

PALOMA MICHELLE DE SALES

**ESTUDO BIOMONITORADO DO EPICARPO DO
FRUTO DE *Pouteria torta* (Mart.) Raldk POR
ENSAIO DE ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA
ALFA-AMILASE**

BRASÍLIA-DF

2012

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

PALOMA MICHELLE DE SALES

**ESTUDO BIOMONITORADO DO EPICARPO DO
FRUTO DE *Pouteria torta* (Mart.) Raldk POR
ENSAIO DE ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA
ALFA-AMILASE**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Dâmaris Silveira

BRASÍLIA-DF

2012

*Dedico este trabalho aos meus queridos pais,
João Bosco e Joana D'arc, pelo inigualável
amor, apoio, incentivo e compreensão.*

*Aos meus amados irmãos, Patrick e Patrese, pela
paciência, carinho e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me acompanhar durante todas as etapas da minha vida.

Agradeço à professora Dâmaris Silveira, minha orientadora, pelo grande incentivo, apoio e oportunidade de caminhar nesse novo universo. Meus agradecimentos pela sua orientação, ensinamentos, auxílio em meu amadurecimento profissional e grande amizade, durante todos esses anos! Minha eterna admiração e gratidão!

Agradeço à professora Inês Sabioni Resck, pela colaboração, ensinamentos, paciência, atenção e grande ajuda no que se refere aos ensaios espectrométricos.

Agradeço a colaboração indispensável da professora Pérola com sua experiência em ensaios enzimáticos que foi fundamental na construção deste trabalho e sua ajuda em todos os momentos de necessidade.

Agradeço à professora Yris Fonseca pela realização das análises cromatográficas.

Agradeço ao professor Luiz Alberto Simeoni pelos ensinamentos, apoio, amizade e colaboração.

Ao meu querido Júlio, pelo companheirismo, carinho, compreensão e auxílio constante.

Às minhas eternas amigas Ivelone e Cíntia, pela grande colaboração, apoio, motivação, carinho e valiosos ensinamentos.

À aluna de iniciação científica Mariana Dartora pela ajuda, amizade e descontração.

Aos amigos Paula, Sílvia, Silas, Pedro, Juliana, Mirta, Igor, Andressa, Stephanie pela colaboração, companheirismo e amizade durante toda esta trajetória.

Enfim, a todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

PALOMA MICHELLE DE SALES

ESTUDO BIOMONITORADO DO EPICARPO DO FRUTO DE
Pouteria torta (Mart.) Raldk POR ENSAIO DE ATIVIDADE DE
INIBIÇÃO DA ALFA-AMILASE

Tese apresentada como requisito parcial para a
obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde
pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde da Universidade de Brasília

Aprovada em 14 de fevereiro de 2012.

BANCA EXAMINADORA

_____ (presidente)
Profa. Dra. Dâmaris Silveira
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UnB)

Prof. Dr. Ely Eduardo Saranz Camargo
Centro Universitário de Votuporanga (UNIFEV)

Profa. Dra. Inês Sabioni Resck
Instituto de Química da Universidade de Brasília (UnB)

Profa. Dra. Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UnB)

Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UnB)

Profa. Dra. Yris Maria Fonseca
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UnB)

RESUMO

A utilização de espécies vegetais com fins terapêuticos, pelo homem, remonta a pré-história. A Organização Mundial de Saúde – OMS estima que, em torno de 80% da população mundial utilizam plantas medicinais para suprir as necessidades de assistência primária à saúde. Entretanto, apesar do forte crescimento no consumo desse tipo de medicamento nas últimas décadas, poucos são os estudos referentes à qualidade, eficácia e segurança. Alterações no metabolismo de carboidratos podem estar associadas a doenças como o *diabetes mellitus*, obesidade, e doenças bucais, representando hoje um importante problema de saúde individual e populacional, em decorrência do aumento global de suas incidências. Os inibidores da enzima α -amilase, responsáveis por inibirem a hidrólise de carboidratos no trato digestivo diminuindo a absorção de glicose no trato digestivo, constituem uma das opções terapêuticas utilizadas para controle do *diabetes mellitus* tipo 2. Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo realizar um estudo biomonitorado do extrato hidroalcoólico do epicarpo do fruto de *Pouteria torta* (Mart.) Raldk, espécie genuinamente brasileira, comum no bioma do cerrado do Distrito Federal, por ensaio de atividade de inibição da enzima α -amilase. A estratégia de estudo utilizada permitiu a obtenção e caracterização de duas frações com capacidade de inibição da enzima α -amilase de forma comparável ao dos controles utilizados, quais sejam, fração insolúvel (FI₂) e fração acetona (FAC). A fração FAC apresentou potencial de inibição maior que FI₂ com valor de IC₅₀ igual a 9 μ g/mL. No entanto, o fracionamento subsequente de FAC resultou no aumento da concentração da subfração necessária para causar a mesma porcentagem de inibição (IC₅₀ = 22,1 μ g/mL), sugerindo que a mistura dos constituintes presentes na FAC seja responsável por tal atividade. Da fração FAC foi possível identificar a presença de epicatequina; enquanto na fração FI₂ foi identificada mistura sacarose, frutose e glicose. Em modelo de toxicidade utilizando larvas de *Artemia salina*, o extrato bruto e frações hexânica, acetato de etila e aquosa não apresentaram toxicidade. Os teores de polifenóis e flavonoides e a capacidade antioxidante do extrato bruto e frações hexânica, acetato de etila e aquosa também foram avaliados e parece não haver correlação entre as frações com alta concentração de polifenóis e flavonoides e capacidade antioxidante e a atividade de inibição da α -amilase. O estudo efetuado sugeriu o potencial terapêutico do epicarpo do fruto de *Pouteria torta*.

Palavras-chave: *Pouteria torta*; Sapotaceae; inibição da α -amilase; *diabetes mellitus*; fruto.

ABSTRACT

The utilization of vegetal species with therapeutical purpose, by humankind, dates from the prehistoric period. According to World Health Organization (WHO), 80% of the worldwide population use herbal medicines to supply their necessities of primary medical assistance. Meanwhile, despite the strong increase in the consumption of this type of medicine in the last decades, there are only a few studies concerning to quality, efficacy and safety. Disorders of carbohydrate uptake may cause severe health problems such as diabetes, obesity, or oral diseases, all of which threaten an increasing population. α -Amylase inhibitors delay the digestion of carbohydrates, reducing the rate of glucose absorption and are one of the options used for therapeutic control of *diabetes mellitus*. Therefore, an assay-guided fractionation study of epicarp crude extract of *Pouteria torta* (Mart.) Raldek was performed by inhibitory activity of α -amylase. The study strategy allowed isolation and identification of two fractions with capacity to inhibit α -amylase in a comparable way of the controls used: insoluble fraction (FI₂) and acetone fraction (FAC). Acetone fraction shows very high inhibitory activity with IC₅₀ of 9 μ g/mL, when compared with FI₂. However, subsequent fractionation led to increase of the concentration to cause the same inhibition percentage (IC₅₀ of 22.1 μ g/mL). From FAC was identified the compound epicatechin; while in FI₂ were isolated and identified mixture sucrose, glucose and fructose. The crude extract and hexane, ethyl acetate and aqueous fractions showed no toxicity on *Artemia salina* brine shrimp assay. Total phenolic and flavonoid contents and antioxidant capacity were also evaluated and seems to be no correlation among fractions with high phenolic and flavonoids content and antioxidant capacity and α -amylase inhibitory activity. The study carried out suggested the therapeutic potential of fruit epicarp from *Pouteria torta*.

Key words: *Pouteria torta*; Sapotaceae; α -amylase inhibitor; *diabetes mellitus*; fruit.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura tridimensional da α -amilase pancreática porcina (APP).....	23
Figura 2: Esqueleto básico dos flavonoides	27
Figura 3: Flavonoides que possuem atividade inibitória sobre α -amilase.	38
Figura 4: Taninos que apresentam atividade inibitória sobre α -amilase.....	45
Figura 5: Derivados do ácido cinâmico que apresentam atividade inibitória sobre α -amilase.....	58
Figura 6: Terpenos que apresentam atividade inibitória sobre α -amilase.....	60
Figura 7: Atividade redutora do ácido ascórbico no método do fosfomolibdênio.....	77
Figura 8: Atividade redutora do BHT no método do fosfomolibdênio.....	78
Figura 9: Atividade redutora da quercetina no método do fosfomolibdênio..	79
Figura 10: Avaliação do perfil de inibição sobre α -amilase por <i>Triticum aestivum</i>	99
Figura 11: Avaliação do perfil de inibição sobre α -amilase por acarbose	100
Figura 12: Comparação entre a curva dose - resposta de inibição da α -amilase por extrato hidroalcoólico bruto do epicarpo do fruto de <i>Pouteria torta</i> em água e etanol: DMSO (3:1) como solvente.....	101
Figura 13: Teste de inibição de α -amilase com frações hexânica (FH), aquosa (FA) e acetato de etila (FAET).....	102
Figura 14: Teste de inibição sobre α -amilase das frações metanólica (FM), acetona (FAC) e insolúvel (FI ₂).....	103
Figura 15: Teste de inibição sobre α -amilase das frações sobrenadante (FS) e precipitado (FP).	105
Figura 16: Espectro de RMN de ¹ H de PTE01 (300MHz, D ₂ O).....	111
Figura 17: Espectro de RMN de ¹ H de PTE01 – Expansão da região entre δ 5,5 e δ 2,8 (300MHz, D ₂ O)	111
Figura 18: Espectro de RMN de ¹³ C de PTE01 (75MHz, D ₂ O)	112
Figura 19: Espectro de RMN de ¹³ C de FIA1 (75MHz, CDCl ₃).....	113
Figura 20: Espectro de RMN de ¹³ C de FIA1 – Expansão da região entre δ 175,0 e δ 168,0 (75MHz, CDCl ₃).....	114

Figura 21: Espectro de RMN de ^{13}C de FIA1 – Expansão da região entre $\delta 80,2$ e $\delta 19,8$ (75MHz, CDCl_3).....	114
Figura 22: Espectro de RMN de ^1H de PTE02 (300MHz, D_2O).....	116
Figura 23: Espectro de RMN de ^1H de PTE02 – Expansão da região entre $\delta 5,60$ e $\delta 2,60$ (300MHz, D_2O)	116
Figura 24: Espectro de RMN de ^{13}C de PTE02 (75MHz, D_2O)	117
Figura 25: Cromatograma de PTE02 em CLAE-IR da mistura frutose, glicose e sacarose em comparação ao padrão analítico	118
Figura 26: Espectro de RMN de ^1H de FP (300MHz, CD_3OD).....	119
Figura 27: Espectro de RMN de ^1H de FP – Expansão da região entre $\delta 5,2$ e $\delta 3,1$ ppm (300MHz, CD_3OD).....	120
Figura 28: Espectro de RMN de ^1H de FP – Expansão da região entre $\delta 7,0$ e $\delta 5,0$ ppm (300MHz, CD_3OD).....	120
Figura 29: Espectro de RMN de ^{13}C de FP (75MHz, CD_3OD).....	121
Figura 30: Espectro de RMN de ^{13}C de FP – Expansão da região entre $\delta 106,0$ e $\delta 62,0$ ppm (75MHz CD_3OD)	121
Figura 31: Cromatograma de FP em CLAE-IR da mistura frutose, glicose e sacarose em comparação ao padrão analítico.....	123
Figura 32: Cromatograma da fração FP em 280 nm e espectro no ultravioleta referente ao pico no $t_{\text{R}}= 14,1$ min em comparação ao padrão analítico catequina.	124
Figura 33: Cromatograma de FP em 354 nm e espectro no ultravioleta do composto isoquercetrina referente ao pico $t_{\text{R}}= 28,8$ em comparação ao padrão analítico.....	124
Figura 34: Espectro de RMN de ^1H de FS (300MHz, CD_3OD).....	125
Figura 35: Espectro de RMN de ^1H de FS – Expansão da região entre $\delta 7,52$ e $\delta 5,04$ (300MHz, CD_3OD).....	126
Figura 36: Espectro de RMN de ^1H de FS – Expansão da região entre $\delta 4,52$ e $\delta 3,06$ (300MHz, CD_3OD).....	126
Figura 37: Espectro de RMN de ^{13}C de FS (75MHz, CD_3OD).....	127
Figura 38: Espectro de RMN de ^{13}C de FS – Expansão da região entre $\delta 160,0$ e $\delta 112,0$ (75MHz, CD_3OD).....	127
Figura 39: Espectro de RMN de ^{13}C de FS – Expansão da região entre $\delta 106,0$ e $\delta 62,0$ (75MHz, CD_3OD).....	128

Figura 40: Cromatograma de FS em 280 nm e espectro no ultravioleta do composto epicatequina referente ao pico $t_R = 18,6$ em comparação ao padrão analítico.	129
Figura 41: Cromatograma de FAET em 280 nm e espectro no ultravioleta dos compostos catequina ($t_R = 14,1$ min) e epicatequina ($t_R = 18,6$ min) em comparação aos padrões analíticos.	130
Figura 42: Cromatograma de FAET em 354 nm e espectro no ultravioleta dos compostos quercetina ($t_R = 46,8$ min) e isoquercetrina ($t_R = 28,8$ min) em comparação aos padrões analíticos.	130
Figura 43: Espectro na região do infravermelho de FAET1 (KBr, cm^{-1})	131
Figura 44: Espectro de RMN de ^1H de FAET1 (300 MHz, CDCl_3)	132
Figura 45: Espectro de RMN de ^{13}C -APT de FAET1 (75 MHz, CDCl_3)	132
Figura 46: Espectro de RMN de ^1H de FAET1 – Expansão da região entre $\delta 4,3$ e $\delta 5,3$ (300 MHz, CDCl_3)	133
Figura 47: Espectro de RMN de ^1H de FAET1 – Expansão da região entre $\delta 4,2$ e $\delta 3,1$ (300 MHz, CDCl_3)	134
Figura 48: Espectro de RMN de ^1H de FAET1 – Expansão da região entre $\delta 2,4$ e $\delta 1,3$ (300MHz, CDCl_3)	134
Figura 49: Espectro de RMN de ^1H de FAET1 – Expansão da região entre $\delta 1,29$ e $\delta 0,75$ (300MHz, CDCl_3)	135
Figura 50: Espectro de RMN de ^{13}C -APT de FAET1– Expansão da região entre $\delta 171,0$ e $\delta 74,0$ (75MHz, CDCl_3)	136
Figura 51: Espectro de RMN de ^{13}C -APT de FAET1– Expansão da região entre $\delta 60,0$ e $\delta 14,0$ (75MHz, CDCl_3)	136
Figura 52: Cromatograma de FAET3 em 280 nm e espectro no ultravioleta dos compostos catequina e epicatequina referentes aos picos $t_R = 14,1$ min e $t_R = 18,6$ min, respectivamente, em comparação aos padrões analíticos.	139
Figura 53: Cromatograma de FAET3 em 354 nm e espectro no ultravioleta dos compostos quercetina ($t_R = 46,8$ min) e isoquercetrina ($t_R = 28,8$ min) em comparação aos padrões analíticos.	140
Figura 54: Espectro de RMN de ^1H de FH1 – Expansão da região entre $\delta 5,2$ e $\delta 1,7$ (300 MHz, CDCl_3)	141
Figura 55: Espectro de RMN de ^1H de FH1 – Expansão da região entre $\delta 1,66$ e $\delta 0,80$ (300 MHz, CDCl_3)	142

Figura 56: Espectro de RMN de ^{13}C de FH1– Expansão da região entre $\delta 172,0$ e $\delta 74,0$ (75MHz, CDCl_3).....	142
Figura 57: Espectro de RMN de ^{13}C de FH1– Expansão da região entre $\delta 58,0$ e $\delta 15,0$ (75MHz, CDCl_3).....	143
Figura 58: Comparação entre a capacidade inibitória de α -amilase (concentração da amostra 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e o teor de flavonoides ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de amostra) das frações FH, FAET e FA obtidas do extrato bruto do epicarpo do fruto de <i>P. torta</i>	150
Figura 59: Comparação entre a capacidade inibitória de α -amilase (concentração da amostra 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e o teor de polifenóis ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de amostra) das frações FH, FAET e FA obtidas do extrato bruto do epicarpo do fruto de <i>P. torta</i>	150

