

## BIOPROSPECÇÃO *IN VITRO* E *IN SÍLICO* DE SUBSTÂNCIAS ANTIDIABÉTICAS NA PLANTA PARIRI (*Arrabidaea chica*)

Ághata Maria Alves da Silva Lima<sup>1</sup>, Kálita Cardoso da Silva<sup>2</sup>, Thaynara Guimarães Miranda<sup>2</sup>, Karoliny Sousa Miranda<sup>2</sup>, Carla Cristina da Silva<sup>4</sup>, Ilamar Mendes Soares<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Estudante do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas – IFTO/campus Araguatins. Bolsista do Programa de Iniciação Científica. E-mail: <aghata.lima@estudante.ifto.edu.br>

<sup>2</sup>Estudantes do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas – IFTO/campus Araguatins. Voluntárias do Programa de Iniciação Científica. E-mails: <kalita.silva2@estudante.ifto.edu.br>, <thaynara.miranda@estudante.ifto.edu.br>, <karoliny.miranda@estudante.ifto.edu.br>, <daniel.andrade3@estudante.ifto.edu.br>, <bruna.cardoso@estudante.ifto.edu.br>

<sup>4</sup>Professores do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas – IFTO/campus Araguatins. E-mails: <ilamar.souares@ifto.edu.br>, <carla.silva@ifto.edu.br>

**Resumo:** Encontrar formas de mitigação das disfunções ocasionadas por diabetes se constitui uma emergência para a humanidade, e as terapias alternativas com plantas medicinais tem se mostrado cada vez mais um método seguro. Portanto, este trabalho teve como principal objetivo realizar uma bioprospecção de fitoconstituintes de *A. chica* com propriedades antidiabéticas, especialmente àquelas capazes de atuar sobre o metabolismo de carboidratos inibindo a enzima intestinal  $\alpha$ -glicosidase – AG. Para tanto, coletou-se folhas de *A. chica* na cidade de Sampaio-TO, obteve-se o extrato em aparelho de Soxhlet, o qual foi separado do solvente e submetido às seguintes análises: prospecção fitoquímica preliminar que revelou a presença de compostos fenólicos, flavonoides e alcaloides; cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE que permitiu identificar vários compostos fenólicos importantes para o controle das complicações diabéticas; atividade antioxidante que indicou potencial de sequestro de radicais livres; capacidade inibitória da enzima AG *in vitro* que demonstrou forte evidência de capacidade antidiabética desempenhada por esta planta e; estudo *in silico*, utilizando o fitoquímico de menor tempo de retenção do extrato que confirmou as inferências *in vitro*, apresentando a possibilidade de os compostos da planta atuarem tanto no sítio ativo como em sítios alostéricos da enzima. As evidências deste trabalho fornecem base para o uso potencial da *A. chica* como um inibidor da AG, no entanto, estudos *in vivo* são necessários para confirmar esses resultados.

**Palavras-chave:** Fitoquímica; antioxidante; diabetes, plantas medicinais, flavonoides, alfa glicosidase.

### 1 INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus (DM) é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia associadas a disfunções e insuficiência de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, cérebro, coração e vasos sanguíneos. Pode resultar de defeitos de secreção e/ou ação da insulina envolvendo processos patogênicos específicos, por exemplo, destruição das células beta do pâncreas (produtoras de insulina), resistência à ação da insulina, distúrbios da secreção da insulina, entre outros (BRASIL, 2006). Segundo a American Diabetes Association (2020), diabetes pode ser classificado em tipo 1, ocasionada pela destruição das células  $\beta$  autoimunes, geralmente levando à deficiência absoluta de insulina, diabetes tipo 2, devido a uma perda progressiva da secreção de insulina das células  $\beta$ , frequentemente no contexto da resistência à insulina e diabetes mellitus gestacional, diagnosticado no segundo ou terceiro trimestre da gravidez em pessoas que não tenham clara evidencia de diabetes antes da gestação.

