

Flavonoides como moduladores da diabetes tipo 2 através da inibição das enzimas α - amilase e α - glucosidase

Edite Pinto

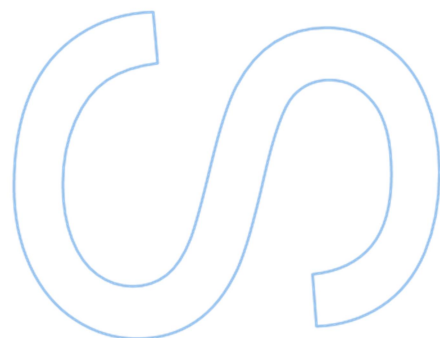
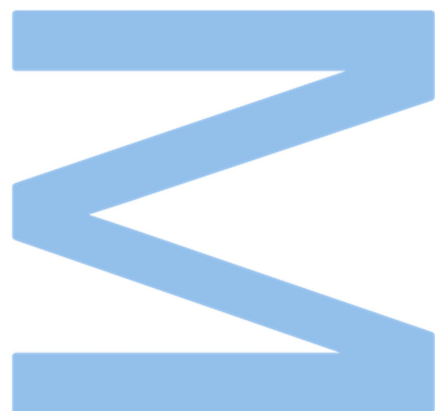
Mestrado em Aplicações em Biotecnologia e em Biologia Sintética
Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da
Universidade do Porto
2023

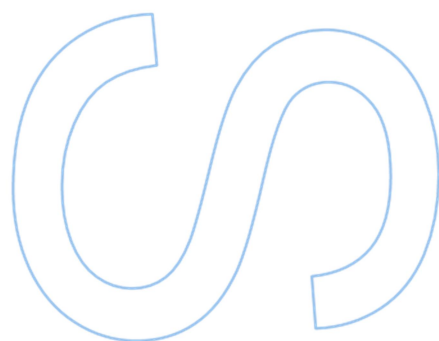
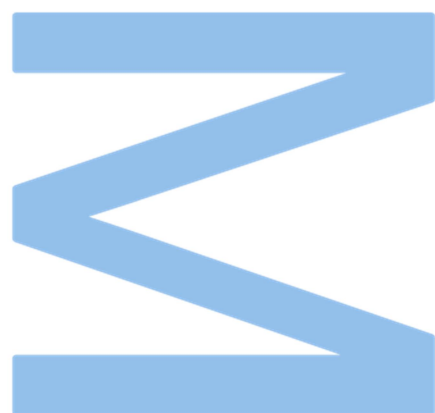
Orientadora

Eduarda Fernandes, Professora Associada com Agregação, Laboratório de
Química Aplicada da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Coorientadora

Marisa Freitas, Investigadora Auxiliar da REQUIMTE, Laboratório de
Química Aplicada da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto





Happiness is only real when shared.

Cristopher Mccandless

Agradecimentos

Um trabalho de mestrado é uma longa jornada, que inclui uma trajetória marcada por inúmeros desafios, incertezas, dedicação, alegrias e muitos percalços, mas, também conta com o contributo, apoio, carinho e energia de várias pessoas, cuja presença se tornou indispensável. Assim, eu não poderia deixar de agradecer a todas as pessoas que, de forma direta ou indireta, contribuíram para o meu sucesso e realização deste trabalho:

Primeiramente à minha orientadora Eduarda Fernandes que, com tanto carinho, me acolheu no seu laboratório. Agradeço-lhe pela linha de pesquisa, pela orientação prestada, pelo incentivo, disponibilidade e apoio que sempre demonstrou.

À minha coorientadora Marisa Freitas pela sua disponibilidade, incentivo e pelo apoio que sempre demonstrou na elaboração deste trabalho. Pela paciência e, principalmente, por ter sido sempre incansável nas correções (que não foram poucas). Por último, pela ajuda e empatia em inúmeras situações. Sinto que aprendi e evolui muito durante este ano de orientação.

Ao pessoal que integra a FRAU, por me receberem tão bem e por me acompanharem nesta “aventura”. Por todos os momentos magníficos que passámos e pela sua inteira disponibilidade. Pelo bom convívio, as boas discussões, camaradagem e alegria que se instala sempre no laboratório.

Aos meus amigos de sempre e aos que fiz ao longo destes cinco anos, por todos os bons momentos passados e por estarem sempre presentes. Por todo o incentivo e motivação e por me mostrarem que, não importa o quão difícil o nosso caminho seja, se tivermos as pessoas certas do nosso lado, nós somos capazes de alcançar tudo.

Por fim, mas não menos importante, agradeço à minha família pois sem ela dificilmente conseguiria chegar até aqui. Em especial, agradeço aos meus pais por sempre me apoiarem e mostrarem interesse pelo meu trabalho. Foram eles que sempre me ouviram e apoiaram incondicionalmente. Por estarem sempre lá para me amparar, para me criticar, para me congratular, fazendo-me sentir uma pessoa melhor.

Resumo

A diabetes *mellitus* (DM) é um problema de saúde pública global e em franca ascensão, sendo considerada uma doença metabólica. A DM pode ser classificada como: diabetes do tipo 1, diabetes do tipo 2, diabetes gestacional e, ainda, embora menos frequente, como diabetes secundária. A diabetes do tipo 2 é o tipo mais comum de DM, representando cerca de 90% de todos os casos. Esta é uma doença que se caracteriza, essencialmente, por uma carência na secreção e/ou da ação de insulina, resultando, em alguns casos, num aumento da resistência à insulina e, consequentemente, em níveis elevados de glucose no sangue – condição designada como hiperglicemia.

Assim, a grande finalidade dos tratamentos farmacológicos aplicados à DM é equilibrar os níveis de glucose no sangue, e, assim, reduzir o aparecimento e o desenvolvimento dos diversos problemas associados a esta doença. Para isso, uma das terapias mais utilizadas atualmente é o uso de inibidores das enzimas α -amilase e α -glucosidase. Existem diversos inibidores destas enzimas, como voglibose, miglitol e a acarbose (sendo esta última a mais usada em Portugal). No entanto, esta terapia não é totalmente eficiente pois o seu uso tem diversos efeitos secundários indesejáveis a nível gastrointestinal, essencialmente devido à inibição não específica da α -amilase. Assim, existe a necessidade de procurar novos inibidores que sejam mais seguros e eficazes e, se possível, com menos efeitos secundários. Os flavonoides são compostos polifenólicos que possuem um elevado potencial no tratamento da DM do tipo 2.

Assim, o principal objetivo deste estudo foi testar, comparar e avaliar, através de uma técnica de microanálise *in vitro*, o efeito inibitório de um grupo de flavonoides relacionados estruturalmente na atividade das enzimas α -amilase e α -glucosidase, (alguns serão aqui estudados pela primeira vez), estabelecendo, sempre que possível, uma relação estrutura *versus* atividade. Para isso, o trabalho prático foi dividido em duas fases complementares e consecutivas. Numa primeira fase, avaliou-se a inibição da atividade das enzimas pela acarbose e, numa segunda fase, estudou-se o efeito inibitório dos flavonoides na atividade dessas enzimas.

Os resultados obtidos permitem afirmar que a estrutura dos flavonoides é um fator decisivo para a inibição da atividade das enzimas α -amilase pancreática e α -glucosidase. Quanto à inibição da enzima α -amilase pancreática, é possível observar que os flavonoides inibem esta enzima de forma reduzida, não sendo possível calcular o IC_{50} nas concentrações testadas. Relativamente à inibição da enzima α -glucosidase, verifica-se que a atividade inibitória dos flavonoides depende da sua estrutura química. Os flavonoides mais ativos foram a quercetina e a quercetagetina, apresentando valores de IC_{50} de $20,6 \pm 1,5 \mu M$ e $18,2 \pm 1,1 \mu M$, respetivamente. Estes dois compostos apresentaram uma atividade inibitória mais elevada do que a da acarbose (com um IC_{50} aproximadamente 43 vezes inferior ao IC_{50} encontrado para a acarbose). No entanto, os restantes compostos testados (designadamente gossipetina, norwogonina e herbacetina), apresentaram inibição inferior a 30% na concentração máxima testada, o que demonstra que estes flavonoides tiveram uma reduzida atividade inibitória sobre esta enzima. Em ambas as técnicas, a acarbose foi utilizada como controlo positivo (apresentando um valor de IC_{50} de $0,84 \pm 0,06 \mu M$ para a enzima α -amilase e um valor de IC_{50} de $878 \pm 37 \mu M$ para a enzima α -glucosidase).

Em conclusão, este estudo sugere que alguns dos flavonoides estudados têm potencial para serem utilizados como alternativas eficazes para regulação da hiperglicemia pós-prandial na DM do tipo 2, contribuindo para o desenho de novas moléculas.

Palavras-chave: diabetes *mellitus*; atividade inibitória; enzimas digestivas; quercetina; quercetagetina; norwogonina; herbacetina; gossipetina.

Abstract

Diabetes *mellitus* (DM) is a global and rapidly rising public health problem and is considered a metabolic disease. DM can be classified as: type 1 diabetes, type 2 diabetes, gestational diabetes and also, although less frequently, as secondary diabetes. Type 2 DM is the most common type of DM, representing about 90% of all cases. This is a disease characterised, essentially, by a lack of insulin secretion and/or action, resulting, in some cases, in an increased insulin resistance and, consequently, in high blood glucose levels - a condition known as hyperglycaemia.

Thus, the main purpose of pharmacological treatments applied to DM is to equilibrate the blood glucose levels, and thus reduce the appearance and development of the several problems associated to this disease. To this end, one of the most currently used therapies is the use of inhibitors of the enzymes α -amylase and α -glucosidase. There are several inhibitors of these enzymes, such as voglibose, miglitol and acarbose (the latter being the most widely used in Portugal). However, this therapy is not fully efficient as it is associated with several undesirable side effects at gastrointestinal level, essentially due to non-specific inhibition of α -amylase. So, there is a need to search for new inhibitors that are safer and more effective and, if possible, with fewer side effects. Flavonoids are polyphenolic metabolites that have a high potential in the treatment of Type 2 DM, being a possible alternative to the drugs currently administered.

Thus, the main objective of this study was to test, compare and evaluate, through an *in vitro* microanalysis technique, the inhibitory effect of a group of structurally related flavonoids on the activity of the enzymes α -amylase and α -glucosidase, (some of which will be studied here for the first time), establishing, whenever possible, a structure *versus* activity relationship. For that purpose, the practical work was divided into two complementary and consecutive phases. In a first phase, the inhibition of the enzymes' activity by acarbose, the positive control, was evaluated and, in a second phase, the inhibitory effect of flavonoids on the activity of those enzymes was studied.

The results obtained show that the structure of the flavonoids is a decisive factor in inhibiting the activity of the enzymes pancreatic α -amylase and α -glucosidase. Regarding the inhibition of the pancreatic α -amylase enzyme, it can be seen that the flavonoids inhibit this enzyme to a low degree, so it was not possible to calculate the IC_{50} value at the concentrations tested. Concerning the inhibition of the α -glucosidase enzyme, it can be seen that the inhibitory activity of flavonoids depends on their chemical structure. The most active flavonoids were quercetin and quercetagenin, with IC_{50} values of $20.6 \pm 1.5 \mu M$ and $18.2 \pm 1.1 \mu M$, respectively. These two compounds showed a higher inhibitory activity than acarbose (with an IC_{50} approximately 43 times lower than the IC_{50} found for acarbose). However, the other compounds tested (namely gossypetin, norwogonin and herbacetin) showed inhibition of less than 30% at the maximum concentration tested, which shows that these flavonoids had a low inhibitory activity on this enzyme. In both techniques, acarbose was used as a positive control (showing an IC_{50} value of $0.84 \pm 0.06 \mu M$ for the α -amylase enzyme and an IC_{50} value of $878 \pm 37 \mu M$ for the α -glucosidase enzyme).

In conclusion, this study suggests that some of the flavonoids studied have the potential to be used as effective alternatives for regulating postprandial hyperglycaemia in type 2 DM, contributing to the design of new molecules.

Keywords: diabetes *mellitus*; inhibitory activity; digestive enzymes; quercetin; quercetagenin; norwogonin; herbacetin; gossypetin.

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	ii
Abstract.....	iv
Lista de Figuras	viii
Lista de Tabelas.....	x
Lista de Abreviaturas	xi
1. Diabetes <i>mellitus</i>	1
1.1. Epidemiologia	2
1.2. Fisiopatologia	3
1.3. Classificação	4
1.4. Fatores de risco.....	7
1.5. Sintomas e complicações.....	9
1.6. Tratamento.....	11
2. Digestão dos hidratos de carbono	15
2.1. Enzima α -amilase	16
2.2. Enzima α -glucosidase	18
3. Inibidores da α -glucosidase	20
4. Flavonoides.....	22
4.1. Quercetina	26
4.2. Quercetagina	27

4.3. Norwogonina	27
4.4. Gossipetina	28
4.5. Herbacetina	28
5. Objetivos	29
6. Materiais e Métodos	30
6.1. Reagentes...	30
6.2. Equipamentos	31
6.3. Ensaio para avaliação da inibição da atividade da enzima α -amilase.....	31
6.4. Ensaio para avaliação da inibição da atividade da enzima α -glucosidase	33
6.5. Análise estatística.....	35
7. Resultados	36
7.1. Avaliação da inibição da enzima α -amilase pancreática pela acarbose	36
7.2. Avaliação da inibição da enzima α -amilase pancreática por flavonoides	37
7.3. Avaliação da inibição da enzima α -glucosidase pela acarbose.....	38
7.4. Avaliação da inibição da enzima α -glucosidase por flavonoides	39
8. Discussão	40
9. Conclusão.....	44
10. Perspetivas futuras.....	45
11. Referências Bibliográficas.....	46

Lista de Figuras

Figura 1 – Percentagem de adultos com idade entre os 20 e os 79 anos com DM em cada continente. Adaptado de (10) e (11).....	2
Figura 2 – Fatores de risco da DM. Adaptado de (41). A figura foi gerada usando BioRender.....	8
Figura 3 – Sintomas da DM. Adaptado de (42). A figura foi gerada usando BioRender.....	9
Figura 4 – Complicações da DM. Adaptado de (46). A figura foi gerada usando BioRender.....	10
Figura 5 – Estrutura tridimensional da enzima α -amilase. Adaptado de (59).....	16
Figura 6 – Conversão do amido em maltose pela α -amilase. Adaptado de (60)	16
Figura 7 – Estrutura tridimensional da enzima α -glucosidase. Adaptado de (67).....	18
Figura 8 – Conversão da maltose em glucose pela α -glucosidase. Adaptado de (68).....	18
Figura 9 – Estrutura química da acarbose	20
Figura 10 – Estrutura química do miglitol.....	21
Figura 11 – Estrutura química da voglibose.	21
Figura 12 – Estrutura química geral dos flavonóides. Adaptado de (79).....	22
Figura 13 – Principais subclasses de flavonoides e as suas respectivas estruturas químicas de base. Adaptado de (80)	23
Figura 14 – Características que contribuem para a importância dos flavonoides na descoberta de novos fármacos. Adaptado de (76) e de (77). A figura foi gerada usando BioRender	24
Figura 15 – Estrutura química da quercetina.....	26

Figura 16 – Estrutura química da quercetagetina.....	27
Figura 17 – Estrutura química da norwogonina.....	27
Figura 18 – Estrutura química da gossipetina.....	28
Figura 19 – Estrutura química da herbacetina.....	28
Figura 20 – Estrutura química dos compostos estudados.....	30
Figura 21 – Hidrólise de CNP3G pela α -amilase. Adaptado de (100) e (101)	31
Figura 22 – Representação dos ensaios <i>in vitro</i> da inibição da α -amilase.....	32
Figura 23 – Hidrólise de pNPG pela α -glucosidase. Adaptado de (1) e (102).....	34
Figura 24 – Representação dos ensaios <i>in vitro</i> da inibição da α -glucosidase.....	34
Figura 25 – Efeito inibitório da acarbose (0-20 μ M), na atividade da enzima α -amilase pancreática e respetivo valor de IC ₅₀ . O valor de IC ₅₀ representa a média $\pm$ SEM de pelo menos três ensaios realizados.....	36
Figura 26 – Efeito inibitório da acarbose (0-3000 μ M), na atividade da enzima α -glucosidase respetivo valor de IC ₅₀ . O valor de IC ₅₀ representa a média $\pm$ SEM de pelo menos quatro ensaios realizados.....	38
Figura 27 – Efeito inibitório dos flavonoides mais ativos entre os estudados (0-50 μ M), na atividade da enzima α -glucosidase e respetivo valor de IC ₅₀ . O valor de IC ₅₀ representa a média $\pm$ SEM de pelo menos quatro ensaios realizados.....	39

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Fármacos mais usados no tratamento da DMT2. Adaptado de (47).....12

Tabela 2 – Estrutura química dos flavonoides em estudo e respetiva % de inibição da atividade da enzima α -amilase pancreática (% de inibição na maior concentração testada, indicada em sobrescrito). 37

