

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

جامعة عمار تليجي بالأغواط

UNIVERSITE AMAR TELIDJI-LAGHOUAT



FACULTE DE SCIENCES

Département de biologie

Mémoire de MASTER

Filière : Biochimie

Option : Biochimie des produits naturels

Par : Youssefi zohra

Thème

L'évaluation de l'activité antidiabétique *in vitro* des extraits de trois plantes médicinales locales

Soutenu publiquement devant le jury composé de :

Mme. KHACHEBA IHCEN	M.C.B	Présidente
Mme. BOUSSOUSSA HADJER	M.A.A	Examinatrice
Mr. DJERIDANE AMAR	M.C.A	Promoteur
Mme. HAMDI AICHE	M.A.A	Co-promotrice

Année universitaire 2015/2016

Remerciements

En tout premier lieu, je remercie le bon Dieu, tout puissant, de m'avoir donné la force pour survivre, ainsi que l'audace pour dépasser toutes les difficultés.

Ma plus grande gratitude va à mon encadreur, Mr. Amar Djeridane, pour sa disponibilité et la confiance qu'il m'a accordée. J'aimerais aussi le remercier pour ses précieux conseils qui m'ont permis de mener à bien ce travail.

J'exprime toute ma reconnaissance à ma co-promotrice, Mme. Aicha HAMDI, pour avoir bien voulu participer dans ce travail, je la remercie pour sa gentillesse, sa disponibilité et sa contribution générale à l'élaboration de ce travail.

Je souhaiterais également remercier mes collègues du travail au niveau de l'Ecole Normale Supérieure (ENS)-LAGHOUAT ; spécialement Maamri malika, Guenfoud Fatma, Messaoudi Abdeldjalil, Lakhdari Ilhem, pour leur soutien au cours de la réalisation de ce travail, ainsi que tous les ingénieurs de laboratoires de l'ENS.

À mes chères amies ; Bederina Sarra et Taibaoui Khadidja qui ont été toujours à mes côtés.

Afin de n'oublier personne, mes vifs remerciements s'adressent à tous ceux qui m'ont aidée de près ou de loin à la réalisation de ce modeste mémoire.

Dédicaces

Au nom de Dieu le clément et le miséricordieux louange à ALLAH le tout puissant.

Je dédie ce modeste travail en signe de respect, reconnaissance et de remerciement :

À mes chers parents, qui m'ont aidée, soutenue et encouragée.

À mes chers frères et sœurs chacun avec son nom

À mes neveux et mes nièces, spécialement les petits de la famille Souhail et Takieddine.

À toute la famille YOUSSEFI.

*À tous ceux qui ont participé à l'élaboration de ce modeste travail et tous ceux qui nous
sont chers.*

Table des matières

Liste des tableaux	I
Liste des figures.....	II
Liste des abréviations.....	III
Résumé (en arabe).....	IV
Résumé (en français).....	V
Résumé (en anglais).....	VI
I. Introduction générale.....	2
II. Extraction des composés phénoliques.....	6
II.1. Matériel végétal (description et prétraitement).....	6
II.2. Macération.....	6
II.3. Purification des extraits.....	6
II.4. Analyse quantitative des composés phénoliques.....	7
II.4.1. Principe de la méthode.....	7
II.4.2. Procédure expérimentale.....	8
III. Effet inhibiteurs des extraits sur les enzymes.....	9
III.1. Inhibition de l' α -amylase.....	9
III.1.1. Principe de la méthode.....	9
III.1.2. Courbe d'étalonnage du maltose.....	9
III.1.3. Cinétique enzymatique de l' α -amylase.....	9
a- Détermination du temps de la réaction.....	9
b- Détermination des paramètres cinétique de l' α -amylase.....	9
III.1.4. Test d'inhibition.....	10
III. 2. Inhibition de l' α -glucosidase.....	10
III.2.1. Principe de la méthode.....	10
III.2.2. Courbe d'étalonnage du glucose.....	10
III.2.3. Cinétique enzymatique de l' α -glycosidase.....	10

a- Détermination du temps de la réaction.....	11
b- Détermination des paramètres cinétique de l' α -glucosidase.....	11
III.2.4. Test d'inhibition.....	12
IV. Résultats et discussions.....	14
IV.1. Extraction et dosage des polyphénols.....	14
IV.2. Effet des extraits sur l' α -amylase.....	17
IV.3. Effets des extraits sur l' α -glucosidase.....	22
V. Conclusion.....	29
VI. Références bibliographiques.....	32