Por se tratar de uma doença crônica, os pacientes diagnosticados com DM precisam ter um controle rigoroso da glicemia. Intervenções medicamentosas mostram efeitos positivos, porém o custo elevado e os efeitos indesejáveis têm despertado o interesse de pesquisadores em conhecer os efeitos de

substâncias naturais na redução dos níveis de glicose sanguínea, visto que muitos indivíduos escolhem a suplementação dietética e terapias alternativas com ervas medicinais (RATES, 2001).

No tocante as terapias alternativas para o DM, *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlt., uma Bignoniaceae, popularmente conhecida como Pariri, se mostra muito promissora para o desenvolvimento de produtos naturais de baixo risco para a saúde humana, à medida que vem sendo amplamente utilizada na medicina popular como anti-inflamatório, contra cólicas intestinais, diarreias, anemias e enfermidades da pele, sendo utilizada também pela indústria cosmética (ALVES, 2010) e citada na medicina tradicional como antidiabética (CARTAGENES et al., 2014). Esta planta está entre as inclusas na Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao Sistema Único de Saúde - SUS (Renusus), uma lista constituída por plantas nativas ou exóticas adaptadas, amplamente utilizadas pela população brasileira e que já apresentam alguma evidência para indicação na atenção básica de saúde, que poderão gerar produtos para serem usados pelo SUS (BRASIL, 2009).

Tendo em vista isto, o principal objetivo deste trabalho foi realizar uma bioprospecção de fitoconstituintes de *A. chica* com propriedades antidiabéticas, especialmente àquelas capazes de atuar sobre o metabolismo de carboidratos inibindo a enzima intestinal AG.

## **2 METODOLOGIA**

### **2.1 Coleta de material vegetal e obtenção dos extratos**

A coleta da planta *A. chica* está cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SIGEN sob o número AC030F5. Folhas de *A. Chica* foram coletadas na área urbana da cidade de Sampaio – TO, nas coordenadas S 5° 18' 57" W 48° 13' 44" durante o mês de outubro de 2020 e conduzidas ao laboratório de Bromatologia do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Tocantins, Campus Araguatins. A identificação da planta foi realizada em comparação com a literatura especializada. Este material vegetal foi seco, estabilizado em estufa com circulação de ar a 50° C e pulverizadas em moinho de facas. O extrato foi obtido em aparelho de Soxhlet conforme Soares et al. (2017), empregando metanol/acetoneitrila (80:20) como solvente por um período de 6 horas. O extrato então foi filtrado a vácuo, concentrado em evaporador rotativo e seco em capela de exaustão. Os extratos obtidos foram armazenados livres de umidade em dessecador de vidro até às análises.

### **2.2 Prospecção fitoquímica**

O extrato obtido foi dissolvido a 1 mg.mL<sup>-1</sup> em metanol e avaliado quanto à presença de diferentes classes de metabólitos secundários, seguindo a metodologia de Mouco et al. (2003). Para tanto, volumes da solução extrativa foram pipetados para tubos de ensaios e submetidos aos diferentes testes de coloração e precipitação frente aos reagentes a seguir a seguir: compostos fenólicos foram avaliados com cloreto férrico a 2%. Fitosteróis com o SPF (ácido sulfúrico, fósforo e cloreto férrico).

Flavonoides foram com cloreto de alumínio a 5% e Shinoda. Para detecção de alcaloides utilizou-se o reagente Dragendorff.

### 2.3 Caracterização química por cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE

Foi realizado caracterização química dos compostos por cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE em cromatógrafo Shimadzu® equipado com detector UV/visível a 280 nm e coluna Phenomenex® Luna C18 5 µm a 22° C, utilizando uma fase móvel “A” (0,1 % de ácido fosfórico em água) e fase móvel “B” (0,1 % de ácido fosfórico em água/acetonitrila/metanol (54:35:11)) nas seguintes condições de gradiente: 0,1-5 min, 0 % B; 5-10 min, 30 % B; 10-20 min, 40 % B; 20-50 min 40 % B; 50-60 min 50 % B; 60-70 min 60 % B; 60-90 min 80 % B; 90-100 min 80 % B; 100-110 min 100 % B; 110-140 min 100 % B; 140-150 min 0 % B; 150-160 min 0 % B; com um fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>. A identificação ocorreu pela comparação entre o tempo de retenção dos picos obtidos com o extrato e o tempo de retenção de padrões autênticos obtidos na Sigma®. O extrato e os padrões foram filtrados em membrana PVDF de 0,22 µm antes da injeção no equipamento.