Lista de Abreviaturas

ATP	Adenosina trifosfato
CNPG3	2-Cloro- <i>p</i> -nitrofenil- α -D-maltotriose
CtMGAM	Subunidade C-terminal da maltaseglucoamilase
CtSI	Subunidade C-terminal da sucrase-isomaltase
DG	Diabetes gestacional
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMT1	Diabetes <i>mellitus</i> de tipo 1
DMT2	Diabetes <i>mellitus</i> de tipo 2
DPP-4	Dipeptidil peptidase 4
GIP	Polipeptídeo insulíntrópico dependente de glucose
GLP-1	Peptídeo semelhante ao glucagon-1 (Glucagon Like Peptide-1)
IC₅₀	Concentração mínima para inibir 50% um composto
MGAM	Maltaseglucoamilase
MODY	Maturity-Onset Diabetes of the Young
NEFAs	Ácidos gordos não-esterificados
NtMGAM	Subunidade N-terminal da maltaseglucoamilase
NtSI	Subunidade N-terminal da sucrase-isomaltase
pNPG	<i>p</i> -Nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo
PPAR	Proliferadores de peroxissoma
SEM	Erro padrão da média
SI	Sucrasedisomaltase
SGLT2	Cotransportador de sódio e glucose 2
TZD	Tiazolidinedionas

1. Diabetes *mellitus*

A diabetes *mellitus* (DM), comumente designada por diabetes, é um dos maiores problemas de saúde pública em todo o mundo. A DM é uma doença que tem sido considerada como um distúrbio metabólico com origem em diversos fatores (principalmente, fatores ambientais e genéticos).⁽¹⁻⁴⁾ Esta é uma doença que se caracteriza, essencialmente, pela presença de níveis plasmáticos elevados de glucose durante um longo intervalo de tempo, condição conhecida por hiperglicemia, distúrbios no metabolismo dos hidratos de carbono, proteínas e lípidos. Este efeito pode ser decorrente de uma carência na secreção e/ou da ação de insulina, provocando, assim, o desenvolvimento da resistência à insulina por parte das células e, consequentemente, níveis elevados de glucose no sangue.^(1, 2, 5) A hiperglicemia está associada ao aparecimento de várias doenças, tais como: nefropatia, retinopatia, neuropatia e doenças cardiovasculares.^(1, 6, 7)

Um grande passo para o tratamento da DM, nomeadamente do tipo 1, foi a descoberta da insulina no ano de 1921, numa Universidade em Toronto. Esta descoberta teve, contudo, uma origem improvável, tendo sido iniciada por Frederick Banting. Durante o seu percurso profissional, foi professor universitário, e lecionou temas relacionados com o metabolismo dos hidratos de carbono, tema sobre o qual não tinha conhecimentos aprofundados, e, por isso, leu o artigo "The Relation of the Islets of Langerhans to Diabetes with Special Reference to Cases of Pancreatic Lithiasis". Com esta leitura, Banting desenvolveu uma hipótese, que decidiu tentar provar experimentalmente. Na Universidade de Toronto, nomeadamente no laboratório do professor de fisiologia John J. R. MacLeod, Banting trabalhou em colaboração com John J. Macleod, onde conseguiram demonstrar o efeito da insulina, primeiro em cães diabéticos e depois em humanos. Salienta-se que, em 1922, Leonard Thompson, um jovem diabético, foi o primeiro paciente a receber insulina com sucesso. Assim, a descoberta da insulina mudou o rumo do que era até então uma doença fatal, possibilitando aos investigadores ganhar o Prémio Nobel de Medicina e Fisiologia em 1923.^(8, 9)

1.1. Epidemiologia

1.1.1. Epidemiologia a nível mundial

A DM é considerada um dos principais problemas de saúde a nível mundial deste século, tendo provocado, em 2021, 6,7 milhões de mortes. Em 2021, a DM atingiu 537 milhões de adultos com idades compreendidas entre os 20 e os 79 anos (correspondendo a 10,5% da população mundial), o que significa que 1 em cada 10 pessoas foram afetadas pela DM, sendo, por isso, esta doença responsável por uma despesa mundial estimada em 966 mil milhões de dólares americanos (Figura 1). Dos 537 milhões de adultos, prevê-se que aproximadamente 240 milhões vivam com diabetes não diagnosticada (equivalendo a sensivelmente 44% dos adultos). Para os próximos anos, antevê-se que o número de pessoas afetadas suba para cerca de 643 milhões (o que corresponde a 11,3% da população mundial, afetando 1 em 9 adultos) até ao ano de 2030 e para 783 milhões (o que corresponde a 12,2% da população mundial, afetando 1 em 8 adultos) até 2045. Assim, estima-se um crescimento de 46% da prevalência mundial da DM até ao ano de 2045.^(10, 11)

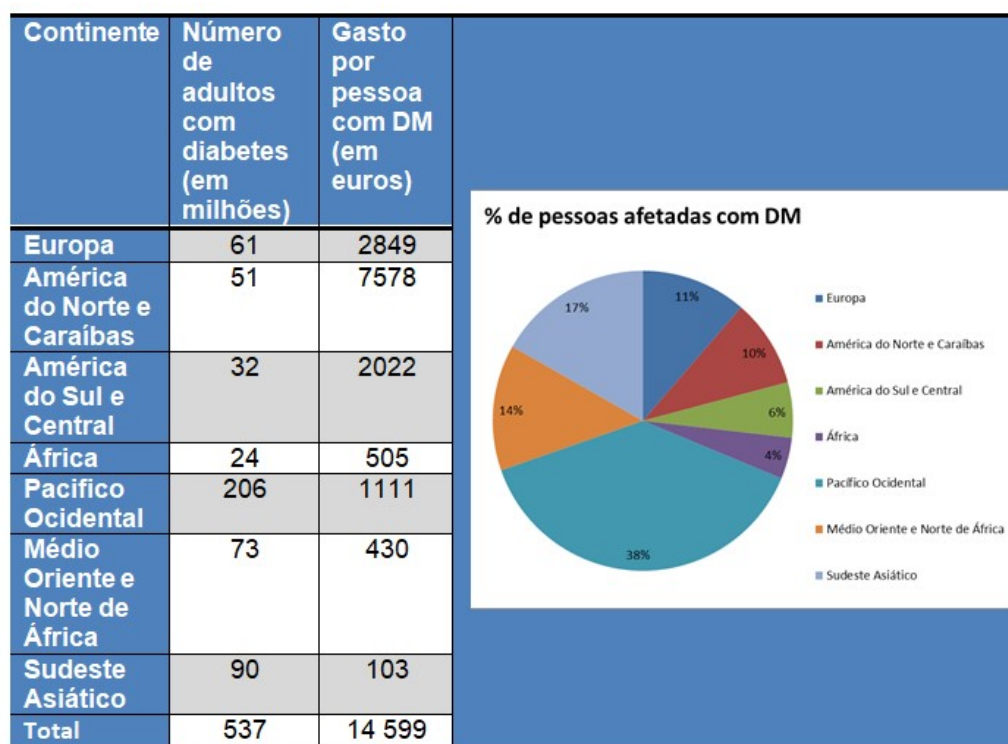


Figura 1 – Percentagem de adultos com idade entre os 20 e os 79 anos com DM em cada continente. Adaptado de (10) e (11).

1.1.2. Epidemiologia em Portugal

Em Portugal, no ano de 2021, a prevalência da DM em adultos com idades entre os 20 e os 79 anos foi de 13% (correspondendo a aproximadamente 994 mil pessoas, dos quais 433300 não foram diagnosticados com DM), apresentando a segunda maior prevalência de DM da União Europeia.⁽¹⁰⁾ Consequentemente, o tratamento decorrente da DM, representa um custo elevado, tendo atingido no ano de 2018, 1588 milhões de euros, representando 0,8 % do Produto Interno Bruto português e 9% da despesa em saúde no ano de 2018.⁽¹²⁾

1.2. Fisiopatologia

A glucose encontra-se presente na circulação sanguínea e, por isso, é um açúcar indispensável em diversas atividades fisiológicas. Assim, vários órgãos e tecidos dependem maioritariamente desta para desempenhar as suas funções e, consequentemente, o excesso ou escassez de glucose pode tornar-se tóxico, podendo provocar danos tanto nas células como nos sistemas de órgãos, tornando-se a sua regulação fundamental.⁽¹³⁾

O glucagon e a insulina são hormonas pancreáticas fundamentais, sendo os principais responsáveis pela regulação dos níveis da glucose no sangue (regulando o seu metabolismo de maneira antagónica). Estas hormonas são produzidas pelas células dos ilhéus de Langerhans presentes no pâncreas, sendo o glucagon libertado pelas células α e a insulina segregada pelas células β .⁽¹⁴⁻¹⁶⁾

O glucagon (peptídeo constituído por 29 aminoácidos) atua quando a glucose está presente em baixas concentrações no sangue, provocando um aumento da sua concentração através da estimulação da gluconeogénese. O fígado exerce uma função fulcral na gluconeogénese pois é o principal órgão que armazena grandes quantidades de glicogénio (polissacarídeo que é convertido em glucose durante a gluconeogénese e, por isso, o glicogénio hidrolisado é libertado diretamente como glucose na circulação sanguínea), produzindo aproximadamente entre 80 a 90% glucose.⁽¹³⁾

A insulina, de forma contrária ao glucagon, atua em situações em que a glucose está presente em elevadas concentrações no sangue. Esta hormona é libertada pelas células pancreáticas β como resposta à variação dos níveis de glucose

no sangue. Como a glucose é o principal nutriente das células, sendo necessária para a sua sobrevivência e para que estas realizem a sua função, a insulina é responsável por transportar a glucose presente na corrente sanguínea para o interior das células. Assim, os transportadores de glucose têm como função transportar a glucose para o interior das células β , onde, aí, esta é convertida a glucose-6-fosfato, provocando, consequentemente, a produção de adenosina trifosfato (ATP). Seguidamente, à medida que a concentração de ATP vai aumentando, os canais de potássio (K^+) fecham, provocando a despolarização da membrana celular, e, consequentemente, ocorre a abertura de canais de cálcio (Ca^{2+}), promovendo-se, assim, a entrada de iões Ca^{2+} na célula. Isto provoca a exocitose de insulina das células β pancreáticas, promovendo-se uma regulação adequada da glucose.⁽¹⁷⁾

1.3. Classificação

A DM pode ser classificada como: diabetes do tipo 1 (os doentes apresentam uma carência absoluta de insulina e, por isso, dependem da insulina exógena),^(2, 6) diabetes do tipo 2 (neste caso, a resistência à insulina provoca hiperglicemia e, por isso, os diabéticos não dependem apenas da insulina)^(2, 6), diabetes gestacional (é detetada durante a gravidez)^(1, 5, 18) e, ainda, embora menos frequente, como diabetes secundária⁽¹⁹⁾. A diabetes secundária engloba diversos tipos de DM que ocorrem devido a inúmeras causas, incluindo, principalmente, defeitos relacionados com a função das células β [como, por exemplo, a DM do tipo MODY (do inglês *Maturity-Onset Diabetes of the Young*), provocada por uma alteração genética que leva a uma alteração da tolerância à glucose, afetando tanto jovens adultos como adolescentes e crianças] ou relacionados com a ação da insulina (insulinopatias), doenças pancreáticas (nomeadamente, a pancreatite crónica ou a destruição pancreática por depósito de ferro, denominado hemocromatose), efeitos colaterais de medicamentos, infeções.⁽¹⁹⁾ A diabetes secundária ainda pode ser provocada pelo aumento de função das glândulas endócrinas e síndromes genéticas pouco comuns associadas à diabetes.⁽¹⁹⁾ Contudo, a diabetes do tipo 2 é o tipo mais comum de DM, representando cerca de 90% de todos os casos, gerando, por isso, cada vez mais interesse na comunidade científica.⁽¹⁻⁴⁾

1.3.1. Diabetes mellitus do tipo 1

A DM do tipo 1, DMT1 (comummente designada por diabetes dependente de insulina), atinge aproximadamente entre 5% a 10% dos diabéticos.^(5, 18) A etiologia da

DMT1 não é completamente conhecida, sabendo-se apenas que a causa principal, em cerca de 90% dos casos, é uma reação autoimune que leva à destruição gradual das células β do pâncreas e, consequentemente, à falha na produção de insulina.⁽²⁰⁾

Em alguns casos da DMT1, a sua etiologia é desconhecida, não sendo detetado um processo autoimune ou a presença de determinados genes, sendo então denominada DMT1 idiopática. Com a descoberta da insulina em 1921, a DMT1 tem sido tratada eficientemente através da terapia de administração exógena de insulina, o que permite prevenir a hiperglicemia e retardar as possíveis complicações crónicas associadas.^(18, 21, 22) Contudo, embora a terapia com insulina exógena seja considerada o tratamento de primeira linha na DMT1 e esta terapia reduza efetivamente os níveis de glucose do paciente e promova uma melhoria na sua qualidade de vida, ainda não imita o padrão fisiológico de secreção pancreática de insulina, estando, assim, associada a um risco de hipoglicemia.^(21, 22) O seu elevado custo e a via de administração são também fatores que constituem uma barreira ao recurso a esta terapia.⁽²³⁾

1.3.2. Diabetes *mellitus* do tipo 2

A DM do tipo 2, DMT2 (também conhecida como diabetes não dependente de insulina), afeta globalmente cerca de 90% dos pacientes diabéticos, sendo que no final de 2035 este tipo de diabetes atingirá, aproximadamente, 592 milhões de pessoas.^(5, 10, 18)

A DMT2 é caracterizada pela incapacidade das células β do pâncreas em produzir insulina, pela ineficácia do organismo em utilizar a insulina produzida (resistência à insulina) ou por uma combinação de ambos, resultando em hiperglicemia. Assim, com a diminuição da sensibilidade à insulina, as células β aumentam a secreção desta hormona para compensar e manter a concentração de glucose dentro dos valores normais.^(5, 10, 18) No entanto, a proporção de resistência à insulina e o nível de disfunção das células β varia de indivíduo para indivíduo.

A DMT2 está normalmente associada a diversos fatores relacionados com o estilo de vida do indivíduo, dos quais existem, nomeadamente, fatores de risco não modificáveis (predisposição genética, peso à nascença, etnia, idade e história de diabetes gestacional) e fatores de risco modificáveis (obesidade, exercício físico, dieta, urbanização) que variam de acordo com o tipo de cultura. A mudança de estilo de vida é a nova tendência para controlo da DMT2. Contudo, quando a adaptação alimentar

conjugada com exercício físico não são suficientes para controlar a DMT2, recorre-se ao tratamento farmacológico, nomeadamente aos antidiabéticos orais. Os principais alvos da terapia antidiabética para DMT2 incluem: inibidores da enzima dipeptidilpeptidase 4 (DPP-4), terapias baseadas em incretinas (agonistas do peptídeo insulínico dependente de glucose (GIP) e agonistas do peptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1)), biguanidas, inibidores do cotransportador de sódio e glucose 2 (SGLT2), sulfonilureias, meglitinida, tiazolidinedionas (TZD), inibidores das enzimas digestivas α -amilase e α -glucosidase, entre outros.⁽²⁴⁻²⁶⁾ Destes, destacam-se os inibidores das enzimas α -glucosidase e da α -amilase, como voglibose, miglitol e a acarbose, sendo a acarbose o mais utilizado em Portugal.^(27, 28)

Tendo em conta que muitos dos fármacos estão associados a efeitos secundários indesejados (tais como: distensão abdominal, flatulência, diarreia e pneumatose cística intestinal^(1, 29)) devido a provocarem uma inibição não específica da α -amilase (levando à acumulação de hidratos de carbono não digeridos no cólon), a comunidade científica reconhece a necessidade de descobrir novos compostos capazes de complementar ou substituir as terapias já disponíveis no mercado.^(1, 2, 30)

1.3.3. Diabetes gestacional

A diabetes gestacional (DG) corresponde a qualquer grau de anomalia do metabolismo da glucose que geralmente é detetada entre o segundo e o terceiro trimestre de gravidez, ocorrendo, aproximadamente, em 16,5% das gravidezes a nível global. Contudo, o número de mulheres afetadas com DG varia substancialmente com os critérios usados para avaliar a presença de hiperglicemia e com as características demográficas da população em estudo. Habitualmente, os níveis de glucose voltam ao normal com o término da gravidez.⁽³¹⁻³⁴⁾

Este tipo de diabetes traz tanto complicações para a mãe (como, por exemplo, as mulheres que apresentam DG têm um risco maior de desenvolver DMT2 com o término da gravidez bem como poderão desenvolver hipertensão, disfunção vascular e aterosclerose) como para o feto (nomeadamente, a curto prazo provoca macrosomia, lesão no nascimento, e prematuridade, e, a longo prazo, provoca consequências na composição corporal, bem como nas funções antropométricas e metabólicas, para além de que filhos têm um risco mais elevado de desenvolver obesidade e DMT2 no início da vida).^(5, 31-33)

1.4 Fatores de risco

Existem diversos fatores associados ao desenvolvimento da DM, sendo os mais importantes:

- **Excesso de peso / obesidade**

A obesidade está associada ao desenvolvimento da DM devido à elevada libertação de diversos fatores do tecido adiposo (como ácidos gordos não-esterificados (NEFAs) e citocinas pró-inflamatórias), o que pode levar à resistência à insulina.^(35, 36) Contudo, apesar de aproximadamente 80% dos doentes que apresentam DM sejam obesos, a obesidade não é uma condição necessária para o desenvolvimento da diabetes.⁽³⁵⁾

- **Inatividade física**

Quando uma pessoa leva um estilo de vida sedentária, o corpo fica menos sensível à insulina, podendo resultar num aumento dos níveis de glucose no sangue e, por isso, é aconselhável que as pessoas adotem um estilo de vida saudável, incluindo a prática regular de exercícios físicos, para prevenir ou controlar a DM.⁽³⁵⁾

- **Tabagismo**

Os cigarros possuem diferentes compostos químicos nocivos que provocam diferentes processos bioquímicos que permitem o aumento do stresse oxidativo, como prejudicam a função das células β , promovendo, por isso, uma resistência à insulina e uma toxicidade das células β .⁽³⁷⁾

- **Idade**

À medida que uma pessoa vai envelhecendo, há uma maior probabilidade de desenvolver DM (em especial a DMT2). Isto deve-se, principalmente, a um decréscimo da sensibilidade à insulina e, para além disso, das células β não produzirem insulina suficiente com o aumento da idade.⁽³⁸⁾

- **Histórico familiar**

A DM resulta, principalmente, devido a uma forte componente hereditária, pelo que as pessoas com um familiar próximo que possua DM têm maior probabilidade de desenvolver esta doença.⁽³⁹⁾

- **Dieta alimentar**

Tanto um consumo exorbitante de calorias bem como a qualidade da dieta são dois grandes fatores que aumentam o risco de desenvolvimento da DM (especialmente, caso haja um grande consumo de gorduras *trans* e de bebidas açucaradas).⁽⁴⁰⁾

Dos fatores anteriormente mencionados, o histórico familiar e a idade são fatores que não podem ser alterados. No entanto, o excesso de peso, a dieta, tabagismo e inatividade física podem ser modificados, resultando em melhorias significativas no progresso da DM, sendo, por isso, esta uma forma de prevenção das complicações associadas⁽⁴¹⁾. A figura 2 resume os fatores de risco de DM mais frequentemente descritos na literatura científica.



