.2. Capacidade de sequestro do radical peroxil (ORAC).....	27
3.5.3. Capacidade de redução de ferro (FRAP) .....	28
3.6. Determinação da capacidade de inibição da glicação proteica .....	28
3.8. Ensaio de hemólise .....	29
3.9. Cromatografia líquida - análise de espectrometria de massa.....	30
3.10. Análise estatística.....	30
4. Resultados .....	31
4.1. Inibição enzimática .....	31
4.2. Prospecção fitoquímica .....	32
4.3. Capacidade antioxidante e antiglicante .....	33
4.4. Ensaio de Hemólise.....	35
4.5. Cromatografia líquida - análise de espectrometria de massa.....	36
5. Discussão.....	53
6. Conclusão .....	56
7. REFERÊNCIAS .....	56
Anexos .....	733
Artigo publicado.....	94

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DM	Diabetes mellitus
DMT1	Diabetes mellitus tipo 1
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
SUS	Sistema único de saúde
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
SOD	Superóxido dismutase
CAT	Catalase
GR	Glutationa redutase
GPx	Glutationa peroxidase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensageiro
UCPs	Proteínas de desacoplamento
AGEs	Espécies avançadas de glicação proteica
APO B	Apolipoproteína B
TG	Triacilglicerol
LP	Lipase pancreática
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
(O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> )	Íon superóxido
(OH <sup>•</sup> )	Hidroxila
(RO <sup>•</sup> )	Peroxila
(NO <sub>2</sub> <sup>•-</sup> )	Óxido nítrico
(ONOO <sup>-</sup> )	Peroxinitrito
(N <sub>2</sub> O)	Óxido nitroso
GLUT 4	Transportador de glicose 4
cm	Centímetro
g	grama
mmolL	Milimol
µg	Micrograma
mg	Miligrama

mM	Milimolar
mL	Mililitro
µL	Microlitro
L	Litro
°C	Graus Celcius
DMSO	Dimetilssulfóxido
IC <sub>50</sub>	Metade da concentração inibitória máxima
FEA	Fração de Saliva enriquecida com α-amilase
FEG	Fração intestinal enriquecida com α-glicosidase
Mg GAE/g	Miligramas de ácido gálico por grama de amostra
Mg CE/g	Miligramas de catequina por grama de amostra
Mg QE/g	Miligramas de quercetina por grama de amostra
PBS	Tampão fosfato de sódio
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
SRE	Solução enriquecida em eritrócitos
SDE	Solução diluída em eritrócitos
HPLC-ESI-MS/MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massa com ionização por eletrospray
Q-TOF	<i>Quadropole Time of Flight Mass Spectrometry</i>
kV	Kilo volt
eV	Elétron volt
(Å)	Ångström
m/z	Massa/carga do íon molecular
ETOH	Etanol
Hex	Hexano
DCM	Diclorometano
Acoet	Acetato de etila
ButOH	N-butanol
H <sub>2</sub> O	Água

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Análise da  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -glucosidase e atividade inibitória da lipase dos extratos hexânico (Hex) e etanol (ETOH) de plantas medicinais.....37
- Figura 2:** Metade dos valores da concentração inibitória máxima (IC50) dos extratos capazes de inibir mais de 70% das atividades da  $\alpha$ -amilase (A) e da lipase pancreática (B).....38
- Figura 3:** Avaliação da capacidade de inibição das enzimas  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -glicosidase e lipase pelas frações de *B. forficata*.....39
- Figura 4:** Avaliação da capacidade de inibição das enzimas  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -glicosidase e lipase pelas frações de *S. cumini*.....40
- Figura 5:** Métodos de quantificação do conteúdo total de polifenóis (A), taninos condensados (B) e flavonoides (C).....41
- Figura 6:** Métodos de quantificação do conteúdo total de polifenóis (A e D), taninos condensados (B e E) e flavonoides (C e F).....42
- Figura 7:** Análise da capacidade anti-glicação e capacidade antioxidante dos extratos hexânico (Hex) e etanol (ETOH) de plantas medicinais pelos métodos DPPH, ORAC, FRAP e BSA / frutose).....43
- Figura 8:** Metade da concentração inibitória máxima (IC50) dos extratos com capacidade antioxidante pelo ensaio de DPPH e capacidade antiglicante pelo ensaio de BSA/Frutose.....44
- Figura 9:** Avaliação da capacidade antioxidante pelos métodos ORAC e FRAP dos extratos que obtiveram os melhores resultados nos ensaios testados.....45
- Figura 10:** Avaliação da capacidade antioxidante pelo método DPPH dos extratos que obtiveram os melhores resultados nos ensaios testados. ....46
- Figura 11:** Avaliação da capacidade antiglicante pelo método BSA/Frutose dos extratos que obtiveram os melhores resultados nos ensaios testados.....47
- Figura 12:** Avaliação da capacidade hemolítica dos extratos que obtiveram os melhores resultados nos ensaios testados.....49

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Plantas medicinais usadas como tratamento complementar ao DMT2 em Uberlândia, Minas Gerais, Brasil .....20

**Tabela 2:** Atividade hemolítica dos extratos de Plantas medicinais usadas como tratamento complementar ao DMT2 em Uberlândia, Minas Gerais, Brasil..... 48

**Tabela 3:** Compostos identificados na partição de acetato de etila (Acoet) presentes no extrato etanólico bruto de *B. forficata* por HPLC-ESI-MS/MS (modo negativo).... 50

**Tabela 4:** Compostos identificados na partição de N-butanol (ButOH) presentes no extrato etanólico bruto de *B. forficata* por HPLC-ESI-MS/MS (modo negativo).....52

## Resumo

As plantas medicinais são capazes de fornecer compostos antioxidantes que podem atuar contra o estresse oxidativo e a glicação protéica, além de inibirem a catálise de enzimas digestivas e assim, possivelmente, contribuir para a redução de hiperglicemia e hiperlipidemia pós-prandial. O objetivo deste trabalho foi investigar as atividades antioxidantes e antiglicantes de algumas plantas medicinais e seu potencial inibitório contra as atividades da  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -glucosidase e lipase pancreática. Considerando pesquisas etnobotânicas realizadas na Universidade Federal de Uberlândia, foram selecionadas dez plantas tradicionalmente utilizadas como tratamento complementar ao diabetes *mellitus* tipo 2. Extratos de etanol (ETOH) e hexano (Hex) de partes específicas dessas plantas foram utilizados em ensaios enzimáticos para avaliar seus potenciais de inibição contra  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -glucosidase e lipase, bem como sua capacidade antioxidante (DPPH, ORAC e FRAP) e antiglicante (BSA / frutose). Os resultados indicam que o extrato ETOH de quatro das dez plantas analisadas apresentou mais de 70% de capacidade antioxidante e antiglicante, bem como alta inibição das enzimas  $\alpha$ -amilase e lipase; nenhum extrato foi capaz de inibir mais de 40% da atividade da  $\alpha$ -glucosidase. Os extratos ETOH de *Bauhinia forficata* e *Syzygium cumini* inibiram a  $\alpha$ -amilase, enquanto os extratos ETOH de *B. forficata*, *Matricaria recutita* e *Echinodorus grandiflorus* inibiram a lipase. Além disso, os extratos ETOH de *B. forficata*, *S. cumini*, *M. recutita* e *E. grandiflorus* apresentaram, respectivamente, maior capacidade antioxidante e atividade antiglicante. Os extratos de ETOH de quatro das dez espécies popularmente citadas para o tratamento complementar do diabetes *mellitus* tipo 2 mostraram propriedades antioxidantes e antiglicantes promissoras, bem como capacidade de inibir as enzimas digestivas  $\alpha$ -amilase e lipase. As partições de *B. forficata* e *S. cumini* apresentaram resultados proeminentes em todos os ensaios. Assim, nossos resultados abrem novas possibilidades para outros estudos, a fim de avaliar o potencial antidiabético dessas plantas medicinais.

**Palavras-chave:** Estresse oxidativo, hiperglicemia pós-prandial, lipase pancreática, produtos avançados de glicação, pata-de-vaca, jambolão.

## Abstract

Some medicinal plants are able to providing antioxidant compounds that act against oxidative stress and protein glycation and others that are capable of inhibiting the catalysis of digestive enzymes and thus possibly contributing to the reduction of postprandial hyperglycemia and hyperlipidemia. Our objective was to investigate the antioxidant and anti-glycation activities of some medicinal plants and their potential inhibitory against  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic lipase activities. Based on the ethnobotanical researches carried out by academic studies conducted at the Federal University of Uberlandia, ten plants traditionally used in the treatment of type-2 diabetes mellitus were selected. Ethanol (ETOH) and hexane (Hex) extracts of specific parts of these plants were used in enzymatic assays to evaluate their inhibitory potential against  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and lipase, as well as their antioxidant (DPPH, ORAC and FRAP) and anti-glycation (BSA/fructose model) capacities. The results indicate that ETOH extract of four of the ten analyzed plants exhibited more than 70% of antioxidant and anti-glycation capacities, and  $\alpha$ -amylase and lipase inhibitory activities; no extract was able to inhibit more than 40% the  $\alpha$ -glucosidase activity. The ETOH extracts of *Bauhinia forficata* and *Syzygium cumini* inhibited  $\alpha$ -amylase, while the ETOH extracts of *B. forficata*, *Matricaria recutita* and *Echinodorus grandiflorus* inhibited lipase. In addition, the ETOH extracts of *B. forficata*, *S. cumini*, *M. recutita* and *E. grandiflorus* presented higher antioxidant capacity, respectively. and anti-graft activity. ETOH extracts from four of the ten species popularly cited for treatment of type 2 diabetes mellitus showed promising antioxidant and anti-glycating properties as well as ability to inhibit  $\alpha$ -amylase and lipase digestive enzymes. The partitions of *B. forficata* and *S. cumini* showed prominent results in all trials. Thus, our results open new possibilities for others studies, to evaluate the antidiabetic potential of these medicinal plants.

**Keywords:** Oxidative stress; Postprandial hyperglycemia; Pancreatic lipase; Advanced glycation end products, cow's foot, jambolan.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Considerações gerais

O diabetes *mellitus* tipo 2 (DMT2) é uma doença metabólica que afeta cerca de 422 milhões de pessoas no mundo (WHO, 2016), sendo caracterizada por vários fatores, incluindo hiperglicemia e hiperlipidemia, bem como aumento do estresse oxidativo e da glicação proteica (GIACCO; BROWNLEE, 2010). Apesar do desenvolvimento de agentes farmacológicos para o tratamento do diabetes e de suas complicações, o uso de plantas medicinais é considerado um tratamento complementar para esta doença (OTA; ULRIH, 2017).

O conhecimento popular sobre os efeitos biológicos dos produtos naturais (etnofarmacologia) foi transmitido entre as gerações humanas através da cultura e hoje contribui com informações valiosas para a descoberta de compostos bioativos com efeitos terapêuticos (GULATI; HARDING; PALOMBO, 2012; HALBERSTEIN, 2005). No Brasil, o Ministério da Saúde estimula a aplicação de plantas medicinais no tratamento complementar do DMT2 e de outras doenças, por meio do Sistema Único de Saúde (SUS), com base em projetos promovidos pelo Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (ZENI et al., 2017).

Os compostos bioativos extraídos das plantas podem ser divididos em três classes principais: terpenos, alcalóides e fenóis. Milhares de compostos secundários foram identificadas até o momento, que por sua vez apresentam função biológica quando consumidos pelos seres humanos e por outros seres vivos, variando apenas em função e intensidade. (AMSTUTZ, 2008; DE LUCIA, 2008). Estudos indicam que metabólitos secundários, como os polifenóis (flavonóides e ácidos fenólicos) e terpenos presentes em plantas medicinais, são capazes de eliminar os radicais livres, reduzir a glicação não enzimática (KIM; KIM, 2003; WU; YEN, 2005; YAMAGUCHI et al., 2000) e de inibir as enzimas  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -glicosidase e lipase (BUCHHOLZ; MELZIG, 2015; MCDUGALL et al., 2005; TAN; CHANG; ZHANG, 2017). Dentre as plantas utilizadas no tratamento complementar do DMT2 e suas complicações, destacam-se as folhas de graviola (*Annona muricata*) (FLORENCE et al., 2014), bardana (*Arctium lappa*) (BAHMANI et al., 2014), pata-de-vaca (*Bauhinia forficata*) (BOLSON et al., 2015),



chá-verde (*Camellia sinensis*) (TANG et al., 2013), chapéu de couro (*Echinodorus grandiflorus*) (MARQUES et al., 2017), melão de São Caetano (*Momordica charantia*) (FUANGCHAN et al., 2011), alecrim (*Rosmarinus officinalis*) (BAKIREL et al., 2008) e jambolão (*Syzygium cumini*) (TROJAN-RODRIGUES et al., 2012), flores de camomila (*Matricaria recutita*) (SEMENYA; POTGIETER; ERASMUS, 2012) e rizoma de gengibre (*Zingiber officinale*) (DAILY et al., 2015).

Estudos anteriores mostraram que o extrato aquoso de folhas de graviola (FLORENCE et al., 2014) e o extrato etanólico das flores de camomila (CEMEK et al., 2008; JABRI et al., 2017) são capazes de estimular a renovação de células  $\beta$  pancreáticas, promovendo a absorção de glicose pelos tecidos periféricos e reduzindo a hiperlipidemia, além de atuarem contra o estresse oxidativo causado pelo DMT2. Estudos utilizando folhas de bardana indicaram que o seu extrato metanólico possui atividades antiinflamatórias e é capaz de controlar doenças autoimunes e a aterosclerose, enquanto que seu extrato aquoso pôde inibir a peroxidação lipídica em cérebro de ratos (KARDOŠOVÁ; MACHOVA, 2006). Além disso, o extrato butanólico das folhas de pata-de-vaca é capaz de reduzir a hiperglicemia, uma vez que possui constituintes com efeito mimético da insulina (JORGE et al., 2004; SILVA et al., 2002). Outro estudo indicou que o extrato aquoso de folhas de pata-de-vaca foi capaz de combater a peroxidação lipídica, estimular a atividade da glutatona redutase (Gr), diminuir a concentração de ácido úrico e aumentar o glicogênio hepático em ratas prenhes (DAMASCENO, D. et al., 2004).

Os extratos etanólicos das folhas de chá-verde e de alecrim, e também o extrato aquoso de folhas de chapéu de couro, demonstraram ser capazes de diminuir a hiperglicemia, o estresse oxidativo, a peroxidação lipídica e ativar enzimas antioxidantes (ALONSO-CASTRO et al., 2012; HAIDARI et al., 2013; LUNARDI et al., 2014). A literatura também mostrou que o melão de São Caetano controla a hiperglicemia pós-prandial e auxilia no combate da tolerância à glicose, e seu extrato metanólico apresenta propriedades de eliminação de radicais livres e atividade inibitória contra a produção de óxido nítrico (TSAI et al., 2014). Além disso, o extrato etanólico das folhas de jambolão foi capaz de diminuir a hiperglicemia e a hiperlipidemia, enquanto que seu extrato metanólico possui alta atividade antioxidante. (MOHAMED; ALI; EL-BAZ, 2013).

Além disso, BHANDARI e PILLAI (2005) mostraram que o extrato etanólico dos rizomas do gengibre preveniu a peroxidação lipídica, reduziu a hiperglicemia e a hiperlipidemia, além de apresentar propriedades anti-inflamatórias e anti-ateroscleróticas.

## **1.2. Diabetes mellitus e suas complicações**

O diabetes mellitus (DM) é uma desordem metabólica caracterizada pela ineficiência do hormônio insulina que acarreta em dificuldade de captação de glicose pelo tecido muscular estriado (KERNER; BRÜCKEL, 2014). Esse distúrbio pode ser promovido pela deficiência absoluta ou relativa da secreção da insulina ou até mesmo pela resistência muscular a sua ação (CZECH, 2017). A deficiência na absorção da glicose aliada ao alto consumo de carboidratos faz com que açúcares se acumulem no sangue do indivíduo diabético, gerando um quadro de hiperglicemia e complicações associadas, tais como disfunções e insuficiência dos órgãos (ESPER; MOSS; MARTIN, 2009; FRANCO et al., 2018).

A literatura traz tipos específicos de diabetes, quase sempre relacionados com a idade e com aspectos genéticos e nutricionais dos indivíduos (GROSS et al., 2002). O diabetes tipo 1 (DMT1) está entre os quadros mais frequentes de diabetes ocorrendo principalmente na infância e compreendendo cerca de 5 a 10% dos casos (BLAIR, 2016). O DMT1 é causado pela deficiência absoluta de insulina (BLAIR, 2016; LOJUDICE; SOGAYAR, 2008), devido à destruição das células  $\beta$  pancreáticas responsáveis por sua produção. A explicação mais aceita para a destruição dessas células está relacionada com a ação do sistema imune que as reconhece como antígenos, diminuindo gradualmente a sua função e proliferação (LOJUDICE; SOGAYAR, 2008).

Por outro lado, o diabetes tipo 2 (DMT2) é o mais preocupante, uma vez que compreende cerca de 90 a 95% do total de casos (JANGHORBANI et al., 2007). Diversos mecanismos vêm sendo propostos a fim de se explicar o desenvolvimento da resistência à insulina, tais como excesso de gordura ectópica característico em indivíduos obesos, estresse oxidativo e inflamação sistêmica (CASPARD et al., 2018). Os indivíduos pré-diabéticos, isto é, aqueles que estão no início do desenvolvimento do DMT2, não necessitam de um tratamento com

insulina para manterem a glicemia adequada, podendo manter seu nível glicêmico controlado por meio da perda de peso, prática de exercício físico regular e consumo de tratamentos hipoglicemiantes complementares à base de plantas medicinais (FRANCO et al., 2018).

A produção de insulina ocorre normalmente no início do DMT2, mas devido à resistência, o hormônio não é capaz de regular o metabolismo dos açúcares. Dessa maneira, o aumento da glicose sanguínea continuará a estimular as células  $\beta$  a secretarem insulina continuamente, fazendo com que se deteriorem no decorrer do avanço da doença. Com a destruição progressiva das células  $\beta$ , haverá diminuição da produção de insulina e o indivíduo passará a ter necessidade de obtê-la a partir de fontes exógenas e consumir medicamentos para aumentar a sua sensibilidade (CZECH, 2017).

A hiperglicemia promovida pela deficiência na captação da glicose estimula as vias catabólicas dos lipídeos de reserva, gerando um quadro de hiperlipidemia (excesso de ácidos graxos e lipoproteínas modificadas) no sangue (JUNG; CHOI, 2014). A hiperglicemia e a hiperlipidemia características do diabetes induzem respostas imunes e inflamatórias, glicação de proteínas e lipídeos (estresse carbonílico) e estresse oxidativo por meio da geração de radicais livres (Justino et al, 2018). Essas reações implicam em perdas funcionais de proteínas, membranas e prejudicam diversas vias metabólicas, juntas geram complicações cardiovasculares e mortalidade relacionadas ao DMT2 (ESPER et al., 2009; GIACCO; BROWNLEE, 2010; GROSS et al., 2002; JANGHORBANI et al., 2007). Além disso, cronicamente, o DMT2 está associado ao aumento dos riscos de desenvolvimento de complicações micro e macrovasculares, como também de neuropatias, podendo resultar em cegueira, insuficiência renal e amputações de membros (ALMEIDA et al., 2018).

O estresse oxidativo é um estado em que a célula apresenta altos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) devido às flutuações agudas na glicemia (GIACCO; BROWNLEE, 2010). Esses radicais livres são capazes, em última instância, de promover o estabelecimento do DMT2 pela diminuição da sensibilidade à insulina e pela destruição gradual das células  $\beta$  pancreáticas (CZECH, 2017). Os principais EROs presentes nas células são resíduos provenientes do metabolismo aeróbio, tais como o íon superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroxila

(OH<sup>•</sup>) e peroxila (RO<sup>•</sup>), bem como espécies consideradas não radicais, como o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (MOLDOGAZIEVA et al., 2018). Além dos EROs, também podem ser citados as espécies reativas de nitrogênio (ERNs), que incluem os radicais livres óxido nítrico (NO<sub>2</sub><sup>•</sup>) e peroxinitrito (ONOO<sup>•</sup>), bem como os não radicais, como o óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) (MOLDOGAZIEVA et al., 2018).

Os organismos vivos são equipados com sistemas enzimáticos altamente complexos que atuam protegendo a célula contra os efeitos dos EROs (MORAES et al., 2015). Dentre essas enzimas antioxidantes, tem-se a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona redutase (GR) e peroxidase (GPx) que podem catalisar diretamente a remoção de radicais livres das células (DINIZ VILELA et al., 2016). Esse sistema antioxidante endógeno é extremamente eficiente, mas se torna sobrecarregado no organismo diabético devido à alta quantidade de EROs (HAIDARI et al., 2013). Devido a isso, o consumo de moléculas antioxidantes tais como terpenos e polifenóis podem auxiliar o sistema antioxidante da célula a estabilizar e combater os radicais livres (SREERAMA; TAKAHASHI; YAMAKI, 2012).

Além dos açúcares, os ácidos graxos livres em excesso podem levar à formação de EROs ao se auto oxidarem, contribuindo para danos ao DNA e às membranas celulares (ASMAT; ABAD; ISMAIL, 2016). As EROs resultam na clivagem do DNA durante a hidroxilação da guanina e metilação da citosina. Além disso, as EROs podem inibir enzimas presentes nos complexos da cadeia de transporte de elétrons, resultando no bloqueio da respiração celular (BHAT, A. H. et al., 2015; TATSCH, 2016). O metabolismo aeróbio depende do oxigênio atmosférico comoceptor final de elétrons durante o processo de fosforilação oxidativa, dessa maneira os danos oxidativos não podem ser evitados por serem vitais (PISOSCHI; POP, 2015). Portanto, estudos aprofundados nessa área são, sem dúvida, úteis para identificar maneiras de prevenir doenças relacionadas ao estresse oxidativo tais como o DMT1 e DMT2 (BAKIREL et al., 2008; PISOSCHI; POP, 2015). Com relação às complicações do diabetes, os EROs são capazes de interferir em várias vias de sinalização e por isso podem afetar a sensibilidade à insulina. A literatura mostra que o estresse oxidativo pode ser responsável pelo desenvolvimento e agravamento do DMT2, uma vez que as células β são vulneráveis aos EROs, uma vez que apresenta baixa expressão de enzimas

antioxidantes quando comparadas com outras células (hepatócitos por exemplo) (WANG; WANG, 2017). Por outro lado, a resistência à insulina observada em idosos tem sido associada à elevação do acúmulo de gordura e redução na atividade de oxidação e fosforilação mitocondrial (DUBOWSKY et al., 2006). A redução da fosforilação oxidativa estimula as proteínas de desacoplamento (UCPs) que vão permitir que os H<sup>+</sup> acumulados no espaço intermembrana regressem à matriz sem atravessarem a ATP sintase (ROLO; PALMEIRA, 2006). A expressão excessiva de UCPs no músculo esquelético é um indicador diabético cuja finalidade tem sido correlacionada com o aumento do gasto de energia e da melhora na ação da insulina (DALGAARD; PEDERSEN, 2001).

A hiperglicemia também promove o desenvolvimento de produtos de glicação avançada (AGEs), que constituem uma grande variedade de moléculas formadas a partir de interações aminocarbonilo, de natureza não enzimática, entre glicose e seus isômeros (açúcares redutores), lipídeos oxidados e proteínas (VEIRIAH, 2005). A formação de uma molécula glicada inicia-se com a formação de uma base de Schiff instável, gerada pela condensação de um grupamento carbonila de um açúcar redutor, com um grupamento amina, de um aminoácido (WAUTIER et al., 1994). Na sequência, a base de Schiff sofre rearranjos, tornando essa estrutura mais estável, gerando um produto de Amadori. A hemoglobina glicosilada e a frutossamina são conhecidos exemplos de produtos de Amadori (WAUTIER et al., 1994).

*In vivo*, a formação dos produtos de Amadori pode ocorrer em um período de dias e é praticamente irreversível (SINGH et al., 2001). Mecanismos alternativos de formação de AGEs incluem a chamada via do estresse carbonílico, na qual a oxidação de lipídeos ou de açúcares gera compostos dicarbonílicos intermediários altamente reativos. A glicólise e a autooxidação de glicose, por exemplo, produzem metilglioxal e glioxal os quais interagem com aminoácidos para formar AGEs (SINGH et al., 2001). Estes compostos dicarbonílicos chegam a ser 20 mil vezes mais reativos do que a glicose e são os principais intermediários durante a formação de AGEs *in vivo* e nos alimentos (URIBARRI et al., 2010).

Os efeitos patológicos dos AGEs estão relacionados à capacidade que estes compostos apresentam em modificar as propriedades químicas e funcionais

das mais diversas estruturas biológicas (WAUTIER et al., 1994). Por meio da geração de radicais livres, de interações com receptores celulares e do estabelecimento de ligações cruzadas com proteínas, os AGEs podem promover, respectivamente, estresse oxidativo, aumento da expressão de mediadores inflamatórios e alterações morfofuncionais (LEWIS et al., 2017) .

Dentre os mecanismos já reconhecidos pelos quais a hiperglicemia leva ao desenvolvimento das lesões vasculares associadas ao diabetes (via do poliol, via da hexosamina, via dos AGEs e via da proteína quinase C), a via de formação dos AGEs é considerada uma das mais importantes (GOH; COOPER, 2008). Os produtos de glicação avançada podem danificar as células por meio de três mecanismos básicos: 1) modificação de estruturas intracelulares, incluindo aquelas envolvidas com a transcrição gênica; 2) interação de AGEs com proteínas da matriz extracelular, modificando a sinalização entre as moléculas da matriz e a célula, gerando uma disfunção e 3) modificação de proteínas ou lipídeos sanguíneos (GOH; COOPER, 2008).

Uma vez glicadas, as proteínas e os lipídios circulantes modificados podem, então, se ligar a receptores específicos, promovendo a produção de citocinas inflamatórias e de fatores de crescimento, os quais, por sua vez, contribuem para doenças vasculares (BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2009). A geração de AGEs reflete basicamente o balanço cinético de dois processos opostos: a taxa de formação/ingestão de AGEs e a taxa de degradação/eliminação destes produtos por sistemas especializados (SINGH et al., 2001). Além disso, fatores genéticos podem influenciar os níveis de AGEs nos indivíduos e, conseqüentemente, a predisposição para o desenvolvimento de outras doenças relacionadas a estes compostos, além do diabetes, tais como a aterosclerose, a artrite, a osteoporose e o Alzheimer (GOH; COOPER, 2008; SINGH et al., 2001).

O organismo possui defesas naturais responsáveis pela remoção e eliminação dessas glicotoxinas. Os AGEs formados nos componentes teciduais, por exemplo, são degradados a partir da proteólise extracelular ou por células scavenger, como os macrófagos teciduais, que endocitam AGEs via receptores e, posteriormente, os liberam como AGE-peptídeos pequenos e solúveis para serem excretados pelos rins (RABBANI; THORNALLEY, 2018). A taxa de formação de

AGEs pode exceder a capacidade do organismo em degradá-los e, ao longo do tempo, mesmo modestas hiperglicemias podem resultar em significativo acúmulo de AGEs, especialmente em macromoléculas como o colágeno (GOH; COOPER, 2008).

Isto pode ser bem ilustrado pela progressiva modificação das lentes do cristalino causada por AGEs, levando à formação de catarata, durante o processo de envelhecimento ou, de maneira acelerada, no próprio diabetes (BRENNER, 2018). A glicação da apolipoproteína B (ApoB), componente da lipoproteína de baixa densidade (LDL), contribui ativamente para a aterosclerose, pela redução da atividade da LDL e da deposição da LDL-AGE (LDL glicado) na parede vascular (LUEVANO-CONTRERAS; CHAPMAN-NOVAKOFSKY, 2017).

### **1.3. Enzimas digestivas relacionadas com o DMT2**

Em humanos, entre 40% a 80% da ingestão calórica total é proveniente dos carboidratos, tornando-os a fonte de energia mais importante e com implicações diretas na glicemia pós-prandial em diabéticos (ENGLYST; ENGLYST, 2005). Os monossacarídeos (única unidade, como glicose, galactose, frutose, xilose e ribose), por definição, não precisam ser digeridos para serem transportados ao corpo (TUCCI; BOYLAND; HALFORD, 2010)

No entanto, polissacarídeos devem ser digeridos enzimaticamente para que seus monossacarídeos possam ser absorvidos (MIAO et al., 2015). Na dieta humana, os principais carboidratos digeríveis compreendem dissacarídeos, como sacarose (açúcar) e lactose, e polissacarídeos maiores, como o amido (TUCCI et al., 2010). A digestão dos carboidratos começa na boca pela ação da  $\alpha$ -amilase salivar, que hidrolisa as ligações  $\alpha$ -1,4 no amido, os produtos desse processo são a maltose, maltriose e pequenas dextrinas (MIAO et al., 2015).

O processo de digestão do amido continua no intestino delgado pela ação da  $\alpha$ -amilase pancreática e é completado por enzimas presentes no intestino delgado, conhecidas como  $\alpha$ -glicosidases (maltase, sacarase e lactase, também conhecidas como dissacaridases) que produzem os monossacarídeos absorvíveis glicose, frutose e galactose (MIAO et al., 2015; TUCCI et al., 2010).

Por outro lado, os lipídios obtidos pela alimentação são componentes fundamentais de todos os organismos vivos, representando assim um constituinte importante da nutrição humana (aproximadamente 40% da ingestão diária de energia) (TUCCI et al., 2010). Nos diabéticos, a hiperlipidemia pode ser gerada pela alta ingestão de lipídeos e pela lipólise, que por sua vez é acionada nos músculos por conta da resistência à insulina (LUNAGARIYA et al., 2014).

As gorduras dietéticas são absorvidas no intestino e funcionam como um suprimento de energia, reguladores térmicos, constituintes da membrana, armazenamento de energia e algumas desempenham um papel importante na função do corpo como ácidos graxos essenciais e vitaminas lipossolúveis (KUKSIS, 2018). O intestino humano é capaz de absorver aproximadamente 95% da gordura ingerida (CAREY; SMALL; BLISS, 1983). Dada a absorção eficiente da gordura dietética, não é de surpreender que a ingestão em longo prazo de uma dieta rica em gordura seja prontamente convertida em tecido adiposo, particularmente naqueles com baixos níveis de atividade física.

Os triacilgliceróis (TG) consistem em uma única molécula de glicerol, ligada por ligações éster a três ácidos graxos (FRIEDMAN; NYLUND, 1980). Os TG não podem ser absorvidos; portanto, as enzimas intestinais devem hidrolisar as ligações éster no esqueleto do glicerol para que a molécula seja absorvida (KUKSIS, 2018). A hidrólise de TG *in vivo* é catalisada por várias lipases digestivas, que incluem a lipase pré-duodenal (lipase gástrica lingual) e as lipases extra-duodenais (pancreáticas, hepáticas, lipoproteicas e endoteliais) (TUCCI et al., 2010).

A Lipase pancreática (LP) é a principal enzima lipolítica, hidrolisando cerca de 40% a 70% dos TG consumidos na alimentação (CARRIERE et al., 1993). A porção exógena do pâncreas sintetiza e secreta várias enzimas lipolíticas, como a LP e a colipase (CL), um fator necessário para otimizar a atividade da lipase pancreática (TUCCI et al., 2010). A colipase liga-se a micelas de ácidos biliares e emulsões revestidas de fosfolipídios e uma vez ligada a essas superfícies, a colipase facilita a interação entre a lipase pancreática e a superfície das micelas. A catálise da lipase possibilita a hidrólise dos TG em ácidos graxos e glicerol.

Para serem absorvidas, as micelas entram em contato com as microvilosidades intestinais e são transportadas através da membrana celular do



enterócito, que posteriormente as re-esterifica em TG, monta-os em quilomícrons e então os segrega no sistema linfático para torná-los biodisponíveis (CAREY et al., 1983). As taxas de lipólise e, conseqüentemente, a oferta de ácidos graxos no organismo podem ser afetadas por vários fatores, como níveis e atividade de lipase, propriedades físico-químicas dos lipídios da dieta e presença de inibidores ou potenciadores (KUKSIS, 2018; LUNAGARIYA et al., 2014). Em tal cenário, é plausível supor que a inibição da absorção de carboidratos e gorduras possa ser um alvo potencial para tratar a DMT2, evitando mais ganho de peso e conseqüentemente a resistência à insulina (FRANCO et al., 2018).

#### **1.4. Relação estrutura e função dos compostos fenólicos**

Os polifenóis são compostos químicos caracterizados pela presença de várias hidroxilas em uma cadeia cíclica de carbonos, presentes nos mais variados seres vivos (LUCKNER, 2013). Os polifenóis possuem ações antioxidantes e também são capazes de inibir enzimas digestivas, essas duas ações podem diminuir o risco de doenças cardiovasculares e câncer (FRANCO et al., 2018). Além disso, os polifenóis isolados a partir de várias fontes vegetais, têm mostrado capacidade para inibir enzimas digestivas incluindo a lipase e  $\alpha$ -amilase *in vitro* e, desempenhando um papel positivo no tratamento da obesidade (TAN et al., 2017)

Estudos anteriores argumentaram que os polifenóis, incluindo os flavonóides, têm um efeito inibitório maior, dependendo do número e da posição dos grupos OH<sup>-</sup> (KARAMAC; AMAROWICZ, 1996; TADERA et al., 2006), também desempenhando um papel em reações antioxidantes (Pietta, 2000) e antiglicantes (Stefek, 2011). Os flavonoides são capazes de estabilizar os radicais livres, prevenindo que eles causem danos às biomoléculas das células. Essa função é extremamente importante em plantas, uma vez que esses seres estão expostos constantemente aos raios ultravioletas (UV) do sol durante a fotossíntese. Os raios UV são capazes de gerar EROs, levando o organismo ao estresse oxidativo se não houvessem mecanismos celulares que controlassem sua concentração (PIETTA, 2000).

Além disso, os mecanismos antioxidantes são importantes para todos os organismos aeróbicos, pois podem ajudá-los a combater os EROs gerados durante a transdução energética que ocorre no processo de fosforilação oxidativa (PIETTA, 2000). Compostos antioxidantes tais como os flavonoides, taninos condensados e outros polifenóis podem reduzir a glicação proteica tal como lutar contra a geração de radicais livres. Os açúcares redutores causam o agravamento da glicação de proteínas e de lipídeos, podendo se auto-oxidarem na presença de metais de transição, gerando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como subproduto (STEFEK, 2011; WU; YEN, 2005). Outros estudos indicam que alguns flavonoides isolados são capazes de atuar como inibidores das enzimas  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -glicosidase e lipase. Os flavonoides kaempferol (TAKAHAMA; HIROTA, 2013), luteolina, quercetina e miricetina (TADERA et al., 2006) são exemplos de inibidores dessas enzimas (BUCHHOLZ; MELZIG, 2015).

A capacidade de inibir as enzimas  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -glicosidase e lipase podem ser consideradas um potencial terapêutico complementar aos tratamentos alopáticos. Os extrativos dessas plantas podem ser usados para auxiliar no tratamento do DMT2, devido à sua capacidade de inibir essas enzimas. A inibição enzimática impedirá a digestão de polissacarídeos e lipídios da alimentação e, portanto, diminuirá a captação de monossacarídeos e ácidos graxos. O menor consumo de glicose pode então atenuar algumas das complicações dessa doença, como a glicação das proteínas séricas e também o estresse oxidativo (PEREIRA et al., 2017). Por outro lado, a menor assimilação de lipídios, favorece a perda de peso, além de impedir o acúmulo de triglicérides intramusculares, responsáveis pelos processos inflamatórios que induzem a resistência dos transportadores de GLUT4 à insulina (JUNG; CHOI, 2014).

## **1.5. Plantas usadas no tratamento complementar do diabetes mellitus tipo 2**

### **1.5.1. Graviola**

A graviola (*A. muricata*) é uma espécie arbórea nativa da América do Sul e Central, muito utilizada na medicina popular dessas regiões, principalmente em

função de suas propriedades medicinais conhecidas desde a antiguidade por povos nativos (LORENZI; MATOS, 2002). Quanto às suas características botânicas, a árvore apresenta porte ereto, com caule central rico em ramos e copa densa, podendo medir entre 3,5-8,0 m de altura. As folhas são inteiras, ovadas, oblongas ou elípticas, coriáceas, duras, de pecíolos curtos, de cor verde escura em sua porção adaxial e verde amarelada na porção abaxial, medindo de 5 a 18 cm de comprimento por 2 a 7 cm de largura (DE OLIVEIRA; LAMEIRA, 2017).

O uso de *A. muricata* na medicina tradicional inclui tratamento para hipertensão, diabetes, dor de estômago, febre, infecções parasitárias, vômitos e câncer. A planta é rica em compostos bioativos, estando presentes em suas folhas e em outras partes da planta compostos tais como taninos, cumarinas, flavonóides, terpenóides, ácido esteárico, ácido mirístico, ácido elágico e alcaloides (MORAES, I. V. M. D., 2016). A literatura mostra trabalhos indicando atividades biológicas variadas dos extratos das folhas e de outras partes de *A. muricata*, tais como propriedades antioxidantes, anti-hipertensivas, vasodilatadoras, antiplasmodiais, anti-mutagênicas, anti-convulsivantes, antivirais, antibacterianas, antidiabéticas e hipolipidêmicas (JUSTINO et al., 2018). Recentemente, em estudos fitoquímicos e farmacológicos com as espécies de anonáceas, foram encontradas moléculas com ampla atividade biológica, denominadas acetogeninas. A uvaricina foi a primeira acetogenina descoberta em 1982, apresentando-se como um agente ativo *in vivo* contra a leucemia tipo murina (MORAES, 2016).

### **1.5.2. Bardana**

A bardana (*A. lappa*) é uma espécie arbustiva originária da Eurásia, sendo utilizada na medicina tradicional chinesa e também utilizada terapeuticamente na Europa por centenas de anos (CHAN et al., 2011). A planta pertence à família Asteraceae, possui entre 50 cm e 2 m de altura, produz um caule robusto com folhas grandes, de coloração verde na porção adaxial e acinzentada na abaxial. As inflorescências (corimbos) possuem flores de cor rosa-púrpura, os frutos (aquênios) são acastanhados e a raiz é longa e grossa (TESKE, 1994).

As folhas e raízes são utilizadas no tratamento de diversas patologias, devido as suas propriedades antidiabética, diurética e anti-inflamatória, capaz de combater furunculoses, abscessos, dermatoses purulentas, acne, eczemas, gota, reumatismo, amigdalite, dor de garganta, artrite, erupções cutâneas, e vários problemas de pele, sudorífico, purificador do sangue e auxiliar no tratamento de diabetes (CHAN et al., 2011). A principal indicação da bardana é para doenças crônicas da pele, graças à presença de compostos eficientes sobre bactérias Gram positivas como estafilococos e estreptococos, e em afecções do tipo furunculose e acne; permitindo a cicatrização de muitas feridas e ulcerações (CHAN et al., 2011; TESKE, 1994). Além disso, possui propriedades diuréticas e sudoríficas que auxiliam processos reumáticos e gotosos, como a eliminação de ácido úrico, uma marcante ação depuradora de sangue, estimula a secreção biliar e é hipoglicemiante (GRASES et al., 1994).

### **1.5.3. Pata-de-vaca**

A Pata de vaca (*B. forficata*) é uma espécie pertencente à família Fabaceae, considerada uma planta nativa da América do Sul, encontrada no Brasil, predominantemente entre as regiões do Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul (CORADIN; SIMINSKI; REIS, 2011). É uma árvore semi-decídua, com crescimento entre 5 a 9 metros de altura, seu caule principal apresenta várias ramificações; suas folhas são simples, levemente coriáceas, e obcordiformes semelhantes aos pés de bovinos, daí o nome popular pata de vaca. Suas flores são brancas, reunidas em inflorescência na ponta dos ramos, que produzem uma grande vagem marrom (LUSA, 2013).