### 2.4 Ensaios biológicos

#### 2.4.1 Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi realizada utilizando o ensaio do radical livre 2,2- difenil-1-picril-hidrezil (DPPH) seguindo a metodologia de Soares et al. (2017). Resumidamente, 0,5 mL do extrato a diferentes concentrações (10 -250 µg.mL<sup>-1</sup> em metanol) foi misturada com 2,5 do DPPH (40 µg.mL<sup>-1</sup> em metanol). Depois de 30 minutos no escuro a absorbância foi registrada a 517 nm. O hidroxitolueno butilado – BHT, rutina e ácido ascórbico foram utilizados como controles positivos e a concentração de amostra necessária para reduzir a absorbância do DPPH em 50 % (IC50) foi calculado por equações de regressão linear ( $y = 0,292x + 21,202$  com  $R^2 = 0,9541$  para BHT,  $y = 0,5971x + 14,408$  com  $R^2 = 0,9792$  para rutina,  $y = 1,6254x - 7,7932$  com  $R^2 = 0,9901$  para ácido ascórbico e  $y = 0,1981x + 7,1352$  com  $R^2 = 0,9986$  para *A. chica*), obtidas com as diferentes concentrações de amostras. Os resultados foram expressos em µg.mL<sup>-1</sup>.

#### 2.4.2 Ensaio de inibição de atividade da enzima α-glicosidase

O ensaio da capacidade de inibição da enzima AG pelo extrato de *A. chica* foi realizado de acordo com o método descrito Costa et al. (2020). O teste se iniciou com a incubação a 37° C por 20 min de 250 µL do extrato dissolvido em dimetilsulfóxido – DMSO a diferentes concentrações (0-0,7 mg.mL<sup>-1</sup>) misturado com 500 µL de tampão fosfato 0,1 M (pH 6,8) e 250 µL da enzima AG a 0,5 u/mL. Em seguida a amostra foi adicionado 250 µL do substrato, p-nitrofenil-α-d-glucopiranosideo (4 mM em em tampão fosfato (pH 6,8)) foi adicionada à mistura preparada acima e incubada a 37° C por 20 min.

A reação foi encerrada pela adição de 1 mL de solução de carbonato de sódio 0,2 M. A absorbância foi medida a 405 nm. Foi preparado uma reação em branco com a enzima e o substrato substituindo o extrato por DMSO. A concentração de amostra necessária para reduzir a absorbância da reação em 50% (IC50) foi calculado pela equação  $y = 113,05x + 11,073$ ,  $R^2 = 0,8837$ , obtidas com absorbâncias das reações realizadas com as diferentes concentrações de amostras. Os resultado foram expressos em  $\text{mg.mL}^{-1}$ .

## 2.5 Estudo *in silico*

Foi avaliado a interação entre o fitoquímico de menor tempo de retenção do extrato (mais solúvel em água – ácido gálico) e a AG. A estrutura química do fito-ligante foi recuperada do Banco de dados PubChem. A AG foi recuperada do banco de dados Protein Data Bank (PDB). As simulações foram realizadas nos softwares MGLTools 1.5.6, AutoDock Vina 4.0 (TROTT; OLSON, 2010), Pymol 2.4.0 e LigPlot 2.2.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Investigação Fitoquímica preliminar

A prospecção fitoquímica preliminar se constitui uma caracterização inicial das classes de componentes químicos presentes nas plantas (SOARES et al, 2016). O teste para detecção de metabolitos secundários de plantas revelou a presença de compostos fenólicos fenóis, flavonoides, flavonas e alcaloides. Segundo Dias et al. (2017), as classes detectadas são importantes no controle da diabetes, fato que fortalece a hipótese de aplicação dessa planta para este papel biológico.

### 4.2 Caracterização química por CLAE

Segundo Dutra et al. (2010), a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido a técnica mais empregada na análise de compostos fenólicos. A partir desta análise foi constatado que o extrato de *A. chica* é rico em compostos fenólicos corroborando a prospecção preliminar. Como mostrado na Tabela 1, foram identificados quatorze compostos mediante comparação entre o tempo de retenção do extrato com o de padrões autênticos.