Figura 2 – Fatores de risco da DM. Adaptado de (41). A figura foi gerada usando BioRender.

1.5. Sintomas e complicações

Sintomas

Habitualmente, os sintomas da DM incluem urinação frequente (poliúria), sede e fome excessivas, fadiga, visão desfocada e perda de peso inexplicável (Figura 3). Estes sintomas são mais frequentes na DMT1, embora também apareçam na DMT2 (contudo, habitualmente, na DMT2 os sintomas, passam muitas vezes despercebidos).⁽⁴²⁾



Figura 3 – Sintomas da DM. Adaptado de (42). A figura foi gerada usando BioRender.

Complicações

A DM pode provocar inúmeras complicações (Figura 4), nomeadamente pode originar doenças microvasculares (como nefropatia, retinopatia e neuropatia) em consequência de danos provocados em pequenos vasos sanguíneos, e macrovasculares (em particular, doenças cardiovasculares) em resultado de danos provocados nas artérias.^(43, 44) O “pé diabético” é um importante problema da DM e está associado principalmente à neuropatia, fator que provoca danos nos nervos (em particular dos nervos sensoriais dos pés). Isto resulta em dor e perda de sensibilidade bem como deformidade do pé, provocando úlceras, infecções e amputações.^(43, 45)

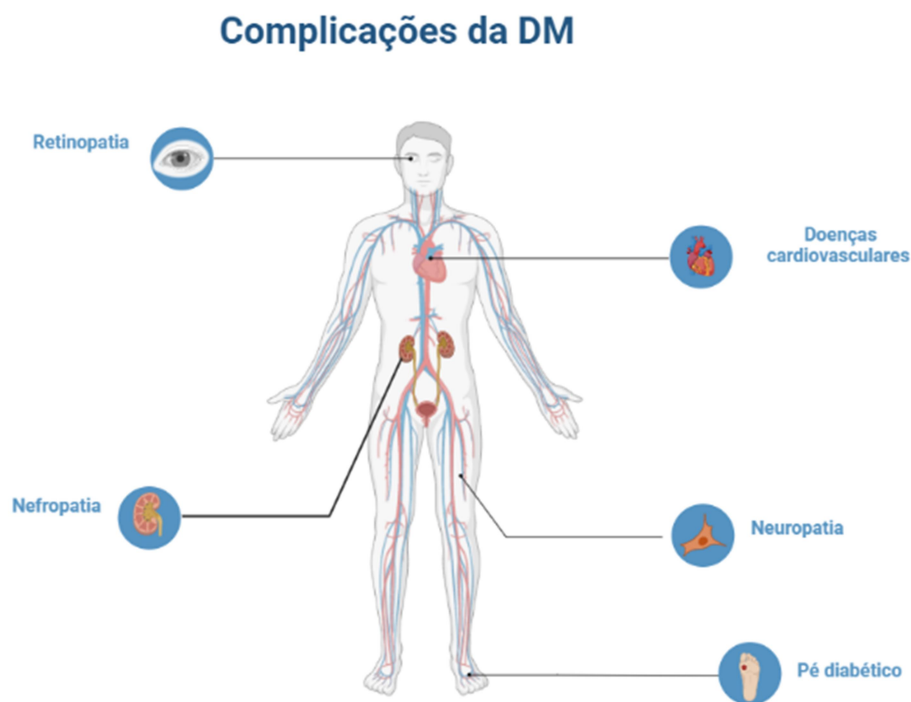


Figura 4 – Complicações da DM. Adaptado de (46). A figura foi gerada usando BioRender.

1.6. Tratamento

O objetivo do tratamento da DM é manter os níveis de glucose no sangue equilibrados (não provocando hipoglicemia) e, por conseguinte, reduzir a ocorrência de complicações.⁽⁴⁷⁾

A terapia com insulina exógena é o tratamento de primeira linha na DMT1. Atualmente, existem três tipos disponíveis: insulinas animais (extraídas de animais), insulina humana (geneticamente modificada com uma sequência de aminoácidos idêntica à da insulina humana endógena) e análogos da insulina (apresentam uma sequência de aminoácidos modificada – embora semelhante – à da insulina humana endógena).⁽⁴⁷⁾ Embora esta terapia reduza efetivamente os níveis de glucose do paciente e promova uma melhoria na sua qualidade de vida, ainda não imita o padrão fisiológico de secreção pancreática de insulina, estando, assim, associada a um risco de hipoglicemia.^(21, 22)

A mudança de estilo de vida é a nova tendência para controlo da DMT2. Contudo, quando a adaptação alimentar conjugada com exercício físico não são suficientes para a controlar, recorre-se ao tratamento farmacológico (Tabela 1), nomeadamente aos antidiabéticos orais. Os principais alvos da terapia antidiabética para DMT2 incluem inibidores da enzima DPP-4, terapias baseadas em incretinas (agonistas do GIP e agonistas do recetor do GLP-1), biguanidas, inibidores do SGLT2, sulfonilureias, meglitinida, TZD, inibidores das enzimas digestivas α -amilase e α -glucosidase, entre outros.⁽²⁴⁻²⁶⁾

Tabela 1 – Fármacos mais usados no tratamento da DMT2. Adaptado de (26)

Classe do tratamento	Fármacos mais usados	Mecanismo de ação
Inibidores da enzima DPP-4	Sitagliptina	Estes fármacos inibem a enzima DPP-4 (responsável pela degradação de GLP-1 alguns minutos após a sua secreção), potenciando, assim, a secreção de insulina e reduzindo a produção hepática de glicose (pela supressão da secreção de glucagon). Assim, têm impacto nos níveis lipídicos pós-prandiais pois inibem a degradação de GLP-1. (26, 48)
	Saxagliptina	
	Vidagliptina	
Agonistas do recetor de GLP-1	Exenatido	Como estes fármacos apresentam uma homologia entre 50% a 97% com o GLP-1 humano, atuam de forma semelhante a esta hormona (embora apresentem uma maior resistência à degradação pela enzima DPP-4). Assim, quando administrados, estimulam o aumento da secreção de insulina nas células β -pancreáticas e, simultaneamente, ativam e ligam-se aos recetores do GLP-1 presentes nas células α -pancreáticas, inibindo, assim, a secreção de glucagon, dependente da glicemia. Todos estes fármacos são de administração sub-cutânea. (26, 49)
	Liraglutido	
	Dulaglutido	

Tabela 1 – Fármacos mais usados no tratamento da DMT2. Adaptado de (26)

Classe do tratamento	Fármacos mais usados	Mecanismo de ação
Biguanidas	Metformina	Ativa a proteína quinase no fígado, provocando a captação hepática de glucose e inibindo a gluconeogénese através de efeitos complexos nas enzimas mitocondriais, atrasando a progressão da DMT2. ^(26, 50)
Inibidores do SGLT2	Canagliflozina	Bloqueia a reabsorção de glucose no túbulo renal proximal através da inibição do SGLT2, sendo este um mecanismo independente da insulina. ⁽²⁶⁾
	Dapagliflozina	
	Empagliflozina	
Sulfonilureias	Clorpropamida	Ao bloquearem os canais K_{ATP} , aumentam a secreção de insulina no pâncreas reduzindo, assim, o nível de glucose no sangue. Para além disso, também diminuem a degradação dos lípidos em ácidos gordos. ⁽²⁶⁾
	Tolazamida	
	Glipizida	
Meglitinida	Repaglinida	Partilham o mesmo mecanismo de ação das sulfonilureias. ⁽²⁶⁾
	Nateglinida	

Tabela 1 – Fármacos mais usados no tratamento da DMT2. Adaptado de (26) (continuação)

Classe do tratamento farmacológico	Fármacos mais usados	Mecanismo de ação
Tiazolidinedionas	Rosiglitazona	Como são agonistas dos proliferadores de peroxissoma (PPAR), eles preservam a integridade e a função das células β , o que provoca a uma melhoria da resistência à insulina. ⁽²⁶⁾
	Pioglitazona	

Destes fármacos, destacam-se os inibidores das enzimas α -glucosidase e da α -amilase pois as estas enzimas são as duas principais enzimas associadas à digestão do amido em humanos. À medida que estas enzimas vão sendo inibidas, há um decréscimo da digestão dos hidratos de carbono, o que significa que ocorre uma diminuição da absorção de glucose na circulação sanguínea.^{(26, 27, (51))} Assim, esta tese foca-se no efeito inibitório dos flavonoides contra as atividades da α -amilase e da α -glucosidase, sendo a sua caracterização discutida mais adiante

2. Digestão de hidratos de carbono

Os hidratos de carbono ingeridos na dieta são uma fonte de energia essencial apresentando, por isso, função energética, sendo a maioria de origem vegetal. Assim, a sua presença na alimentação é bastante pronunciada, correspondendo a cerca de 40 a 60% das calorias ingeridas.^(52, 53) Estas macromoléculas dividem-se em três grupos essenciais: monossacarídeos (como glucose, frutose e galactose), dissacarídeos (como lactose, sacarose e maltose) e polissacarídeos (como amido, glicogénio, fibra e glicolípidos).⁽⁵³⁾

A digestão dos hidratos de carbono começa na boca. Aí, a enzima α -amilase salivar (enzima produzida nas glândulas salivares) é libertada durante a mastigação, o que permite a quebra das ligações 1,4- α glucosídicas do amido e glicogénio ingeridos, transformando-os em maltose, entre outros polissacarídeos, formando-se, assim, uma mistura denominada por bolo alimentar.^(54, 55)

Seguidamente, a mistura anteriormente formada, é engolida e atravessa o esófago até chegar ao estômago. O estômago possui inúmeras funções, das quais se destacam o armazenamento dos hidratos de carbono ingeridos e a sua digestão, embora esta seja mínima pois a enzima α -amilase salivar é inativa a pH baixos.^(54, 55)

Posteriormente, o quimo gerado no estômago segue para o intestino delgado, onde aí se mistura com as diferentes enzimas digestivas, em especial com a α -amilase pancreática e a α -glucosidase, transformando-se em diferentes nutrientes e água, que serão posteriormente absorvidos na corrente sanguínea.⁽⁵⁴⁾

Esta tese irá incidir sobre as enzimas α -amilase e α -glucosidase, e como tal, estas serão descritas com mais detalhe no tópico seguinte.

2.1. Enzima α -amilase

A enzima α -amilase (identificada como EC 3.2.1.1) (Figura 5) encontra-se presente em animais, plantas e microorganismos (como fungos e bactérias). Esta endoenzima participa na catálise da primeira etapa da digestão do amido, clivando, assim, de forma não específica, as ligações 1,4- α glucosídicas internas do amido (Figura 6) de forma a serem obtidos oligossacarídeos mais pequenos absorvíveis. No entanto, esta enzima não cliva os resíduos terminais de glucose nem as ligações 1,6- α glucosídicas.⁽⁵⁶⁻⁵⁸⁾

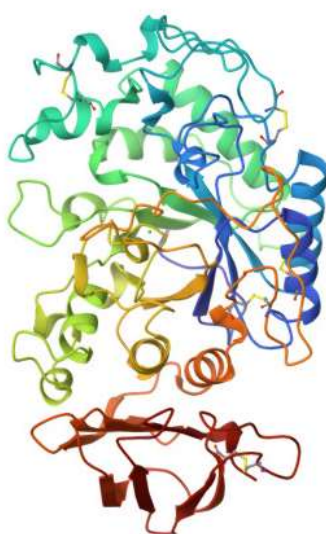


Figura 5 – Estrutura tridimensional da enzima α -amilase. Adaptado de (59).

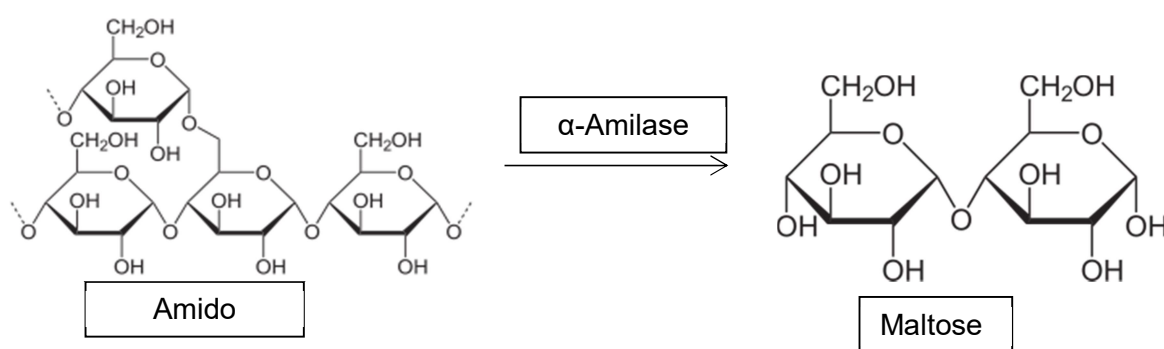


Figura 6 – Conversão do amido em maltose pela α -amilase. Adaptado de (60)

No organismo humano, existem duas isoformas desta enzima: a α -amilase salivar (expressa nas glândulas salivares, mamárias e lacrimais e que é codificada pelo gene AMY1), e a pancreática (sintetizada no pâncreas e secretada no duodeno e codificada pelo gene AMY2).⁽⁵⁸⁾ Estas duas isoformas apresentam cerca de 94% de similaridade nas sequências de aminoácidos que possuem.⁽⁶¹⁾

A α -amilase salivar é a enzima mais abundante na saliva humana, representando aproximadamente 50% das proteínas aí presentes. Esta enzima é sintetizada maioritariamente pelas células acinares das glândulas parótidas e permite a digestão inicial dos hidratos de carbono (como o amido), provocando, assim, a degradação das ligações 1,4- α glucosídicas dos diversos polissacarídeos presentes (convertendo-os em oligossacáridos mais curtos). Seguidamente, a mistura anteriormente formada na boca, é engolida e atravessa o esófago até chegar ao estômago onde a atividade desta enzima é interrompida devido ao pH ácido do estômago. Portanto, esta enzima só é capaz de digerir os hidratos de carbono quando está protegida do ácido gástrico, como quando está envolvida por um grande bolo alimentar.^(58, 62, 63)

O pâncreas é considerado como uma glândula tanto exócrina como endócrina, no qual a grande maioria do seu tecido é dedicada à sua função exócrina, sendo esta responsável pela produção de enzimas digestivas para o duodeno. As células acinares, após estimulação, sintetizam e segregam as enzimas digestivas (nomeadamente a α -amilase pancreática), num sistema de ductos intercalados para ajudar na digestão.⁽⁶⁴⁾ Posteriormente, o suco pancreático anteriormente formado no estômago segue para o intestino delgado, onde, aí, esta enzima entra no lúmen através do esfíncter hepatopancreático. Assim, a α -amilase pancreática penetra no lúmen intestinal e proporciona uma hidrólise mais extensa da mistura de hidratos de carbono resultante, transformando-os em di-, tri e outros oligossacáridos, designadamente como maltose e maltotriose. No entanto, é necessária uma digestão adicional de forma a serem libertados monossacáridos absorvíveis (como a glucose), sendo esta realizada pela enzima α -glucosidase, enzima explicada com mais detalhe no tópico seguinte.⁽⁶¹⁾

2.2. A enzima α -glucosidase

A enzima α -glucosidase (identificada como EC 3.2.1.20) (Figura 7) é uma exoenzima que catalisa a hidrólise das ligações 1,4- α glucosídicas terminais dos oligossacáridos e dissacarídeos (Figura 8) dos substratos não absorvidos que provieram da digestão inicial dos hidratos de carbono pelas α -amilases salivar e pancreática, convertendo-os em monossacarídeos – como a glucose – que serão absorvidos posteriormente. Assim, catalisa a etapa final do processo digestivo dos hidratos de carbono. Esta enzima pode ser encontrada nos reinos das arqueobactérias, eubactérias e eucariotas.^(21, 51, 55, 65, 66)

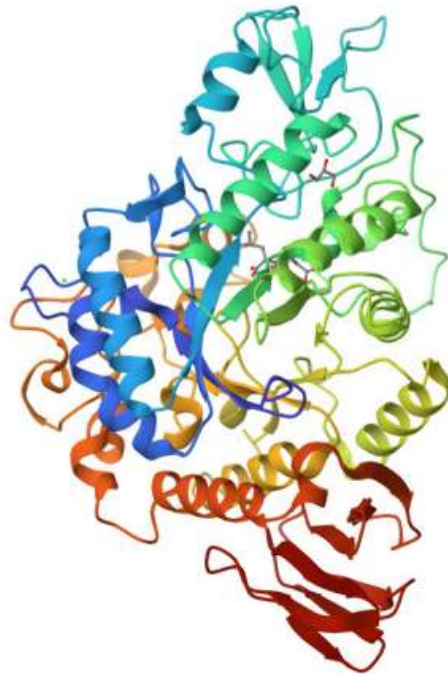


Figura 7 – Estrutura tridimensional da enzima α -glucosidase. Adaptado de (67).

