



**THALITA GONELLI**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIDIABÉTICO E  
VASODILATADOR DOS EXTRATOS DE *Tournefortia  
paniculata* Vent**

**LAVRAS – MG  
2021**

**THALITA GONELLI**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIDIABÉTICO E VASODILATADOR DOS  
EXTRATOS DE *Tournefortia paniculata* Vent**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, para obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Aline Carvalho Pereira  
Orientadora

Profa. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci  
Coorientadora

**LAVRAS - MG**

**2021**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Gonelli, Thalita.

Avaliação do potencial antidiabético e vasodilatador dos  
extratos de *Tournefortia paniculata* Vent / Thalita Gonelli. - 2021.  
62 p.: il.

Orientador(a): Aline Carvalho Pereira.

Coorientador(a): Suzan Kelly Vilela Bertolucci.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Inibição enzimática. 2. Glicação. 3. Vasorelaxante. I.  
Carvalho Pereira, Aline. II. Vilela Bertolucci, Suzan Kelly. III.  
Título.

**THALITA GONELLI**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIDIABÉTICO E VASODILATADOR DOS  
EXTRATOS DE *Tournefortia paniculata* Vent**

**EVALUATION OF THE ANTIDIABETIC POTENTIAL AND VASODILATOR OF  
THE EXTRACTS OF *Tournefortia paniculata* Vent**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 19 de outubro de 2021.

Dra. Aline Carvalho Pereira (Presidente) - UFLA

Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci - UFLA

Dr. Eduardo Damasceno Costa - FCV

Dr. Wanderley José Mantovani Bittencourt - UNILAVRAS

Dr. Alexandre Alves de Carvalho - UFLA

Profa. Dra. Aline Carvalho Pereira

Orientadora

Profa. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci

Coorientadora

**LAVRAS - MG**

**2021**

*Aos meus pais pelo incentivo, carinho, apoio e amor incondicional.*

*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por apoiarem minhas escolhas, pelo incentivo, por acreditarem na minha capacidade e por sempre estarem presentes.

Ao meu marido, Luiz Fernando, pelo apoio nos momentos difíceis, pelas conversas, pelo carinho e suporte.

À toda minha família pelo apoio e incentivo.

Às minhas amigas Natália Jardim, Júlia Campos, Clara Loureiro e Alice Braga pela amizade e companheirismo.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) pela estrutura e oportunidade em poder realizar meu sonho.

Ao Programa de Pós-graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares pela oportunidade concedida de realizar o mestrado.

Ao Laboratório de Fitoquímica do Horto de Plantas Medicinais pela acolhida e estrutura fornecida para realização dos experimentos.

Ao Laboratório de Fisiologia e Farmacologia do Departamento de Medicina Veterinária pela acolhida e disponibilidade.

À professora Dra. Aline Pereira Carvalho, minha orientadora, pelo apoio, dedicação, confiança, paciência, pela ajuda na execução dos experimentos, análise dos dados e principalmente, suporte nos dias mais difíceis.

À professora Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci, minha coorientadora, pelo conhecimento, disponibilidade, confiança e acolhida em seu laboratório de fitoquímica.

Ao professor Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto pela confiança e oportunidade.

Ao Professor Manoel Losada Gavilanes pelos ensinamentos e apoio.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares da Universidade Federal de Lavras pelos ensinamentos transmitidos e pela disponibilidade em ajudar.

À equipe técnica do Laboratório de Fitoquímica e do Horto de Plantas Medicinais, Dico, Paulinho, Giulia e em especial, Annete de Jesus Boari Lima pelo auxílio nos experimentos.

À secretária do Programa de Pós-graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares Ana Luiza Rufini Pinto pela disponibilidade.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, em especial, Anna Olímpio, Adriane Duarte, Juliana Pace Salimena, Débora Ribeiro, Hebe Freire, Érica Marques, Júlia Assunção e Welligrton Tavares pela amizade e auxílio.

Aos colegas do NEMAC/NEPRON pelos aprendizados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte ao longo da pesquisa.

## RESUMO GERAL

*Tournefortia paniculata* Vent, sinônimo de *Myriopus paniculatus* (Cham.) Feuillet, é uma planta conhecida como marmelinho e utilizada popularmente como diurética e antidiabética. Os estudos sobre suas atividades biológicas e fitoquímica são escassos. Visto isso, objetivou-se avaliar o perfil químico e o efeito dos extratos de *Tournefortia paniculata* sobre a enzima  $\alpha$ -glicosidase, a glicação proteica e tónus vascular. Os extratos foram obtidos por refluxo, a partir das folhas secas e pulverizadas, com solventes de polaridades crescente, sendo eles: hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol e água. No teste de inibição *in vitro* da enzima  $\alpha$ -glicosidase os extratos (1mg/mL) que obtiveram melhor desempenho foram acetato de etila (60,3  $\pm$ 8%) e metanol (56,2  $\pm$ 5,4%). Em outras concentrações não foi observada inibição. Todos os extratos (1mg/mL), com exceção do aquoso, apresentaram atividade antiglicante: hexano (82,5 $\pm$ 7,5%), diclorometano (84,3 $\pm$ 0,88%), acetato de etila (95,2 $\pm$ 1,8%) e metanol (89,7 $\pm$ 5,6%). A avaliação do potencial relaxante após serotonina mostrou novamente que os resultados mais potentes foram dos extratos acetato de etila (83,4  $\pm$ 4,0%) e metanol (64,1  $\pm$ 15,6%). Também foi avaliada a relação entre o perfil químico e suas atividades biológicas através de análises de perfis cromatográficos por CLAE-DAD e de componentes principais (PCA). Os perfis cromatográficos dos extratos hexânico, diclorometânico e acetato de etila foram mais complexos que os metanólico e aquoso. Correlação positiva entre picos majoritários dos extratos em acetato de etila e metanol e as atividades biológicas avaliadas foi observada na análise de componentes principais. Conclui-se que os extratos em acetato de etila e metanólico de *Tournefortia paniculata* possui potencial de prevenção e tratamento do diabetes, assim como no tratamento de doenças cardiovasculares.

**Palavras-chave:** Marmelinho. *Myriopus paniculatus*. Inibição enzimática.  $\alpha$ -glicosidase. Glicação. Vasorelaxante.



## ABSTRACT

*Tournefortia paniculata* Vent, a synonym of *Myriopus paniculatus* (Cham.) Feuillet, is a plant known as marmelinho and popularly used as a diuretic and antidiabetic. Studies on its biological and phytochemical activities are scarce. Thus, this study aimed to characterize the chemical profile and the effect of *Tournefortia panicu* extracts on the  $\alpha$ -glucosidase enzyme, protein glycation and vascular tone. The extracts were obtained by reflux, from the dried and pulverized, with solvents of different polarities: hexane, dichloromethane, ethyl acetate, methanol, and water. In the in vitro inhibition test of the  $\alpha$ -glucosidase enzyme, the extracts (1mg/mL) that had the best performance were ethyl acetate (60.3  $\pm$ 8%) and methanol (56.2  $\pm$ 5.4%) in the other concentrations no inhibition was observed. All extracts (1mg/mL), except the aqueous extract, showed antiglycant activity: Hexane (82.5 $\pm$ 7.5%), dichloromethane (84.3 $\pm$ 0.88%), ethyl acetate (95.2 $\pm$  1.8%) and methanol (89.7 $\pm$ 5.6%). The evaluation of the relaxing potential after serotonin again showed that the most potent results were from the ethyl acetate (83.4  $\pm$ 4.0%) and methanol (64.1  $\pm$ 15.6%) extracts. The relation between the chemical profile and its biological activities was also evaluated through chromatographic profile by HPLC-DAD and principal component analysis (PCA). The PCA between the biological activities and the areas of the 10 major peaks of the chromatographic profiles indicated a positive correlation between the ethyl acetate and methanol extract and its biological effect. It is concluded that *Tournefortia panicu*, especially ethyl acetate and methanol extract, has potential for the prevention and treatment of diabetes, as well as for the treatment of cardiovascular diseases.

**Keywords:** *Myriopus paniculatus*. Enzyme inhibition.  $\alpha$ -glycosidase. Glycation. Vasorelaxant.

## LISTA DE FIGURAS

### PRIMEIRA PARTE

Figura 1 - Mecanismo de ação dos inibidores da $\alpha$ -glicosidase.....	20
Figura 2 - Mecanismo de contração do músculo liso.....	23
Figura 3 - A espécie <i>Tournefortia paniculata</i> .....	26

### SEGUNDA PARTE – ARTIGO

Figura 1 - Exemplo de banho de órgãos isolados.....	42
Figura 2 - Porcentagem de inibição da enzima $\alpha$ -glicosidase em relação aos extratos de <i>Tournefortia paniculata</i> . Resultados dos extratos nas concentrações de 0,1mg/mL e 1,0 mg/mL.....	45
Figura 3 - Porcentagem de inibição da glicação em relação aos extratos de <i>Tournefortia paniculata</i> . Resultados dos extratos nas concentrações de 0,1mg/mL e 1,0 mg/mL.	46
Figura 4 - Porcentagem de relaxamento vascular após pré-contração com KCl mediante tratamentos com extratos de <i>Tournefortia paniculata</i>	47
Figura 5 - Porcentagem de relaxamento vascular após pré-contração com serotonina mediante tratamentos com extratos de <i>Tournefortia paniculata</i>	48
Figura 6 - Perfis cromatográficos por CLAE-DAD para os extratos de <i>Tournefortia paniculata</i> a 210 nm.	51
Figura 7 - Graficos de scores e loadings para PCA (PCA1 x PCA2) dos extratos de <i>Tournefortia paniculata</i> (scores) e dos 10 picos de maior área relativa analisados por análise de impressão digital por CLAE-DAD e atividades biológicas (loadings).	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Teor (%) dos extratos de <i>T. paniculata</i> obtidos com diferentes solventes.	39
Tabela 2 - Gradiente linear de eluição empregado para registro dos perfis cromatográficos exploratórios por CLAE.....	44
Tabela 3 - Picos selecionados da impressão digital obtida por CLAE-DAD a 210 nm para fins de análise de componentes principais apontados na Figura 4 para cada perfil cromatográfico dos extratos de <i>Tournefortia paniculata</i> .....	49

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5HTP - Serotonina  
A - Extrato aquoso  
AC - Acarbose  
AE - Extrato acetato de etila  
AG - Aminoguanidina  
AG -  $\alpha$ -glicosidase  
ANOVA - Análise de variância  
BHT - Butil-hidroxitolueno  
BSA - Albumina bovina sérica  
 $C_6H_{12}O_6$  - Glicose  
Ca - Íons cálcio  
 $CaCl_2$  - Cloreto de cálcio  
 $Ca^{2+}$  - Íon Cálcio  
CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência  
DAG - Diacilglicerol  
DCM - Extrato diclorometano  
iNOS - Óxido nítrico sintase induzida  
eNOS - Óxido nítrico sintase endotelial constitutiva  
EPAMIG - Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais  
EPM - Erro padrão da média  
GC - Guanilato ciclase  
GMPc - 3', 5' - Monofosfato cíclico de guanosina  
GPCR - Receptor acoplado à proteína G - receptor  $\alpha$  1-adrenérgico  
Hex - Extrato hexano  
IAG - Inibidor  $\alpha$ -glicosidase  
IP<sub>3</sub> - Trifosfato de inositol  
IP<sub>3</sub>R - Receptor de IP<sub>3</sub>  
K<sup>+</sup> - Íons potássio  
KCl – Cloreto de potássio  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – Fosfato de potássio monobásico  
K<sub>v</sub> - Canal para potássio dependente de voltagem

L-NAME - N<sup>G</sup>-Nitro-L-arginina Metil Ester  
MeOH - Extrato metanol  
MgSO<sub>4</sub> – Sulfato de magnésio  
MLCK - Miosina quinase  
MLCP - Miosina fosfatase.  
NaCl – Cloreto de sódio  
NADPH - N<sup>G</sup>-hidróxi-L-arginina  
NaHCO<sub>3</sub> - Bicarbonato de sódio  
nNOS - Óxido nítrico sintase neuronal constitutiva  
NO - Óxido nítrico  
NOS - Óxido nítrico sintase  
NOX - NADPH oxidase  
OMS - Organização Mundial de Saúde  
p-NPG - p-nitrofenil- $\alpha$ -D- glicosídeo  
PC1 - Primeira componente principal  
PC2 - Segunda componente principal  
PCA - Análise de componente principal  
pH - Potencial Hidrogeniônico  
Phe - Fenilefrina  
PKA - Proteína quinase A  
PKG - proteína quinase G  
PLA<sub>2</sub> - Fosfolipase A<sub>2</sub>  
PLC - Fosfolipase C  
Rho-GEG - Fator de troca de GTP/GDP  
ROC - Canal para cálcio operado por receptor  
ROS - Espécies reativas de oxigênio  
RPM – Rotações por minuto  
SR - Retículo sarcoplasmático  
SUS - Sistema Único de saúde  
TEA - Tetraetilamônio  
U46619 - Tromboxano mimético  
VOC - Canal para cálcio operado por voltagem  
WHO – Vide OMS

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	<b>16</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>18</b>
<b>2.1 DOENÇAS CRÔNICAS NÃO TRANSMISSÍVEIS</b> .....	<b>18</b>
<b>2.2 DIABETES</b> .....	<b>18</b>
<b>2.3 TRATAMENTO DO DIABETES</b> .....	<b>19</b>
<b>2.4 DOENÇAS CARDIOVASCULARES</b> .....	<b>20</b>
<b>2.6 PLANTAS MEDICINAIS</b> .....	<b>24</b>
<b>2.8 A ESPÉCIE <i>TOURNEFORTIA PANICULATA</i> CHAM</b> .....	<b>25</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>28</b>
<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGO</b> .....	<b>34</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>37</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
<b>2.1 MATERIAL VEGETAL E EXTRAÇÃO</b> .....	<b>39</b>
<b>2.2 EXTRAÇÃO DA A-GLICOSIDASE</b> .....	<b>39</b>
<b>2.3 INIBIÇÃO DA A-GLICOSIDASE</b> .....	<b>40</b>
<b>2.4 ENSAIO ANTIGLIFICAÇÃO</b> .....	<b>40</b>
<b>2.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO <i>EX VIVO</i></b> .....	<b>41</b>
<b>2.5.1 OBTENÇÃO DOS CORAÇÕES</b> .....	<b>41</b>
<b>2.5.2 EFEITO DE <i>TOURNEFORTIA PANICULATA</i> NA REATIVIDADE VASCULAR</b> .....	<b>41</b>
<b>2.5.3 EFEITO DOS EXTRATOS <i>TOURNEFORTIA PANICULATA</i> NAS ARTÉRIAS CORONÁRIAS PRÉ-CONTRAÍDAS</b> .....	<b>42</b>
<b>2.6 ANÁLISE DO PERFIL QUÍMICO</b> .....	<b>43</b>
<b>2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS</b> .....	<b>44</b>
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>45</b>
<b>3.1 EFEITO DE <i>TOURNEFORTIA PANICULATA</i> SOBRE A ATIVIDADE DE A-GLICOSIDASE</b> .....	<b>45</b>
<b>3.2 EFEITO DE <i>TOURNEFORTIA PANICULATA</i> SOBRE A INIBIÇÃO DA GLICAÇÃO PROTEICA</b> .....	<b>45</b>
<b>3.3 RESULTADOS DE <i>TOURNEFORTIA PANICULATA</i> NA REATIVIDADE VASCULAR</b> .....	<b>47</b>

<b>3.4 ANÁLISE DO PERFIL QUÍMICO .....</b>	<b>48</b>
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>58</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>59</b>

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares são um grupo de distúrbios crônicos do funcionamento do coração e dos vasos sanguíneos, dentre elas: infarto, acidente vascular cerebral, hipertensão, doença coronariana, doenças cerebrovasculares, doença arterial periférica, doença reumática do coração, doença cardíaca congênita, trombose venosa profunda e embolia pulmonar (WHO, 2017). Estima-se que 17,9 milhões de pessoas morrem por causa de doenças cardiovasculares, representando 32% do total de mortes em 2019 ao redor do mundo (WHO, 2021).

Alterações no bom funcionamento do sistema cardiovascular podem causar desequilíbrios na perfusão de sangue nos tecidos, isso significa que o fluxo sanguíneo na região será insuficiente (CARDEN; GRANGER, 2000). Obesidade, hipertensão e a diabetes juntas representam um custo total de 3,45 bilhões de reais em 2018, sendo 30% deste valor destinado ao tratamento de pacientes com diabetes (NILSON et al., 2020).