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Compostos com capacidade de inibição da α -amilase humana.....	30
Tabela 2: Cromatografia por exclusão em Sephadex LH-20 da fração insolúvel (FI ₂) da fração aquosa do extrato hidroalcoólico bruto do epicarpo do fruto de <i>Pouteria torta</i> – primeira estratégia	91
Tabela 3: Cromatografia por exclusão em Sephadex LH-20 da fração insolúvel (FI ₂) da fração aquosa do extrato hidroalcoólico bruto do epicarpo do fruto de <i>Pouteria torta</i> – segunda estratégia.....	92
Tabela 4: Cromatografia por exclusão em Sephadex LH-20 da fração acetona (FAC) da fração aquosa do extrato hidroalcoólico bruto do epicarpo do fruto de <i>Pouteria torta</i> .	93
Tabela 5: Cromatografia por exclusão em Sephadex LH-20 da fração acetato de etila (FAET) do extrato hidroalcoólico bruto do epicarpo do fruto de <i>Pouteria torta</i>	96
Tabela 6: Cromatografia por exclusão em Sephadex LH-20 da fração metanólica (FM) do extrato hidroalcoólico bruto do epicarpo do fruto de <i>Pouteria torta</i>	97
Tabela 7: Valores de IC50 das frações FM, FAC e FI ₂	104
Tabela 8: Equivalência do extrato bruto e frações do epicarpo do fruto de <i>Pouteria torta</i> em relação à quercetina, ácido ascórbico e BHT	106
Tabela 9: Avaliação citotóxica às larvas de <i>Artemia salina</i>	108
Tabela 10: Teores de polifenóis e flavonoides presentes no extrato bruto e frações do epicarpo do fruto de <i>Pouteria torta</i>	110
Tabela 11: Deslocamentos químicos de PTE01 em RMN de ¹³ C (δ , 75MHz, D ₂ O) em comparação com os dados da literatura relatados para sacarose	112
Tabela 12: Comparação dos dados de RMN de ¹³ C de FIA1 (50 MHz, CDCl ₃) e aqueles descritos para o octaacetato da sacarose (75 MHz, CD ₃ OD).	115
Tabela 13: Comparação dos dados de RMN de ¹³ C de FP (75MHz, CD ₃ OD) e aqueles descritos na literatura para sacarose, glicose e frutose	122
Tabela 14: Deslocamentos químicos de FAET1 em RMN de ¹³ C (δ , CDCl ₃ , 75MHz) em comparação com os dados da literatura (δ , CDCl ₃ , 75MHz).....	137
Tabela 15: Deslocamentos químicos de FH1 em RMN de ¹³ C (δ , CDCl ₃ , 75MHz) em comparação com os dados da literatura (δ , CDCl ₃ , 75MHz).	143

LISTA DE ESQUEMAS

- Esquema 1:** Obtenção do extrato hidroacoólico bruto (EHB) dos epicarpos frescos do fruto de *Pouteria torta* 88
- Esquema 2:** Partição biomonitorada do extrato hidroacoólico bruto do epicarpo do fruto de *Pouteria torta* (EHB) 89
- Esquema 3:** Elaboração e biomonitoramento da fração aquosa (FA) quanto à atividade de inibição da α -amilase 90
- Esquema 4:** Elaboração da fração hexânica (FH) do extrato hidroalcoólico bruto do epicarpo do fruto de *Pouteria torta* 95
- Esquema 5:** Reação do ácido gálico com molibdênio presente no reagente de Folin-Ciocalteu 109
- Esquema 6:** Formação do complexo flavonóide-Al, em solução metanólica de cloreto de alumínio 109
- Esquema 7:** Fracionamento químico do extrato hidroalcoólico bruto do epicarpo do fruto de *Pouteria torta* 151

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	micrograma
AcO	grupo acetila
APT	Approach Proton Test
BHT	2,6-di- <i>tert</i> -butil-4-metilfenol
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CD₃OD	metanol deuterado
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa
DAD	Detector de arranjo de diodos
DL₅₀	dose letal a 50% da população ou dose letal mediana
DM2	<i>diabetes mellitus</i> tipo 2
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNS	Ácido 3,5 – dinitrosalicílico
EHB	Extrato hidroalcoólico bruto
FA	Fração aquosa
FAC	Fração acetona
FAET	Fração acetato de etila
FH	Fração hexânica
FI₂	Fração insolúvel
FM	Fração metanólica
FP	Fração precipitada
FS	Fração sobrenadante
Gal	galactose
Gli	glicose
IC₅₀	Concentração capaz de inibir 50% a atividade máxima
IR	índice de refração
J	Constante de acoplamento de ¹ H
mg	miligrama
mL	mililitro
nm	nanômetro
NP	Difenilboriloxietanolamina
OMS	Organização Mundial de Saúde
PEG	Polietilenoglicol
ppm	parte por milhão
Ramn	ramnose
f_R	fator de retenção
RMN de ¹³C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN de ¹H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
TMS	Tetrametilsilano
t_R	Tempo de retenção
UI	Unidade internacional
Xil	xilose
δ	Deslocamento químico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1. Enzimas α -amilase.....	21
2.1.1. Inibidores não protéicos.....	24
2.2. Produtos naturais com capacidade de inibição da α -amilase.....	25
2.3. Constituintes químicos e atividades biológicas de frutos da família Sapotaceae	62
3. JUSTIFICATIVA.....	69
4. OBJETIVO.....	69
4.1. Objetivos específicos.....	69
5. MATERIAIS E MÉTODOS	70
5.1. Reação de acetilação.....	70
5.2. Cromatografia em camada delgada	70
5.3. Reveladores	71
5.4. Cromatografia em coluna	72
5.5. Análises espectrométricas.....	74
5.6. Ensaio biológico	75
5.6.1. Atividade citotóxica.....	75
5.6.2. Atividade antioxidante.....	76
5.6.3. Atividade de inibição enzimática.....	80
5.6.4. Quantificação de fenólicos totais.....	84
5.6.5. Quantificação de flavonoides	85
5.7. Estudo biomonitorado do epicarpo do frutos maduros de <i>Pouteria torta</i> (Mart.) Radlk	86
5.7.1. Descrição botânica.....	86
5.7.2. Obtenção do material botânico	87
5.7.3. Obtenção do extrato bruto	87
5.7.4. Monitoramento do extrato hidroalcoólico bruto (EHB)	88
5.7.5. Elaboração e biomonitoramento da fração aquosa (FA).....	89
5.7.6. Elaboração da Fração insolúvel (FI ₂).....	90
5.7.7. Elaboração da Fração acetona (FAC)	92
5.7.8. Fitoquímica das frações hexânica (FH), acetato de etila (FAET) e metanólica (FM)	94

6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	98
6.1.	Biomonitoramento do extrato hidroalcoólico bruto e frações do epicarpo do fruto de <i>Pouteria torta</i> por ensaio de inibição da α -amilase.	98
6.1.1.	Avaliação do perfil de inibição enzimática do <i>Triticum aestivum</i> (semente de trigo) e acarbose	98
6.1.2.	Avaliação da atividade de inibição sobre α -amilase pelo extrato hidroalcoólico bruto (EHB)	100
6.1.3.	Avaliação da atividade de inibição sobre α -amilase das frações obtidas por partição líquido-líquido do extrato hidroalcoólico bruto (EHB)	101
6.1.3.1.	Curva dose - resposta da atividade de inibição sobre α -amilase da fração aquosa (FA)	102
6.1.3.2.	Avaliação da atividade de inibição sobre α -amilase das frações obtidas a partir da fração aquosa (FA)	103
6.1.4.	Avaliação da atividade de inibição sobre α -amilase das frações obtidas a partir da fração acetona (FAC)	105
6.2.	Avaliação da atividade antioxidante total através de ensaio da redução do complexo de fosfomolibdênio	106
6.3.	Atividade citotóxica.....	107
6.4.	Quantificação de polifenóis e flavonoides	108
6.5.	Estudo químico dos extratos e frações do epicarpo do fruto de <i>Pouteria torta</i>	110
6.5.1.	Constituintes químicos presentes na fração insolúvel (FI ₂)	110
6.5.1.1.	Sacarose (PTE01).....	110
6.5.1.2.	Mistura de açúcares (PTE02)	115
6.5.2.	Constituintes químicos presentes na fração acetona (FAC).....	118
6.5.2.1.	Mistura de açúcares (FP).....	119
6.5.2.2.	Mistura de epicatequina (16b) e derivados de catequina (FS).....	125
6.5.3.	Identificação das substâncias presentes na fração acetato de etila (FAET)	129
6.5.3.1.	Lupeol e acetato de β -amirina (FAET1).....	131
6.5.3.2.	Derivados de catequina e epicatequina (FAET2)	138
6.5.3.3.	Mistura de compostos fenólicos (FAET3)	138
6.5.4.	Identificação das substâncias presentes na fração hexânica do extrato hidroalcoólico bruto	140
6.5.4.1.	Acetato de β -amirina (FH1)	140
6.5.5.	Identificação das substâncias presentes na fração metanólica (FM).....	144
7.	CONCLUSÕES.....	152
8.	REFERÊNCIAS	154
	APÊNDICE	163

1. INTRODUÇÃO

O emprego de plantas medicinais na cura ou alívio de enfermidades é uma prática tão antiga quanto à própria humanidade. As primeiras descrições sobre plantas medicinais feitas pelo homem remontam às escrituras sagradas e ao papiro de Ebers, que descreveu um número significativo de doenças e os medicamentos de origem vegetal ou animal empregados no tratamento das mesmas (1).

Atualmente, os estudos de plantas medicinais no Brasil chamam a atenção de equipes multidisciplinares formadas por botânicos, biólogos, bioquímicos, farmacêuticos, médicos, laboratórios químicos e farmacológicos, centros de pesquisa, órgãos governamentais, indústrias farmacêuticas e empresas que comercializam plantas nativas. Esse interesse é fruto do incentivo dado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) após reunião em 23 de maio de 1978, quando reconheceu a importância das plantas medicinais e das preparações galênicas na cura de doenças, recomendando a difusão, em nível mundial, dos conhecimentos necessários para o uso das plantas medicinais (2).

Dentre as recentes estratégias utilizadas para o isolamento e identificação de substâncias com potencial terapêutico, a pesquisa por substâncias presentes em extratos de planta se destaca como uma das mais importantes. O estudo biomonitorado enfatiza o conhecimento da estrutura dos constituintes químicos de uma planta, com ênfase às substâncias com atividade biológica ou farmacológica e não somente com foco central ao isolamento e determinação estrutural, como na fitoquímica clássica (3).

Fármacos que inibam uma enzima chave em um determinado processo metabólico de forma que sua ação seja a mais seletiva possível e com menores efeitos indesejáveis, têm sido alvo das pesquisas nas áreas de medicamentos. Assim, acetilcolinesterase, tirosinase, α -amilase e α -glicosidase são algumas enzimas alvo da busca de novos inibidores a serem utilizados na terapêutica.

Uma das estratégias mais utilizadas nessa busca são os levantamentos (*screenings*) de derivados de origem natural. Dessa forma, um levantamento identificou a presença de substâncias de origem vegetal, em várias espécies de plantas, com

capacidade de promover a inibição enzimática, como o que ocorre com a huperzina A, substância de origem vegetal extraída da *Huperzia serrata* que mostrou atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase similar ou superior a fármacos utilizados para tratamento da doença de Alzheimer (4).

Selin-4(14),7(11)-dien-8-ona, isolada da espécie *Atractylodis rhizoma Alba* apresentou a capacidade de interferir na síntese de melanina por meio da redução da atividade da enzima tirosinase em cultura de melanócitos, contribuindo para os efeitos de clareamento cutâneo (5). O mesmo padrão de atividade foi verificado com a substância artocarpanona, isolada *Artocarpus heterophyllus*, planta de origem asiática (6). Além disso, o extrato aquoso da *Artocarpus heterophyllus* apresentou atividade inibitória da enzima α -amilase, *in vitro* (7). As respectivas substâncias isoladas são exemplos de candidatos a novos produtos cosméticos destinados ao tratamento de hiperpigmentação cutânea, visto que estas substâncias apresentaram baixo grau de citotoxicidade nos modelos testados.

Inibidores de glicosidases são agentes de grande interesse terapêutico, apresentando atividade antiviral (8), antitumoral (9) e no controle do *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2). Também atuam como inibidores da rejeição de órgãos transplantados (10), agentes agroquímicos (8) e no tratamento da cárie dentária (9).

Alterações no metabolismo de carboidratos podem estar associadas a doenças como o *diabetes mellitus* (11), obesidade (12), e doenças bucais (13), representando hoje um importante problema de saúde individual e populacional, em decorrência do aumento global de suas incidências. A prevalência global do DM2 foi estimada em 171 milhões de indivíduos em 2000, e as expectativas eram, na ocasião, de aumento para 366 milhões de casos até 2030 (14). Contudo, dados recentes divulgados pela OMS mostram que, atualmente, a prevalência global é de 346 milhões de indivíduos portadores do DM2, sendo que 80% dos casos estão em países em desenvolvimento (15).

DM2 é caracterizado como uma desordem metabólica resultante da deficiência na secreção de insulina, seu mecanismo de ação, ou ambos, promovendo alterações no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas. As complicações do DM2 em longo prazo incluem retinopatia, nefropatia, neuropatia, micro angiopatia e aumento no risco de aterosclerose e doença cardiovascular (11, 16, 17).

Uma das abordagens terapêuticas no tratamento do DM2 é a redução da hiperglicemia, a partir da inibição das enzimas que hidrolisam carboidratos, a α -amilase e a α -glicosidase no trato digestivo; enzimas estas responsáveis pela transformação de oligossacarídeos e dissacarídeos em monossacarídeos (11, 18-20). Tais inibidores, como acarbose, retardam a digestão de carboidratos, promovendo redução na taxa de absorção da glicose (11, 17)

Os efeitos adversos relacionados a estes inibidores enzimáticos estão relacionados principalmente a distúrbios gastrointestinais. Os mais comuns são desconforto abdominal, diarreias e flatulência que ocorrem em, aproximadamente, 20% dos pacientes (21) e freqüentemente desaparecem com a continuidade do tratamento (20).

Plantas medicinais continuam tendo um papel importante no tratamento da diabetes, principalmente nos países em desenvolvimento, mas o interesse crescente dos países desenvolvidos na fitoterapia para o tratamento da diabetes é devido, em parte, aos efeitos colaterais apresentados pelo uso da insulina e dos agentes hipoglicemiantes orais (22).

De acordo com dados do Ministério da Saúde (MS), o Brasil é o país que detém a maior parcela da biodiversidade mundial, em torno de 15 a 20%, com destaque para as plantas superiores, aproximadamente 24% do total das espécies (23). Destas, apenas 1% foram estudadas química e farmacologicamente (24, 25). Associado a isso, o país possui ainda uma rica diversidade étnica e cultural que detém um valioso conhecimento tradicional quanto ao uso de plantas medicinais (23). Das espécies existentes, muitas são conhecidas e utilizadas pela população como remédios supostamente eficazes para um grande número de moléstias. Outras não são utilizadas na etnomedicina e não se conhece ainda seu potencial terapêutico ou tóxico.

Dessa maneira, busca-se, partindo do vasto conhecimento popular sobre as supostas propriedades medicinais das plantas do Cerrado Brasileiro, encontrar substâncias de origem vegetal que apresentem atividade de inibição da enzima α -amilase.

Com essa finalidade, um projeto de pesquisa multidisciplinar de triagem de produtos naturais potencialmente inibidores enzimáticos vem sendo realizado na Universidade de Brasília, onde diversas espécies nativas do Cerrado têm sido avaliadas,

in vitro, quanto a esse poder inibitório. Esses extratos podem ser futuramente utilizados como insumos para o desenvolvimento de medicamentos que poderão ser empregados no tratamento de pacientes.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Enzimas α -amilase

Enzimas que atuam na degradação do amido podem ser classificadas em quatro grupos de acordo com o mecanismo de ação: endoamilases, exoamilases, enzimas de desramificação e transferases (26, 27). As endoamilases, representadas pelas α -amilases, atuam clivando ligações glicosídicas α -1,4 presentes na região interna da cadeia de amilose e amilopectina, polímeros formadores da composição do amido, resultando na formação de oligossacarídeos de tamanhos variados. A ação desse grupo de enzimas causa um rápido decréscimo na viscosidade da solução de amido, sendo conhecidas como “enzimas de liquefação” (26, 27).

As exoamilases, conhecidas como “enzimas de sacarificação”, englobam as β -amilases bacterianas e de cereais e as glucoamilases fúngicas e atuam clivando as ligações glicosídicas α -1,4 nos polímeros de amido, a partir das extremidades não redutoras, resultando na liberação gradativa de maltose e glicose e lento decréscimo na viscosidade da solução (26, 27).

As enzimas de desramificação atuam sobre as ligações glicosídicas α -1,6, presentes nos pontos de ramificação, resultando em α/β dextrinas limite (26, 27). Pululanase, produzida pelo fungo *Aureobasidium pullulans*, é exemplo de enzima pertencente a esse grupo (26). As transferases são responsáveis pela clivagem da ligação glicosídica α -1,4 de molécula doadora e transferir a porção clivada para uma molécula aceptora, formando uma nova ligação glicosídica (27, 28).

α -Amilases, α -1,4-glicano-4-glicanoidrolases classificadas por E.C. 3.2.1.1, são enzimas responsáveis por catalisar a hidrólise de polissacarídeos, como amido e glicogênio, e são encontradas em microrganismos, plantas e animais (29). As amilases consistem em hidrolases que catalisam a hidrólise inicial do amido em oligossacarídeos menores através da clivagem das ligações glicosídicas α -1,4 (29-32). Outras enzimas amilolíticas participam no processo de hidrólise do amido, contudo a ação da α -amilase

é essencial para o início do processo de degradação de polissacarídeos (32). Os resíduos terminais de glicose e as ligações α -1,6 não são clivados pela amilase (33).