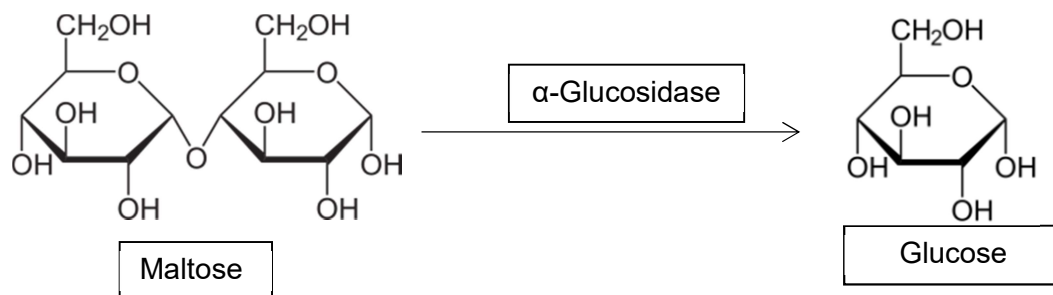


Figura 8 – Conversão da maltose em glucose pela α -glucosidase. Adaptado de (68).

No intestino delgado humano existem dois tipos de α -glucosidases de membrana responsáveis pela hidrólise do amido (resultante da atividade da α -amilase) em glucose: a maltaseglucoamilase (MGAM) e a sucrase-isomaltase (SI), cada uma composta por subunidades catalíticas duplicadas: uma subunidade N-terminal (NtMGAM e NtSI) e uma subunidade C-terminal, (CtMGAM e CtSI). Os quatro domínios exibem atividades de exo-glucosidase contra as ligações 1,4- α glucosídicas. No entanto, os domínios NtMGAM e CtMGAM apresentam uma maior preferência pelas ligações 1,4- α glucosídicas, enquanto o domínio NtSI tem uma especificidade para clivar tanto ligações 1,4- α como para ligações 1,6- α de oligossacarídeos e CtSI para hidrolisar as ligações 1,2- α glucosídicas.^(66, 69, 70)

As enzimas α -glucosidases são principalmente classificadas em duas famílias da glucosidase hidrolase – grupo 13 e grupo 31. Como as α -glucosidases possuem uma grande diversidade no reconhecimento dos substratos devido a terem diferentes origens, podem ser classificadas em três grupos:

- **α -glucosidases de Tipo I.** Estas pertencem à família da glucosidase hidrolase do grupo 13 e têm maior preferência para ligações heterosídicas (por exemplo, sacarose) do que para ligações osídicas (por exemplo, maltoligossacarídeos).
- **α -glucosidases de Tipo II.** Antagonicamente às α -glucosidases de Tipo I, estas reconhecem ligações osídicas.
- **α -glucosidases de Tipo III.** Como as α -glucosidases de Tipo II, estas também reconhecem as ligações osídicas, apresentando uma menor afinidade para ligações heterosídicas. Contudo, as enzimas deste tipo apresentam uma atividade hidrolítica elevada para o α -glucano. As α -glucosidases tipo II e tipo III são membros da família da glucosidase hidrolase do grupo 31.⁽⁶⁹⁾

3. Inibidores da α -glucosidase

Uma das terapias farmacológicas mais comuns utilizadas no tratamento da DMT2 são os **inibidores da α -glucosidase** devido ao seu modo de ação no controlo da libertação de glucose.^(27, 28, 71) Estes agentes atuam como inibidores competitivos das enzimas α -amilase e α -glucosidase, isto é, competem com a ligação dos oligossacarídeos, trissacarídeos e dissacarídeos às enzimas, interferindo com a sua clivagem em monossacarídeos.⁽²⁸⁾ À medida que estas enzimas vão sendo inibidas, há um decréscimo da digestão dos hidratos de carbono, o que significa que ocorre uma diminuição da absorção de glucose na circulação sanguínea.⁽⁵¹⁾ Estes agentes são usualmente usados em conjunto com dieta e exercício físico ou com outros fármacos orais ou, ainda, em conjunto com insulina, uma vez que impedem a digestão de hidratos de carbono complexos.⁽⁷¹⁾

Atualmente existem no mercado três inibidores da α -glucosidase para o tratamento da DMT2, todos estes administrados via oral⁽⁵⁾ :

1. **Acarbose** – trata-se de um oligossacarídeo obtido a partir da fermentação de diversas bactérias (nomeadamente da *Actinoplanes utahensis*) (Figura 9). Este fármaco foi o primeiro inibidor da α -glucosidase utilizado para o tratamento da DMT2, tendo sido aprovado em 1995. Atualmente é um dos mais prescritos, sendo utilizado em 117 países, tratando-se do inibidor da α -glucosidase mais prescrito em Portugal. Contudo, é mal absorvido e é excretado nas fezes, maioritariamente intacto.^(66, 72)

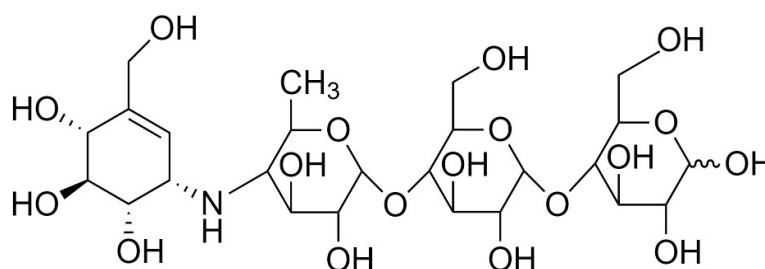


Figura 9 – Estrutura química da acarbose.

2. **Miglitol** – trata-se de um fármaco derivado da 1-deoxinocirimicina (Figura 10) e foi apenas aprovado em 1996. É habitualmente prescrito porque, contrariamente à acarbose, é quase totalmente absorvido no intestino delgado, sendo capaz de reduzir a glucose pós-prandial e de prolongar a absorção de hidratos de carbonos. Ao contrário da acarbose, é usado num número limitado de países. ⁽⁷²⁾

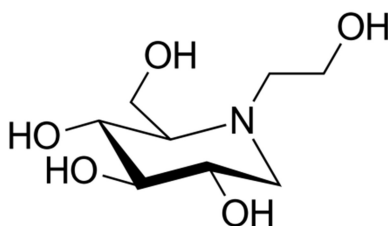


Figura 10 – Estrutura química do miglitol.

3. **Voglibose** – trata-se de um fármaco derivado da valiolumina (Figura 11) e tem a capacidade de melhorar a libertação de GLP-1. À semelhança da acarbose, atua de forma lenta e é mal absorvido e rapidamente excretado nas fezes. ^(5, 71, 72) Este fármaco foi descoberto no Japão em 1981, tornando-se comercialmente disponível apenas nesse mesmo país a partir do ano de 1994. ⁽⁷³⁾

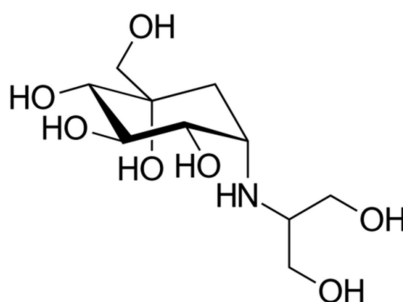


Figura 11 – Estrutura química da voglibose.

A utilização prolongada dos inibidores da α -glucosidase está associada a diversos efeitos secundários, tais como: distensão abdominal, flatulência, diarreia, pneumatose cistóide intestinal e, no caso da acarbose, distúrbios hepáticos. Os efeitos referidos são sobretudo causados pela degradação de polissacarídeos não digeridos, o que leva à produção excessiva de gases. Por isso, se o paciente seguir uma dieta com um consumo abundante de hidratos de carbono, pode provocar os efeitos acima referidos. ^(74, 75)

4. Flavonoides

Os flavonoides são uma classe de compostos orgânicos pertencentes à família dos polifenóis, sendo estes os compostos mais abundantes na dieta humana. Estima-se que a ingestão total destes compostos é de cerca de 1 grama por dia, embora a sua biodisponibilidade dependa do modo de preparação dos alimentos assim como da sua digestão e absorção. Estes compostos são amplamente distribuídos na natureza, sendo encontrados em flores, frutas, vegetais, ervas, grãos, entre outros alimentos, e são responsáveis por inúmeras características (por exemplo, são estes que lhes confere cor, sabor e fragância características bem como confere proteção contra agentes patogénicos e radiação ultravioleta).^(27, 76-79)

A estrutura química dos flavonoides consiste num núcleo de flavona, que é formado por dois anéis aromáticos (anéis A e B) unidos por um anel heterocíclico (anel C) e também apresentam grupos hidroxilo (-OH) em várias posições dos seus anéis aromáticos (Figura 12). Estes compostos apresentam diversas propriedades biológicas que dependem da sua estrutura, nomeadamente, propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antidiabéticas, e anti-carcinogénicas, etc.^(76, 80, 81)

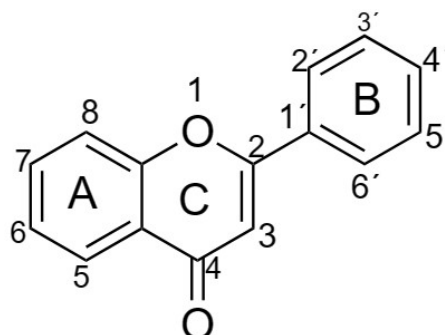


Figura 12 – Estrutura química geral dos flavonoides. Adaptado de (79).

Os flavonoides podem ser agrupados em diferentes classes, dependendo do padrão de oxidação, do padrão de substituição e de insaturação do anel C. Quando a estrutura do anel C é um pirano heterocíclico, este origina 6 classes principais de flavonoides: flavanóis, antocianinas, flavonóis, flavonas, flavanonas e isoflavonas. (Figura 13).

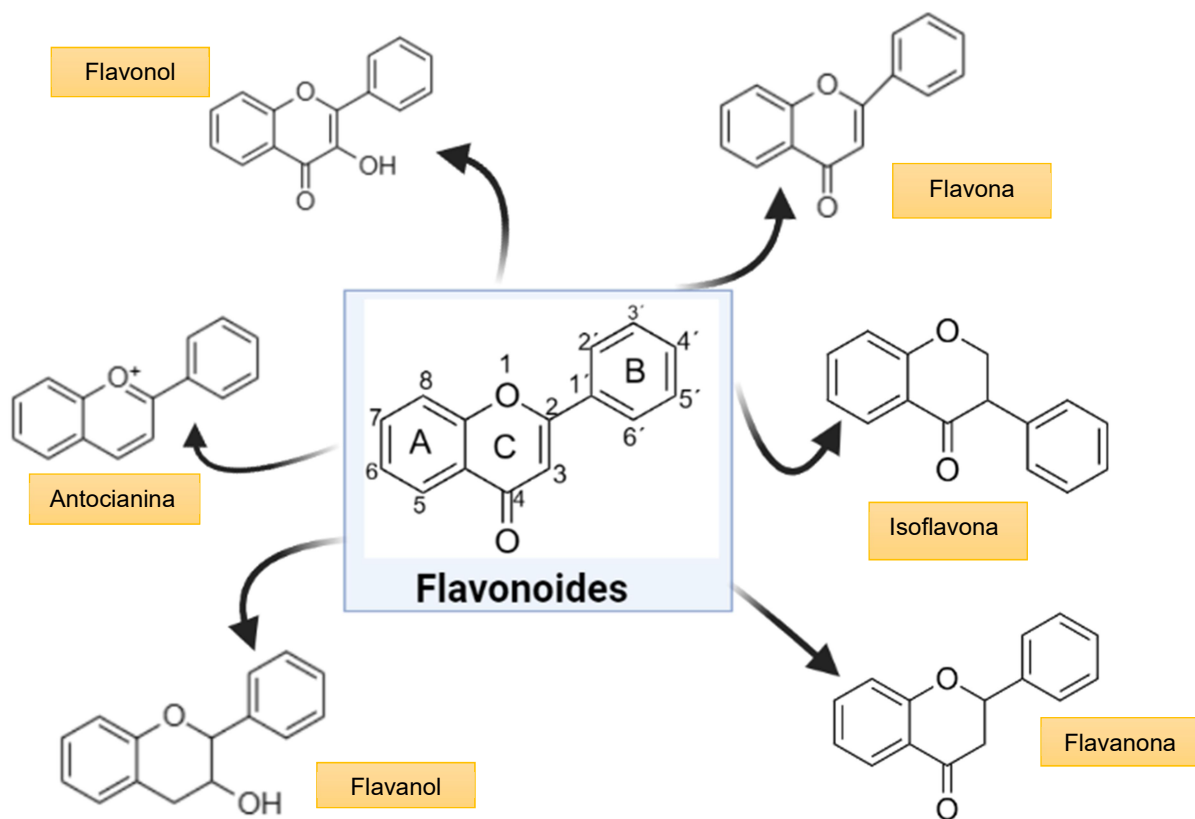


Figura 13 – Principais subclasses de flavonoides e as suas respectivas estruturas químicas de base. Adaptado de (80)

Ao longo dos últimos anos, diversos investigadores têm dedicado uma atenção crescente aos flavonoides devido à sua estrutura simples, diversidade de substituintes, facilidade de síntese, elevada segurança, custo mais baixo e, principalmente, por apresentarem um grande número de atividades biológicas (Figura 14). Assim, aliando as atividades biológicas destes compostos com o facto da terapia farmacológica usada para tratar a DMT2 não ser totalmente eficaz, devido aos inúmeros efeitos secundários indesejáveis, os flavonoides adquirem um importante papel no tratamento da DMT2, enquanto inibidores naturais da α -glucosidase.⁽⁷⁹⁻⁸²⁾

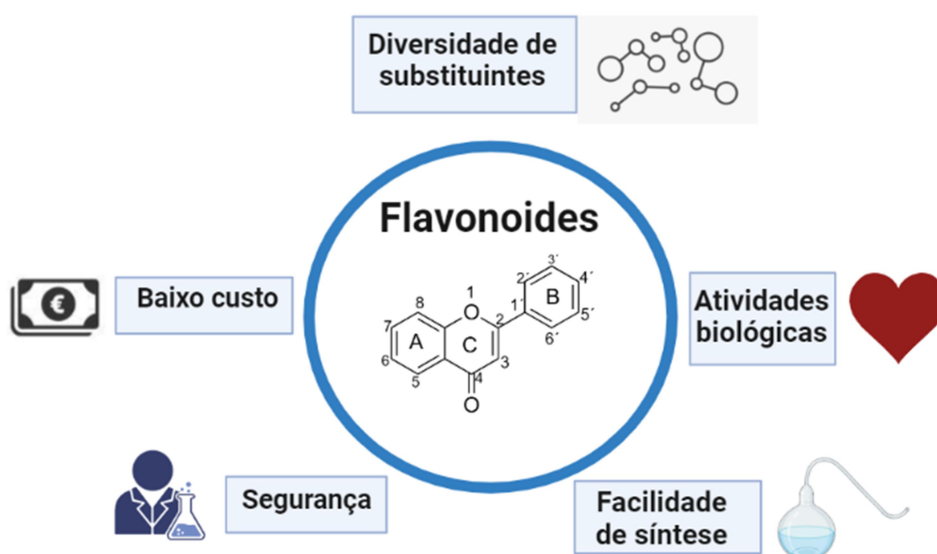


Figura 14 – Características que contribuem para a importância dos flavonoides na descoberta de novos fármacos. Adaptado de (76) e de (77). A figura foi gerada usando BioRender.