Diabetes é uma doença crônica que ocorre quando o pâncreas não produz insulina suficiente ou quando o organismo não utiliza adequadamente a insulina que produz. Hiperglicemia ou aumento de açúcar no sangue é um efeito comum da diabetes sem controle, que pode causar diversos danos ao organismo, em especial, aos vasos sanguíneos (WHO, 2021). Em 2019 estimou-se que 1,5 milhões de pessoas tiveram mortes diretamente causadas por diabetes. Dentre os hábitos que influenciam o risco de morte estão: tabagismo, alimentação inadequada, falta de prática de esportes e consumo de bebidas alcoólicas (WHO, 2021).

Estratégias não-farmacológicas são indicadas para o controle da glicose, entretanto, se não há resultado com o uso destas estratégias, o uso de fármacos é indicado, como os inibidores da  $\alpha$ -glicosidase, tiazolidinedionas, sulfoniluréias, secretagogos de insulina, insulina, entre outros (ARAÚJO; BRITTO; CRUZ, 2000).

Metabólitos secundários presentes nas plantas medicinais são fonte novas moléculas para criação de fitofármacos (HALBERSTEIN, 2005). Espécies medicinais vem sendo estudadas por sua ação de inibir a  $\alpha$ -glicosidase, como a *Rhizoma Polygonati* (CHEN et al., 2001), *Syzygium malaccense* (ARUMUGAM et al., 2014), *Lobelia chinensis* (SHIBANO et al., 2001), *Morus alba* (HANSAWASDI; KAWABATA, 2006), *Origanum majorana* (KAWABATA et al., 2003) e *Hyssopus officinalis* (JUNG et al., 2006).

Tradicionalmente conhecida por “marmelinho”, a *Tournefortia paniculata* (Boraginaceae) é encontrada nas Américas, Ásia e regiões mediterrâneas (SIMÃO et al., 2015).



Simão et al. (2013) reportaram atividade da espécie como forte inibidor enzimático, sobre as enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase. Entretanto, há poucos estudos farmacológicos em relação à *T. paniculata*. Nesse contexto, o presente trabalho objetivou avaliar o potencial da *T. paniculata* como antidiabético, inibidor da enzima  $\alpha$ -glicosidase, antiglicação e seu efeito sobre a musculatura lisa vascular.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Doenças crônicas não transmissíveis**

As doenças crônicas não transmissíveis são aquelas que acometem as pessoas por um longo período de tempo e possuem alta prevalência no mundo, dentre elas, as doenças cardiovasculares, respiratórias crônicas, neoplasias e o diabetes mellitus (WHO, 2005).

Devido à mortalidade e à incapacidade precoce o número de incidentes gerados pelas doenças crônicas não transmissíveis impõe elevados custos ao sistema de saúde. Segundo dados do Ministério da Saúde do Brasil, as doenças do aparelho circulatório têm impacto significativo na taxa de mortalidade da população brasileira, equivalente a 32% do total de óbitos (BRASIL, 2006).

### **2.2 Diabetes**

Diabetes é considerada uma doença crônica não transmissível que ocorre quando o pâncreas não produz insulina suficiente ou quando o organismo não utiliza a insulina que produz de forma adequada. Dos efeitos da doença, o mais comum é a hiperglicemia, a qual pode desencadear diversos danos ao organismo, especialmente aos vasos sanguíneos se a doença estiver fora de controle (WHO, 2021).

A diabetes tipo I, conhecida como dependente de insulina, é caracterizada pela deficiência do organismo em produzir insulina. A diabetes tipo II, conhecida como não dependente de insulina, é a mais predominante na população, ocorre quando o organismo não utiliza de maneira adequada a insulina que produz (PACAUD et al., 2016).

Em 2019, 1,5 milhões de pessoas tiveram mortes diretamente causadas por diabetes (WHO, 2021). Estudos epidemiológicos sugerem que há um aumento de prevalência de doenças cardiovasculares em pacientes com taxa de glicose acima do normal (ZHENG et al., 2018).

A diabetes está diretamente ligada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares em pacientes que não realizam o controle da glicemia, que apresentam hipertensão, dislipidemia e obesidade (MATHEUS et al., 2013). Assim, a prevenção, detecção precoce e o tratamento adequado são de extrema importância para a redução da mortalidade. Porém, a eficácia do controle metabólico depende de inúmeros fatores, dentre eles o contexto social, acesso a informação e a serviços de saúde (MONTENEGRO et al., 2004).

Em condições ideais, a insulina é secretada sempre que os níveis de glicose no sangue aumentam, inibe a secreção de glucagon e reduz a concentração de ácidos graxos séricos, o que

leva a um declínio na produção de glicose no (POWERS; D'ALESSIO, 2016).

Quando a produção de insulina não é suficiente ou quando há resistência a insulina, a absorção tecidual de glicose é reduzida e resulta em hipoglicemia intracelular e hiperglicemia extracelular. Com a hipoglicemia intracelular ocorre quebra das gorduras causando cetoacidose diabética, diminuição da síntese proteica e de gamaglobulinas. A hiperglicemia extracelular leva ao coma hiperglicêmico e à diurese osmótica (ULLAH; KHAN; KHAN, 2016).

A diabetes necessita o tratamento com medicamentos, como a metformina, bromocriptina e inibidores da  $\alpha$ -glicosidase. Entretanto, diversos fatores afetam a aderência ao tratamento da diabetes, como medo, falta de confiança na medicação, custo, interferência em relação ao estilo de vida e esquecer de tomar o medicamento no momento correto (BAILEY; KODACK, 2011; ODEGARD; CAPOCCIA, 2007).

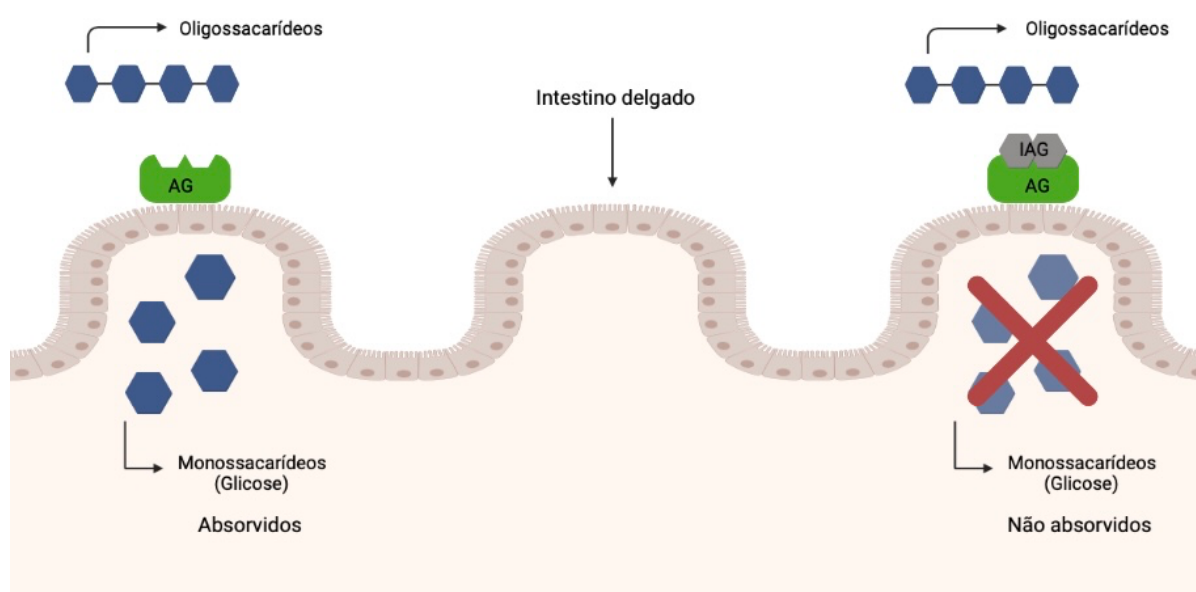
### **2.3 Tratamento do diabetes**

Os tratamentos não farmacológicos são não fumar, ter uma alimentação adequada, praticar esportes regularmente e não consumir de bebidas alcoólicas (WHO, 2021). Quando as estratégias não farmacológicas não são capazes de obter o controle da glicemia, as medidas farmacológicas são indicadas. Dentre os fármacos prescritos, destacam-se as seguintes classes: Biguanidas, inibidores da  $\alpha$ -glicosidase, tiazolidinedionas, sulfoniluréias, secretagogos de insulina, insulina, entre outros (ARAÚJO; BRITTO; CRUZ, 2000).

No tratamento farmacológico, embora os agentes hiperglicêmicos orais e insulina sejam a base do tratamento da diabetes, eles possuem efeitos colaterais capazes de limitar o uso pelos pacientes (RANG; DALE; RITTER, 1991).

Os inibidores de  $\alpha$ -glicosidase são opções terapêuticas para diabetes II. As enzimas  $\alpha$ -glicosidase estão localizadas nas vilosidades dos enterócitos presentes no intestino delgado e são necessárias para a etapa final da quebra de carboidratos, como amidos, dextrinas e maltose, em monossacarídeos absorvíveis (ROSS; GULVE; WANG, 2004). A  $\alpha$ -glicosidase é responsável por quebrar ligações glicosídicas  $\alpha$ 1-4 externas das amiloses, amilopectinas e polissacarídeos (OTA et al., 2009).

Figura 1 - Mecanismo de ação dos inibidores da  $\alpha$ -glicosidase.



AG:  $\alpha$ -glicosidase. IAG: Inibidor da  $\alpha$ -glicosidase.

Fonte: Da autora (2021).

Os inibidores da  $\alpha$ -glicosidase retardam, mas não impedem a absorção de carboidratos ingeridos e reduzem os picos de insulina e glicose pós-prandiais (ROSS; GULVE; WANG, 2004).

Estudos sugerem que produtos de glicação avançada podem contribuir diretamente para a progressão da diabetes. Essa formação é considerado um dos mais importantes mecanismos propostos que tentam elucidar como a hiperglicemia crônica causa danos celulares e teciduais, como neuropatia, nefropatia e retinopatia diabética (BROWNLEE, 2001).

Os produtos de glicação avançada são formados a partir de interações aminocarbonilo, induzidas por reações não enzimáticas entre açúcares redutores ou lipídeos oxidados e proteínas, aminofosfatídeos ou ácidos nucleicos. O açúcar liga-se a uma proteína mediada por um reação denominada de reação de Maillard ou glicação (MONNIER, 2003).

## 2.4 Doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares são um grupo de doenças crônicas que afetam o coração e os vasos sanguíneos, dentre elas: infarto, acidente vascular cerebral, hipertensão, doença coronariana, doenças cerebrovasculares, doença arterial periférica, doença reumática do coração, doença cardíaca congênita, trombose venosa profunda e embolia pulmonar (WHO, 2017).

Um dos principais fatores de risco para as doenças cardiovasculares é a diabetes tipo 2. A presença das duas doenças associadas aumenta o risco de morte (DI ANGELANTONIO et al., 2015). Outros fatores de risco são: tabagismo, obesidade, sedentarismo, dislipidemia, diabetes, idade superior a 55 anos para homens e 65 anos para mulheres e hereditariedade (CHOBANIAN ARAM et al., 2003).

Hipertensão afeta aproximadamente 1 bilhão de indivíduos no mundo e é o fator de risco mais importante de morte resultante de doença cardiovascular (RODRIGUEZ-ITURBE; PONS; JOHNSON, 2017). A pressão alta causa alterações na vasculatura e hipertrofia do ventrículo esquerdo. A hipertensão é a principal causa de acidente vascular encefálico, insuficiência cardíaca, insuficiência renal e principal fator de risco para doença arterial coronariana, isquemia miocárdica e morte súbita cardíaca (BRUNTON, 2012).

A aterosclerose é caracterizada pela formação de placas de gordura nos vasos causando dano endotelial. Os principais fatores de risco são dislipidemia, tabagismo, diabetes, hipertensão arterial, obesidade, idade, sedentarismo, histórico familiar, fatores socioeconômicos e estresse (SEIDL; ZANNON, 2004).

A doença coronariana é o processo de aterosclerose que acomete as artérias coronárias, causa estreitamento do lúmen, reduzindo o suprimento de sangue no miocárdio, podendo causar isquemia (WONG, 2014). Os principais fatores para a doença coronariana são: histórico familiar, diabetes, tabagismo, hipertensão, hiperlipidemia, alimentos ricos em colesterol e obesidade (SEIDL; ZANNON, 2004). Sendo assim, a melhora do controle glicêmico previne as doenças cardiovasculares.

O óxido nítrico que é produzido pelas células endoteliais possui um grande potencial vasodilatador e inibidor da agregação plaquetária. Assim, desempenha um papel fundamental do controle cardiovascular, prevenindo trombozes e doenças ateroscleróticas (VANHOUTTE, 2003).

O principal contribuinte para doenças cardiovasculares é o tônus vascular, sendo grande responsável pela manutenção da resistência periférica. Alterações no tônus vascular podem levar a desequilíbrios na perfusão de sangue nos tecidos, isso significa que o fluxo sanguíneo na região não será suficiente (CARDEN; GRANGER, 2000). O tônus do músculo liso vascular pode ser alterado facilmente pelas mudanças nas concentrações de cálcio. Durante a contração há aumento da permeabilidade ao íon cálcio e durante o relaxamento do vaso ocorre a diminuição da concentração intracelular de cálcio (LEDOUX et al., 2006).

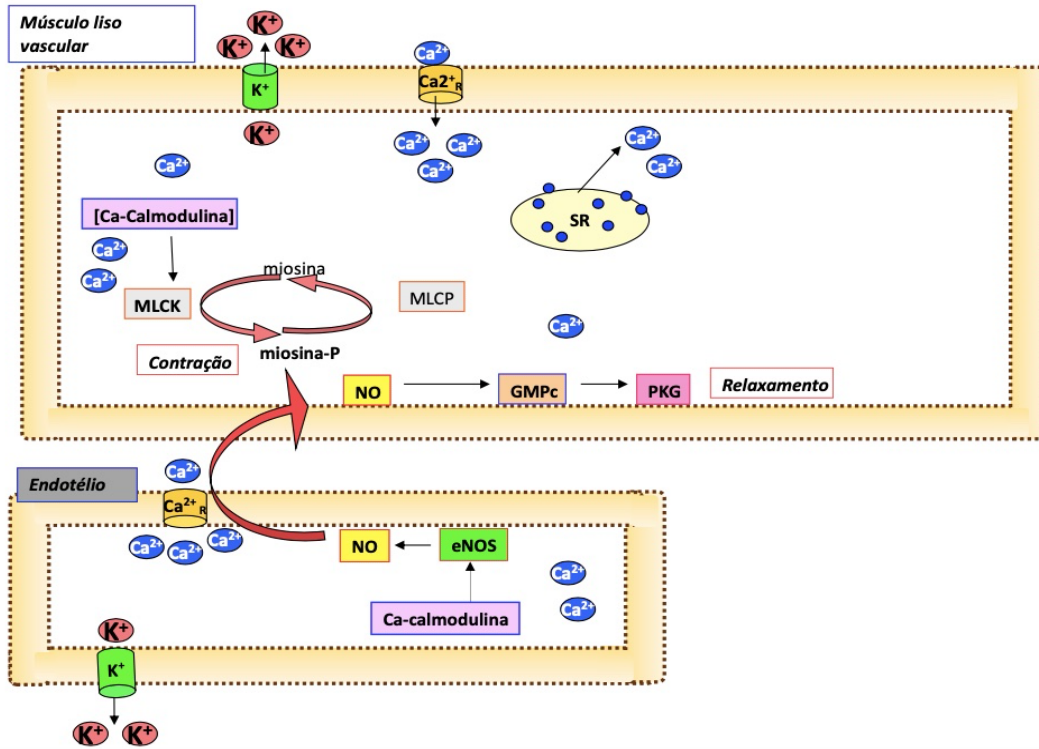
Os canais de cálcio dependentes de voltagem são amplamente expressos em todo o sistema cardiovascular. Eles constituem a principal via de entrada de cálcio, essencial para a

manutenção da contração (RICHARD, 2005). O cálcio liga-se a calmodulina, formando o complexo cálcio/calmodulina. A enzima quinase da cadeia leve da miosina é ativada pelo complexo cálcio/calmodulina em uma parte da molécula de miosina chamada cadeia leve. Essa enzima ativada promove a fosforilação da cadeia leve de miosina. O grau dessa fosforilação é definido pela formação do complexo cálcio/calmodulina. A cadeia leve da miosina fosforilada interage com a actina, formando pontes cruzadas de actina-miosina, ocorrendo assim a contração celular do músculo liso (SOMLYO; SOMLYO, 2003; KAUFFENSTEIN et al., 2012).