Os produtos finais da ação das α -amilases são oligossacarídeos de tamanhos variados com configuração anomérica e dextrinas limite (28), na qual constituem em uma mistura de maltose, maltotriose e oligossacarídeos de 6-8 unidades de glicose contendo ligações α -1,4 e α -1,6 (33).

A enzima α -amilase possui uma estrutura tridimensional capaz de se ligar ao substrato e, através dos grupos catalíticos altamente específicos, promover a quebra do glicosídeo (31). Em mamíferos e insetos a enzima é estruturada em 3 domínios (Figura 1). O domínio catalítico A, compreende o barril (β/α)₈; o domínio B inserido entre a folha β e a hélice α e ligado ao domínio A por pontes dissulfeto; e o domínio C, composto de folha β e ligado ao domínio A por cadeia polipeptídica (26, 34, 35). A ligação do substrato à enzima ocorre nos subsítios localizados nos domínios A e B, sendo que o número e a natureza química variam de acordo com a origem da amilase (26, 36). A estabilidade estrutural de ambas as isoformas é cálcio-dependente, além de serem ativadas pela presença de íons cloreto. Os sítios de ligação desses íons, que são funcionalmente importantes para a atividade enzimática, envolvem os domínios A e B (34).

A enzima α -amilase humana é codificada por uma família multigênica localizada no cromossomo I, na posição 1q21. A α -amilase salivar expressa os genes AMY1A, AMY1B e AMY1C enquanto na α -amilase pancreática ocorre a expressão dos genes AMY2A e AMY2B (37, 38). As isoformas de α -amilase salivar e pancreática conservam alto grau de similaridade na seqüência de aminoácidos, com 97% de resíduos idênticos e 92% de autenticidade nos domínios catalíticos (30, 39). A expressão gênica é tecido-específica, sendo a enzima um dos principais produtos de secreção do pâncreas (cerca de 5-6%) (33) e das glândulas salivares.

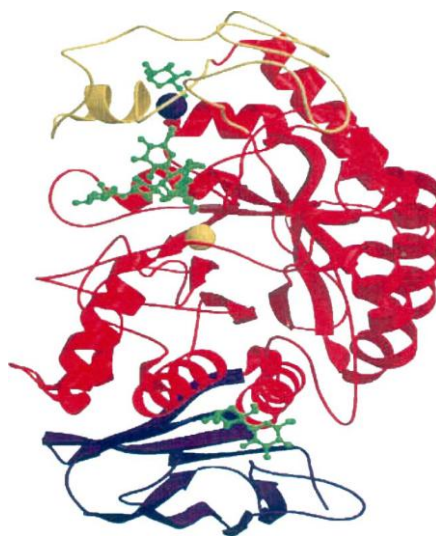


Figura 1: Estrutura tridimensional da α -amilase pancreática porcina (APP). Domínio A em vermelho, domínio B em amarelo e domínio C em azul. O íon cálcio (esfera azul) e o íon cloreto (esfera amarela) estão ligados aos domínios A e B. A figura exemplifica a presença um derivado da acarbose (estrutura em verde) no sítio ativo da enzima, e ligantes monossacarídeos e dissacarídeos na superfície dos sítios de ligação (34).

Dois mecanismos foram propostos para a degradação da amilose pela enzima α -amilase *in vitro*: ataque múltiplo e o ataque em multicadeia. No primeiro deles, a enzima pode se ligar de modo aleatório ao substrato e liberar apenas uma molécula, enquanto a outra porção do polímero fica retida e em seguida é submetida a uma nova hidrólise. Neste mecanismo ocorre a formação de oligossacarídeos; ao passo que no ataque em multicadeia, apenas uma reação hidrolítica ocorre no complexo enzima-substrato, resultando na liberação de duas moléculas de tamanhos semelhantes (26).

Diversos compostos orgânicos têm sido descritos como inibidores de α -amilases. Eles são classificados em inibidores protéicos e não protéicos e possuem aplicação em diversas áreas, entre elas na indústria de alimentos, no controle de pragas e insetos/pragas e como terapia medicamentosa para algumas doenças, tais como DM2.

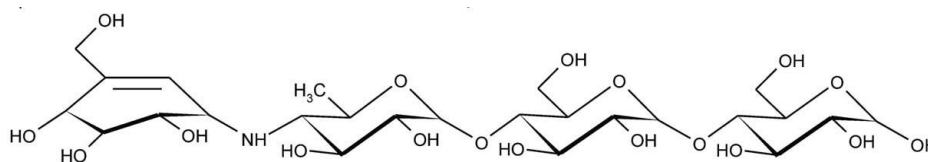
2.1.1. Inibidores não protéicos

Diversos derivados de amino-oligossacarídeos extraídos de plantas e microrganismos têm sido descritos como potentes inibidores da enzima α -amilase humana, tais como, acarbose (40), acarviostatina (41), (glicose)n-desoxinojirimicina (42), trestatina (43), entre outros.

Desordens relacionadas à absorção de carboidratos estão associadas a problemas de saúde como diabetes (44), obesidade (45) e doenças bucais (46), todas com incidência crescente na população.

Considerando que a digestão de carboidratos tem início na boca pela α -amilase salivar e continua no intestino com a ação da α -amilase pancreática, a redução ou bloqueio dessa atividade de inibição pode acarretar na redução da degradação de polissacarídeos em glicose, maltose e maltotriose (47).

Acarbose [1], fármaco utilizado para tratamento clínico da DM2, é um pseudotetrassacarídeo, produzido pelo processo de fermentação de fungos do gênero *Actinoplanes* sp., consistindo em um derivado aminociclohexano poli-hidroxiado (valienamina) ligado a uma 6-desoxiglicose por um átomo de nitrogênio. Atua como inibidor competitivo da enzima α -amilase e seu mecanismo de inibição proposto envolve o acoplamento, no sítio ativo da enzima, do anel ciclohexânico insaturado e do nitrogênio glicosídico que mimetizam o estado de transição para a clivagem enzimática das ligações glicosídicas (48, 49).



1 acarbose

Em estudo estrutural do complexo α -amilase pancreática humana/acarbose, a ligação do inibidor acarbose ocorreu nas posições dos subsítios de -3 a +2 (36). Por outro lado, o estudo cinético mostrou a relação entre os grupos hidroxila do ligante e a capacidade de catálise enzimática, onde a interação dos grupos hidroxila com os resíduos Asp¹⁹⁷, Glu²³³ e Asp³⁰⁰ resultou em considerável redução nessa capacidade catalítica (36).

Acarbose é metabolizada por carboidrases intestinais em acarviosina-glicose e glicose (49). Dentre os principais efeitos adversos têm-se os gastrintestinais incluindo desconforto abdominal, flatulências e diarreias, acometendo aproximadamente 20% dos pacientes (21, 49, 50). Esses efeitos adversos são causados pela fermentação intestinal de carboidratos não completamente degradados (49, 51) e representam o principal motivo de não adesão ao tratamento medicamentoso com este fármaco (20).

Devido aos efeitos adversos causados pelo uso de inibidores de glicosidases, a busca de novos compostos químicos efetivos na capacidade de inibição enzimática, isolados de plantas, que possam ser usados na terapia medicamentosa, assim como candidatos que possam ser adicionados em alimentos ou como suplementos, tem sido realizada em várias pesquisas envolvendo plantas medicinais.

2.2. Produtos naturais com capacidade de inibição da α -amilase

Compostos fenólicos constituem um amplo grupo de compostos de ocorrência natural e possuem pelo menos um grupamento fenólico em sua estrutura. Vários desses compostos apresentam atividade antioxidante ou propriedade sequestradora de radicais livres, assim como outras propriedades medicinais.

Flavonoides constituem a mais abundante classe de compostos fenólicos com várias atividades biológicas descritas. Eles compartilham um esqueleto estrutural com dois anéis aromáticos (A e B) ligados através de três carbonos, formando um heterociclo oxigenado (anel C) e são divididos em grupos (Figura 2).

Lo Piparo et al. (2008) avaliaram a interação entre flavonoides e a enzima α -amilase humana com o objetivo de elucidar o mecanismo molecular de inibição da referida enzima. A investigação mostrou que a potência de inibição está correlacionada com o número de grupamentos hidroxila presentes no anel B da estrutura do flavonoide e a interação ocorre com a formação de ligações de hidrogênio entre o grupamento hidroxila na posição R6 ou R7 do anel A e a posição R4' ou R5' do anel B do polifenol ligante e o resíduo catalítico presente no sítio de ligação da enzima; em consequência, ocorre a formação de um sistema π conjugado que estabiliza a interação com o sítio ativo (52). O mecanismo de interação descrito é similar ao mecanismo proposto para a acarbose (53).

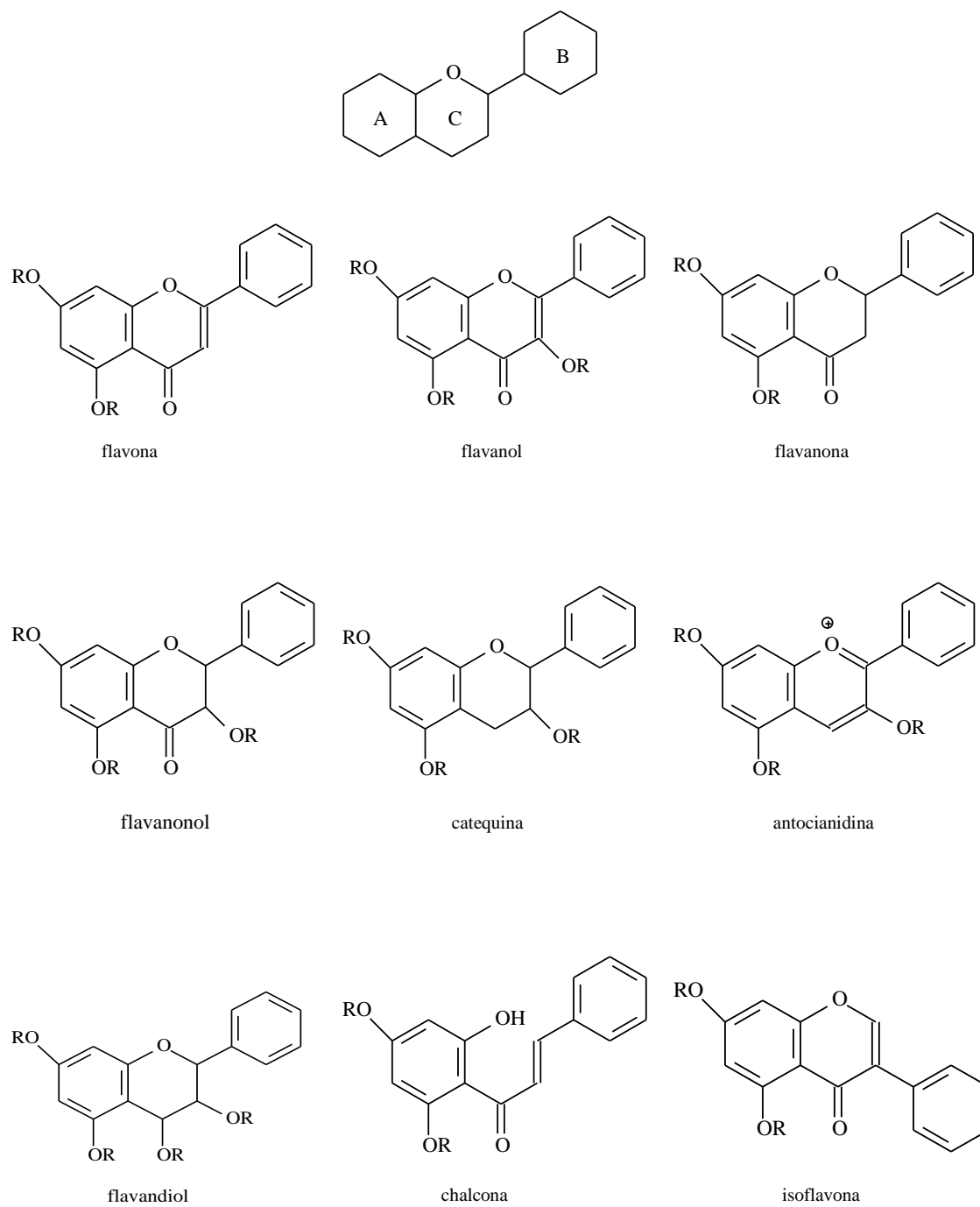
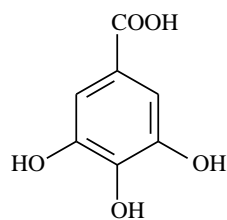


Figura 2: Esqueleto básico dos flavonoides

Taninos compreendem outro grupo heterogêneo de polifenóis amplamente distribuído no reino vegetal e geralmente presentes em frutos verdes que desaparecem com o amadurecimento. Possuem alto peso molecular e podem ser classificados em taninos hidrolisáveis e taninos condensados.

Os taninos hidrolisáveis podem ser subdivididos em galotaninos, derivados do ácido gálico [2] ligado a um glicosídeo, enquanto os taninos condensados formam polímeros complexos onde são formados geralmente por catequinas e flavonoides (54).



2 ácido gálico

Taninos causam vários efeitos em sistemas biológicos devido ao seu potencial quelante de íons metálicos e como agentes precipitadores de proteínas formando complexos insolúveis com essas proteínas, assim como oxidantes biológicos (55). Estudos realizados em pacientes portadores de DM2 não insulino-dependentes mostrou a capacidade em reduzir os níveis séricos de glicose, após refeição rica em amido, do ácido tânico e de compostos não alcoólicos enriquecidos em taninos presentes no vinho tinto. O mecanismo envolvido nesse efeito anti-hiperglicêmico é desconhecido, provavelmente os taninos causam inibição da α -amilase por meio de interação *in situ* (56).

A habilidade dos taninos em se ligar a proteínas formando complexos insolúveis fundamenta seu largo uso na indústria de couros, no tratamento de diarreias, sangramentos e lesões cutâneas (57) e provavelmente é este o mecanismo de ação que causa a inibição da α -amilase.

Terpenoides são compostos que compreendem várias estruturas comumente encontradas na natureza desempenhando diversas funções em plantas e animais. A interação cabeça-cauda de unidades isoprênicas e a combinação de duas ou mais dessas unidades divide os terpenoides em monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), triterpenos (C_{30}) e tetraterpenos (C_{40}) (58).

Triterpenos compreendem um grupo de produtos contendo 30 carbonos, derivados do esqualeno, com várias utilizações na área médica. Alguns triterpenos possuem atividades biológicas bem caracterizadas, por exemplo, os esteróides e saponinas (59)

Vários efeitos biológicos reais e potenciais têm sido avaliados para essa classe de substâncias. Atividade antiinflamatória, analgésica, antimicótica, antiviral, antiplasmodial, antiulcerogênica, anticariogênica, imunomoduladora, protetora vascular, antiobesidade, anticarcinogênica e efeito tônico são alguns dos usos relatados para essa classe de compostos (60, 61). Triterpenos representam uma classe de compostos naturais biologicamente ativos promissores para pesquisa e desenvolvimento de novas substâncias farmacologicamente ativas e apesar de serem amplamente distribuídas em vegetais, a atividade inibitória da enzima α -amilase foi relatada somente para os tipos oleano, ursano e lupano e o mecanismo de inibição ainda é desconhecido.

A Tabela 1 mostra os compostos químicos isolados de plantas e que apresentam atividade de inibição da enzima α -amilase. As Figuras 3 a 6 ilustram as estruturas dessas substâncias.