Os flavonoides atuam em diversos alvos moleculares e regulam várias vias diretamente relacionadas com a DM, entre elas, destaca-se a inibição da enzima α -glucosidase. Ao atuarem sob este alvo, os flavonoides podem exercer a sua atividade antidiabética pois há um atraso na decomposição dos hidratos de carbono ingeridos através da dieta, permitindo uma redução da absorção de glucose. Para além disso, aliado ao facto de reduzirem a digestão dos hidratos de carbono, estes protegem as células β pancreáticas dos danos induzidos pela hiperglicemia (pois permite atenuar o stresse oxidativo gerado, reduzindo a apoptose destas células).^(79, 83-85)

A utilização de diversos flavonoides naturais, relacionados estruturalmente, em estudos de inibição da atividade das enzimas α -amilase e α -glucosidase permite tirar diversas conclusões essenciais quanto à estrutura e o tipo de substituintes que mais influenciam o seu poder inibitório, permitindo, conseqüentemente, estabelecer, sempre que possível, uma relação estrutura *versus* atividade. Salienta-se que a presença de grupos hidroxilo (-OH) nos flavonoides é uma característica estrutural que contribui para o aumento da atividade inibitória destes compostos.^(86, 87)

Apesar do efeito inibitório dos flavonoides contra a atividade das enzimas α -amilase e α -glucosidase já ter sido anteriormente estudada, a comparação da informação existente na literatura é difícil, principalmente devido à variabilidade de condições experimentais que são aplicadas em cada estudo (nomeadamente, a origem e a concentração da enzima, o tipo e a concentração do substrato, o tempo de incubação, o pH e a temperatura), o que torna complicado a comparação entre estudos e o estabelecimento de relação estrutura *versus* atividade.^(88, 89)

Nesse sentido, este trabalho irá incidir sobre o efeito inibitório das enzimas α -amilase e α -glucosidase, por um grupo de flavonoides relacionados estruturalmente, nomeadamente a quercetina, quercetagina, norwogonina, gossipetina e herbacetina.

4.1. Quercetina

A quercetina (Figura 15) é um flavonoide pertencente à classe dos flavonóis e apresenta como substituintes o grupo hidroxilo (-OH) nas posições 5 e 7 do anel A, 3' e 4' do anel B, e 3 do anel C bem como uma ligação dupla entre os carbonos 2 e 3 (C2=C3) do anel C. Este flavonoide está associado a inúmeras atividades biológicas, nomeadamente: anti-inflamatória, antioxidante, anticancerígena, antiviral, e antidiabética. A quercetina encontra-se presente na nossa dieta através da ingestão de diversas frutas como maçãs, uvas, toranjas e laranjas. No entanto, a ingestão deste flavonoide varia de país para país, apresentando uma variação entre 50 e 800 mg/dia dependendo principalmente do tipo de dieta.⁽⁹⁰⁾

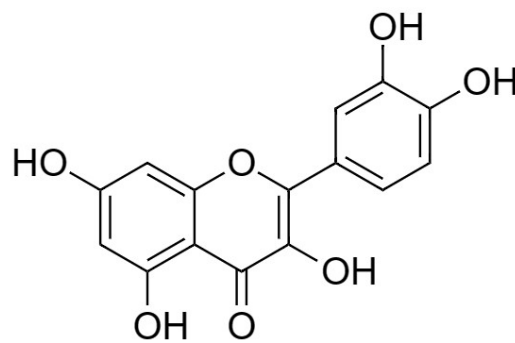


Figura 15 – Estrutura química da quercetina

4.2. Quercetagetina

A quercetagetina (Figura 16) é um flavonoide pertencente à classe dos flavonóis e apresenta como substituinte o grupo hidroxilo (-OH) nas posições 5, 6 e 7 do anel A, 3' e 4' do anel B, e 3 do anel C bem como uma ligação dupla entre os carbonos 2 e 3 (C2=C3) do anel C. A quercetagetina é um flavonoide natural que se encontra presente em inúmeras plantas cítricas e possui inúmeras atividades biológicas, nomeadamente antifúngica, antibacteriana, antiviral, antidiabética e antioxidante, podendo, inclusivamente, prevenir as doenças cardiovasculares.⁽⁹¹⁻⁹³⁾

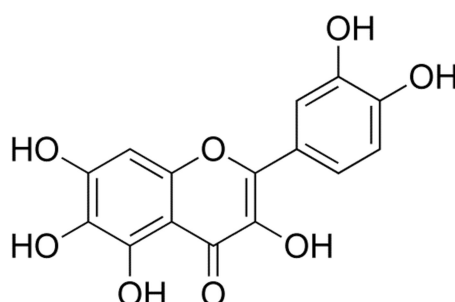


Figura 16 – Estrutura química da quercetagetina

4.3. Norwogonina

A norwogonina (Figura 17) é um flavonoide natural, pertencente ao grupo das flavonas. Embora esteja presente em concentrações muito baixas na natureza, possui importantes atividades farmacológicas, nomeadamente atividades antioxidante, antiviral e antimicrobianas. Este flavonoide apresenta como substituinte o grupo hidroxilo (-OH) nas posições 5, 7 e 8 do anel A, uma ligação dupla entre os carbonos 2 e 3 (C2=C3) do anel C.^(94, 95)

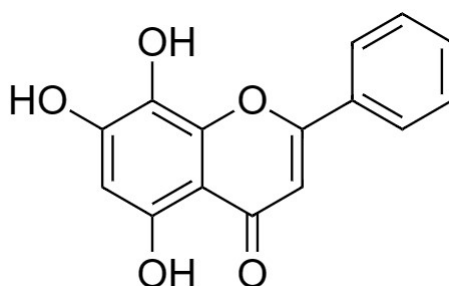


Figura 17 – Estrutura química da norwogonina.

4.4. Gossipetina

A gossipetina (Figura 18) é um tipo de flavonoide natural que pertence ao grupo das flavonas. Está presente em inúmeras partes de diversas plantas (nomeadamente, encontra-se em *Leguminosae*, *Ericaceae*, *Rhododendron* e *Papaveraceae*) e apresenta como substituinte o grupo hidroxilo (-OH) nas posições 5, 7 e 8 do anel A, 3' e 4' do anel B e 3 do anel C bem como apresenta uma ligação dupla entre os carbonos 2 e 3 (C2=C3) do anel C. Este flavonoide apresenta propriedades antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias e anti-ateroscleróticas.^(96, 97)

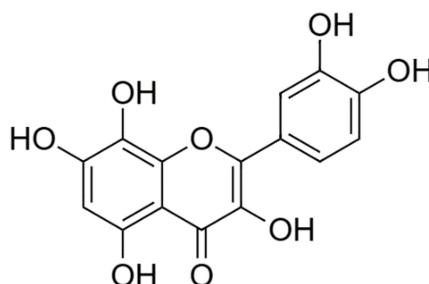


Figura 18 – Estrutura química da gossipetina.

4.5. Herbacetina

A herbacetina (Figura 19) é um flavonoide pertencente à classe dos flavonóis que se encontra presente em inúmeras plantas medicinais e possui inúmeros efeitos farmacológicos (nomeadamente como antioxidante, anti-inflamatório, e antidiabético). Este flavonoide apresenta como substituinte o grupo hidroxilo (-OH) nas posições 5, 7 e 8 do anel A, 4' do anel B e 3 do anel C, bem como apresenta uma ligação dupla entre os carbonos 2 e 3 (C2=C3) no anel C. Apesar de possuir diversas atividades farmacológicas importantes para o tratamento de diversas doenças (sendo de destacar a obesidade, entre outras), encontra-se presente em concentrações muito pequenas na natureza.^(98, 99)

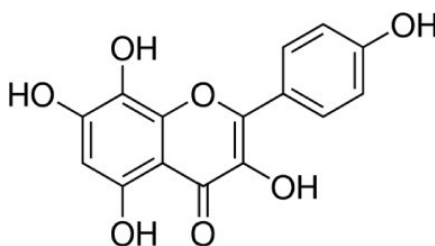


Figura 19 – Estrutura química da herbacetina.

5. Objetivos

O principal objetivo deste estudo foi testar, avaliar e comparar, através de uma técnica *in vitro* de microanálise, o efeito inibitório de um painel de flavonoides, relacionados estruturalmente (quercetina; quercetagetina; norwogonina; gossipetina e herbacetina), na atividade das enzimas digestivas α -amilase e α -glucosidase, estabelecendo sempre que possível uma relação estrutura *versus* atividade.

Para isso, o trabalho prático foi dividido em duas fases complementares e consecutivas. Numa primeira fase, efetuou-se uma análise preliminar, que consistiu numa avaliação da inibição da atividade das enzimas α -amilase e α -glucosidase pelo controlo positivo, a acarbose. Numa segunda fase, estudou-se o efeito inibitório dos flavonoides na atividade destas enzimas.

6. Materiais e Métodos

6.1. Reagentes

O dimetilsulfóxido (DMSO), a α -glucosidase de *Saccharomyces cerevisiae*, a α -amilase de pâncreas de porco, o *p*-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (pNPG), 2-cloro-*p*-nitrofenil- α -D-maltotriose (CNPG3), o hidrogenofosfato dissódico, a acarbose (Figura 20), os flavonoides em estudo (Figura 20): quercetina, quercetagetina, gossipetina, norwogonina e a herbacetina foram adquiridos à Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, USA).

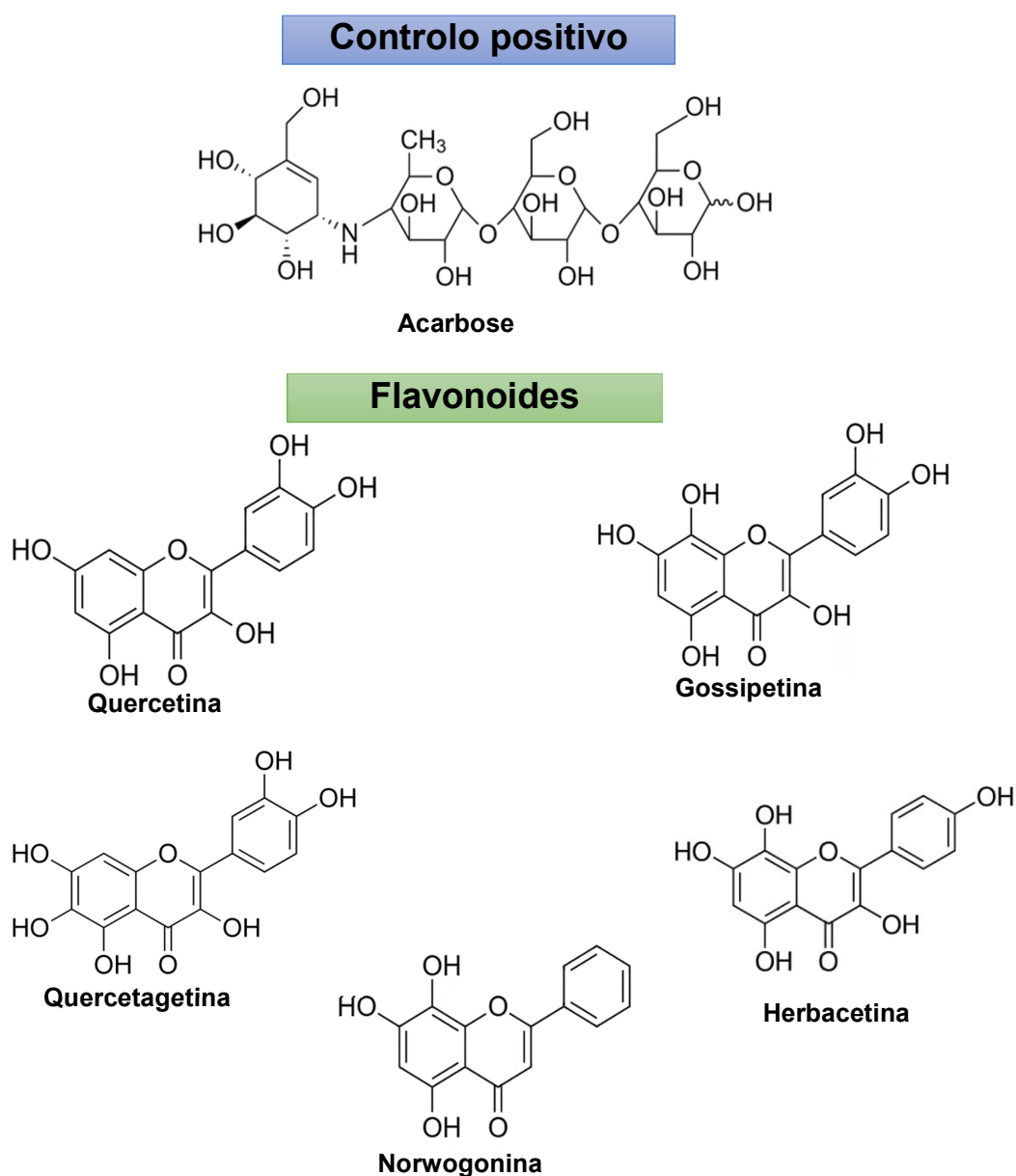


Figura 20 – Estrutura química dos compostos estudados.

6.2. Equipamentos

As leituras de absorvência foram efetuadas num leitor de microplacas de 96 poços da marca Synergy HT (BIO-TEK).

6.3. Ensaio para avaliação da inibição da atividade da enzima α -amilase

6.3.1. Fundamento do método

Neste ensaio, foi testada a atividade da enzima α -amilase extraída de pâncreas de porco, usando uma técnica *in vitro* de microanálise por espectrofotometria UV/vis. Para o efeito, utilizou-se como substrato o CNPG3. Desta hidrólise, resultam os seguintes produtos: 2-cloro-*p*-nitrofenol, 2-cloro-*p*-nitrofenil- α -D-maltósido, maltotriose e a glucose (Figura 21). Através da técnica de espectrofotometria UV/Vis, é possível medir a formação de 2-cloro-*p*-nitrofenil (que origina a cor amarela que se forma no decorrer da reação), a um comprimento de onda 405 nm. Assim, trata-se de uma quantificação indireta da cinética enzimática pois o produto de reação que é medido é o 2-cloro-*p*-nitrofenil. Salienta-se que quanto mais elevada for a atividade da α -amilase, maior será a conversão de CNPG3 em 2-cloro-*p*-nitrofenil e, por isso, mais elevado será o valor de absorvência. Assim, quando um inibidor da atividade da α -amilase é usado, ocorre uma menor formação dos produtos de reação, resultando em menores valores de absorvência.

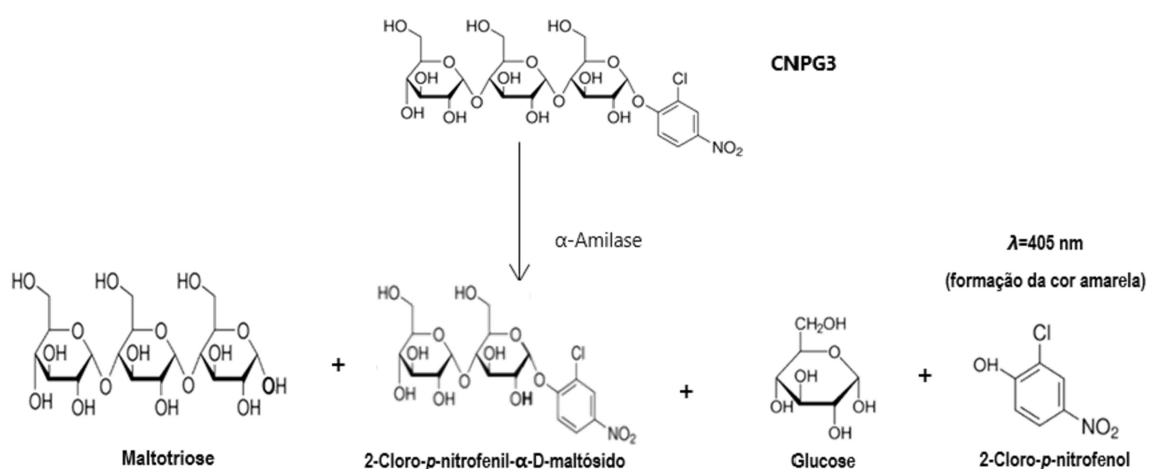


Figura 21 – Hidrólise de CNPG3 pela α -amilase. Adaptado de (100) e em (101).