Liste des tableaux

Tableau 1	: Photos et classification des plantes investiguées.....	P 6
Tableau 2	: Rendement d'extraction.....	P14
Tableau 3	: Teneurs en composés phénoliques.....	P16
Tableau 4	: Les différentes constantes cinétiques de l' α -amylase	P20
Tableau 5	: Pourcentage d'inhibition des extraits et de l'acarbose vis-à-vis de l' α -amylase.....	P20
Tableau 6	: Constantes cinétiques de l' α -glucosidase.....	P25
Tableau 7	: Pourcentage d'inhibition des extraits et de l'acarbose vis-à-vis l' α -glucosidase.....	P25

Liste des figures

Figure 1	: Réaction de l'hydrolyse du saccharose.....	P 10
Figure 2	: Méthode enzymatique de dosage de glucose.....	P 15
Figure 3	: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	P 18
Figure 4	: Courbe d'étalonnage du maltose	P 18
Figure 5	: Cinétique de l' α -amylase en fonction du temps.....	P 19
Figure 6	: Courbe de la cinétique de l' α -amylase.	P 19
Figure 7	: Représentation graphique de Linweaver-Burk pour l' α -amylase...	P 23
Figure 8	: Courbe d'étalonnage du glucose.....	P 23
Figure 9	: La cinétique de l' α -glucosidase en fonction du temps.....	P 24
Figure10	: Courbe de la cinétique enzymatique de l' α -glucosidase	P24
Figure11	: Représentation graphique de Linweaver-Burk pour l' α - glucosidase.....	P 24

Liste des abréviations

A0	:	Absorbance en absence d'extraits (témoin)
A1	:	Absorbance en présence de l'extrait
CuSO ₄	:	Sulfate de cuivre
EAG	:	Equivalent acide gallique
EC	:	Enzym comission
H ₃ PM ₀₁₂ O ₄₀	:	Acide phosphomolybdique
H ₃ PW ₁₂ O ₄₀	:	Acide phosphotungstique
K _{cat}	:	Constante catalytique
K _M	:	Constante de Michaelis-Menten
K _{sp}	:	Constante de spécificité
Mo ₈ O ₂₃	:	Molybdène
MS	:	Matière sèche
Na ₂ CO ₃	:	Carbonate de sodium
ND	:	Non déterminé
OMS	:	Organisation mondiale de la santé
pH	:	Potentiel hydrogène
PI	:	Pourcentage d'inhibition
R ²	:	Coefficient de corrélation
UI	:	Unité internationale
V _{max}	:	Vitesse maximale
W ₈ O ₂₃	:	Bleu de tungstène

ملخص

السكري هو خلل أيضي يميزه ارتفاع في معدل الجلوكوز في الدم ، و يعود ذلك لنقص في إفراز هرمون الأنسولين أو خلل في نشاط هذا الأخير .

يعتبر تثبيط انزيمات تفكيك الكربوهيدرات كألفا أميلاز و الألفا غليكوزيداز استراتيجية مهمة في مراقبة معدل السكر (بعد الوجبات) للمرضى المصابين بالنوع الثاني من السكري.

تحتوي النباتات على مركبات كيميائية ذات قدرة تثبيطية لهذين الإنزيمين و لذلك بالإمكان استخدامها في علاج السكري. في هذا السياق، ثلاث نباتات تم اختبارها بهدف تقييم نشاطها ضد سكري. من ناحية أخرى تم استخدام الأكربوز كمثبط مرجعي.