Estudos prévios conferem à Pata de Vaca as atividades diurética, hipoglicemiante e hipolipemiant. Seu principal uso como antidiabético é atribuído a trigonelina (alcaloide) e kaempferitrim (flavonoide glicosilado), princípios ativos presentes em grandes quantidades nas folhas da planta, demonstrando atividade hipoglicemiante em ratos diabéticos. Vários estudos *in vivo* demonstraram ações hipoglicemiantes de *Bauhinia forficata* em humanos e animais diabéticos, tanto que seu potencial antidiabético é reconhecido pelo SUS brasileiro, sendo uma das

plantas indicadas como tratamento complementar para o diabetes (CORADIN et al., 2011).

Outros estudos ainda demonstraram que o consumo da planta estimulou a redução dos níveis de LDL e de triglicérides em sangue de animais, estes, resultados sugerem a validade do uso clínico de pata de vaca no tratamento de diabetes tipo 2. Em estudos com humanos normais e diabéticos, a dose de 3 gramas diários de folhas em infusão durante 56 dias, obteve-se resultados benéficos (CORADIN et al., 2011).

#### **1.5.4. Camomila**

A camomila (*M. recutita*) é uma espécie herbácea usada desde a antiguidade, pelos egípcios, gregos e romanos, devido às suas diversas propriedades medicinais (GUPTA et al., 2010). A planta apresenta caule ereto, glabro e ramificado, alcançando cerca de 30 a 50 cm de altura. Suas folhas são verdes, lisas em sua porção adaxial e recortadas em segmentos afilados. As inflorescências (capítulo) apresentam flores com o centro amarelo, com corola simples de pétalas brancas, a floração ocorre na primavera e verão (LORENZI; MATOS, 2002). Trabalhos anteriores mostraram que a atividade terapêutica da camomila é devida aos princípios ativos lipofílicos e pelos hidrofílicos presentes nas inflorescências. A atividade predominante do extrato aquoso é espasmolítica (que inibe a motilidade da musculatura visceral, prevenindo a ocorrência de espasmos no estômago, intestino, útero ou bexiga), enquanto que o extrato alcoólico apresenta atividade anti-inflamatória. Dentre os compostos anti-inflamatórios da camomila temos o camazuleno, que possui reconhecida atividade anti-inflamatória e que é reforçada pela presença de matricina e do alfa bisabolol também presentes na planta. Outras moléculas bioativas da camomila também apresentam propriedades anti-inflamatórias, como os flavonóides e as cumarinas, sendo que à estas últimas atribuem-se também efeitos antimicrobianos. Os flavonóides da camomila podem ser absorvidos pela superfície da pele após aplicação cutânea, podendo penetrar nas camadas mais profundas da pele, o que é importante para seu uso como anti-inflamatório (GUPTA et al., 2010). Além disso, ao se aplicar a camomila topicamente favorece-se a ação de flavonoides e

de outros polifenóis como combatentes do estresse oxidativo e do envelhecimento. A literatura traz o uso etnofarmacológico da camomila como calmante, uma vez que apresenta efeitos ansiolíticos. Esse efeito está relacionado com o flavonoide apigenina, o qual é capaz de se ligar a receptores cerebrais (de maneira similar aos benzodiazepínicos), provocando um bom efeito ansiolítico. Esta ação é muito interessante do ponto de vista farmacológico, pois, é capaz de diminuir a ansiedade sem provocar depressão do sistema nervoso central (GUPTA et al., 2010).

### **1.5.5. Chá-verde**

O chá-verde (*C. sinensis*) é uma planta herbácea amplamente cultivada no sul da Ásia, incluindo China, Índia, Japão, Tailândia, Sri Lanka e Indonésia. De forma arbórea a arbustiva, pode atingir uma altura de 10 - 15 m na natureza e 0,6 a 1,5 m quando cultivados. As folhas são verdes, coriáceas, lanceolado, com margem serrilhada, glabra ou pubescente por baixo, variando em comprimento de 5 - 30 cm e aproximadamente 4 cm largura (MAHMOOD; AKHTAR; KHAN, 2010). A medicina chinesa tradicional recomenda o consumo do chá dessa planta, pois o considera uma bebida benéfica à saúde, devido às suas propriedades antioxidantes, antiinflamatórias, antihipertensivas, antidiabéticas e antimutagênicas (SHARANGI, 2009). As catequinas constituem a maior parte dos polifenóis contidos no Chá verde, destacando-se a epigallocatequina galato um potente antioxidante. O extrato de Chá verde é usado primeiramente por sua capacidade de combater radicais livres, mas também por auxiliar no combate da progressão de diferentes tipos de câncer, controlar os níveis de colesterol LDL e hipertensão (MITSCHER et al., 1997). A epigallocatequina galato também é capaz de reduzir a agregação plaquetária, sendo mais eficiente do que a aspirina. Além disso, o chá-verde apresenta o aminoácido L-teanina, molécula reconhecida pela literatura como um combatente do estresse oxidativo por estimular, dentre vários outros mecanismos, a síntese de glutathione (SHARANGI, 2009).

### **1.5.6. Chapéu-de-couro**

O chapéu-de-couro (*E. grandiflorus*) é uma planta herbácea encontrada em regiões alagadas, como em córregos, brejos e pântanos da região sudeste do Brasil (CORADIN et al., 2011). Planta rizomatosa com cerca de 50 a 150 cm de altura, com folhas apresentando longos pecíolos angulosos e estriados. Folhas coriáceas, cordiformes na base e agudas no ápice, bastante ásperas, com nervuras salientes, inodoras e de sabor levemente amargo, chegam a 40 cm de comprimento. A inflorescência aparece com flores hermafroditas, trímeras e numerosas, já o fruto possui um aquênio com uma semente. Apresenta reprodução sexuada por sementes e assexuada pelos brotos laterais da planta mãe (LORENZI; MATOS, 2002). A literatura aponta que as folhas da planta apresentam diversas ações biológicas, tais como ação energética, diurética, depurativa, antirreumática, laxativa, hepática, anti-inflamatória e adstringente. Além disso, pode atuar no intestino delgado produzindo um efeito laxativo por estimular a produção de bile, age melhorando os quadros reumáticos e estimula a eliminação de ácido úrico graças ao seu efeito diurético (BEVILAQUA et al., 2001).

### **1.5.7. Melão-de-São-Caetano**

O melão-de-São-Caetano (*M. charantia*), é uma espécie trepadeira amplamente conhecida por ser uma planta medicinal amplamente encontrada na Ásia, África ocidental e na América do norte (BASCH; GABARDI; ULBRICHT, 2003). As folhas são lobadas com comprimento aproximadamente de 3 a 6 cm, apresenta gavinhas simples, longas e pubescentes. As flores amarelas saem das axilas da folha, tem cinco pétalas, são amarelas arredondadas ou recortadas nas pontas e com até 1 cm de comprimento (LENZI; ORTH; GUERRA, 2005). Os frutos possuem casca amarelada e polpa alaranjada. Suas folhas são ricas em fitoquímicos como glicosídeos, saponinas, alcalóides, polifenóis e óleos. É uma das plantas mais estudadas para o tratamento do DM, sendo provavelmente a mais utilizada no mundo para este fim. A planta é usada por pacientes com DM2 como terapia complementar para reduzir a hiperglicemia, graças às suas capacidades em reduzir os danos oxidativos, bem como proteger as células beta-

pancreáticas e aumentar a absorção de glicose pelas células do fígado e tecidos adiposos e periféricos (CARVALHO; DINIZ; MUKHERJEE, 2005). Estudos realizados em animais relataram efeitos antidiabéticos dessa planta, uma mistura de dois glicosídeos esteroidais, com estrutura semelhante à insulina. Estudos indicam que a administração oral de extrato polar do pó do fruto é capaz de reduzir a glicemia e colesterolemia em animais diabéticos (CARVALHO et al., 2005).

#### **1.5.8. Alecrim**

O alecrim (*R. officinalis*) é uma planta arbustiva nativa da região mediterrânea mas foi amplamente distribuída por todo o mundo, devido principalmente aos seus usos culinários, medicinais e comerciais, incluindo nas indústrias de fragrâncias e de alimentos (AL-SEREITI; ABU-AMER; SENA, 1999). Planta de porte pequeno com caule lenhoso, ereto, pouco ramificado, de até 1,5 m de altura; suas folhas são lineares coriáceas e aciculadas, muito aromáticas, medindo 1,5 a 4 cm de comprimento por 1 a 3 mm de espessura. Suas flores possuem tonalidade lilás, pequenas de aroma forte e agradável (TESKE, 1994). A literatura relaciona suas atividades biológicas com seu óleo essencial e seus compostos fenólicos com capacidade antioxidante (BAKKALI et al., 2008). O óleo essencial apresenta propriedade analgésica, espasmolítica, antiinflamatória, antineoplásica, antifúngica e antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. Estudos clínicos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que o alecrim pode atuar contra a morte celular dos neurônios, induzida por uma variedade de agentes, abrangendo vários alvos farmacológicos para a doença de Alzheimer (HABTEMARIAM, 2016). Externamente possui ação anticaspa e previne a queda de cabelo. Por apresentar aroma marcante, o óleo essencial de alecrim é altamente utilizado na indústria de perfumaria.

#### **1.5.9. Jambolão**

O jambolão (*S. cumini*) é uma planta originária da Ásia, mas por apresentar alta plasticidade fenotípica, foi possível adaptá-la às condições brasileiras. Seu consumo é indicado para o tratamento de diarreias, desintérias, inflamações,



hemorragias, leucorreia e diabetes (LORENZI; MATOS, 2002). Planta arbórea de grande porte, tronco ereto, de folhas opostas e pecioladas. Flores esbranquiçadas, com 4 ou 5 pétalas arredondadas em forma de capuz, estames livres, indefinidos, ovário bilocular com poucos óvulos. O fruto é uma drupa oval de 3 cm de comprimento unilocular, roxo-escuro, com uma semente marrom, grande (AYYANAR; SUBASH-BABU, 2012).

As folhas possuem substâncias com ação insulínomimética, com função hipoglicemiante e com capacidade de regular os níveis glicêmicos e influenciar o metabolismo e estoque de glicogênio hepático. Além disso, o extrato das folhas do jambolão apresenta ação antiviral, anticancerígeno, antibacteriana e antialérgica. O jambolão também possui atividades distúrbios gástricos e pancreáticos, disfunções nervosas, diarreia, espasmo e gases (AYYANAR; SUBASH-BABU, 2012).

#### **1.5.10. Gengibre**

O gengibre (*Z. officinale*) é uma planta herbácea originária da Ásia, mas disseminada mundialmente (ELPO; NEGRELLE, 2004). Essa espécie apresenta rizoma alongado, um pouco achatado, com ramos fragmentados irregularmente, com coloração entre amarelo couro à marrom brilhante, estriado na longitudinal e algumas vezes fibroso. É considerada uma especiaria, pois vem sendo utilizada desde a antiguidade como condimento alimentar e para fabricação de xaropes e doces, bem como para a preparação de medicamentos (ELPO; NEGRELLE, 2004). A literatura traz vários estudos comprovando diversas propriedades do gengibre, tais como as atividades anti-inflamatórias, antiemética e antináusea, antimutagênica, antiúlcera, hipoglicêmica, antibacteriana entre outras. Os rizomas apresentam várias indicações e despertam interesse comercial quanto a sua capacidade de tratar dispepsia atônica, cólica, inflamação da garganta, asma, bronquite, anorexia, reumatismo, de seu efeito analgésico, antipirético, antihepatotóxica e antiemético. O extrato polar do gengibre possui atividade antiedematogênica e analgésica em modelos de analgesia e inflamação em roedores, possivelmente por reduzir os produtos do metabolismo do ácido araquidônico (ALI et al., 2008).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Gerais

Este estudo teve como objetivo investigar as capacidades antioxidantes e antiglicantes de algumas plantas medicinais utilizadas popularmente em Uberlândia – MG para o tratamento complementar do diabetes *mellitus* tipo 2, bem como avaliar seu potencial de inibição contra as enzimas  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -glucosidase e lipase pancreática relacionadas com a hiperglicemia e hiperlipidemia pós-prandial.

### 2.2. Específicos

- Obter os extratos etanólicos e hexânicos das plantas selecionadas e particionar dois extratos que obtiverem os melhores resultados frente aos ensaios propostos;
- Determinar o teor de fenóis totais, flavonoides e proantocianidinas dos extratos brutos e das partições;
- Avaliar a atividade de inibição das enzimas  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -glicosidase e lipase dos extratos brutos e das partições;
- Investigar a atividade antioxidante dos extratos e das partições pelos métodos FRAP (capacidade de redução do ferro), DPPH (sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e ORAC (capacidade de sequestro do radical peroxil);
- Averiguar a capacidade de inibição da glicação proteica dos extratos brutos e das frações dos melhores extratos pelo método de albumina sérica bovina e frutose (BSA/Frutose);
- Caracterizar por espectrometria de massas os principais compostos presentes em duas partições dos dois melhores extratos escolhidos com o intuito de subsidiar a investigação de suas propriedades medicinais.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Obtenção do material vegetal

As plantas utilizadas neste trabalho foram selecionadas a partir de estudos etnofarmacológicos presentes na literatura (Tabela 1) e em nove estudos etnobotânicos, realizados na cidade de Uberlândia - MG (Damasceno, 2007; Gomes, 2008; Machado, 2008; Milani, 2007; Oliveira, 2010; Oliveira, 2008; Pereira, 2008; Resende, 2007; Salgado, 2007). Estes estudos são monografias realizadas por pesquisadores do Instituto de Biologia e que estão depositadas na biblioteca da Universidade Federal de Uberlândia. As plantas selecionadas foram compradas de duas empresas brasileiras especializadas em comércio de plantas nacionais e internacionais.

As folhas de melão de São Caetano foram compradas da *FLORIEN Distribuidor de insumos farmacêuticos* (Piracicaba, SP), empresa devidamente registrada na Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (Número de Registro 1.11.419-1) e Conselho Regional de Farmácia - CRF (Registro Número: 34823). As demais plantas foram adquiridas da *Santos Flora Comércio de Ervas Ltda* (Mariporã, São Paulo, Brasil), empresa devidamente registrada na ANVISA (Número de Autorização: 6.0.671-1) e Conselho Regional de Farmácia - CRF (Número de Registro: 0505). Todas as plantas apresentaram controle de qualidade, com certificado de origem e identificadas por meio de características organolépticas, macroscópicas e microscópicas, bem como pela análise de marcadores fitoquímicos.

**Tabela 1:** Plantas medicinais usadas como tratamento complementar ao DMT2 em Uberlândia, Minas Gerais, Brasil

Nome científico	Família	Parte da planta	Referências
<i>Annona muricata</i> L.	Annonaceae	Folhas	(FLORENCE et al., 2014; OLIVEIRA, 2010)
<i>Arctium lappa</i> L.	Asteraceae	Folhas	(BAHMANI et al., 2014; RESENDE, 2007)
<i>Bauhinia forficata</i> Link.	Fabaceae	Folhas	(BOLSON et al., 2015; OLIVEIRA, 2010)
<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze	Theaceae	Folhas	(MACHADO, 2008; TANG et

<i>Echinodorus grandiflorus</i> (Cham. &Schltdl.) Micheli	Alismataceae	Folhas	al., 2013) (MARQUES et al., 2017; OLIVEIRA, 2010)
<i>Momordica charantia</i> L.	Cucurbitaceae	Folhas	(DAMASCENO, A. A., 2007; FUANGCHAN et al., 2011)
<i>Matricaria recutita</i> (L.) Rauschert	Asteraceae	Flores	(MACHADO, 2008; SEMENYA et al., 2012)
<i>Rosmarinus officinalis</i> Roscoe	Lamiaceae	Folhas	(BAKIREL et al., 2008; DAMASCENO, A. A., 2007)
<i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels	Myrtaceae	Folhas	(OLIVEIRA, 2010; TROJAN- RODRIGUES et al., 2012)
<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	Zingiberaceae	Rizoma	(DAILY et al., 2015; MACHADO, 2008)

### 3.2. Preparação dos extratos

Para o processo de extração, utilizou-se 500g de material vegetal seco, aplicando-se o método adaptado de maceração estática, isto é, sem agitação (FRANCO et al., 2018). O material permaneceu imerso em 2,5 L de solvente (proporção de 1:5 m/v) durante seis dias em média. Após esse período, a solução com os extrativos foi filtrada e o solvente removido em rotaevaporador sobre pressão reduzida a 40° C. O resíduo do material vegetal foi remacerado por mais duas vezes, utilizando-se o solvente recuperado na rotaevaporação. Repetiu-se este procedimento com dois solventes diferentes, utilizando-se o mesmo material vegetal em períodos de tempo distintos, começando pelo hexano e finalizando com o etanol. O extrato gerado foi congelado e liofilizado para a remoção da água e posteriormente, armazenado em freezer à -20°C.

### 3.3. Fracionamento do extrato etanólico

Aplicou-se o procedimento de fracionamento do extrato bruto aos extratos que obtiveram os melhores resultados nos ensaios propostos. Inicialmente, cerca de 5 g de extrato etanólico foi solubilizado em 50 mL de solução metanol:água (9:1). Com o auxílio de um funil de bromo, a partição foi realizada com solventes de polaridade crescente: hexano (Hex), diclorometano (DCM), acetato de etila (Acoet), n-butanol (ButOH) e água (H<sub>2</sub>O). Para esse processo, foram realizadas

três extrações com 50 mL de cada solvente. Os solventes das frações foram totalmente removidos por rotaevaporação com pressão reduzida a 40° C, congeladas e liofilizadas para a remoção da água remanescente e, em seguida, armazenadas a -20° C.

### 3.4. Determinação da capacidade de inibição enzimática

Os extratos/partições e controles positivos (acarbose para  $\alpha$ -amilase /  $\alpha$ -glicosidase e Orlistat para lipase) foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) e utilizados na concentração de 5 mg / mL para os ensaios iniciais. As amostras foram diluídas em série a partir de uma concentração de 5 mg / mL para determinação da IC50. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram apresentados como porcentagem (%) de inibição, calculados conforme a equação 3:

$$\text{Inibição (\%)} = [(A \text{ controle} - A \text{ amostra}) / (A \text{ controle})] \times 100$$

Equação 3

Onde “A controle” é o valor de absorbância do controle negativo e “A amostra” é o valor de absorbância de cada extrato ou controle positivo.

#### 3.4.1. Ensaio de inibição da enzima $\alpha$ -amilase

O ensaio de inibição da enzima  $\alpha$ -amilase foi baseado em DA SILVA SANTOS et al. (2012). O método consiste na inibição da catálise da  $\alpha$ -amilase, utilizando-se o substrato  $\alpha$ -(2-cloro-4-nitrofenil)- $\beta$ -1,4-galactopiranosilmaltosídeo (GAL-G2- $\alpha$ -CNP) e uma fração de saliva enriquecida com  $\alpha$ -amilase (FEA). Para o preparo da FEA, coletou-se saliva humana pelo método de cuspe, armazenando-a em freezer a -20° C por 48 h (parecer do comitê de ética no. 407.597). Após esse período, a saliva foi descongelada e centrifugada a 12000 xg por 10 min a 20 ° C. O sobrenadante foi fracionado em uma coluna de Q-Sepharose utilizando como fase móvel um tampão Tris-HCl (50 mmol/L de Tris, 10 mmol/L de EDTA e 10 mmol/L de EGTA com pH 8,0).

O volume de exclusão da coluna de Q-Sepharose foi dialisado em tampão de bicarbonato de amônio (50 mmol/L e pH 7,0), liofilizado e solubilizado em 50 mmol/L de tampão ácido 2-(N-morfolino)-etanossulfônico (MES) pH 6,0 (contendo 5 mmol/L de cloreto de cálcio, 140 mmol/L de tiocianato de potássio e 300 mmol/L de cloreto de sódio). As amostras de extrato/partições e a acarbose foram dissolvidas em DMSO e incubadas com a FAE (proporção de 1:10) durante 30 min a 37° C. Iniciou-se a reação com a adição de 320 µL do substrato GAL-G2- $\alpha$ -CNP (12 mmol/L) e os valores de absorbâncias foram medidos a 405 nm, durante 3 min, com intervalo de 1 min, a 37° C. O branco foi realizado substituindo as amostras por tampão MES.

### **3.4.2. Ensaio de inibição da enzima $\alpha$ -glicosidase**

O ensaio de inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase foi baseada em JUSTINO et al. (2018). Os extratos foram analisados quanto à sua capacidade de inibir a atividade da  $\alpha$ -glicosidase usando 4-nitrofenil  $\alpha$ -D-glicopiranosídeo (p-NPG) como substrato e fração enriquecida em  $\alpha$ -glicosidase obtida a partir do pó cetônico de intestino de ratos (Sigma) (FEG). Para o preparo da FEG, 200 mg de pó cetônico de intestino de rato foi homogeneizado em 3 mL de tampão fosfato (50 mmol/L e pH 6,8). O homogeneizado foi então centrifugado a 12000 xg por 30 min e o sobrenadante (FEG) foi coletado e utilizado no ensaio. Cada extrato foi incubado com FEG e glutatona reduzida a 1,5 mM (diluída em tampão fosfato 50 mM pH 6,8) durante 20 min a 37 ° C. A reação foi iniciada pela adição de 4 mM de p-NPG nos poços. Os valores de absorbância foram medidos em espectrofotômetro a 405 nm durante 30 min. Utilizou-se tampão fosfato como branco.

### **3.4.3. Ensaio de inibição da enzima lipase**

O ensaio de inibição da enzima lipase foi baseado em FRANCO et al. (2018). Os extratos foram analisados quanto à sua capacidade de inibir a atividade da lipase utilizando 4-nitrofenil palmitato (p-NPP) como substrato e lipase pancreática suína (Sigma). Inicialmente, incubou-se 50 µL de cada

extrato/partição com 100 µL de enzima (diluído em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0, contendo CaCl<sub>2</sub> 10 mM e NaCl 25 mM) por 20 min a 37 °C. A reação iniciou-se com a adição do substrato p-NPP (0,08 mM) (diluído em isopropanol a 10%, tampão Tris-HCl 50 mM e goma arábica a 0,1%). Os valores de absorbância foram medidos em espectrofotômetro a 410 nm por 30 min. Como branco, utilizou-se tampão Tris-HCl.

### **3.5. Prospecção fitoquímica**

Para a determinação das concentrações totais de polifenóis, flavonoides e taninos condensados nos extratos brutos e partições selecionadas como as melhores, utilizou-se como base o método de ZOU et al. (2011) em microplacas de 96 poços. Os extratos/partições foram diluídos em etanol na concentração de 5 mg/mL. Todas as análises foram feitas em triplicata.

#### **3.5.1. Determinação do conteúdo de fenóis totais**

Para a determinação de fenóis totais, utilizou-se o reagente Folin Ciocalteu na qual envolve a redução do reagente de Folin (mistura dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico) pelos compostos fenólicos (TREVISAN et al., 2009). O ensaio foi iniciado com a adição de 5 µL de solução de extrato/partição, 25 µL de solução aquosa do reagente Folin-Ciocalteu e 195 µL de água milli-Q em cada poço e depois incubado por 6 min à 25°C. Após a incubação, adicionou-se 75 µL de carbonato de cálcio Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7%) e a placa foi novamente incubada por 2h à 25°C na ausência de luz.

A determinação foi feita pela medida da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 760 nm. O mesmo procedimento foi realizado utilizando 5 µL de etanol para obtenção do branco. O conteúdo de fenóis totais foi obtido utilizando uma curva analítica construída com padrões de ácido gálico, nas concentrações de 15,62; 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000 e 2000 µg/mL. Os resultados foram expressos como miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (mg GAE/g).

### **3.5.2. Determinação do conteúdo de taninos condensados**

O conteúdo de proantocianidinas foi determinado utilizando vanilina. O mecanismo da reação que ocorre entre a vanilina e o tanino condensado em HCl é do tipo substituição eletrofílica no anel aromático. Essa metodologia não identifica os taninos hidrolisáveis, pois conforme as suas estruturas de ressonância, os carbonos na posição orto em relação à carbonila apresentam densidade de carga positiva para os taninos hidrolisáveis, o que impede que ocorra uma substituição eletrofílica no anel aromático (SCHOFIELD; MBUGUA; PELL, 2001). Em cada poço, foram adicionados 10 µL de solução de extrato/partição, 200 µL de solução metanólica de vanilina (4%) e 100 µL de HCl concentrado e, sequencialmente, incubou-se por 15 min à 25°C.

A determinação foi feita pela medida da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 500 nm. O mesmo procedimento foi realizado utilizando 5 µL de etanol para obtenção do branco. O conteúdo de fenóis totais foi obtido utilizando uma curva analítica construída com padrões de catequina (CE), nas concentrações de 15,62; 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000 e 2000 µg / mL. Os resultados foram expressos como miligramas de equivalentes de catequina por grama de amostra (mg CE/g).

### **3.5.3. Determinação do conteúdo de flavonoides**

O teor de flavonoides foi determinado utilizando-se como complexante o cloreto de alumínio. Nessa análise, o cátion alumínio ( $Al^{3+}$ ) forma complexos estáveis com os flavonoides, que apresentam absorção em comprimento de onda maior do que o flavonoide não complexado (WOISKY; SALATINO, 1998)

Em cada poço, foram adicionados 30 µL de solução extrato/partição, 180 µL de água milli-Q e 10 µL de solução 5% de  $NaNO_2$  e então, deixou-se a placa sob incubação por 6 min à 25°C e na ausência de luz. Após, adicionou-se 20 µL de solução de  $AlCl_3$  (10%) e deixou-se em repouso por mais 6 min à 25°C e na ausência de Luz. Depois da incubação, adicionou-se à mistura 60 µL de solução de NaOH (4%) e incubou-se durante mais 15 min à 25°C e na ausência de luz.



A determinação foi feita pela medida da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 425 nm. O mesmo procedimento foi realizado utilizando 5 µL de etanol para obtenção do branco. O conteúdo de fenóis totais foi obtido utilizando uma curva analítica construída com padrões de quercetina, nas concentrações de 15,62; 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000 e 2000 µg/mL. Os resultados foram expressos como miligramas de equivalentes de quercetina por grama de amostra (mg QE/g).

### **3.6. Determinação da capacidade antioxidante**

Utilizou-se diferentes concentrações de extratos/partições e de ácido ascórbico (controle positivo) para os ensaios antioxidantes. As amostras foram solubilizadas em etanol e o ácido ascórbico em água na concentração de 1 mg/mL para o método FRAP (Capacidade de redução do Ferro) e para o método de eliminação do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), e 100 µg/mL para o método ORAC (capacidade de absorção de radicais de oxigênio). As amostras foram diluídas em série a partir da concentração de 5 mg/mL para a determinação da análise de IC<sub>50</sub> pelo método DPPH. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como porcentagem (%) de capacidade antioxidante para ensaio de DPPH, e equivalentes de trolox (µmol TE / g) para ensaios de FRAP e ORAC.

#### **3.6.1. Sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)**

O método de DPPH foi baseado no método descrito por SHARMA; BHAT (2009). Na análise da capacidade antioxidante pelo sequestro do radical DPPH, a reação entre os compostos fenólicos e o radical pode ocorrer por meio da transferência de hidrogênio atômico ou por perda sequencial de próton na transferência de elétron (LIU, 2010).

As amostras foram incubadas com uma solução metanólica de 60 mM de DPPH a 30 ° C por 20 min, na ausência de luz. O ensaio foi iniciado com 250 µL de extrato/partição solubilizado em 750 µL de solução metanólica de DPPH (0,06

mmol/L). A mistura contendo extrato/partição e o ácido ascórbico foi incubada a 30° C, na ausência de luz, por 20 min. A redução na absorvância da mistura foi medida em espectrofotômetro a 517 nm. A eliminação dos radicais DPPH foi calculada usando a equação 1:

$$DPPH (\%) = [(A \text{ controle} - (A \text{ amostra} - A \text{ branco})) / (A \text{ controle} - A)] \times 100$$

Equação 1

onde “*A controle*” é o valor de absorvância do radical DPPH, “*A amostra*” é o valor da absorvância do mix amostra + DPPH e “*A branco*” é o valor da absorvância do mix amostra + metanol. O solvente metanol foi usado como controle negativo.

### 3.6.2. Capacidade de sequestro do radical peroxil (ORAC)

A avaliação da capacidade antioxidante pelo método ORAC foi baseada em PRIOR et al. (2003). O método fundamenta-se na inibição da oxidação da fluoresceína pelo radical peroxil, iniciado pela decomposição térmica do composto Azobis (2,2'-azobis (2-amidino-propano) dihidrocloro); a fluoresceína é utilizada como indicadora e a perda de sua fluorescência é avaliada ao longo do tempo, na ausência e na presença de antioxidantes (PRIOR et al., 2003). Neste ensaio, todos os reagentes foram preparados em tampão fosfato a 75 mmol/L e pH 7.4.

Inicialmente, 25 µL de extrato/partição foram misturados a 150 µL de fluoresceína (0,085 nmo/L) e incubados à temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, adicionou-se 30 µL da solução de Azobis para dar início à reação. A intensidade de fluorescência (485 nmex/ 528 nmem) foi medida em espectrofluorímetro e foi verificada a cada 1 min e 30 s durante 90 min. O branco foi realizado substituindo o extrato/partição por tampão fosfato. A perda de fluorescência da fluoresceína foi medida utilizando o cálculo da área sob a curva e a capacidade antioxidante foi determinada por meio de uma curva analítica construída com ácido Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico).

### 3.6.3. Capacidade de redução de ferro (FRAP)

A avaliação da capacidade antioxidante pelo método FRAP foi baseado em BENZIE; STRAIN (1996). Neste ensaio, os antioxidantes presentes nas amostras reduzem  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$ , o qual é quelado pelo composto TPTZ (2,4,6-tri(2piridil) -s-triazina) formando o complexo  $Fe^{2+}$ -TPTZ, de coloração azulada (BENZIE; STRAIN, 1996). Inicialmente, incubou-se 250  $\mu$ L do reagente de FRAP, constituído por 10 volumes de tampão acetato de sódio (0,3 mol/L e pH 3,6), 1 volume de solução ácida de TPTZ (10 mmol/L) e 1 volume de solução aquosa de cloreto férrico (20 mmol/L), com 10  $\mu$ L de extrato/partição e 25  $\mu$ L de água milli-Q durante 6 min a 37° C. As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro a 593 nm e a capacidade antioxidante foi determinada por meio de uma curva analítica construída com ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox). O tampão acetato de sódio foi utilizado como branco.

### 3.7. Determinação da capacidade de inibição da glicação proteica

O método de capacidade antiglicante foi baseado em JUSTINO et al. (2018). O método albumina sérica bovina e frutose (BSA/FRU) é útil para avaliar o efeito dos extratos/partições em todas as fases da glicação protéica. Os extratos/partição e quercetina (controle positivo) foram diluídos em DMSO e utilizados na concentração de 5 mg/mL e diluídos serialmente a partir dessa concentração para determinação do  $IC_{50}$ . Para este ensaio, foram adicionados 450  $\mu$ L de tampão fosfato (200 mmol/L, pH 7,4), 150  $\mu$ L de BSA (50 mg/mL em tampão fosfato), 150  $\mu$ L de frutose (1,25 mol/L em tampão fosfato) e 50  $\mu$ L de extrato/partições. Os tubos foram incubados à 37° C por 72 horas, na ausência de luz. Após esse período, 800  $\mu$ L de ácido tricloroacético 20% (m/v) foi adicionado em cada tubo. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 10000 xg por 10 min e o pellet foi ressuspendido em 800  $\mu$ L de tampão fosfato. A redução da fluorescência do BSA quando se liga ao açúcar (frutose) foi avaliada em espectrofluorímetro, com excitação a 350 nm e emissão a 420 nm. O branco foi realizado substituindo a frutose por tampão fosfato e o extrato/partição por DMSO.

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados são apresentados como porcentagem (%) de inibição, calculados pela equação 2:

$$\text{Inibição (\%)} = [(F \text{ controle} - F \text{ amostra}) / (F \text{ controle})] \times 100$$

Equação 2

onde o “*F controle*” é o valor de fluorescência do controle negativo e “*F amostra*” é o valor de fluorescência de cada extrato / quercetina. Como controle negativo, utilizou-se tampão fosfato.

### 3.8. Ensaio de hemólise

O ensaio de hemólise foi feito com base no estudo de EVANS et al. (2013). Para a avaliação da capacidade hemolítica, os extratos e a saponina *Quillaja sp* (controle positivo Sigma) foram diluídos em etanol nas concentrações de 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,67 µg/mL. Por outro lado, foram avaliadas três concentrações das partições, começando por 500, 250 e 125 µg/mL. Inicialmente, removeu-se 1 mL de sangue de rato Wistar macho, devidamente sedado, por meio de tubo revestido com K<sub>2</sub>-EDTA (parecer do comitê de ética no. 015/17). Após remoção, o sangue foi centrifugado a 500g durante 5 min para que o sobrenadante (plasma) pudesse ser descartado. Após descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em tampão fosfato de sódio (PBS) (pH 7,4) e a solução foi então centrifugada a 500g durante 5 min. Logo após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o processo repetido por mais 3 vezes, com a finalidade de lavar as células. Em seguida, o sobrenadante foi removido e substituído por PBS enriquecido com glicose (10mmol/L) para obtenção de solução rica em eritrócitos (SRE).

Em um tubo de 10 mL, acrescentou-se 9800 µL de PBS e 200 µL de SRE (diluição de 1:50) para obtenção de solução diluída de eritrócitos (SDE). Para o início do ensaio, foram adicionados 10 µL de amostra (extrato/partição) e 190 µL de SDE em placas de 96 poços com fundo em V. As placas foram então incubadas à 37°C durante 1 hora. Após a incubação das placas, as mesmas foram centrifugadas a 500g por 5 min para sedimentar os eritrócitos intactos e

então, foram transferidos 100 µL do sobrenadante de cada poço para novos poços de uma placa de 96 poços de fundo plano. As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro a 405 nm. Para o branco, utilizou-se 10 µL de solução de triton (10%). O valor médio de eritrócitos em sangue de rato wistar macho é de  $8,65 \cdot 10^6$  células/µL, portanto, a concentração final de eritrócitos será de aproximadamente  $18 \cdot 10^5$  células por poço (LIMA et al., 2014).

### **3.9. Cromatografia líquida - análise de espectrometria de massa**

Os compostos nas frações que apresentaram melhores atividades biológicas foram identificados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massa com ionização por eletrospray (HPLC-ESI-MS / MS, Agilent Q-TOF, modelo 6520). A solução Metanol-H<sub>2</sub>O (4:1) foi usada como sistema de solvente e as amostras foram infundidas na fonte ESI do equipamento a uma taxa de fluxo de 200 µl / h. Foi utilizado gás nitrogênio como gás de secagem gás a uma taxa de fluxo de 8 L/min e como gás nebulizador a 58 psi. A temperatura do nebulizador foi ajustada para 200°C e potencial de 4,5 kV foi aplicado ao capilar. A energia de impacto do elétron foi ajustada para 5-30 eV. Os parâmetros do HPLC foram: coluna Agilent Zorbax modelo 50 x 2,1 mm, partículas de 1,8 µm e diâmetro de poro de 110 Å, fase móvel: água acidificada com ácido fórmico (0,1% v v-1) (A) e metanol (B). O sistema solvente de gradiente (B) foi: 2% (0 min); 98% (0-15 min); 100% (15-17 min); 2% (17-18 min); 2% (18-22 min), com um fluxo de 0,35 mL/min e detectado a UV de 280 e 360 nm. Os dados foram adquiridos nos modos negativo e positivo, com ajuste para um intervalo de 20-1000 m/z.

### **3.10. Análise estatística**

Todas as análises estatísticas e a confecção dos gráficos foram realizados utilizando-se o software GraphPad Prism versão 6.0. Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média e a análise da variância foi realizada pelo teste One-Way ANOVA com teste Dunnett para comparações múltiplas entre os

controles e as médias das amostras, One-Way e two-Way ANOVA com teste de Tukey para comparações múltiplas entre as médias das amostras e dos controles. Valores de  $p < 0.05$  foram considerados significativos.

## 4. Resultados

### 4.1. Inibição enzimática

Os resultados das atividades inibitórias dos extratos ETOH e Hex contra  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -glucosidase e lipase são mostrados na figura 1. Os extratos de *A. muricata*, *C. sinensis*, *E. grandiflorus* e *M. charantia* não inibiram o  $\alpha$ -amilase. No entanto, os extratos Hex de *M. recutita*, *S. cumini* e *Z. officinale*, assim como os extratos ETOH de *A. muricata*, *B. forficata*, *R. officinalis* e *S. cumini* inibiram esta enzima. Os extratos ETOH de *S. cumini* e *B. forficata* apresentaram maior atividade inibitória de  $\alpha$ -amilase ( $73,1 \pm 0,2$  e  $91,3 \pm 0,2\%$ , respectivamente) em comparação às demais plantas, apresentando capacidade de inibição semelhante à da acarbose.

No ensaio de inibição da  $\alpha$ -glucosidase, todos os extratos apresentaram baixo potencial para inibir essa enzima, com valores percentuais de inibição abaixo de 40%. Com relação ao ensaio de inibição da lipase, nem todos os extratos apresentaram capacidade de inibição. Mas entre eles, os extratos ETOH de *M. recutita*, *B. forficata* e *E. grandiflorus* apresentaram as maiores capacidades inibitórias ( $86,6 \pm 0,3$ ,  $100,0 \pm 0,1$  e  $75,8 \pm 17,0\%$  de inibição, respectivamente), com valores semelhantes ao Orlistat. Os extratos que apresentaram capacidade de inibição enzimática superior a 70% foram analisados para determinação do  $IC_{50}$ .

O extrato ETOH de *S. cumini* e *B. forficata* apresentou  $IC_{50}$  de  $401,8 \pm 14,7$  e  $8,2 \pm 2,2 \mu\text{g} / \text{mL}$  para inibição de  $\alpha$ -amilase, respectivamente (Figura 2). Além disso, extratos de *M. recutita*, *B. forficata* e *E. grandiflorus* apresentaram valores de  $IC_{50}$  de  $264,2 \pm 87,2$ ,  $59,6 \pm 10,8$  e  $115,8 \pm 57,1 \mu\text{g} / \text{mL}$  para inibição da lipase, respectivamente (Figura 2). Os extratos etanólicos de *B. forficata* e *S. cumini* apresentaram os melhores resultados nos ensaios enzimáticos, dessa maneira suas partições foram avaliadas nos mesmos métodos (Figuras 3 e 4).

Quanto ao ensaio de inibição da enzima  $\alpha$ -amilase, as partições DCM da *B. forficata* e Hex do *S. cumini* não apresentaram atividade. Por outro lado, as demais partições de *B. forficata* (IC<sub>50</sub>: Hex: 3,07±1,1; Acoet: 0,4±0,1; ButOH: 0,1±0,02 e H<sub>2</sub>O: 0,4±0,1) e *S. cumini* (IC<sub>50</sub>: DCM: 2,08±0,7; Acoet: 1,1±0,3; ButOH: 0,7±0,1 e H<sub>2</sub>O: 0,5±0,1) apresentaram alta capacidade de inibição, não apresentando diferença significativa com o controle acarbose (IC<sub>50</sub>: 0,02±0,002). As partições polares (Acoet, ButOH e H<sub>2</sub>O) apresentaram boa atividade no ensaio de inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase, contrariando os resultados obtidos com os extratos brutos Hex e ETOH.

Contudo, as partições de *B. forficata* (IC<sub>50</sub>: Acoet: 8,2±3,3; ButOH: 17,1±6,1) apresentaram os mais valores quando comparadas às partições de *S. cumini* (IC<sub>50</sub>: Acoet: 126,5±33,7; ButOH: 536,1±161,8 e H<sub>2</sub>O: 473,8±104,2), sendo que apenas a partição Acoet de *B. forficata* apresentou semelhança significativa com a acarbose (IC<sub>50</sub>: 7,1±1,4). Com relação ao ensaio de inibição da enzima lipase, as partições de *B. forficata* (IC<sub>50</sub>: Hex: 352,9±62,3; DCM: 296,7±66,4; Acoet: 185,2±37,8; ButOH: 26,7±7,8; H<sub>2</sub>O: 18,6±1,0) e *S. cumini* (IC<sub>50</sub>: Hex: 44,3±4,5; DCM: 31,5±14,3; Acoet: 237,8±21,7; ButOH: 85,9±19,1; H<sub>2</sub>O: 239,0±83,6) também apresentaram ótimo potencial sendo as frações ButOH e H<sub>2</sub>O da *B. forficata* e Hex e DCM do *S. cumini* muito próximas do Orlistat (IC<sub>50</sub>: 6,2±1,1).