Tabela 1 - Compostos com capacidade de inibição da α -amilase humana

Composto	Fonte	Atividade	Controle	Referência
Flavanol				
quercetina (3a)	-	82% de atividade inibitória (IC ₅₀ =21,4 μ M)	Acarbose com 99% de atividade inibitória máxima (IC ₅₀ = 0,996 μ M)	(52)
3,7,3'-trimetoxiquercetina (3b)	<i>Varthemia iphionoides</i> Boiss. & Blanche (Asteraceae)	32% de atividade inibitória (100 μ M)	Enzima sem tratamento	(62)
quercetrina (3c)	<i>Kalopanax pictum</i> (Araliaceae)	\pm 45% de atividade inibitória (5 mg/mL)	Acarbose com 50% de inibição em 5-50 μ g/mL	(63)
rutina (3d)	<i>Sophora japonica</i> (Fabaceae)	\pm 40% de atividade inibitória (5 mg/mL)	Acarbose com 50% de inibição em 5-50 μ g/mL	(63)
kaempferol (3e)	-	34% de atividade inibitória (IC ₅₀ = não determinado)	Acarbose com 99% de atividade inibitória máxima (IC ₅₀ = 0,996 μ M)	(52)
5,7,4'- triidroxi-3-metoxiflavona (3f)	<i>Varthemia iphionoides</i> Boiss. & Blanche (Asteraceae)	99% de atividade inibitória (100 μ M)	Enzima sem tratamento	(62)
5,4'- diidroxi-3,7-dimetoxiflavona (3g)	<i>Varthemia iphionoides</i> Boiss. & Blanche (Asteraceae)	98% de atividade inibitória (100 μ M)	Enzima sem tratamento	(62)
5,4'-dihidroxi-3,6,7-trimetoxi flavona (3h)	<i>Varthemia iphionoides</i> Boiss. & Blanche (Asteraceae)	77% de atividade inibitória (100 μ M)	Enzima sem tratamento	(62)
astragalina (3i)	<i>Polygala japonica</i> (Polygalaceae)	\pm 55% de atividade inibitória (5 mg/mL)	Acarbose com 50% de inibição em 5-50 μ g/mL	(63)
hiperina (3j)	<i>Kalopanax pictum</i> (Araliaceae)	\pm 55% de atividade inibitória (5 mg/mL)	Acarbose com 50% de inibição em 5-50 μ g/mL	(63)
isoraminetina (4a)	-	35% de atividade inibitória (IC ₅₀ = não determinado)	Acarbose com 99% de atividade inibitória máxima (IC ₅₀ = 0,996 μ M)	(52)
narcisina (4b)	<i>Sophora japonica</i> (Fabaceae)	\pm 70% de atividade inibitória (5 mg/mL)	Acarbose com 50% de inibição em 5-50 μ g/mL	(63)
fisetina (4c)	-	50% inibição entre 0,4-0,6 mM	Acarbose com 50% de inibição em concentração < 0,1 mM	(64)
	-	85% de atividade inibitória (IC ₅₀ = 19,6 μ M)	Acarbose com 99% de atividade inibitória máxima (IC ₅₀ = 0,996 μ M)	(52)

Continuação: Tabela 2 - Compostos com capacidade de inibição da α -amilase humana

Composto	Fonte	Atividade	Controle	Referência
miricetina (4d)	-	79% de atividade inibitória (IC ₅₀ = 30,2 μ M)	Acarbose com 99% de atividade inibitória máxima (IC ₅₀ = 0,996 μ M)	(52)
dímero de quercetina (5a)	<i>Allium cepa</i> L. (Liliaceae)	87% de atividade inibitória	Acarbose	(65)
(4'-O- β -D-glicopiranosídeo de dímero de quercetina) (5b)	<i>Allium cepa</i> L. (Liliaceae)	56% de atividade inibitória	Acarbose	(65)
quercetagetina (6)	-	97% de atividade inibitória (IC ₅₀ = 10,2 μ M)	Acarbose com 99% de atividade inibitória máxima (IC ₅₀ = 0,996 μ M)	(52)
kaempferol-3-O-[6''-O-(3-hidroxil-3-metilglutaroil) glicosídeo] (7)	<i>Polygala japonica</i> (Polygalaceae)	100% de atividade inibitória	Acarbose com 50% de inibição em 5-50 μ g/mL	(63)
auranetina-5-metileter (8)	<i>Varthemia iphionoides</i> Boiss. & Blanche (Asteraceae)	18% de atividade inibitória (100 μ M)	Enzima sem tratamento	(62)
Flavona				
luteolina (9a)	<i>Lonicera japonica</i> (Caprifoliaceae)	100% de atividade inibitória (5 mg/mL)	Acarbose com 50% de inibição em 5-50 μ g/mL	(63)
	-	50% de inibição em 0,2 mM	Acarbose com 50% de inibição em concentração < 0,1 mM	(64)
	-	88% de atividade inibitória (IC ₅₀ = 18,4 μ M)	Acarbose com 99% de atividade inibitória máxima (IC ₅₀ = 0,996 μ M)	(52)
luteolina -7-O-glicosídeo (9b)	<i>Allium cepa</i> L. (Liliaceae)	82% de atividade inibitória (IC ₅₀ = não determinado)	Acarbose	(65)
	<i>Salix gracilistyla</i> (Salicaceae)	100% de atividade inibitória (5 mg/mL)	Acarbose com 50% de inibição em 5-50 μ g/mL	(63)
	-	50% de inibição em 0,2-0,4mM	Acarbose com 50% de inibição em concentração < 0,1 mM	(64)
acacetina (9c)	-	14% de atividade inibitória (IC ₅₀ = não determinado)	Acarbose com 99% de atividade inibitória máxima (IC ₅₀ = 0,996 μ M)	(52)

Continuação: Tabela 3 - Compostos com capacidade de inibição da α -amilase humana

Composto	Fonte	Atividade	Controle	Referência
apigetrina (9d)	-	IC ₅₀ < 0,2 mM	Acarbose com 50% de inibição em concentração < 0,1mM	(64)
lonicerina (9e)	<i>Lonicera japonica</i> (Caprifoliaceae)	± 55% de atividade inibitória (5 mg/mL)	Acarbose com 50% de inibição em 5-50 µg/mL	(63)
rhoifolina (9f)	<i>Lonicera japonica</i> (Caprifoliaceae)	± 60% de atividade inibitória (5 mg/mL)	Acarbose com 50% de inibição em 5-50 µg/mL	(63)
diosmetina (10a)	-	19% de atividade inibitória (IC ₅₀ = não determinado)	Acarbose com 99% de atividade inibitória máxima (IC ₅₀ = 0,996 µM)	(52)
genkwanina (10b)	-	17% de atividade inibitória (IC ₅₀ = não determinado)	Acarbose com 99% de atividade inibitória máxima (IC ₅₀ = 0,996 µM)	(52)
escutelareina (11a)	-	98% de atividade inibitória (IC ₅₀ = 9,64 µM)	Acarbose com 99% de atividade inibitória máxima (IC ₅₀ = 0,996 µM)	(52)
eupafolina (11b)	-	99% de atividade inibitória (IC ₅₀ = 48 µM)	Acarbose com 99% de atividade inibitória máxima (IC ₅₀ = 0,996 µM)	(52)
bilobetina (12)	<i>Ginkgo biloba</i> L. (Ginkgoaceae)	± 25% de atividade inibitória (5 mg/mL)	Acarbose com 50% de inibição em 5-50 µg/mL	(63)
Flavanona				
naringenina (13a)	-	26% de atividade inibitória (IC ₅₀ = não determinado)	Acarbose com 99% de atividade inibitória máxima (IC ₅₀ = 0,996 µM)	(52)
hesperetina (13b)	-	39% de atividade inibitória (IC ₅₀ = não determinado)	Acarbose com 99% de atividade inibitória máxima (IC ₅₀ = 0,996 µM)	(52)
hesperidina (13c)	<i>Citrus unshiu</i> (Rutaceae)	± 60% de atividade inibitória (5 mg/mL)	Acarbose com 50% de inibição em 5-50 µg/mL	(63)
Flavanonol				
aliocídeo G (14a)	<i>Allium cepa</i> L. (Liliaceae)	96% de atividade inibitória	Acarbose	(65)

Continuação: Tabela 4 - Compostos com capacidade de inibição da α -amilase humana

Composto	Fonte	Atividade	Controle	Referência
Isoflavona				
daidzeína (15a)	-	\pm 55% de atividade inibitória (5 mg/mL)	Acarbose com 50% de inibição em 5-50 μ g/mL	(63)
	-	23% de atividade inibitória (IC ₅₀ = não determinado)	Acarbose com 99% de atividade inibitória máxima (IC ₅₀ = 0,996 μ M)	(52)
genisteína (15b)	-	\pm 30% de atividade inibitória (5 mg/mL)	Acarbose com 50% de inibição em 5-50 μ g/mL	(63)
	-	25% de atividade inibitória (IC ₅₀ = não determinado)	Acarbose com 99% de atividade inibitória máxima (IC ₅₀ = 0,996 μ M)	(52)
Proantocianidina				
catequina (16a)	-	13% de atividade inibitória (IC ₅₀ = não determinado)	Acarbose com 99% de atividade inibitória máxima (IC ₅₀ = 0,996 μ M)	(52)
catequina hidrato (16a)	-	50% de atividade inibitória (concentração > 20 mM)	Acarbose com 50% de inibição em 5,7 μ M	(66)
epicatequina (16b)	-	10% de atividade inibitória (IC ₅₀ = não determinado)	Acarbose com 99% de atividade inibitória máxima (IC ₅₀ = 0,996 μ M)	(52)
galato de (-)-catequina (16c)	<i>Bergenia ciliate</i> (Haw) (Saxifragaceae)	IC ₅₀ = 401 μ M	Enzima sem tratamento	(67)
galato de (-)-epicatequina (16d)	<i>Bergenia ciliate</i> (Haw) (Saxifragaceae)	50% de atividade inibitória em 739 μ M	Enzima sem tratamento	(67)
galato de epicatequina (16d)	-	50% de atividade inibitória em 1,5 mM	Acarbose com 50% de inibição em 5,7 μ M	(66)

Continuação: Tabela 5 - Compostos com capacidade de inibição da α -amilase humana

Composto	Fonte	Atividade	Controle	Referência
galato de epigalocatequina (17)	-	50% de atividade inibitória em 1,4 mM	Acarbose com 50% de inibição em 5,7 μ M	(66)
teaflavina (18a)	-	50% de atividade inibitória em 67 μ M	Acarbose com 50% de inibição em 5,7 μ M	(66)
monogalato de teaflavina (18b)	-	50% de atividade inibitória em 5,5 μ M	Acarbose com 50% de inibição em 5,7 μ M	(66)
digalato de teaflavina (18c)	-	50% de atividade inibitória em 2,9 μ M	Acarbose com 50% de inibição em 5,7 μ M	(66)
Outros				
2-(3,4-diidroxibenzoil)-2,4,6-triidroxi-3 (2H)-benzofuranona (19)	<i>Allium cepa</i> L. (Liliaceae)	88% de atividade inibitória	Acarbose	(65)
aceronidina (20)	<i>Malpighia emarginata</i> DC. (Malpighiaceae)	34% de atividade inibitória (IC ₅₀ = 820 μ M)	Enzima sem tratamento	(68)
Tanino				
“Aleppo tannin” (galotanino) (21)	“noz de gala”	Constante de dissociação do complexo contendo inibidor EI (K_{EI}) 0,82 μ g/ mL vs constante de dissociação do complexo inibidor/ enzima/ substratoESI (K_{ESI}) 3,32 μ g/ mL	Acarbose com constante de dissociação do complexo contendo inibidor EI (K_{EI}) 0,45 μ g/ mL vs constante de dissociação do complexo inibidor/ enzima/ substratoESI (K_{ESI}) 0,065 μ g/ mL	(57)
pedunculagina (22a)	<i>Rubus suavissimus</i> S. LEE (Rosaceae)	14% de atividade inibitória	teaflavina-3,3-di-O-gallato com 83% de atividade de inibição	(69)

Continuação: Tabela 6 - Compostos com capacidade de inibição da α -amilase humana

Composto	Fonte	Atividade	Controle	Referência
1(β)- <i>O</i> -galoilpedunculagina (22b)	<i>Rubus suavissimus</i> S. LEE (Rosaceae)	56% de atividade inibitória	teaflavina-3,3-di- <i>O</i> -galato com 83% de atividade de inibição	(69)
1 (α)- galoilpedunculagina (22b)	<i>Rubus suavissimus</i> S. LEE (Rosaceae)	36% de atividade inibitória	teaflavina-3,3-di- <i>O</i> -galato com 83% de atividade de inibição	(69)
estricтинina (23a)	<i>Rubus suavissimus</i> S. LEE (Rosaceae)	52% de atividade inibitória	teaflavina-3,3-di- <i>O</i> -galato com 83% de atividade de inibição	(69)
sanguiina H5 (23b)	<i>Rubus suavissimus</i> S. LEE (Rosaceae)	56% de atividade inibitória	teaflavina-3,3-di- <i>O</i> -galato com 83% de atividade de inibição	(69)
roshenina B (1-desgaloil sanguiina H6 (23c)	<i>Rubus suavissimus</i> S. LEE (Rosaceae)	54% de atividade inibitória	teaflavina-3,3-di- <i>O</i> -galato com 83% de atividade de inibição	(69)
sanguiina H2 (23d)	<i>Rubus suavissimus</i> S. LEE (Rosaceae)	36% de atividade inibitória	teaflavina-3,3-di- <i>O</i> -galato com 83% de atividade de inibição	(69)
sanguiina H10 (23e)	<i>Rubus suavissimus</i> S. LEE (Rosaceae)	23% de atividade inibitória	teaflavina-3,3-di- <i>O</i> -galato com 83% de atividade de inibição	(69)
sanguiina H11 (23f)	<i>Rubus suavissimus</i> S. LEE (Rosaceae)	1% de atividade inibitória	teaflavina-3,3-di- <i>O</i> -galato com 83% de atividade de inibição	(69)
lambertianina A (23g)	<i>Rubus suavissimus</i> S. LEE (Rosaceae)	36% de atividade inibitória	teaflavina-3,3-di- <i>O</i> -galato com 83% de atividade de inibição	(69)
sanguiina H6 (23h)	<i>Rubus suavissimus</i> S. LEE (Rosaceae)	19% de atividade inibitória	teaflavina-3,3-di- <i>O</i> -galato com 83% de atividade de inibição	(69)
rubusuaviina A (24a)	<i>Rubus suavissimus</i> S. LEE (Rosaceae)	60% de atividade inibitória	teaflavina-3,3-di- <i>O</i> -galato com 83% de atividade de inibição	(69)
rubusuaviina B (24b)	<i>Rubus suavissimus</i> S. LEE (Rosaceae)	60% de atividade inibitória	teaflavina-3,3-di- <i>O</i> -galato com 83% de atividade de inibição	(69)
rubusuaviina C (24c)	<i>Rubus suavissimus</i> S. LEE (Rosaceae)	17% de atividade inibitória	teaflavina-3,3-di- <i>O</i> -gallato com 83% de atividade de inibição	(69)
rubusuaviina D (24d)	<i>Rubus suavissimus</i> S. LEE (Rosaceae)	52% de atividade inibitória	teaflavina-3,3-di- <i>O</i> -galato com 83% de atividade de inibição	(69)

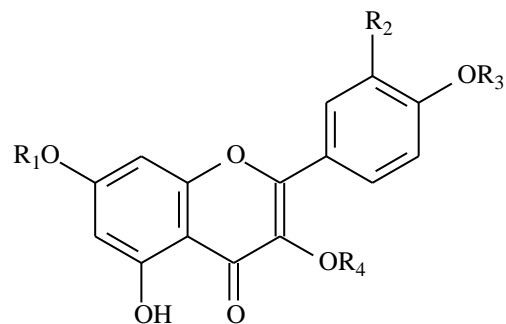
Continuação: Tabela 7 - Compostos com capacidade de inibição da α -amilase humana

Composto	Fonte	Atividade	Controle	Referência
rubusuaviina E (24e)	<i>Rubus suavissimus</i> S. LEE (Rosaceae)	14% de atividade inibitória	teaflavina-3,3-di- <i>O</i> -galato com 83% de atividade de inibição	(69)
rubusuaviina F (24f)	<i>Rubus suavissimus</i> S. LEE (Rosaceae)	34% de atividade inibitória	teaflavina-3,3-di- <i>O</i> -galato com 83% de atividade de inibição	(69)
ácido tânico (25)	-	IC ₅₀ < 0,2 mM	Acarbose com 50% de inibição em concentração < 0,1mM	(64)
	-	Constante de dissociação do complexo contendo inibidor EI (K_{EI}) entre 8-9 μ g/mL vs constante de dissociação do complexo inibidor/ enzima/ substrato ESI (K_{ESI}) entre 45-49 μ g/ mL	-	(54)
Derivados do ácido cinâmico				
ácido clorogênico (26)	-	IC ₅₀ entre 1,4-1,6 mM	Acarbose com 50% de inibição em concentração <0,1mM	(64)
ácido isoclorogênico (27)	-	IC ₅₀ entre 0,6-0,8 mM	Acarbose com 50% de inibição em concentração < 0,1 mM	(64)
ácido rosmarínico (28)	-	85% de atividade inibitória	Enzima sem tratamento	(70)
	-	IC ₅₀ entre 1,4-1,6 mM	Acarbose com 50% de inibição em concentração < 0,1 mM	(64)
esculina (29)	-	IC ₅₀ entre 1,4-1,6 mM	Acarbose com 50% de inibição em concentração < 0,1 mM	(64)
mistura de ácido gálico (2), ácido proto-cateico (30), ácido cafeico (32a), ácido elágico (31), ácido ferúlico (32b), quercetina (3a) e kaempferol (3e)	<i>Centratherum anthelminticum</i> (Asteraceae)	90% de atividade inibitória (IC ₅₀ = 185 μ g)	Acarbose com 85% de inibição máxima (IC ₅₀ = 17 μ g)	(71)