6.3.2. Ensaio para avaliação da inibição da atividade da enzima α -amilase

Nesta etapa do estudo, avaliou-se a atividade da enzima α -amilase na presença de acarbose ou dos flavonoides em estudo (Figura 20). Para isso, utilizou-se uma concentração de 0,2 U/mL de α -amilase e uma concentração de 500 μ M de CNPG3, sendo o tempo total de cinética 30 minutos. Neste estudo, a acarbose foi utilizada como controlo positivo. Foram estudadas várias concentrações de acarbose (0,31 – 20 μ M) e de flavonoides (1,6 – 100 μ M).

Numa placa de 96 poços, colocou-se 80 μ L de enzima α -amilase, dissolvida numa solução de tampão fosfato, juntamente com 20 μ L de acarbose ou dos flavonoides (dissolvidos em DMSO), procedendo-se, posteriormente, à sua pré-incubação a 37°C durante 10 minutos. De seguida, adicionou-se 100 μ L de substrato – CNPG3 (dissolvido em tampão fosfato) – e incubou-se a 37°C durante 30 minutos (Figura 22).

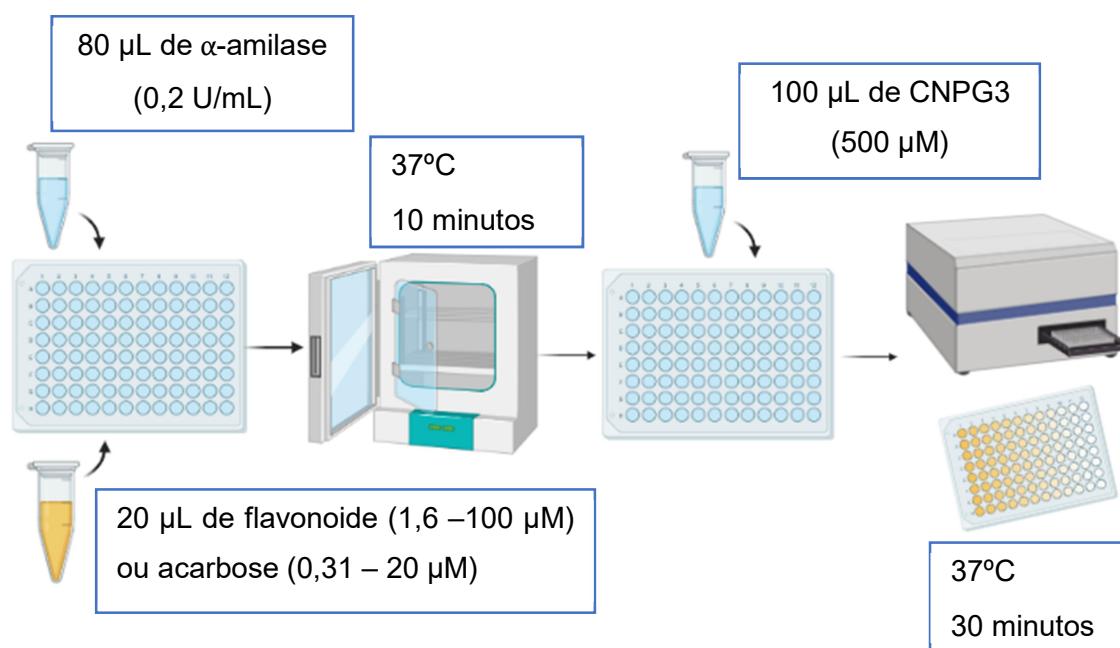


Figura 22 – Representação dos ensaios *in vitro* da inibição da α -amilase.

Em cada estudo efetuou-se, no mínimo, três ensaios em duplicado, sendo os resultados expressos sobre a forma de percentagem de inibição da atividade de enzima, usando para o efeito a equação 1.

$$\text{Equação 1} - \% \text{ Inibição enzimática} = 100 - \frac{v_{(A)} - v_{(B)}}{v_{(C)} - v_{(B)}} \times 100$$

Em que:

$v_{(A)}$ = velocidade de reação na presença da amostra

$v_{(B)}$ = velocidade de reação do ensaio em branco (ausência da enzima e da amostra)

$v_{(C)}$ = velocidade de reação na ausência da amostra e na presença da enzima

6.4. Ensaio para avaliação da inibição da atividade da enzima α -glucosidase

6.4.1. Fundamentação do método

Neste ensaio, foi testada a atividade da enzima α -glucosidase extraída de *Saccharomyces cerevisiae*, usando uma técnica *in vitro* de microanálise por espectrofotometria UV/Vis. Para o efeito, utilizou-se um substrato sintético – *p*NPG (*p*-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo). Desta hidrólise, resultam dois produtos: a α -D-glucose e o *p*-nitrofenol (Figura 23). Através da técnica de espectrofotometria UV/Vis, é possível medir a formação de *p*-nitrofenol (que origina a cor amarela que se forma no decorrer da reação), a um comprimento de onda 405 nm. Assim, trata-se de uma quantificação indireta da cinética enzimática pois o produto de reação que é medido é o *p*-nitrofenol e não a α -D-glucose. Salienta-se que quanto mais elevada for a atividade da α -glucosidase, maior será a conversão de *p*NPG em *p*-nitrofenol e, por isso, mais elevado será o valor de absorvência. Assim, quando um inibidor da atividade da α -glucosidase é usado, ocorre uma menor formação dos produtos de reação e, por isso, resultando em menores valores de absorvência.

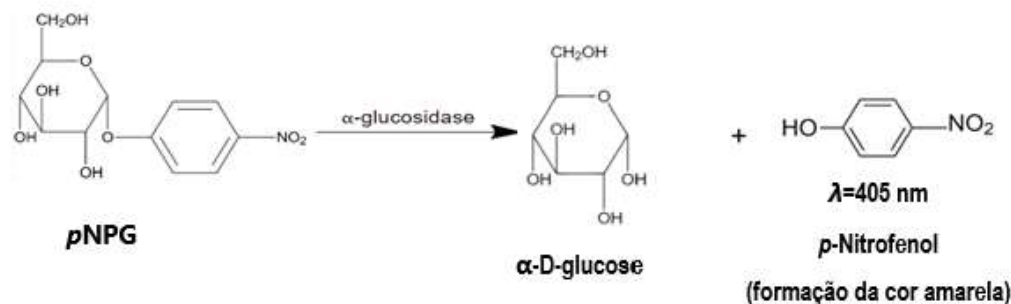


Figura 23 – Hidrólise de pNPG pela α -glucosidase. Adaptado de (1) e (102)

6.4.2. Ensaio para avaliação da inibição da atividade da enzima α -glucosidase

Nesta etapa do estudo, avaliou-se a atividade da enzima α -glucosidase na presença de acarbose ou dos flavonoides em estudo (Figura 20). Para isso, utilizou-se uma concentração de 0,04 U/mL de α -glucosidase e uma concentração de 600 μ M de pNPG, sendo o tempo total de cinética 40 minutos. Neste estudo, a acarbose foi utilizada como controlo positivo. Foram estudadas várias concentrações de acarbose (94 – 3000 μ M) e de flavonoides (1,6 – 50 μ M).

Numa placa de 96 poços, colocou-se 50 μ L de enzima α -glucosidase, dissolvida numa solução de tampão fosfato, juntamente com 10 μ L de acarbose ou dos flavonoides (dissolvidos em DMSO), procedendo-se, posteriormente, à sua pré-incubação a 37°C durante 5 minutos. De seguida, adicionou-se 50 μ L de substrato – pNPG (dissolvido em tampão fosfato) – e incubou-se a 37°C durante 40 minutos (Figura 24).

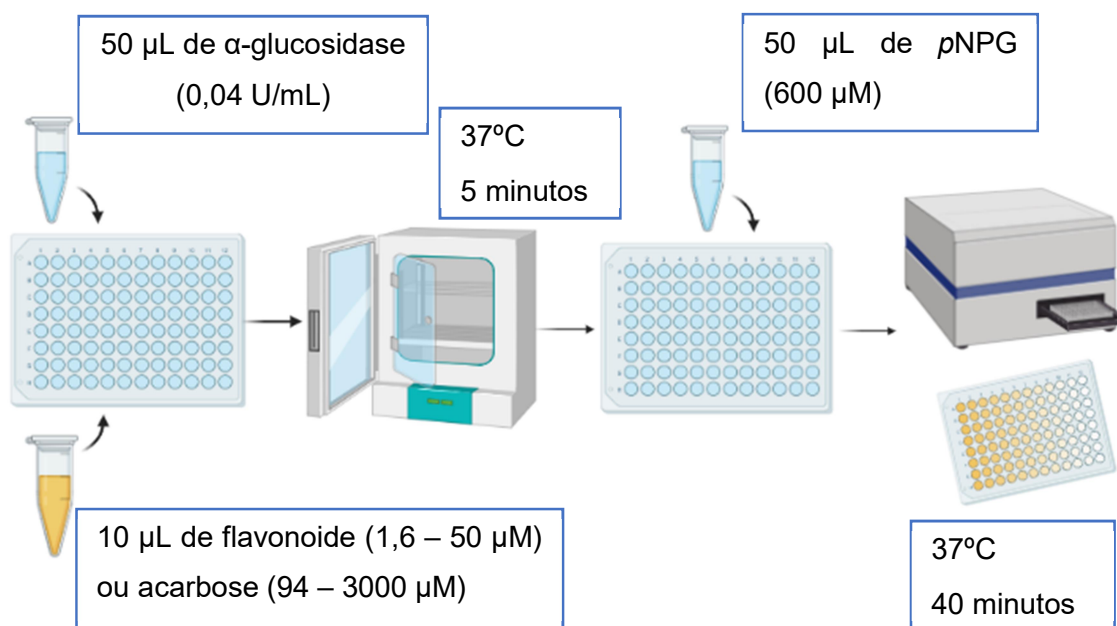


Figura 24 – Representação dos ensaios *in vitro* da inibição da α -glucosidase.

Em cada estudo efetuou-se, no mínimo, três ensaios em duplicado, sendo os resultados expressos sobre a forma de percentagem de inibição da atividade de enzima, usando para o efeito a equação 1.

6.5. Análise estatística

Os resultados do efeito inibitório *in vitro* dos flavonoides estudados na atividade das enzimas α -amilase e α -glucosidase são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM). O cálculo do IC_{50} para cada um dos compostos estudados foi realizado recorrendo ao *software* GraphPad 7.0. O IC_{50} representa a concentração mínima necessária de um composto para inibir 50% a atividade das enzimas α -amilase e α -glucosidase.

7. Resultados

7.1. Avaliação da inibição da enzima α -amilase pancreática pela acarbose

O efeito inibitório da atividade da enzima α -amilase pela acarbose está representado na figura 25. Analisando esta figura, é possível verificar que a atividade inibitória da acarbose foi dependente da concentração testada.

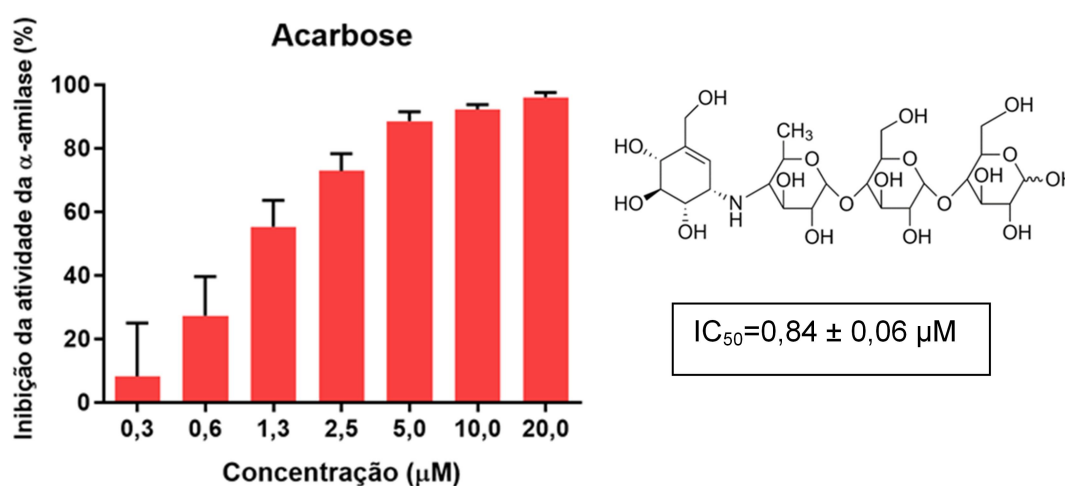


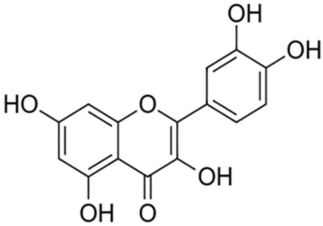
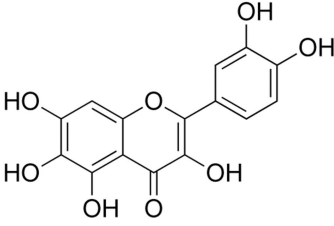
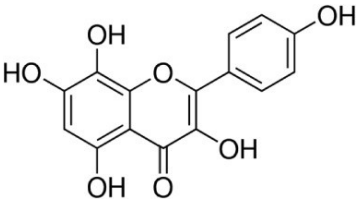
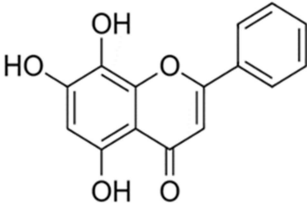
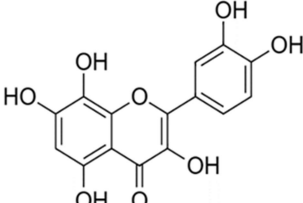
Figura 25 – Efeito inibitório da acarbose (0-20 μ M), na atividade da enzima α -amilase pancreática e respetivo valor de IC_{50} . O valor de IC_{50} representa a média $\pm$ SEM de pelo menos três ensaios realizados.

De acordo com os resultados apresentados na figura 25, verifica-se que, o IC_{50} obtido para a acarbose foi igual a $0,8 \pm 0,1 \mu$ M e apresentou uma percentagem de inibição igual a $96,1 \pm 1,5\%$ para a concentração máxima testada (20 μ M).

7.2. Avaliação da inibição da enzima α -amilase pancreática por flavonoides

O efeito inibitório da atividade da enzima α -amilase pancreática dos diferentes flavonoides testados está representado na Tabela 2.

Tabela 2 – Estrutura química dos flavonoides em estudo e respetiva % de inibição da atividade da enzima α -amilase pancreática (% de inibição na maior concentração testada, indicada em sobrescrito).

Flavonoide	Estrutura	Inibição da α -amilase (%)
Quercetina		<45 ¹⁰⁰ μ M
Quercetagetina		<38 ¹⁰⁰ μ M
Herbacetina		<25 ¹⁰⁰ μ M
Norwogonina		<10 ¹⁰⁰ μ M
Gossipetina		<20 ¹⁰⁰ μ M

De acordo com os resultados apresentados na tabela 1, a atividade inibitória dos flavonoides testados foi inferior a 50 % na concentração mais alta testada, 100 μ M. Este resultado demonstra que os flavonoides tiveram uma reduzida atividade inibitória sobre esta enzima, não sendo possível calcular o valor de IC_{50} .

7.3. Avaliação da inibição da enzima α -glucosidase pela acarbose

O efeito inibitório da atividade da enzima α -glucosidase pela acarbose está representado na figura 26. Analisando esta figura, é possível verificar que a atividade inibitória da acarbose foi dependente da concentração testada.

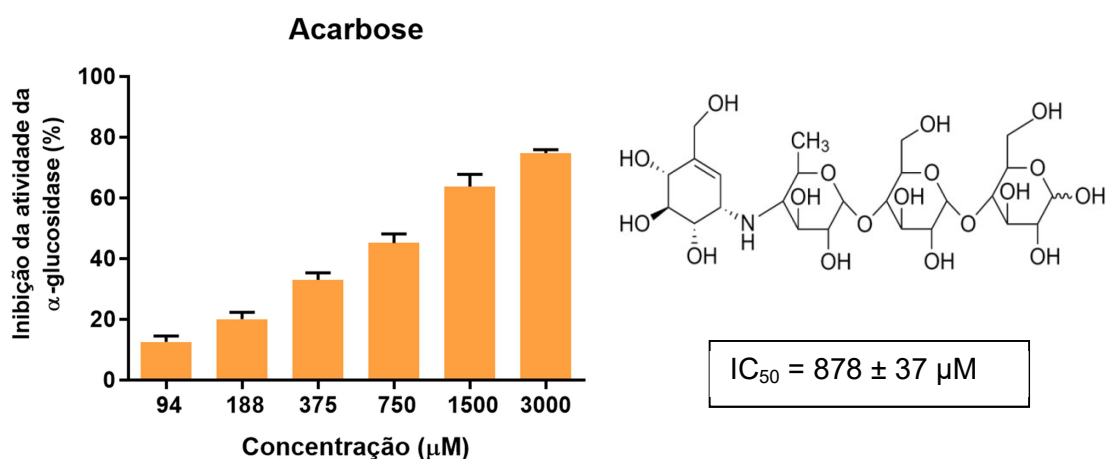


Figura 26 – Efeito inibitório da acarbose (0-3000 μ M), na atividade da enzima α -glucosidase e respetivo valor de IC_{50} . O valor de IC_{50} representa a média $\pm$ SEM de pelo menos quatro ensaios realizados.