#### 4.2. Prospecção fitoquímica

De maneira geral, os extratos ETOH apresentaram altas quantidades de polifenóis, taninos condensados e flavonoides quando comparados aos extratos Hex (Figura 5). Com exceção de ambos os extratos de *A. muricata* e do extrato etanólico de *M. charantia*, todos os demais extratos, Hex e ETOH, apresentaram valores superiores a 100 mg GAE/g. Dentre todos, destacaram-se os extratos ETOH de *A. muricata* (268±9,2) *B. forficata* (451,9±3,0), *C. sinensis* (514,7±8,4), *S. cumini* (285,2±14,1), o extrato hexânico de *R. officinalis* (220,0±7,1) e ambos os extratos de *Z. officinale* (Hex: 372,3±4,5 e ETOH: 236,2±2,0 mg GAE/g).

Quanto ao ensaio de taninos condensados, poucos extratos tiveram quantidade significativa dessas moléculas. Dentre todos, destacaram-se os extratos etanólicos de *A. muricata* (61,7±1,5), *B. forficata* (84,1±1,0) e *C. sinensis* (103,4±6,3 mg CE/g), enquanto que os demais extratos, etanólicos e hexânicos, apresentaram valores menores que 45 mg CE/g. Assim como no ensaio de taninos condensados, houve poucos extratos com quantidades significativas de flavonoides, mas dentre todos, destacaram-se os extratos etanólicos de *A. muricata* (73,4±2,8), *B. forficata* (82,2±2,3), *C. sinensis* (98,8±1,0) e *R. officinalis* (73,7±6,1 mg QE/g), os demais extratos, etanólicos e hexânicos, apresentaram valores inferiores a 70 mg QE/g.

Por outro lado, assim como observado nos ensaios com seus extratos brutos, as partições de *B. forficata* e *S. cumini* apresentaram altas quantidades de polifenóis, taninos condensados e flavonoides (Figura 6). As partições de *B. forficata* (Hex: 59,31±0,08; DCM: 88,9±2,9; Acoet: 203,7±3,1; ButOH: 233,7±4,8 e H<sub>2</sub>O: 160,2±0,8 mg GAE/g) e *S. cumini* (Hex: 31,4±0,7; DCM: 97,4±2,7; Acoet: 183,8±0,6; ButOH: 161,8±0,1 e H<sub>2</sub>O: 136,3±0,1 mg GAE/g) obtiveram boa quantidade de polifenóis.

Além disso, as partições de *B. forficata* (Hex: 14,6±0,8; DCM: 35,1±3,0; Acoet: 112,3±3,0; ButOH: 96,3±3,4 e H<sub>2</sub>O: 74,6±2,1 mg CE/g) tiveram bons resultados no ensaio de quantificação de taninos condensados quando comparadas às partições de *S. cumini* (Hex: 8,4±0,8; DCM: 10,1±0,9; Acoet: 20,9±0,2; ButOH: 24,2±0,4 e H<sub>2</sub>O: 14,5±0,9 mg CE/g). As partições da *B. forficata* (Hex: 5,9±1,1; DCM: 16,06±1,6; Acoet: 25,7±0,1; ButOH: 21,2±0,1 e H<sub>2</sub>O: 14,9±0,2 mg QE/g) e *S. cumini* (Hex: 9,5±0,9; DCM: 10,0±0,6; Acoet: 18,7±0,1; ButOH: 25,7±1,2 e H<sub>2</sub>O: 10,3±0,7 mg QE/g) apresentaram valores semelhantes no ensaio de quantificação de flavonoides, com destaque para as partições polares Acoet e ButOH.

### 4.3. Capacidade antioxidante e antiglicante

As atividades antioxidante e antiglicante dos extratos ETOH e Hex são mostradas na Figura 7. Em geral, os extratos ETOH apresentaram maior



capacidade antioxidante em relação aos extratos Hex. Os extratos ETOH de *A. muricata*, *M. recutita*, *C. sinensis*, *A. muricata*, *S. cumini*, *E. grandiflorus* e ambos os extratos de *R. officinallis*, *Z. officinale* e *B. forficata* apresentaram capacidades antioxidantes superiores 75% no ensaio DPPH; esses resultados foram semelhantes ao ácido ascórbico, com exceção de *M. charantia*, que apresentou atividade antioxidante abaixo de 42%. Além disso, todos os extratos apresentaram capacidade antioxidante no ensaio ORAC (acima de 700  $\mu\text{mol trolox eq / g}$ ), apresentando valores semelhantes aos da atividade do ácido ascórbico ( $1136,0 \pm 27,1 \mu\text{mol trolox eq / g}$ ). Embora nenhum extrato exibisse capacidade antioxidante próxima ao ácido ascórbico no método FRAP ( $1714,0 \pm 7,4 \mu\text{mol trolox eq / g}$ ), os extratos ETOH de *B. forficata* e *C. sinensis* apresentaram maiores capacidades antioxidantes que outros extratos ( $600,2 \pm 19,7$  e  $761,3 \pm 13,6 \mu\text{mol trolox eq / g}$ , respectivamente).

Com relação à análise de antiglicação, os extratos ETOH de *M. recutita*, *Z. officinale*, *C. sinensis*, *R. officinallis*, *A. muricata*, *S. cumini*, *B. forficata* e *E. grandiflorus* foram capazes de inibir a glicação enzimática, com valores de inibição superiores a 50%. Além disso, o extrato Hex de *R. officinallis* foi o único extrato apolar que apresentou alta capacidade antiglicante ( $95,2 \pm 0,1\%$ ). Portanto, a capacidade antioxidante medida pelo ensaio de DPPH apresentou valores superiores ( $> 85\%$ ) para extratos de ETOH de *A. muricata*, *E. grandiflorus*, *S. cumini* e ambos os extratos Hex e ETOH de *B. forficata*, *R. officinalis* e *Z. officinale*. O mesmo foi observado para os ensaios ORAC e antiglicação. Com relação ao ensaio ORAC, os extratos ETOH de *A. muricata*, *C. sinensis*, *M. recutita* e ambos os extratos Hex e ETOH de *R. officinalis* apresentaram valores superiores a 1000  $\mu\text{mol trolox eq/g}$  de atividade antioxidante.

Em relação ao ensaio de antiglicação, os extratos ETOH de *A. muricata*, *B. forficata*, *C. sinensis*, *R. officinalis* e *S. cumini* apresentaram valores excepcionais superiores a 98% da atividade antiglicantes, semelhante à quercetina. Os valores de  $\text{IC}_{50}$  para os ensaios de DPPH e antiglicação foram determinados para extratos com resultados superiores a 70% da capacidade antioxidante e inibição da glicação, respectivamente (Fig. 2). O extrato ETOH de *B. forficata* apresentou o menor valor de  $\text{IC}_{50}$  do DPPH ( $0,7 \pm 0,1 \text{ g / mL}$ ) (Figura 2A). Os extratos ETOH dos extratos de *M. recutita*, *C. sinensis*, *A. muricata*, *S.*

*cumini*, *E. grandiflorus*, *R. officinallis*, *Z. officinale* e Hex de *R. officinallis*, *Z. officinale* e *B. forficata* exibiram DPPH IC<sub>50</sub> valores inferiores a 100 µg / mL. Os extratos ETOH de *S. cumini*, *B. forficata* e *C. sinensis* apresentaram os menores valores de antiglicação (18,5 ± 2,8, 22,7 ± 4,4 e 39,6 ± 8,4 µg/mL), respectivamente, e o extrato Hex de *R. officinallis* mostrou um valor de IC<sub>50</sub> de 438,1 ± 84,9 µg/mL. Os valores do IC<sub>50</sub> de antiglicação são mostrados na figura 8.

As partições de *B. forficata* e *S. cumini* foram também avaliadas nos métodos antioxidantes DPPH, ORAC e FRAP, bem como no método de antiglicação BSA/Frutose. No método ORAC, praticamente todas as partições de *B. forficata*, (exceto a H<sub>2</sub>O) e todas as partições de *S. cumini* apresentaram alta atividade antioxidante, com resultados próximos a 1200 µmol trolox eq/g, valores que foram próximos do ácido ascórbico, que por sua vez atingiu aproximadamente 1500 µmol trolox eq / g. Pelo método de FRAP, as partições polares (Acoet, ButOH e H<sub>2</sub>O) de *B. forficata* e *S. cumini* apresentaram capacidade antioxidante também muito próxima de 1200 µmol trolox eq / g enquanto que as partições apolares (Hex e DCM) atingiram valores abaixo de 600 µmol trolox eq / g, já o ácido ascórbico apresentou valores próximos de 1700 µmol trolox eq / g.

No ensaio de DPPH, todas as partições de *B. forficata* (IC<sub>50</sub>: Hex: 142,5±20,8; DCM: 43,4±5,6; Acoet: 8,5±1,2; ButOH: 6,3±1,1 e H<sub>2</sub>O: 17,5±2,0 µg/mL) e de *S. cumini* (IC<sub>50</sub>: Hex: 377,5±67,1; DCM: 43,7±5,9; Acoet: 15,7±2,4; ButOH: 23,5±2,7 e H<sub>2</sub>O: 31,4±3,9 µg/mL) obtiveram valores elevados, não havendo diferenças significativas entre as amostras e o ácido ascórbico (7,4±0,6 µg/mL). Com relação ao ensaio BSA/Frutose, observou-se que todas as frações de *B. forficata* (IC<sub>50</sub>: Hex: 29,1±6,3; DCM: 20,8±3,5; Acoet: 8,6±2,5; ButOH: 16,7 e H<sub>2</sub>O: 14,3±3,8 µg/mL) e *S. cumini* (IC<sub>50</sub>: Hex: 112,3±41,1; DCM: 14,0±4,0; Acoet: 8,2±3,5; ButOH: 7,8±3,5; e H<sub>2</sub>O: 7,4±2,3 µg/mL), apresentaram considerável capacidade antiglicante, com valores semelhantes e sem diferença significativa quando comparados com a quercetina (8,5±1,2 µg/mL).

#### 4.4. Ensaio de Hemólise

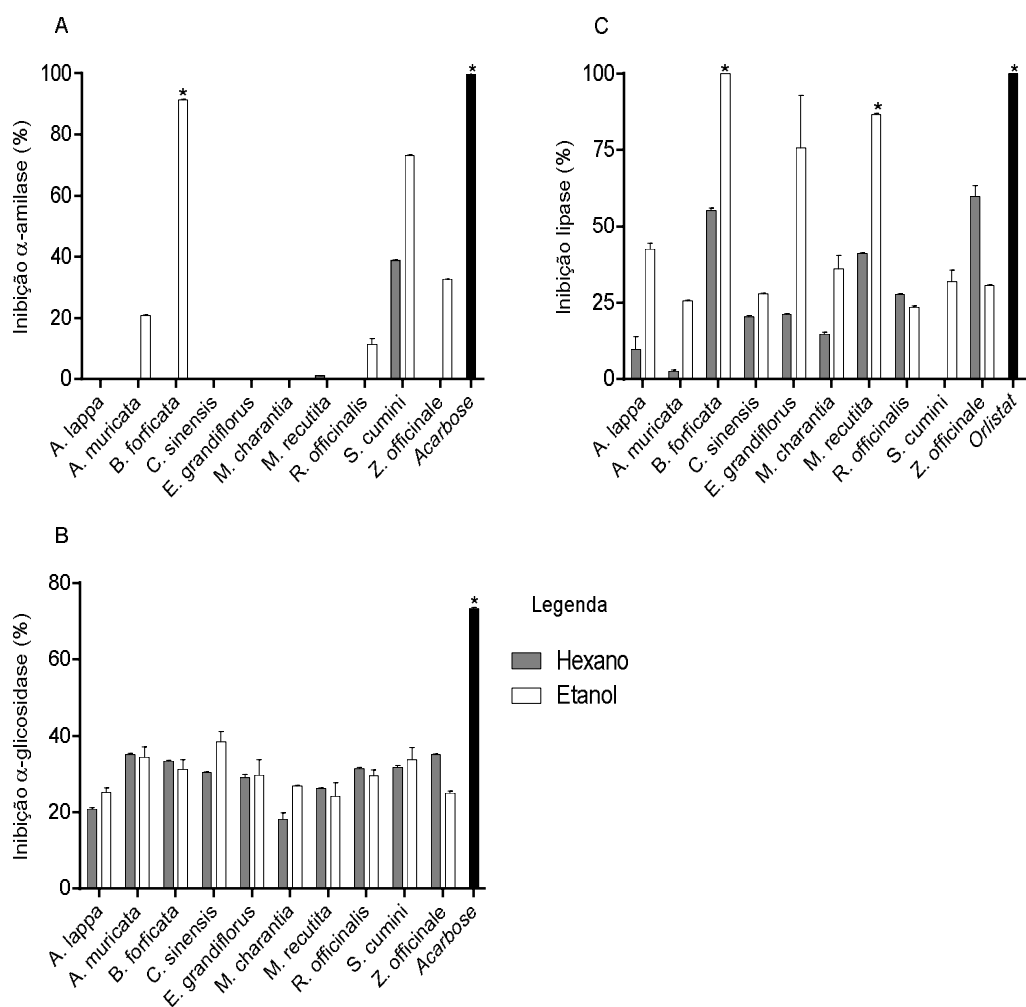
A tabela 2 mostra os resultados obtidos no ensaio de hemólise utilizando-se os extratos brutos etanólicos e hexânicos das plantas selecionadas, bem como as partições de *B. forficata* e *S.cumini*. O teste permitiu averiguar se as concentrações dos extratos/partições que obtiveram atividade nos ensaios propostos são tóxicas caso promovessem hemólise. Nenhum dos extratos apresentou atividade hemolítica nas concentrações de 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,67 µg/mL. No entanto, na concentração de 500 µg/mL os extratos Hex de *A. muricata* (23,7±0,2%), *B. forficata* (16,2±4,4%), *C. sinensis* (18,7±1,8%), *E. grandiflorus* (19,4±3,6%), *M. recutita* (23,6±0,8) e *Z. officinale* (46,8±6,8%) apresentaram os maiores valores de hemólise.

Por outro lado, a maioria dos extratos ETOH desencadearam baixos níveis de hemólise, com valores próximos a 10% de atividade, sendo as únicas exceções os extratos ETOH de *E. grandiflorus* e *M. charantia* com cerca de 35%. As partições foram testadas nas concentrações de 500, 250 e 125 µg/mL e ainda assim não apresentaram atividade hemolítica considerável quando comparadas com a saponina. Em média, as partições de *B. forficata* e *S. cumini* tiveram atividade hemolítica abaixo de 10% em todas as concentrações avaliadas.

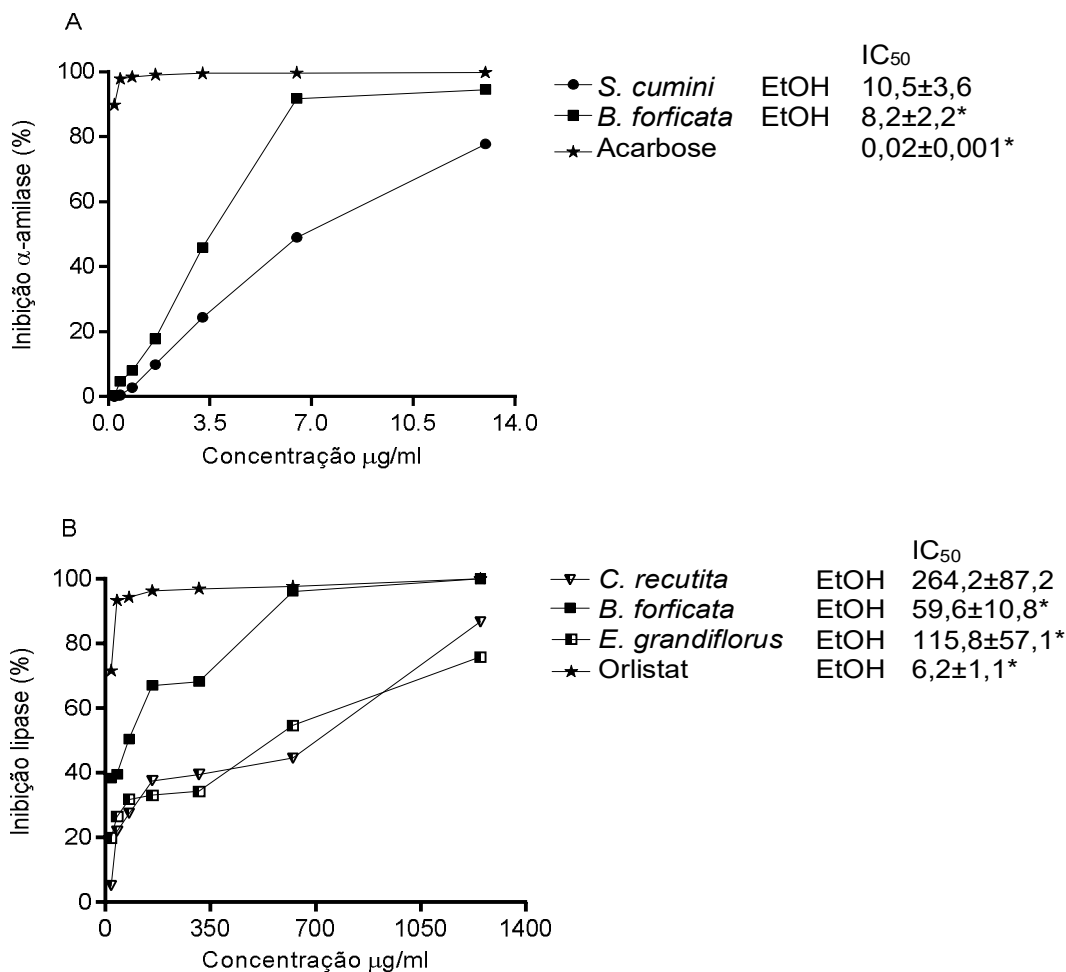
#### 4.5. Cromatografia líquida - análise de espectrometria de massa

Com base nas análises, o extrato ETOH de *B. forficata* e suas partições apresentaram os melhores resultados nos ensaios propostos. Devido a isso, foram feitas análises espectrométricas para as duas melhores partições de *B. forficata*, Acoet e ButOH, os resultados são apresentados nas tabelas 3 e 4. Foram identificadas 25 moléculas na partição Acoet, são elas: ácido quínico, ácido protocatecuico 3-hexosídeo, ácido protocatecuico, (epi) catequina hexosídeo, Apigenina, Kaempferol 3-O-(4-O-p-coumail)-glicosídeo, procianidina C1, ácido gálico, miricitina-3-O-(2-O-galoil)-glicosídeo, procianidina B2, Isorhamnetina-3-O-glicosídeo, galoil-quercetina hexosídeo, miricetina-3-O- $\alpha$ -arabino piranosídeo, quercetina-O-hexosídeo, ácido elágico pentosídeo, quercetina-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopiranosídeo, quercetina, gliciridina, liquiritina, kaempferol-3-rhamnosídeo, (+)- catequina, aurantio-obtusina, luteolina-7-O-rutinosídeo, miricetina-3-O- $\beta$ -D-galacto piranosídeo. Por outro lado, foram

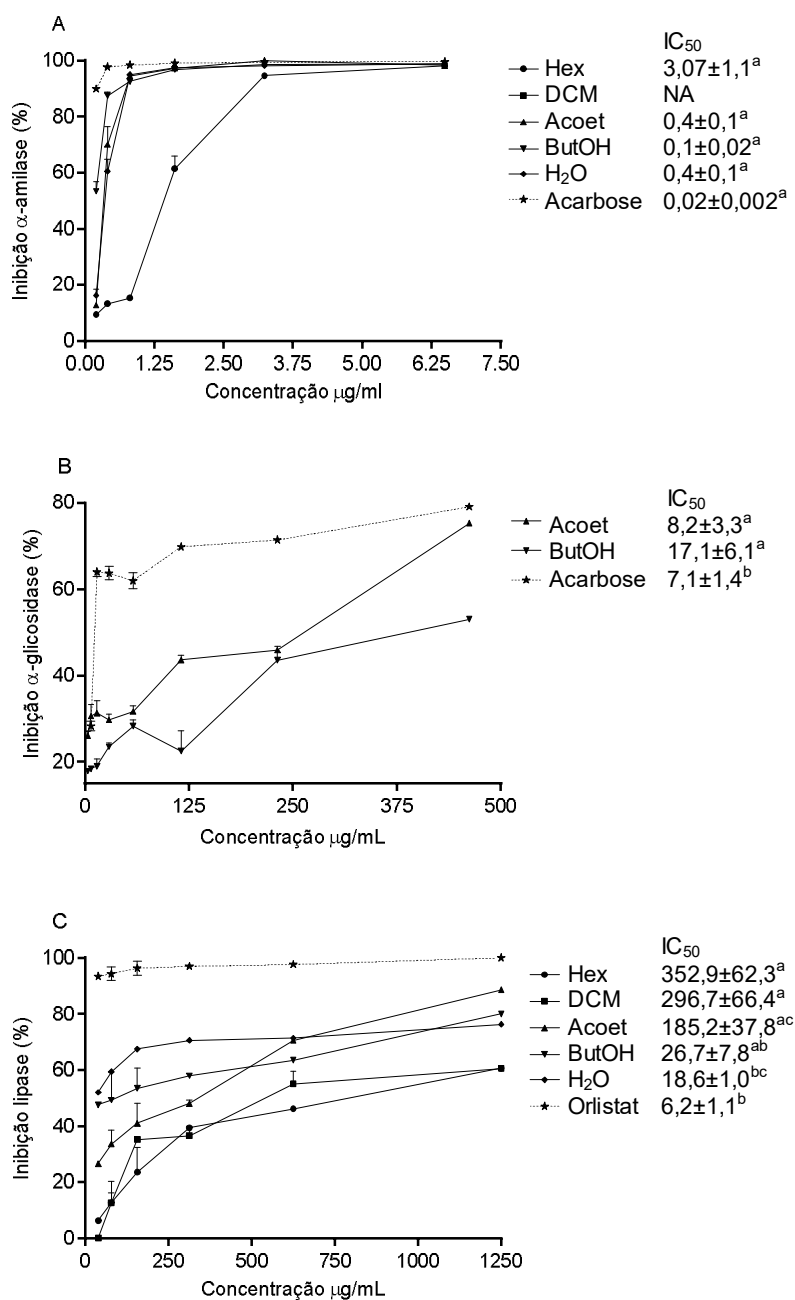
identificadas 15 moléculas na partição ButOH, são elas: galoil-hexosídeo, ácido gálico, ácido quínico, ácido protocatecuico 3-hexosídeo, kaempferol-7-O-glicosídeo, kaempferol-7-O-glicosídeo, kaempferol-3,7-dirhamnosídeo (kaempferitrina), (+)- catequina, (epi) catequina hexosídeo, isorhamnetina-3-O-glicosídeo, quercetina-3-O-rutinosídeo-7-O-rhamnosídeo, miricetina-3-O-hexosídeo, luteolina di-O-glicosídeo, miricetina-3-O- $\alpha$ -arabinopentosídeo, isoquercetina e liquiritina.



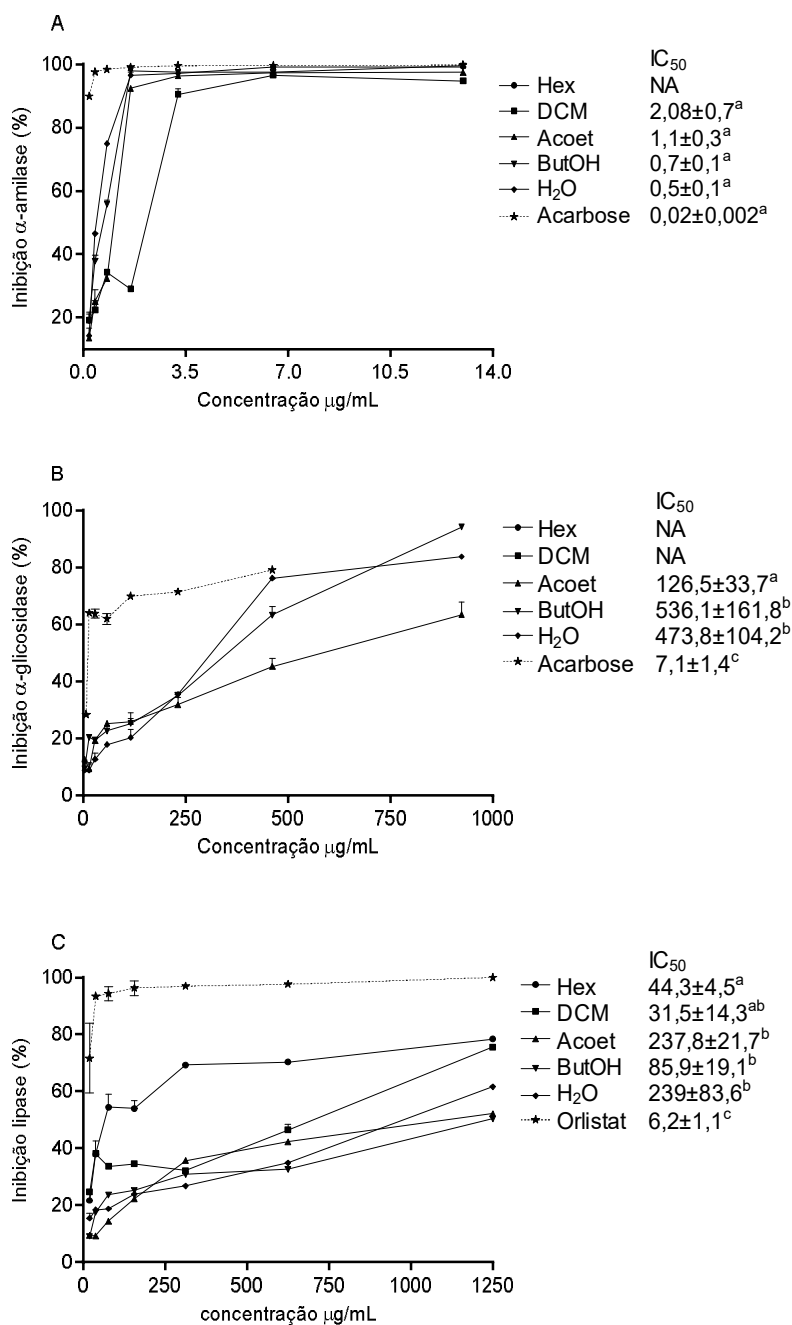
**Figura 1:** Análise da  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -glucosidase e atividade inibitória da lipase dos extratos hexânico (Hex) e etanol (ETOH) de plantas medicinais. Todos os extratos e controles positivos foram diluídos em DMSO na concentração de 5 mg / mL. Valores expressos em porcentagem da inibição enzimática. Nota: Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão. \* Diferença não significativa quando comparada ao controle (Acarbose ou Orlistat) ( $p < 0.05$ ).



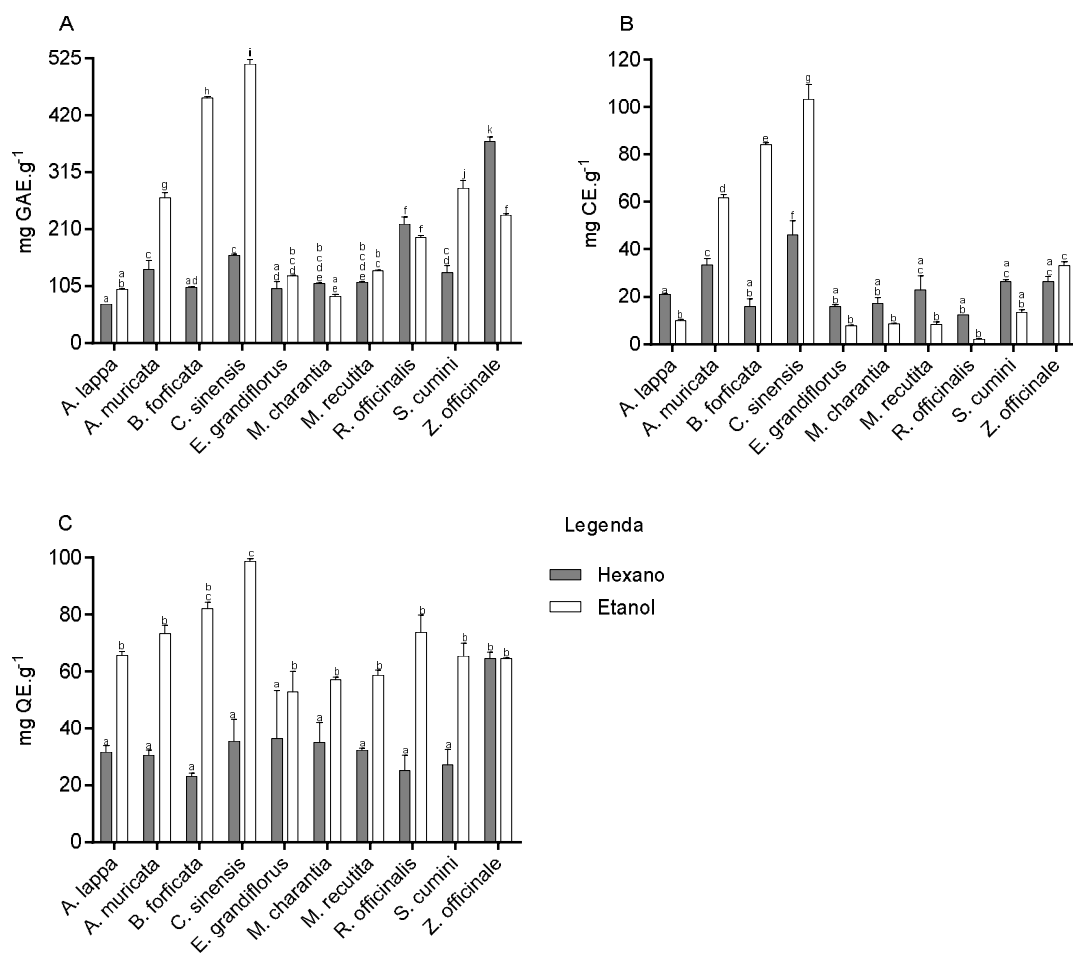
**Figura 2:** Metade dos valores da concentração inibitória máxima (IC<sub>50</sub>) dos extratos capazes de inibir mais de 70% das atividades da  $\alpha$ -amilase (A) e da lipase pancreática (B). Nota: EtOH: etanol. Todos os extratos e controles positivos foram diluídos em DMSO na concentração de 5 mg / mL. Valores expressos em percentagem da inibição enzimática, como média  $\pm$  erro padrão. \* Diferença não significativa quando comparada ao controle (Acarbose ou Orlistat) ( $p < 0.05$ ).



**Figura 3:** Avaliação da capacidade de inibição das enzimas  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -glicosidase e lipase pelas frações de *B. forficata*. Nota: Hex: hexano; DCM: diclorometano; Acoet: acetato de etila; ButOH: n-butanol; H<sub>2</sub>O: água. Todas as partições e controles positivos foram diluídos em DMSO na concentração de 5 mg / mL. Valores expressos em porcentagem de inibição enzimática. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão. Letras iguais indicam diferença não significativa (Acarbose ou Orlistat) ( $p < 0.05$ ).

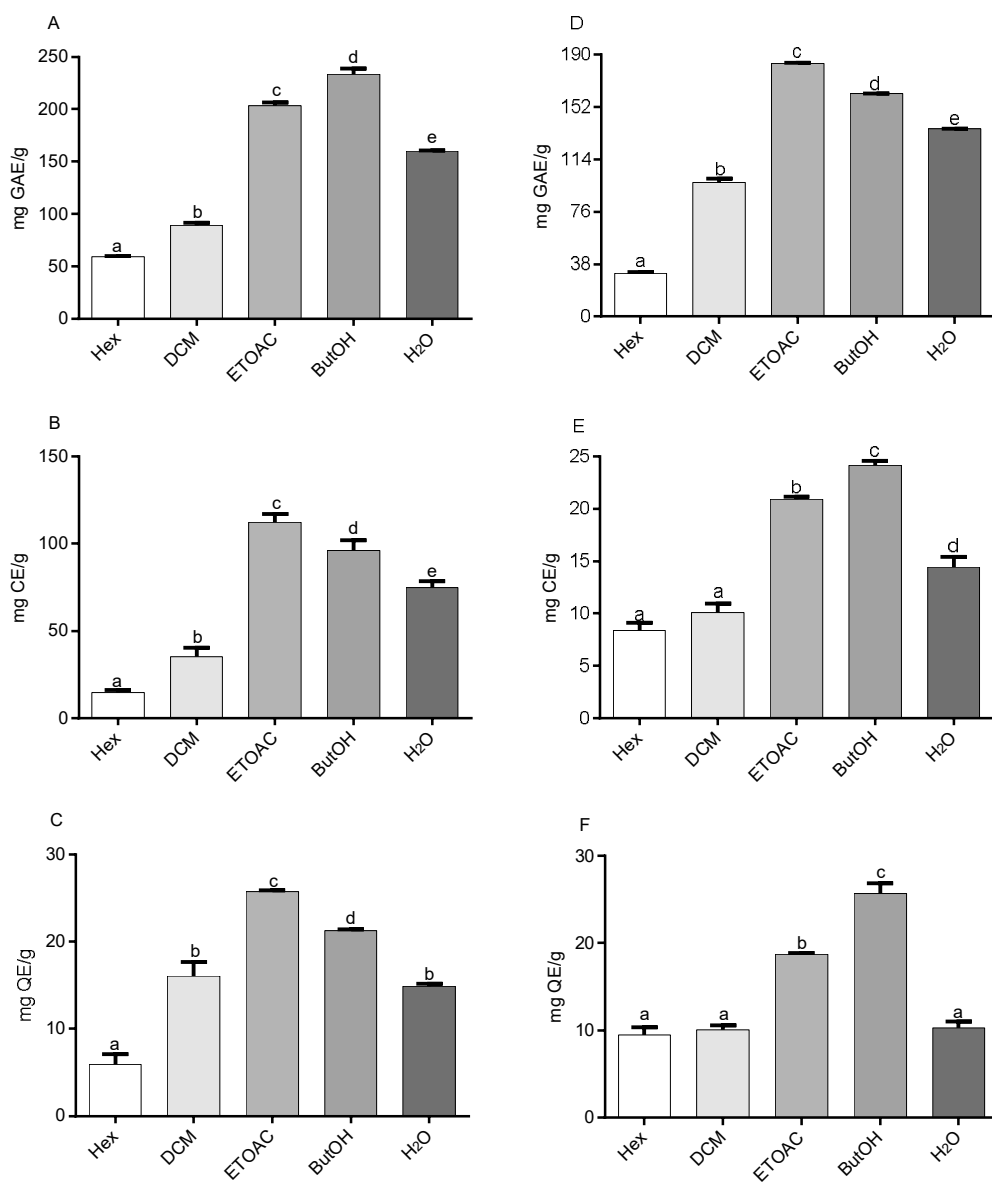


**Figura 4:** Avaliação da capacidade de inibição das enzimas  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -glicosidase e lipase pelas frações de *S. cumini*. Todas as partições e controles positivos foram diluídos em DMSO na concentração de 5 mg / mL. Valores expressos em percentagem de inibição enzimática. Nota: Hex: hexano, DCM: diclorometano, Acoet: acetato de etila, ButOH: N-butanol e H<sub>2</sub>O: água. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão. Letras iguais indicam diferença não significativa (Acarbose ou Orlistat) ( $p < 0.05$ ).

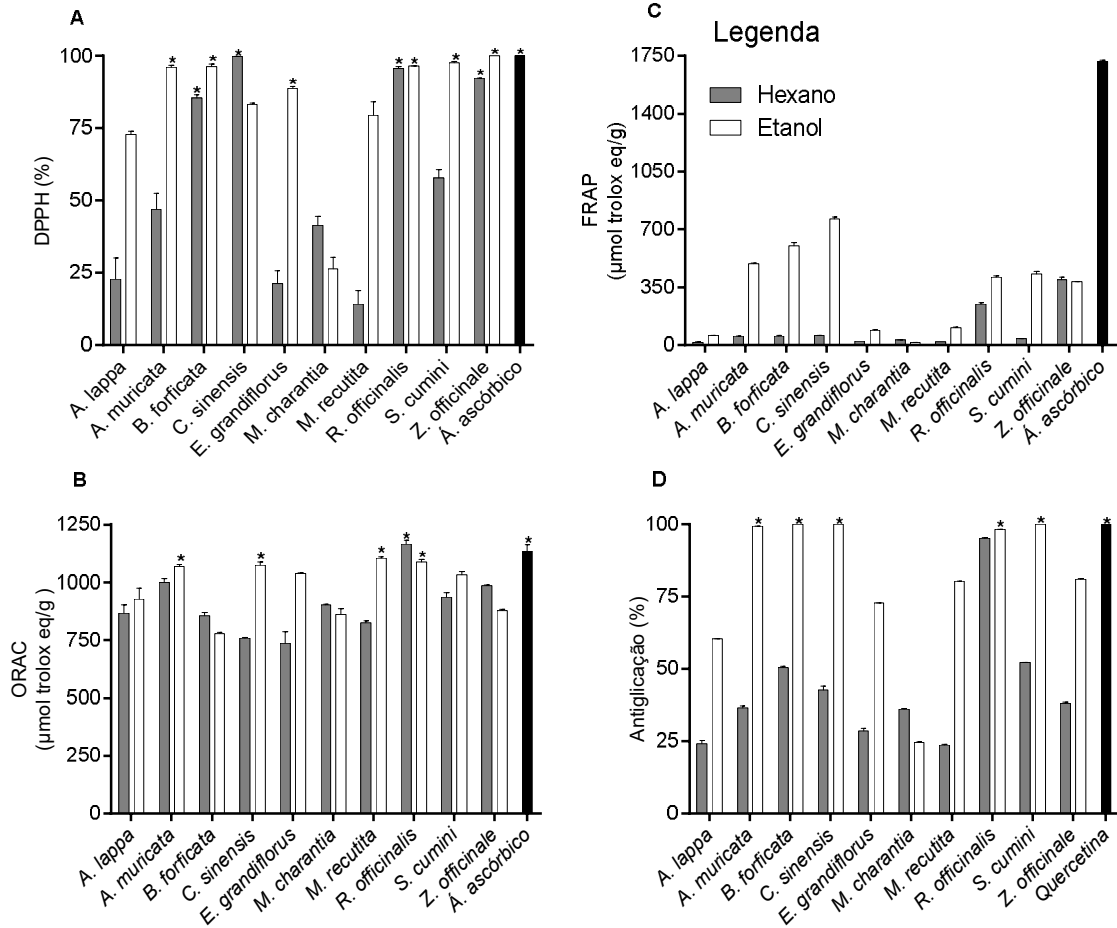


**Figura 5:** Métodos de quantificação do conteúdo total de polifenóis (A), taninos condensados (B) e flavonoides (C). Todos os extratos foram diluídos em ETOH na concentração de 5 mg/mL. O conteúdo total de polifenóis é dado como “mg de ácido gálico por g de amostra (mg GAE/g)”, o conteúdo total de taninos condensados é dado como “mg de catequina por g de amostra (mg CE/g)” e o conteúdo total de flavonoides é dado como “mg de quercetina por g de amostra (mg QE/g)”. Letras iguais indicam diferença não significativa ( $p < 0.05$ ).