Entretanto, é importante considerar que a contração do músculo liso não depende somente da elevação do cálcio intracelular. O processo contrátil pode acontecer também pelo aumento da sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio que aumentam a afinidade dos miofilamentos contráteis (HILGERS; WEBB, 2005)

A abertura dos canais de potássio provoca aumento da saída de íons do meio intracelular por difusão passiva, o que causa hiperpolarização da membrana celular. O estado hiperpolarizado causa fechamento dos canais de cálcio dependentes de voltagem e diminuição da entrada de cálcio, resultando em vasodilatação. Já o oposto, na despolarização da membrana ocorre o fechamento dos canais de potássio e a abertura dos canais de cálcio ativados por voltagem, aumentando a concentração de cálcio no citoplasma e causando vasoconstrição (FIGURA 2) (FARACI; HEISTAD, 1998).

Figura 2 - Mecanismo de contração do músculo liso.



(Fonte: Adaptado de PEREIRA, 2009).

O óxido nítrico (NO) é uma das substâncias vasoativas de maior importância dentre as liberadas pelo endotélio. É sintetizado através da hidroxilação de um dos nitrogênios guanidínicos da L-arginina formando N<sup>G</sup>-hidróxi-L-arginina que utiliza a NADPH e uma molécula de oxigênio, envolvendo o complexo heme do óxido nítrico sintase (NOS). Após esse processo, ocorre a conversão de N-hidróxi-L-arginina em NO e citrulina (MARLETTA; SPIERING, 2003).

Atualmente, são conhecidas três isoformas de NOS: eNOS (endotelial constitutiva), nNOS (neuronal constitutiva) e iNOS (induzida). A iNOS participa nos processos de defesa do hospedeiro. A nNOS e eNOS são importantes na sinalização neuronal, vasodilatação e controle da pressão arterial. Essas isoformas são reguladas pelo complexo cálcio-calmodulina (MARÍN; RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, 1995).

Para promover o relaxamento vascular o NO se difunde para as células do músculo liso vascular onde ativa a guanilato ciclase (GC), que aumenta a concentração intracelular de GMPc (3', 5'-monofosfato cíclico de guanosina). O GMPc ativa a proteína quinase G (PKG), que fosforila outras proteínas, reduzindo a concentração intracelular e a sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio, ocasionando relaxamento vascular (LINCOLN; DEY; SELLAKE, 2001).

A entrada de cálcio na célula ocorre, principalmente, via canais de cálcio voltagem-dependente.

A sensibilização ao cálcio ocorre via RhoA/Rho-quinase que é ativado por agonistas de receptores de proteína G. A RhoA ativada interage com a Rho-quinase que inibe a fosfatase da miosina através da fosforilação da subunidade de ligação da miosina (SOMLYO; SOMLYO, 2003; MIZUNO et al., 2008)

## **2.5 Tratamento das doenças cardiovasculares**

A manutenção do tônus vascular é importante para o controle das doenças cardiovasculares. Os tratamentos não farmacológicos incluem mudança no estilo de vida, incluindo, não fumar, ter alimentação adequada, praticar esportes e não consumir bebidas alcoólicas (WHO, 2021).

Os vasodilatadores são uma importante classe de medicamentos que atuam na manutenção da concentração de cálcio ( $Ca^{2+}$ ) ou alteram a sensibilidade a esses íons na musculatura lisa e são utilizados para o tratamento da hipertensão, insuficiência cardíaca, angina, aterosclerose, doença coronariana, hipertensão pulmonar e a doença de Reynaud. Dessa forma, aumentam o fluxo de sangue para os tecidos, diminuem a pressão arterial e consequentemente, há redução do trabalho cardíaco (KUBOTANI; FERNANDES; JÚNIOR, 2019).

Mesmo com a descoberta de novos medicamentos, por exemplos os vasodilatadores indiretos que possuem menos efeitos colaterais, menor risco de interações medicamentosas e em sua maioria mais eficazes, os vasodilatadores diretos não foram descartados e ainda tem seu uso empregado para situações mais específicas como em casos graves de hipertensão (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA., 2016).

## **2.6 Plantas medicinais**

O uso de plantas representa uma das mais antigas formas de tratamento e prevenção de doenças. Metabólitos secundários presentes nas plantas são uma importante fonte de novas moléculas para criação de fitofármacos (HALBERSTEIN, 2005).

Plantas, em especial, formaram a base da medicina tradicional. Registros datados de 2600 a.C. demonstram que povos da antiga Mesopotâmia tinham conhecimento de aproximadamente mil plantas ou derivados medicinais (CRAGG; NEWMAN, 2013). O derivado vegetal exige uma série de cuidados desde sua plantação até a fase final do consumo



pelo paciente. Frequentemente são a primeira escolha da população pela facilidade de obtenção e pelo baixo custo. Porém, sabe-se que plantas medicinais possuem ampla diversidade de metabólitos secundários com diversas ações biológicas, exigindo assim cuidado no seu uso e preparo, além de exigir produtos de boa qualidade e orientação ao paciente sobre efeitos colaterais e interações medicamentosas (SIMÕES; ISCHENKEL; GOSMANN, 1999).

Plantas deram origem a importantes produtos farmacêuticos, como: aspirina, atropina, artimisinina, colchicina, digoxina, efedrina, morfina, fisostigmina, pilocarpina, quinina, quinidina, reserpina, taxol, tubocurarina, vincristina e vinblastina são exemplos de substâncias isoladas de plantas (GILANI; ATTA-UR-RAHMAN, 2005).

Diversas plantas possuem propriedades vasorelaxante, graças ao seu poder antagonista de canais de cálcio, dentre elas, *Nigella sativa*, *Rosa damascena*, *Carum copticum*, *Achillea wilhelmsii*, *Pimpinella anisun*, *Satureja hortensis*, entre outras (SHAKERI; BOSKABADY, 2015). Podem também atuar na via do óxido nítrico, seja aumentando a sua formação, favorecendo seu efeito ou protegendo e aumentando sua biodisponibilidade. *Alpinia zerumbet*, bradicinina, através dos receptores  $\beta_2$  (DE MOURA et al., 2005), *Panax ginseng* possui ação vasodilatadora tanto pelo bloqueio dos canais de cálcio como também pela mediação da liberação de óxido nítrico (SCOTT et al., 2001) e o *Allium sativum* possui compostos sulfurados que *in vitro* apresentaram atividade vasodilatadora mediado pela liberação de óxido nítrico (ALEXANDRE; BAGATINI; SIMÕES, 2008).

O medicamento hipoglicemiante de maior proeminência, metformina, é derivado da *Galega officinalis*, planta utilizada desde a idade média para tratamento de Diabetes na Europa (GROVER; YADAV; VATS, 2002).

Diversas plantas têm ação de inibir a  $\alpha$ -glicosidase. Dentre elas: *Rhizoma Polygonati* (CHEN et al., 2001), *Syzygium malaccense* (ARUMUGAM et al., 2014), *Lobelia chinensis* (SHIBANO et al., 2001), *Morus alba* (HANSAWASDI; KAWABATA, 2006), *Origanum majorana* (KAWABATA et al., 2003) e *Hyssopus officinalis* (JUNG et al., 2006).

## **2.8 A espécie *Tournefortia paniculata* Cham**

*Tournefortia paniculata* é um arbusto escandentes (FIGURA 3). Folhas com pecíolo delgado, de forma ovalada ou lanceolada, faces adaxial e abaxial esparsamente estrigosas, densamente pubescente nas nervuras principal e laterais. Inflorescência paniculoide terminal, 10-22 cm de comprimento, cimeiras escorpióides 2-5 cm de comprimento, flores esverdeadas subssésseis a sésseis, cálice densamente pubescente, lobos ovais, corola hipocrateriforme, dilata

na base, 5 estames, anteras sésseis, lanceolada, papilhosas no ápice, estilete terminal, estigma piramidal, fruto subgloboso (VITTA, 1992). Recentemente a espécie *Tournefortia paniculata* Cham passou a se chamar *Myriopus paniculatus*, tornando o nome *Tournefortia paniculata* sua sinonímia (PLANTLIST, 2021).

Figura 3 – A espécie *Tournefortia paniculata*



(Fonte: BITTENCOURT, 2019)

Conhecida tradicionalmente como “marmelinho” é um arbusto da família Boraginaceae, sendo encontrada nas regiões mediterrâneas, Américas e Ásia (SIMÃO et al., 2015). No Brasil, distribui-se desde a Amazônia até o Rio Grande do Sul (MELO; LYRA-LEMOS, 2008).

Moraes et al (2007) descreveram a presença de flavonoides, taninos, cumarinas e heterosídeos cardiotônicos com base em estudos de triagem fitoquímica do extrato etanólico de *Tournefortia paniculata*. (MORAES; ORLANDO VIEIRA DE; HITOMI, 2007). Outro estudo de triagem fitoquímica utilizando técnicas extrativas e solventes diferentes indicou a presença de ácidos orgânicos, açúcar reduzido, antraquinonas, carotenóides, catequinas, lactonas sesquiterpênicas e outras lactonas, flavonóides, saponinas e taninos (SIMÃO et al., 2014). Entretanto, os estudos fitoquímicos da espécie *Tournefortia paniculata* são superficiais e escassos.

Há relatos na literatura que o decocto das folhas é popularmente utilizado como antibiótico para tratamento de infecções da via urinárias, diurético por pacientes com litíase renal (BERTOLUCCI et al., 2000; BERTOLUCCI et al., 2005).

Pesquisa realizada por Simão et al. (2012) com extratos de diversas plantas incluindo o

extrato aquoso de *Tournefortia paniculata* indicou forte efeito inibidor enzimático, sobre as enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase. Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisa publicou outro estudo, onde quantificaram os compostos fenólicos presentes na espécie, pelo método de Folin-Denis. Em comparação com outras espécies estudadas, extrato da *T. paniculata* apresentou os maiores valores de compostos fenólicos totais (36,19 g/100g de folhas secas). Provavelmente, a atividade antioxidante da espécie é devido à presença de altos níveis de compostos fenólicos, flavonoides, vitamina C e carotenoides presentes em suas folhas (SIMÃO et al., 2013).

Após testes *in vivo* foram realizados para avaliar o efeito do extrato aquoso e folhas pulverizadas de *Tournefortia paniculata* em ratos Wistar. Os animais foram divididos e submetidos a uma dieta hipercalórica. Aqueles que receberam o extrato ou a planta pulverizada apresentaram atividade hipoglicemiante, atividade anorexígena e perda de peso (SIMÃO et al., 2015).

O gênero *Tournefortia* vem sendo estudado em todo o mundo por sua grande variabilidade química e potenciais usos terapêuticos. O estudo etnobotânico realizado em Trinidad e Tobago em 2006 mostrou que a espécie *Tournefortia hirsutissima* é utilizada pela sua população para o controle da hipertensão e diabetes (LANS, 2006).

Estudo realizado com *Tournefortia hartwegiana*, demonstrou que 310 mg/Kg/dia por 10 dias em ratos diabéticos diminuiu em 37% os níveis de glicose no sangue, essas atividades hipoglicêmicas foram semelhantes às produzidas por Metformina 120 mg/Kg (ORTIZ-ANDRADE et al., 2005).

## REFERÊNCIAS

- ALEXANDRE, R. F.; BAGATINI, F.; SIMÕES, C. M. O. Potenciais interações entre fármacos e produtos à base de valeriana ou alho. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n. 1, p.455-463, 2008.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Prevention or Delay of Type 2 Diabetes (Position statement). **Diabetes Care**, v. 27, p. 47–54, 2004.
- ANDRADE-CETTO, A.; BECERRA-JIMÉNEZ, J.; CÁRDENAS-VÁZQUEZ, R. Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, n. 1, p. 27–32, 2008.
- ARAÚJO, L.; BRITTO, M.; CRUZ, T. Tratamento do diabetes mellitus do tipo 2: novas opções. **Arquivos Brasileiros De Endocrinologia E Metabologia**, v. 44, 2000.
- ARUMUGAM, B.; MANAHARAN, T.; HENG, C.K.; KUPPUSAMY, U.R.; PALANISAMY, U.D., Antioxidant and antiglycemic potentials of a standardized extract of *Syzygium malaccense*. **LWT- Food science and technology**, v. 59, n. 2, p.707-712, 2014.
- BAILEY, C.J.; KODACK, M. Patient adherence to medication requirements for therapy of type 2 diabetes. **International journal of clinical practice**, v. 65, n. 3, pp.314-322, 2011.
- BERTOLUCCI, S. K. V.; PINTO, J.E.B.P.; CARDOSO, M.D.G.; GAVILANES, M.L.; SANTIAGO, E.J.A.; LAMEIRA, O.A. Abordagem fitoquímica Preliminar em Plântulas micropropagadas de *Tournefortia cf paniculata* Cham. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 1, p. 59–65, 2005.
- BERTOLUCCI, S.K.; PINTO, J.E.B.P.; CARDOSO, M.D.G.; GAVILANES, M.L.; SANTIAGO, E.J.A.; LAMEIRA, O.A., Micropropagation of *Tournefortia cf paniculata* Cham. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 3, n. 1, p. 43–49, 2000.
- BRASIL. **Prevenção clínica de doenças cardiovasculares, cerebrovasculares e renais**, Brasília, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica 2006.
- BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 813–820, 2001.
- BRUNTON, L. L. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12ª ed. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012, 1808 p.
- CARDEN, D. L.; GRANGER, D. N. Pathophysiology of ischaemia–reperfusion injury. **The Journal of Pathology**, v. 190, n. 3, p. 255–266, 1 fev. 2000.
- CAVALHEIRO, L.; RANGA, N. T.; FURLAN, A. *Tournefortia* L. (Boraginaceae): espécies do Brasil extra-amazônico, **Hoehnea**, v. 38, n. 2, 2011.

- CHEN, H.; RUIZHI, F. YI, G.; LIHONG, S.; JINGLI, J. "Hypoglycemic effects of aqueous extract of *Rhizoma Polygonati Odorati* in mice and rats." **Journal of ethnopharmacology**, v. 74, n. 3, 225-229, 2001.
- CHOBANIAN ARAM, V. et al. Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. **Hypertension**, v. 42, n. 6, p. 1206–1252, 2003.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2013.
- DE MOURA, R.S.; EMILIANO, A.F.; DE CARVALHO, L.C.M.; SOUZA, M.A.; GUEDES, D.C.; TANO, T.; RESENDE, A.C. Antihypertensive and endothelium-dependent vasodilator effects of *Alpinia zerumbet*, a medicinal plant. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 46, n. 3, p. 288-294, 2005.
- DI ANGELANTONIO, E.; KAPTOGE, S.; WORMSER, D.; WILLEIT, P.; BUTTERWORTH, A.S. Association of Cardiometabolic Multimorbidity With Mortality. **JAMA**, v. 314, n. 1, p. 52–60, 7 jul. 2015.
- FARACI, F. M.; HEISTAD, D. D. Regulation of the Cerebral Circulation: Role of Endothelium and Potassium Channels. **Physiological Reviews**, v. 78, n. 1, p. 53–97, 1998.
- FULLER, J. H. et al. Hyperglycaemia and coronary heart disease: The Whitehall Study. **Journal of Chronic Diseases**, v. 32, n. 11, p. 721–728, 1979.
- GILANI, A. H. Novel developments from natural products in cardiovascular research. **Phytotherapy Research**, v. 12, n. 1, p. 66–69, 1998.
- GILANI, A. H.; ATTA-UR-RAHMAN. Trends in ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1, p. 43–49, 2005.
- GO, A.S.; MOZAFFARIAN, D.; ROGER, V.L.; BENJAMIN, E.J.; BERRY, J.D.; BLAHA, M.J.; DAI, S.; FORD, E.S.; FOX, C.S.; FRANCO, S.; FULLERTON, H.J. Heart Disease and Stroke Statistics—2014 Update. **Circulation**, v. 129, n. 3, p. e28–e292, 2014.
- GROVER, J. K.; YADAV, S.; VATS, V. Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n. 1, p. 81-100, 2002.
- HALBERSTEIN, R. A. Medicinal Plants: Historical and Cross-Cultural Usage Patterns. **Annals of Epidemiology**, v. 15, n. 9, p. 686–699, 2005.
- HANSAWASDI, C.; KAWABATA, J.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory effect of mulberry (*Morus alba*) leaves on Caco-2. **Fitoterapia**, v. 77, p.568-573, 2006.
- HILGERS, R. H. P.; WEBB, R. C. Molecular Aspects of Arterial Smooth Muscle Contraction: Focus on Rho. **Experimental Biology and Medicine**, v. 230, n. 11, p. 829–835, 2005.