De acordo com os resultados apresentados na figura 26, verifica-se que, o IC_{50} obtido para a acarbose foi igual a $878 \pm 37 \mu$ M e apresentou uma percentagem de inibição igual a $74,7 \pm 1,2\%$ para a concentração máxima testada (3000 μ M).

7.4. Avaliação da inibição da enzima α -glucosidase por flavonoides

Este trabalho permitiu verificar que a atividade inibitória dos flavonoides na enzima α -glucosidase variou com a estrutura dos mesmos e com a concentração testada. Assim, dentre o painel testado, os flavonoides mais ativos foram quercetagina e a quercetina, que apresentaram $IC_{50}=18,2 \pm 1,1$ e $20,6 \pm 1,5$ μM , respetivamente (Figura 27). Os outros compostos testados, designadamente gossipetina, norwogonina e herbacetina, apresentaram inibição inferior a 30% na concentração máxima testada (50 μM). Assim sendo, a ordem de atividade inibitória dos flavonoides estudados é a seguinte: quercetina $\approx$ quercetagina > gossipetina $\approx$ norwogonina $\approx$ herbacetina.

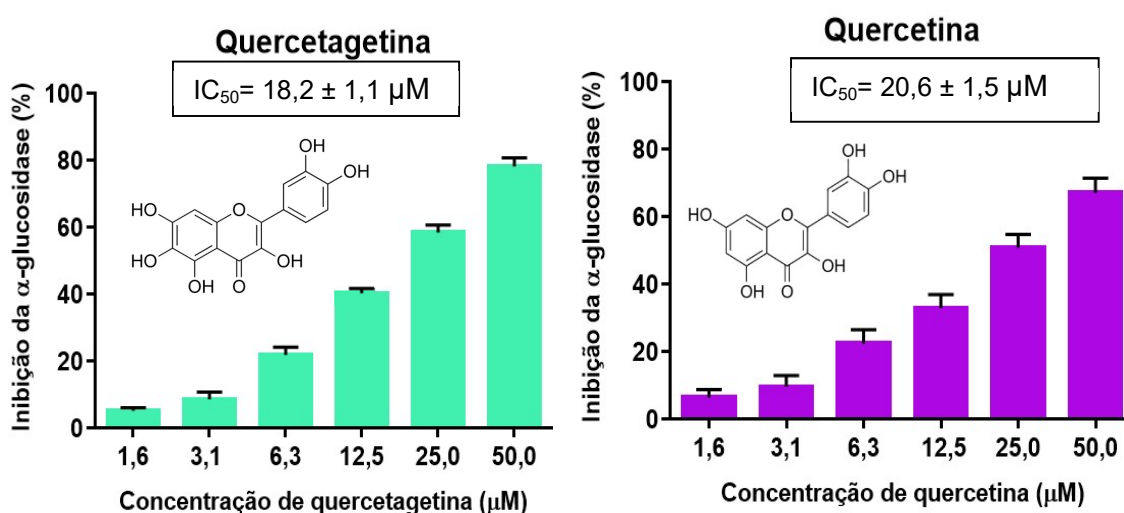


Figura 27 – Efeito inibitório dos flavonoides mais ativos entre os estudados (0-50 μM), na atividade da enzima α -glucosidase e respetivo valor de IC_{50} . O valor de IC_{50} representa a média $\pm$ SEM de pelo menos quatro ensaios realizados.

8. Discussão

As enzimas α -amilase e α -glucosidase desempenham um papel importante na decomposição dos hidratos de carbono antes da absorção intestinal dos monossacarídeos, nomeadamente a glucose, e, por isso, possuem um papel importante no controlo dos níveis de glucose no sangue pós-prandial. A inibição destas enzimas é uma das abordagens terapêuticas atualmente disponível e mais utilizadas no tratamento da DMT2, sendo a acarbose o inibidor mais prescrito. No entanto, a utilização desta terapia farmacológica não tem sido totalmente eficaz pois possui inúmeros efeitos secundários indesejáveis (como distensão abdominal, flatulência, diarreia, pneumatose cistóide intestinal e, no caso da acarbose, distúrbios hepáticos). Assim, é essencial a procura de novas estratégias terapêuticas mais eficazes e mais seguras para ultrapassar este inconveniente e de forma a prevenir esta doença.^(54, 55, 83, 88)

Os flavonoides, amplamente distribuídos na natureza, exibem diversas atividades biológicas, incluindo a antidiabética. O efeito inibitório de alguns flavonoides na atividade das enzimas α -amilase e α -glucosidase já foi anteriormente estudado.^(1, 100, 103-105) No entanto, a comparação dos resultados encontrados na literatura é difícil devido às diferentes condições experimentais que são aplicadas em cada estudo, nomeadamente: a origem e a concentração da enzima, o tipo e a concentração do substrato, o tempo de incubação, o pH e a temperatura aplicadas^(1, 88, 89, 106)

Neste trabalho foi avaliado o efeito inibitório da atividade das enzimas α -amilase e α -glucosidase por um painel de cinco flavonoides, estruturalmente relacionados, sendo estes sujeitos às mesmas condições experimentais, permitindo assim, uma comparação de resultados entre eles mais fidedigna. Para isso, recorreu-se a uma técnica de microanálise com recurso a um leitor de microplacas, técnica esta que reduz os custos e o tempo gasto nas experiências, permitindo que várias leituras sejam realizadas pelo mesmo operador e ao mesmo tempo, constituindo assim, a escolha ideal neste tipo de ensaios.

Este trabalho começou com o estudo da avaliação do efeito inibitório da acarbose (fármaco atualmente utilizado para o controlo da DMT2 em Portugal) em ambas as enzimas. A acarbose foi capaz de inibir as enzimas α -amilase e α -glucosidase na concentração máxima testada. No que diz respeito à atividade da enzima α -amilase, apresentou um valor de $IC_{50} = 0,84 \pm 0,06 \mu M$. Já na atividade da

enzima α -glucosidase, a acarbose apresentou um valor de IC_{50} de $878 \pm 37 \mu M$. Proença et al.^(1, 100) também utilizaram a acarbose como controlo positivo, nas mesmas condições experimentais do trabalho aqui apresentado e obtiveram valores semelhantes aos obtidos neste trabalho ($IC_{50} = 1.3 \pm 0.2 \mu M$)⁽¹⁰⁰⁾ para a enzima α -amilase e $IC_{50} = 607 \pm 56 \mu M$ ⁽¹⁾ para a enzima α -glucosidase).

Seguidamente, prosseguiu-se para o estudo da inibição das referidas enzimas por um painel de cinco flavonoides relacionados estruturalmente.

Analisando os resultados da inibição da enzima α -amilase pelo painel de flavonoides testados é possível observar que estes inibem esta enzima de forma reduzida nas concentrações testadas (apresentando uma percentagem de inibição inferior a 50%). Tanto quanto sabemos, estes compostos foram avaliados aqui pela primeira vez, com exceção da quercetina e da quercetagetina. Quanto à quercetina, os investigadores Nickavar et al.⁽¹⁰³⁾ testaram a sua atividade e obtiveram uma percentagem de inibição de $43.58 \pm 1.02 \%$ para uma concentração de $190 \mu M$, o que corrobora o valor obtido neste trabalho. Já Proença et al.⁽¹⁰⁰⁾ obtiveram um valor de $IC_{50} = 138 \pm 5 \mu M$. Quanto à quercetagetina, os autores Piparo E. et al.⁽¹⁰⁴⁾ apresentaram um $IC_{50} = 10.2 \pm 2.2 \mu M$, valor consideravelmente diferente do obtido neste trabalho. Esta diferença de valores pode-se dever ao facto de os autores usarem condições experimentais diferentes das utilizadas neste trabalho, nomeadamente, a enzima utilizada, que foi a α -amilase salivar humana (em vez da α -amilase pancreática), bem como, o método utilizado, com a recurso ao amido como substrato.

Analisando os resultados da inibição da enzima α -glucosidase pelo painel de flavonoides testados é possível observar que estes possuem efeito inibitório diferentes dependendo da estrutura testada. Inclusivamente, alguns flavonoides apresentaram uma atividade inibitória mais elevada do que a da acarbose, que é o fármaco atualmente mais utilizado no controlo da DMT2 em Portugal.

Assim, os compostos mais ativos foram a quercetina e a quercetagetina, apresentando valores de IC_{50} de $20,6 \pm 1,5 \mu M$ e $18,2 \pm 1,1 \mu M$, respetivamente. Os restantes flavonoides estudados (herbacetina, norwogonina e gossipetina) apresentaram valores de inibição inferiores aos da quercetina e da quercetagetina, para a concentração máxima estudada ($50 \mu M$), não tendo sido possível calcular o valor de IC_{50} . Tanto quanto sabemos, estes compostos foram avaliados aqui pela primeira vez, com exceção da quercetina e a quercetagetina.

Apesar do painel estudado neste trabalho ser de apenas cinco flavonoides, os resultados obtidos permitem tirar algumas conclusões sobre a relação estrutura *versus* atividade.

Quando comparamos a quercetina e a quercetagetina, verifica-se que a presença do grupo hidroxilo (-OH) no carbono 6 do anel A é irrelevante na atividade inibitória da enzima α -glucosidase. Estes flavonoides apresentam grupos -OH nas posições 5 e 7 do anel A, 3' e 4' do anel B e 3 do anel C, apenas diferindo na ausência do grupo hidroxilo no carbono 6 do anel A na quercetina. Isto traduz-se numa percentagem de inibição semelhante pois apresentam valores de IC_{50} próximos (IC_{50} = $20,6 \pm 1,5 \mu M$ para a quercetina e IC_{50} = $18,2 \pm 1,1 \mu M$ para a quercetagetina). Os investigadores Wang et al.⁽¹⁰⁵⁾ testaram a atividade da quercetina e da quercetagetina, obtendo, respetivamente, valores de IC_{50} de $163,44 \pm 3,44 \mu M$ e de $180,11 \pm 3,68 \mu M$. Estes valores são mais elevados do que os valores obtidos neste trabalho, o que pode ser devido às diferenças nas condições experimentais e no método aplicado. Nomeadamente, os investigadores começaram por diluir a acarbose e os flavonoides numa solução aquosa de etanol a 70 % (em vez de DMSO). Para além disso, utilizaram volumes diferentes de composto, de tampão e de substrato. Outra diferença encontrada foi a temperatura e o tempo de incubação bem como a concentração de substrato utilizado (utilizaram uma concentração de 4 mM). Por sua vez, os investigadores, no fim do processo de incubação, acrescentaram um passo: a reação foi interrompida pela adição de 600 μL de Na_2CO_3 .

A substituição do -OH da posição 6 para a posição 8 do anel A, não parece ser favorável para a atividade inibitória da enzima α -glucosidase. Esta conclusão baseou-se na comparação da quercetagetina, um dos flavonoides mais ativos, com a gossipetina (efeito inibitório de $30 \pm 4\%$ na concentração máxima testada, 50 μM). Estes flavonoides apresentam grupos -OH nas posições 5 e 7 do anel A, 3' e 4' do anel B e 3 do anel C, apenas diferindo na presença do grupo -OH no anel A (na posição 6 para a quercetagetina e na posição 8 na gossipetina).

Os resultados obtidos para a quercetina e a gossipetina, reforçam a conclusão de que a presença de grupos -OH na posição 8 do anel A não é favorável para a atividade inibitória. Estes flavonoides apresentam grupos -OH nas posições 5 e 7 do anel A, 3' e 4' do anel B e 3 do anel C, apenas diferindo na ausência do grupo hidroxilo no carbono 8 do anel A na quercetina. Isto traduz-se numa maior percentagem de inibição da quercetina.

A presença de grupos –OH no anel B não trouxe qualquer vantagem para a atividade inibitória, o que é possível ver através da comparação entre a herbacetina, norwogonina e gossipetina. Assim, a presença do grupo catecol no anel B (gossipetina), a presença do grupo hidroxilo no carbono 4' do anel B (herbacetina) ou não ter nenhum grupo hidroxilo (norwogonina) demonstrou ser irrelevante porque estes compostos demonstraram uma reduzida percentagem de inibição na concentração máxima testada.

Assim, neste trabalho a quercetagetina e a quercetina foram os flavonoides que mostraram uma maior atividade inibitória da atividade da α -glucosidase, apresentando um IC_{50} aproximadamente 43 vezes inferior ao IC_{50} encontrado para a acarbose.

Os inibidores da α -glucosidase atualmente disponíveis provocam um aumento excessivo de hidratos de carbono não digeridos no intestino, principalmente devido à inibição não específica da α -amilase. Uma inibição elevada da atividade da enzima α -amilase provoca uma inibição prolongada da hidrólise do amido e leva à acumulação de hidratos de carbono não digeridos no cólon. Assim, os inibidores da α -glucosidase, com atividade inibitória ligeira sobre a α -amilase, constituem uma das principais estratégias terapêuticas para o tratamento da DMT2⁽³⁰⁾. Assim sendo, a quercetina e a quercetagetina constituem as moléculas mais promissoras para o controlo e/ou tratamento da DMT2 entre os flavonoides testados.

9. Conclusão

Neste estudo, foi avaliado o efeito inibitório da atividade das enzimas α -amilase e α -glucosidase por um painel de cinco flavonoides, a maioria destes aqui testados pela primeira vez. Os resultados obtidos permitem afirmar que a estrutura dos flavonoides é um fator decisivo para a inibição da atividade das enzimas α -amilase e α -glucosidase, verificando-se que os flavonoides mais ativos foram a quercetina e a quercetina.

Em conclusão, este estudo sugere que alguns dos flavonoides estudados têm potencial para serem utilizados como alternativas eficazes para regulação da hiperglicemia pós-prandial na DMT2, contribuindo, assim, para o desenho de novas moléculas.

10. Perspetivas futuras

A investigação realizada neste trabalho não poderá ser dada como terminada. O próximo passo será testar o efeito dos flavonoides mais promissores (quercetina e quercetagina) em enzimas humanas, para comparar com os resultados obtidos neste trabalho. Posteriormente, o efeito dos flavonoides mais promissores será avaliado em linhas celulares humanas, nomeadamente numa linha celular intestinal (as células CaCo-2) para a avaliação da atividade da enzima α -glucosidase. Os resultados obtidos contribuirão para o design de novas moléculas com potencial inibitório das enzimas em estudo.