لقد أظهرت النباتات نشاطا تثبيطيا للألفا أميلاز ، أغلب المستخلصات كان لها نشاط تثبيطيا عاليا مقارنة بالاكربوز.

فيما يتعلق بالألفا غليكوزيداز ، فقد اظهرت المستخلصات الفينولية نشاطا تثبيطيا بنسب متفاوتة. مستخلص النبتتين من نوع salsola هما الأكثر نشاطا.

انطلاقا من هذه النتائج نتوقع أن يكون لمستخلصاتنا قدرة على تثبيط الامتصاصية المعوية للسكريات و ذلك بتثبيط كل من الالفا اميلاز و الالفا غليكوزيداز.

كلمات مفتاحية : السكري ، ألفا اميلاز ، ألفا غليكوزيداز ، الفينولات ، الجل ، بوقريية ، الروقل.

Résumé

Le diabète sucré est un trouble métabolique caractérisé par un taux élevé de glucose sanguin dû à une carence de la sécrétion d'insuline ou de l'action de ce dernier.

L'inhibition des enzymes de l'hydrolyse des carbohydrates telle que l'alpha-amylase et l'alpha-glucosidase, peut être une stratégie importante dans le contrôle du taux de la glycémie post prandial atteints de diabète de type II.

Les plantes contiennent différents constituants chimiques ayant un pouvoir inhibiteur pour ces deux enzymes et donc peuvent être utilisées dans la thérapie de diabète. Dans ce contexte, trois plantes ont été testées dans le but d'évaluer leur activité antidiabétique. En outre, l'acarbose a été utilisé comme inhibiteur de référence.

Les trois plantes montrent une activité inhibitrice vis-à-vis de l' α -amylase. La plupart des extraits ont un pouvoir inhibiteur plus important que celui de l'acarbose.

En ce qui concerne l' α -glucosidase, les extraits phénoliques montrent également un pouvoir d'inhibition avec des taux différents. Les deux plantes du genre *Salsola* sont les plus actives.

Mots clés : diabète, α -amylase, α -glucosidase, polyphénols, *Salsola baryosma*, *Salsola vermiculata*, *Agatophora alopecuroide*.

Abstract

Diabetes mellitus is a metabolic disorder characterized by high blood glucose due to a deficiency in insulin secretion or action of the latter.

Inhibition of the enzymes of the hydrolysis of carbohydrates such as alpha-amylase and alpha-glucosidase, may be an important strategy in controlling the rate of glucose postprandial with type II diabetes.

Plants contain different chemical components having an inhibiting power for these two enzymes and therefore can be used in diabetes therapy. In this context, three plants were tested in order to assess their anti-diabetic activity. In addition, acarbose was used as reference inhibitor.

Three plants show inhibitory activity vis-a-vis of the α -amylase. Most extracts have a greater inhibitory power than acarbose.

Regarding the α -glucosidase, phenolic extracts also show an inhibiting power with different rates. The two plants of the genus *Salsola* are most active.

Key words: diabetes, α -amylase, α -glucosidase, polyphenols, *Salsola baryosma*, *Salsola vermiculata*, *Agatophora alopecuroide*.

I. Introduction générale

Selon des statistiques récentes, on estime que deux tiers des médicaments actuels ont une origine naturelle : obtenus par hémi-synthèse à partir d'un pharmacophore ou par modification des produits naturels, composés issus des biotechnologie, vaccins, composés d'origine végétale, composés microbiologiques ou animale (**Daniel A. Dias et al., 2012**). L'utilisation thérapeutique des extraordinaires vertus de plantes pour le traitement des maladies de l'homme est très ancienne et évolue avec l'histoire de l'humanité.

Actuellement environ 20000 plantes médicinales sont utilisées soit dans l'industrie pharmaceutique et/ou la médecine traditionnelle (**A. Kar, 2007**).