JUNG, M.; PARK, M.; LEE, H.C.; KANG, Y.H.; KANG, E.S.; KIM, S.K. Antidiabetic agents from medicinal plants. **Current medicinal chemistry**, v. 13, n.10, pp.1203-1218, 2006.

KAWABATA, J.; MIZUHATA, K.; SATO, E.; NISHIOKA, T.; AOYAMA, Y.; KASAI, T. 6-Hydroxyflavonoids as  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from marjoram (*Origanum majorana*) leaves. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 67, n. 2, p.445-447, 2003.

KAUFFENSTEIN, G. et al. Emerging role of G protein-coupled receptors in microvascular myogenic tone. **Cardiovascular Research**, v. 95, n.2, 2012.

KUBOTANI, K.; FERNANDES, D.; JÚNIOR, A. Utilização de fármacos vasodilatadores de ação direta e indireta no tratamento de hipertensão arterial: artigo de revisão. **Revista Científica FAEMA**, v. 10, p. 148–156, 2019.

LANS, C. A. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for urinary problems and diabetes mellitus. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 2, n. 1, p. 45, 2006.

LEDOUX, J. et al. Calcium-Activated Potassium Channels and the Regulation of Vascular Tone. **Physiology**, v. 21, n. 1, p. 69–78, 2006.

LINCOLN, T. M.; DEY, N.; SELLAKE, H. Invited Review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. **Journal of Applied Physiology**, v. 91, n. 3, p. 1421–1430, 2001.

LOIZZO, M.R.; TUNDIS, R.; MENICHINI, F., STATTI, G.A.; MENICHINI, F. Hypotensive natural products: current status. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 8, n. 8, p. 828-855, 2008.

MARÍN, J.; RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, M. A. Nitric oxide, oxygen-derived free radicals and vascular endothelium. **Journal of Autonomic Pharmacology**, v. 15, n. 4, p. 279–307, 1 ago. 1995.

MARLETTA, M. A.; SPIERING, M. M. Trace Elements and Nitric Oxide function. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 5, p. 1431-1433, 2003.

MATHEUS, A.S.D.M.; TANNUS, L.R.M.; COBAS, R.A.; PALMA, C.C.S.; NEGRATO, C.A.; GOMES, M.D.B. Impact of diabetes on cardiovascular disease: an update. **International Journal of Hypertension**, 2013.

MCCARRON, D. A. Calcium in the pathogenesis and therapy of human hypertension. **The American Journal of Medicine**, v. 78, n. 2, Supplement 2, p. 27–34, 1985.

MELO, J. I. M. DE; LYRA-LEMOS, R. P. DE. Sinopse taxonômica de *Boraginaceae* sensu lato A. Juss. no Estado de Alagoas. **Brasil Acta Botanica Brasilica**, v. 22, p. 701-170, 2008.

MIZUNO, Y. et al. Myosin light chain kinase activation and calcium sensitization in smooth muscle in vivo. **American journal of physiology - Cell physiology**, v. 295, n. 2, p. C358–C364, 2008.

- MONNIER, V. M. Intervention against the Maillard reaction in vivo. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 419, n. 1, p. 1–15, 2003.
- MONTENEGRO, R. M. et al. A assistência multidisciplinar e o manejo efetivo do diabetes mellitus: desafios atuais. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, v. 17, n. 4, p. 200–205, 2004.
- MORAES, L. D. S.; ORLANDO VIEIRA DE, Y.; HITOMI, C. Avaliações qualitativas e quantitativas da variação de metabólitos secundários em *Tournefortia paniculata*. **Brazilian Journal of Biosciences**, v. 5, p. 1032–1034, 2007.
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020.
- NILSON, E.A.F.; ANDRADE, R.D.C.S.; BRITO, D.A.D.; OLIVEIRA, M.L.D. Custos atribuíveis a obesidade, hipertensão e diabetes no Sistema Único de Saúde, Brasil, 2018. **Revista Panamericana de Salud Pública**, 44, p.e32, 2020.
- ODEGARD, P.S.; CAPOCCIA, K. Medication taking and diabetes. **The Diabetes Educator**, v.33, n. 6, p.1014-1029, 2007.
- ORTIZ-ANDRADE, R. et al. Anti-diabetic effect on alloxanized and normoglycemic rats and some pharmacological evaluations of *Tournefortia hartwegiana*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 101, p. 37–42, 1 nov. 2005.
- OTA, M. et al. Action of  $\alpha$ -d-glucosidase from *Aspergillus niger* towards dextrin and starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 2, p. 287–291, 2009.
- PACAUD, D. et al. A description of clinician reported diagnosis of type 2 diabetes and other non-type 1 diabetes included in a large international multicentered pediatric diabetes registry (SWEET). **Pediatric Diabetes**, v. 17, p. 24–31, 1 out. 2016.
- POWERS, A. C.; D’ALESSIO, D. Pancreas endócrino de farmacoterapia do diabetes melito e da hipoglicemia. In: BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.; KNOLLMANN, B. C. (Ed.). **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gillman**. 12. ed. ed. Rio de Janeiro: Ed. McGraw-Hill, 2016. p. 1237–1273.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. The endocrine system pharmacology. **Pharmacology. Longman Group Ltd., UK**, p. 504–508, 1991.
- RICHARD, S. Vascular Effects of Calcium Channel Antagonists: New Evidence. **Drugs**, v. 65, n. 2, p. 1–10, 2005.
- RIETBROCK, N.; WOODCOCK, B. G. Two hundred years of foxglove therapy *Digitalis purpurea* 1785–1985. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 6, p. 267–269, 1985.
- RODRIGUEZ-ITURBE, B.; PONS, H.; JOHNSON, R. Role of the Immune System in Hypertension. **Physiological Reviews**, v. 97, n. 3, p. 1127–1164, 31 maio 2017.

ROSS, S. A.; GULVE, E. A.; WANG, M. Chemistry and Biochemistry of Type 2 Diabetes. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 3, p. 1255–1282, 2004.

SCOTT, G. I. Ginsenosides Rb1 and Re decrease cardiac contraction in adult rat ventricular myocytes: role of nitric oxide. **British journal of pharmacology**, v. 134, n. 6, p. 1159–1165, 2001.

SEIDL, E. M. F.; ZANNON, C. M. L. DA C. Quality of life and health: conceptual and methodological issues. **Cadernos de saúde pública / Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública**, v. 20, n. 2, p. 580–588, 2004.

SHAKERI, F.; BOSKABADY, M. H. A review of the relaxant effect of various medicinal plants on tracheal smooth muscle, their possible mechanism(s) and potency. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 175, p. 528–548, 2015.

SHIBANO, M.; TSUKAMOTO, D.; MASUDA, A.; TANAKA, Y.; KUSANO, G. Two new pyrrolidine alkaloids, radicamines A and B, as inhibitors of  $\alpha$ -glucosidase from *Lobelia chinensis* LOUR. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 49, n.10, p.1362-1365, 2001.

SIMAO, A. et al. Chemical composition of medicinal plants used as auxiliary treatments for obesity. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, p. 3840–3846, 2014.

SIMÃO, A. et al. Antioxidants from Medicinal Plants Used in the Treatment of Obesity. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 3, p. 429–443, 2013.

SIMÃO, A. A. et al. Anti-obesity Effects of the Administration of *Tournefortia paniculata* Cham Extract on Wistar Rats Subjected to a Hypercaloric Diet. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, p. 494–503, 2015.

SIMÃO, A. A.; CORRÊA, A.; CHAGAS, P. Inhibition of digestive enzymes by medicinal plant aqueous extracts used to aid the treatment of obesity. **Journal of Medical Plant Research**, v. 6, p. 5826–5830, 2012.

SIMÕES, C. M. O.; ISCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis. 1096p.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. VII Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. **Revista Brasileira de Cardiologia**, v. 107, n.3, 2016.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. **Physiological reviews**, v. 83, n. 4, p. 1325-1358, 2003.

THE PLANTLIST. *Myriopus paniculatus* (Cham.) Feuillet. Disponível em: <<https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/373833#names>>. Acesso em: 20 jul. 2021.

TURNER, R.; CULL, C.; HOLMAN, R. United Kingdom Prospective Diabetes Study 17: A 9-Year Update of a Randomized, Controlled Trial on the Effect of Improved Metabolic Control on Complications in Non-Insulin-dependent Diabetes Mellitus. **Annals of Internal Medicine**, v. 124, n. 1, p. 136–145, 1996.



ULLAH, A.; KHAN, A.; KHAN, I. Diabetes mellitus and oxidative stress-a concise review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, n. 5, p. 547–553, 2016.

VANHOUTTE, P. Endothelial control of vasomotor function - From health to coronary disease. **Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society**, v. 67, p. 572–575, 1 ago. 2003.

VITTA, F. A. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Boraginaceae. **Boletim de Botânica**, v. 13, p. 235, 1992.

WALSH, M. P. Regulation of vascular smooth muscle tone. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 72, n. 8, p. 919-936, 1994.

WHO. **Prevenção de doenças crônicas: um investimento vital**. Geneva: World Health Organization, 2005.

WHO. **Cardiovascular diseases (CVDs)**. Disponível em: <[https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))>. Acesso em: 17 dez. 2021.

WHO. **Diabetes**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>>. Acesso em: 16 abr. 2021.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes care**, v. 27, n. 5, p. 1047-1053, 2004.

WONG, N. D. Epidemiological studies of CHD and the evolution of preventive cardiology. **Nature Reviews Cardiology**, v. 11, n. 5, p. 276–289, 2014.

ZHENG, Y.; LEY, S.H.; HU, F.B. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. **Nature Reviews Endocrinology**, 14, n. 2, pp.88-98, 2018.

**SEGUNDA PARTE – ARTIGO**

**ARTIGO – AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIDIABÉTICO E VASODILATADOR  
DOS EXTRATOS DE *Tournefortia paniculata Vent***

**ARTICLE – EVALUATION OF THE ANTIDIABETIC POTENTIAL AND  
VASODILATOR OF THE EXTRACTS OF *Tournefortia paniculata Vent***

**Artigo redigido conforme a NBR 6022 (ABNT, 2003) e formatado de acordo com o Manual da UFLA de apresentação de teses e dissertações.**

## RESUMO

*Tournefortia paniculata*, é uma planta conhecida como marmelinho e utilizada popularmente como diurética e antidiabética. Os estudos sobre suas atividades biológicas e fitoquímica são escassos. Visto isso, objetivou-se avaliar o perfil químico e o efeito dos extratos de *Tournefortia paniculata* sobre a enzima  $\alpha$ -glicosidase, a glicação proteica e tônus vascular. Os extratos foram obtidos por refluxo, a partir das folhas secas e pulverizadas, com solventes de polaridades crescente (hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol e água). Os extratos em acetato de etila e metanol na concentração de 1 mg/mL foram os que indicaram maior atividade de inibição *in vitro* da enzima  $\alpha$ -glicosidase  $60,3 \pm 8\%$  e  $56,2 \pm 5,4\%$ , respectivamente. Nas demais concentrações não foi observada inibição. Todos os extratos (1 mg/mL), com exceção do aquoso, apresentaram atividade antiglicante: hexano ( $82,5 \pm 7,5\%$ ), diclorometano ( $84,3 \pm 0,88\%$ ), acetato de etila ( $95,2 \pm 1,8\%$ ) e metanol ( $89,7 \pm 5,6\%$ ). A avaliação do potencial relaxante após serotonina indicou que os extratos acetato de etila ( $83,4 \pm 4,0\%$ ) e metanol ( $64,1 \pm 15,6\%$ ) foram os mais potentes. Também foi avaliada a relação entre o perfil químico e suas atividades biológicas através de análises de perfis cromatográficos por CLAE-DAD e de componentes principais (PCA). Houve correlação positiva entre os picos majoritários observados e os extratos acetato de etila e metanol em relação ao efeito biológico da espécie. Conclui-se que *Tournefortia paniculata*, em especial seu extrato acetato de etila e metanol possui potencial de prevenção e tratamento do diabetes, assim como no tratamento de doenças cardiovasculares.

**Palavras-chave:** *Myriopus paniculatus*. Inibição enzimática.  $\alpha$ -glicosidase. Glicação. Antiglicação. Vasorelaxante.

## ABSTRACT

*Tournefortia paniculata*, is a plant known as “marmelinho” and popularly used as a diuretic and antidiabetic. Studies on its biological and phytochemical activities are scarce. Thus, this study aimed to characterize the chemical profile and the effect of *Tournefortia paniculata* extracts on the  $\alpha$ -glucosidase enzyme, protein glycation and vascular tone. The extracts were obtained by reflux, from the dried and pulverized, with solvents of different polarities: hexane, dichloromethane, ethyl acetate, methanol, and water. In the in vitro inhibition test of the  $\alpha$ -glucosidase enzyme, the extracts (1mg/mL) that had the best performance were ethyl acetate ( $60.3 \pm 8\%$ ) and methanol ( $56.2 \pm 5.4\%$ ) in the other concentrations no inhibition was observed. All extracts (1 mg/mL), except the aqueous extract, showed antiglycant activity: Hexane ( $82.5 \pm 7.5\%$ ), dichloromethane ( $84.3 \pm 0.88\%$ ), ethyl acetate ( $95.2 \pm 1.8\%$ ) and methanol ( $89.7 \pm 5.6\%$ ). The evaluation of the relaxing potential after serotonin again showed that the most potent results were from the ethyl acetate ( $83.4 \pm 4.0\%$ ) and methanol ( $64.1 \pm 15.6\%$ ) extracts. The relation between the chemical profile and its biological activities was also evaluated through chromatographic profile by HPLC-DAD and principal component analysis (PCA). There was a positive correlation between the major peaks observed and the ethyl acetate and methanol extracts regarding the biological effect of the species. It is concluded that *Tournefortia paniculate*, especially ethyl acetate and methanol extract, has potential for the prevention and treatment of diabetes, as well as for the treatment of cardiovascular diseases.

**Keywords:** *Myriopus paniculatus*. Enzyme inhibition.  $\alpha$ -glycosidase. Glycation. Vasorelaxant.

## 1. INTRODUÇÃO

Doenças crônicas não transmissíveis apresentam elevada morbidade e mortalidade, tem sido consideradas problemas de saúde pública no Brasil e em todo mundo, com o diabetes em segundo lugar das doenças que mais causam custos ao Sistema Único de Saúde (SUS) no Brasil, correspondendo a cerca de 30% dos gastos, aproximadamente R\$1,15 bilhões (NILSON et al., 2018). Em 2019, 1,5 milhões de pessoas tiveram mortes diretamente causadas por diabetes (WHO, 2021). Sendo assim, a busca por novos agentes terapêuticos se faz necessária para promover uma melhora na qualidade de vida destes pacientes.

A diabetes é um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Dentre os fatores que contribuem para o desenvolvimento dessas doenças, destacam-se as alterações no tônus vascular que resultam em aumento da resistência periférica e prejuízo da perfusão tecidual (CARDEN; GRANGER, 2000). Sendo assim, os vasodilatadores são uma importante classe de medicamentos que promovem relaxamento da musculatura lisa vascular, contribuindo para restabelecer o fluxo de sangue para os tecidos (KUBOTANI; FERNANDES; JÚNIOR, 2019).

As doenças cardiovasculares, assim como a neuropatia, nefropatia, retinopatia diabética e outras complicações, podem ser causadas pela glicação. Essa reação entre glicose e componentes celulares é considerada um dos mais importantes mecanismos propostos para relacionar a hiperglicemia crônica com as várias doenças associadas à diabetes (BROWNLEE, 2001). Os produtos de glicação avançada são formados a partir de interações aminocarbonilo, induzidas por reações não enzimáticas entre açúcares redutores ou lipídeos oxidados e proteínas, aminofosfatídeos ou ácidos nucleicos (MONNIER, 2003).

Portanto, controlar a glicemia é fundamental para evitar as complicações da diabetes. Há várias estratégias farmacológicas disponíveis para tratar a doença, como o uso de inibidores de  $\alpha$ -glicosidase. Estes fármacos podem ser usados no tratamento de diabetes tipo I e II. As enzimas  $\alpha$ -glicosidase são necessárias para a etapa final da quebra de carboidratos, como amidos, dextrinas e maltose, em monossacarídeos absorvíveis e estão localizadas nas vilosidades dos enterócitos presentes no intestino delgado (ROSS; GULVE; WANG, 2004). O uso desses fármacos auxilia no controle da glicemia pós-prandial e na prevenção de complicações. Entretanto, assim como acontece durante o uso de outros fármacos para tratar diabetes, há efeitos indesejados e a eficácia nem sempre é satisfatória.