11. Referências Bibliográficas

1. Proença C, Freitas M, Ribeiro D, Oliveira EFT, Sousa JLC, Tomé SM, et al. α -Glucosidase inhibition by flavonoids: an in vitro and in silico structure-activity relationship study. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2017;32(1):1216-28.
2. Rocha S, Sousa A, Ribeiro D, Correia CM, Silva VLM, Santos CMM, et al. A study towards drug discovery for the management of type 2 diabetes mellitus through inhibition of the carbohydrate-hydrolyzing enzymes α -amylase and α -glucosidase by chalcone derivatives. *Food & Function Journal*. 2019;10(9):5510-20.
3. DeFronzo RA, Ferrannini E, Groop L, Henry RR, Herman WH, Holst JJ, et al. Type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*. 2015;1:15019.
4. Wilke T, Boettger B, Berg B, Groth A, Mueller S, Botteman M, et al. Epidemiology of urinary tract infections in type 2 diabetes mellitus patients: An analysis based on a large sample of 456,586 German T2DM patients. *Journal of Diabetes and its Complications*. 2015;29(8):1015-23.
5. Hossain U, Das AK, Ghosh S, Sil PC. An overview on the role of bioactive α -glucosidase inhibitors in ameliorating diabetic complications. *Food and Chemical Toxicology*. 2020;145:111738.
6. Schmidt AM. Highlighting Diabetes Mellitus: The Epidemic Continues. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2018;38(1):e1-e8.
7. Ceriello A, Davidson J, Hanefeld M, Leiter L, Monnier L, Owens D, et al. Postprandial hyperglycaemia and cardiovascular complications of diabetes: an update. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2006;16(7):453-56.
8. Flier JS, Kahn CR. Insulin: A pacesetter for the shape of modern biomedical science and the Nobel Prize. *Molecular Metabolism* 2021;52:101194.
9. The Nobel Prize. "The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1923". Available from: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1923/summary/>
10. International Diabetes Federation. Diabetes Atlas 2021. Available from: <https://diabetesatlas.org/atlas/tenth-edition/>
11. International Diabetes Federation. Diabetes around the world, 2021. Available from: <https://diabetesatlas.org/regional-factsheets/>
12. Sociedade Portuguesa de Diabetologia. Diabetes – Factos e Números – Os anos de 2016, 2017 e 2018. 2019; pp. 7-9. Available from: <http://www.revportdiabetes.com/diabetes-factos-numeros-os-anos-de-2016-2017-e-2018/>

13. Sargsyan A, Herman MA. Regulation of Glucose Production in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. *Current Diabetes Reports*. 2019;19(9):77.
14. Ahmad M, He L, Perrimon N. Regulation of insulin and adipokinetic hormone/glucagon production in flies. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*. 2020;9(2):e360.
15. Chabenne JR, Mroz PA, Mayer JP, DiMarchi RD. Structural Refinement of Glucagon for Therapeutic Use. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2020;63(7):3447-60.
16. Jia Y, Liu Y, Feng L, Sun S, Sun G. Role of Glucagon and Its Receptor in the Pathogenesis of Diabetes. *Frontiers in Endocrinology*. 2022;13:928016.
17. Park SY, Gautier JF, Chon S. Assessment of Insulin Secretion and Insulin Resistance in Human. *Diabetes and Metabolism Journal*. 2021;45(5):641-54.
18. Bailes BK. Diabetes mellitus and its chronic complications. *Aorn Journal*. 2002;76(2):266-76, 78-82.
19. Genuth SM, Palmer JP, Nathan DM. Classification and Diagnosis of Diabetes. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK568014/>.
20. Federation ID. Type 1 diabetes 2023 [updated 16-01-2023]. Available from: <https://idf.org/aboutdiabetes/type-1-diabetes.html>.
21. Zamboni F, Collins MN. Cell based therapeutics in type 1 diabetes mellitus. *International Journal of Pharmaceutics*. 2017;521(1-2):346-56.
22. DiMeglio LA, Evans-Molina C, Oram RA. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2018;391(10138):2449-62.
23. Fernandes AP, Pace AE, Zanetti ML, Foss MC, Donadi EA. [Immunogenetic factors associated with type 1 diabetes mellitus]. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*. 2005;13(5):743-9.
24. Goyal R, Jialal I. Diabetes Mellitus Type 2. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.; 2022.
25. Wu Y, Ding Y, Tanaka Y, Zhang W. Risk factors contributing to type 2 diabetes and recent advances in the treatment and prevention. *International Journal of Medical Sciences*. 2014;11(11):1185-200.
26. Chaudhury A, Duvoor C, Reddy Dendi VS, Kraleti S, Chada A, Ravilla R, et al. Clinical Review of Antidiabetic Drugs: Implications for Type 2 Diabetes Mellitus Management. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017;8:6.
27. Kashtoh H, Baek K-H. Recent Updates on Phytoconstituent Alpha-Glucosidase Inhibitors: An Approach towards the Treatment of Type Two Diabetes. *Plants*. 2022;11(20):2722.

28. Lebovitz HE. α -Glucosidase inhibitors. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 1997;26(3):539-51.
29. Sudhir R, Mohan V. Postprandial hyperglycemia in patients with type 2 diabetes mellitus. *Treat Endocrinology*. 2002;1(2):105-16.
30. Shahidpour S PF, Yousefi R, Nourisefat M, Nabipoor M, Khalafi-Nezhad A. Design and synthesis of new antidiabetic α -glucosidase and α -amylase inhibitors based on pyrimidine-fused heterocycles. *Medical Chemistry Research*. 2015;7:3086-96.
31. Cleary EM, Thung SF, Buschur EO. Gestational Diabetes. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E, et al., editors. *Endotext*. South Dartmouth (MA): MDTText.com, Inc. Copyright © 2000-2023, MDTText.com, Inc.; 2000.
32. Franzago M, Fraticelli F, Stuppia L, Vitacolonna E. Nutrigenetics, epigenetics and gestational diabetes: consequences in mother and child. *Epigenetics*. 2019;14(3):215-35.
33. Kampmann U, Madsen LR, Skajaa GO, Iversen DS, Moeller N, Ovesen P. Gestational diabetes: A clinical update. *World Journal of Diabetes*. 2015;6(8):1065-72.
34. Plows JF, Stanley JL, Baker PN, Reynolds CM, Vickers MH. The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(11).
35. Artasensi A, Pedretti A, Vistoli G, Fumagalli L. Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Multi-Target Drugs. *Molecules*. 2020;25(8).
36. Chumakova-Orin M, Vanetta C, Moris DP, Guerron AD. Diabetes remission after bariatric surgery. *World Journal of Diabetes*. 2021;12(7):1093-101.
37. Śliwińska-Mossoń M, Milnerowicz H. The impact of smoking on the development of diabetes and its complications. *Diabetes and Vascular Diseases Research*. 2017;14(4):265-76.
38. Khan RMM, Chua ZJY, Tan JC, Yang Y, Liao Z, Zhao Y. From Pre-Diabetes to Diabetes: Diagnosis, Treatments and Translational Research. *Medicina (Kaunas)*. 2019;55(9).
39. Fletcher B, Gulanick M, Lamendola C. Risk factors for type 2 diabetes mellitus. *Journal of Cardiovascular Nursing*. 2002;16(2):17-23.
40. Hu FB. Globalization of diabetes: the role of diet, lifestyle, and genes. *Diabetes Care*. 2011;34(6):1249-57.

41. Organization WH. Global report on diabetes: Executive Summary 2020 [Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/who-nmh-nvi-16.3>
42. Diseases NIDDK. Symptoms & Causes of Diabetes 2016. Available from: <https://www.niddk.nih.gov/health-information/diabetes/overview/symptoms-causes#symptoms>
43. Cole JB, Florez JC. Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications. *Nature Reviews Nephrology*. 2020;16(7):377-90.
44. Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiological Reviews*. 2013;93(1):137-88.
45. Bandyk DF. The diabetic foot: Pathophysiology, evaluation, and treatment. *Seminars in Vascular Surgery*. 2018;31(2-4):43-8.
46. Federation ID. Diabetes complications 2020 [updated 22/05/2020. Available from: <https://www.idf.org/aboutdiabetes/complications.html>.
47. Dorothy Abiola TS, David Hepburn. Management of type 1 and type 2 diabetes requiring insulin. *Prescriber*. 2016:50-7.
48. Duarte R. Inibidores da DPP-4 (Gliptinas) – 10 anos depois (2007-2017). *Revista Portuguesa de Diabetes*. 2017;12(2):62-7.
49. D. Carvalho JSN, J. F. Raposo, J. L. Medina, J. Jácome de Castro, F. Carrilho. Agonistas dos Receptores do GLP-1 no Tratamento da Diabetes Tipo 2. *Revista Portuguesa de Diabetes*. 2016;11:154-66.
50. Flory J, Lipska K. Metformin in 2019. *Jama*. 2019;321(19):1926-7.
51. Gong L, Feng D, Wang T, Ren Y, Liu Y, Wang J. Inhibitors of α -amylase and α -glucosidase: Potential linkage for whole cereal foods on prevention of hyperglycemia. *Food Science & Nutrition*. 2020;8(12):6320-37.
52. Hurtado CW. Carbohydrate Digestion and Absorption,. North American Society For Pediatric Gastroenterology, Hepatology & Nutrition (NASPGHAN).
53. Slavin J, Carlson J. Carbohydrates. *Advances in Nutrition*. 2014;5(6):760-1.
54. Diseases. NIDDK. Your Digestive System & How it Works. 2017 [updated december, 2017. Available from: <https://www.niddk.nih.gov/health-information/digestive-diseases/digestive-system-how-it-works#whyis>.
55. Tomasik P, Horton D. Enzymatic conversions of starch. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. 2012;68:59-436.
56. Chen WN, Tang KS, Yeong KY. Potential Roles of α -amylase in Alzheimer's Disease: Biomarker and Drug Target. *Current Neuropharmacology*. 2022;20(8):1554-63.

57. de Souza PM, de Oliveira Magalhães P. Application of microbial α -amylase in industry - A review. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2010;41(4):850-61.
58. Peter J. Butterworth FJWaPRE. Human α -amylase and starch digestion: An interesting marriage. *Starch* 2011;63:395-405.
59. PD B. Human salivary amylase 2019 [updated 2019]. Available from: <https://www.rcsb.org/structure/1smd>.
60. Graciela Granados-Guzmána BAAG, Rocío Castro-Ríosa, Noemí Waksman-Minsky and Ricardo, Salazar-Arandaa. Assessment of α -amylase inhibition activity by an optimized and validated in vitro microscale method. *Quimica Nova*. 2022;45:1146-52.
61. Goodman BE. Insights into digestion and absorption of major nutrients in humans. *Advances in Physiology Education*. 2010;34(2):44-53.
62. Al-Akl NS, Thompson RI, Arredouani A. Reduced odds of diabetes associated with high plasma salivary α -amylase activity in Qatari women: a cross-sectional study. *Scientific Reports*. 2021;11(1):11495.
63. Sahu GK, Upadhyay S, Panna SM. Salivary alpha amylase activity in human beings of different age groups subjected to psychological stress. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2014;29(4):485-90.
64. Atkinson MA, Campbell-Thompson M, Kusmartseva I, Kaestner KH. Organisation of the human pancreas in health and in diabetes. *Diabetologia*. 2020;63(10):1966-73.
65. Krasikov VV, Karelov DV, Firsov LM. alpha-Glucosidases. *Biochemistry (Mosc)*. 2001;66(3):267-81.
66. Santos CMM, Freitas M, Fernandes E. A comprehensive review on xanthone derivatives as α -glucosidase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018;157:1460-79.
67. Bank PD. Crystal structure of alpha-glucosidase 2014 [updated 21 March 2018]. Available from: <https://www.rcsb.org/structure/3wy1>
68. Francisco W.A. Bezerra LMUDF, Karen P.S. Lopes, et al.. α -Glucosidase inhibitory activity of mangiferin-loaded F127/PEG micellar system. *Material Letters*. 2019; 255: 126522.
69. Okuyama M, Saburi W, Mori H, Kimura A. α -Glucosidases and α -1,4-glucan lyases: structures, functions, and physiological actions. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2016;73(14):2727-51.

70. Sim L, Willemsma C, Mohan S, Naim HY, Pinto BM, Rose DR. Structural basis for substrate selectivity in human maltase-glucoamylase and sucrase-isomaltase N-terminal domains. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(23):17763-70.
71. Derosa G, Maffioli P. α -Glucosidase inhibitors and their use in clinical practice. *Archives of Medical Science*. 2012;8(5):899-906.
72. Joshi SR, Standl E, Tong N, Shah P, Kalra S, Rathod R. Therapeutic potential of α -glucosidase inhibitors in type 2 diabetes mellitus: an evidence-based review. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2015;16(13):1959-81.
73. Dabhi AS, Bhatt NR, Shah MJ. Voglibose: an alpha glucosidase inhibitor. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2013;7(12):3023-7.
74. J. Ahamad KJN, S. R. Mir, M.. Ali, M. Shuaib. Review on role of natural alfa-glucosidase inhibitors for management of diabetes mellitus. . *International Journal of Biomedical Research*. 2011;6:pp. 374-80.
75. Akmal M, Wadhwa R. Alpha Glucosidase Inhibitors. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.; 2022.
76. Dias MC, Pinto D, Silva AMS. Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Molecules*. 2021;26(17).
77. Kashtoh H, Baek KH. Recent Updates on Phytoconstituent Alpha-Glucosidase Inhibitors: An Approach towards the Treatment of Type Two Diabetes. *Plants (Basel)*. 2022;11(20).
78. C.V. U, A.M. J, Alex PM. The role of flavonoids in drug - review on potential applications. *Research Journal Life Sciences, Bioinformatics, Pharmaceutical and Chemical Sciences*. 2018:70-7.
79. Bahadoran Z, Mirmiran P, Azizi F. Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*. 2013;12(1):43.
80. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*. 2016;5:e47.
81. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *ScientificWorldJournal*. 2013;2013:162750.
82. Barber E, Houghton MJ, Williamson G. Flavonoids as Human Intestinal α -Glucosidase Inhibitors. *Foods*. 2021;10(8).
83. Williamson G. Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2013;57(1):48-57.

84. Palafox-Carlos H, Ayala-Zavala JF, González-Aguilar GA. The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. *Journal of Food Science*. 2011;76(1):R6-r15.
85. Cazarolli LH, Zanatta L, Alberton EH, Figueiredo MS, Folador P, Damazio RG, et al. Flavonoids: cellular and molecular mechanism of action in glucose homeostasis. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2008;8(10):1032-8.
86. Kozłowska A, Szostak-Wegierek D. Flavonoids - food sources and health benefits. *Rocz Panstw Zakl Hig*. 2014;65(2):79-85.
87. Cao H, Chen X. Structures required of flavonoids for inhibiting digestive enzymes. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2012;12(8):929-39.
88. Proença C, Ribeiro D, Freitas M, Fernandes E. Flavonoids as potential agents in the management of type 2 diabetes through the modulation of α -amylase and α -glucosidase activity: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2022;62(12):3137-207.
89. Gandhi GR, Vasconcelos ABS, Wu DT, Li HB, Antony PJ, Li H, et al. Citrus Flavonoids as Promising Phytochemicals Targeting Diabetes and Related Complications: A Systematic Review of In Vitro and In Vivo Studies. *Nutrients*. 2020;12(10).
90. Li Y, Yao J, Han C, Yang J, Chaudhry MT, Wang S, et al. Quercetin, Inflammation and Immunity. *Nutrients*. 2016;8(3):167.
91. T. Quan DW, L. Yang. Effective extraction methods based on hydrophobic deep eutectic solvent coupled with functional molecularly imprinted polymers: Application on quercetagenin extraction from natural medicine and blood. *Microchemical Journal*. 2021;174.
92. Kang GJ, Han SC, Ock JW, Kang HK, Yoo ES. Anti-Inflammatory Effect of Quercetagenin, an Active Component of Immature Citrus unshiu, in HaCaT Human Keratinocytes. *Biomolecules & Therapeutics (Seoul)*. 2013;21(2):138-45.
93. Wang Z, Yang L. Chinese herbal medicine: Fighting SARS-CoV-2 infection on all fronts. *Journal of Ethnopharmacology*. 2021;270:113869.
94. Linlin Jing RG, Jie Zhang, Dongmei Zhang, Jin Shao, Zhengping Jia & Huiping Ma. Norwogonin attenuates hypoxia-induced oxidative stress and apoptosis in PC12 cells. *BMC Complementary Medicine and Therapies volume*. 2021;21.
95. Jing LL, Fan XF, Jia ZP, Fan PC, Ma HP. Convergent synthesis of moslosooflavone, isowogonin and norwogonin from chrysin. *Natural Product Communications*. 2015;10(3):387-8.

96. Lin HH, Hsieh MC, Wang CP, Yu PR, Lee MS, Chen JH. Anti-Atherosclerotic Effect of Gossypetin on Abnormal Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Migration. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(9).
97. Harbone JB. Gossypetin and herbacetina as taxonomic markers in higher plants. *Phytochemistry* 1969;8:pp. 177 - 83.
98. Wei X, Zhao Z, Zhong R, Tan X. A comprehensive review of herbacetin: From chemistry to pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*. 2021;279:114356.
99. Veeramani C, Alsaif MA, Al-Numair KS. Herbacetin, a flaxseed flavonoid, ameliorates high percent dietary fat induced insulin resistance and lipid accumulation through the regulation of hepatic lipid metabolizing and lipid-regulating enzymes. *Chemico-Biological Interactions*. 2018;288:49-56.
100. Proença C, Freitas M, Ribeiro D, Tomé SM, Oliveira EFT, Viegas MF, et al. Evaluation of a flavonoids library for inhibition of pancreatic α -amylase towards a structure-activity relationship. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2019;34(1):577-88.
101. Marisa Freitas CP, Daniela Ribeiro, Maria Beatriz Quinaz-Garcia, Alberto N. Araújo, and Eduarda Fernandes. Assessment of α -Amylase Activity in a Microanalysis System: Experimental Optimization and Evaluation of Type of Inhibition. *Journal of Chemical Education*. 2023;100(3):1237-45.
102. Qurrat-ul-Ain UA, Rifat Ara Jamal, Muhammad Saleem, Mohammad Mahroof-Tahir Alpha-glucosidase and carbonic anhydrase inhibition studies of Pd(II)-hydrazide complexes. *Arabian Journal of Chemistry*. 2015;10(4):488-99.
103. Nickavar B, Amin G. Enzyme Assay Guided Isolation of an α -Amylase Inhibitor Flavonoid from *Vaccinium arctostaphylos* Leaves. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2011;10(4):849-53.
104. Lo Piparo E, Scheib H, Frei N, Williamson G, Grigorov M, Chou CJ. Flavonoids for controlling starch digestion: structural requirements for inhibiting human alpha-amylase. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2008;51(12):3555-61.
105. Wang W, Xu H, Chen H, Tai K, Liu F, Gao Y. In vitro antioxidant, anti-diabetic and antilipemic potentials of quercetagenin extracted from marigold (*Tagetes erecta* L.) inflorescence residues. *Journal of Food Science and Technology*. 2016;53(6):2614-24.
106. Singh P, Singh VK, Singh AK. Molecular docking analysis of candidate compounds derived from medicinal plants with type 2 diabetes mellitus targets. *Bioinformation*. 2019;15(3):179-88.