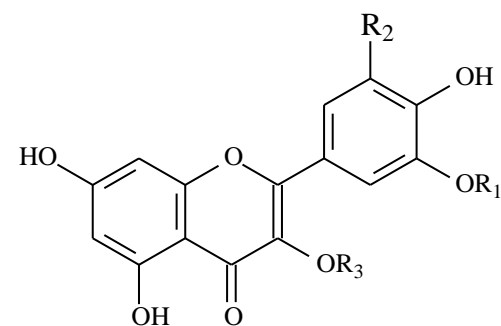
Conclusão: Tabela 8 - Compostos com capacidade de inibição da α -amilase humana

Composto	Fonte	Atividade	Controle	Referência
Terpeno				
esqualeno (33)	-	30% de atividade inibitória	Enzima sem tratamento	(72)
lupeol (34)	-	\pm 50% de atividade inibitória	<i>Triticum aestivum</i> (inibidor de α -amilase isolado de semente de trigo)	(73)
3-O-[(9Z)-9-heexadec-9-enoil]- β -amirina (35)	<i>Spondias mombin</i> Linn (Anacardiaceae)	57% de atividade inibitória	Acarbose	(74)
ácido oleanólico (36a)	-	\pm 50% de atividade inibitória	<i>Triticum aestivum</i> (inibidor de α -amilase isolado da semente de trigo)	(73)
ácido ursólico (36b)	-	\pm 87,5% de atividade inibitória	<i>Triticum aestivum</i> (inibidor de α -amilase isolado da semente de trigo)	(73)
mistura de lambertianina C, sanguina H10 (23e), e sanguina H6 (23h)	<i>Rubus idaeus</i> L. variedade Glen Ample (Rosaceae)	\pm 75% de atividade inibitória	Chá verde com \pm 99% de inibição máxima	(75)
mistura de isômeros de ácidos oleanólico (36a) e ursólico (36b)	<i>Phyllanthus amarus</i> Schumach. & Thonn. (Euphorbiaceae)	\pm 65% de atividade inibitória (IC ₅₀ = 2,01 μ g)	<i>Triticum aestivum</i> (inibidor de α -amilase isolado da semente de trigo)	(73)
mistura de ácido betulínico (37) e 3,5,7,4'-tetraidroxiflavanona (14b)	<i>Syzygium cumini</i> Linn (Myrtaceae)	98% de atividade inibitória	Não informado	(76)

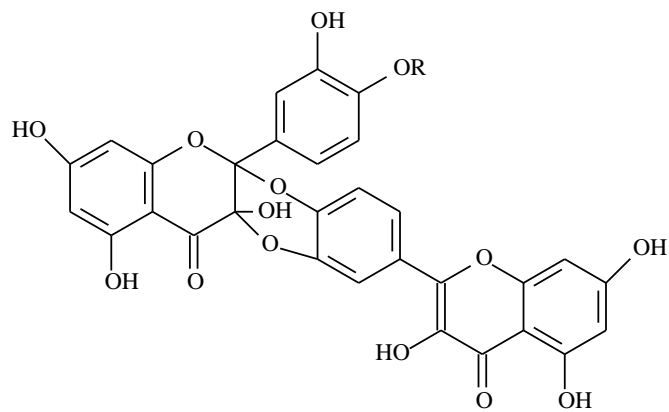
Figura 3: Flavonoides que possuem atividade inibitória sobre α -amilase.



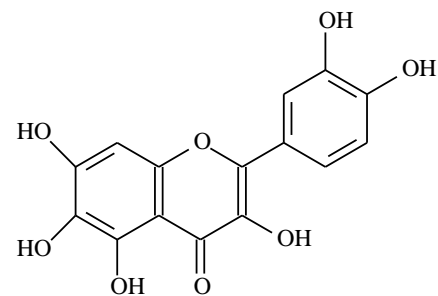
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	
3a	H	OH	H	H	quercetina
3b	CH ₃	OH	CH ₃	OCH ₃	
3c	H	OH	H	ramn	quercetrina
3d	H	OH	H	ramn-gli	rutina
3e	H	H	H	H	kaempferol
3f	H	H	H	CH ₃	
3g	CH ₃	H	H	CH ₃	
3h	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃	
3i	H	H	H	gli	astragalina
3j	H	OH	H	gal	hiperina



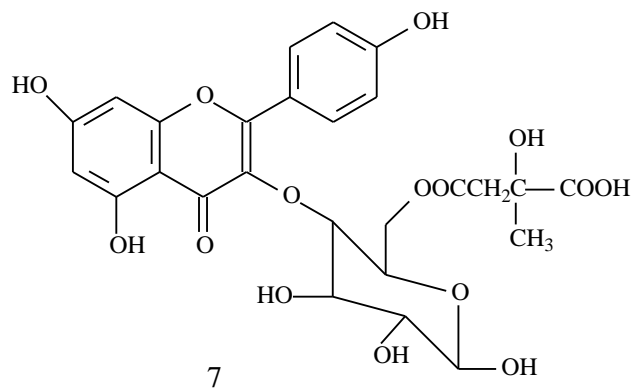
	R ₁	R ₂	R ₃	
4a	CH ₃	H	H	isorhamnetina
4b	CH ₃	H	ramn-gli	narcisiana
4c	H	H	H	fisetina
4d	H	OH	H	miricetina



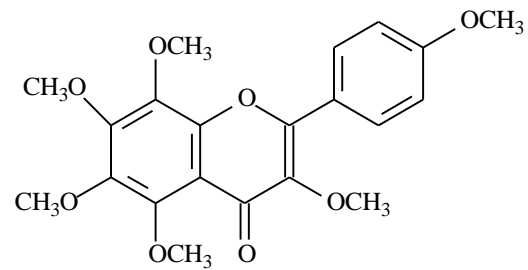
R
5a H
5b gli



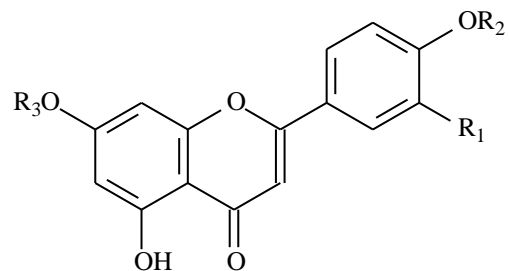
6 quercetina



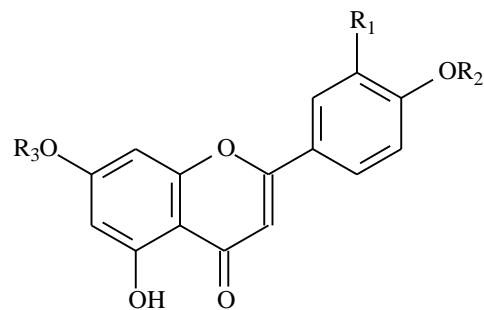
7



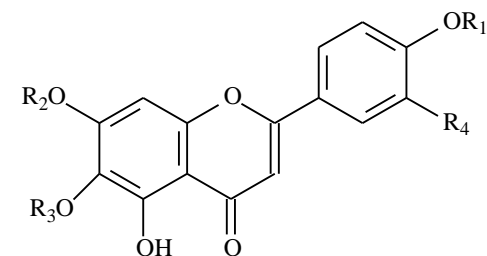
8 éter metílico de 5-auretina



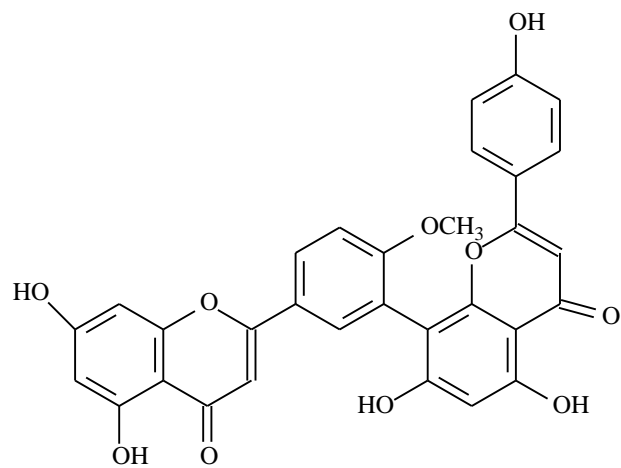
	R ₁	R ₂	R ₃	
9a	OH	H	H	luteolina
9b	OH	H	glu	
9c	OH	CH ₃	H	acacetina
9d	H	H	glu	apigetrina
9e	OH	H	glu-rham	lonicerina
9f	H	H	α-rham-6α-glu	rhoifolina



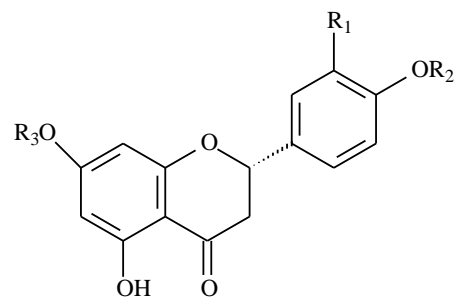
	R ₁	R ₂	R ₃	
10a	OH	CH ₃	H	diosmetina
10b	CH ₃	CH ₃	H	genkwanina



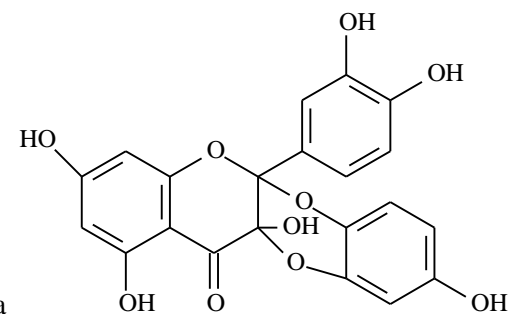
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	
11a	H	H	H	H	escutelareina
11b	H	H	CH ₃	OH	eupafolina



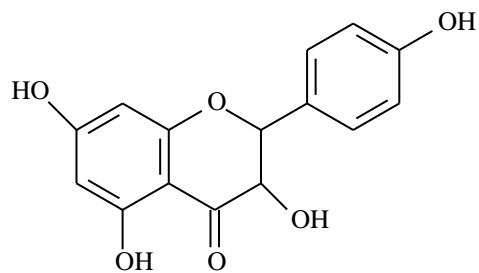
12 bilobetina



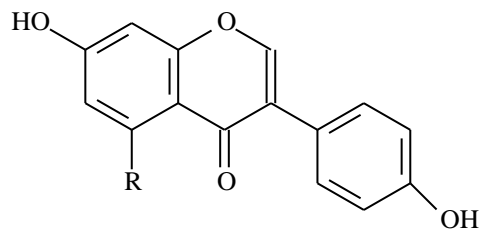
	R ₁	R ₂	R ₃	
13a	H	H	H	naringenina
13b	OH	CH ₃	H	hesperetina
13c	OH	CH ₃	rham-glu	hesperidina



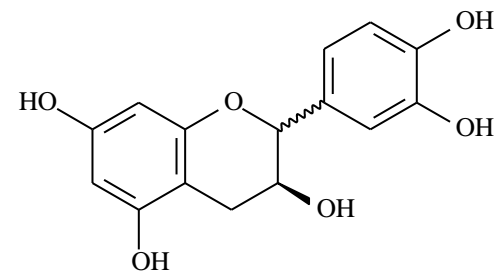
14a aliucideo G



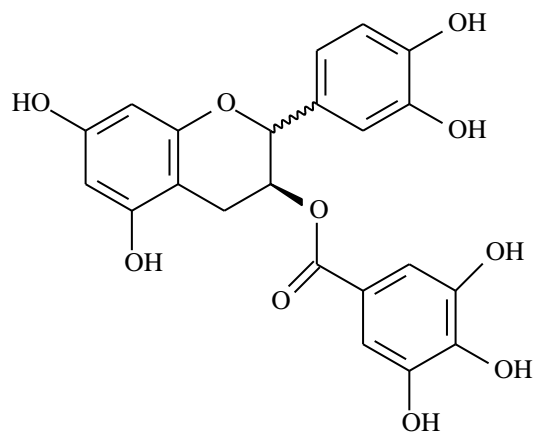
14b



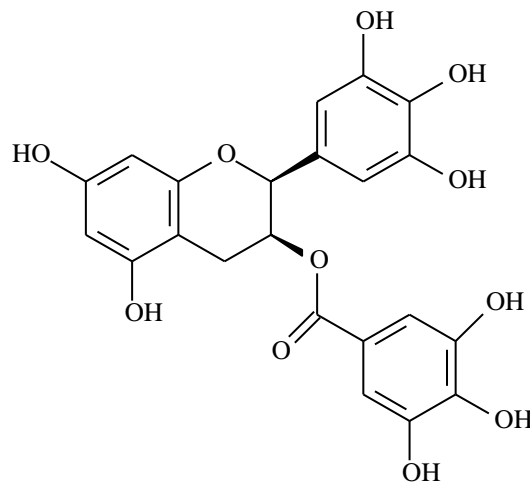
R
 15a H daidzeína
 15b OH genisteína



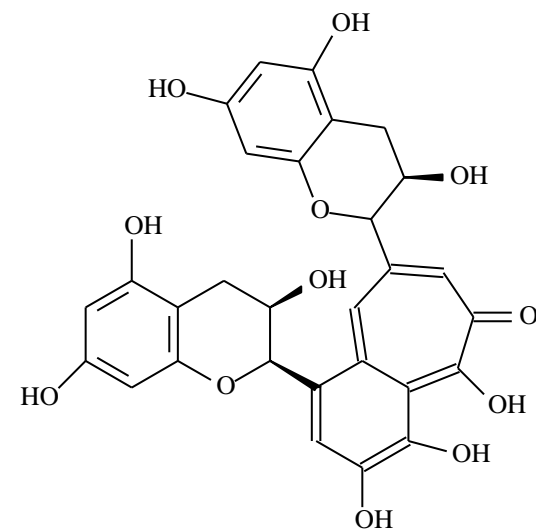
~~~~~  
 16a ..... catequina  
 16b ——— epicatequina



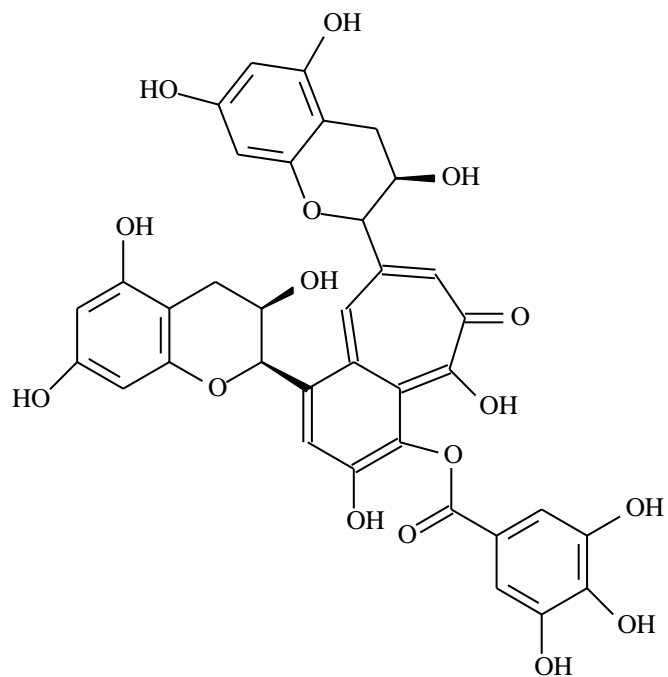
~~~~~  
 16c 3-O-galoilcatequina
 16d ——— 3-O-galoilepicatequina