Sendo assim, é imprescindível buscar novas alternativas para o tratamento da doença. Sabendo-se do potencial de plantas medicinais como fonte de substâncias bioativas, a pesquisa

por produtos de origem vegetal para tratar diabetes é interessante. Conhecido popularmente como marmelinho, a *Tournefortia paniculata* é um arbusto da família Boraginaceae, encontrado nas regiões mediterrâneas, Américas e Ásia (SIMÃO et al., 2015). Apresenta-se também como *Myriopus paniculatus*, sua sinonímia. Estudos prévios sugerem que a espécie *Tournefortia paniculata* contém substâncias com efeito inibitório in vitro sobre as enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase (SIMÃO et al., 2013). Também foram realizados estudos em ratos Wistar, sugerindo efeito hipoglicemiante e anorexígeno (SIMÃO et al., 2015). Com isso, objetivou-se avaliar o potencial de diferentes extratos de *Tournefortia paniculata* para auxiliar no tratamento e na prevenção de complicações da diabetes.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal e extração

O material vegetal foi coletado no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras - MG, localizado nas coordenadas 21° 14' S e 45° 00 W, a 918 m de altitude. O material botânico foi depositado no Herbário PAMG da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), em Belo Horizonte - MG, sob registro número PAMG-57806. As folhas foram coletadas e secas a 40°C até peso constante.

A planta seca foi pulverizada em moinho de facas e os extratos preparados por refluxo, empregando sequencialmente os seguintes solventes: hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol e água. A proporção de material vegetal em relação ao solvente foi de 20%. Os extratos foram concentrados em rotavapor à vácuo à 40°C e seus rendimentos extrativos calculados e expressos em porcentagem (TABELA 1).

Todos os extratos foram solubilizados com Kolliphor® (10 mg/mL) que foi a menor concentração que os solubilizou de forma homogênea e foi inerte nos testes.

Tabela 1- Teor (%) dos extratos de *T. paniculata* obtidos com diferentes solventes.

	Massa obtida (g)	Teor (%)
Material vegetal seco total	745,00	100
Ext. hexano	6,05	0,81
Ext. diclorometano	5,54	0,74
Ext. acetato etila	5,92	0,79
Ext. metanol	7,47	1,00
Ext. aquoso	43,24	5,80

Fonte: Da autora (2021).

### 2.2 Extração da $\alpha$ -glicosidase

A  $\alpha$ -glicosidase foi obtida do duodeno fresco suínos provindos do abatedouro Correia Lima, localizado na cidade de Lavras – MG. Logo após o abate dos porcos, removeu-se com cuidado 20 cm de duodeno, logo após o piloro. O material foi levado imediatamente para o laboratório em banho de gelo (JOHN MARSHALL; STURGEON; WHELAN, 1977).

O duodeno foi lavado cuidadosamente com tampão fosfato salino gelado. Em seguida, aberto no sentido longitudinal. A mucosa foi exposta e raspada com auxílio de uma espátula.

Durante toda a extração foi mantida a temperatura de 4°C em banho de gelo. Cada parte de mucosa raspada foi homogeneizada com 5 partes de tampão fosfato salino gelado pH 7,4. Após homogeneizar bem, a mistura foi centrifugada a 4000 RPM por 10 minutos a 4°C e coletou-se o sobrenadante, solução rica em enzima  $\alpha$ -glicosidase (DAHLQVIST, 1984).

### 2.3 Inibição da $\alpha$ -glicosidase

O efeito dos extratos de *Tournefortia paniculata* sobre a enzima  $\alpha$ -glicosidase foram realizados *in vitro* da seguinte forma: um volume de 120  $\mu$ L de substrato p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glicosídeo (p-NPG) a 4,25 mM e 30  $\mu$ L da amostra, isto é, de diferentes concentrações (1 mg/mL; 0,1 mg/mL e 0,01 mg/mL) de extratos que foram solubilizados com Kolliphor® (10 mg/mL) e diluídos em tampão fosfato de potássio (100 mM), foram aquecidos separadamente em banho-maria à 37 °C por 15 minutos. A seguir, foram adicionados em microplaca de 96 poços juntamente com 50  $\mu$ L da solução de enzima. A análise foi realizada de acordo com EL-GUENDOOUZ et al. em 2016, com modificações. Foram realizadas leituras a 405 nm com intervalo de 1 minuto em espectrofotômetro TECAN INFINITY M200 PRO, operado com o sistema de processamento de dados I-control® (versão 3.37), temperatura a 37 °C. As análises foram realizadas em triplicata, obtendo-se uma média. O controle negativo utilizado foi 120  $\mu$ L de p-NPG; 50  $\mu$ L de enzima e 30  $\mu$ L tampão fosfato (pH 6,8) com Kolliphor® (10 mg/mL). Como controle positivo foi empregado 120  $\mu$ L de p-NPG, 50  $\mu$ L de enzima e 30  $\mu$ L de diferentes concentrações de acarbose, conhecido inibidor da  $\alpha$ -glicosidase (PEREIRA et al., 2011). A porcentagem de inibição enzimática foi calculada seguinte forma:

$$\text{Porcentagem de inibição (\%)} = \frac{a \text{ Controle} - a \text{ Teste}}{a \text{ Controle}} \times 100$$

### 2.4 Ensaio antiglicação

O ensaio antiglicação foi realizado conforme SUANTAWEE et al. (2015), com modificações. Basicamente, 200  $\mu$ L de albumina bovina sérica (BSA, 10 mg/mL) foram adicionados a 200  $\mu$ L de frutose (200 mM), ambos em solução 100 mM de tampão fosfato de sódio (pH 7,4), contendo 0,02 % de azida sódica para prevenir a proliferação bacteriana. A mistura reacional foi incubada com 200  $\mu$ L dos extratos (0,001 a 1 mg/mL), solubilizadas em Kolliphor® (10 mg/mL) e diluídos em tampão fosfato de sódio (pH 7,4), a 37 °C por sete dias. As reações foram feitas em microtubos de 1,5 mL.



Após o período de incubação, 250 µL da mistura reacional foram transferidos para microplacas escuras de 96 poços e a formação de BSA glicada foi medida utilizando intensidade fluorescente a um comprimento de onda de excitação de 355 nm e 460 nm de emissão em espectrofotômetro TECAN INFINITY M200 PRO, operado com o sistema de processamento de dados I-control<sup>®</sup> (versão 3.37). A mistura reacional sem frutose foi utilizada como branco. Como controle negativo foi utilizado Kolliphor<sup>®</sup> (10 mg/mL) e, como controle positivo, aminoguanidina (0,1 a 1 mg/ml). As análises foram realizadas em triplicata (SUANTAWEE et al., 2015)

$$\text{Porcentagem de inibição (\%)} = \frac{(\text{Extrato} - \text{Branco})}{(\text{Controle negativo} - \text{branco controle negativo})} \times 100$$

## **2.5 Avaliação do efeito *ex vivo***

### **2.5.1 Obtenção dos corações**

Visando reduzir o uso de testes em animais foram utilizados corações suínos provenientes de descarte de abatedouro. Os experimentos com animais já abatidos são isentos de aprovação do comitê de ética institucional.

Os corações suínos foram obtidos do abatedouro Almeida localizado no município de Nepomuceno – MG onde foram removidos imediatamente após o abate. O coração coletado foi transportado ao laboratório em solução de Krebs resfriada (NaCl 119; KCl 4,7; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,18; MgSO<sub>4</sub> 1,18; CaCl<sub>2</sub> 1,25; NaHCO<sub>3</sub> 25; C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> 11 (mmol/L)). O material foi acondicionado em caixa de isopor com gelo para manter o resfriamento até o momento da dissecação extração do vaso.

### **2.5.2 Efeito de *Tournefortia paniculata* na reatividade vascular**

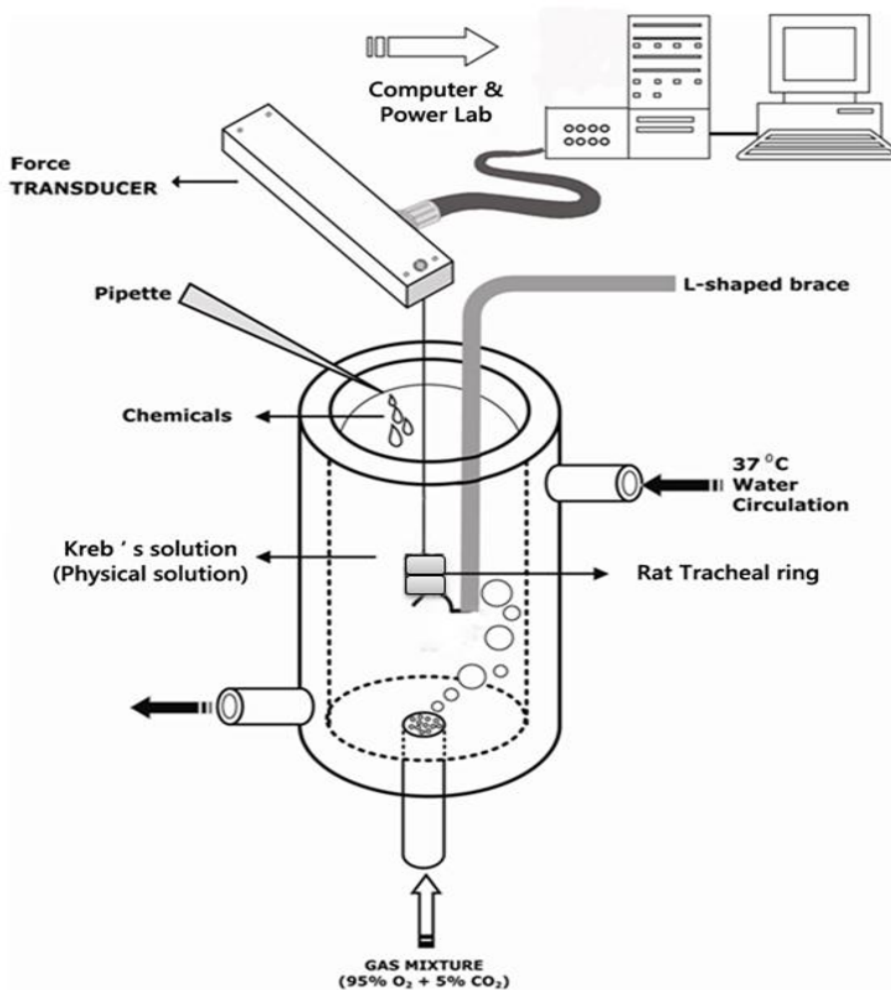
A artéria coronária circunflexa esquerda obtida de coração suínos foi livre de tecidos conectivos e cortada em anéis de 4 mm de comprimento.

Para avaliar a tensão isométrica dos vasos os anéis foram suspensos através de um par de triângulos de metal, em uma cuba de vidro para o órgão isolado contendo de solução de Krebs Bicarbonato: NaCl 119; KCl 4,7; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,18; MgSO<sub>4</sub> 1,18; CaCl<sub>2</sub> 1,25; NaHCO<sub>3</sub> 25; C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> 11 (mmol/L); pH 7,4 mantidos juntamente com carbogênio, uma mistura contendo 95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>, a uma temperatura de 37°C. Um dos ganchos foi conectado a um suporte

fixo ajustável e o outro a um transdutor para registro de contração isométrica (FIGURA 3). Os resultados das contrações foram obtidos pelo programa AQCAD computacional conectado aos transdutores.

Após a estabilização dos vasos na tensão de 5 g/F (MUSHTAQ et al., 2019), a viabilidade foi testada com cloreto de potássio (KCl, 45mM) e durante toda a estabilização a solução de Krebs Bicarbonato foi trocada a cada 15 minutos.

Figura 1 – Exemplo de banho de órgãos isolados.



Fonte: (YILDIZ et al., 2015).

### 2.5.3 Efeito dos extratos *Tournefortia paniculata* nas artérias coronárias pré-contraídas

Após a estabilização por 1 hora com lavagem de solução de Krebs a cada 15 minutos, as artérias foram testadas com KCl (45 mM), seguindo a estabilização do platô foi adicionado 1 mg/mL dos extratos, que foram solubilizados com Kolliphor® (10 mg/mL) e diluídos em

solução de Krebs Bicarbonato, para avaliar a resposta do vaso.

Após o teste de viabilidade com KCl (45 mM), as cubas foram lavadas a cada 15 minutos por 1 hora a fim do vaso voltar ao estado basal. A integridade do endotélio também foi avaliada após pré-contracção com serotonina (5-HT<sup>4</sup>) e, em seguida, adição de Bradicinina (0,3 µmol/L), uma droga capaz de promover relaxamento vascular dependente de endotélio. Os anéis que produziram relaxamento superior à 80% foram considerados com endotélio e foram lavados novamente a cada 15 minutos por 1 hora a fim do vaso voltar ao estado basal. Em seguida, dando continuidade ao teste foi aplicado serotonina (5-HT<sup>4</sup>) e seguindo a estabilização do platô foi adicionado 1mg/mL dos extratos para avaliar a resposta do vaso.

## 2.6 Análise do perfil químico

Como ainda não existem estudos fitoquímicos que descrevam a composição química desta espécie, os extratos de *Tournefortia paniculata* foram submetidos a análise de impressão digital. A análise cromatográfica de impressões digitais é um dos métodos de avaliação química preliminar de extratos vegetais e, é aceita pela OMS como uma estratégia para estimar diferenças qualitativas em preparados de plantas medicinais (HAWRYL et al., 2020).

Para a preparação da amostra, uma alíquota de 10 mg de cada extrato foi dissolvida em 1 mL de metanol grau CLAE, à temperatura ambiente, em banho de ultrassom por 15min. Após centrifugação a 10.000 rpm por 10 min, o sobrenadante (10 µL) foi automaticamente injetado no sistema da CLAE.

Os perfis cromatográficos exploratórios foram obtidos para as amostras *Tournefortia paniculata*, empregando um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) Agilent 1200 Series (Agilent Technologies®, Waldbronn, Alemanha) equipado com bomba quaternária (G1311A), sistema de degaseificação (G13222A), amostrador automático ALS (G1322A), detector de arranjo de diodos (G1315D) e sistema de aquisição de dados operacionalizados pelo *software* OpenLAB. As separações foram realizadas em uma coluna analítica de fase reversa Eclipse XDB-C18 (5 µm × 150 mm × 4,6 mm I.D.) (Agilent Technologies®, EUA), com fluxo de 1 mL/min, empregando gradiente linear de acetonitrila acidificada com 0,1% e ácido fosfórico, conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2 - Gradiente linear de eluição empregado para registro dos perfis cromatográficos exploratórios por CLAE.

Tempo (min)	A (%)	B (%)
0	95	5
65	5	95
70	5	95
75	95	5
85	95	5

Legenda: A= água. B = acetonitrila. Ambos os eluentes foram acidificados com 0,1% de ácido fosfórico.

Fonte: Da autora (2021).

As análises foram realizadas a 40 °C, com detecção no comprimento de onda de 210 nm.

## 2.7 Análise estatística dos dados

Foram obtidas as médias das porcentagens de inibição enzimática e de inibição da glicação para cada amostra. Dos experimentos de reatividade vascular, foram obtidas curvas concentração-resposta e o efeito máximo foi comparado entre os extratos. Foi usada a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de cada dado. Os dados foram analisados no programa Graphpad Prism 5.0, utilizando ANOVA e pós-teste de Dunnett. Foi considerado significativo valores de  $p < 0,05$ .

A análise de PCA consiste em identificar dentro de múltiplos dados qual a direção que contém o maior número de informações. Por meio da padronização dos dez picos com maior porcentual de área relativa nos perfis cromatográficos foi possível demonstrar diferenças entre os extratos analisados (gráfico de scores) e determinar sua correlação com as variáveis de atividades biológicas (gráfico de *loadings*).

Como durante a eluição, algumas variações podem ocorrer nos tempos de retenção devido a fatores como condicionamento de coluna, temperatura e pressão, optamos por numerar os dez picos de maior porcentual de área relativa em ordem crescente relativo ao tempo de eluição (picos 1 a 10, conforme Figura 6). A análise de componentes principais (PCA) foi realizada no software Statistica, versão 13.5 (StatSoft, Tulsa, OK).