A gama de compostos identificados demonstra que o extrato de *A. chica* pode atuar sobre o metabolismo de carboidratos e vários fatores relacionados a DM. Abdel-Moneim et al. (2017), relata que o ácido gálico e o ácido p-cumárico são eficazes contra o DM, tanto nos estágios iniciais quanto na progressão da doença. A diversidade de compostos detectada conduz a uma inferência de que vários compostos dessa planta podem atuar de forma sinérgica no controle dessa patologia humana, tendo em vista, que se trata de uma classe de compostos com ações benéficas diversificadas no organismo humano (SOARES et al., 2017).

Tabela 2 – Identificação de compostos a partir do tempo de retenção dos padrões em comparação com o extrato bruto de *A. chica* e frações obtidos pelo procedimento CLAE.

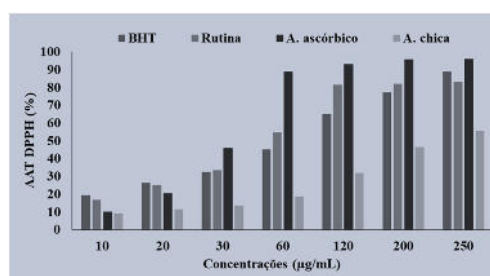
Compostos identificados no extrato de <i>A. chica</i>	Tempo de retenção em minutos
Ácido gálico	14,430
Ácido clorogênio	24,810
Ácido vanílico	27,080
Ácido siríngico	28,490
Epigallocatequina galato	32,360
Ácido p-cumárico	42,620
Rutina	67,150
Naringina	75,230
Hesperidina	76,210
Miricetina	80,510
Ácido rosmarínico	81,480
Morina	87,110
Quercetina	95,380
Caempferol	110,820

Fonte: os autores.

### 4.3 Atividade antioxidante

Como pode ser observado na Figura 1, a atividade antioxidante total do extrato de *A. chica* foi dependente da concentração, semelhante ao comportamento dos controles positivos. Observa-se também que nas concentrações iniciais o extrato apresenta uma atividade próxima a do ácido ascórbico, mas se mostra inferior em concentrações maiores.

Figura 1 – Atividade antioxidante total do extrato de *A. chica* e os controles positivos BHT, Rutina e ácido ascórbico em diferentes concentrações frente ao radical livre DPPH.



Fonte: os autores.

Como mostrado na Tabela 2, os dados de IC50 demonstram que o extrato de *A. chica* é capaz sequestrar radicais livres e contribuir com o retardo da oxidação de biomoléculas em sistemas biológicos. O extrato, mesmo em seu estado bruto, teve um valor aproximado da metade da eficiência do controle positivo BHT, indicando a possibilidade de uma atividade sequestradora mais efetiva mediante purificação para eliminação interferentes. Esta inferência é reforçada pelo dados obtidos na análise CLAE, que mostrou uma matriz diversificada de compostos antioxidantes neste extrato. Esta observação é de fundamental importância para o papel biológico que está se investigando neste trabalho com esta planta, pois segundo Bajaje e Khan (2012), a inibição da formação de radicais livres intracelulares se constitui uma estratégia importante na prevenção do estresse oxidativo que leva a complicações

vasculares relacionadas a DM.

Tabela 2 – IC50 de inibição de DPPH por extrato de *A. chica* e os controles positivos Hidroxitolueno butilado - BHT, rutina e ácido ascórbico.

Amostra	IC50 DPPH ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )
BHT	$100.452 \pm 7.236^a$
Rutina	$59.682 \pm 0.402^b$
Ácido Ascórbico	$35.390 \pm 0.203^c$
<i>A. chica</i>	$218.558 \pm 2.848^d$

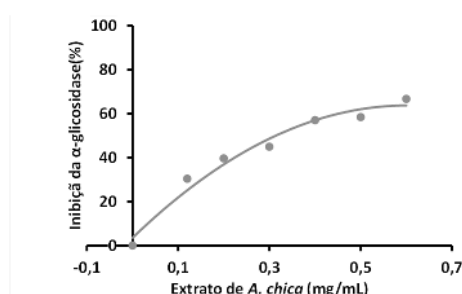
\* Médias seguidas pela mesma letra na coluna diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,01$ ).