Les substances naturelles et les plantes en particulier représentent une immense source de composés phénoliques (acides phénoliques, flavonoïdes, flavonols, tannins condensés...), l'isolement des bruts, naturels et l'extraction de ces composés à partir d'espèces de plantes utilisées en médecine traditionnelle peuvent être des ressources prometteuse de nouveaux médicaments (**Daniel S. Fabricant et al., 2001**).

Le diabète est une maladie métabolique chronique, endocrinienne, complexe insidieuse et omniprésente qui représente une source majeure de complications de santé à travers le monde (**World Health Organisation, 2005**). Cette maladie est caractérisée par une hyperglycémie qui résulte, d'une déficience absolue ou relative de la sécrétion en insuline (apparaît lorsque les cellules β du pancréas ne produisent pas suffisamment d'insuline), d'action d'insuline (l'organisme n'utilise pas correctement l'insuline qu'il produit), ou les deux anomalies à la fois ; l'une des conséquences de ces anomalies est l'hyperglycémie, qui peut être permanente ou seulement postprandiale, et accompagnée ou non de glycosurie (**Vivian A Fonseca, 2008**).

Le diabète constitue un problème majeur de santé publique et son impact sur les systèmes de santé est très lourd, engendre de multiples problèmes, médicaux, économiques et sociaux. Le nombre de personnes atteintes de diabète ne cesse de croître de façon très alarmante. L'OMS a tiré la sonnette d'alarme par rapport à l'évolution de cette maladie, pour prendre conscience de la gravité de la situation et d'agir avant qu'elle ne prenne des proportions incontrôlables, selon ses statistiques, ce fléau touche plus de 280 millions de personnes dans le monde et pourrait atteindre plus du double d'ici l'horizon 2030 (soit une augmentation de plus de 122 %) (**World Health Organisation, 2016**).

L'Algérie n'est pas épargnée par cette épidémie qui interpelle le corps de la santé pour un redéploiement des moyens tournés vers ces pathologies chroniques non transmissibles. En effet, en Algérie, les études concernant ce fléau social sont encore peu nombreuses malgré qu'elle est classée parmi les pays d'Afrique du nord les plus touchés par cette pathologie (**F. Ouhada, 2012**). Cependant, la maladie continue d'augmenter d'une manière particulièrement accélérée, en particulier dans certaines régions défavorisées du pays. Le nombre des diabétiques est passé d'un million de personnes en 1993, à plus de 2.5 millions en 2007 soit une prévalence de 7.3 % et à plus de 3 millions de personnes en 2011 soit 7,4

% de la population algérienne avec une prévision qui atteindra 8.9 % en 2025 et plus de 9,3 % en 2030 (**F. Ouhada, 2012**). Devant cette situation on note une absence de laboratoires pharmaceutiques et d'associations de malades atteints du diabète pour le dépistage de cette "catastrophe sanitaire", sachant que 10 % de la population algérienne ne sait pas qu'elle est diabétique.

En effet, le diabète se manifeste sous deux principales différentes formes (les autres formes sont beaucoup moins fréquentes), le diabète type 1 qui survient le plus souvent avant l'âge de 20 ans et représente 10 à 15 % des diabètes, et le diabète type 2 qui survient le plus souvent après l'âge de 50 ans et représente 85 à 90 % des diabètes (**Aissa Boudiba et Safia Mimouni-Zerguini, 2008**).

Pour retarder voire prévenir la survenue et ralentir la progression de cette maladie, non seulement plusieurs agents pharmacologiques ont été utilisés mais en plus des mesures hygiéno-diététiques étaient recommandés dans le but d'obtenir un contrôle glycémique fiable et correct. Pour atteindre cet objectif, plusieurs thérapeutiques sont à notre disposition, la diététique, au même titre que l'activité physique et la prise des médicaments (**V.Halkins, 2008**).