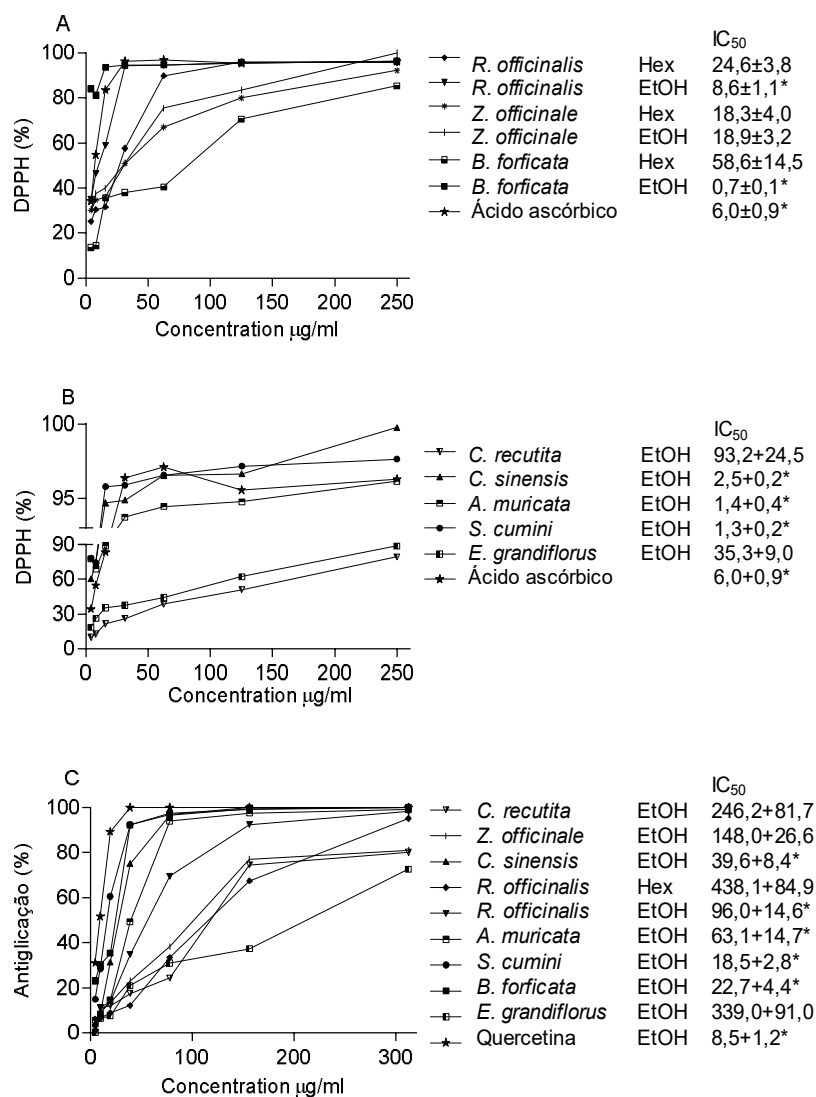




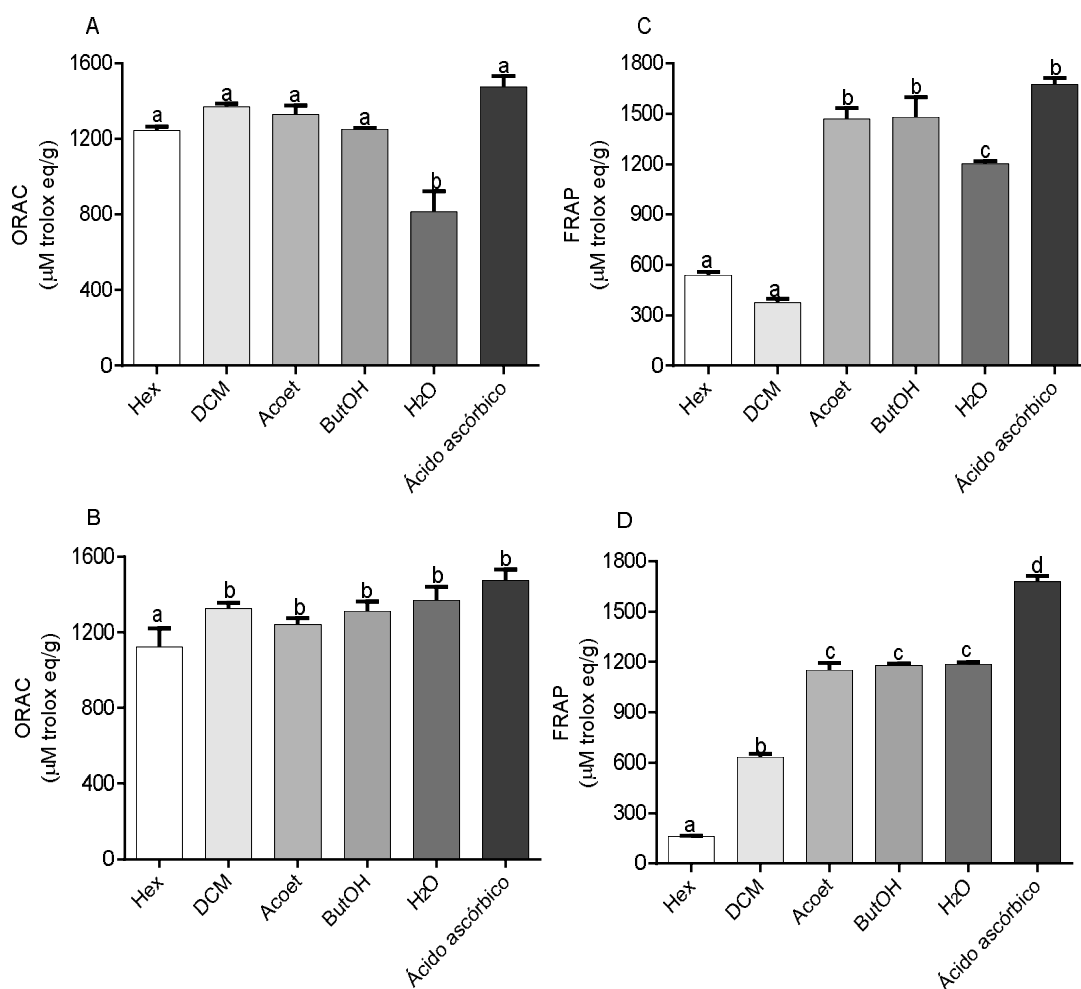
**Figura 6:** Métodos de quantificação do conteúdo total de polifenóis (A e D), taninos condensados (B e E) e flavonoides (C e F). Nota: Hex: hexano; DCM: diclorometano; Acoet: acetato de etila; ButOH: n-butanol; H<sub>2</sub>O: água. As letras A, B e C se referem às partições de *B. forficata*, enquanto que D, E e F, se referem às partições de *S. cumini*. Todas as partições foram diluídas em ETOH na concentração de 5 mg/mL. O conteúdo total de polifenóis é dado como “mg de ácido gálico por g de amostra (mg GAE/g)”, o conteúdo total de taninos condensados é dado como “mg de catequina por g de amostra (mg CE/g)” e o conteúdo total de flavonoides é dado como “mg de quercetina por g de amostra (mg QE/g)”. Letras iguais indicam diferença não significativa ( $p < 0.05$ ).



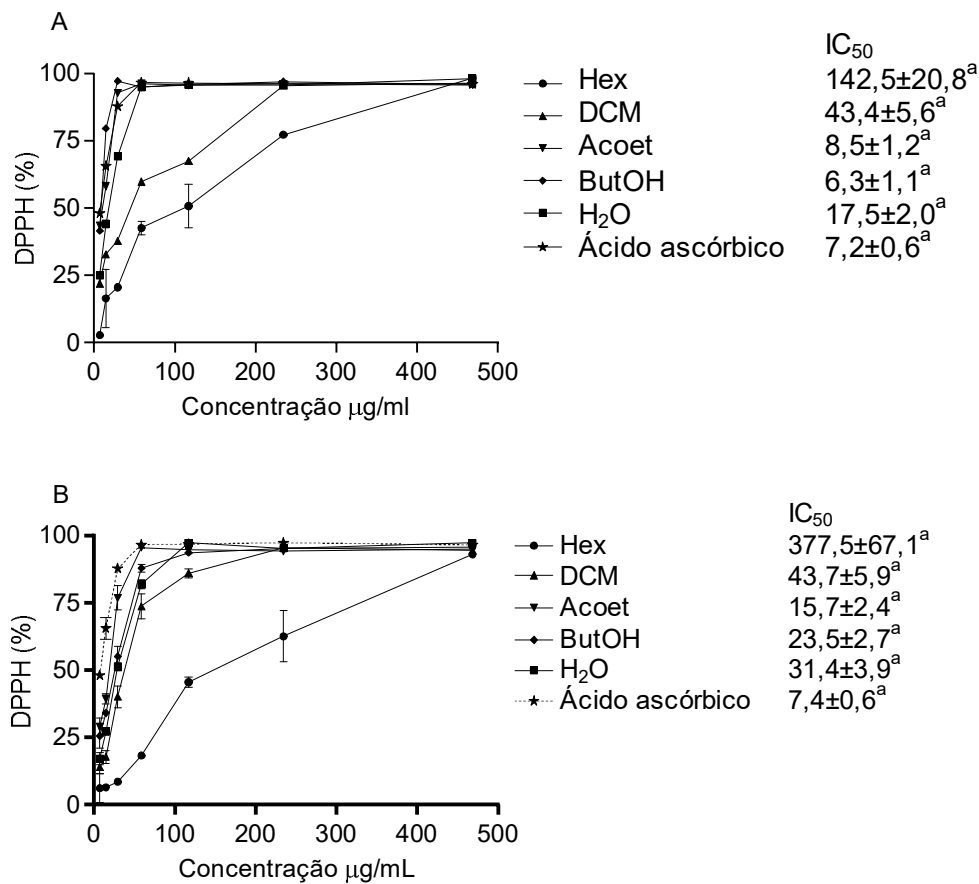
**Figura 7:** Análise da capacidade anti-glicação e capacidade antioxidante dos extratos hexânico (Hex) e etanol (ETOH) de plantas medicinais pelos métodos DPPH, ORAC, FRAP e BSA / frutose. Todos os extratos e controles positivos foram diluídos em ETOH para análises de antioxidantes e em DMSO para ensaio de anti-glicação na concentração de 1 mg / mL (DPPH e FRAP), 100 µg / mL (ORAC) e 5 mg / mL (anti-glicação ). Os valores são expressos como percentagem das capacidades antioxidante e anti-glicação (ensaios com DPPH e anti-glicação, respectivamente) e equivalentes de µmol trolox / g (ORAC e FRAP). Nota: Valores expressos como média ± erro padrão. \* Diferença não significativa quando comparada ao controle (Ácido ascórbico ou quercetina) ( $p < 0.05$ ).



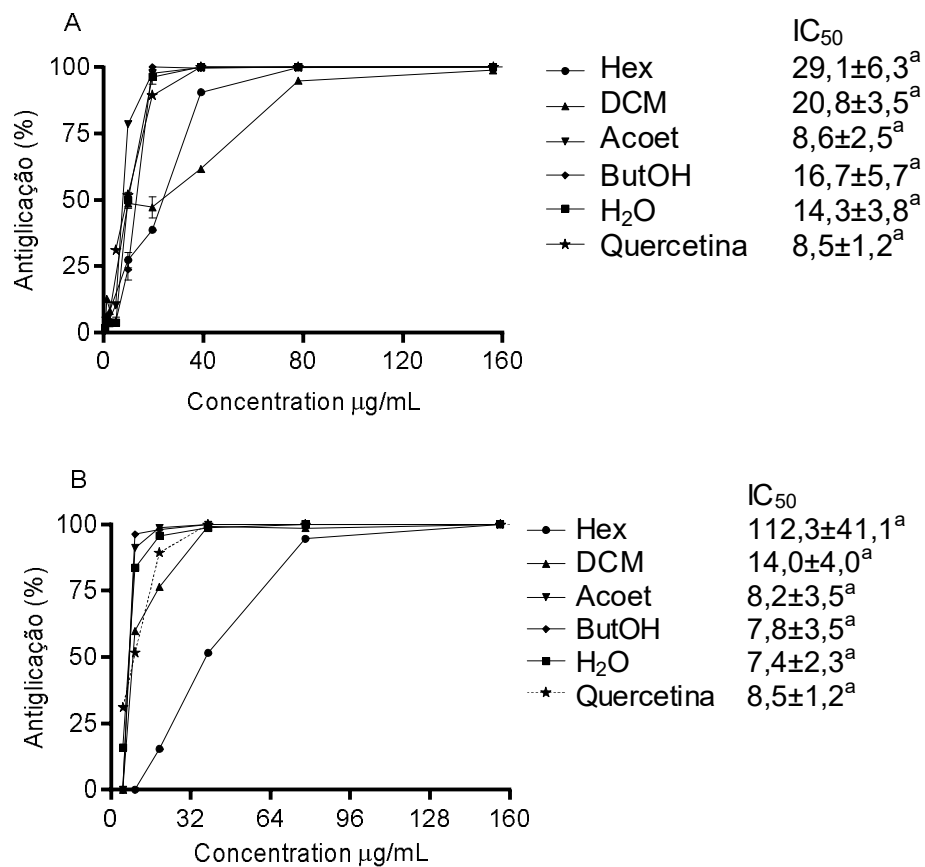
**Figura 8:** Metade da concentração inibitória máxima (IC<sub>50</sub>) dos extratos com capacidade antioxidante pelo ensaio de DPPH e capacidade antiglicante pelo ensaio de BSA/Frutose. Nota: (A) valores de DPPH dos extratos de hexano (Hex) e etanol (EtOH). (B) valores de DPPH IC<sub>50</sub> apenas para o extrato de etanol (EtOH). (C) Valores de antiglicação dos extratos de hexano (Hex) e etanol (EtOH). Todos os extratos e controles positivos foram diluídos em EtOH para análises de antioxidantes e em DMSO para ensaio de anti-glicação na concentração de 1 mg / mL (DPPH e FRAP), 100 µg / mL (ORAC) e 5 mg / mL (antiglicação). Os valores são expressos como percentagem da capacidade antiglicante e DPPH, mas como equivalentes de µmol de trolox / g de amostra para ORAC e FRAP. Valores expressos como média ± erro padrão. \* Diferença não significativa quando comparada ao controle (Ácido ascórbico ou quercetina) ( $p < 0.05$ ).



**Figura 9:** Avaliação da capacidade antioxidante pelos métodos ORAC e FRAP dos extratos que obtiveram os melhores resultados nos ensaios testados. Nota: Hex: hexano; DCM: diclorometano; Acoet: acetato de etila; ButOH: n-butanol; H<sub>2</sub>O: água. As letras A e C se referem às partições de *B. forficata*, enquanto que as letras B e D se referem às partições de *S. cumini*. Todas as partições foram diluídas em ETOH nas concentrações de 1 mg/mL para o ensaio FRAP e 100 μg/mL para o ensaio ORAC. Os valores são expressos como equivalentes de μmol de trolox / g de amostra. Nota: Valores expressos como média ± erro padrão. Letras diferentes indicam diferença não significativa quando comparada ao controle (Ácido ascórbico ou quercetina) ( $p < 0.05$ ).



**Figura 10:** Avaliação da capacidade antioxidante pelo método DPPH dos extratos que obtiveram os melhores resultados nos ensaios testados. Nota: Hex: hexano; DCM: diclorometano; Acoet: acetato de etila; ButOH: n-butanol; H<sub>2</sub>O: água. A letra A se refere às partições de *B. forficata*, enquanto que a letras B se refere às partições de *S. cumini*. Todas as partições foram diluídas em ETOH na concentração de 1 mg/mL para o ensaio DPPH. Os valores são expressos como porcentagem de atividade antioxidante. Valores expressos como média ± erro padrão. Letras diferentes indicam diferença não significativa quando comparada ao controle (Ácido ascórbico) ( $p < 0.05$ ).

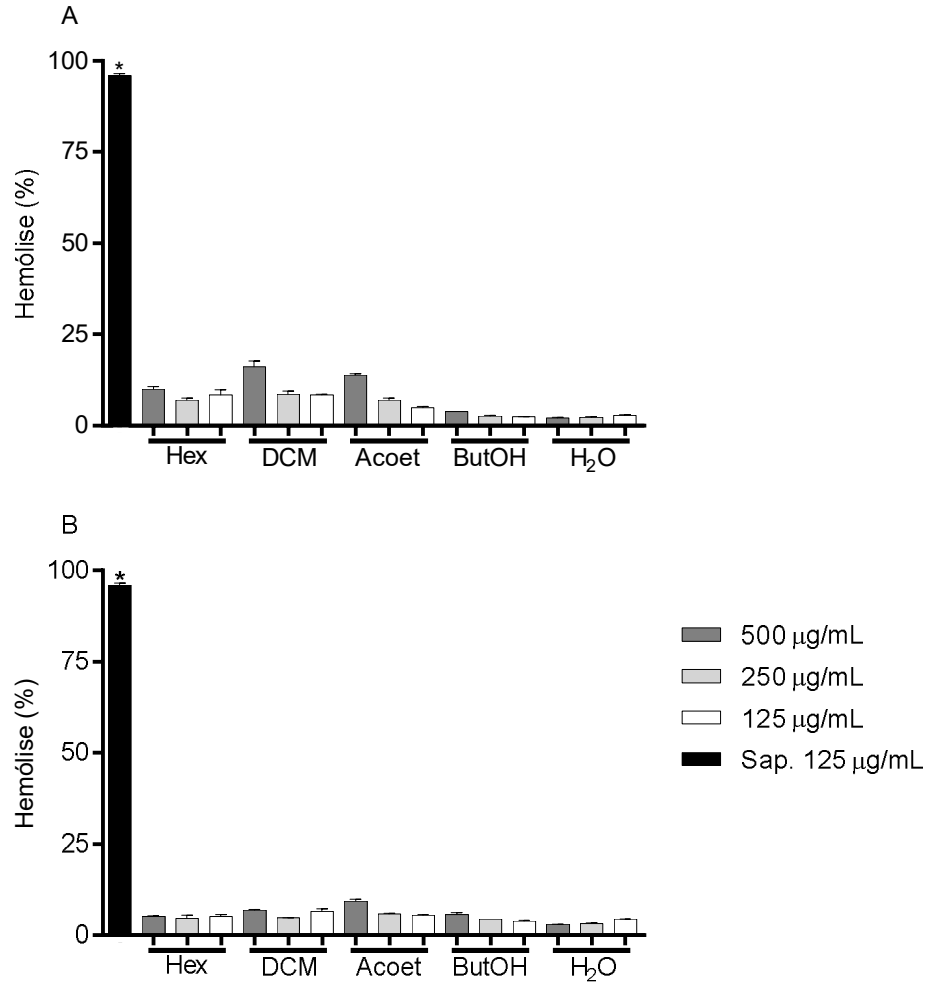


**Figura 11:** Avaliação da capacidade antiglicante pelo método BSA/Frutose dos extratos que obtiveram os melhores resultados nos ensaios testados. Nota: Hex: hexano; DCM: diclorometano; Acoet: acetato de etila; ButOH: n-butanol; H<sub>2</sub>O: água. A letra A se refere às partições de *B. forficata*, enquanto que a letra B se refere às partições de *S. cumini*. Todas as partições foram diluídas em DPPH na concentração de 5 mg/mL. Os valores são expressos como porcentagem de inibição da glicação proteica. Valores expressos como média ± erro padrão. Letras diferentes indicam diferença não significativa quando comparada ao controle (quercetina) ( $p < 0.05$ ).

**Tabela 2:** Atividade hemolítica dos extratos de plantas medicinais usadas como tratamento complementar ao DMT2 em Uberlândia, Minas Gerais, Brasil

Extratos		Hemolise (%)					
		Concentrações (µg/mL)					
		15,62	31,25	62,5	125	250	500
<i>A. muricata</i>	Hex	0,9±0,3	0,9±0,3	2,2±0,5	10,8±0,9	11,5±1,2	23,7±0,2
	ETO	0,1±0	0,6±0,1	0,8±0,1	2,2±0,6	4,5±2,5	9,9±1,6
	H						
<i>A. muricata</i>	Hex	0,4±0	0,9±0,1	1,5±0,3	2,6±0,1	6,9±0,2	7,6±0,3
	ETO	0,4±0,2	0,6±0	0,8±0,2	2,5±0,6	5,7±0,4	7,6±0,6
	H						
<i>B. forficata</i>	Hex	0,5±0,1	0,9±0,2	1,1±0,1	2,6±0,4	4,7±0,1	16,2±4,4
	ETO	0±0	0,1±0	0,9±0,2	0,3±0,3	1,6±0	4,4±0
	H						
<i>C. sinensis</i>	Hex	0,9±0,3	1,2±0,1	2,8±0,4	4,0±0,6	6,5±0,1	18,7±1,8
	ETO	0,4±0,1	0,5±0,3	0,6±0	2,1±0,2	4,5±0,1	5,2±0,7
	H						
<i>E. grandiflorus</i>	Hex	0,4±0,1	0,8±0,2	1,2±0,2	2,9±0,1	7,2±0,6	19,4±3,6
	ETO	0,3±0,1	0,7±0,2	2,2±0,2	3,6±0,3	6,6±0,2	35,2±3,8
	H						
<i>M. charantia</i>	Hex	0,5±0,2	1,3±0,7	1,3±0,2	2,6±0,4	6,8±0,4	8,3±0,4
	ETO	0,7±0,2	0,8±0,1	0,8±0	1,5±0	14,4±10,9	33,5±4,7
	H						
<i>M. recutita</i>	Hex	1,7±0,1	2,0±0	1,5±0,1	2,0±0,4	2,5±0	23,6±0,8
	ETO	1,9±0,3	1,5±0,1	1,8±0,2	3,3±0,7	8,1±0,5	13,4±0,1
	H						
<i>R. officinalis</i>	Hex	0,4±0,2	1,2±0,1	1,1±0,2	1,7±0,2	2,9±0	8,0±1,2
	ETO	1,4±0,0	0,7±0,5	1,18±0,3	1,5±0	1,4±0,4	4,7±0,2
	H						
<i>S. cumini</i>	Hex	0,4±0	0,9±0,3	2,1±0,2	2,8±0,5	4,2±0,1	13,6±2,1
	ETO	0	0	0,5±0,4	1,7±0	4,0±0	3,9±0,2
	H						
<i>Z. officinale</i>	Hex	2,4±0,3	3,4±0,4	16,5±0,9	17,5±0,9	23,2±3,8	46,8±6,8
	ETO	0,7±0,4	0,8±0	0,9±0,2	1,7±0,7	8,4±0,3	13,5±8,3
	H						
Saponina	-	89,2±0*	92,4±2*	93,3±0*	96,1±0,5*	100±0*	100±0*

Nota: Hex: hexano; ETOH: etanol. Todas as partições foram diluídas em etanol na concentração de 500, 250, 125, 62,5, 31,25, e 15,62 µg/mL. Os valores são expressos como porcentagem de hemólise. Gráficos expressos como média ± erro padrão. \* Diferença não significativa quando comparada ao controle (saponina) ( $p < 0.05$ ).



**Figura 12:** Avaliação da capacidade hemolítica dos extratos que obtiveram os melhores resultados nos ensaios testados. Nota: Hex: hexano; DCM: diclorometano; Acoet: acetato de etila; ButOH: n-butanol; H<sub>2</sub>O: água e Sap: saponina. A letra A se refere às partições de *B. forficata*, enquanto que a letra B se refere às partições de *S. cumini*. Todas as partições foram diluídas em etanol nas concentrações de 500, 250 e 125 µg/mL. Os valores são expressos como porcentagem de hemólise. Gráficos expressos como média ± erro padrão. \* Diferença não significativa quando comparada ao controle (saponina) ( $p < 0.05$ ).



**Tabela 3:** Compostos identificados na partição de acetato de etila (Acoet) presentes no extrato etanólico bruto de *B. forficata* por HPLC-ESI-MS/MS (modo negativo)

Compostos identificados	Tempo de retenção (min)	Formula [M-H] <sup>-</sup>	Massa molecular exata	Massa calculada para [M-H] <sup>-</sup>	m/z de [M-H] <sup>-</sup>	Error (ppm)	m/z para os fragments de [M-H] <sup>-</sup>	Referências
Ácido quínico	0,977	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub> <sup>-</sup>	192,06	191,0172	191,0177	2,61	171, 154, 136, 126, 106	(GOUVEIA; CASTILHO, 2010)
Ácido protocatecuico 3-hexosídeo	2,135	C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> O <sub>9</sub> <sup>-</sup>	316,08	315,1076	315,1072	1,26	307, 267, 209, 169, 183	(CHEN; INBARAJ; CHEN, 2011)
Ácido protocatecuico	2,034	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub> <sup>-</sup>	154,03	153,0175	153,0178	1,96	124, 109, 148, 116, 120, 105	(VALLVERDÚ-QUERALT et al., 2010)
(Epi)catequina hexosídeo	5,823	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>11</sub>	452,13	451,1225	451,1227	0,44	374, 325, 245, 221, 167	(DEL BUBBA et al., 2012)
Apigenina	5,404	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub> <sup>-</sup>	270,05	269,0661	269,0655	2,22	219, 203, 191, 172, 149	(FALCÃO et al., 2010)
Kaempferol 3-O-(4-O-p-coumaroil) - glicosídeo	1,413	C <sub>30</sub> H <sub>25</sub> O <sub>13</sub> <sup>-</sup>	594,14	593,1307	593,1300	1,18	447, 279, 257, 232, 182	(IBRAHIM et al., 2015)
Ácido p-coumarico	5,673	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub> <sup>-</sup>	164,05	163,0387	163,0389	1,22	119, 150	(DEL BUBBA et al., 2012)
Procianidina C1	6,343	C <sub>45</sub> H <sub>37</sub> O <sub>18</sub> <sup>-</sup>	866,21	865,1984	865,1974	1,15	721, 695, 407, 289, 217	(JUSTINO et al., 2018)
Ácido gálico	0,927	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>5</sub> <sup>-</sup>	170,02	169,0131	169,0140	5,32	167, 153, 130, 125, 108	(DEL BUBBA et al., 2012)
Miricetina-3-O-(2-O-galoil) glicosídeo	6,025	C <sub>28</sub> H <sub>23</sub> O <sub>17</sub> <sup>-</sup>	632,10	631,0933	631,0939	0,95	559, 479, 416, 316, 253	(NEGRI; TABACH, 2013)
Procianidina B2	6,176	C <sub>30</sub> H <sub>25</sub> O <sub>12</sub> <sup>-</sup>	578,14	577,1342	577,1340	0,34	519, 400, 245, 222, 125	(ZHANG et al., 2013)
Isorhamnetina-3-O-glicosídeo	7,685	C <sub>22</sub> H <sub>11</sub> O <sub>12</sub> <sup>-</sup>	478,11	477,1063	477,1065	0,41	432, 380, 300, 201, 156	(IBRAHIM et al., 2015)
Galoil-quercetina hexosídeo	6,612	C <sub>28</sub> H <sub>23</sub> O <sub>16</sub> <sup>-</sup>	616,11	615,0999	615,1000	0,16	556, 463, 368, 316, 260	(SILVA, N. A. D. et al., 2014)
Miricetina-3-O-α-arabino piranosídeo	6,562	C <sub>20</sub> H <sub>17</sub> O <sub>12</sub> <sup>-</sup>	450,08	449,0728	449,0729	0,22	316, 271, 212, 151, 107	(SALDANHA; VILEGAS; DOKKEDAL, 2013)
Quercetina-O-hexosídeo	7,316	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub> <sup>-</sup>	464,10	463,0887	463,0888	0,21	364, 316, 271, 243, 151	(YE et al., 2012)

Ácido elágico pentosídeo	7,098	C <sub>19</sub> H <sub>13</sub> O <sub>12</sub> <sup>-</sup>	434,05	433,0774	433,0777	0,69	300, 151	(DEL BUBBA et al., 2012)
Quercetina-3-O-α-L-rhamno-piranosídeo	7,400	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub> <sup>-</sup>	448,10	447,0936	447,0933	0,67	445, 351, 271, 151	(SANTOS; FORTUNATO; SPOTORNO, 2018)
Quercetina	8,205	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>7</sub> <sup>-</sup>	302,04	301,0340	301,0345	0,33	279, 199, 151, 107	(SUN et al., 2007)
Gliricidina	9,680	C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub> <sup>-</sup>	300,06	299,0194	299,0186	2,67	282, 216, 200, 154, 117	(YE et al., 2012)
Liquiritina	7,668	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>9</sub> <sup>-</sup>	418,13	417,0817	417,0818	0,23	355, 255, 186, 108	(SIMIRGIOTIS et al., 2015)
Kaempferol-3-rhamnosídeo	8,087	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>10</sub> <sup>-</sup>	432,10	431,0991	431,0981	2,31	393, 373, 285, 227, 177	(SANTOS et al., 2018)
(+)-Catequina	5,136	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub> <sup>-</sup>	290,08	289,0726	289,0708	6,22	282, 244, 227, 217, 161	(JUSTINO et al., 2018)
Aurantio-obtusina	9,328	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> O <sub>7</sub> <sup>0-</sup>	330,07	329,0674	329,0675	0,30	304, 299, 239, 199, 125	(GOUVEIA; CASTILHO, 2010)
Luteolina-7-O-rutinosídeo	2,620	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>15</sub> <sup>-</sup>	594,16	593,1304	593,1300	0,67	501, 435, 385, 285, 182	(CHEN et al., 2011)
Miricetina-3-O-β-D-galacto piranosídeo	6,478	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>13</sub> <sup>-</sup>	480,09	479,0836	479,0839	0,62	460, 361, 340, 271, 221	(SALDANHA et al., 2013)

Nota: compostos identificados entre 20, 25 e 30 eV.

**Tabela 4:** Compostos identificados na partição de N-butanol (ButOH) presentes no extrato etanólico bruto de *B. forficata* por HPLC-ESI-MS/MS (modo negativo)

Compostos identificados	Tempo de retenção (min)	Formula [M-H] <sup>-</sup>	Massa molecular exata	Mass calculada for [M-H] <sup>-</sup>	m/z of [M-H] <sup>-</sup>	Error (ppm)	m/z para os fragments de [M-H] <sup>-</sup>	Referências
Galoil hexosídeo	1,077	C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> O <sub>10</sub> <sup>-</sup>	332,07	331,0655	331,0653	0,60	271, 227, 181, 169, 125	(SILVA, N. A. D. et al., 2014)
Ácido gálico	1,161	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>5</sub> <sup>-</sup>	170,02	169,0142	169,0143	0,59	147, 139, 113, 106, 125	(DEL BUBBA et al., 2012)
Ácido quínico	1,429	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub> <sup>-</sup>	192,06	191,0500	191,0504	2,09	186, 172, 148, 106	(GOUVEIA; CASTILHO, 2010)
Ácido protocatecuico 3-hexosídeo	1,613	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub> <sup>-</sup>	316,08	315,0667	315,0669	0,63	229, 169, 153, 125, 108	(CHEN et al., 2011)
Kaempferol-7-O-glicosídeo	2,821	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub> <sup>-</sup>	448,10	447,1171	447,1173	0,67	319, 285, 250, 227, 208	(IBRAHIM et al., 2015)
Kaempferol - 3,7 – dirhamnosídeo (kaempferitrina)	4,665	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>14</sub> <sup>-</sup>	578,16	577,1184	577,1188	0,69	554, 534, 489, 431, 243	(SANTOS et al., 2018)
(+)-Catequina	5,185	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub> <sup>-</sup>	290,08	289,0676	289,0689	4,49	270, 248, 205, 179, 153	Min Ye(YE et al., 2012)
(Epi) catequina hexosídeo	5,772	C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> O <sub>11</sub> <sup>-</sup>	452,13	451,2016	451,2010	1,32	289, 241, 201, 143, 107	(DEL BUBBA et al., 2012)
Isorhamnetina-3-O-glicosídeo	6,124	C <sub>22</sub> H <sub>11</sub> O <sub>12</sub> <sup>-</sup>	478,11	477,1031	477,1031	1,25	383, 344, 243, 217, 169	(IBRAHIM et al., 2015)
Quercetina-3-O-rutinosídeo-7-O-rhamnosídeo	6,259	C <sub>33</sub> H <sub>39</sub> O <sub>20</sub> <sup>-</sup>	756,21	755,2021	755,2010	1,45	300, 201, 125	(FERRERES et al., 2012)
Miricetina-3-O-hexosídeo	6,393	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>13</sub> <sup>-</sup>	480,09	479,0821	479,0822	0,20	397, 316, 243, 178, 150	(FERRERES et al., 2012)
Luteolina di-O-glicosídeo	6,443	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>16</sub> <sup>-</sup>	610,14	609,1552	609,1461	1,47	449, 391, 300, 137	(IBRAHIM et al., 2015)
Miricetina-3-O-α-arabinopentosídeo	6,527	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub> <sup>-</sup>	450,08	449,0712	449,0714	0,44	405, 316, 271, 186	(SOBEH et al., 2016)
Isoquercetina	6,661	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub> <sup>-</sup>	464,10	463,0873	463,0875	0,43	316, 271, 151	(IBRAHIM et al., 2015)
Liquiritina	7,918	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>9</sub> <sup>-</sup>	418,13	417,0818	417,0818	0	400, 255, 220, 139	(SIMIRGIOTIS et al., 2015)

Nota: compostos identificados entre 20, 25 e 30 eV.

## 5. Discussão

Neste estudo, avaliamos *in vitro* a capacidade antioxidante e antiglicante e as atividades inibitórias contra as enzimas  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -glicosidase e lipase dos extratos ETOH e Hex de dez plantas medicinais tradicionalmente usadas no tratamento complementar do DMT2. Nossos principais resultados indicam que o extrato ETOH de *B. forficata*, *S. cumini*, *M. recutita* e *E. grandiflorus*, apresentaram mais de 70% de capacidade antioxidante e antiglicante e atividade de inibição enzimática. As folhas de *B. forficata* e *S. cumini* apresentaram capacidade de inibição de  $\alpha$ -amilase, enquanto que *B. forficata*, *M. recutita* e *E. grandiflorus* foram capazes de inibir a atividade da lipase.

Além disso, os resultados mostraram que as partições de *B. forficata* e *S. cumini* apresentaram atividade proeminente nos ensaios avaliados, inclusive como inibidores da enzima  $\alpha$ -glicosidase. Vale salientar que este trabalho foi um dos primeiros a mostrar que as plantas avaliadas possuem baixo ou nenhum potencial citotóxico pelo método de hemólise, viabilizando seu uso. Anteriormente, nosso grupo e outros mostraram que as plantas utilizadas no tratamento complementar do diabetes têm a capacidade de inibir as enzimas  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -glicosidase e lipase, além de apresentarem alta capacidade antioxidante (DE GOUVEIA et al., 2013; DE GOUVEIA et al., 2014; PEREIRA et al., 2017).

A capacidade antioxidante dessas plantas tem o potencial de combater a oxidação de biomoléculas no organismo (MORAES et al., 2015) e a inibição dessas enzimas digestivas está relacionada com o controle da hiperglicemia pós-prandial (TOMA et al., 2014) e diminuição da hiperlipidemia (LUNAGARIYA et al., 2014), que pode reduzir os danos causados pelo estresse oxidativo, glicação de proteínas, como inflamação, aterosclerose e morte cardiovascular (VEIRAIAN, 2005). Com base na literatura, o uso de hexano no processo de extração permite o isolamento de moléculas apolares, como os flavonóides oxigenados e metoxilados, cumarinas, terpenóides e sesquiterpenos lactonas (BHAT, S. V.; NAGASAMPAGI; SIVAKUMAR, 2005; DE MONTE et al., 2014). Por outro lado, o uso do etanol permite o isolamento de substâncias polares e semipolares, como flavonóides, alcalóides, flavonas, polifenóis e taninos (DE MONTE et al., 2014;

TIWARI et al., 2011). Estudos anteriores argumentaram que os polifenóis, incluindo os flavonóides, têm um efeito inibitório maior dessas enzimas, dependendo do número e da posição dos grupos OH<sup>-</sup> (KARAMAC; AMAROWICZ, 1996; TADERA et al., 2006), também desempenhando um importante papel em reações antioxidantes (Pietta, 2000) e antiglicantes (Stefek, 2011).

Os flavonóides são capazes de oxidar os radicais livres, impedindo sua ação prejudicial às biomoléculas celulares, essa função é extremamente importante para as folhas das plantas, pois a exposição aos raios UV durante a fotossíntese gera EROs levando o organismo ao estresse oxidativo (PIETTA, 2000). Além disso, o mecanismo antioxidante é importante para todos os organismos aeróbicos e pode auxiliá-los no combate às espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas durante a transdução de energia na fosforilação oxidativa (PIETTA, 2000).

Anteriormente, um estudo conduzido por FERRERES et al. (2012) mostrou a presença de Kaempferol, miricetina e derivados de quercetina em extrato hidrometanólico de folhas de *B. forficata*, sugerindo a relação entre a concentração de flavonóides deste extrato com suas atividades antioxidante e biológica. Estes compostos estão associados à inibição das atividades de  $\alpha$ -amilase e lipase, bem como à capacidade antioxidante (TAN et al., 2017), o que justifica os resultados obtidos em nosso estudo. Vale ressaltar que este trabalho é o primeiro a demonstrar o papel do extrato ETOH de *B. forficata* e de suas partições no controle da glicação não enzimática e na inibição da enzima lipase.

No presente estudo, o extrato ETOH de *S. cumini* e suas partições também inibiram a  $\alpha$ -amilase, além de possuírem alta capacidade antioxidante e antiglicação. Um estudo anterior mostrou inibição da  $\alpha$ -amilase pancreática humana (PONNUSAMY et al., 2010), e  $\alpha$ -amilase pancreática suína (POONGUNRAN et al., 2017) por ambos os extratos aquoso e acetato de etila de *S. cumini*, respectivamente. Esses achados podem estar relacionados com os compostos presentes nas folhas de *S. cumini*, como os terpenos ursólicos e oleanólicos, que foram descritos como inibidores da atividade da  $\alpha$ -amilase (POONGUNRAN et al., 2017). Além disso, a capacidade do extrato ETOH de *S. cumini* e de suas partições em reduzir a oxidação e a glicação protéica corrobora com estudos anteriores, onde o extrato aquoso de folhas de *S. cumini* apresentou

capacidade antioxidante (RUAN; ZHANG; LIN, 2008) e o extrato metanólico inibiram a glicação proteica (PERERA; PREMADASA, 2016). A alta capacidade antioxidante e antiglicação desses extratos pode estar relacionada à presença de flavonóides, como a quercetina, miricetina, isoquercetina e glicosídeos flavonóis (RAMYA; NEETHIRAJAN; JAYAKUMARARAJ, 2012).

Com relação ao *E. grandiflorus*, nossos resultados mostraram que o extrato de ETOH inibiu a atividade da lipase e apresentou alta capacidade antioxidante e anti-glicação. Estudos anteriores indicaram propriedades para inibir a atividade da lipase pelo extrato metanólico de folhas de *E. grandiflorus* (SOUZA et al., 2012). Recentemente, flavonóides como isoorientina, isovitexina, swertiajaponina, swertisina e ácidos fenólicos chicóricos, cafeicos e ferúlicos, foram descritos em folhas de *E. grandiflorus* (GARCIA EDE et al., 2010; MARQUES et al., 2017). Está bem documentado que os compostos isoorientina (LUNAGARIYA et al., 2014) e isovitexina (SREERAMA et al., 2012) inibem a atividade da lipase, o que justifica a atividade inibitória da lipase pancreática do extrato de *E. grandiflorus* ETOH. Além disso, nossos resultados corroboram outro estudo que mostrou que o chá de *E. grandiflorus* possui capacidade antioxidante (LUNARDI et al., 2014).