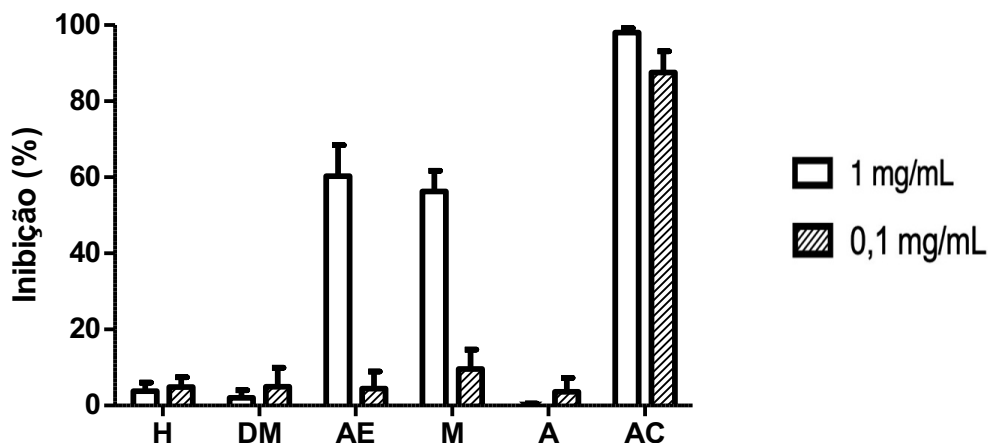
### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Efeito de *Tournefortia paniculata* sobre a atividade de $\alpha$ -glicosidase

Os extratos de *Tournefortia paniculata* foram avaliados em duas concentrações (0,1 mg/mL e 1,0 mg/mL). Nenhum dos extratos avaliados apresentou efeito inibitório significativo na menor concentração. Na concentração de 1 mg/mL, os extratos acetato de etila e metanol foram os que apresentaram maior efeito inibitório,  $60 \pm 8\%$  e  $56,2 \pm 5,4\%$  respectivamente. Não foram observadas atividades inibitória da  $\alpha$ -glicosidase para os extratos hexano, diclorometano e aquoso em nenhuma das concentrações testadas (FIGURA 2).

A acarbose (1 mg/mL), conhecido inibidor da glicosidase (controle positivo) inibiu a atividade da glicosidase em  $98 \pm 1,2\%$ . Este efeito foi semelhante ao observado na concentração de 0,1mg/mL. O efeito observado para a acarbose foi significativamente maior que o observado para os extratos na mesma concentração.

Figura 2 - Porcentagem de inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase em relação aos extratos de *Tournefortia paniculata*. Resultados dos extratos nas concentrações de 0,1mg/mL e 1,0 mg/mL.



Legenda: H: Extrato hexano; DM: Extrato diclorometano; AE: Extrato acetato de etila; M: Extrato metanol; A: Extrato aquoso; AC: Acarbose.

#### 3.2 Efeito de *Tournefortia paniculata* sobre a inibição da glicação proteica

A aminoguanidina é um dos agentes mais utilizados e mais eficazes para prevenir e reduzir a formação de produtos de glicação (controle positivo). Nos testes, a aminoguanidina apresentou uma capacidade de inibir a glicação proteica em  $91 \pm 8,3\%$  na concentração de 1

mg/mL e  $77 \pm 13\%$  na concentração de 0,1 mg/mL.

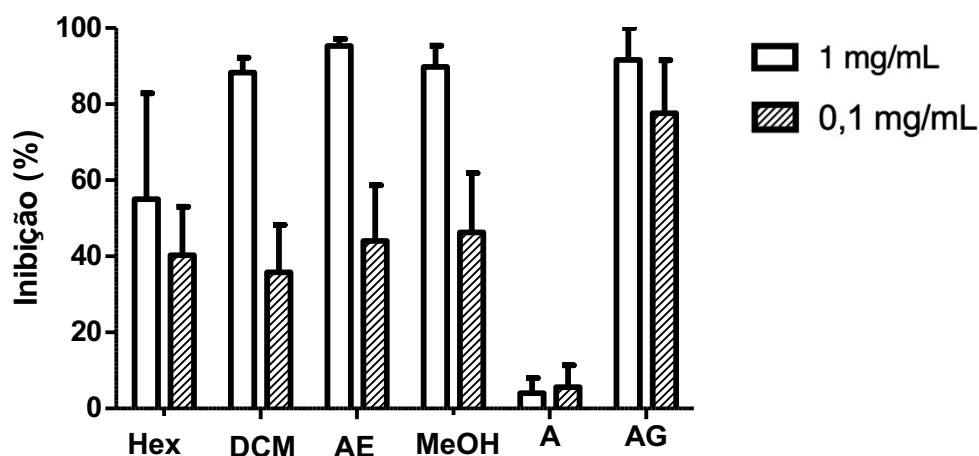
No ensaio anti-glicação os extratos preparados com solventes orgânicos apresentaram uma inibição concentração-dependente. Já o extrato aquoso não apresentou inibição em nenhuma das concentrações (FIGURA 3).

O extrato acetato de etila a 1,0 mg/mL apresentou a maior capacidade antiglicação *in vitro* com  $95 \pm 1,8\%$ , seguido pelo extrato metanólico com  $89 \pm 5,6\%$ , extrato diclorometano com  $84 \pm 0,8\%$  e extrato hexano com  $82 \pm 7,5 \%$  (FIGURA 3).

Na concentração de 0,1 mg/mL, os extratos obtiveram os seguintes percentuais de inibição: hexano  $40,3 \pm 12,7\%$ , diclorometano  $35,7 \pm 12,5\%$ , acetato de etila  $44 \pm 14,6\%$  e metanol  $46,2 \pm 15,6\%$ . O extrato aquoso obteve resultado próximo a zero  $5,6 \pm 5,6\%$ .

Os resultados mostrados apresentam um efeito significativo na inibição da formação dos produtos finais de glicação. Apesar de não haver diferença significativa entre eles, os extratos acetato de etila metanol e diclorometano, na concentração de 1mg/mL, apresentaram valores inibitórios semelhantes ao observado para aminoguanidina (controle positivo).

Figura 3 - Porcentagem de inibição da glicação em relação aos extratos de *Tournefortia paniculata*. Resultados dos extratos nas concentrações de 0,1mg/mL e 1,0 mg/mL.



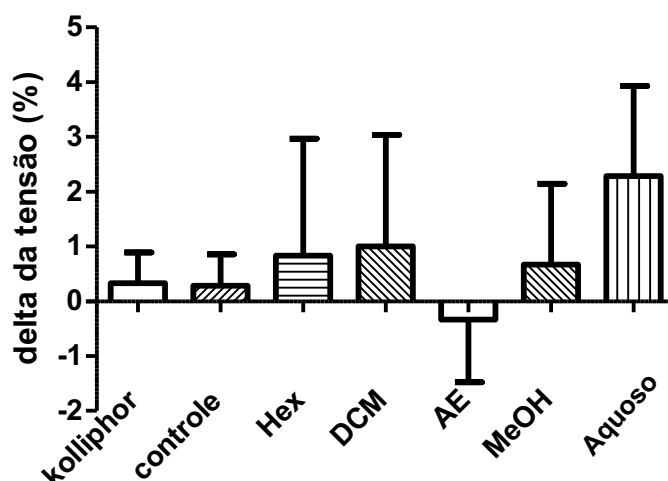
Legenda: H: Extrato hexano; DM: Extrato diclorometano; AE: Extrato acetato de etila; M: Extrato metanol; A: Extrato aquoso; AG: Aminoguanidina.

### 3.3 Resultados de *Tournefortia paniculata* na reatividade vascular

O veículo usado no preparo dos extratos, solução aquosa de Kolliphor® (10mg/mL) não promoveu efeito significativo sobre a tensão vascular (FIGURAS 4 e 5).

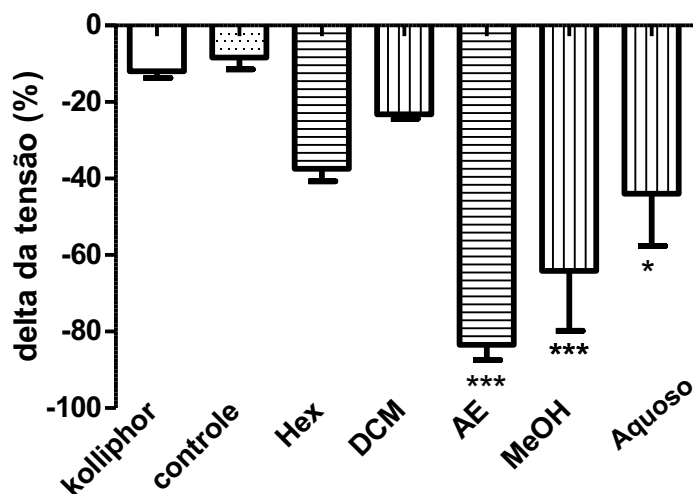
Após o teste de viabilidade das artérias com KCl (45 mM) e de integridade do endotélio com bradicinina (0,3  $\mu\text{mol/L}$ ), foi feita uma pré-contração com KCl (45 mM) para avaliar o efeito dos extratos sobre a tensão vascular. Com exceção do extrato em acetato de etila, os demais tenderam a aumentar a tensão vascular. Entretanto, nenhum dos extratos apresentou efeito significativo sobre a tensão da coronária suína (FIGURA 4).

Figura 4 - Porcentagem de relaxamento vascular após pré-contração com KCl mediante tratamentos com extratos de *Tournefortia paniculata*



Nos testes em que a pré-contração foi feita com serotonina, os extratos acetato etila e metanol produziram o maior efeito de relaxamento na concentração 1 mg/ml.

Figura 5 - Porcentagem de relaxamento vascular após pré-contracção com serotonina mediante tratamentos com extratos de *Tournefortia paniculata*



Dentre todas os extratos testados, os extratos acetato etila e metanol se mostraram os mais potentes e produziram um relaxamento de  $83,4 \pm 4\%$  e  $64,1 \pm 15,6\%$ , respectivamente, nas artérias coronárias após contracção com serotonina (FIGURA 5). O extrato aquoso promoveu relaxamento menos acentuado, com  $44 \pm 13,6\%$ , em relação aos extratos acetato de etila e metanol. Já os extratos hexano e diclorometano não obtiveram resultados significativamente diferentes do controle após pré-contracção com serotonina, sendo  $37,5 \pm 3,2\%$  e  $23,2 \pm 1,1\%$ , respectivamente.

### 3.4 Análise do perfil químico

A análise dos perfis cromatográficos por CLAE-DAD a 210 nm foi realizada nas mesmas condições para todos os extratos, a fim de apontar diferenças e/ou semelhanças no perfil químico.

Os perfis cromatográficos dos extratos hexano, diclorometano e acetato de etila caracterizaram os perfis mais complexos. O perfil do extrato hexânico apresentou um pico majoritário de polaridade intermediária aproximadamente em 36 min. Os perfis cromatográficos dos extratos diclorometano e acetato de etila foram similares com predominância de picos no intervalo de 20 a 75 min. Os perfis dos extratos metanol e aquoso também indicaram semelhança entre si. Nestes perfis os picos se concentraram na região de compostos polares (0-30 min), sendo observados dois picos majoritários com tempos de retenção de 3,41 e 21,88 min. O perfil do extrato metanólico (92 picos) demonstrou ser mais



complexo que do extrato aquoso (37 picos). Entretanto, em ambos predominaram picos com áreas abaixo de 1% (FIGURA 6).

A fim de apontar os picos potencialmente responsáveis pelas atividades biológicas por meio de análise quimiométrica, os dez picos de maior área relativa foram selecionados, conforme apresenta a Tabela 3 e Figura 6.

Tabela 3 - Picos selecionados da impressão digital obtida por CLAE-DAD a 210 nm para fins de análise de componentes principais apontados na Figura 4 para cada perfil cromatográfico dos extratos de *Tournefortia paniculata*

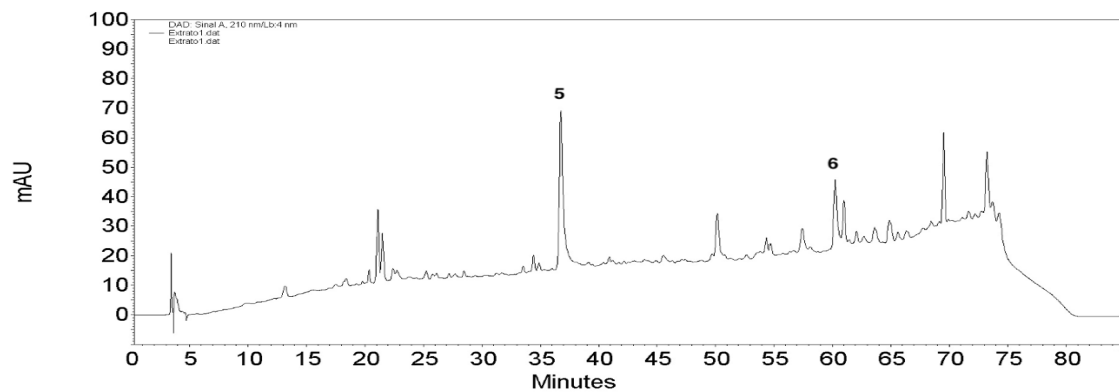
<b>Extrato hexânico</b>			
<b>Número do pico</b>	<b>TR (min)</b>	<b>Área</b>	<b>Área relativa (%)</b>
1	3,13	796685	0,61
2	20,36	62205	0,05
3	24,99	703524	0,54
4	25,88	404262	0,31
5	36,50	5078601	3,88
6	60,76	1981328	1,52
7	62,47	2245520	1,72
8	69,68	1095406	0,84
9	73,46	2286761	1,75
10	74,03	3216482	2,46
<b>Extrato Diclorometano</b>			
<b>Número do pico</b>	<b>TR (min)</b>	<b>Área</b>	<b>Área relativa (%)</b>
1	2,98	1273258	0,66
2	20,41	2537512	1,32
3	24,75	2200275	1,14
4	25,85	1876774	0,97
5	36,49	8119842	4,21
6	60,84	3375827	1,75
7	62,49	2571433	1,33
8	69,51	4167590	2,16
9	73,31	7771650	4,03
10	73,71	12102642	6,28

Tabela 3 - Continuação.

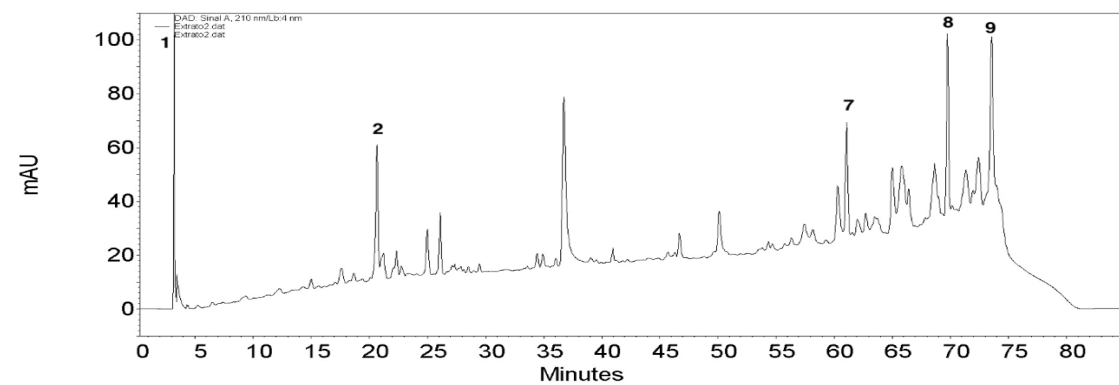
<b>Extrato Acetato de etila</b>			
<b>Número do pico</b>	<b>TR (min)</b>	<b>Área</b>	<b>Área relativa (%)</b>
1	3,05	686715	0,27
2	20,44	4027770	1,58
3	24,79	6925779	2,72
4	25,87	3296990	1,29
5	36,51	10370832	4,07
6	61,07	5396282	2,12
7	62,79	3177489	1,25
8	69,43	1174473	0,46
9	72,78	16378657	6,43
10	73,75	18350566	7,21
<b>Extrato Metanólico</b>			
<b>Número do pico</b>	<b>TR (min)</b>	<b>Área</b>	<b>Área relativa (%)</b>
1	3,41	44744341	11,35
2	20,64	3527863	0,89
3	24,75	1880347	0,48
4	25,88	4697057	1,19
5	36,55	1577981	0,40
6	60,54	5945610	1,51
7	62,37	2251251	0,57
8	69,85	4624610	1,17
9	72,99	18247390	4,63
10	73,61	16208617	4,11
<b>Extrato aquoso</b>			
<b>Número do pico</b>	<b>TR (min)</b>	<b>Área</b>	<b>Área relativa (%)</b>
1	3,19	796885	0,61
2	20,86	938183	0,72
3	24,99	703524	0,54
4	25,88	404267	0,31
5	36,50	5078601	3,88
6	60,77	1981328	1,52
7	62,47	2245520	1,72
8	69,68	1095406	0,84
9	73,46	2286761	1,75
10	74,03	9939168	7,60

Figura 6 - Perfis cromatográficos por CLAE-DAD para os extratos de *Tournefortia paniculata* a 210 nm.