Dans le cas d'un diabète de type 2 diagnostiqué, il faut alors opter pour un traitement médicamenteux, par une monothérapie orale, en premier lieu, utilisant de médicaments antidiabétiques actifs par voie orale à action hypoglycémiant c'est les antidiabétiques oraux, qui sont classés selon leur mode d'action en trois principales catégories, les sulfamides hypoglycémiant, les biguanides et les inhibiteurs des α -glucosidases qui diffèrent par leur modes d'action ainsi que la cible physiopathologique (**J. Deruiter, 2003**).

Les inhibiteurs des α -glucosidases, atténuent la glycémie postprandiale par leur action directe comme agent inhibiteur de certaines alpha-glucosidases ou alpha amylases intestinales en ralentissant la digestion des polysaccharides donc retarder la libération et l'absorption du D-glucose, et aboutissent à une baisse de glucose sanguin. Ceci s'est avérée être l'une des meilleures stratégies pour diminuer l'élévation de la glycémie postprandiale chez le diabétique afin d'éviter les complications dégénératives du diabète (**J.A. Nazare, 2009**).

En Algérie, la médecine traditionnelle encore largement utilisée, constitue un patrimoine à conserver. Plusieurs plantes ou mélanges de plantes sont utilisées dans cette région, et nombreuses d'entre elles sont considérées traditionnellement comme antidiabétique. Selon les résultats publiés sur les trois plantes *Salsola Baryosma*, *Salsola vermiculata* et *Agatophora alopecuroide* pratiquement peu de travaux qui s'intéressent à l'effet de leurs extraits sur l'activité de l' α -amylase et α -glucosidase.

C'est dans cette optique que se situe notre travail de mémoire qui s'attèle à l'étude antidiabétique *in vitro* de ces trois plantes poussant à l'état spontané dans la région de Laghouat. Notre plan de recherche s'articule autour de deux axes principaux. Le premier axe porte sur l'étude du contenu en composés phénoliques des différents extraits issus des

trois plantes récoltées durant plusieurs mois. Tandis que, le second axe sera focalisé sur l'examen de l'activité antidiabétique de ces extraits par la mesure *in vitro* de leur pouvoir inhibiteur vis-à-vis de l' α -amylase et α -glucosidase.

V. Conclusion

Etant donné la toxicité et/ou les effets secondaires indésirables des molécules de synthèse ainsi que la résistance de certains germes microbiens face aux médicaments existants, l'utilisation des plantes qui contiennent des composés bioactifs est en progression constante. En effet, compte tenu de leur meilleure biocompatibilité on observe une demande croissante des produits d'origine naturelle.

De ce fait, ce travail avait pour but de caractériser la composition phytochimique des extraits de trois espèces de la famille de *Chenopodiaceae* à savoir *Salsola Baryosma*, *Salsola vermiculata* et *Agatophora alopecuroide* et d'évaluer *in vitro* leurs activités antidiabétiques.

Vu que l'étude bibliographique réalisée sur ces espèces a montré que l'on ne disposait que de peu d'informations de nature chimique et/ou biologique. Pour pallier ce manque d'informations, notre étude s'est focalisée sur les analyses quantitatives de ces extraits en composés phénoliques et les évaluations de leurs activités inhibitrices vis-à-vis de l' α -amylase et de l' α -glucosidase.

La teneur en phénols totaux, est variable entre les différents extraits des plantes investiguées. La teneur la plus élevée des polyphénols est constatée dans l'extrait butanolique d'*Agatophora alopecuroide* récolée en Octobre ($15,98 \pm 0,22$ mg GAE/g). Tandis que, la teneur la plus faible a été enregistrée pour l'extrait butanolique de *Salsola vermiculata* récolée en décembre avec une teneur de $0,61 \pm 0,04$ mg GAE/g. On peut conclure également que les extraits d'*Agatophora alopecuroide* étaient significativement riches en polyphénols par rapport aux autres extraits qui représentent des teneurs moyennement faibles. Ces résultats importants reflètent les rendements élevés et le contenu variable de chaque plante en polyphénols.