Fonte: Os autores.

#### 4.4 Atividade Antidiabética - Inibição de atividade da enzima AG

A AG, é principal enzima envolvida na digestão de açúcares e a utilização de inibidores dessa enzima nos portadores de diabetes tem sido associada a benefícios para a saúde, como a diminuição do risco de eventos cardiovasculares (DUDOIT et al., 2020). A inibição da AG pelo extrato de *A. chica* foi dependente da concentração do extrato (Figura 2). Assim, *A. chica* foi nitidamente capaz de inibir a atividade da enzima em 60 %, sendo que apenas  $35,40 \pm 2,67 \text{ mg.mL}^{-1}$  do extrato é capaz de inibir a ação da enzima em 50 % (IC50), demonstrando grande potencial para o desenvolvimento de produtos antidiabéticos capazes de controlar a glicemia pós-prandial.

Figura 2 – Inibição da AG pelo extrato *A. chica*.



Fonte: os autores.

É importante destacar que os dados da inibição obtidos neste trabalho corroboram os relatos de Cartagenes et al. (2014), sobre o papel antidiabético dessa planta. Visando aprofundar este aspecto, neste trabalho, foram avaliados os parâmetros de ancoragem molecular entre o fitoconstituente com menor tempo de retenção (ácido gálico) e AG. Os parâmetros de ligação entre o composto testado e AG são apresentados na Tabela 3. Por esta análise, é possível constatar que o extrato de *A. chica* é capaz de interagir com diferentes resíduos de aminoácidos da enzima por pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas.

Tabela 2- Parâmetros de afinidade molecular entre AG (RCSB PDB ID 4J5T) e ácido gálico (PubChem CID 370). (AA) aminoácidos que interagem por pontes de hidrogênio e ligação hidrofóbica.

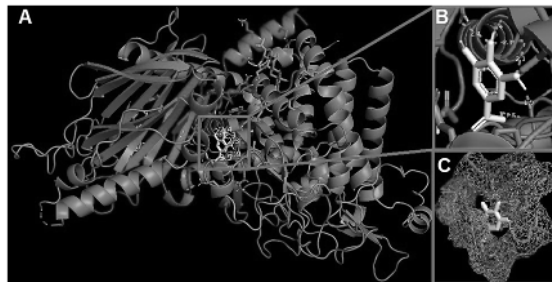
Complexo	$\Delta G$ - Energia na melhor conformação (kcal/mol)	Distância RSMD	AA - pontes de hidrogênio	AA - ligação hidrofóbica
----------	---	----------------	---------------------------	--------------------------

AG (4J5T) e ácido gálico	-6.9	0.000 Å	Tyr 343, Arg 26, Leu 432.	Arg 18, Phe 342, Glu 435, Ala 436, Asn 20, Tyr 341.
--------------------------	------	---------	---------------------------	---

Fonte: os autores

Como mostrado na Figura 3, o ácido gálico está ligado a um bolsão hidrofóbico da AG, rodeada por resíduos de aminoácidos, incluindo os citados na Tabela 3. Segundo Shen et al. (2021), a presença de vários grupos hidroxilas em compostos fenólicos é um fator que favorece sua interação com vários resíduos de aminoácidos sofrendo polarizações que permite interações fortes. Como a análise CLAE demonstrou grande diversidade dessa classe de compostos, infere-se que essas interações podem ocorrer tanto em um sítio alostérico e alterar a estrutura conformacional da enzima, como ao sítio ativo, impedindo de ela se ligar ao substrato, tornando-se impossibilitada de realizar digestão de carboidratos para serem transferidos para a corrente sanguínea.