Destacamos também o extrato de ETOH de flores de *M. recutita*, que também inibiu a enzima lipase e apresentou alta capacidade antioxidante e anti-glicação. Um estudo mostrou que o extrato ETOH de *M. recutita* possui capacidade antioxidante (PEREIRA et al., 2009), e que seu chá tem propriedades antiglicantes (OTAKE et al., 2015). Da mesma forma, o extrato de ETOH de flores de *M. recutita* possui flavonóides como quercetina, luteolina, patuletina, apigenina e ácidos ferúlico e cafeico (SRIVASTAVA; SHANKAR; GUPTA, 2010). Entre esses flavonóides, o bisabolol e o farneseno têm capacidade inibitória contra a atividade da lipase (SRIVASTAVA et al., 2010).

Também mostramos que os extratos ETOH de folhas de *R. officinalis*, *A. muricata* e rizoma de *Z. officinale* apresentam alta capacidade antioxidante e anti-glicação. Além disso, o extrato ETOH do rizoma *Z. officinale* também foi capaz de inibir a enzima lipase. De acordo com RANI et al. (2012), o extrato acetato de etila do rizoma *Z. officinale* apresenta alta capacidade antioxidante e é capaz de atuar no processo antiglicação. Além disso, o trabalho de GHOLAMHOSEINIAN; SHAHOZEHI; SHARIFI-FAR (2010) indica que o extrato

metanólico deste rizoma atua como um inibidor da lipase pancreática suína. Outros trabalhos também apontaram os extratos hidroalcoólicos das folhas de *R. officinalis* (KIM; KIM, 2003), *A. muricata* (LOU et al., 2010) e *A. muricata* (GAVAMUKULYA et al., 2014) como antioxidantes. No entanto, este é o primeiro estudo a mostrar seu papel no processo antiglicação.

## 6. Conclusão

Nossos resultados demonstram que as dez plantas medicinais selecionadas apresentam propriedades antioxidantes e antiglicantes proeminentes e alta capacidade de inibição das enzimas digestivas envolvidas na digestão de carboidratos e lipídios. Os Extratos etanólicos de *B. forficata*, *S. cumini*, *M. recutita* e *E. grandiflorus* apresentaram as maiores capacidades antioxidante e antiglicação e atividades inibitórias contra  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -glucosidase e lipase. Mas entre todas as plantas, a espécie *B. forficata* apresentou os melhores resultados, sendo que a eficiência de sua atividade biológica pôde ser observada pelos baixos valores de IC<sub>50</sub> e pelas moléculas encontradas nas partições Acoet e ButOH. Este estudo apresentou novos resultados sobre as atividades biológicas dessas plantas medicinais, principalmente em relação à alta capacidade antioxidante dos extratos de ETOH e das partições de *B. forficata* e *S. cumini*, contribuindo para o entendimento da ação e da eficácia de seu uso no manejo do diabetes mellitus e suas complicações. Assim, esses resultados agregam valor ao conhecimento tradicional e abrem novas possibilidades para ensaios *in vivo*, a fim de avaliar o amplo potencial antidiabético dessas plantas.

## 7. REFERÊNCIAS

AL-SEREITI, M.; ABU-AMER, K.; SENA, P. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. 1999.

ALI, B. H. et al. Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): a review of recent research. **Food and chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 409-420, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.085>

ALMEIDA, F. D. C. A. D. et al. Idosos diabéticos: fatores clínicos predisponentes para amputação de membros inferiores. **Nursing (São Paulo)**, v. 21, n. 238, p. 2075-2079, 2018.

ALONSO-CASTRO, A. J. et al. Isoorientin reverts TNF- $\alpha$ -induced insulin resistance in adipocytes activating the insulin signaling pathway. **Endocrinology**, v. 153, n. 11, p. 5222-5230, 2012. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1290>

ASMAT, U.; ABAD, K.; ISMAIL, K. Diabetes mellitus and oxidative stress—a concise review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, n. 5, p. 547-553, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2015.03.013>

AYYANAR, M.; SUBASH-BABU, P. Syzygium cumini (L.) Skeels: A review of its phytochemical constituents and traditional uses. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 2, n. 3, p. 240-246, 2012. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60050-1](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60050-1)

BAHMANI, M. et al. Ethnobotanical study of medicinal plants used in the management of diabetes mellitus in the Urmia, Northwest Iran. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 7, p. S348-S354, 2014. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60257-1](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60257-1)

BAKIREL, T. et al. In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits. **Journal of ethnopharmacology**, v. 116, n. 1, p. 64-73, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.10.039>

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils—a review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>

BARBOSA, J. H. P.; OLIVEIRA, S. L. D.; SEARA, L. T. E. Produtos da glicação avançada dietéticos e as complicações crônicas do diabetes. **Revista de Nutrição**, v. 22, p. 113-124, 2009. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732009000100011>

BASCH, E.; GABARDI, S.; ULBRICHT, C. Bitter melon (*Momordica charantia*): a review of efficacy and safety. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 60, n. 4, p. 356-359, 2003.

BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>



BEVILAQUA, G. A. P. et al. Distribuição geográfica e composição química de chapéu de couro (*Echinodorus* spp.) no Rio Grande do Sul. **Ciência rural. Santa Maria. Vol. 31, n. 2 (mar./abr. 2001), p. 213-218**, 2001.

BHANDARI, U.; PILLAI, K. Effect of ethanolic extract of *Zingiber officinale* on dyslipidaemia in diabetic rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 227-230, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.11.011>

BHAT, A. H. et al. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 74, p. 101-110, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.07.025>

BHAT, S. V.; NAGASAMPAGI, B. A.; SIVAKUMAR, M. **Chemistry of natural products**. Alpha Science Int'l Ltd., 2005.

BLAIR, M. Diabetes mellitus review. **Urologic nursing**, v. 36, n. 1, p. 27, 2016.

BOLSON, M. et al. Ethno-medicinal study of plants used for treatment of human ailments, with residents of the surrounding region of forest fragments of Paraná, Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 161, p. 1-10, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.11.045>

BRENNER, S. R. There may be a brain origin for advanced glycation end products, causing accelerated cognitive aging. 2018.

BUCHHOLZ, T.; MELZIG, M. F. Polyphenolic compounds as pancreatic lipase inhibitors. **Planta medica**, v. 81, n. 10, p. 771-783, 2015. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1546173>

CAREY, M. C.; SMALL, D. M.; BLISS, C. M. Lipid digestion and absorption. **Annual Review of Physiology**, v. 45, n. 1, p. 651-677, 1983. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.45.030183.003251>

CARRIERE, F. et al. Secretion and contribution to lipolysis of gastric and pancreatic lipases during a test meal in humans. **Gastroenterology**, v. 105, n. 3, p. 876-888, 1993. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(93\)90908-U](https://doi.org/10.1016/0016-5085(93)90908-U)

CARVALHO, A. C.; DINIZ, M.; MUKHERJEE, R. Estudos da atividade antidiabética de algumas plantas de uso popular contra o diabetes no Brasil. **Rev Bras Farm**, v. 86, n. 1, p. 11-16, 2005.

CASPARD, H. et al. Recent trends in the prevalence of type 2 diabetes and the association with abdominal obesity lead to growing health disparities in the USA: an analysis of the NHANES surveys from 1999 to 2014. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 20, n. 3, p. 667-671, 2018. <https://doi.org/10.1111/dom.13143>

CEMEK, M. et al. Antihyperglycemic and antioxidative potential of *Matricaria chamomilla* L. in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of natural medicines**, v. 62, n. 3, p. 284-293, 2008. <https://doi.org/10.1007/s11418-008-0228-1>

CHAN, Y.-S. et al. A review of the pharmacological effects of *Arctium lappa* (burdock). **Inflammopharmacology**, v. 19, n. 5, p. 245-254, 2011. <https://doi.org/10.1007/s10787-010-0062-4>

CHEN, H.-J.; INBARAJ, B. S.; CHEN, B.-H. Determination of phenolic acids and flavonoids in *Taraxacum formosanum* Kitam by liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with a post-column derivatization technique. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 1, p. 260-285, 2011. <https://doi.org/10.3390/ijms13010260>

CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial. **Brasília: Ministério do Meio Ambiente**, 2011.

CZECH, M. P. Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. **Nature medicine**, v. 23, n. 7, p. 804, 2017. <https://doi.org/10.1038/nm.4350>

DA SILVA SANTOS, T. V. et al. Bioelectrode for detection of human salivary amylase. **Materials Science and Engineering: C**, v. 32, n. 3, p. 530-535, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2011.12.005>

DAILY, J. W. et al. Efficacy of ginger for treating Type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. **Journal of Ethnic Foods**, v. 2, n. 1, p. 36-43, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jef.2015.02.007>

DALGAARD, L.; PEDERSEN, O. Uncoupling proteins: functional characteristics and role in the pathogenesis of obesity and Type II diabetes. **Diabetologia**, v. 44, n. 8, p. 946-965, 2001. <https://doi.org/10.1007/s001250100596>

DAMASCENO, A. A. **Levantamento Etnobotânico na Comunidade Martinésia, Uberlândia – MG**. 2007. 26 Monografia (Bacharelado do Curso de Ciências

Biológicas), Monografia (Bacharelado do Curso de Ciências Biológicas) - Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia

DAMASCENO, D. et al. Effect of Bauhinia forficata extract in diabetic pregnant rats: maternal repercussions. **Phytomedicine**, v. 11, n. 2-3, p. 196-201, 2004. <https://doi.org/10.1078/0944-7113-00348>

DE GOUVEIA, N. M. et al. Pouteria ramiflora extract inhibits salivary amylolytic activity and decreases glycemic level in mice. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 3, p. 1141-1148, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652013000300016>

DE GOUVEIA, N. M. et al. An in vitro and in vivo study of the  $\alpha$ -amylase activity of phaseolamin. **Journal of medicinal food**, v. 17, n. 8, p. 915-920, 2014. <https://doi.org/10.1089/jmf.2013.0044>

DE MONTE, C. et al. Modern extraction techniques and their impact on the pharmacological profile of Serenoa repens extracts for the treatment of lower urinary tract symptoms. **BMC urology**, v. 14, n. 1, p. 63, 2014. <https://doi.org/10.1186/1471-2490-14-63>

DE OLIVEIRA, P. C.; LAMEIRA, H. L. N. Physiological behavior of Annona muricata, Dipteryx odorata and Copaifera langsdorffii in response to water and light stress. **Journal of Medicinal Plants**, v. 5, n. 1, p. 193-199, 2017.

DEL BUBBA, M. et al. Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of polyphenolic composition of four cultivars of Fragaria vesca L. berries and their comparative evaluation. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 47, n. 9, p. 1207-1220, 2012. <https://doi.org/10.1002/jms.3030>

DINIZ VILELA, D. et al. The role of metformin in controlling oxidative stress in muscle of diabetic rats. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, 2016. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/6978625>

DUBOWSKY, S. D. et al. Diabetes, obesity, and hypertension may enhance associations between air pollution and markers of systemic inflammation. **Environmental health perspectives**, v. 114, n. 7, p. 992, 2006. <https://doi.org/10.1289/ehp.8469>

ELPO, E. R. S.; NEGRELLE, R. R. B. Zingiber officinale Roscoe: aspectos botânicos e ecológicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, 2004.

ENGLYST, K. N.; ENGLYST, H. N. Carbohydrate bioavailability. **British Journal of Nutrition**, v. 94, n. 1, p. 1-11, 2005. <https://doi.org/10.1079/BJN20051457>

ESPER, A. M.; MOSS, M.; MARTIN, G. S. The effect of diabetes mellitus on organ dysfunction with sepsis: an epidemiological study. **Critical Care**, v. 13, n. 1, p. R18, 2009. <https://doi.org/10.1186/cc7717>

EVANS, B. C. et al. Ex vivo red blood cell hemolysis assay for the evaluation of pH-responsive endosomolytic agents for cytosolic delivery of biomacromolecular drugs. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 73, 2013.

FALCÃO, S. I. et al. Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: usual and unusual compounds. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 396, n. 2, p. 887-897, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3232-8>

FERRERES, F. et al. Bauhinia forficata Link authenticity using flavonoids profile: Relation with their biological properties. **Food chemistry**, v. 134, n. 2, p. 894-904, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.201>

FLORENCE, N. T. et al. Antidiabetic and antioxidant effects of Annona muricata (Annonaceae), aqueous extract on streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 151, n. 2, p. 784-790, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.09.021>

FRANCO, R. R. et al. Antioxidant and anti-glycation capacities of some medicinal plants and their potential inhibitory against digestive enzymes related to type 2 diabetes mellitus. **JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY**, v. 215, n. 1, p. 140-146, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.12.032>

FRIEDMAN, H. I.; NYLUND, B. Intestinal fat digestion, absorption, and transport. A review. **American Journal of Clinical Nutrition (USA)**, 1980.

FUANGCHAN, A. et al. Hypoglycemic effect of bitter melon compared with metformin in newly diagnosed type 2 diabetes patients. **Journal of ethnopharmacology**, v. 134, n. 2, p. 422-428, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.12.045>

GARCIA EDE, F. et al. Antiedematogenic activity and phytochemical composition of preparations from Echinodorus grandiflorus leaves. **Phytomedicine**, v. 18, n. 1, p. 80-6, Dec 15 2010. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2010.05.008>

GAVAMUKULYA, Y. et al. Phytochemical screening, anti-oxidant activity and in vitro anticancer potential of ethanolic and water leaves extracts of *Annona muricata* (Graviola). **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 7, p. S355-S363, 2014. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60258-3](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60258-3)

GHOLAMHOSEINIAN, A.; SHAHOUEHI, B.; SHARIFI-FAR, F. Inhibitory effect of some plant extracts on pancreatic lipase. **IJP-International Journal of Pharmacology**, v. 6, n. 1, p. 18-24, 2010. <https://doi.org/10.3923/ijp.2010.18.24>

GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circulation research**, v. 107, n. 9, p. 1058-1070, 2010. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.223545>

GOH, S.-Y.; COOPER, M. E. The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 93, n. 4, p. 1143-1152, 2008. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-1817>

GOUVEIA, S. C.; CASTILHO, P. C. Characterization of phenolic compounds in *Helichrysum melaleucum* by high-performance liquid chromatography with on-line ultraviolet and mass spectrometry detection. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 24, n. 13, p. 1851-1868, 2010. <https://doi.org/10.1002/rcm.4585>

GRASES, F. et al. Urolithiasis and phytotherapy. **International Urology and Nephrology**, v. 26, n. 5, p. 507-511, 1994. <https://doi.org/10.1007/BF02767650>

GROSS, J. L. et al. Diabetes melito: diagnóstico, classificação e avaliação do controle glicêmico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 1, p. 16-26, 2002. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302002000100004>

GULATI, V.; HARDING, I. H.; PALOMBO, E. A. Enzyme inhibitory and antioxidant activities of traditional medicinal plants: potential application in the management of hyperglycemia. **Bmc complementary and alternative medicine**, v. 12, n. 1, p. 77, 2012. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-77>

GUPTA, V. et al. Pharmacological potential of *Matricaria recutita*-A review. **Int J Pharm Sci Drug Res**, v. 2, n. 1, p. 12-6, 2010.

HABTEMARIAM, S. The therapeutic potential of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) diterpenes for Alzheimer's disease. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2005.02.004>

HADARI, F. et al. Green tea (*Camellia sinensis*) supplementation to diabetic rats improves serum and hepatic oxidative stress markers. **Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR**, v. 12, n. 1, p. 109, 2013.

HALBERSTEIN, R. A. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. **Annals of epidemiology**, v. 15, n. 9, p. 686-699, 2005.

IBRAHIM, R. M. et al. HPLC-DAD-MS/MS profiling of phenolics from *Securigera securidaca* flowers and its anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 2, p. 134-141, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.02.008>

JABRI, M.-A. et al. Chamomile (*Matricaria recutita* L.) decoction extract inhibits in vitro intestinal glucose absorption and attenuates high fat diet-induced lipotoxicity and oxidative stress. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 87, p. 153-159, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.043>

JANGHORBANI, M. et al. Systematic review of type 1 and type 2 diabetes mellitus and risk of fracture. **American journal of epidemiology**, v. 166, n. 5, p. 495-505, 2007. <https://doi.org/10.1093/aje/kwm106>

JORGE, A. P. et al. Insulinomimetic effects of kaempferitrin on glycaemia and on 14 C-glucose uptake in rat soleus muscle. **Chemico-biological interactions**, v. 149, n. 2, p. 89-96, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2004.07.001>

JUNG, U. J.; CHOI, M.-S. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 4, p. 6184-6223, 2014. <https://doi.org/10.3390/ijms15046184>

JUSTINO, A. B. et al. *Annona muricata* Linn. leaf as a source of antioxidant compounds with in vitro antidiabetic and inhibitory potential against  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, lipase, non-enzymatic glycation and lipid peroxidation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 100, p. 83-92, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.01.172>

KARAMAC, M.; AMAROWICZ, R. Inhibition of pancreatic lipase by phenolic acids-examination in vitro. **Z Naturforsch C**, v. 51, n. 11-12, p. 903-5, Nov-Dec 1996. <https://doi.org/10.1515/znc-1996-11-1222>

KARDOŠOVÁ, A.; MACHOVA, E. Antioxidant activity of medicinal plant polysaccharides. **Fitoterapia**, v. 77, n. 5, p. 367-373, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.05.001>

KERNER, W.; BRÜCKEL, J. Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 122, n. 07, p. 384-386, 2014. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1366278>

KIM, H. Y.; KIM, K. Protein glycation inhibitory and antioxidative activities of some plant extracts in vitro. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 6, p. 1586-1591, 2003. <https://doi.org/10.1021/jf020850t>

KUKSIS, A. **Fat Absorption**. CRC Press, 2018. ISBN 1351088890.

LENZI, M.; ORTH, A. I.; GUERRA, T. M. Pollination ecology of *Momordica charantia* L.(Cucurbitaceae) in Florianópolis, SC, Brazil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 28, n. 3, p. 505-513, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042005000300008>

LEWIS, J. B. et al. Inhibition of the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) protects from secondhand smoke (SHS)-induced intrauterine growth restriction IUGR in mice. **Cell and tissue research**, v. 370, n. 3, p. 513-521, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2691-z>

LIMA, C. M. et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia Plena**, v. 10, n. 3, 2014.

LIU, Z.-Q. Chemical methods to evaluate antioxidant ability. **Chemical reviews**, v. 110, n. 10, p. 5675-5691, 2010. <https://doi.org/10.1021/cr900302x>

LOJUDICE, F. H.; SOGAYAR, M. C. Stem cells in the treatment and cure of diabetes mellitus. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, n. 1, p. 19-21, 2008. <https://doi.org/10.1590/S1413-81232008000100005>

LORENZI, H.; MATOS, F. J. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2002. ISBN 8586714186.

LOU, Z. et al. Antioxidant activity and chemical composition of the fractions from burdock leaves. **Journal of food science**, v. 75, n. 5, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01616.x>



LUCKNER, M. **Secondary metabolism in microorganisms, plants and animals**. Springer Science & Business Media, 2013. ISBN 3662023849.

LUEVANO-CONTRERAS, C.; CHAPMAN-NOVAKOFSKY, K. Dietary advanced glycation end products and lipid profile in diabetes mellitus subjects with or without complications. **The FASEB Journal**, v. 31, n. 1 Supplement, p. 966.39-966.39, 2017.

LUNAGARIYA, N. A. et al. Inhibitors of pancreatic lipase: state of the art and clinical perspectives. **Excli j**, v. 13, p. 897-921, 2014.

LUNARDI, R. F. et al. In vitro antioxidant capacity of tea of *Echinodorus grandiflorus*, leather hat, in Wistar rat liver. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, p. 1451-1462, 2014. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201420130507>

LUSA, M. G. Análise morfoanatômica comparativa da folha de *Bauhinia forficata* (Link) e *B. variegata* (Linn).(Leguminosae: Caesalpinioideae). 2013.

MACHADO, H. L. **Levantamento Etnobotânico de Plantas Medicinais e Fitoterápicos utilizados por idosos freqüentadores de um programa de atividades físicas (AFRID) em Uberlândia – MG**. 2008. 88 (Monografia (Bacharelado em Farmácia)). Monografia (Bacharelado em Farmácia), Universidade Presidente Antônio Carlos \_ MG

MAHMOOD, T.; AKHTAR, N.; KHAN, B. A. The morphology, characteristics, and medicinal properties of *Camellia sinensis* tea. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 19, p. 2028-2033, 2010. <https://doi.org/10.5897/JMPR10.010>

MARQUES, A. M. et al. *Echinodorus grandiflorus*: Ethnobotanical, phytochemical and pharmacological overview of a medicinal plant used in Brazil. **Food and Chemical Toxicology**, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.03.026>

MCDUGALL, G. J. et al. Different polyphenolic components of soft fruits inhibit  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 7, p. 2760-2766, 2005. <https://doi.org/10.1021/jf0489926>

MIAO, M. et al. Slowly digestible starch—a review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 55, n. 12, p. 1642-1657, 2015. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.704434>



MITSCHER, L. A. et al. Chemoprotection: a review of the potential therapeutic antioxidant properties of green tea (*Camellia sinensis*) and certain of its constituents. **Medicinal research reviews**, v. 17, n. 4, p. 327-365, 1997. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1128\(199707\)17:4<327::AID-MED2>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1128(199707)17:4<327::AID-MED2>3.0.CO;2-Y)

MOHAMED, A. A.; ALI, S. I.; EL-BAZ, F. K. Antioxidant and antibacterial activities of crude extracts and essential oils of *Syzygium cumini* leaves. **Plos one**, v. 8, n. 4, p. e60269, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060269>

MOLDOGAZIEVA, N. et al. ROS and RNS signalling: adaptive redox switches through oxidative/nitrosative protein modifications. **Free radical research**, p. 1-37, 2018. <https://doi.org/10.1080/10715762.2018.1457217>

MORAES, I. B.; Manzan-Martins, C.; de Gouveia, N. M.; Calábria, L. K.; Hiraki, K. R. N.; Moraes, A. D. S.; Espindola, F. S. Polyploidy analysis and attenuation of oxidative stress in hepatic tissue of STZ-induced diabetic rats treated with an aqueous extract of *Vochysia rufa*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/316017>

MORAES, I. V. M. D. Extração de compostos bioativos da folha da gravioleira (*Annona muricata* L.) e concentração dos extratos por ultra e nanofiltração= Extraction of bioactive compounds from *Annona muricata* L. leaves and concentration of the extracts by ultra and nanofiltration. 2016.

NEGRI, G.; TABACH, R. Saponins, tannins and flavonols found in hydroethanolic extract from *Periandra dulcis* roots. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 6, p. 851-860, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013000600001>

OLIVEIRA, M. R. **Rede Fitocerrado: Identificação de Práticas Populares em Uberlândia – MG com plantas medicinais e atividades de capacitação através de cursos e oficinas**. 2010. 47 Monografia (Bacharelado do Curso de Ciências Biológicas), Monografia (Bacharelado do Curso de Ciências Biológicas) - Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia

OTA, A.; ULRICH, N. P. An Overview of Herbal Products and Secondary Metabolites Used for Management of Type Two Diabetes. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, p. 436, 2017. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00436>

OTAKE, K. et al. Effect of tea (*Camellia sinensis*) and herbs on advanced glycation endproduct formation and the influence of post-fermentation. **Glycative Stress Research**, v. 2, p. 156-162, 2015.

PEREIRA, M. N. et al. Stephalagine, an alkaloid with pancreatic lipase inhibitory activity isolated from the fruit peel of *Annona crassiflora* Mart. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 324-329, 3// 2017. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.12.038>

PEREIRA, R. P. et al. Antioxidant effects of different extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus*. **Neurochemical research**, v. 34, n. 5, p. 973-983, 2009. <https://doi.org/10.1007/s11064-008-9861-z>

PERERA, H.; PREMADASA, W. Heat Stable Inhibitors of Protein Cross-linking from Sri Lankan Medicinal Plants. **British Journal of Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 3, p. 1-11, 2016. <https://doi.org/10.9734/BJPR/2016/21839>

PIETTA, P.-G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of natural products**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000. <https://doi.org/10.1021/np9904509>

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European journal of medicinal chemistry**, v. 97, p. 55-74, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>

PONNUSAMY, S. et al. Evaluation of traditional Indian antidiabetic medicinal plants for human pancreatic amylase inhibitory effect in vitro. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2010. <http://dx.doi.org/10.1155/2011/515647>

POONGUNRAN, J. et al. Bioassay-guided fractionation and identification of  $\alpha$ -amylase inhibitors from *Syzygium cumini* leaves. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 206-211, 2017. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1257031>

PRIOR, R. L. et al. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 11, p. 3273-3279, 2003. <https://doi.org/10.1021/jf0262256>

RABBANI, N.; THORNALLEY, P. J. Advanced glycation end products in the pathogenesis of chronic kidney disease. **Kidney international**, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.11.034>

RAMYA, S.; NEETHIRAJAN, K.; JAYAKUMARARAJ, R. Profile of bioactive compounds in *Syzygium cumini*—a review. **J. Pharm. Res**, v. 5, p. 4548-4553, 2012.

RANI, M. P. et al. Zingiber officinale extract exhibits antidiabetic potential via modulating glucose uptake, protein glycation and inhibiting adipocyte differentiation: an in vitro study. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 9, p. 1948-1955, 2012. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5567>

RESENDE, R. F. **Análise Etnobotânica e resgate da sabedoria popular no uso de plantas medicinais nos municípios de Uberlândia, Araguari e Uberaba, MG.** . 2007. 46 (Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas)). Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia– MG

ROLO, A. P.; PALMEIRA, C. M. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 212, n. 2, p. 167-178, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.01.003>

RUAN, Z. P.; ZHANG, L. L.; LIN, Y. M. Evaluation of the antioxidant activity of Syzygium cumini leaves. **Molecules**, v. 13, n. 10, p. 2545-2556, 2008. <https://doi.org/10.3390/molecules13102545>

SALDANHA, L. L.; VILEGAS, W.; DOKKEDAL, A. L. Characterization of flavonoids and phenolic acids in Myrcia bella cambess. Using FIA-ESI-IT-MSn and HPLC-PAD-ESI-IT-MS combined with NMR. **Molecules**, v. 18, n. 7, p. 8402-8416, 2013. <https://doi.org/10.3390/molecules18078402>

SANTOS, M.; FORTUNATO, R. H.; SPOTORNO, V. G. Analysis of flavonoid glycosides with potential medicinal properties on Bauhinia uruguayensis and Bauhinia forficata subspecies pruinosa. **Natural product research**, p. 1-5, 2018. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1460826>

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D.; PELL, A. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, n. 1-2, p. 21-40, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(01\)00228-0](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(01)00228-0)

SEMENYA, S.; POTGIETER, M.; ERASMUS, L. Ethnobotanical survey of medicinal plants used by Bapedi healers to treat diabetes mellitus in the Limpopo Province, South Africa. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, n. 1, p. 440-445, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.03.008>

SHARANGI, A. Medicinal and therapeutic potentialities of tea (Camellia sinensis L.)—A review. **Food Research International**, v. 42, n. 5-6, p. 529-535, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.01.007>

SHARMA, O. P.; BHAT, T. K. DPPH antioxidant assay revisited. **Food chemistry**, v. 113, n. 4, p. 1202-1205, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.008>

SILVA, F. R. M. B.; SZPOGANICZ, B.; PIZZOLATTI, M. G.; WILLRICH, M. A. V.; DE SOUSA, E. Acute effect of *Bauhinia forficata* on serum glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, n. 1, p. 33-37, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(02\)00193-9](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00193-9)

SILVA, N. A. D. et al. Phenolic compounds and carotenoids from four fruits native from the Brazilian Atlantic forest. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 22, p. 5072-5084, 2014. <https://doi.org/10.1021/jf501211p>

SIMIRGIOTIS, M. J. et al. Antioxidant capacities and analysis of phenolic compounds in three endemic *Nolana* species by HPLC-PDA-ESI-MS. **Molecules**, v. 20, n. 6, p. 11490-11507, 2015. <https://doi.org/10.3390/molecules200611490>

SINGH, R. et al. Advanced glycation end-products: a review. **Diabetologia**, v. 44, n. 2, p. 129-146, 2001. <https://doi.org/10.1007/s001250051591>

SOBEH, M. et al. Identification of phenolic secondary metabolites from *Schotia brachypetala* Sond.(Fabaceae) and demonstration of their antioxidant activities in *Caenorhabditis elegans*. **PeerJ**, v. 4, p. e2404, 2016. <https://doi.org/10.7717/peerj.2404>

SOUZA, S. P. et al. Seleção de extratos brutos de plantas com atividade antiobesidade. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 643-648, 2012. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722012000400011>

SREERAMA, Y. N.; TAKAHASHI, Y.; YAMAKI, K. Phenolic Antioxidants in Some *Vigna* Species of Legumes and their Distinct Inhibitory Effects on  $\alpha$ -Glucosidase and Pancreatic Lipase Activities. **Journal of food science**, v. 77, n. 9, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02848.x>

SRIVASTAVA, J. K.; SHANKAR, E.; GUPTA, S. Chamomile: A herbal medicine of the past with bright future. **Mol Med Report**, v. 3, n. 6, p. 895-901, Nov 1 2010.

STEFEK, M. Natural flavonoids as potential multifunctional agents in prevention of diabetic cataract. **Interdiscip Toxicol**, v. 4, n. 2, p. 69-77, Jun 2011. <https://doi.org/10.2478/v10102-011-0013-y>

SUN, J. et al. Screening non-colored phenolics in red wines using liquid chromatography/ultraviolet and mass spectrometry/mass spectrometry libraries. **Molecules**, v. 12, n. 3, p. 679-693, 2007. <https://doi.org/10.3390/12030679>

TADERA, K. et al. Inhibition of alpha-glucosidase and alpha-amylase by flavonoids. **J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)**, v. 52, n. 2, p. 149-53, Apr 2006. <https://doi.org/10.3177/jnsv.52.149>

TAKAHAMA, U.; HIROTA, S. Effects of starch on nitrous acid-induced oxidation of kaempferol and inhibition of alpha-amylase-catalysed digestion of starch by kaempferol under conditions simulating the stomach and the intestine. **Food Chem**, v. 141, n. 1, p. 313-9, Nov 01 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.02.037>

TAN, Y.; CHANG, S. K.; ZHANG, Y. Comparison of  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and lipase inhibitory activity of the phenolic substances in two black legumes of different genera. **Food chemistry**, v. 214, p. 259-268, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.100>

TANG, W. et al. Anti-diabetic activity of chemically profiled green tea and black tea extracts in a type 2 diabetes mice model via different mechanisms. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 4, p. 1784-1793, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.08.007>

TATSCH, E. **Dano ao DNA no diabetes tipo 2 e sua associação com inflamação, estresse oxidativo, disfunção endotelial, resistência à insulina e à ocorrência de complicações crônicas microvasculares**. 2016. Universidade Federal de Santa Maria

TESKE, M. Herbarium: compêndio de fitoterapia. In: (Ed.). **Herbarium: compêndio de fitoterapia**, 1994.

TIWARI, P. et al. Phytochemical screening and extraction: a review. **Internationale pharmaceutica sciencia**, v. 1, n. 1, p. 98-106, 2011.

TOMA, A. et al. Intestinal  $\alpha$ -glucosidase and some pancreatic enzymes inhibitory effect of hydroalcoholic extract of *Moringa stenopetala* leaves. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14, n. 1, p. 180, 2014. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-180>

TREVISAN, M. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. Rev. **Quim. Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000300013>

TROJAN-RODRIGUES, M. et al. Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p. 155-163, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.10.034>

TSAI, T.-H. et al. Antioxidant, cell-protective, and anti-melanogenic activities of leaf extracts from wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* Ser.) cultivars. **Botanical Studies**, v. 55, n. 1, p. 78, 2014. <https://doi.org/10.1186/s40529-014-0078-y>

TUCCI, S. A.; BOYLAND, E. J.; HALFORD, J. C. The role of lipid and carbohydrate digestive enzyme inhibitors in the management of obesity: a review of current and emerging therapeutic agents. **Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy**, v. 3, p. 125, 2010. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S7005>

URIBARRI, J. et al. Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 110, n. 6, p. 911-916. e12, 2010.

VALLVERDÚ-QUERALT, A. et al. Improved characterization of tomato polyphenols using liquid chromatography/electrospray ionization linear ion trap quadrupole Orbitrap mass spectrometry and liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 24, n. 20, p. 2986-2992, 2010. <https://doi.org/10.1002/rcm.4731>

VEIRIAH, A. Hyperglycemia, lipoprotein glycation, and vascular disease. **Angiology**, v. 56, n. 4, p. 431-438, 2005. <https://doi.org/10.1177/000331970505600411>

WANG, J.; WANG, H. Oxidative Stress in Pancreatic Beta Cell Regeneration. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2017, 2017.

WAUTIER, J. et al. Advanced glycation end products (AGEs) on the surface of diabetic erythrocytes bind to the vessel wall via a specific receptor inducing oxidant stress in the vasculature: a link between surface-associated AGEs and diabetic complications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 16, p. 7742-7746, 1994. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.16.7742>

WHO. World Health Day 2016: WHO calls for global action to halt rise in and improve care for people with diabetes. 2016.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of apicultural research**, v. 37, n. 2, p. 99-105, 1998. <https://doi.org/10.1080/00218839.1998.11100961>

WU, C.-H.; YEN, G.-C. Inhibitory effect of naturally occurring flavonoids on the formation of advanced glycation endproducts. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 8, p. 3167-3173, 2005. <https://doi.org/10.1021/jf048550u>

YAMAGUCHI, F. et al. Antioxidative and anti-glycation activity of garcinol from *Garcinia indica* fruit rind. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 48, n. 2, p. 180-185, 2000. <https://doi.org/10.1021/jf990845y>

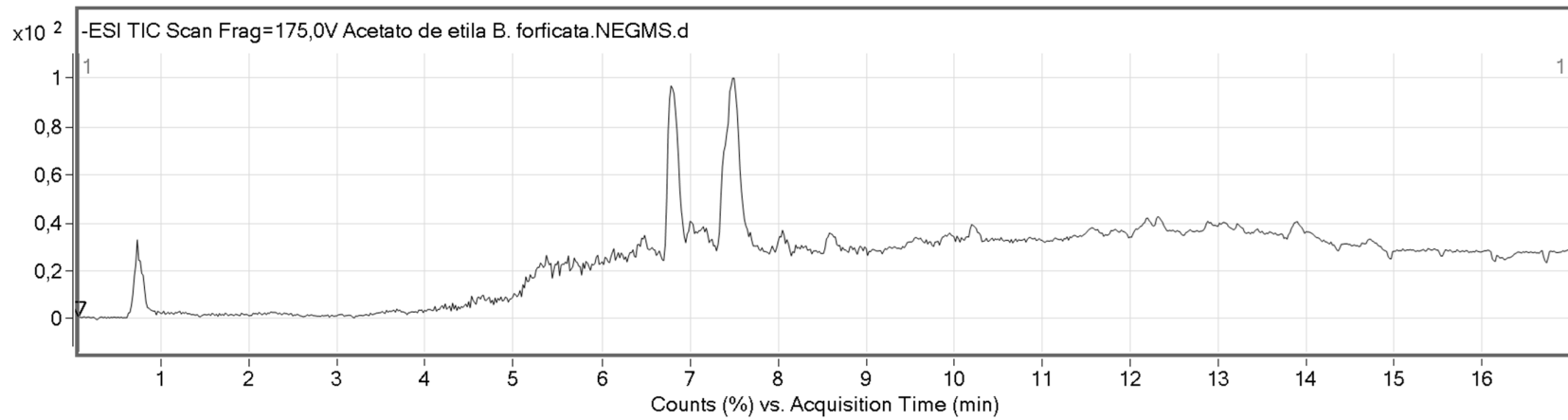
YE, M. et al. Characterization of flavonoids in *Millettia nitida* var. *hirsutissima* by HPLC/DAD/ESI-MSn. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 2, n. 1, p. 35-42, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2011.09.009>

ZENI, A. L. B. et al. Use of medicinal plants as home remedies in Primary Health Care in Blumenau–State of Santa Catarina, Brazil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 8, p. 2703-2712, 2017.

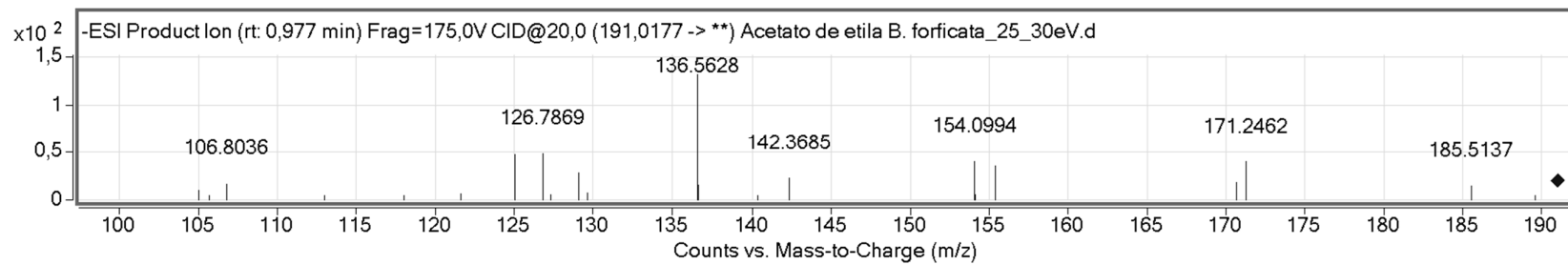
ZHANG, W. et al. Comparative studies on antioxidant activities of extracts and fractions from the leaves and stem of *Epimedium koreanum* Nakai. **Journal of food science and technology**, v. 50, n. 6, p. 1122-1129, 2013.

ZOU, Y. et al. Antioxidant activity and phenolic compositions of lentil (*Lens culinaris* var. *Morton*) extract and its fractions. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 6, p. 2268-2276, 2011. <https://doi.org/10.1021/jf104640k>

## Anexos

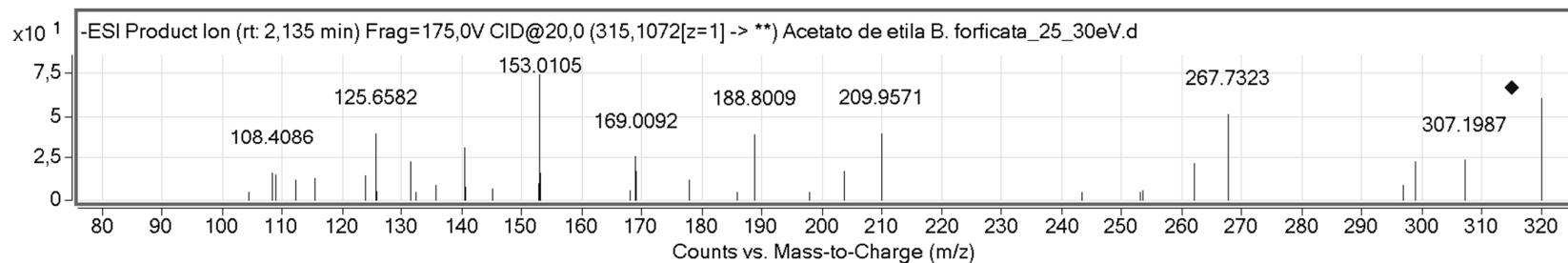


**Fig. A.1.** Cromatograma da partição de acetato de etila do extrato etanólico das folhas de *Bauhinia forficata* por HPLC-ESI-MS/MS (modo negativo).