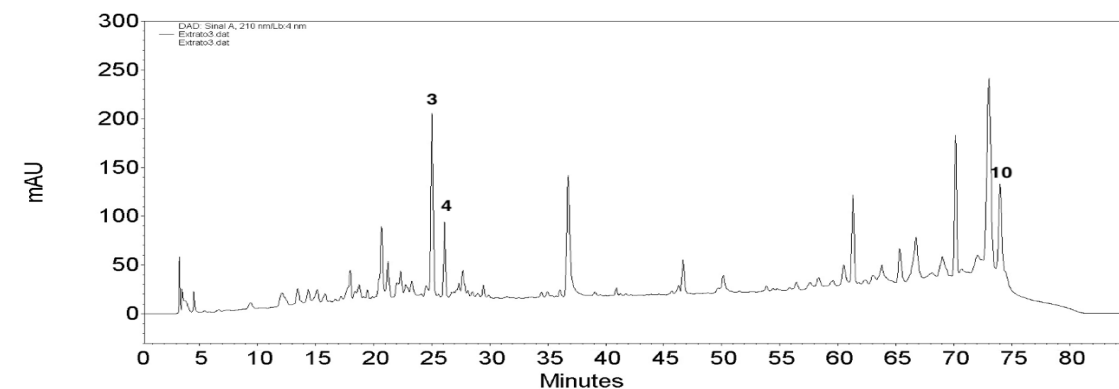
Extrato hexano



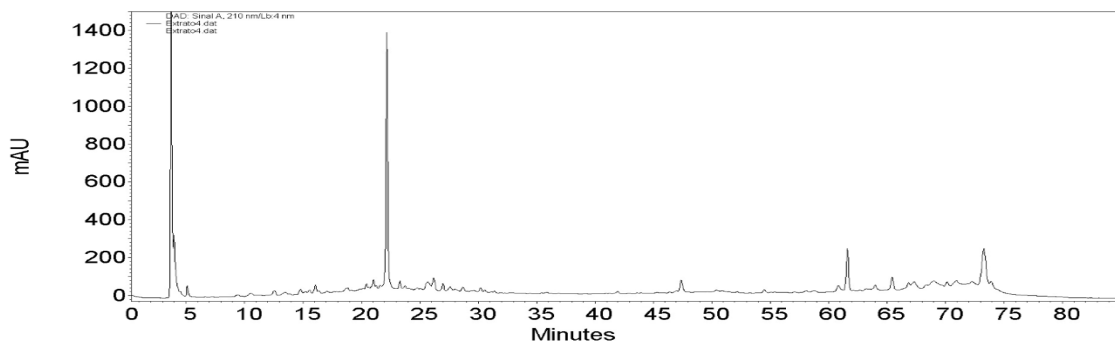
Extrato diclorometano



Extrato acetato de etila



### Extrato metanol



### Extrato água

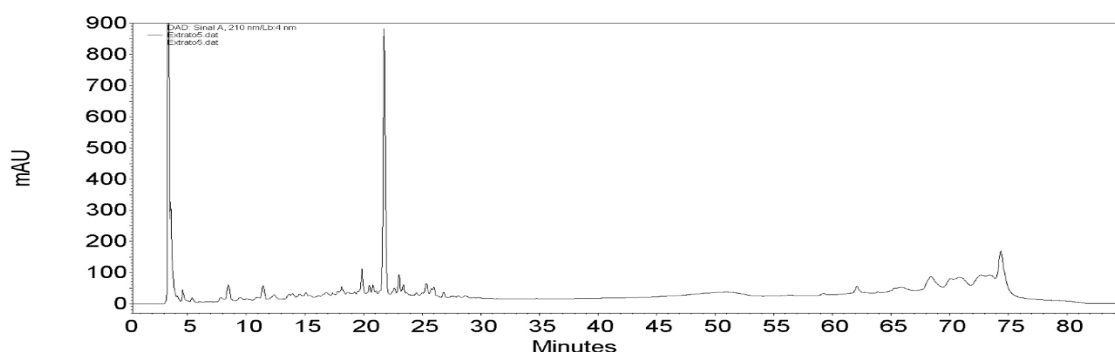
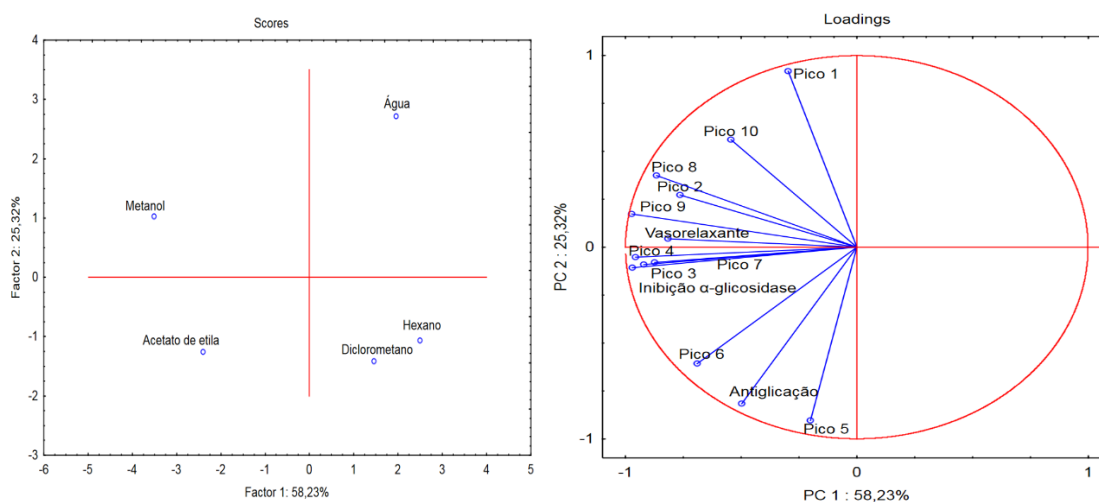


Figura 7 - Gráficos de scores e loadings para PCA (PCA1 x PCA2) dos extratos de *Tournefortia paniculata* (scores) e dos 10 picos de maior área relativa analisados por análise de impressão digital por CLAE-DAD e atividades biológicas (loadings).



A correlação entre os 10 picos de maior área percentual relativa dos cromatogramas (FIGURA 6) e as atividades biológicas avaliadas ( $\alpha$ -glicosidase, antiglicação e vasorelaxante) foram avaliados por meio de análise de componentes principais (PCA).

De acordo com os resultados observados na Figura 7, a primeira componente principal (PC1) e a segunda (PC2) foram capazes de descrever 83,55 % da variância total. A componente principal 1 (PC1) representou 58,23 % da variação total dos dados, sendo observado a formação de dois grupos (da esquerda, com valores de PC1 negativos e da direita, com valores de PC1 positivos). No gráfico de escore observa-se que o grupo da direita foi constituído pelos extratos hexano e diclorometano, apresentando perfis cromatográficos bastante semelhantes. Distinção química expressiva no grupo da direita foi observada no extrato aquoso. Já o grupo da esquerda foi representado pelos extratos provenientes do acetato de etila e metanol.

Pela análise do gráfico de peso (*loadings*) sobre o de escores (FIGURA 7) observa-se a correlação entre os perfis químicos dos extratos acetato de etila e metanol e as atividades biológicas (inibidora da  $\alpha$ -glicosidase, antiglicação e vasorelaxante). Este resultado corrobora com as observações anteriores. Os dados sugerem que os picos 5 e 6 do extrato acetato de etila tem forte efeito antiglicação. Os constituintes químicos correspondentes aos picos 3 e 7 possuem maior evidência que são os responsáveis pelo efeito inibitório da  $\alpha$ -glicosidase e os picos 4 e 9 sobre o vasorelaxamento.

#### 4. DISCUSSÃO

Na preparação de um extrato vegetal a partir de plantas medicinais, se busca extrair da forma mais seletiva possível os constituintes ativos. Uma vez que a composição química de *Tournefortia paniculata* não é conhecida, a extração com solventes de polaridades crescente foi empregada neste estudo, a fim de selecionar extratos com maior potencial antidiabético e vasorelaxante.

Os resultados deste estudo sugerem que os extratos em acetato de etila e metanólico da planta *Tournefortia paniculata* (syn. *Myriopus paniculatus*), podem ajudar no controle da glicemia e na prevenção de complicações relacionadas à diabetes. A diabetes é um problema de saúde pública em todo o mundo e existe uma grande demanda por novas e eficientes estratégias de tratamento. Dentre estas estratégias, o uso de plantas medicinais é uma opção valiosa, uma vez que são fontes de substâncias químicas biologicamente ativas que podem auxiliar no tratamento de doenças.

Controlar a glicemia é fundamental importância para evitar as complicações da diabetes. Existem diversas estratégias farmacológicas disponíveis para tratar a doença, dentre elas, o uso de inibidores de  $\alpha$ -glicosidase.

As enzimas  $\alpha$ -glicosidase são necessárias para a digestão de polissacarídeos e absorção

de glicose. Assim, os inibidores de  $\alpha$ -glicosidase são alternativas eficazes na terapia da diabetes tipo II e hiperglicemia.

Neste trabalho foram avaliados diferentes extratos da planta e foi observado que os extratos acetato de etila e metanol, na concentração 1 mg/mL, apresentaram efeito inibitório da enzima  $\alpha$ -glicosidase.

O efeito de inibição da atividade de  $\alpha$ -glicosidase pelos extratos de *Tournefortia paniculata* foi explorado previamente por SIMÃO; CORRÊA e CHAGAS (2012). Neste estudo, os autores avaliaram extratos de diversas plantas, entre elas: *Simaba ferruginea*, *Baccharis trimera*, *Aloe vera*, *Garcinia cambogia* e *Tournefortia paniculata*. A enzima  $\alpha$ -glicosidase, assim como no presente estudo, foi obtida de duodeno suínos, porém foi usada outra metodologia na extração da enzima. O extrato aquoso de *Tournefortia paniculata* apresentou resultado inibitório superior às demais plantas avaliadas.

No nosso grupo de pesquisa (BITTENCOURT, 2019) avaliou o potencial da *Tournefortia paniculata* em inibir a enzima  $\alpha$ -glicosidase. As frações diclorometano e butanol foram as que apresentaram a maior inibição enzimática (IC<sub>50</sub> de 0,096 e 0,094 mg/mL, respectivamente). Neste estudo foram obtidas frações por partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente a partir do extrato bruto etanólico. No trabalho de Bittencourt (2019) foi utilizado a enzima  $\alpha$ -glicosidase recombinante bacteriana e no presente trabalho usou-se  $\alpha$ -glicosidase de intestino suíno, um mamífero, que possui a enzima com mais homologia à humana. Além disso, o protocolo para avaliar o efeito inibitório também foi diferente.

Diversas complicações da diabetes podem ser causadas pela glicação. A reação entre glicose e componentes celulares é um dos mais importantes mecanismos propostos para relacionar a hiperglicemia crônica com as várias doenças associadas à diabetes (BROWNLEE, 2001).

Outro efeito observado no presente trabalho foi a inibição da glicação proteica. Os resultados mostraram que os extratos inibiram a formação de produtos glicosados, sendo que na maior concentração (1 mg/mL) a inibição observada para os extratos diclorometano, acetato de etila e metanol foi igual à observada para AG (controle positivo). Esse resultado sugere que a espécie estudada pode contribuir para a prevenção de complicações relacionadas à diabetes, já que os produtos de glicação avançada estão associados a alterações em vários tecidos.

Quando ligada em receptores específicos pode ocorrer uma alteração na sinalização celular resultando em aumento da produção de radicais livres. Os produtos finais de glicação avançada contribuem para complicações vasculares na diabetes sendo assim um alvo promissor

para medidas terapêuticas (GOH; COOPER, 2008; BROWNLEE, 2001). Há evidências de que em diabéticos há maior produção de espécies reativas de oxigênio e que o estresse oxidativo está associado às complicações da diabetes (SONG et al., 2021). Estudos mostram que existe uma boa correlação entre atividade antiglicação e capacidade antioxidante (MATSUDA et al., 2003; YOKOZAWA; NAKAGAWA, 2004). No trabalho realizado por BITTENCOURT (2019), foi observado que a espécie *Tournefortia paniculata*, atual *Myriopus paniculatus*, apresentou efeitos antioxidantes significativos, em especial, sua fração butanólica, que mostrou resultados melhores que Butil-hidroxitolueno (BHT), conhecido antioxidante.

Diversos agentes naturais e sintéticos com possíveis propriedades antiglicação são estudados. Foi mostrado que o extrato aquoso e fração acetato de etila de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume), apresentaram uma atividade inibitória significativa contra a formação de produtos finais de glicação avançada (PENG et al., 2008).

O interesse em plantas que atuem em mecanismos diversos para tratar diabetes, como inibindo a  $\alpha$ -glicosidase e a glicação proteica, torna a *Tournefortia paniculata* uma alternativa de tratamento extremamente promissora.

Além disso, a diabetes é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, o que aumenta muito o risco de morte.

Várias substâncias são utilizadas para o tratamento de diversas doenças cardiovasculares dentre elas os vasodilatadores. O relaxamento e contração depende de vários fatores dentre eles o endotélio. O controle do tônus vascular pelo endotélio é devido à liberação de mediadores como o óxido nítrico, prostaciclina e de outros fatores que induzem hiperpolarização do músculo liso vascular (CHADHA et al., 2011).

O óxido nítrico se difunde para a camada de células musculares lisas e promove relaxamento através da ativação da guanilato ciclase solúvel que leva a produção de um nucleotídeo cíclico, o GMPc. Os nucleotídeos cíclicos, tanto o AMPc quanto o GMPc levam a um relaxamento vascular através da ativação das respectivas proteínas quinases, a proteína quinase A (PKA) e proteína quinase G (PKG) (DOSTMANN et al., 2002). Assim, estas enzimas induzem um relaxamento na musculatura lisa através de várias ações: ativação de canais de potássio, aumento da recaptação de  $Ca^{2+}$  ou podem ainda inativar a quinase da cadeia leve da miosina (KRUMENACKER; HANAFY; MURAD, 2004).

No presente trabalho foi demonstrado que os extratos acetato de etila e metanol a 1 mg/mL apresentaram efeito vasodilatador na presença de endotélio após pré-contração com serotonina. Um dos mecanismos de relaxamento do músculo liso é o bloqueio dos canais de cálcio. Porém, foi observado que pós-contração com KCl o vaso não relaxou, sugerindo que

não seja esse o mecanismo envolvido no relaxamento observado.

A abertura dos canais de potássio provoca aumento da saída de íons do meio intracelular por difusão passiva, o que causa hiperpolarização da membrana celular. Essa hiperpolarização causa fechamento dos canais de cálcio dependentes de voltagem e diminuição da entrada de cálcio, resultando em vasodilatação (FARACI; HEISTAD, 1998).

No trabalho realizado por Diniz et al. (2013) foi observado que a 4-metoxixantona não obteve relaxamento pós contração com KCl porém quando pré-contraída com fenilefrina obteve relaxamento. A ausência de relaxamento nos vasos pré-contraídos com KCl é uma indicação da participação dos canais de potássio. Para verificar essa hipótese o grupo utilizou tetraetilamônio (TEA) que atua como bloqueador dos canais de potássio nos vasos pré-contraídos com fenilefrina. O TEA bloqueou completamente o efeito relaxante da 4-metoxixantona, comprovando sua hipótese. Tal teste também poderia ser empregado para direcionar futuros experimentos com *Tournefortia paniculata*.

Também no trabalho realizado por Diniz et al. (2013) após a 4-metoxixantona induzir o relaxamento pós pré-contração por fenilefrina na presença de endotélio o grupo testou a participação do óxido nítrico como fator relaxante derivado de endotélio, para isso usaram o N<sup>G</sup>-Nitro-L-arginina Metil Ester (L-NAME), conhecido inibidor do óxido nítrico sintase. Nestas condições o potencial vasorelaxante de 4-metoxixantona foi reduzido. Tais testes podem direcionar experimentos futuros para elucidar o mecanismo de relaxamento de *Tournefortia paniculata*.