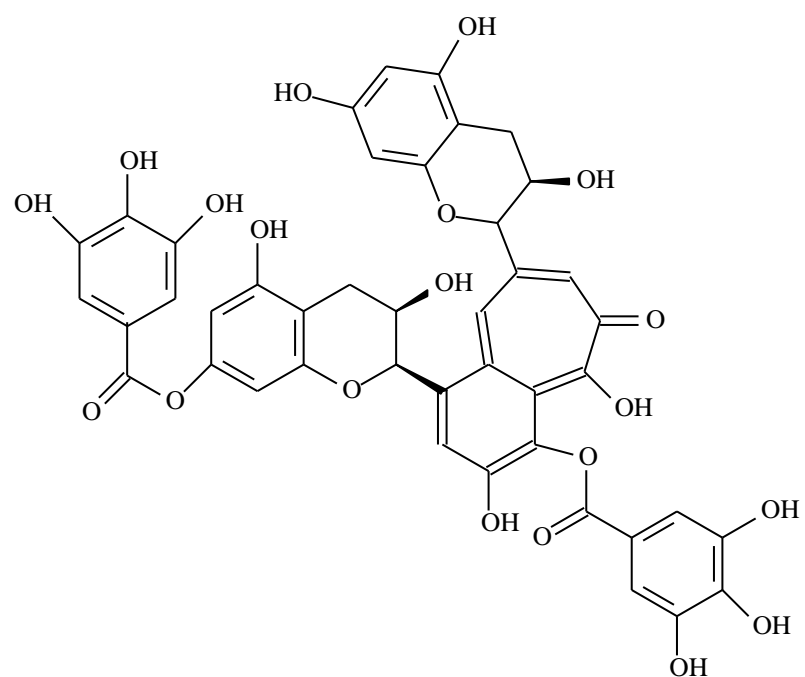
17 galato de epigalocatequina



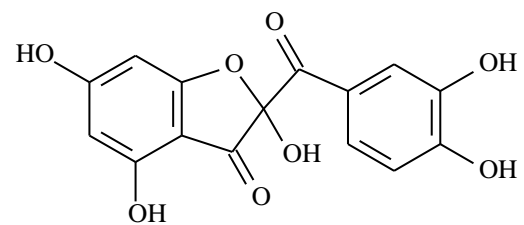
18a teaflavina



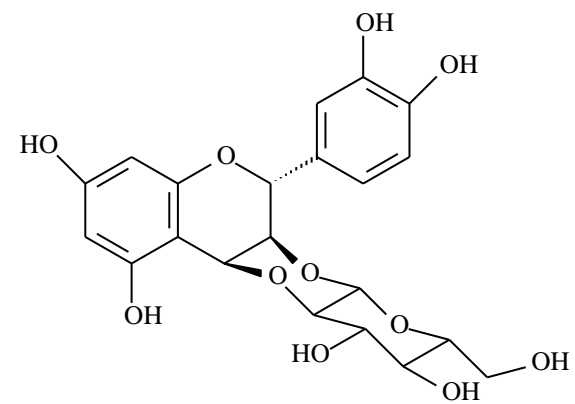
18b monogalato de teaflavina



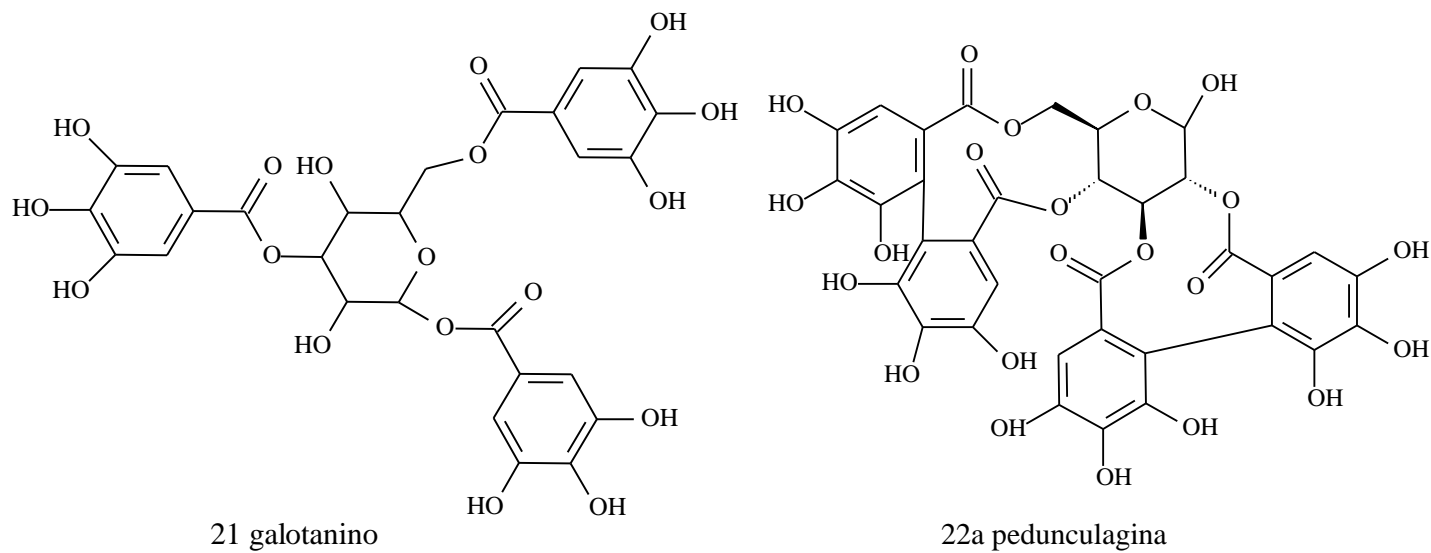
18c digalato de teaflavina

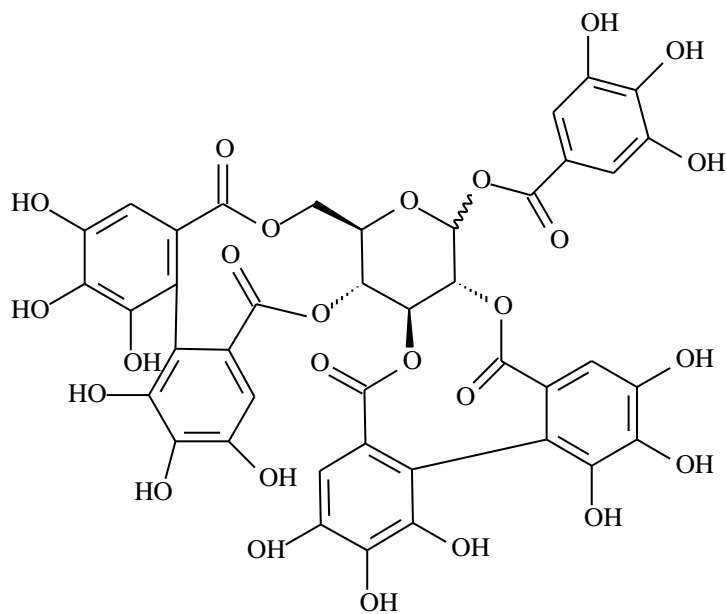


19

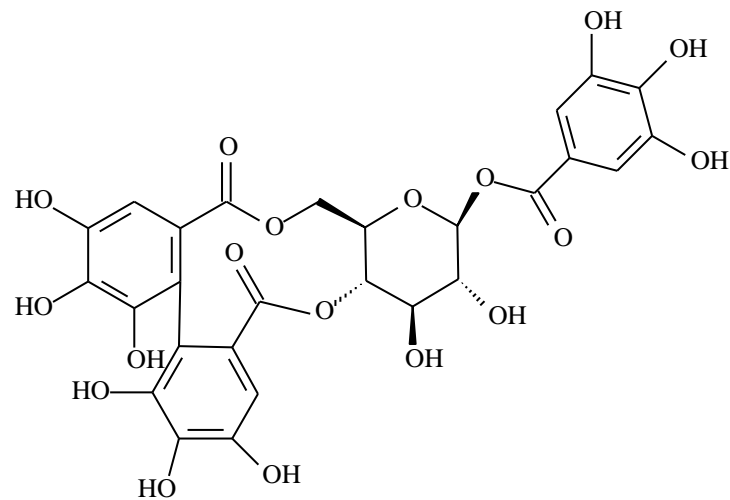


20 aceronidina

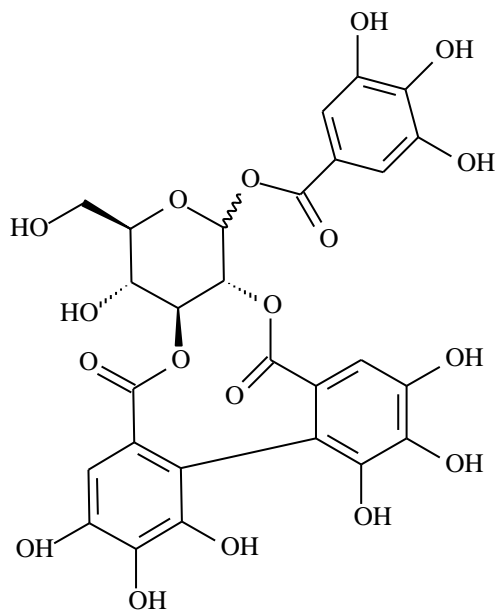
Figura 4: Taninos que apresentam atividade inibitória sobre α -amilase