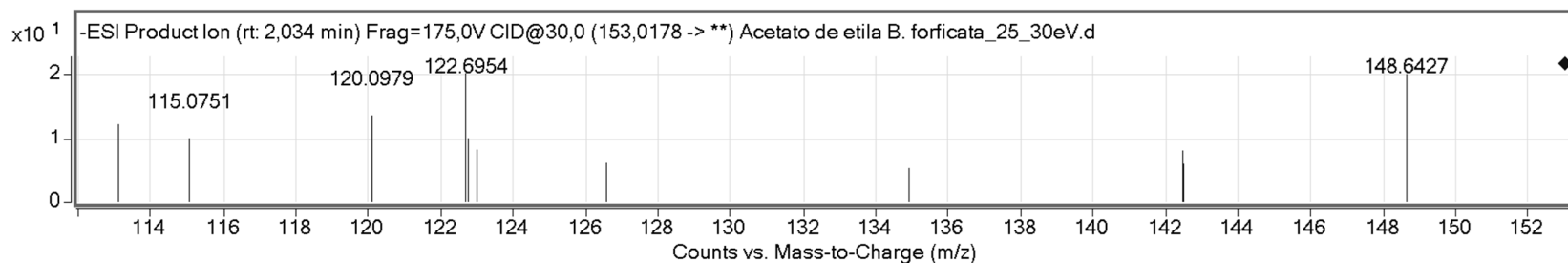


**Fig. A.2.** HPLC-ESI-MS/MS de ácido quínico presente na partição acetato de etila ( $m/z$  191 [M-H]).

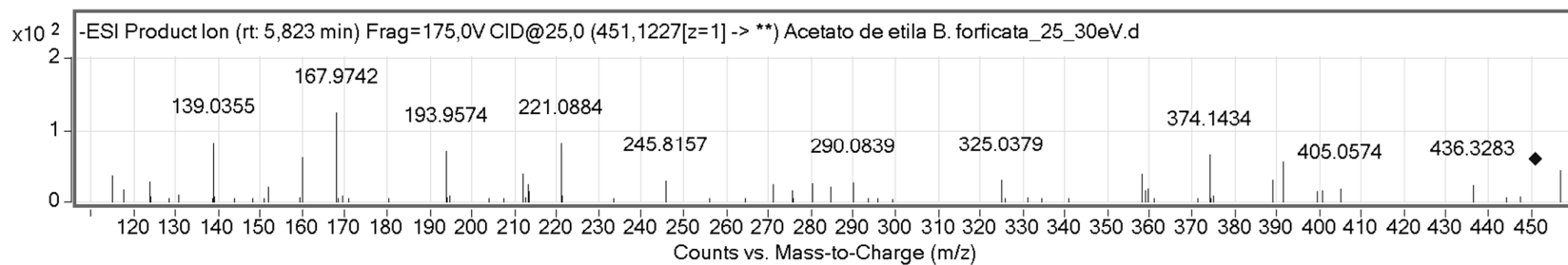




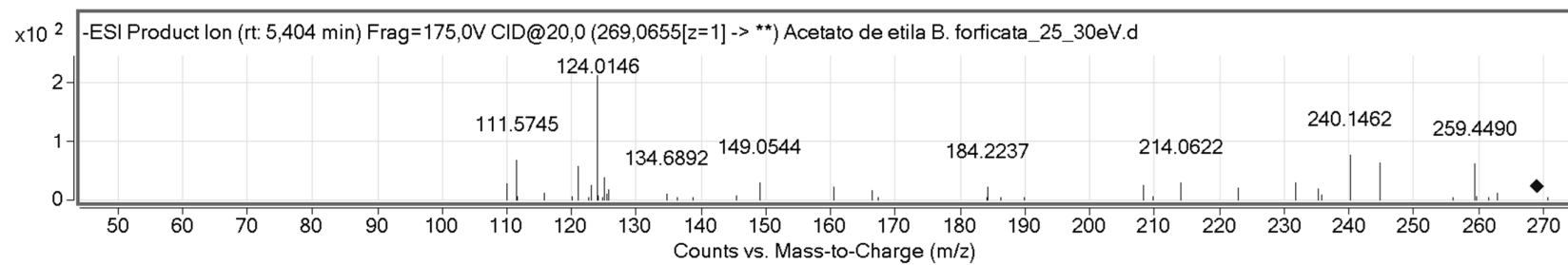
**Fig. A.2.** HPLC-ESI-MS/MS de ácido protocatecuico 3-hexosídeo presente na partição acetato de etila ( $m/z$  315 [M-H]).



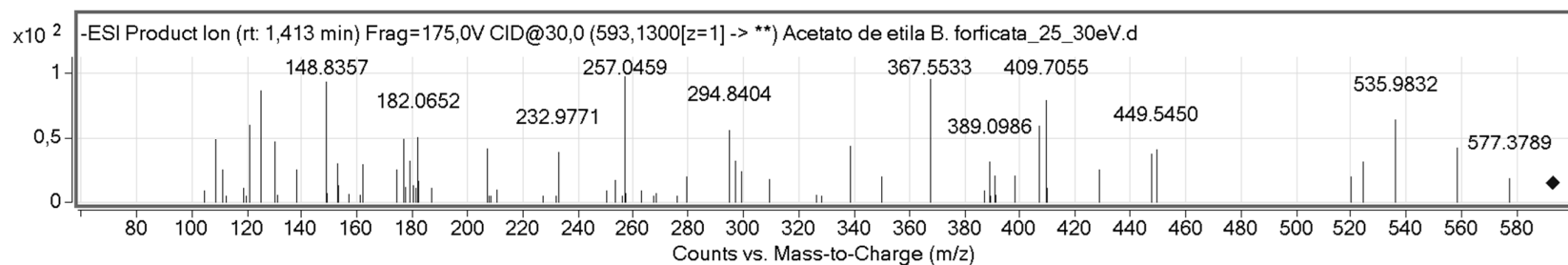
**Fig. A.3.** HPLC-ESI-MS/MS de ácido protocatecuico presente na partição acetato de etila ( $m/z$  153 [M-H]).



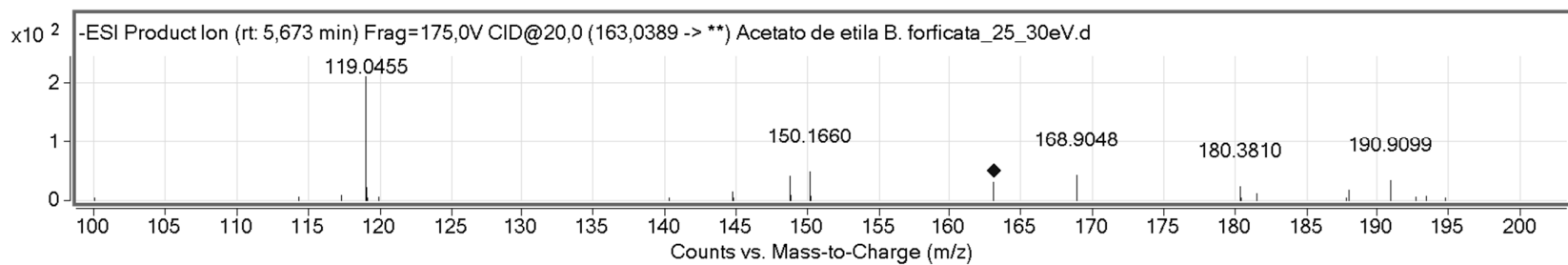
**Fig. A.4.** HPLC-ESI-MS/MS de (Epi)catechins hexosídeo presente na partição acetato de etila ( $m/z$  451 [M-H]<sup>-</sup>).



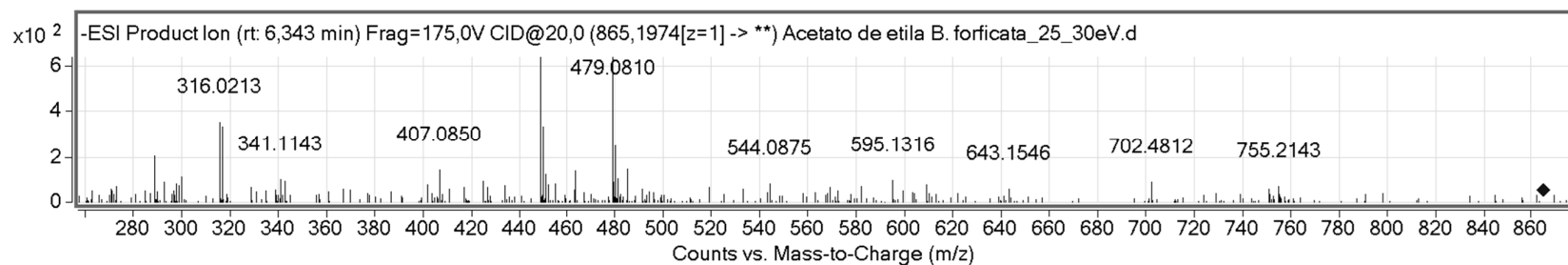
**Fig. A.5.** HPLC-ESI-MS/MS de apigenina presente na partição acetato de etila ( $m/z$  269 [M-H]<sup>-</sup>).



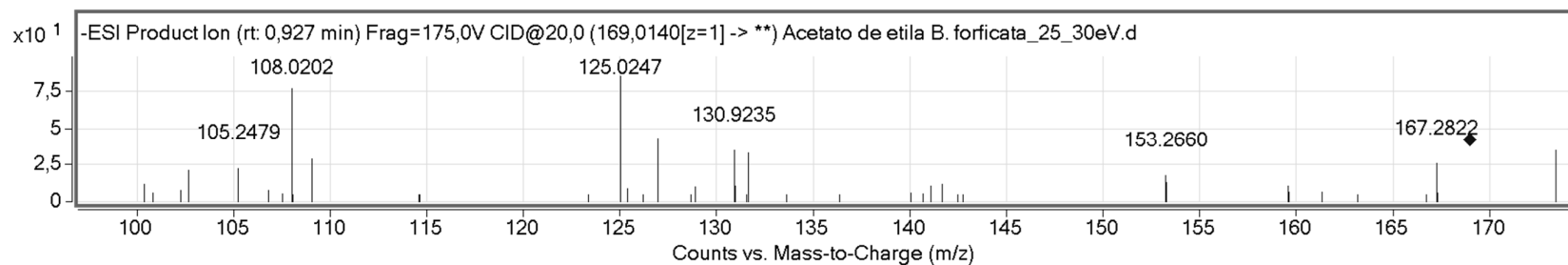
**Fig. A.6.** HPLC-ESI-MS/MS de Kaempferol 3-O-(4-O-p-coumaroil) - glicosídeo presente na partição acetato de etila ( $m/z$  593 [M-H]<sup>-</sup>).



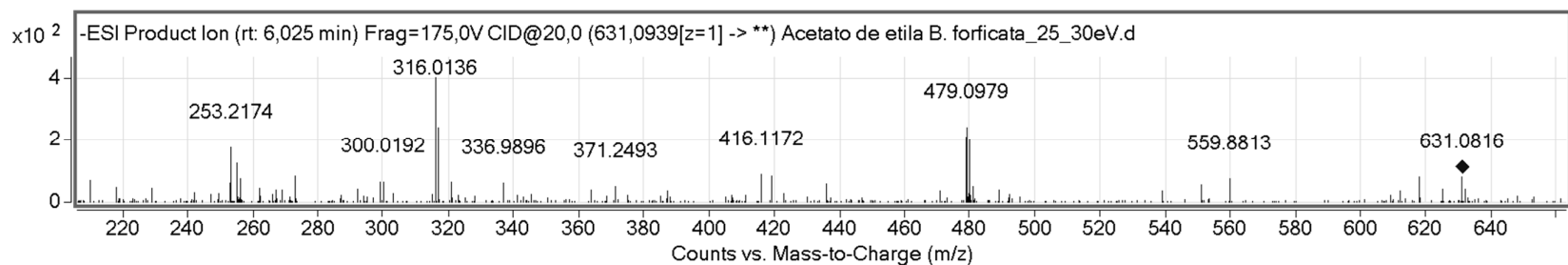
**Fig. A.7.** HPLC-ESI-MS/MS de ácido p-coumarico presente na partição acetato de etila ( $m/z$  163 [M-H]<sup>-</sup>).



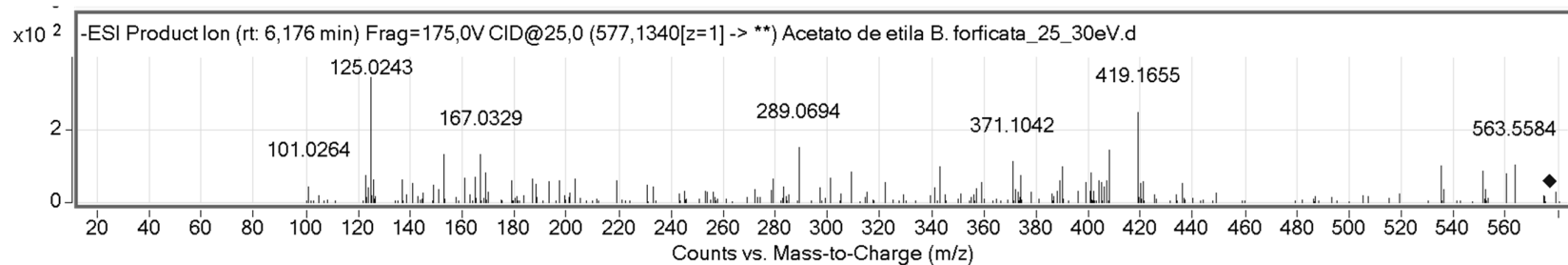
**Fig. A.8.** HPLC-ESI-MS/MS de procianidina C1 presente na partição acetato de etila ( $m/z$  865 [M-H]<sup>-</sup>).



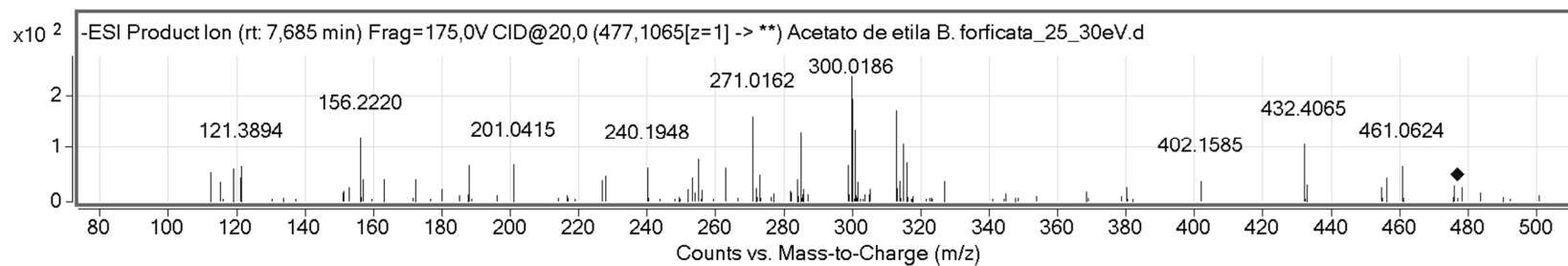
**Fig. A.9.** HPLC-ESI-MS/MS de ácido gálico presente na partição acetato de etila ( $m/z$  169 [M-H]<sup>-</sup>).



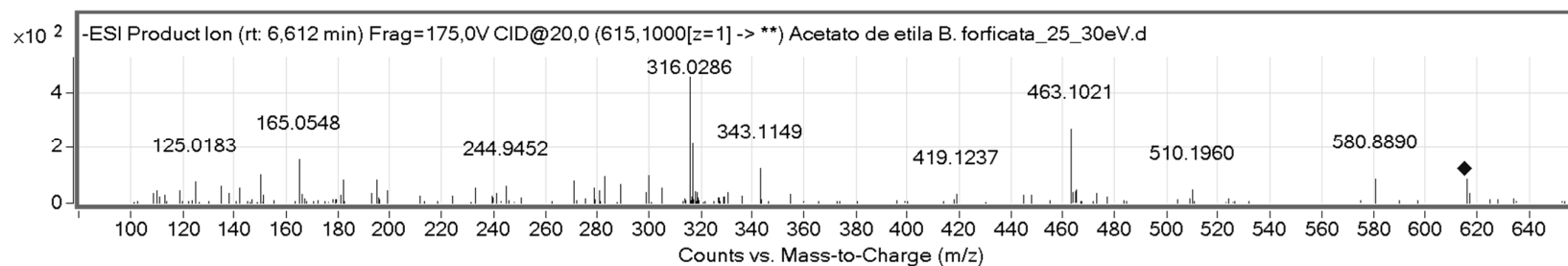
**Fig. A.10.** HPLC-ESI-MS/MS de miricetina-3-O-(2-O-galoi) glicosídeo presente na partição acetato de etila ( $m/z$  631 [M-H]<sup>-</sup>).



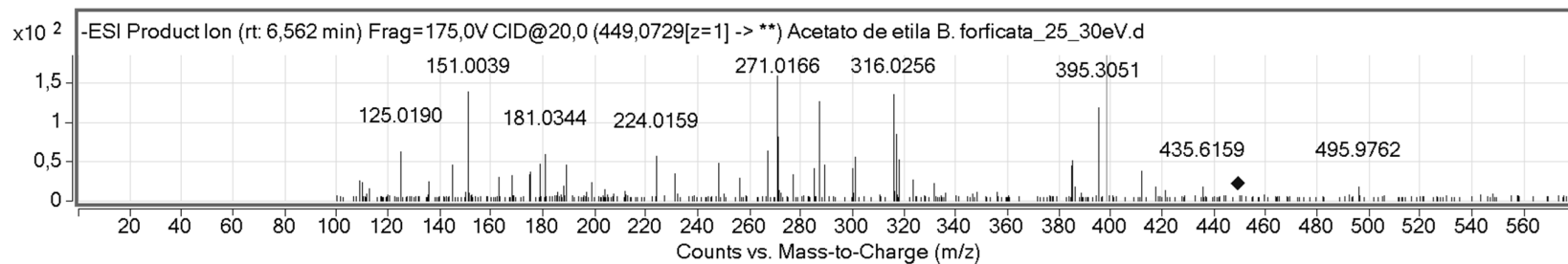
**Fig. A.11.** HPLC-ESI-MS/MS de Procianidina B2 presente na partição acetato de etila ( $m/z$  577 [M-H]<sup>-</sup>).



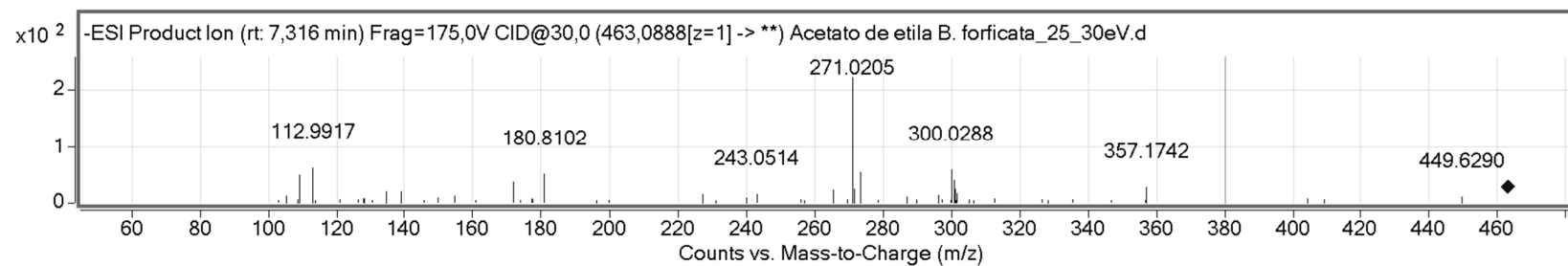
**Fig. A.12.** HPLC-ESI-MS/MS de Isorhamnetina-3-O-glicosídeo presente na partição acetato de etila ( $m/z$  477 [M-H]<sup>-</sup>).



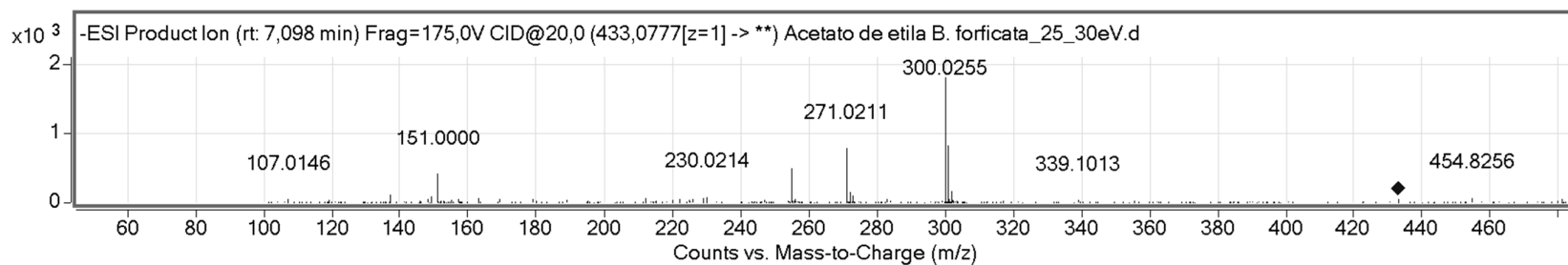
**Fig. A.13.** HPLC-ESI-MS/MS de Galoil-quercetin hexosídeo presente na partição acetato de etila ( $m/z$  615 [M-H]<sup>-</sup>).



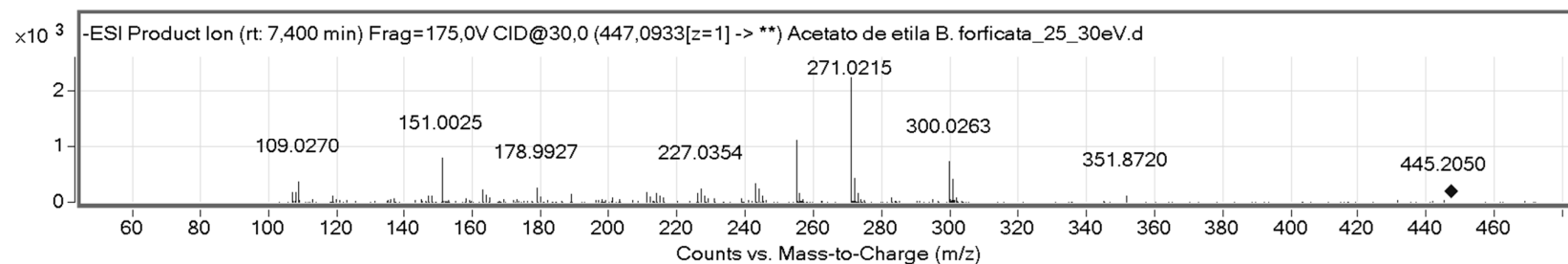
**Fig. A.14.** HPLC-ESI-MS/MS de miricetina-3-O- $\alpha$ -arabino piranosídeo presente na partição acetato de etila ( $m/z$  449 [M-H]<sup>-</sup>).



**Fig. A.15.** HPLC-ESI-MS/MS de Quercetina-O-hexosídeo presente na partição acetato de etila ( $m/z$  463 [M-H]<sup>-</sup>).

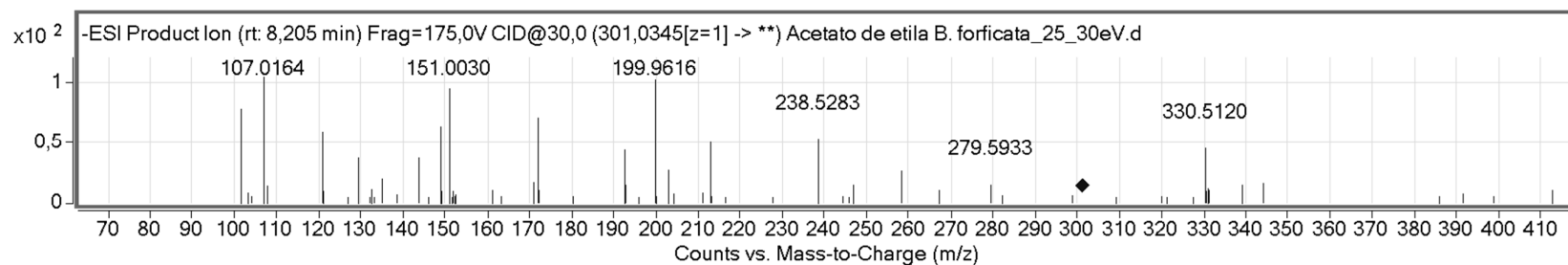


**Fig. A.16.** HPLC-ESI-MS/MS de ácido elágico pentosídeo presente na partição acetato de etila ( $m/z$  433 [M-H]).

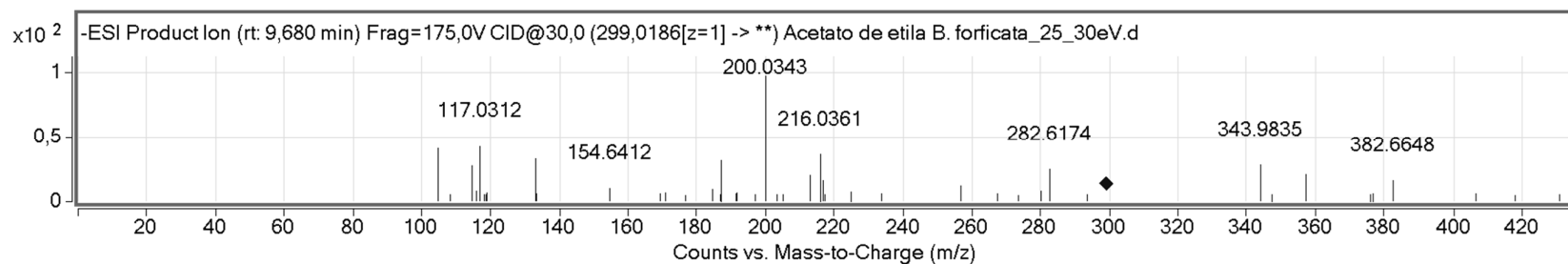


**Fig. A.17.** HPLC-ESI-MS/MS de quercetina-3-O- $\alpha$ -L-rhamno-piranosídeo presente na partição acetato de etila ( $m/z$  447 [M-H]).

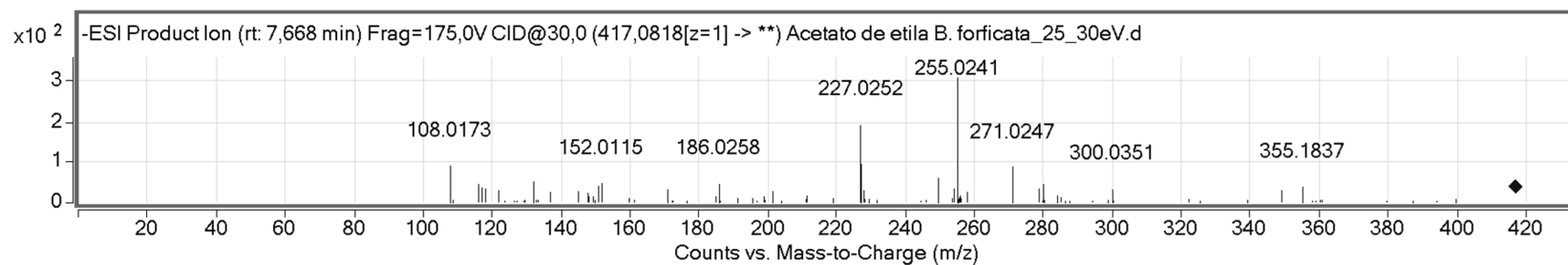




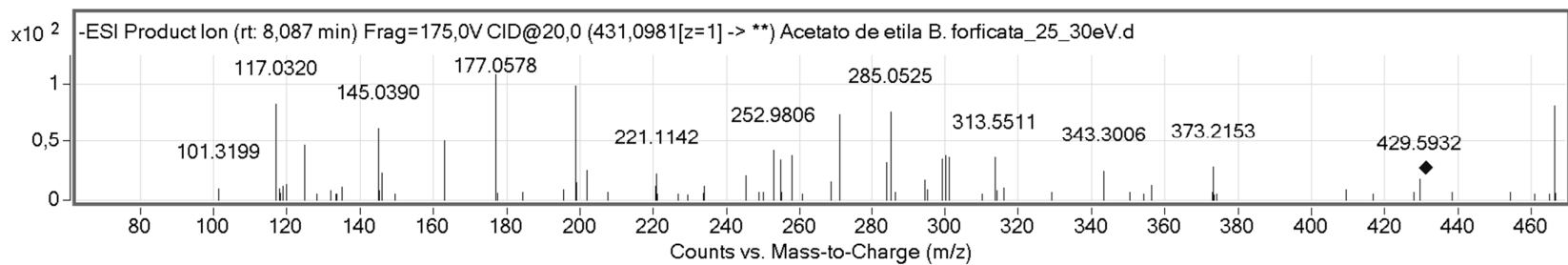
**Fig. A.18.** HPLC-ESI-MS/MS de quercetina presente na partição acetato de etila ( $m/z$  301 [M-H]).



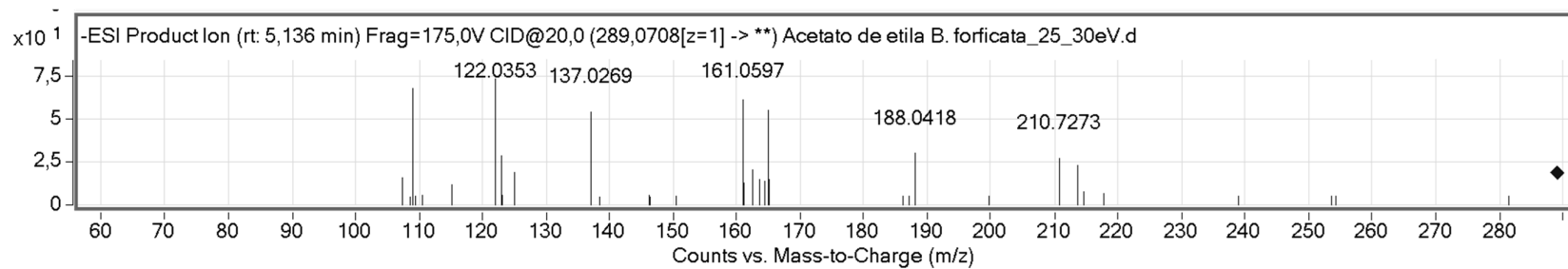
**Fig. A.19.** HPLC-ESI-MS/MS de gliricidina presente na partição acetato de etila ( $m/z$  299 [M-H]).



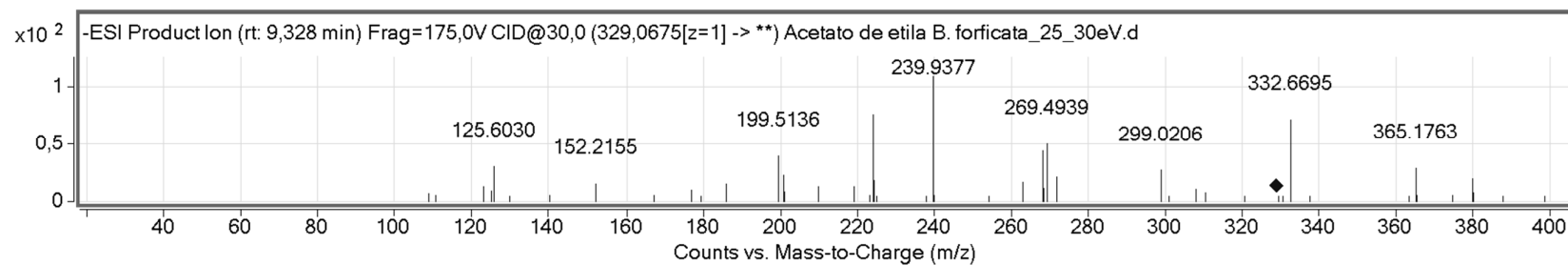
**Fig. A.20.** HPLC-ESI-MS/MS de liquiritina presente na partição acetato de etila ( $m/z$  417 [M-H]).



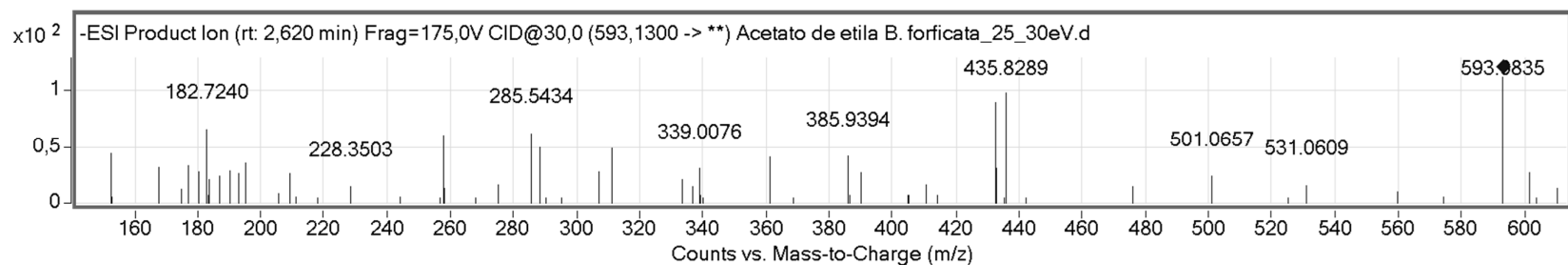
**Fig. A.21.** HPLC-ESI-MS/MS de Kaempferol-3-rhamnosídeo presente na partição acetato de etila ( $m/z$  431 [M-H]).



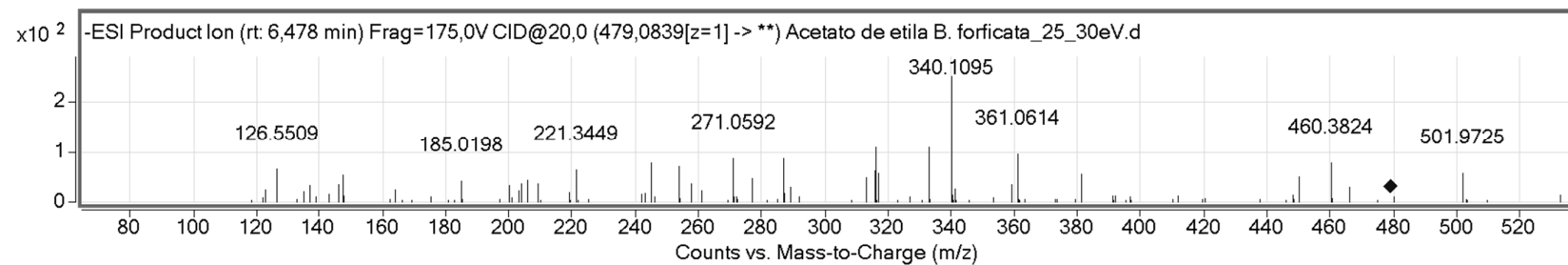
**Fig. A.22.** HPLC-ESI-MS/MS de (+)-Catequina presente na partição acetato de etila ( $m/z$  289 [M-H]).



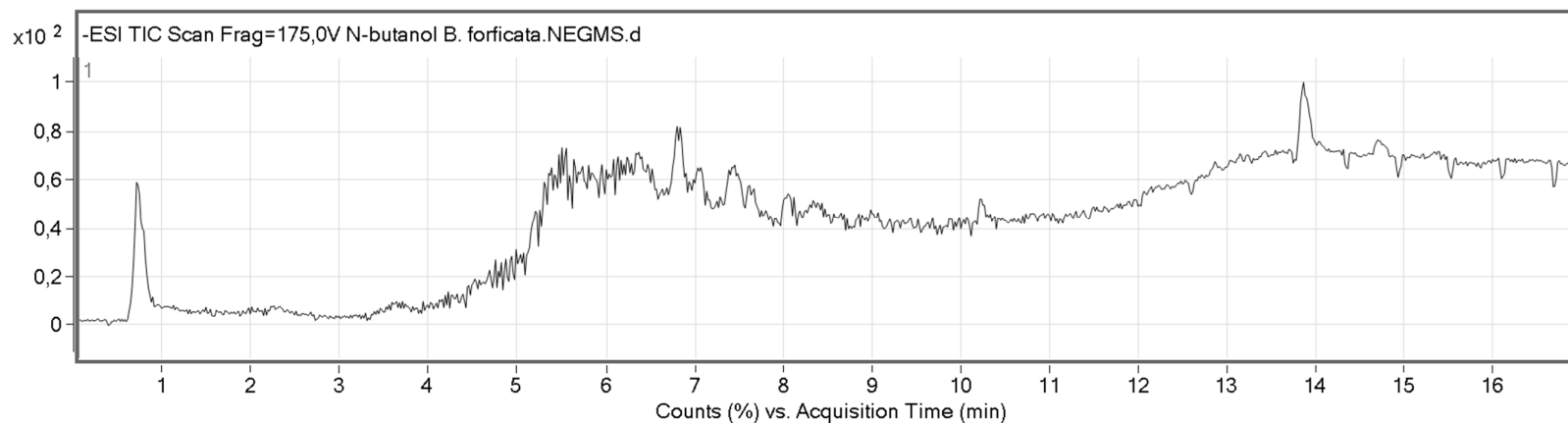
**Fig. A.23.** HPLC-ESI-MS/MS de aurantio-obtusina presente na partição acetato de etila ( $m/z$  329 [M-H]).



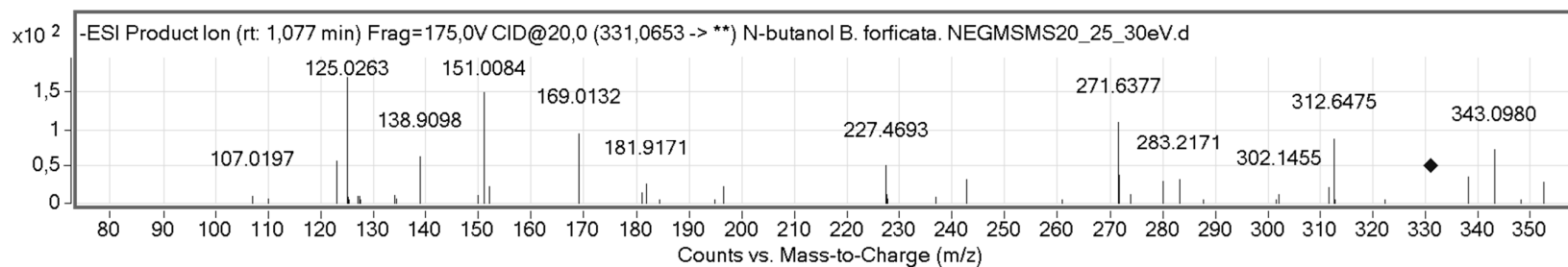
**Fig. A.24.** HPLC-ESI-MS/MS de Luteolina-7-O-rutinosídeo presente na partição acetato de etila ( $m/z$  593 [M-H]<sup>-</sup>).



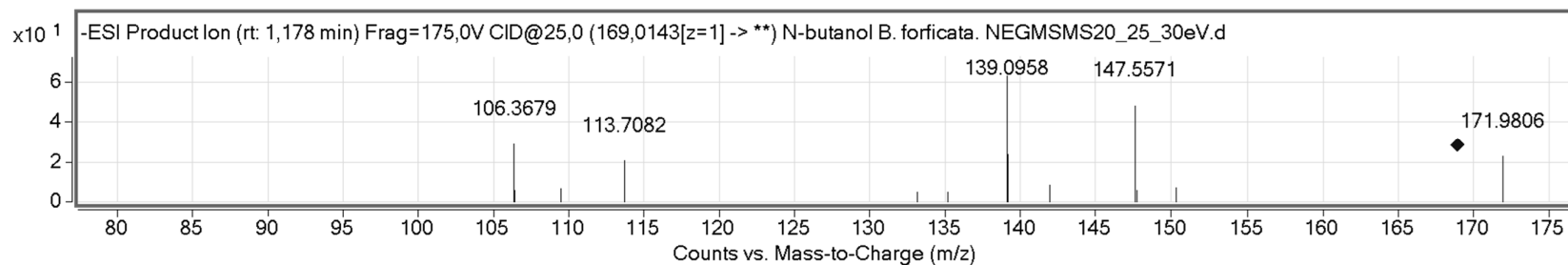
**Fig. A.25.** HPLC-ESI-MS/MS de miricetina-3-O-β-D-galacto piranosídeo presente na partição acetato de etila ( $m/z$  479 [M-H]<sup>-</sup>).