Figura 3- Ancoragem molecular entre o ácido gálico (PubChem CID 370), um dos compostos identificados por CLAE em *A. chica* com a AG (RCSB PDB ID 4J5T). A- a enzima mostrada em desenhos cinzas e o ácido gálico em branco. B- Destaque do local da interação entre a enzima e fitoquímico ligante e as distâncias em Å; C- bolsão hidrofóbico formada pelos resíduos de aminoácidos no local da interação com o fitoquímico avaliado. Os dados para esta figura foram gerados no Pymol.



Fonte: os autores

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O efeito inibitório do extrato de *A. chica* sobre a AG foi analisado *in vitro* e *in silico*. No estudo *in vitro* foi constatado que o extrato avaliado tem capacidade de inibir a AG. Enquanto, o teste de ancoragem molecular demonstrou que os compostos fenólicos da planta podem interagir com a enzima e inibir sua ação no metabolismo de carboidratos, fator importante no agravamento da DM. A avaliação da atividade antioxidante indicou que o extrato, desempenha atividade sequestradora de radicais livres. Os dados obtidos na prospecção preliminar e por CLAE demonstram que a planta é rica em fitoquímicos importantes para a saúde humana. Este estudo valida o relato popular quanto a atividade antidiabética desta planta e dá base para o uso potencial da *A. chica* como um inibidor da AG, no entanto, futuros estudos *in vivo* darão maior suporte a estes resultados.

## REFERÊNCIAS

ABDEL-MONEIM, A. *et al.* Gallic acid and p-coumaric acid attenuate type 2 diabetes-induced

neurodegeneration in rats. **Metabolic Brain Disease**, v. 32, p.1279–1286, 2017.

ALVES, M. et al. Análise farmacognóstica das folhas de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlt., Bignoniaceae. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 20, n. 2, 2010.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção Básica à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Diabetes Mellitus**. Brasília, 2006.

BRASIL. **Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao SUS (Rennisus)**. Brasília, 2009.  
BAJAJ, S.; KHAN, A. “Antioxidants and diabetes.” **Indian journal of endocrinology and metabolismo**, v. 16, 2012.

CARTAGENES, M. S. *et al.* Avaliação da atividade anti-hipertensiva do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot em ratos espontaneamente hipertensos. **Revista de Ciências Saúde**, v.16 n.2, p. 98-105, 2014.

COSTA, O. J. *et al.* Inhibitory effects of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan stem bark extract on  $\alpha$ -glucosidase activity and oxidative stress. *Journal of Medicinal Plants Research*, v. 14, n. 11, p. 583-592, 2020.

DIAS T. R. *et al.* Promising Potential of Dietary (Poly)Phenolic Compounds in the Prevention and Treatment of Diabetes Mellitus. **Current Medicinal Chemistry**. v. 24, n. 4, p. 334-354, 2017.

DUDOIT, A. *et al.* “ $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory Activity of Tannat Grape Phenolic Extracts in Relation to Their Ripening Stages.” **Biomolecules**, v. 10, n, 1088, 2020.

DUTRA, F. L. G. *et al.* Determination of phenolic compounds by isocratic high performance liquid chromatographic method during storage of yerba-mate. **Química Nova**, v. 33 n. 1, 2010.

HIYOSHI, T. *et al.* “Postprandial hyperglycemia and postprandial hypertriglyceridemia in type 2 diabetes.” **Journal of biomedical research**, v. 33, n. 1, p. 1–16, 2017.

MOUCO, G. *et al.* Controle de qualidade de ervas medicinais. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 31, p. 18-22, 2003.

RATES S. M. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39 n. 5, p. 603-13, 2001.

SHEN, B. *et al.* Inhibitory Effect of Fisetin on  $\alpha$ -Glucosidase Activity: Kinetic and Molecular Docking Studies. **Molecules**, v. 26, n. 17 p. 2-11, 2021.

SOARES, I. M. et al. Application of a degreasing process and sequential ultrasound-assisted extraction to obtain phenolic compounds and elucidate of the potential antioxidant of *Siparuna guianensis* Aublet. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 11 n. 21, p. 357-366, 2017.

SOARES, N. *et al.* Técnicas de prospecção fitoquímica e sua importância para o estudo de biomoléculas derivadas de plantas . **Enciclopédia Biosfera**, v. 13 n. 24. 2016.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010.