No trabalho realizado por Younis et al. (2020), também com coronárias de porco, foi avaliado o potencial vasorelaxante dos extratos de *Asphodelus tenuifolius*. Seu relaxamento máximo foi produzido pelo extrato acetato de etila na concentração de 1mg/mL e de forma independente de endotélio pós-contração com tromboxano mimético (U46619). Para avaliar a participação de canais de potássio os vasos foram contraídos com KCl e com bloqueador de canais de potássio, TEA, o que também não afetou seu efeito relaxador.

Diversas classes de metabólitos secundários apresentam efeitos biológicos. Porém, muitas vezes esses efeitos são resultado de sinergismo entre as substâncias ativas presentes nos extratos vegetais (WAGNER; ULRICH-MERZENICH, 2009).

Análises de triagem fitoquímica de extratos de *Tournefortia paniculata* descreveram a presença de flavonoides, taninos, cumarinas, heterosídeos cardiotônicos, antraquinonas, carotenóides, catequinas, lactonas sesquiterpênicas e saponinas (MORAES; ORLANDO VIEIRA DE; HITOMI, 2007; SIMAO et al., 2014).

A composição química de plantas medicinais é complexa e muitas vezes desconhecida



(YANG et al., 2005), como é o caso de *Tournefortia paniculata*. A análise cromatográfica de impressões digitais ou “fingerprint” é uma técnica eficaz e abrangente que pode ser empregada para comparar as diferenças moleculares entre extratos de plantas (LIANG et al., 2021). Além disso, a análise de impressão digital pode mostrar não apenas constituintes ativos, mas também as proporções químicas deles (YANG et al., 2005).

Devido a complexidades dos perfis químicos cromatográficos de extratos vegetais, análises multivariadas têm sido empregadas a fim de discriminar diferenças entre amostras de drogas e extratos vegetais (SABIR; RAFI; DARUSMAN, 2016; HAWRYŁ et al., 2020; LIANG et al., 2021). A avaliação dos complexos e extensos dados de um perfil cromatográfico é difícil. Para facilitar a análise de multidados, a quimiometria, como uma ferramenta estatística, tem sido introduzida para a avaliação da dissimilaridade química entre a impressão digital dos cromatogramas em matrizes complexas, como os extratos vegetais (LI et al., 2020).

A análise de componentes principais (PCA) é um método de reconhecimento de padrões não supervisionada. Normalmente é o primeiro passo para uma análise exploratória dos dados sem conhecimento prévio de classe da amostra (MELUCCI et al., 2016; PETRETTO et al., 2016). Esses dados são convertidos em informações para estabelecer critérios de similaridade e parâmetros de reconhecimento para perfis metabólicos de extratos de plantas medicinais (MARTINS; PEREIRA-FILHO; CASS, 2011).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) introduziu e aceitou as análises de impressões digitais como uma estratégia para a avaliação de fitoterápicos (TISTAERT et al., 2011). A análise de impressão digital fornece uma visão abrangente da composição química de uma amostra (SABIR et al., 2017). Além disso, o tratamento quimiométrico das impressões digitais permite modelar e prever atividades farmacológicas e indicar os picos potencialmente responsáveis pelas atividades modeladas (TISTAERT et al., 2011).

A análise de componentes principais mostrou perfis químicos similares e discriminatórios entre os extratos de *Tournefortia paniculata*. Os extratos hexânico e diclorometano apresentaram perfis químico similares entre si. Entretanto, os perfis dos extratos acetato de etila, metanol e aquoso apresentaram distinção entre si e com os demais.

Pela análise do gráfico de pesos (*loadings*) sobre o de escores (FIGURA 7) foi possível apontar a contribuição dos picos com maior porcentual de área relativa sobre as atividades biológicas avaliadas. Os picos 5 e 6 do perfil cromatográfico do extrato em aceto de etila teve correlação positiva com o efeito antiglicação. Ao avaliar os perfis dos extratos hexânico e diclorometânico nota-se também a presença marcante dessas duas substâncias. No entanto, a substância referente ao pico 5 encontrou-se mais concentrada no extrato em acetato de etila, o

que sugere que os extratos hexânico e diclometânico não foram ativos para o efeito antiglicante, devido a falta de proporcionalidade entre dose e resposta.

No que tange ao efeito de inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase, as substâncias químicas correspondentes aos picos 3 e 7 indicaram ser responsáveis por este efeito (FIGURA 7). Estes picos estão presentes nos extratos acetato de etila e metanol, os quais foram os que apresentaram a melhor resposta para este efeito (FIGURA 2).

Portanto, a PCA corroborou com resultados observados nos ensaios de inibição da enzima  $\alpha$ -glicosidase, antiglicação e vasorelaxamento em artéria do coração suíno.

## 5. CONCLUSÃO

O presente estudo reporta o potencial dos extratos de *Tournefortia paniculata* no tratamento e prevenção de diabetes e doenças cardiovasculares. Os resultados indicam um efeito inibitório da enzima  $\alpha$ -glicosidase, antiglicação e vasodilatador em artéria coronária dos extratos acetato etílico e metanólico, sugerindo que a(s) substância(s) química responsável por esses efeitos encontram-se em maior concentração nestes extratos, sendo os mais promissores para futuros estudos biológicos e fitoquímicos.

Recomendamos a continuidade dos trabalhos sobre o potencial da espécie *Tournefortia paniculata* na prevenção da diabetes. Visto o potencial do extrato acetato de etila e metanol como vasorelaxante, futuros trabalhos podem investigar a participação do endotélio e elucidar qual seu mecanismo de ação. Assim, este estudo contribui no direcionamento de estudos químico-biológicos que visem identificar as substâncias responsáveis pelos efeitos anti-diabéticos e vasorelaxantes observados em extratos de *Tournefortia paniculata*.

## REFERÊNCIAS

- BERTOLUCCI, S. K. V.; PINTO, J.E.B.P.; CARDOSO, M.D.G.; GAVILANES, M.L.; SANTIAGO, E.J.A.; LAMEIRA, O.A. Abordagem fitoquímica Preliminar em Plântulas micropropagadas de *Tournefortia cf paniculata* Cham. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 1, p. 59–65, 2005.
- BERTOLUCCI, S. K. V.; PINTO, J.E.B.P.; CARDOSO, M.D.G.; GAVILANES, M.L.; SANTIAGO, E.J.A.; LAMEIRA, O.A. Micropropagation of *Tournefortia cf paniculata* Cham. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 3, n. 1, p. 43–49, 2000.
- BITTENCOURT, W. J. M. **Tournefortia paniculata Vent: a phytochemical and biological approach**. Dissertação de Doutorado - Universidade Federal de Lavras (UFLA), 2019.
- BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 813–820, 2001.
- CARDEN, D. L.; GRANGER, D. N. Pathophysiology of ischaemia–reperfusion injury. **The Journal of Pathology**, v. 190, n. 3, p. 255–266, 2000.
- CHADHA, P.S.; LIU, L.; RIKARD-BELL, M.; SENADHEERA, S.; HOWITT, L.; BERTRAND, R.L.; GRAYSON, T.H.; MURPHY, T.V.; SANDOW, S.L. Endothelium-Dependent Vasodilation in Human Mesenteric Artery Is Primarily Mediated by Myoendothelial Gap Junctions Intermediate Conductance Calcium-Activated K<sup>+</sup> Channel and Nitric Oxide. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 336, p. 701–708, 2011.
- DAHLQVIST, A. Assay of intestinal disaccharidases. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 44, n. 2, p. 169–172, 1984.
- DINIZ, T.F.; PEREIRA, A.C.; CAPETTINI, L.S.; SANTOS, M.H.; NAGEM, T.J.; LEMOS, V.S.; CORTES, S.F. Mechanism of the Vasodilator Effect of Mono-oxygenated Xanthenes: A Structure-Activity Relationship Study. **Planta medica**, v. 79, 2013.
- DOSTMANN, W.R.; TEGGE, W.; FRANK, R.; NICKL, C.K.; TAYLOR, M.S.; BRAYDEN, J.E. Exploring the mechanisms of vascular smooth muscle tone with highly specific, membrane-permeable inhibitors of cyclic GMP-dependent protein kinase Ialpha. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 93, n. 2–3, p. 203–215, 2002.
- EL-GUENDOUIZ, S.; AAZZA, S.; LYOUSSI, B.; ANTUNES, M.D.; FALEIRO, M.L.; MIGUEL, M.G. Anti-acetylcholinesterase, antidiabetic, anti-inflammatory, antityrosinase and antixanthine oxidase activities of Moroccan propolis. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 51, n. 8, p. 1762–1773, 2016.
- FARACI, F. M.; HEISTAD, D. D. Regulation of the Cerebral Circulation: Role of Endothelium and Potassium Channels. **Physiological Reviews**, v. 78, n. 1, p. 53–97, 1998.
- FULLER, J.H.; MCCARTNEY, P.; JARRETT, R.J.; KEEN, H.; ROSE, G.; SHIPLEY, M.J.; HAMILTON, P.J. Hyperglycaemia and coronary heart disease: The Whitehall Study. **Journal of Chronic Diseases**, v. 32, n. 11, p. 721–728, 1979.

GILANI, A.-H. Novel developments from natural products in cardiovascular research. **Phytotherapy Research**, v. 12, n. S1, p. S66–S69, 1998.

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.

HALBERSTEIN, R. A. Medicinal Plants: Historical and Cross-Cultural Usage Patterns. **Annals of Epidemiology**, v. 15, n. 9, p. 686–699, 2005.

HAWRYŁ, A.; HAWRYŁ, M.; HAJNOS-STOLARZ, A.; ABRAMEK, J.; BOGUCKA-KOCKA, A.; KOMSTA, Ł. HPLC fingerprint analysis with the antioxidant and cytotoxic activities of selected lichens combined with the chemometric calculations. **Molecules**, v. 25, n. 18, p.4301, 2020.

JOHN MARSHALL, J.; STURGEON, C. M.; WHELAN, W. J. Solubilization of porcine intestinal  $\alpha$ -glucosidases and evidence for the separate identities of isomaltase and limit dextrinase. **Analytical Biochemistry**, v. 82, n. 2, p. 435–444, 1977.

KRUMENACKER, J. S.; HANAFY, K. A.; MURAD, F. Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. **Brain research bulletin**, v. 62, n. 6, p. 505 - 515, 2004.

KUBOTANI, K.; FERNANDES, D.; JÚNIOR, A. Utilização de fármacos vasodilatadores de ação direta e indireta no tratamento de hipertensão arterial: artigo de revisão. **Revista Científica FAEMA**, v. 10, p. 148–156, 2019.

LAPORNIK, B.; PROSEK, M.; WONDRA, A. G. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. **Journal of food engineering**, v. 71, n. 2, p. 214-222, 2005.

LI, Y. et al. Quality assessment of herbal medicines based on chemical fingerprints combined with chemometrics approach: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 185, p. 113215, 2020.

LIANG, H.Z.; ZHI-YONG, D.U.; SHUO, Y.U.A.N.; MENG-QIU, L.U.; JIAN-YONG, X.I.N.G.; QING, M.A.; ZHENG-ZHOU, H.A.N.; PENG-FEI, T.U.; JIANG, Y. Comparison of *Murraya exotica* and *Murraya paniculata* by fingerprint analysis coupled with chemometrics and network pharmacology methods. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 19, n. 9, p. 713–720, 2021.

MARTINS, L. R. R.; PEREIRA-FILHO, E. R.; CASS, Q. B. Chromatographic profiles of *Phyllanthus* aqueous extracts samples: a proposition of classification using chemometric models. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 400, n. 2, p. 469-481, 2011.

MATSUDA, H. et al. Structural requirements of flavonoids for inhibition of protein glycation and radical scavenging activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 24, p. 5317–5323, 2003.

- MELUCCI, D. et al. Rapid direct analysis to discriminate geographic origin of extra virgin olive oils by flash gas chromatography electronic nose and chemometrics. **Food Chemistry**, v. 204, p. 263–273, 2016.
- MONNIER, V. M. Intervention against the Maillard reaction in vivo. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 419, n. 1, p. 1–15, 2003.
- MORAES, L. D. S.; ORLANDO VIEIRA DE, Y.; HITOMI, C. Avaliações qualitativas e quantitativas da variação de metabólitos secundários em *Tournefortia paniculata*. **Brazilian Journal of Biosciences**, v. 5, p. 1032–1034, 2007.
- NILSON, E.A.F. et al. Custos atribuíveis a obesidade, hipertensão e diabetes no Sistema Único de Saúde, Brasil, **Revista Panamericana de Saude Pública**, v. 44, p. e32, 2020.
- PENG, X. et al. Cinnamon Bark Proanthocyanidins as Reactive Carbonyl Scavengers To Prevent the Formation of Advanced Glycation Endproducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 6, p. 1907–1911, 1 mar. 2008.
- PEREIRA, A. et al. Inhibition of  $\alpha$ -Glucosidase and Hypoglycemic Effect of Stilbenes from the Amazonian Plant *Deguelia rufescens* var. urucu (Ducke) A. M. G. Azevedo (Leguminosae). **Planta medica**, v. 78, p. 36–38, 16 set. 2011.
- PETRETTO, G. L. et al. Variability of chemical composition and antioxidant activity of essential oils between *Myrtus communis* var. Leucocarpa DC and var. Melanocarpa DC. **Food Chemistry**, v. 197, p. 124–131, 2016.
- RIETBROCK, N.; WOODCOCK, B. G. Two hundred years of foxglove therapy *Digitalis purpurea* 1785–1985. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 6, p. 267–269, 1985.
- ROSS, S. A.; GULVE, E. A.; WANG, M. Chemistry and Biochemistry of Type 2 Diabetes. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 3, p. 1255–1282, 2004.
- SABIR, A.; RAFI, M.; DARUSMAN, L. Discrimination of Red and White Rice Bran from Indonesia Using HPLC Fingerprint Analysis Combined with Chemometrics. **Food Chemistry**, v. 221, 2016.
- SIMAO, A. et al. Chemical composition of medicinal plants used as auxiliary treatments for obesity. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, p. 3840–3846, 2014.
- SIMÃO, A. et al. Antioxidants from Medicinal Plants Used in the Treatment of Obesity. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 3, p. 429–443, 2013.
- SIMÃO, A. A. et al. Anti-obesity Effects of the Administration of *Tournefortia paniculata* Cham Extract on Wistar Rats Subjected to a Hypercaloric Diet. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, p. 494–503, 2015.
- SIMÃO, A. A.; CORRÊA, A.; CHAGAS, P. Inhibition of digestive enzymes by medicinal plant aqueous extracts used to aid the treatment of obesity. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 6, p. 5826–5830, 2012.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO SOBRE A BIODIVERSIDADE BRASILEIRA. *Myriopus paniculatus* (Cham.) Feuillet. Disponível em: <<https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/373833#names>>. Acesso em: 20 jul. 2021.

SONG, Q.; LIU, J.; DONG, L.; WANG, X.; ZHANG, X. Novel advances in inhibiting advanced glycation end product formation using natural compounds. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 140, p. 111750, 2021.

SUANTAWEE, T.; WESARACHANON, K.; ANANTSUPHASAK, K.; DAENPHETPLOY, T.; THIEN-NGERN, S.; THILAVECH, T.; PASUKAMONSET, P.; NGAMUKOTE, S.; ADISAKWATTANA, S. Protein glycation inhibitory activity and antioxidant capacity of clove extract. **Journal of food science and technology**, v. 52, n. 6, p. 3843–3850, 2015.

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 16, p. 97–110, 2009.

WHO. **Diabetes**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>>. Acesso em: 16 abr. 2021.

YANG, L.W.; WU, D.H.; TANG, X.; PENG, W.; WANG, X.R.; MA, Y.; SU, W.W. Fingerprint quality control of Tianjihuang by high-performance liquid chromatography–photodiode array detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1070, n. 1, p. 35–42, 2005.

YILDIZ, O. et al. **Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials Dental Polymers: Effects on Vascular Tone**. 2015.

YOKOZAWA, T.; NAKAGAWA, T. Inhibitory effects of Luobuma tea and its components against glucose-mediated protein damage. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 42 6, p. 975–981, 2004.

YOUNIS, W.; SCHINI-KERTH, V.B.; JUNIOR, A.G.; NOCCHI, S.R.; SILVA, D.B.; ROBERTS, R.E. Endothelium-independent vasorelaxant effect of *Asphodelus tenuifolius* Cav. via inhibition of myosin light chain kinase activity in the porcine coronary artery. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 269, p. 113693, 2020.