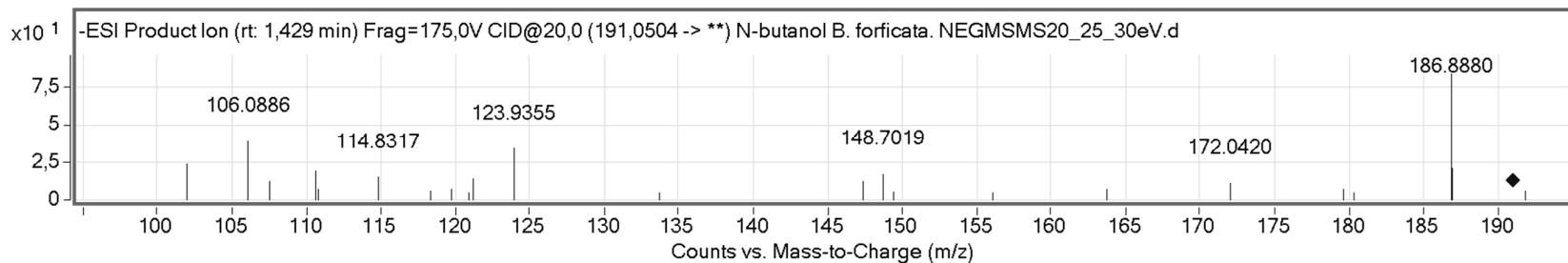
**Fig. A.26.** Cromatograma da partição de N-butanol do extrato etanólico das folhas de *Bauhinia forficata* por HPLC-ESI-MS/MS (modo negativo).



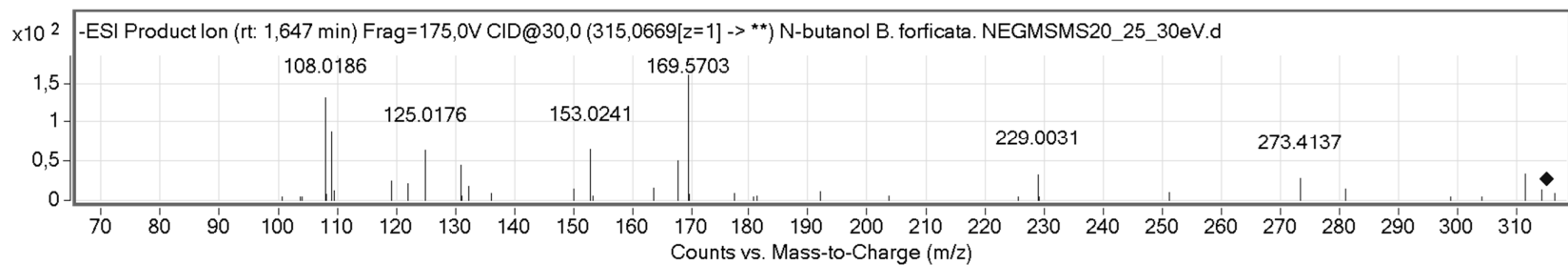
**Fig. A.27.** HPLC-ESI-MS/MS de galoil hexosídeo presente na partição N-butanol ( $m/z$  331 [M-H]).



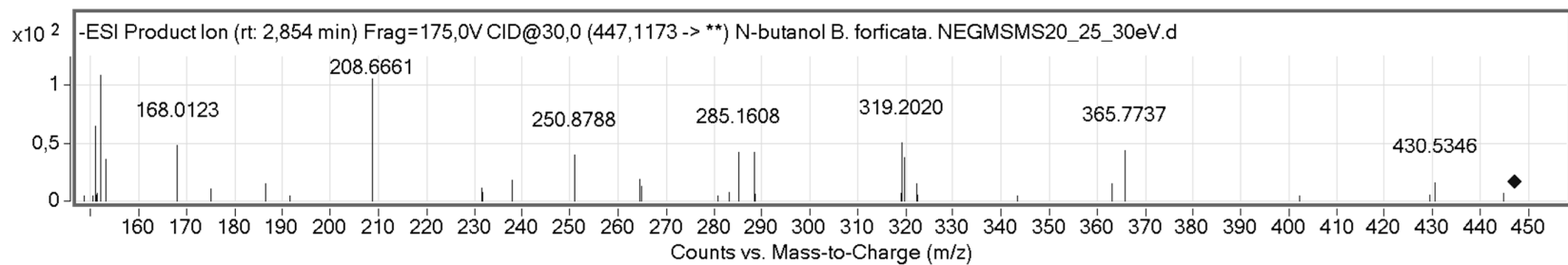
**Fig. A.28.** HPLC-ESI-MS/MS de ácido gálico presente na partição N-butanol ( $m/z$  169 [M-H]).



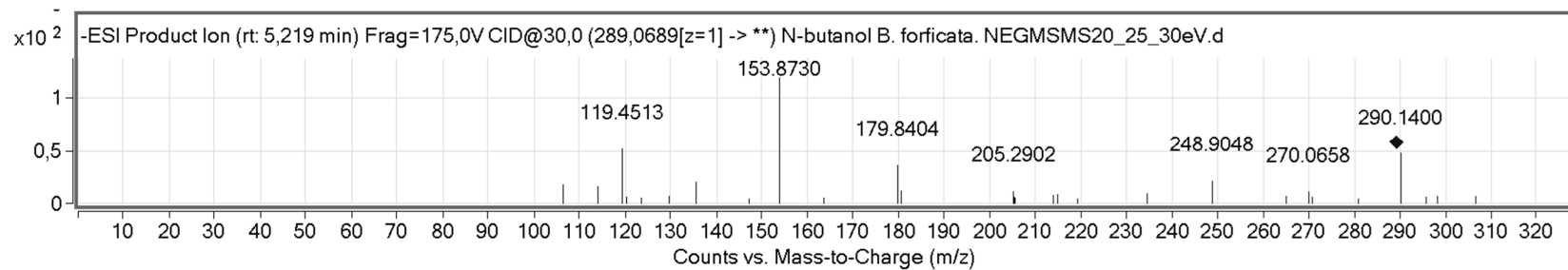
**Fig. A.29.** HPLC-ESI-MS/MS de ácido quínico presente na partição N-butanol ( $m/z$  191 [M-H]).



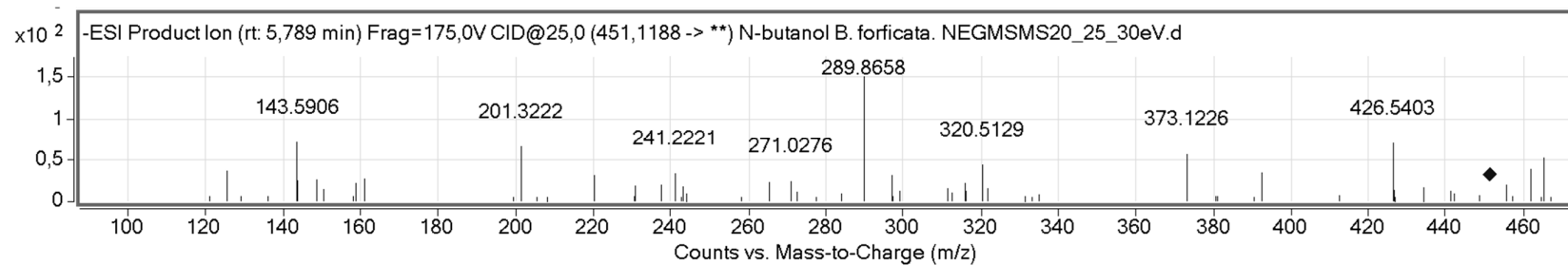
**Fig. A.30.** HPLC-ESI-MS/MS de ácido protocatecuico presente na partição N-butanol ( $m/z$  315 [M-H]<sup>-</sup>).



**Fig. A.31.** HPLC-ESI-MS/MS de Kaempferol-7-O-glicosídeo presente na partição N-butanol ( $m/z$  447 [M-H]<sup>-</sup>).

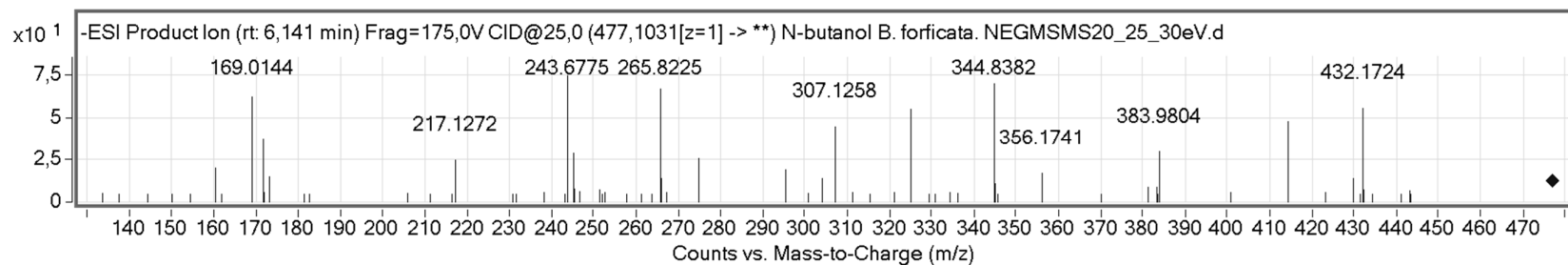


**Fig. A.32.** HPLC-ESI-MS/MS de (+)- catequina presente na partição N-butanol ( $m/z$  289 [M-H]<sup>-</sup>).

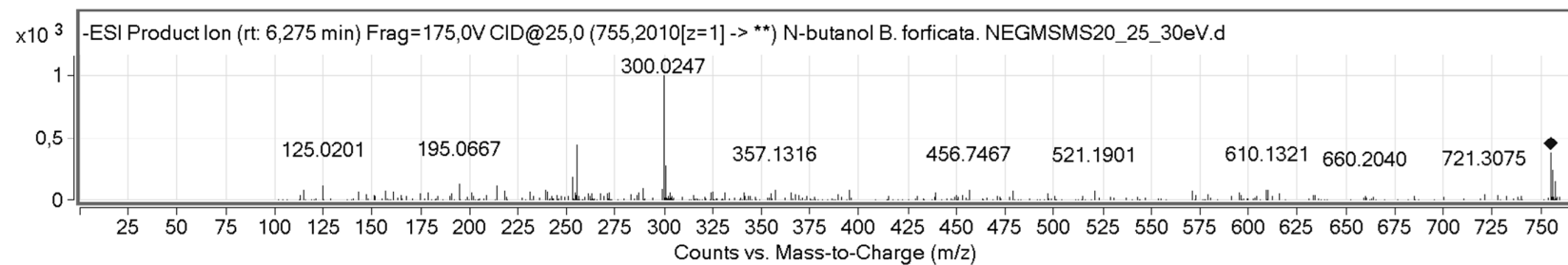


**Fig. A.32.** HPLC-ESI-MS/MS de (Epi) catequina hexosídeo presente na partição N-butanol ( $m/z$  451 [M-H]<sup>-</sup>).

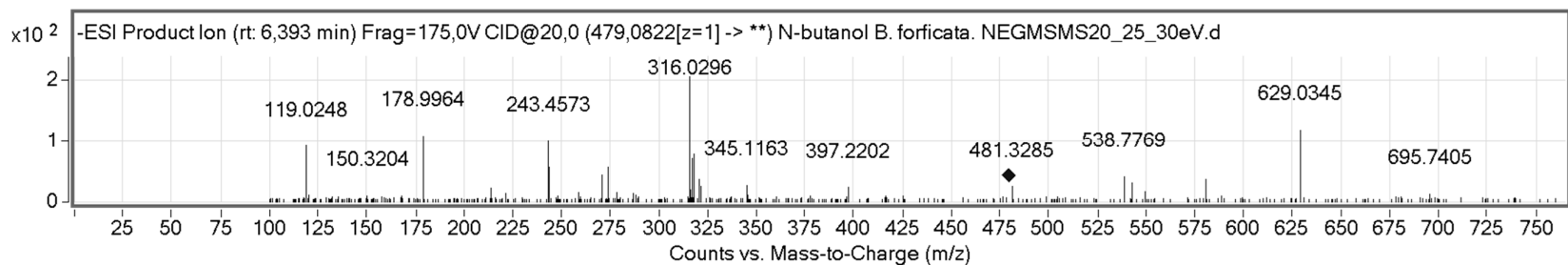




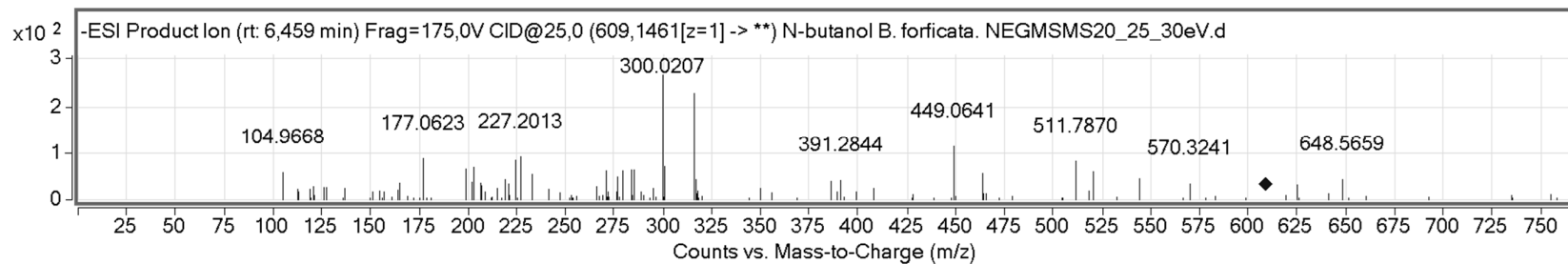
**Fig. A.33.** HPLC-ESI-MS/MS de isorhamnetina-3-O-glicosídeo presente na partição N-butanol ( $m/z$  477 [M-H]<sup>-</sup>).



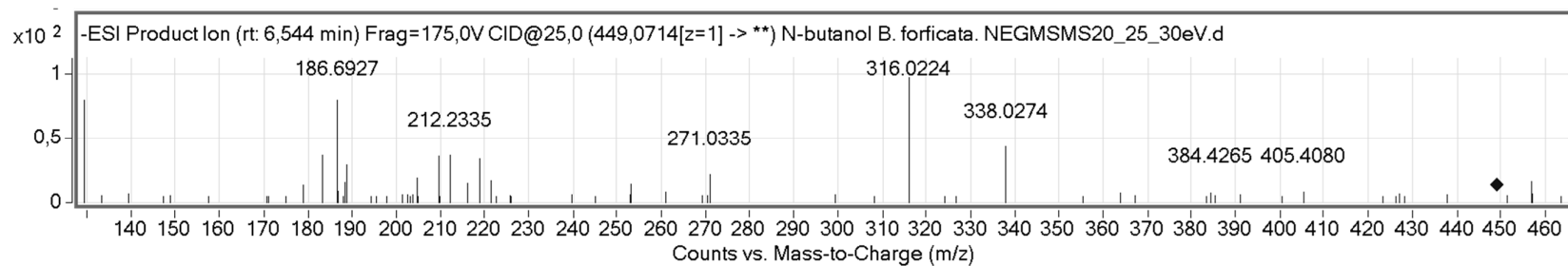
**Fig. A.34.** HPLC-ESI-MS/MS de quercetina-3-O-rutinosídeo-7-O-rhamnosídeo presente na partição N-butanol ( $m/z$  755 [M-H]<sup>-</sup>).



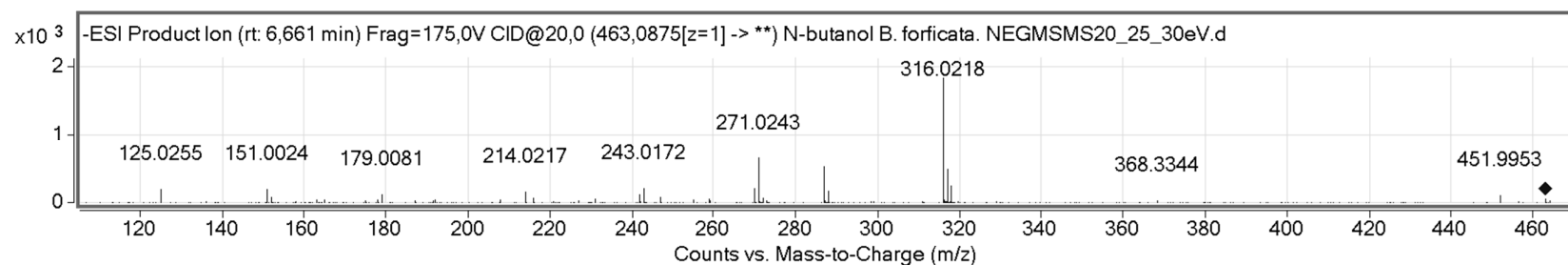
**Fig. A.35.** HPLC-ESI-MS/MS de miricetina-3-O-hexosídeo presente na partição N-butanol ( $m/z$  755 [M-H]<sup>-</sup>).



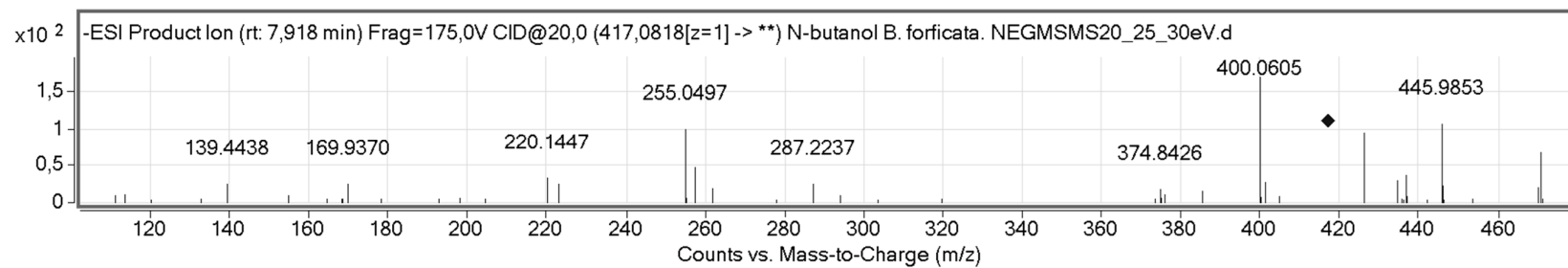
**Fig. A.36.** HPLC-ESI-MS/MS de Luteolina di-O-glicosídeo presente na partição N-butanol ( $m/z$  609 [M-H]<sup>-</sup>).



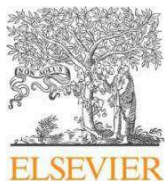
**Fig. A.37.** HPLC-ESI-MS/MS de Miricetina-3-O- $\alpha$ -arabinopentósídeo presente na partição N-butanol ( $m/z$  449 [M-H]).



**Fig. A.38.** HPLC-ESI-MS/MS de isoquercetina presente na partição N-butanol ( $m/z$  449 [M-H]).



**Fig. A.39.** HPLC-ESI-MS/MS de liquiritina presente na partição N-butanol ( $m/z$  417 [M-H]).



## Antioxidant and anti-glycation capacities of some medicinal plants and their potential inhibitory against digestive enzymes related to type 2 diabetes mellitus



Rodrigo Rodrigues Franco, Danúbia da Silva Carvalho, Francielle Borges Rosa de Moura, Allisson Benatti Justino, Heitor Cappato Guerra Silva, Leonardo Gomes Peixoto, Foued Salmen Espindola

Institute of Biotechnology (IBTEC), Federal University of Uberlandia (UFU), Uberlandia, MG, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Oxidative stress  
Postprandial hyperglycemia  
Pancreatic lipase  
Advanced glycation end products

### ABSTRACT

**Ethnopharmacological relevance:** Plants preparations are used by traditional medicine in the treatment of various diseases, such as type-2 diabetes mellitus. Some medicinal plants are capable of controlling the complications of this metabolic disease at different levels, for example, providing antioxidant compounds that act against oxidative stress and protein glycation and others which are capable of inhibiting the catalysis of digestive enzymes and thus contribute to the reduction of hyperglycemia and hyperlipidemia. Our objective was to investigate the antioxidant and anti-glycation activities of some medicinal plants and their potential inhibitory against  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic lipase activities.

**Material and methods:** Based on the ethnobotanical researches carried out by academic studies conducted at the Federal University of Uberlandia, ten plants traditionally used in the treatment of type-2 diabetes mellitus were selected. Ethanol (EtOH) and hexane (Hex) extracts of specific parts of these plants were used in enzymatic assays to evaluate their inhibitory potential against  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and lipase, as well as their anti-oxidant (DPPH, ORAC and FRAP) and anti-glycation (BSA/fructose model) capacities.

**Results:** The results indicate that EtOH extract of four of the ten analyzed plants exhibited more than 70% of antioxidant and anti-glycation capacities, and  $\alpha$ -amylase and lipase inhibitory activities; no extract was able to inhibit more than 40% the  $\alpha$ -glucosidase activity. The EtOH extracts of *Bauhinia forficata* and *Syzygium cumini* inhibited  $\alpha$ -amylase ( $IC_{50}$   $8.17 \pm 2.24$  and  $401.8 \pm 14.7$   $\mu$ g/mL, respectively), whereas EtOH extracts of *B. forficata*, *Chamomilla recutita* and *Echinodorus grandiflorus* inhibited lipase ( $IC_{50}$   $59.6 \pm 10.8$ ,  $264.2 \pm 87.2$  and  $115.8 \pm 57.1$   $\mu$ g/mL, respectively). In addition, EtOH extracts of *B. forficata*, *S. cumini*, *C. recutita* and *E. grandiflorus* showed, respectively, higher antioxidant capacity (DPPH  $IC_{50}$   $0.7 \pm 0.1$ ,  $2.5 \pm 0.2$ ,  $1.3 \pm 0.2$  and  $35.3 \pm 9.0$   $\mu$ g/mL) and anti-glycation activity ( $IC_{50}$   $22.7 \pm 4.4$ ,  $246.2 \pm 81.7$ ,  $18.5 \pm 2.8$  and  $339.0 \pm 91.0$   $\mu$ g/mL).

**Conclusions:** EtOH extracts of four of the ten species popularly cited for treatment of type 2 diabetes mellitus have shown promising antioxidant and anti-glycation properties, as well as the ability to inhibit the digestive enzymes  $\alpha$ -amylase and lipase. Thus, our results open new possibilities for further studies in order to evaluate the antidiabetic potential of these medicinal plants.

### 1. Introduction

Type-2 diabetes mellitus (T2DM) is a metabolic disease that affects about 422 million people in the world (WHO, 2016), being characterized by several factors, including hyperglycemia and hyperlipidemia, as well as increased oxidative stress and protein glycation (Giacco and Brownlee, 2010). In spite of the development of pharmacological agents for the treatment of diabetes, the use of medicinal plants is considered a complementary treatment for this disease (Ota and Ulrich, 2017). This knowledge has been transmitted to human generations through culture and today

contributes with valuable information for the discovery of bioactive compounds with therapeutic effects (Gulati et al., 2012; Halberstein, 2005). In Brazil, the Ministry of Health stimulates the application of medicinal plants for the treatment of T2DM, and other diseases, through the Unified Health System, based on successful projects promoted by the National Program of Medicinal Plants and Herbal Medicines (Caccia-Bava et al., 2017).

Studies indicate that secondary metabolites, such as polyphenols (flavonoids and phenolic acids) and terpenes present in medicinal plants are able to scavenge free radicals and reduce non-enzymatic glycation (Kim and Kim, 2003; Wu and Yen, 2005; Yamaguchi et al.,

Correspondence to: Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Biotecnologia, Rua Acre S/N Blc 2E 237, CEP 38400-902, Uberlândia, MG, Brazil. E-mail address: foued@ufu.br (F.S. Espindola).

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.12.032>

Received 9 August 2017; Received in revised form 13 December 2017; Accepted 20 December 2017

Available online 21 December 2017

0378-8741/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

2000) and inhibit  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and lipase (Buchholz and Melzig, 2015; McDougall et al., 2005; Tan et al., 2017). Among plants used in the treatment of T2DM and its complications, we highlight leaves of *Annona muricata* (Florence et al., 2014), *Arctium lappa* (Bahmani et al., 2014), *Bauhinia forficata* (Bolson et al., 2015), *Camellia sinensis* (Tang et al., 2013), *Echinodorus grandiflorus* (Marques et al., 2017), *Momordica charantia* (Fuangchan et al., 2011), *Rosmarinus officinalis* (Bakrel et al., 2008) and *Syzygium cumini* (Trojan-Rodrigues et al., 2012), flowers of *Matricaria recutita* (Semenya et al., 2012) and rhizome of *Zingiber officinale* (Daily et al., 2015).

Previous studies have showed that the aqueous extract of *A. muricata* leaves (Florence et al., 2014) and ethanolic extract of *M. recutita* (Cemek et al., 2008; Jabri et al., 2017) are capable of stimulating the renewal of pancreatic  $\beta$  cells, promoting the absorption of glucose by peripheral tissues and reducing hyperlipidemia, as well as act against oxidative stress caused by T2DM. Studies using *A. lappa* leaves indicated that its methanolic extract has anti-inflammatory activities and controls autoimmune diseases and atherosclerosis, while its aqueous extract inhibits lipid peroxidation in rat brain (Kardošová and Machova, 2006). In addition, the butanolic extract of *B. forficata* leaves is able to reduce hyperglycemia, since it has insulin mimetic effect in diabetic rats (Jorge et al., 2004; Silva et al., 2002). Another study indicated that the aqueous extract of *B. forficata* leaves is able to combat lipid peroxidation, stimulate GSH activity, decrease uric acid concentration and increase hepatic glycogen in pregnant rats (Damasceno et al., 2004).

The ethanolic extracts of *C. sinensis*, *R. officinalis* leaves and aqueous extract of *E. grandiflorus* leaves have also been reported to decrease hyperglycemia, oxidative stress, lipid peroxidation and activate antioxidant enzymes (Alonso-Castro et al., 2012; Haidari et al., 2013; Lunardi et al., 2014). A previous study also showed that *M. charantia* leaves control postprandial hyperglycemia and glucose tolerance, and its methanolic extract presents free radical-scavenging properties and inhibitory activity against nitric oxide production (Tsai et al., 2014). Moreover, the ethanolic extract of *S. cumini* leaves was able to decrease hyperglycemia and hyperlipidemia, while its methanolic extract has high antioxidant activity (Mohamed et al., 2013). Furthermore, Bhandari and Pillai (2005) showed that the ethanolic extract of *Z. officinalis* rhizome prevents lipid peroxidation, reduces hyperglycemia and hyperlipidemia, besides to presents anti-inflammatory and anti-atherosclerotic properties.

Thus, considering the beneficial effects of these plants and the development of new strategies based on natural products to mitigate the complications related to type-2 diabetes mellitus, our study aimed to investigate the antioxidant and anti-glycation capacities of some medicinal plants and their inhibitory potential against  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic lipase activities.

## 2. Material and methods

### 2.1. Plant material

The plants used in our study were selected from ethnopharmacology (Table 1) and nine ethnobotanical studies carried out in the city of Uberlandia - MG (Damasceno, 2007; Gomes, 2008; Machado, 2008; Milani,

2007; Oliveira, 2010, 2008; Pereira, 2008; Resende, 2007; Salgado, 2007). These ethnobotanical studies are monographs deposited in the library of Federal University of Uberlandia, which were performed by researchers from Institute of Biology. The selected plants were purchased from two Brazilian companies, specialized in national and international plant trade. The *M. charantia* leaves were purchased from FLORIEN Distribuidor de insumos farmacêuticos (Piracicaba, São Paulo, Brazil), company duly registered in the National Health Surveillance Agency - ANVISA (Registration Number 1.11.419-1) and Regional Pharmacy Council - CRF (Registration Number: 34823). The others plants were purchased from Santos Flora Comércio de Ervas Ltda (Mariporã, São Paulo, Brazil), a company duly registered in the ANVISA (Authorization Number: 6.0.671-1) and Regional Pharmacy Council - CRF (Registration Number: 0505). All plants showed quality control, with certificate of origin, free of contaminants, being identified by their organoleptic, macroscopic and microscopic characteristics, as well as by analysis of phytochemical markers (Supplementary material).

### 2.2. Preparation of extracts

The plants were crushed and individually subjected to static maceration for seven days, using 500 g of plant material for each 2.5 L of 98% ethanol or hexane (1:5 m/v). After extraction, the solutions were filtered and the solvent completely removed by rotary evaporator under reduced pressure at 40 °C. The maceration process was repeated once to warranty extraction exhaustion (Jones and Kinghorn, 2012) and extracts were frozen and lyophilized to remove remaining water.

### 2.3. Enzymatic assays

The extracts and positive controls (acarbose for  $\alpha$ -amylase/ $\alpha$ -glucosidase and Orlistat for lipase) were diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) and used at a concentration of 5 mg/mL for initial assays. The samples has been diluted serially from a concentration of 5 mg/mL for IC<sub>50</sub> determination. All analyzes were performed in triplicate and results are presented as percentage (%) of inhibition, calculated using the following equation:  $I (\%) = [(A_{control} - A_{sample}) / (A_{control} - A_{negative})] \times 100$ , where  $A_{control}$  is the absorbance value of the negative control and  $A_{sample}$  is the absorbance value of each extract/positive control.

#### 2.3.1. $\alpha$ -amylase inhibition

The extracts were analyzed for inhibition of  $\alpha$ -amylase activity using 2-chloro-4-nitrophenyl-4- $\beta$ -D-galactopyranosylmaltoide (GalG2CNP) as substrate and a saliva fraction enriched with  $\alpha$ -amylase (HSA-f) (da Silva Santos et al., 2012). The HSA-f was diluted in 50 mM of 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) buffer containing 5 mM of calcium chloride, 140 mM of potassium thiocyanate and 300 mM of sodium chloride (pH 6.0). Each extract was incubated with HSA-f (1:10 ratio) for 30 min at 37 °C. Subsequently, 12 mM of GALG2CNP was added to initiate the reaction. Increases in absorbance (i.e., CNP re-lease) were measured at 37 °C for 3 min and at 405 nm (Molecular Devices, Menlo Park, CA, USA). Acarbose and MES buffer were used as positive and negative controls, respectively.

Table 1  
Medicinal plants indicated to treat T2DM in Uberlandia city, Minas Gerais, Brazil.

Scientific name	Common name	Family	Parts of plant	Reference
<i>Annona muricata</i> L.	Soursop	Annonaceae	Leaf	(Florence et al., 2014; Oliveira, 2010)
<i>Arctium lappa</i> L.	Burdock	Asteraceae	Leaf	(Bahmani et al., 2014; Resende, 2007)
<i>Bauhinia forficata</i> Link.	Cow's foot	Fabaceae	Leaf	(Bolson et al., 2015; Oliveira, 2010)
<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze	Green tea	Theaceae	Leaf	(Machado, 2008; Tang et al., 2013)
<i>Echinodorus grandiflorus</i> (Cham. & Schltdl.) Micheli	Leather hat	Alismataceae	Leaf	(Marques et al., 2017; Oliveira, 2010)
<i>Momordica charantia</i> L.	Bitter melon	Cucurbitaceae	Leaf	(Damasceno, 2007; Fuangchan et al., 2011)
<i>Matricaria recutita</i> (L.) Rauschert	Chamomile	Asteraceae	Flower	(Machado, 2008; Semanya et al., 2012)
<i>Rosmarinus officinalis</i> Roscoe	Rosemary	Lamiaceae	Leaf	(Bakrel et al., 2008; Damasceno, 2007)
<i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels	Jambolan	Myrtaceae	Leaf	(Oliveira, 2010; Trojan-Rodrigues et al., 2012)
<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	Ginger	Zingiberaceae	Rhizome	(Daily et al., 2015; Machado, 2008)

### 2.3.2. $\alpha$ -glucosidase inhibition

The extracts were analyzed for their ability to inhibit  $\alpha$ -glucosidase activity using a modified method (Justino et al., 2016), with 4-nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside (p-NPG) as substrate and  $\alpha$ -glucosidase-enriched fraction from rat's intestinal acetone powder (AG-f). Each extract was incubated with AG-f and 1.5 mM reduced glutathione (diluted in 50 mM phosphate buffer pH 6.8) for 20 min at 37 °C. The reaction started by adding 4 mM p-NPG and the absorbance values were measured at 405 nm (Molecular Devices, Menlo Park, CA, USA) for 30 min. Acarbose and phosphate buffer were used as positive and negative controls, respectively.

### 2.3.3. Lipase inhibition

The extracts were analyzed for their ability to inhibit lipase activity using a modified method with p-nitrophenyl palmitate (p-NPP) as substrate and porcine pancreatic lipase (Pereira et al., 2017). Each extract was incubated with 10 g/L PL (diluted in 50 mM Tris-HCl buffer pH 8.0, containing 10 mM CaCl<sub>2</sub> and 25 mM NaCl) for 20 min at 37 °C. The reaction started by adding 0.8 mM p-NPP substrate (diluted in 10% isopropanol and 50 mM Tris-HCl buffer, containing 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM NaCl, 0.5% triton X-100% and 0.1% gum arabic). The absorbance values were measured at 410 nm (Molecular Devices, Menlo Park, CA, USA) for 30 min. Orlistat and Tris-HCl buffer were used as positive and negative controls, respectively.

### 2.4. Antioxidant assays

The extracts/ascorbic acid (positive control) were solubilized in ethanol at a concentration of 1 mg/mL for ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical scavenging (DPPH) methods, and at 100  $\mu$ g/mL for the absorption capacity of oxygen radicals (ORAC) assay. The samples has been serially diluted from a concentration of 1 mg/mL for DPPH IC<sub>50</sub> determination. All analyzes were performed in triplicate and the results were expressed as percentage (%) of antioxidant capacity for DPPH assay, and trolox equivalents ( $\mu$ mol TE/g) for FRAP and ORAC assays.

#### 2.4.1. Sequestration of free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

The extracts/ascorbic acid were incubated with a methanolic solution of 60 mM DPPH at 30 °C for 20 min, in absence of light. The reduction in absorbance of the mixture was measured at 517 nm (Molecular Devices, Menlo Park, CA, USA). Scavenging of DPPH radicals was calculated using the following equation:  $DPPH(\%) = [(A_{control} - A_{sample}) / (A_{control})] \times 100$ , where A control is the absorbance value of the DPPH radical and A sample is the absorbance value of each extract/positive control (Kedare and Singh,

2011). Methanol was used as negative control.

#### 2.4.2. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)

The extracts/ascorbic acid were incubated with 0.085 nM fluorescein at room temperature for 15 min. After incubation, 153 mM 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) was added and the fluorescence (485 nmex/528 nmem) was measured at 37 °C for 90 min (Perkin-Elmer LS 55, Massachusetts, USA); the loss of fluorescence was measured by calculating the area under the curve. All reagents were prepared in 75 mM phosphate buffer (pH 7.4). The antioxidant capacity was determined using an analytical curve, constructed with trolox as standard (Rodríguez-Bonilla et al., 2017). Phosphate buffer was used as negative control.

#### 2.4.3. Iron reduction capacity (FRAP)

The extracts/ascorbic acid were incubated with 10 volumes of 300 mM sodium acetate buffer (pH 3.6), 1 vol of 10 mM 2,4,6-tri(2pyridyl)-stria-zine (TPTZ) and 1 vol of 20 mM ferric chloride at 37 °C for 6 min. Absorbance values were measured at 593 nm (Molecular Devices, Menlo Park, CA, USA) and the antioxidant capacity was determined by an analytical curve constructed with trolox (Tenorio-Rodríguez et al., 2017). Sodium acetate buffer was used as negative control.

### 2.5. Inhibition test for the formation of advanced glycation end products

The extracts/quercetin (positive control) were diluted in DMSO and used at a concentration of 5 mg/mL and serially diluted from a concentration of 5 mg/mL for IC<sub>50</sub> determination. Each plant extract and control were incubated with 50 mg/mL BSA and 1.25 M fructose (diluted in 200 mM phosphate buffer, pH 7.4 containing 0.02% sodium azide) at 37 °C for 72 h in the dark. After incubation, 20% trichloroacetic acid (m/v) was added and the mixture was centrifuged at 10,000 $\times$ g for 10 min. The Pellet fraction has been resuspended in phosphate buffer and fluorescence intensity of glycated albumin was measured at 350 nmex/420 nmem (Molecular Devices, Menlo Park, CA, USA). All analyzes were performed in triplicate and results are presented as percentage (%) of inhibition, calculated using the following equation:  $GI(\%) = [(F_{control} - F_{sample}) / (F_{control})] \times 100$ , where F control is the fluorescence value of the negative control and F sample is the fluorescence value of each extract/quercetin. Phosphate buffer was used as negative control (Harsha et al., 2014).

### 2.6. Statistical analysis

The statistical analyzes and graphics were done using GraphPad Prism 6.0 software. The data was expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) and the significance of difference has been calculated using one-way ANOVA and Dunnett's post-test of multiple comparisons to control. Values of p < 0.05 were considered significant.

## 3. Results

### 3.1. Enzymatic inhibition

The results of inhibitory activities by EtOH and Hex extracts against  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and lipase activities are shown in Table 2. The extracts of A. lappa, C. sinensis, E. grandiflorus and M. charantia did not inhibit the  $\alpha$ -amylase. However, the Hex extracts of M. recutita, S. cumini and Z. officinale, as well as the EtOH extracts of A. muricata, B. forficata, R. officinalis and S. cumini inhibited this enzyme. The EtOH extract of S. cumini and B. forficata showed higher  $\alpha$ -amylase inhibitory activity (73.1  $\pm$  0.2% and 91.3  $\pm$  0.2%, respectively) compared to the other plants, presenting similar inhibition capacity as acarbose. In the  $\alpha$ -glucosidase inhibition assay, all extracts presented low potential to inhibit this enzyme, with percentual values of inhibition below 40%.

With regard to the lipase inhibition assay, all extracts showed capacity to inhibit lipase activity, except the Hex extract of S. cumini. Among them, the EtOH extracts of M. recutita, B. forficata and E. grandiflorus showed the highest inhibitory capacities (86.6  $\pm$  0.3%, 100.0  $\pm$  0.1% and 75.8  $\pm$  17.0% of inhibition, respectively), with similar values to Orlistat.

The extracts that showed enzymatic inhibition capacity higher than 70% were analyzed for determination of half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>). The EtOH extract of S. cumini and B. forficata showed IC<sub>50</sub> values of 401.8  $\pm$  14.7 and 8.2  $\pm$  2.2  $\mu$ g/mL for  $\alpha$ -amylase inhibition, respectively (Fig. 1A). Furthermore, M. recutita, B. forficata, E. grandiflorus EtOH extracts showed IC<sub>50</sub> values of 264.2  $\pm$  87.2, 59.6  $\pm$  10.8 and 115.8  $\pm$  57.1  $\mu$ g/mL for lipase inhibition, respectively (Fig. 1B).

### 3.2. Antioxidant and anti-glycation capacities

The antioxidant and anti-glycation activities of EtOH and Hex extracts are shown in Table 3. In general, EtOH extracts showed higher antioxidant capacity compared to Hex extract. The EtOH extract of A. lappa, M. recutita, C. sinensis, A. muricata, S. cumini, E. grandiflorus and both EtOH and Hex extracts of R. officinalis, Z. officinale and B. forficata showed antioxidant capacities higher than 75% in DPPH assay; these results were similar to ascorbic acid, with the exception of M. charantia, that presented antioxidant activity below 42%. Furthermore, all extracts showed antioxidant capacity in the ORAC assay (above 700  $\mu$ mol trolox eq/g), presenting similar values to ascorbic acid activity (1136.0  $\pm$  27.1  $\mu$ mol trolox eq/g). Although no



Table 2

$\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and lipase inhibitory activities analysis of the hexane (Hex) and ethanol (EtOH) extracts of medicinal plants. All extracts and positive controls were di-luted in DMSO at a concentration of 5 mg/mL. Values are expressed as percentage of enzymatic inhibition.