L'étude de l'effet antidiabétique *in vitro* des extraits phénoliques des plantes investiguées sur les deux enzymes α -amylase et α -glucosidase, montrent que la majorité de ces extraits de plantes présentent des effets inhibiteurs très importants. Les valeurs obtenues sont comparables à celle de l'inhibiteur de référence "acarbose", dont l'extrait butanolique d'*A. alopecuroide* récolée en Juin et l'extrait d'acétate d'éthyle de *S. vermiculata* récolée en Octobre se comportent comme les inhibiteurs les plus efficaces avec des valeurs de pourcentage d'inhibition supérieur à 60 %.

Toutefois ; tous ces résultats sont très intéressants mais insuffisants, car le fractionnement des extraits en leurs composés phénoliques individuels est nécessaire afin de caractériser les structures des substances phénoliques responsables de l'inhibition de ces enzymes et par conséquent savoir leurs effets sur l'action des enzymes en question.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats obtenu *in vitro* ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substance de source naturelle biologiquement active capable de traiter le diabète de type II. Des essais complémentaires seront donc nécessaires pour

caractériser les molécules responsables à ces activités, afin qu'elles puissent être utilisées pour traiter les effets insouhaitables des inhibiteurs de synthèse.

VI. Références bibliographiques

- ❖ Aissa Boudiba et Safia Mimouni-Zerguini, Améliorer la prévention et les soins du diabète en Algérie, *DiabetesVoice*, Volume 53, Numéro 2, Juin 2008.
- ❖ Akowuah G.A., Z. Ismail, I. Norhayati, A. Sadikun. The Effects Of Different Extraction Solvents Of Varying Polarities On Polyphenols Of *Orthosiphon Stamineus* And Evaluation Of The Free Radical-Scavenging Activity. *Food Chemistry*; 93 : 311–317. 2005.
- ❖ A. Kar, H.S Parmar, Antidiabetic potentiel of *Citrus sinensis* and *Punica granatum* peel extracts in alloxan treated male mice, *BioFactors*, 2007.
- ❖ Bahorun. T ; Substances naturelles actives: La flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle ; AMAS. 83-94 ; 1997.
- ❖ Boath, D. Grussu, D. Stewart and G. J. McDougall Berry, Polyphenols Inhibit Digestive Enzymes: a Source of Potential Health Benefits, *Food Dig.* 3 : 1–7 ; 2012.
- ❖ Chemoenzymatic, Asymmetric Synthesis of Medically Important Compounds in Biocatalysis Research Progress (F. H. Romano et A. Russo ; éd), Nova Science
- ❖ Daniel A. Dias, Sylvia Urban and Ute Roessner , A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery, *Metabolites* 2012, 2, 303-336.
- ❖ Daniel S. Fabricant and Norman R. Farnsworth, The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery, *Environ Health Perspect* 109(suppl 1):69–75 (2001).
- ❖ D.S. Fabricant and H R. Farnsworth, The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ Health Prespect*, 2001.
- ❖ E. Żyłańczyk-Duda et P. Kafarski, Application of Whole-cell Biocatalysis in ; 2008.
- ❖ F. Ouhada, Diabète en Algérie, *Santé-Mag-* N° 04 Mars 2012.
- ❖ Gray ; éd), 2eme édition, Vol. 20, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, P : 270I Kazeem, J. V. Ogunbiyi and A. Ashafa, In vitro Studies on the Inhibition of α -Amylase and α -Glucosidase by Leaf Extracts of *Picralima nitida* (Stapf), *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12 (5) : 719-725 ; 2013.
- ❖ H. Bisswanger, *Enzyme Kinetics; principales ans methods*, Willey-VCH ; 2002.
- ❖ H. Otsuka, Purification by Solvent Extraction Using Partition Coefficient in ; 2006.
- ❖ human salivary α -amylase, *Biochemical and Biophysical Research Communications* ; 1982.
- ❖ J. Bruneton, *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes medicinales*, 3eme edition, Tec et Doc editions ; 1999.
- ❖ J. Deruiter, overview of the antidiabetic agents, *Endocrine Pharmacotherapy Module*, Spring, 2003.
- ❖ J. Macheix, A. Fleuriet et C. Jay-Allemand. Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires. Presses polytechnique et universitaires romandes ; 2005.