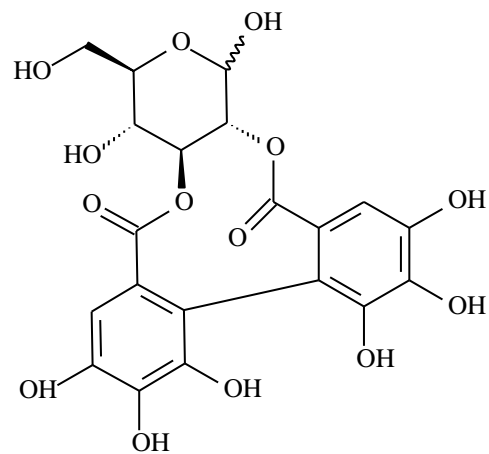
22b 1-O-galloylpedunculagina



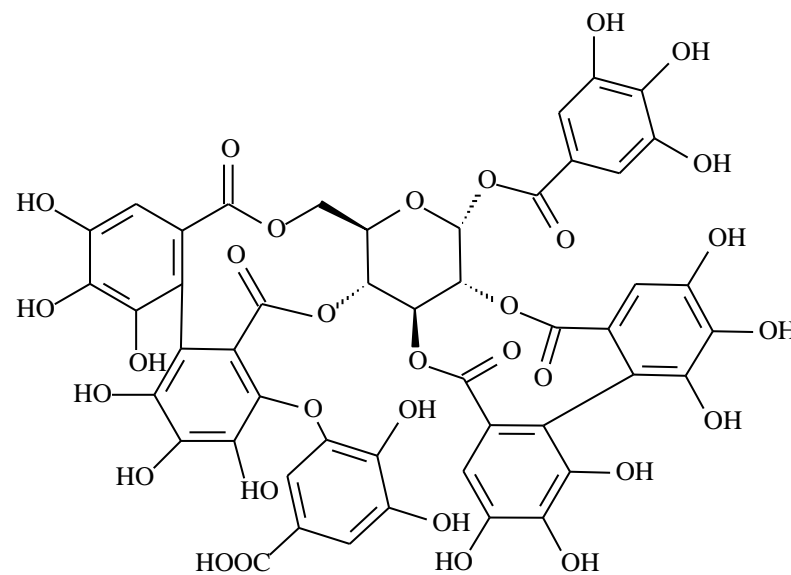
23a estrectinina



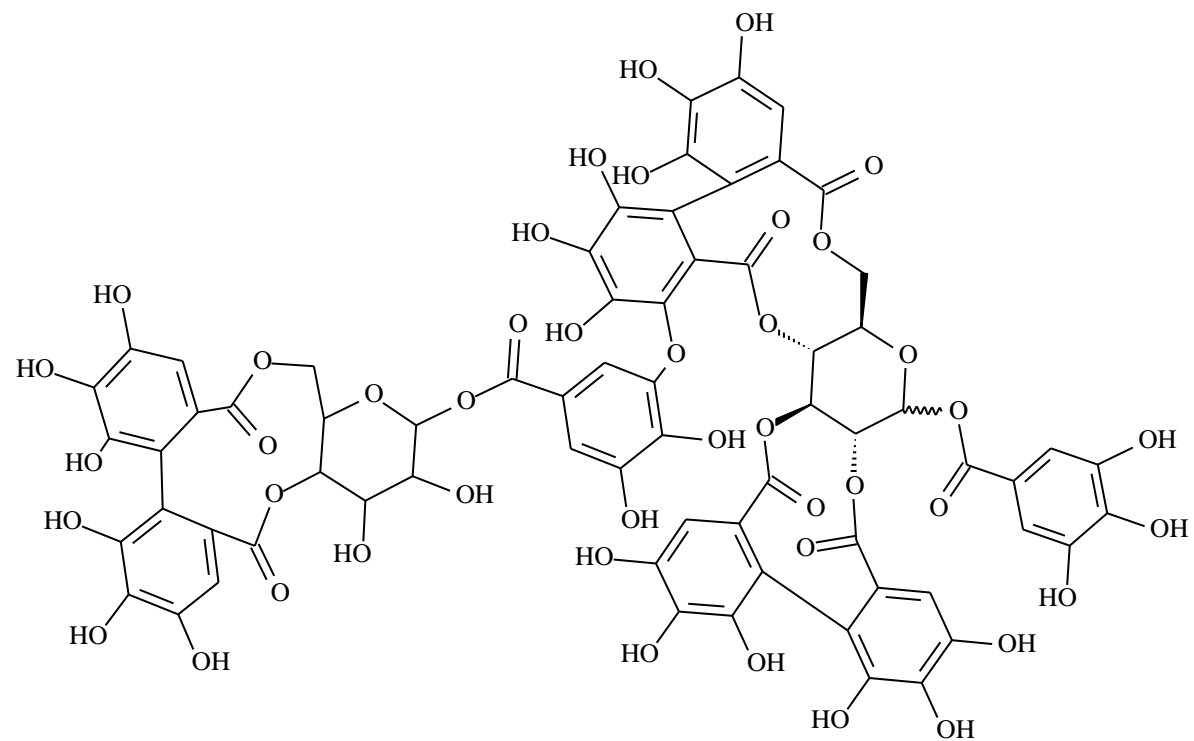
23b sanguina H5



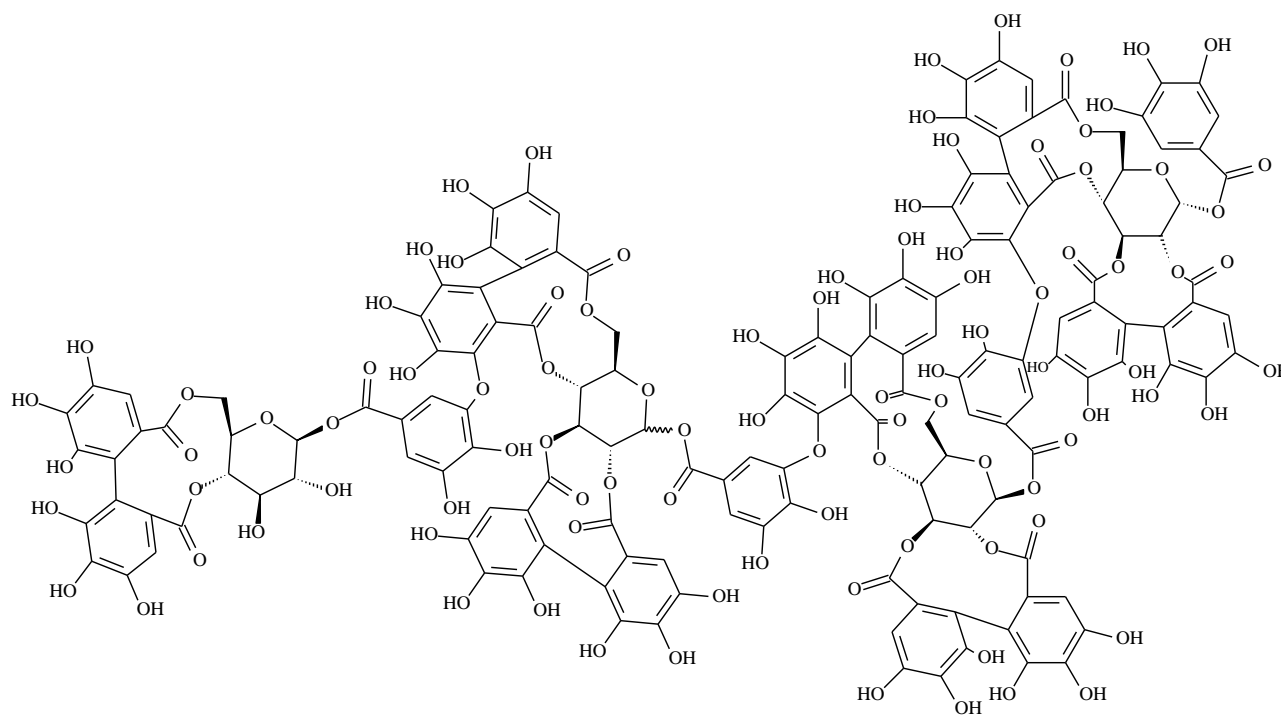
23c roshenina B



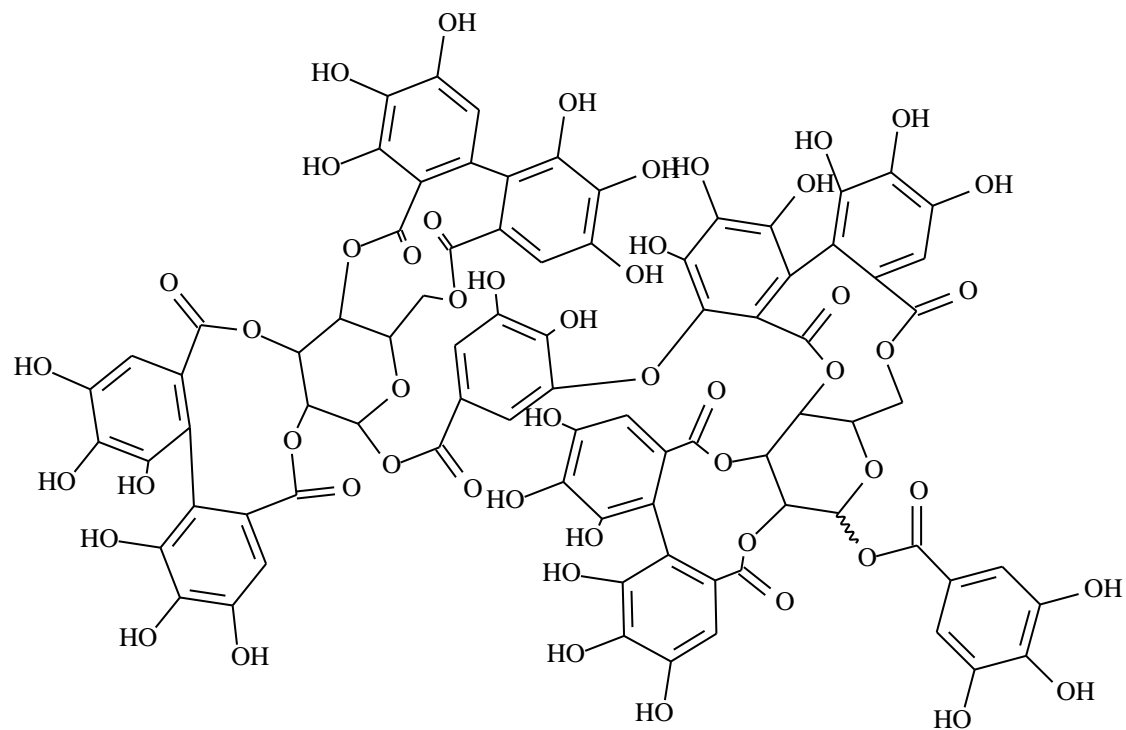
23d sanguina H2





23e sanguina H10

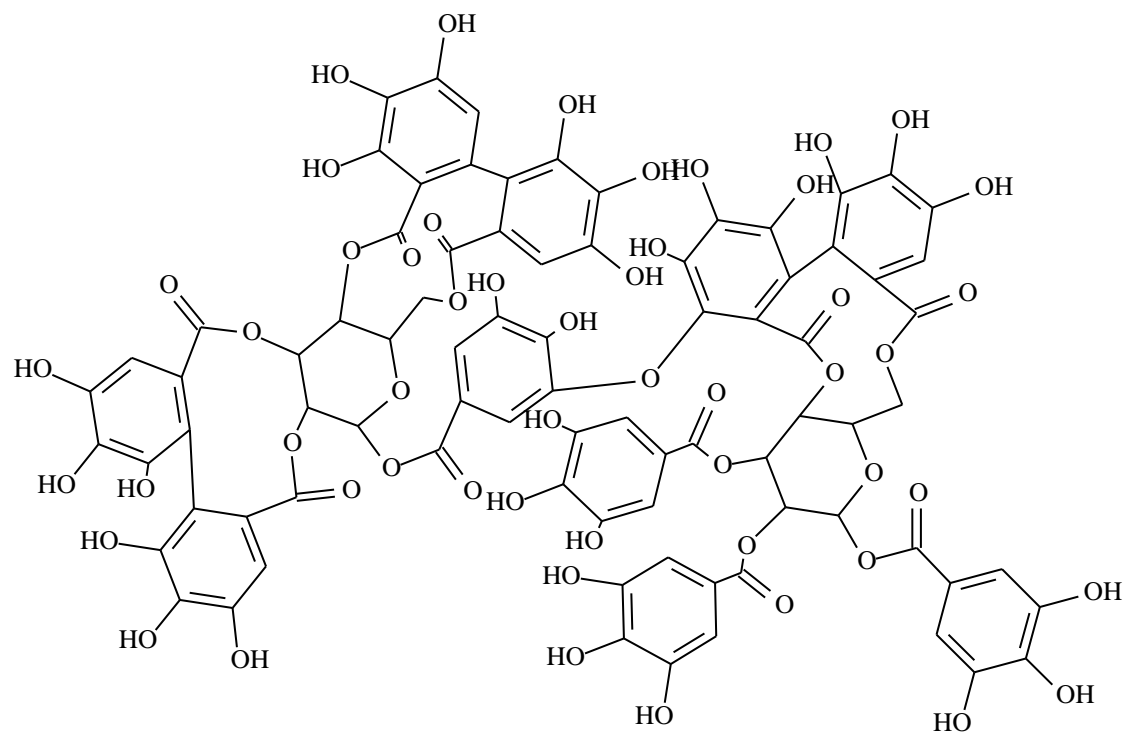


23f sanguina H11

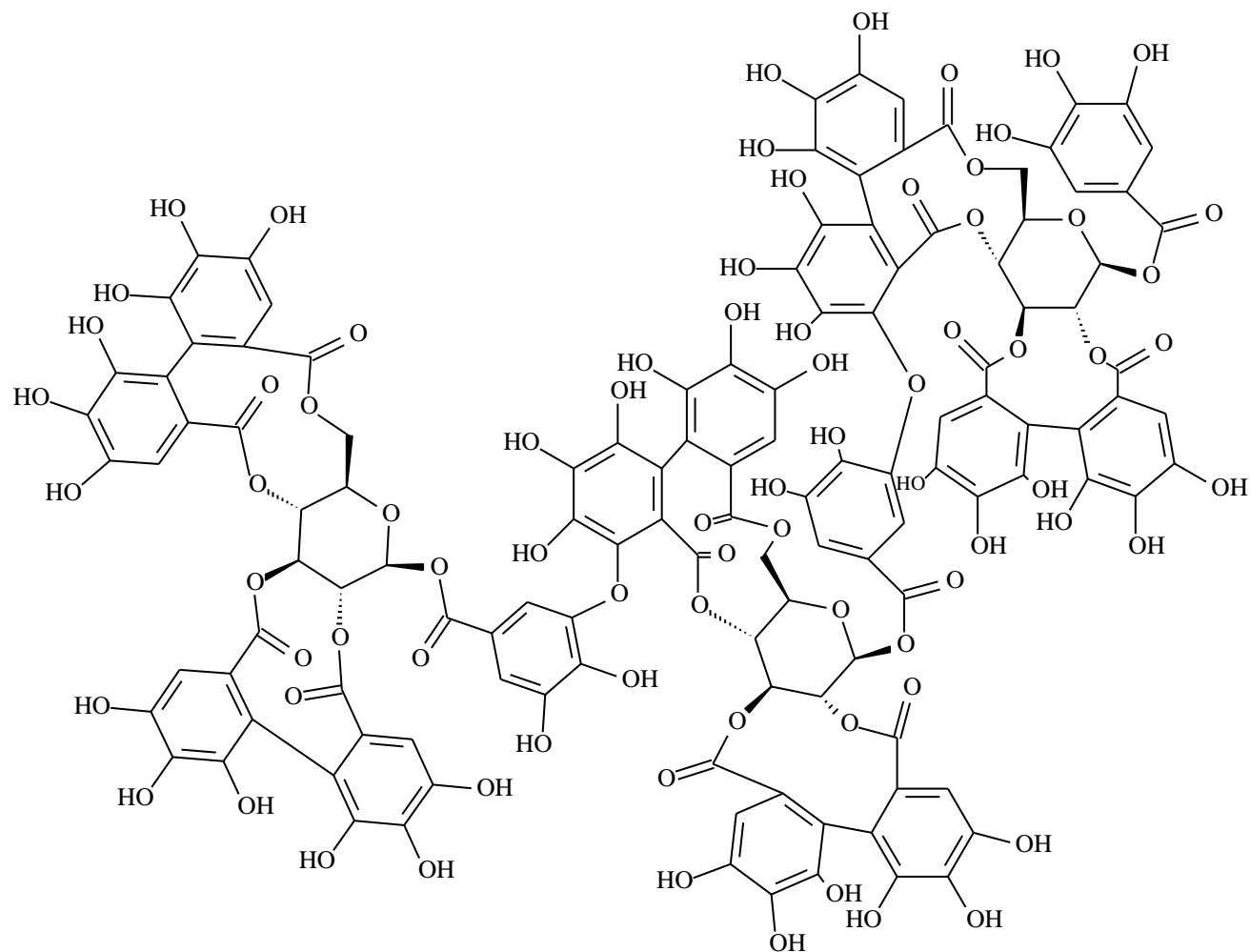


23g  = β lambertianina A

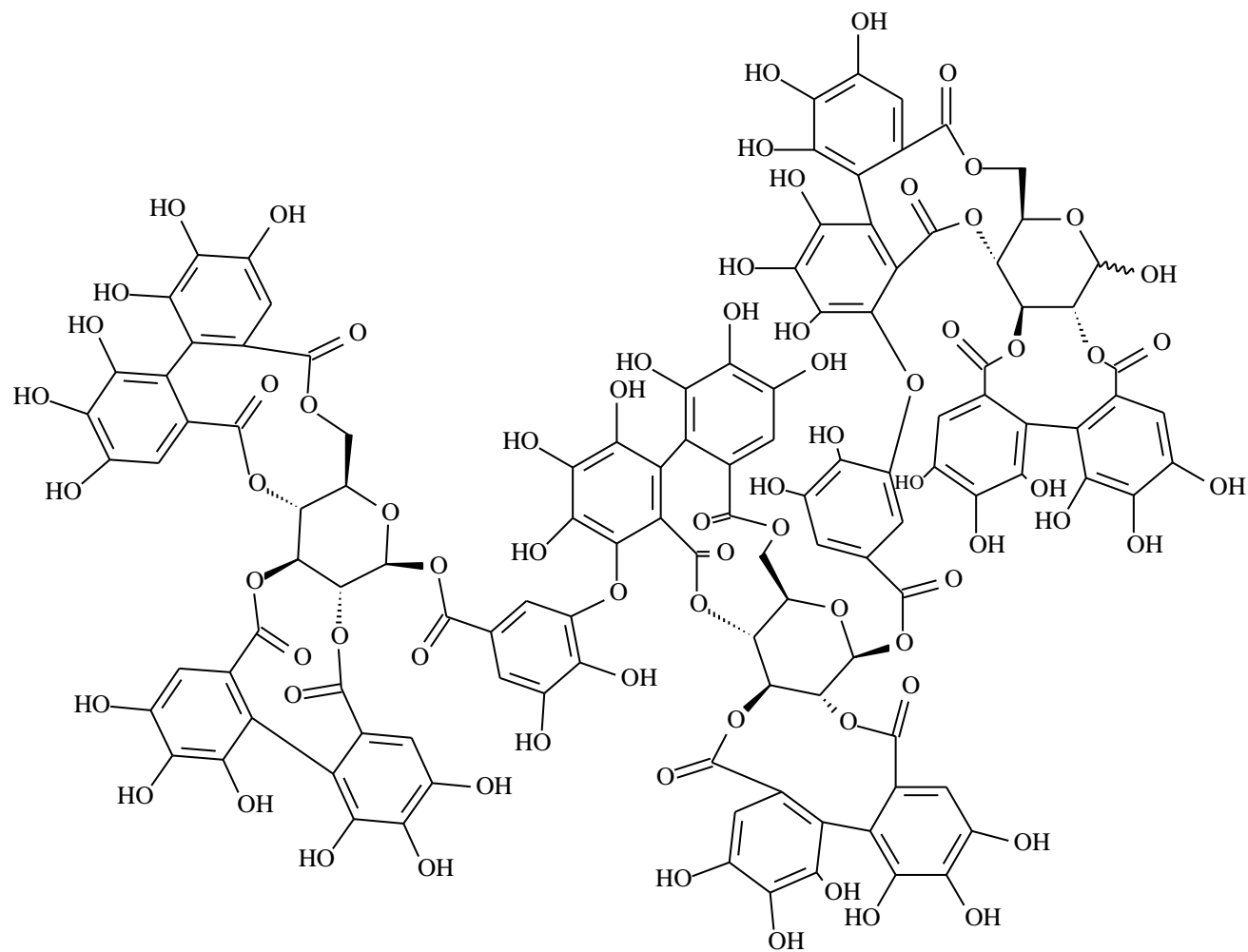
23h  = α sanguina H6



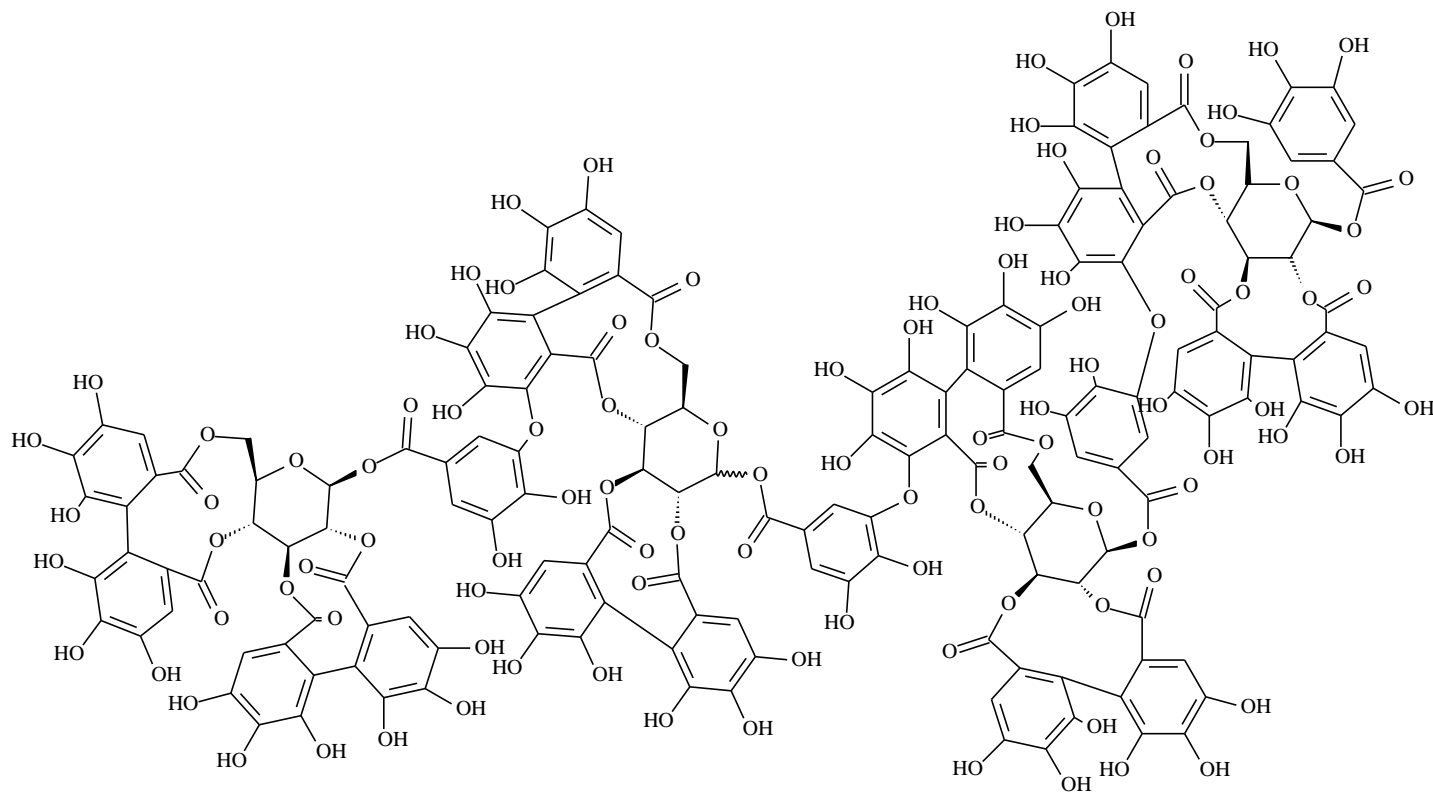
24b rubusuaviina B



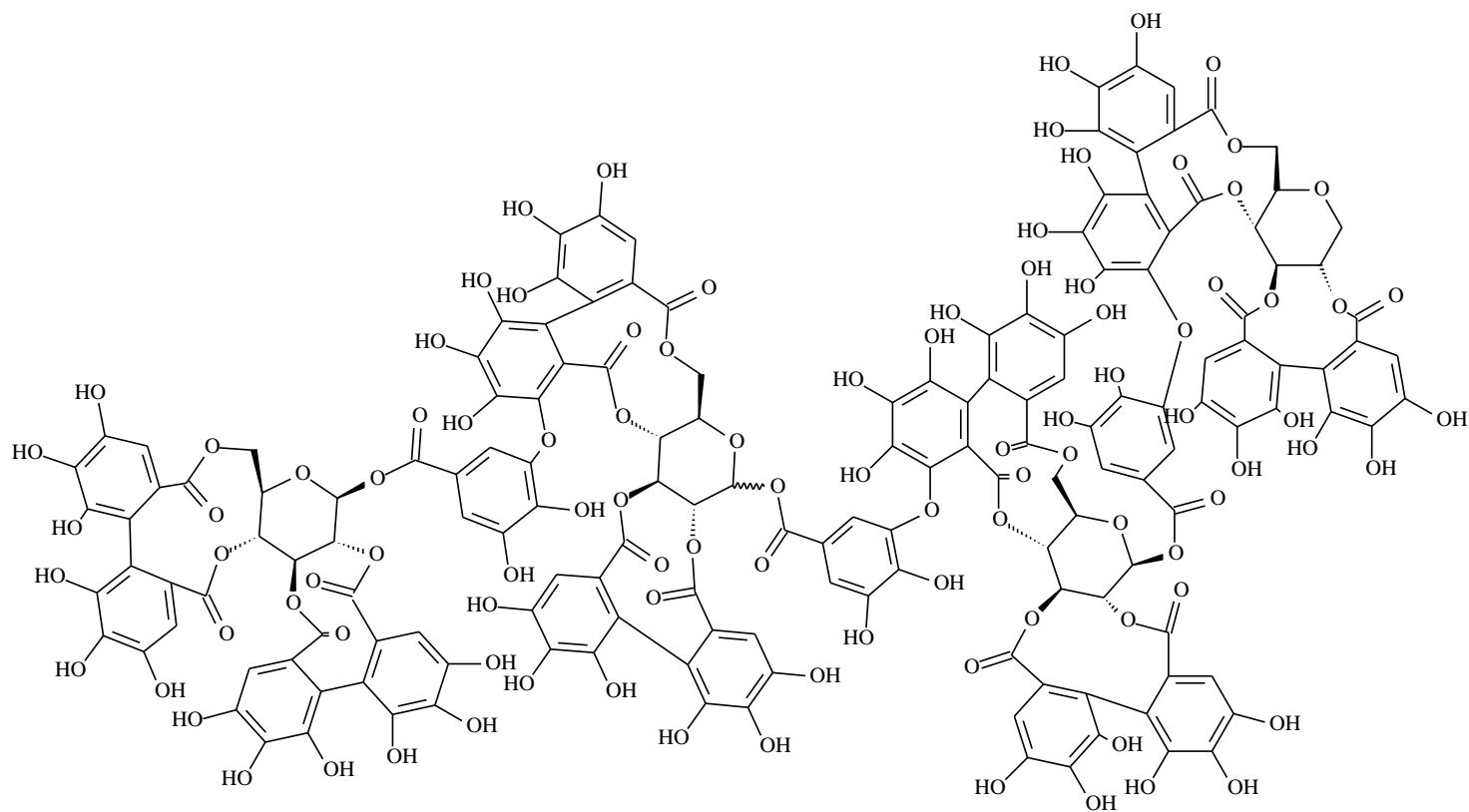
24c rubusuaviina C



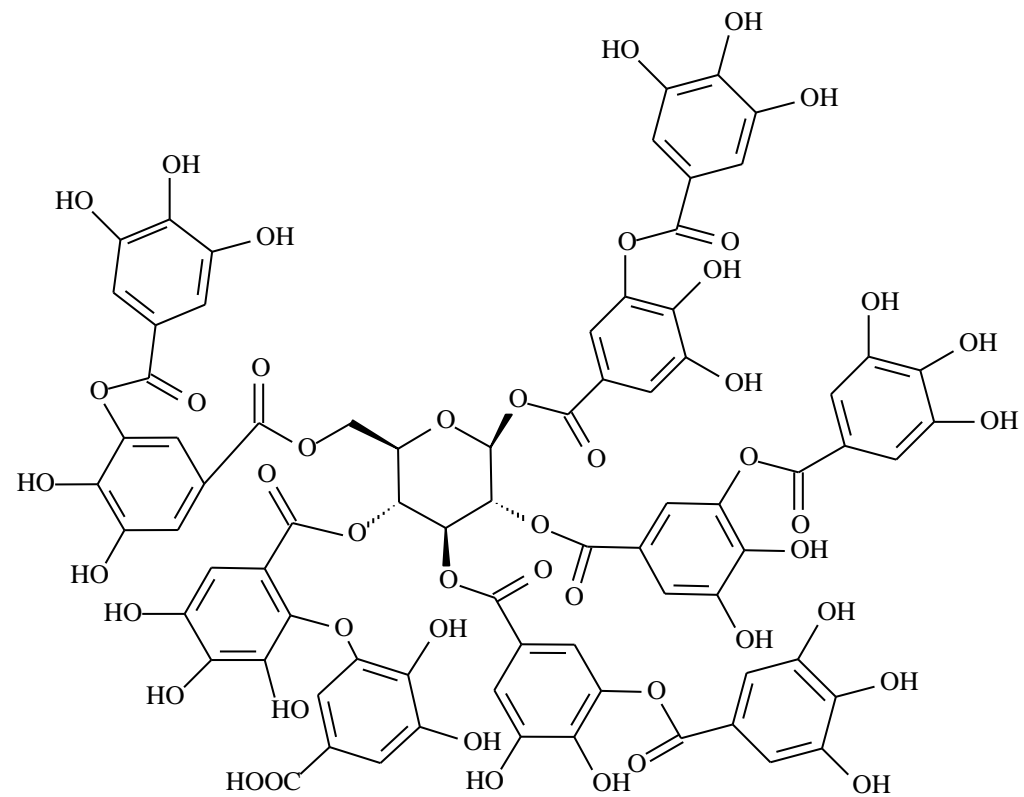
24d rubusuaviina D



24e rubusuaviina E

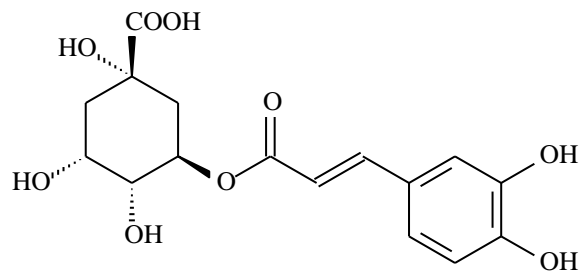


24f rubusuaviina F

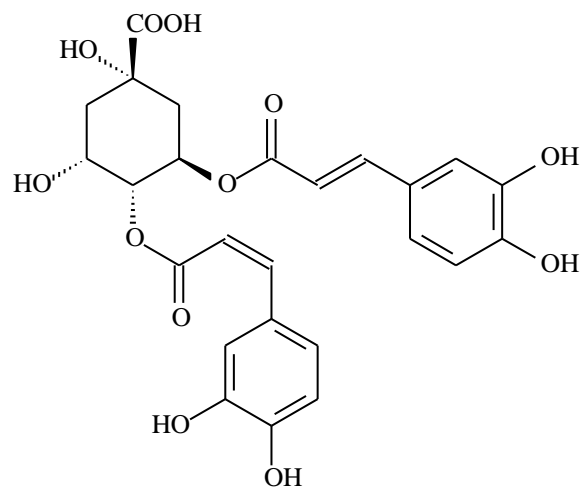


25 ácido tânico

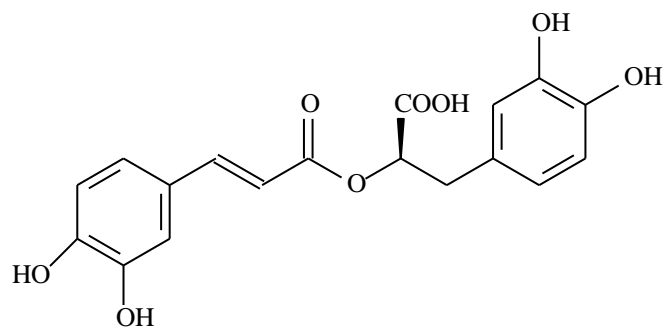
Figura 5: Derivados do ácido cinâmico que apresentam atividade inibitória sobre α -amilase



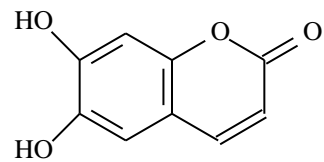
26 ácido clorogênico



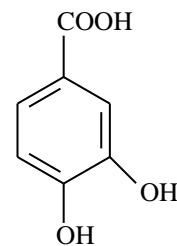
27 ácido isoclorogênico



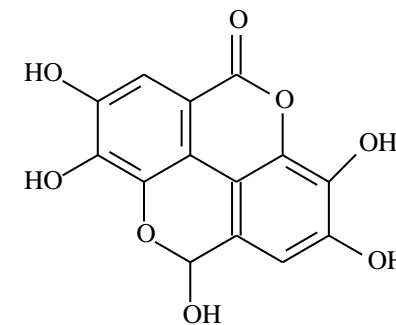
28 ácido rosmarínico



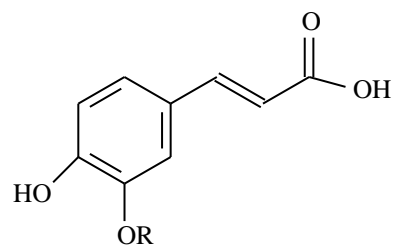
29 esculina



30 ácido protocatéquico



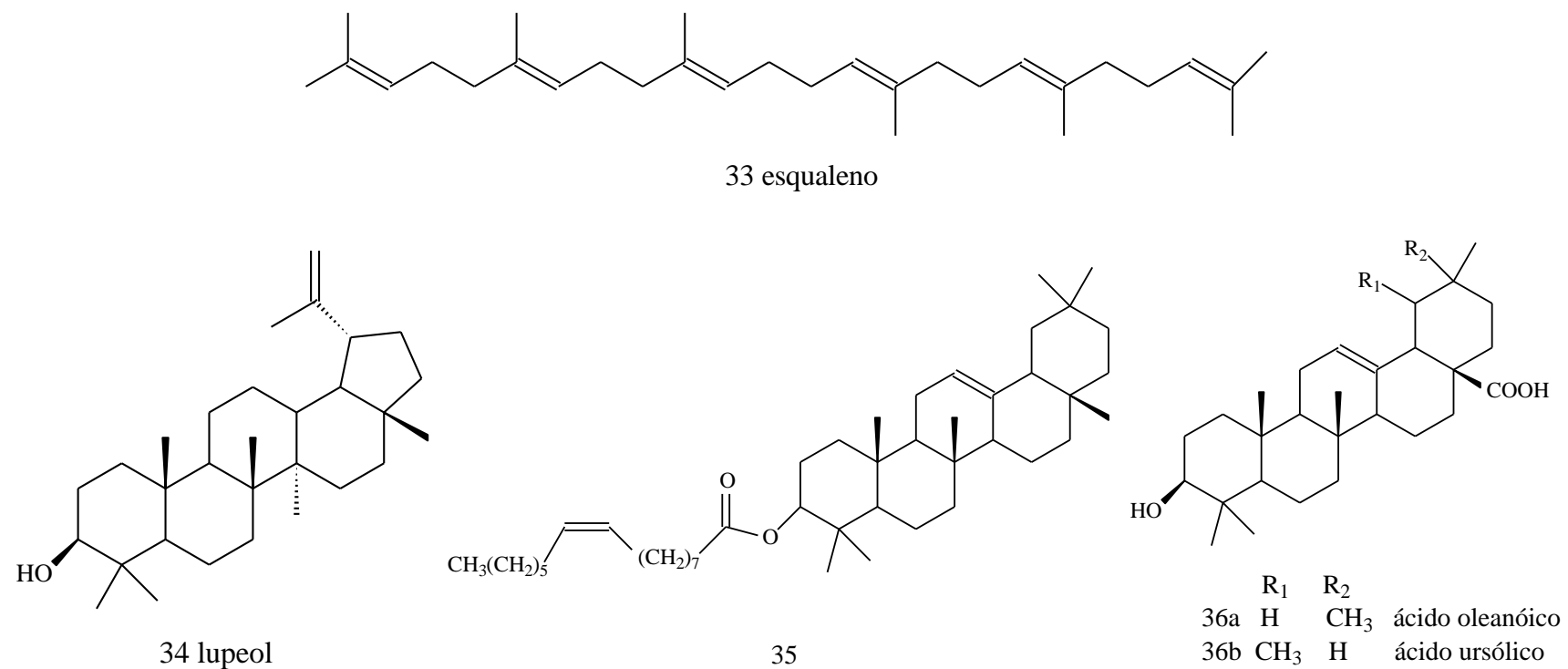
31 ácido elágico

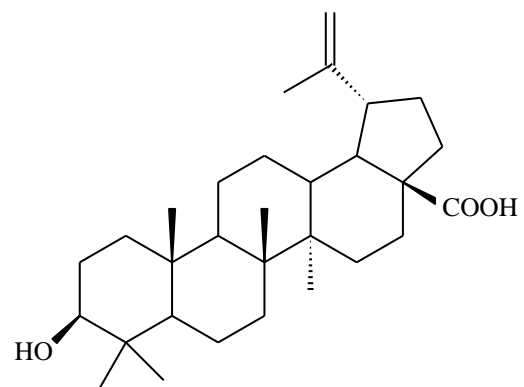


R

32a H ácido cafeico

32b CH₃ ácido ferúlico

Figura 6: Terpenos que apresentam atividade inibitória sobre α -amilase



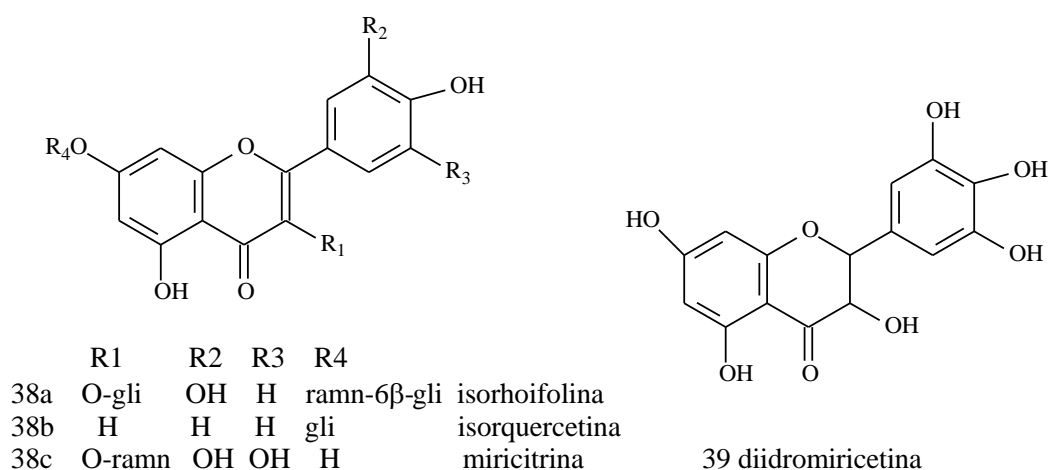
37 ácido betulínico

2.3. Constituintes químicos e atividades biológicas de frutos da família Sapotaceae