Scientific name	Extract	$\alpha$ -amylase (%)	$\alpha$ -glucosidase (%)	Lipase (%)
A. lappa	Hex	NI	20.8 $\pm$ 0.4	9.7 $\pm$ 4.3
	EtOH	NI	25.2 $\pm$ 1.1	42.6 $\pm$ 1.9
A. muricata	Hex	NI	35.0 $\pm$ 0.5	2.6 $\pm$ 0.3
	EtOH	20.8 $\pm$ 0.1	34.4 $\pm$ 2.7	25.6 $\pm$ 0.3
B. forficata	Hex	NI	33.4 $\pm$ 0.2	55.1 $\pm$ 1.0
	EtOH	91.3 $\pm$ 0.2*	31.2 $\pm$ 2.6	100 $\pm$ 0.1*
C. sinensis	Hex	NI	30.3 $\pm$ 0.2	20.5 $\pm$ 0.3
	EtOH	NI	38.5 $\pm$ 2.6	28.0 $\pm$ 0.1
E. grandiflorus	Hex	NI	29.1 $\pm$ 0.8	21.3 $\pm$ 0.1
	EtOH	NI	29.8 $\pm$ 3.9	75.8 $\pm$ 17.0
M. charantia	Hex	NI	18.1 $\pm$ 1.8	14.8 $\pm$ 0.5
	EtOH	NI	26.9 $\pm$ 0.2	36.0 $\pm$ 4.5
M. recutita	Hex	1.1 $\pm$ 0.1	26.2 $\pm$ 2.7	41.2 $\pm$ 0.2
	EtOH	NI	24.1 $\pm$ 3.6	86.6 $\pm$ 0.3*
R. officinalis	Hex	NI	31.4 $\pm$ 0.4	27.7 $\pm$ 0.3
	EtOH	11.4 $\pm$ 1.8	29.6 $\pm$ 1.4	23.6 $\pm$ 0.3
S. cumini	Hex	38.8 $\pm$ 0.1	31.7 $\pm$ 0.6	NI
	EtOH	73.1 $\pm$ 0.2	33.8 $\pm$ 3.2	32.0 $\pm$ 3.6
Z. officinale	Hex	32.7 $\pm$ 0.1	35.0 $\pm$ 0.2	59.8 $\pm$ 3.6
	EtOH	NI	25.0 $\pm$ 0.6	30.6 $\pm$ 0.3
Acarbose	–	99.8 $\pm$ 0.1	73.3 $\pm$ 0.4	–
Orlistat	–	–	–	100 $\pm$ 0

Note: Values were expressed as mean  $\pm$  standard error; Hex – Hexane; EtOH – Ethanol; NI – Non-inhibition.

\* Difference was not significant in relation to control (Acarbose and Orlistat) ( $p < 0.05$ ).

extract exhibited antioxidant capacity close to ascorbic acid in the FRAP method (1714.0  $\pm$  7.4  $\mu$ mol trolox eq/g), the EtOH extracts of B. forficata and C. sinensis showed higher antioxidant capacity than other extracts (600.2  $\pm$  19.7 and 761.3  $\pm$  13.6  $\mu$ mol trolox eq/g, respectively). With re-gard to anti-glycation analysis, the EtOH extracts of M. recutita, Z. officinale, C. sinensis, R. officinalis, A. muricata, S. cumini, B. forficata and E. grandiflorus were able to inhibit the non-enzymatic glycation, with inhibition values higher than 50%. In addition, Hex extract of R. officinalis was the only Hex extract that presented high anti-glycation capacity (95.2  $\pm$  0.1%) (Table 3).

Therefore, antioxidant capacity measured by DPPH assay showed higher values (> 85%) for EtOH extracts of A. muricata, E. grandiflorus, S. cumini and both Hex and EtOH extracts of B. forficata, R. officinalis and Z. officinale. The same was observed for the ORAC and anti-glycation assays. With regard to ORAC assay, the EtOH extracts of A. muricata, C. sinensis, M. recutita and both extracts Hex and EtOH of R. officinalis presented values higher than 1000  $\mu$ mol trolox eq/g of antioxidant activity. With regard to anti-glycation assay, the EtOH extracts of A. muricata, B. forficata, C. sinensis, R. officinalis e S. cumini presented exceptional values higher than 98% of anti-glycation activity, similar to quercetin.

The IC<sub>50</sub> values for DPPH and anti-glycation assays were determined for extracts with results higher than 70% of antioxidant capacity and glycation inhibition, respectively (Fig. 2). The EtOH extract of B. forficata showed the lowest DPPH IC<sub>50</sub> value (0.7  $\pm$  0.1  $\mu$ g/mL) (Fig. 2A). The EtOH extracts of

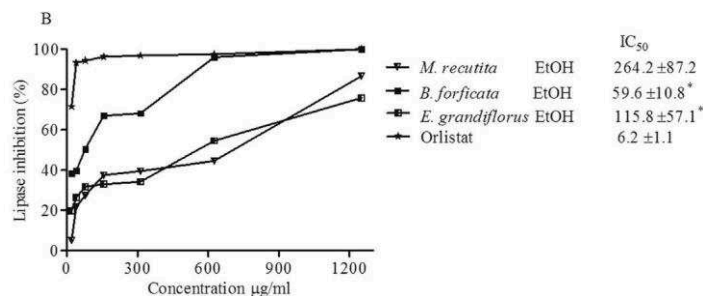
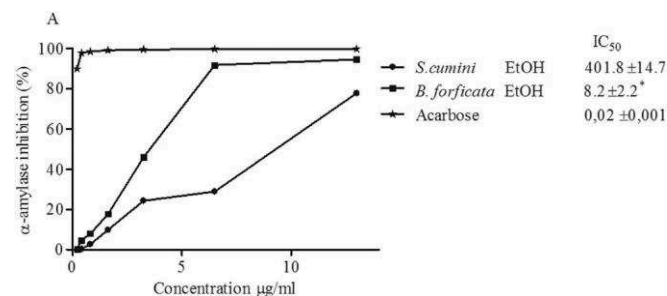


Fig. 1. Half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) values of extracts capable of inhibit more than 70% of  $\alpha$ -amylase (A) and pancreatic lipase (B) activities. \* Difference was not significant in relation to control (Acarbose and Orlistat) ( $p < 0.05$ ).

M. recutita, C. sinensis, A. muricata, S. cumini, E. grandiflorus, R. officinalis, Z. officinale, and Hex extracts of R. officinalis, Z. officinale and B. forficata exhibited DPPH IC<sub>50</sub> values lower than 100  $\mu$ g/mL.

The EtOH extracts of S. cumini, B. forficata and C. sinensis exhibited the lowest anti-glycation values (18.5  $\pm$  2.8, 22.7  $\pm$  4.4 and 39.6  $\pm$  8.4  $\mu$ g/mL), respectively, and the R. officinalis Hex extract showed IC<sub>50</sub> value of 438.1  $\pm$  84.9  $\mu$ g/mL. The anti-glycation IC<sub>50</sub> values are shown in Fig. 2C.

#### 4. Discussion

In this study, we evaluated the in vitro antioxidant and anti-glycation capacity and inhibitory activities against  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, lipase of EtOH and Hex extracts of ten medicinal plants traditionally used in type-2 diabetes treatment. Our main findings indicate that the EtOH extract of four of ten analyzed plants such as B. forficata, S. cumini, M. recutita and E. grandiflorus exhibited more than 70% of anti-oxidant and anti-glycation capacities, and enzymatic inhibitory activities. The B. forficata and S. cumini showed  $\alpha$ -amylase inhibition capacities, whereas B. forficata, M. recutita and E. grandiflorus were able to inhibit lipase activity. Previously, our group and others showed that plants used in diabetes treatment have the capacity to inhibit  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and high antioxidant capacity (de Gouveia et al., 2013, 2014) and lipase enzymes (Buchholz and Melzig, 2015; Pereira et al., 2017). The antioxidant capacity of these plants has the potential to combat the oxidation of biomolecules in the body (Moraes et al., 2015) and the inhibition of these digestive enzymes are related with control of post-prandial hyperglycemia (Toma et al., 2014) and decrease of hyperlipidemia (Lunagariya et al., 2014), which may reduce the damages caused by oxidative stress, protein glycation, such as inflammation, atherosclerosis and cardiovascular death (Veiraiah, 2005).

Based on literature, the use of hexane in the extraction process allows the isolation of apolar molecules, such as oxygenated flavonoids, coumarins, terpenoids and sesquiterpenes lactones (Bhat et al., 2005; De Monte et al., 2014). On the other hand, the use of ethanol allows the isolation of polar and semipolar substances, such as flavonols, alkaloids, flavones, polyphenols and tannins (De Monte et al., 2014; Tiwari et al., 2011). Previous studies have argued that polyphenols, including flavonoids, have an increased inhibitory effect of these enzymes depending on the number and position of the -OH groups (Karamac and Amarowicz, 1996; Tadera et al., 2006), also playing a role in anti-oxidant (Pietta, 2000) and anti-glycation reactions (Stefek, 2011).

Previously, a study conducted by Ferreres et al. (2012) showed the presence of kaempferol, myricetin and quercetin derivatives in hydro-methanolic extract of leaves of B. forficata, suggesting the relation between the concentration of flavonoids of this extract with its antioxidant and biological activities. These compounds are associated with inhibition of  $\alpha$ -amylase and lipase activities, as well as with antioxidant capacity (Tan et al., 2017), which justifies the results obtained in our study. It is worth mentioning that our work is the first to demonstrate the role of the EtOH extract of B. forficata in the control of non-enzymatic glycation.

In the present study, the EtOH extract of S. cumini also inhibited  $\alpha$ -



Table 3

Anti-glycation and antioxidant capacity analyzes of the hexane (Hex) and ethanol (EtOH) extracts of medicinal plants by DPPH, ORAC, FRAP and BSA/fructose methods. All extracts and positive controls were diluted in EtOH for antioxidants analyzes and in DMSO for anti-glycation assay at a concentration of 1 mg/mL (DPPH and FRAP), 100 µg/mL (ORAC) and 5 mg/mL (anti-glycation). Values are expressed as percentage of antioxidant and anti-glycation capacities (DPPH and anti-glycation assays, respectively) and µmol trolox equivalents/g (ORAC and FRAP).

Scientific name	Extract	DPPH (%)	ORAC (µmol trolox eq/g)	FRAP (µmolTroloxeq/g)	Anti-glycation (%)
A. lappa	Hex	22.8 ± 7.3	867.9 ± 36.6	15.2 ± 2.2	24.1 ± 1.0
	EtOH	72.8 ± 1.2	926.9 ± 48.3	58.7 ± 1.2	60.4 ± 0.1
A. muricata	Hex	46.9 ± 5.5	999.4 ± 17.9	54.9 ± 1.1	36.5 ± 0.7
	EtOH	96.1 ± 0.6*	1069.8 ± 8.2*	491.2 ± 4.9	99.3 ± 0.1*
B. forficata	Hex	85.5 ± 1.0*	855.8 ± 13.2	56.3 ± 2.1	50.5 ± 0.4
	EtOH	96.3 ± 0.8*	778.2 ± 5.4	600.2 ± 19.7	100 ± 0*
C. sinensis	Hex	99.7 ± 4.7*	760.1 ± 0.3	57.9 ± 2.6	42.8 ± 1.1
	EtOH	83.1 ± 0.5	1075.2 ± 13.7*	761.3 ± 13.6	100 ± 0*
E. grandiflorus	Hex	21.3 ± 4.3	737.7 ± 49.1	22.4 ± 0.2	28.5 ± 0.9
	EtOH	88.7 ± 0.7*	1039.4 ± 1.4	90.3 ± 2.3	72.7 ± 0.1
M. charantia	Hex	41.3 ± 3.2	903.1 ± 2.8	29.6 ± 1.7	36.1 ± 0.1
	EtOH	26.3 ± 3.9	861.3 ± 24.1	15.2 ± 0.8	24.6 ± 0.1
M. recutita	Hex	14.2 ± 4.7	826.2 ± 6.2	18.4 ± 0.1	23.7 ± 0.3
	EtOH	79.4 ± 4.6	1103.7 ± 7.4*	106.1 ± 2.7	80.2 ± 0.1
R. officinalis	Hex	95.7 ± 0.5*	1166.9 ± 14.9*	246.5 ± 8.9	95.2 ± 0.1
	EtOH	96.5 ± 0.1*	1088.1 ± 11.8*	409.2 ± 9.4	98.2 ± 0.1*
S. cumini	Hex	57.9 ± 2.8	935.1 ± 19.2	36.9 ± 2.7	52.2 ± 0.1
	EtOH	97.6 ± 0.4*	1034.4 ± 11.8	431.0 ± 12.9	100 ± 0*
Z. officinale	Hex	92.2 ± 1.0*	985.1 ± 3.3	394.2 ± 15.6	38.1 ± 0.3
	EtOH	100 ± 0*	878.5 ± 3.6	382.6 ± 0.9	81.1 ± 0.1
Ascorbic acid	Control	100 ± 0	1136.0 ± 27.1	1714.0 ± 7.4	–
Quercetin	Control	–	–	–	100 ± 0

Note: Values were expressed as mean ± standard error; Hex – Hexane; EtOH – Ethanol.

\* Difference was not significant in relation to control (Ascorbic acid and Quercetin) ( $p < 0.05$ ).

amylase in addition to having high antioxidant and anti-glycation capacities. A previous study showed inhibition of human pancreatic  $\alpha$ -amylase (Ponnusamy et al., 2010), and porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase (Poongunran et al., 2017) by both the aqueous and ethyl acetate extracts of *S. cumini*, respectively. These findings may be related with the compounds present in *S. cumini* leaves, such as terpenes ursolic and oleanolic acid, which were described as inhibitors of  $\alpha$ -amylase activity (Poongunran et al., 2017). In addition, the capacity of the EtOH extract of *S. cumini* to reduce the oxidation and protein glycation corroborates previous studies, where aqueous extract of *S. cumini* leaves had anti-oxidant capacity (Ruan et al., 2008), and methanol extract of *S. cumini* leaves inhibited protein glycation (Perera and Premadasa, 2016). The high antioxidant and anti-glycation capacities of these extracts may be related to presence of flavonoids, such as quercetin, myricetin, isochlorogenic acid and flavonol glycosides (Ramya et al., 2012).

With regard to *E. grandiflorus*, our results showed that the EtOH extract inhibited lipase activity and presented high antioxidant and anti-glycation capacities. Previous studies indicated properties to inhibit lipase activity by methanol extract of *E. grandiflorus* leaves (Souza et al., 2012). Recently, flavonoids such as isoorientin, isovitexin, swertijaponin, swertisin and chicoric, caffeic and ferulic phenolic acids, were described in leaves of *E. grandiflorus* (Garcia Ede et al., 2010; Marques et al., 2017). It is well documented that isoorientin (Lunagariya et al., 2014) and isovitexin (Sreerama et al., 2012) inhibit lipase activity, which justifies the pancreatic lipase inhibitory activity of *E. grandiflorus* EtOH extract. In addition, our results corroborate another study that showed that the tea from *E. grandiflorus* has anti-oxidant capacity (Lunardi et al., 2014).

We also highlight the EtOH extract of *M. recutita* flowers, which also inhibited the lipase enzyme and showed high antioxidant and anti-glycation capacities. A study showed that the EtOH extract of *M. recutita* has antioxidant capacity (Pereira et al., 2009), and that its tea has anti-glycation properties (Otake et al., 2015). In the same way, EtOH extract of *M. recutita* flowers has flavonoids such as quercetin, luteolin, patuletin, apigenin, and ferulic and caffeic acids (Srivastava et al., 2010). Among these flavonoids, bisabolol and farnesene have inhibitory capacity against lipase activity (Srivastava et al., 2010).

We also showed that the EtOH extracts of leaves of *R. officinalis*, *A.*

*lappa*, *A. muricata* and rhizome of *Z. officinale* presents high antioxidant and anti-glycation capacities. In addition, the EtOH extract of the *Z. officinale* rhizome was also able to inhibit the lipase enzyme. According to Rani et al. (2012), the ethyl acetate extract of *Z. officinale* rhizome presents high antioxidant capacity and is capable of acting in the anti-glycation process. In addition, the work of Gholamhoseinian et al. (2010) indicates that the methanolic extract of this rhizome acts as an inhibitor of the porcine pancreatic lipase. Other works have also pointed out the hydroalcoholic extracts of the leaves of *R. officinalis* (Kim and Kim, 2003), *A. lappa* (Lou et al., 2010) and *A. muricata* (Gavamukulya et al., 2014) as antioxidants. However, this is the first study to show their role in the anti-glycation process.

In summary, our results suggest ten selected medicinal plants with prominent antioxidant and anti-glycation properties besides being able to inhibit digestive enzymes involved in the carbohydrate and lipid digestion. EtOH extracts of *B. forficata*, *S. cumini*, *M. recutita* and *E. grandiflorus* showed the highest antioxidant and anti-glycation capacities and inhibitory activities against  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and lipase. This study presented new results on the biological activities of these medicinal plants, mainly regarding to the high antioxidant capacity of the EtOH extracts, which contributes to the understanding of action and the efficacy of their use in the management of diabetes mellitus and its complications. Thus, these results add value to traditional knowledge and open new possibilities for further in vivo assays in order to assess the antidiabetic potential of these plants.

#### Acknowledgments

This work was supported by the Minas Gerais State Agency for Research and Development (FAPEMIG – APQ-01856-14, APQQ6 02659-12). RRF, ABJ, FBRM received graduate fellowships from Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), DSC and HCGS, received scientific initiation fellowships fellowships from National Council for Scientific and Technological Development (CNPq). LGP received post-doctoral fellowships from National Postdoctoral Program (PNPD/CAPES - 1743115) and FSE is grant recipients of CNPq (308965/2015-9).

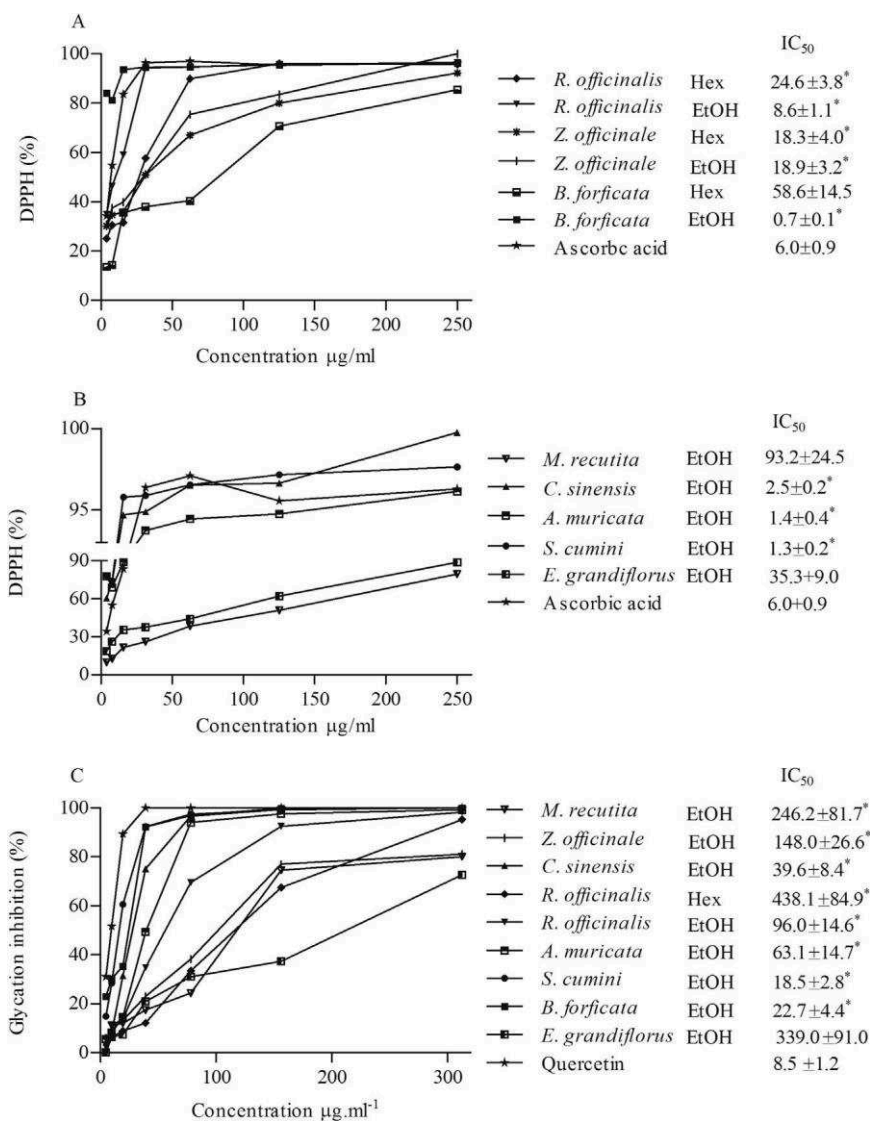


Fig. 2. Half maximum inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of extracts with antioxidant capacity by DPPH assay and anti-glycation capacity by BSA-fructose assay. (A) DPPH IC<sub>50</sub> values of hexane (Hex) and ethanol (EtOH) extracts. (B) DPPH IC<sub>50</sub> values of only ethanol (EtOH) extract. (C) Anti-glycation IC<sub>50</sub> values of hexane (Hex) and ethanol (EtOH) extracts. \*Difference was not significant in relation to control (ascorbic acid and quercetin) ( $p < 0.05$ ).

## Conflict of interest

The authors have declared that there is no conflict of interest.

## Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.jep.2017.12.032.

## References

- Alonso-Castro, A.J., Zapata-Bustos, R., Gómez-Espinoza, G., Salazar-Olivo, L.A., 2012. Isoorientin reverts TNF- $\alpha$ -induced insulin resistance in adipocytes activating the in-sulin signaling pathway. *Endocrinology* 153 (11), 5222–5230.
- Bahmani, M., Zargaran, A., Rafieian-Kopaei, M., Saki, K., 2014. Ethnobotanical study of medicinal plants used in the management of diabetes mellitus in the Urmia, Northwest Iran. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 7, S348–S354.
- Bakrel, T., Bakrel, U., Keleş, O.Ü., Ülgen, S.G., Yardibi, H., 2008. In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits. *J. Ethnopharmacol.* 116 (1), 64–73.
- Bhandari, U., Pillai, K., 2005. Effect of ethanolic extract of *Zingiber officinale* on dyslipidaemia in diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 97 (2), 227–230.
- Bhat, S.V., Nagasampagi, B.A., Sivakumar, M., 2005. *Chemistry of Natural Products*. Alpha Science Int'l Ltd.
- Bolson, M., Hefler, S.R., Dall, E.I., Chaves, O., Junior, A.G., Junior, E.L.C., 2015. Ethnomedicinal study of plants used for treatment of human ailments, with residents of the surrounding region of forest fragments of Paraná, Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 161, 1–10.
- Buchholz, T., Melzig, M.F., 2015. Polyphenolic compounds as pancreatic lipase inhibitors. *Planta Med.* 81 (10), 771–783.
- Caccia-Bava, M.D.C.G.G., Bertoni, B.W., Pereira, A.M.S., Martinez, E.Z., 2017. Availability of herbal medicines and medicinal plants in the primary health facilities of the state of São Paulo, Southeast Brazil: results from the National Program for Access and Quality Improvement in Primary Care. *Ciênc. Saúde Colet.* 22 (5), 1651–1659.
- Cemek, M., Kağa, S., Şimşek, N., Büyükköroğlu, M.E., Konuk, M., 2008. Antihyperglycemic and antioxidative potential of *Matricaria chamomilla* L. in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Nat. Med.* 62 (3), 284–293.
- da Silva Santos, T.V., Teixeira, R.R., Franco, D.L., Maduro, J.M., Brito-Maduro, A.G., Espindola, F.S., 2012. Bioelectrode for detection of human salivary amylase. *Mater. Sci. Eng.: C* 32 (3), 530–535.
- Daily, J.W., Yang, M., Kim, D.S., Park, S., 2015. Efficacy of ginger for treating type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *J. Ethn. Foods* 2 (1), 36–43.
- Damasceno, A.A., 2007. Levantamento Etnobotânico na Comunidade Martinésia, Uberlândia – MG. Monografia (Bacharelado do Curso de Ciências Biológicas) - Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, pp. 26.
- Damasceno, D., Volpato, G., Calderon, Id.M.P., Aguilar, R., Rudge, M.C., 2004. Effect of *Bauhinia forficata* extract in diabetic pregnant rats: maternal repercussions. *Phytomed. : Int. J. Phytother. Phytopharm.* 11 (2–3), 196–201.
- De Monte, C., Carradori, S., Granese, A., Di Piero, G.B., Leonardo, C., De Nunzio, C., 2014. Modern extraction techniques and their impact on the pharmacological profile of *Serenoa repens* extracts for the treatment of lower urinary tract symptoms. *BMC Urol.* 14 (1), 63.
- Ferreres, F., Gil-Izquierdo, A., Vinholes, J., Silva, S.T., Valentão, P., Andrade, P.B., 2012. *Bauhinia forficata* link authenticity using flavonoids profile: relation with their biological properties. *Food Chem.* 134 (2), 894–904.
- Florence, N.T., Benoit, M.Z., Jonas, K., Alexandra, T., Désiré, D.D.P., Pierre, K., Théophile, D., 2014. Antidiabetic and antioxidant effects of *Annona muricata* (Annonaceae), aqueous extract on streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 151 (2), 784–790.
- Fuangchan, A., Sonthisombat, P., Seubnukarn, T., Chanouan, R., Chotchaisuwat, P., Sirikulsatien, V., Ingkaninan, K., Plianbangchang, P., Haines, S.T., 2011. Hypoglycemic effect of bitter melon compared with metformin in newly diagnosed

- type 2 diabetes patients. *J. Ethnopharmacol.* 134 (2), 422–428.
- Garcia Ede, F., de Oliveira, M.A., Godin, A.M., Ferreira, W.C., Bastos, L.F., Coelho Mde, M., Braga, F.C., 2010. Antiedematogenic activity and phytochemical composition of preparations from *Echinodorus grandiflorus* leaves. *Phytomed.: Int. J. Phytother. Phytopharm.* 18 (1), 80–86.
- Gavamukulya, Y., Abou-Ellella, F., Wamunyokoli, F., AEI-Shemy, H., 2014. Phytochemical screening, anti-oxidant activity and in vitro anticancer potential of ethanolic and water leaves extracts of *Annona muricata* (Graviola). *Asian Pac. J. Trop. Med.* 7, S355–S363.
- Gholamhosseinian, A., Shahouzhi, B., Sharifi-Far, F., 2010. Inhibitory effect of some plant extracts on pancreatic lipase. *Int. J. Pharmacol.* 6 (1), 18–24.
- Giacco, F., Brownlee, M., 2010. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ. Res.* 107 (9), 1058–1070.
- Gomes, M.V.L., 2008. Conhecimento popular e levantamento fitossociológico dos recursos vegetais do cerrado nos distritos de Martinésia, Cruzeiro dos Peixotos, Uberlândia – MG. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, MG.
- de Gouveia, N.M., Albuquerque, C.L., Espindola, L.S., Espindola, F.S., 2013. Pouteria ramiflora extract inhibits salivary amylolytic activity and decreases glycemic level in mice. *An. Acad. Bras. Ciências* 85 (3), 1141–1148.
- de Gouveia, N.M., Alves, F.V., Furtado, F.B., Scherer, D.L., Mundim, A.V., Espindola, F.S., 2014. An in vitro and in vivo study of the  $\alpha$ -amylase activity of phaseolamin. *J. Med. Food* 17 (8), 915–920.
- Gulati, V., Harding, I.H., Palombo, E.A., 2012. Enzyme inhibitory and antioxidant activities of traditional medicinal plants: potential application in the management of hyperglycemia. *BMC Complement. Altern. Med.* 12 (1), 77.
- Haidari, F., Omidian, K., Rafiei, H., Zarei, M., Shahi, M.M., 2013. Green tea (*Camellia sinensis*) supplementation to diabetic rats improves serum and hepatic oxidative stress markers. *Iran. J. Pharm. Res.* 12 (1), 109.
- Halberstein, R.A., 2005. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. *Ann. Epidemiol.* 15 (9), 686–699.
- Harsha, P.S., Lavelli, V., Scarafoni, A., 2014. Protective ability of phenolics from white grape vinification by-products against structural damage of bovine serum albumin induced by glycation. *Food Chem.* 156, 220–226.
- Jabri, M.-A., Sakly, M., Marzouki, L., Sebai, H., 2017. Chamomile (*Matricaria recutita* L.) decoction extract inhibits in vitro intestinal glucose absorption and attenuates high fat diet-induced lipotoxicity and oxidative stress. *Biomed. Pharmacother.* 87, 153–159.
- Jones, W.P., Kinghorn, A.D., 2012. Extraction of plant secondary metabolites. In: Sarker, S.D., Nahar, L. (Eds.), *Natural Products Isolation*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 341–366.
- Jorge, A.P., Horst, H., de Sousa, E., Pizzolatti, M.G., Silva, F.R.M.B., 2004. Insulinomimetic effects of kaempferitrin on glycaemia and on 14 C-glucose uptake in rat soleus muscle. *Chem. Biol. Interact.* 149 (2), 89–96.
- Justino, A.B., Pereira, M.N., Vilela, D.D., Peixoto, L.G., Martins, M.M., Teixeira, R.R., Miranda, N.C., da Silva, N.M., de Sousa, R.M., de Oliveira, A., 2016. Peel of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) as a source of antioxidant compounds with  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and glycation inhibitory activities. *Bioorg. Chem.* 69, 167–182.
- Karamac, M., Amarowicz, R., 1996. Inhibition of pancreatic lipase by phenolic acids—examination in vitro. *Z. Nat. C. J. Biosci.* 51 (11–12), 903–905.
- Kardosová, A., Machova, E., 2006. Antioxidant activity of medicinal plant polysaccharides. *Fitoterapia* 77 (5), 367–373.
- Kedare, S.B., Singh, R.P., 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J. Food Sci. Technol.* 48 (4), 412–422.
- Kim, H.Y., Kim, K., 2003. Protein glycation inhibitory and antioxidative activities of some plant extracts in vitro. *J. Agric. Food Chem.* 51 (6), 1586–1591.
- Lou, Z., Wang, H., Li, J., Chen, S., Zhu, S., Ma, C., Wang, Z., 2010. Antioxidant activity and chemical composition of the fractions from burdock leaves. *J. Food Sci.* 75 (5).
- Lunagariya, N.A., Patel, N.K., Jagtap, S.C., Bhutani, K.K., 2014. Inhibitors of pancreatic lipase: state of the art and clinical perspectives. *EXCLI J.* 13, 897–921.
- Lunardi, R.F., Wohlenberg, M., Medeiros, N., Agostini, F., Funchal, C., Dani, C., 2014. In vitro antioxidant capacity of tea of *Echinodorus grandiflorus*, leather hat, in Wistar rat liver. *An. Acad. Bras. Ciências* 86, 1451–1462.
- Machado, H.L., 2008. Levantamento Etnobotânico de Plantas Medicinais e Fitoterápicos utilizados por idosos frequentadores de um programa de atividades físicas (AFRID) em Uberlândia – MG. Monografia (Bacharelado em Farmácia), Universidade Presidente Antônio Carlos, MG, pp. 88.
- Marques, A.M., Provance, D.W., Kaplan, M.A.C., Figueiredo, M.R., 2017. *Echinodorus grandiflorus*: ethnobotanical, phytochemical and pharmacological overview of a medicinal plant used in Brazil. *Food Chem. Toxicol.*
- McDougall, G.J., Shpiro, F., Dobson, P., Smith, P., Blake, A., Stewart, D., 2005. Different polyphenolic components of soft fruits inhibit  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase. *J. Agric. Food Chem.* 53 (7), 2760–2766.
- Milani, J.F., 2007. Levantamento Etnobotânico nos quintais do Distrito de Cruzeiro dos Peixotos, Uberlândia, MG: educação Ambiental a partir deste resgate. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, MG.
- Mohamed, A.A., Ali, S.I., El-Baz, F.K., 2013. Antioxidant and antibacterial activities of crude extracts and essential oils of *Syzygium cumini* leaves. *PLoS One* 8 (4), e60269.
- Moraes, I.B., Manzan-Martins, C., de Gouveia, N.M., Calábria, L.K., Hiraki, K.R.N., Moraes, A.D.S., Espindola, F.S., 2015. Polyploidy analysis and attenuation of oxidative stress in hepatic tissue of STZ-induced diabetic rats treated with an aqueous extract of *Vochysia rufa*. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2015.
- Oliveira, M.R., 2010. Rede Fitocerrado: identificação de Práticas Populares em Uberlândia – MG com plantas medicinais e atividades de capacitação através de cursos e oficinas. Monografia (Bacharelado do Curso de Ciências Biológicas) - Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, pp. 47.
- Oliveira, T.G., 2008. O conhecimento dos usos de plantas do bioma Cerrado nos distritos de Tapuirama e Miraporanga, Uberlândia – MG. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, MG, pp. 42.
- Ota, A., Ulrih, N.P., 2017. An overview of herbal products and secondary metabolites used for management of type two diabetes. *Front. Pharmacol.* 8, 436.
- Otake, K., Yagi, M., Takabe, W., Yonei, Y., 2015. Effect of tea (*Camellia sinensis*) and herbs on advanced glycation endproduct formation and the influence of post-fermentation. *Glycative Stress Res.* 2, 156–162.
- Pereira, J.F.Q., 2008. Propostas de Educação Ambiental a partir do resgate dos quintais e seu valor etnobotânico no distrito de Tapuirama, Uberlândia, MG. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, MG, pp. 69.
- Pereira, M.N., Justino, A.B., Martins, M.M., Peixoto, L.G., Vilela, D.D., Santos, P.S., Teixeira, T.L., da Silva, C.V., Goulart, L.R., Pivatto, M., Espindola, F.S., 2017. Stephalagine, an alkaloid with pancreatic lipase inhibitory activity isolated from the fruit peel of *Annona crassiflora* Mart. *Ind. Crops Prod.* 97, 324–329.
- Pereira, R.P., Fachineto, R., de Souza Prestes, A., Puntel, R.L., Santos da Silva, G.N., Heinzmann, B.M., Boschetti, T.K., Athayde, M.L., Bürger, M.E., Morel, A.F., 2009. Antioxidant effects of different extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus*. *Neurochem. Res.* 34 (5), 973–983.
- Perera, H., Premadasa, W., 2016. Heat stable inhibitors of protein cross-linking from Sri Lankan medicinal plants. *Br. J. Pharm. Res.* 9 (3), 1–11.
- Pietta, P.-G., 2000. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* 63 (7), 1035–1042.
- Ponnusamy, S., Ravindran, R., Zinjarde, S., Bhargava, S., Ravi Kumar, A., 2010. Evaluation of traditional Indian antidiabetic medicinal plants for human pancreatic amylase inhibitory effect in vitro. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2011.
- Poongunran, J., Perera, H.K.I., Jayasinghe, L., Fernando, I.T., Sivakanesan, R., Araya, H., Fujimoto, Y., 2017. Bioassay-guided fractionation and identification of  $\alpha$ -amylase inhibitors from *Syzygium cumini* leaves. *Pharm. Biol.* 55 (1), 206–211.
- Ramya, S., Neethirajan, K., Jayakumararaj, R., 2012. Profile of bioactive compounds in *Syzygium cumini* – a review. *J. Pharm. Res.* 5, 4548–4553.
- Rani, M.P., Krishna, M.S., Padmakumari, K.P., Raghu, K.G., Sundaresan, A., 2012. Zingiber officinale extract exhibits antidiabetic potential via modulating glucose uptake, protein glycation and inhibiting adipocyte differentiation: an in vitro study. *J. Sci. Food Agric.* 92 (9), 1948–1955.
- Resende, R.F., 2007. Análise Etnobotânica e resgate da sabedoria popular no uso de plantas medicinais nos municípios de Uberlândia, Araguaçu e Uberaba, MG. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, MG, pp. 46.
- Rodríguez-Bonilla, P., Gandía-Herrero, F., Matencio, A., García-Carmona, F., López-Nicolás, J.M., 2017. Comparative study of the antioxidant capacity of four stilbenes using ORAC, ABTS+, and FRAP techniques. *Food Anal. Methods* 1–7.
- Ruan, Z.P., Zhang, L.L., Lin, Y.M., 2008. Evaluation of the antioxidant activity of *Syzygium cumini* leaves. *Molecules* 13 (10), 2545–2556.
- Salgado, C.L., 2007. O conhecimento popular sobre plantas: um estudo etnobotânico em quintais do distrito de Martinésia, Uberlândia – MG. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, MG.
- Semenya, S., Potgieter, M., Erasmus, L., 2012. Ethnobotanical survey of medicinal plants used by Bapedi healers to treat diabetes mellitus in the Limpopo Province, South Africa. *J. Ethnopharmacol.* 141 (1), 440–445.
- Silva, F.R.M.B., Szpoganicz, B., Pizzolatti, M.G., Willrich, M.A.V., de Sousa, E., 2002. Acute effect of *Bauhinia forficata* on serum glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 83 (1), 33–37.
- Souza, S.P., Pereira, L.L.S., Souza, A.A., Santos, C.D., 2012. Seleção de extratos brutos de plantas com atividade antiobesidade. *Rev. Bras. Plantas Med.* 14, 643–648.
- Sreerama, Y.N., Takahashi, Y., Yamaki, K., 2012. Phenolic antioxidants in some vigna species of legumes and their distinct inhibitory effects on  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic lipase activities. *J. Food Sci.* 77 (9).
- Srivastava, J.K., Shankar, E., Gupta, S., 2010. Chamomile: a herbal medicine of the past with bright future. *Mol. Med. Rep.* 3 (6), 895–901.
- Stefek, M., 2011. Natural flavonoids as potential multifunctional agents in prevention of diabetic cataract. *Interdiscip. Toxicol.* 4 (2), 69–77.
- Tadera, K., Minami, Y., Takamatsu, K., Matsuoka, T., 2006. Inhibition of alpha-glucosidase and alpha-amylase by flavonoids. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 52 (2), 149–153.
- Tan, Y., Chang, S.K., Zhang, Y., 2017. Comparison of  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and lipase inhibitory activity of the phenolic substances in two black legumes of different genera. *Food Chem.* 214, 259–268.
- Tang, W., Li, S., Liu, Y., Huang, M.-T., Ho, C.-T., 2013. Anti-diabetic activity of chemically profiled green tea and black tea extracts in a type 2 diabetes mice model via different mechanisms. *J. Funct. Foods* 5 (4), 1784–1793.
- Tenorio-Rodríguez, P.A., Murillo-Álvarez, J.I., Campa-Cordova, Á.I., Angulo, C., 2017. Antioxidant screening and phenolic content of ethanol extracts of selected Baja California Peninsula macroalgae. *J. Food Sci. Technol.* 54 (2), 422–429.
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., Kaur, H., 2011. Phytochemical screening and extraction: a review. *Int. Pharm. Sci.* 1 (1), 98–106.
- Toma, A., Makonnen, E., Mekonnen, Y., Debella, A., Addisakwattana, S., 2014. Intestinal  $\alpha$ -glucosidase and some pancreatic enzymes inhibitory effect of hydroalcoholic extract of *Moringa stenopetalata* leaves. *BMC Complement. Altern. Med.* 14 (1), 180.
- Trojan-Rodrigues, M., Alves, T., Soares, G., Ritter, M., 2012. Plants used as antidiabetic in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 139 (1), 155–163.
- Tsai, T.-H., Huang, C.-J., Wu, W.-H., Huang, W.-C., Chyuan, J.-H., Tsai, P.-J., 2014. Antioxidant, cell-protective, and anti-melanogenic activities of leaf extracts from wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* Ser.) cultivars. *Bot. Stud.* 55 (1), 78.
- Veiraiha, A., 2005. Hyperglycemia, lipoprotein glycation, and vascular disease. *Angiology* 56 (4), 431–438.
- WHO, 2016. World Health Day 2016: WHO Calls for Global Action to Halt Rise in and Improve Care for People with Diabetes.
- Wu, C.-H., Yen, G.-C., 2005. Inhibitory effect of naturally occurring flavonoids on the formation of advanced glycation endproducts. *J. Agric. Food Chem.* 53 (8), 3167–3173.
- Yamaguchi, F., Ariga, T., Yoshimura, Y., Nakazawa, H., 2000. Antioxidative and anti-glycation activity of garcinol from *Garcinia indica* fruit rind. *J. Agric. Food Chem.* 48 (2), 180–185.