- ❖ J. Thuilier, dictionnaire des médicaments, volume III, Ed. connaissance du monde ; 1994.
- ❖ L. Gayla, J. Favarel, F. Davaux et J. Moulin, methodologied'estimation des composés phénoliques, Journée technique cinquantenaire, France ; 1998.
- ❖ L. Kandra, G. Gyémánt, A. Zajàcz, et G. Batta, Inhibitory effects of tannin in ; 2004.
- ❖ M. Jemmali, R. Kabana, dosage rapide oxygraphique du glucose en présence de glucose-oxydase dans les milieux complexes, Annales de biologie animale, biochimie, biophysique, 12 (2) : 329-334 ; 1972.
- ❖ M. Perez, caracterisation de composés phenoliques des extraits de ramilles du bouleau jaune : étude de leur capacité antioxydante, thèse doctorat, université laval-Québec ; 2008.
- ❖ Methods in Biotechnology in Natural Products Isolation,. (S. D. Sarker, Z. Latif, et A. I. ; 2011.
- ❖ R. Subramanian, M. Z. Asmawi and A. Sadikun, In vitro α -glucosidase and α -amylase enzyme inhibitory effects of Andrographis paniculata extract and andrographolide In vitro α -glucosidase and α -amylase enzyme inhibitory effects of Andrographis paniculata extract and andrographolide, Vol. 55 No. 2 : 391–398 ; 2008.
- ❖ Sabeena Farvin K.H., C. Jacobsen , Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast. Food Chemistry. 138: 1670–1681 ; 2013.
- ❖ S. Dygert, L.H. Li, D. Florida and J.A. Thoma, Determination of reducing sugar whith improved precision, Analytical Biochemistry, Vol 13, No 3, 1965.
- ❖ Stephen Matthew Phipps, Maged H. M. Sharaf, Z and Veronika Butterweck, Assessing Antioxidant Activity In Botanicals And Other Dietary Supplements. Pharmacopeial Forum. 33(4): 810-814 ; 2007.
- ❖ T. Hayakawa, A. Noda, T. Kondo and N. Okumura, effects of acarbose, an α -glucosidase inhibitor (bay g 5421), on orally loaded glucose, maltose and sucrose and on blood glucose control in non-insulin-dependent diabetics, Nagoya J. Med. Sci. 47 : 35 – 41 ; 1984.
- ❖ T. Ngo et H. Lenhoff, A sensitive and versatile chromogenic assay for peroxidaseled rections, Analytical Biochemistry, 105 (1) : 389-397 ; 1980.
- ❖ V. Desseaux, R. Koukiekolo, Y. Moreau, M. Santimone and G. Marchis-Mouren, Mechanism of porcine pancreatic α -amylase: inhibition of amylose and maltopentaose hydrolysis by various inhibitors, Biologia, Bratislava, 57 (11) : 163-170 ; 2002.
- ❖ V.Halkins, a practical guide to integrated type 2 diabetes care, 2008.
- ❖ Vivian A Fonseca, Defining and characterising the progression of type 2 diabetes, Vol., 319 : 1265–1271 ; 2008.
- ❖ World Health Organization, Preventing chronic diseases : a vital investment : WHO global report, 2005.
- ❖ World Health Organization, Global report on diabetes, 2016.

- ❖ S. Dygert, L.H. Li, D. Florida and J.A. Thoma, Determination of reducing sugar with improved precision, *Analytical Biochemistry*, Vol 13, No 3, 1965.