A família Sapotaceae compreende cerca de 75 gêneros e 800 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais, sendo que 12 deles, com cerca de 103 espécies, são encontrados no Brasil (77, 78).

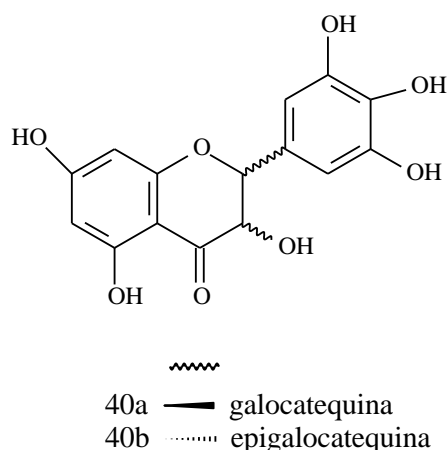
Poucas referências são encontradas quanto às atividades biológicas ou aos metabólitos secundários de frutos pertencentes a espécies da família Sapotaceae, apesar de várias espécies produzirem frutos comestíveis amplamente consumidos pela população, como por exemplo, *Pouteria caimito* (abiu), *P. macrocarpa* (cutito), *P. macrophyla* (caimo), *P. sapota* (sapota, sapoti, sapotilha), *Manilkara zapota* cv.

O estudo do óleo essencial isolado da polpa do fruto de *Argania spinosa* L. identificou a presença de 1,8-cineol, cânfora, 2-(4-metilciclohex-3-enil)-propan-2-ol, como constituintes mais abundantes, indicando a utilização do óleo essencial como repelente de insetos (79). Ainda da polpa do fruto foram identificados os compostos polifenólicos rutina [3d], hesperidina [13c], isoroifolina [38a], quercetina [3c] e derivados, naringenina [13a], luteolina [9a], catequina [16a], epicatequina [16b] e ácido gálico [2] (80).



A análise do óleo concentrado obtido das sementes *Argania spinosa* L. identificou, como componentes mais abundantes, os ácidos palmítico, oléico, linoléico e esteárico, além da presença de tocoferol e outros compostos polifenólicos. Devido à sua composição rica em ácidos graxos e compostos antioxidantes, o óleo vem sendo amplamente utilizado na indústria dermocosmética em preparações cosméticas para uso cutâneo e capilar (81).

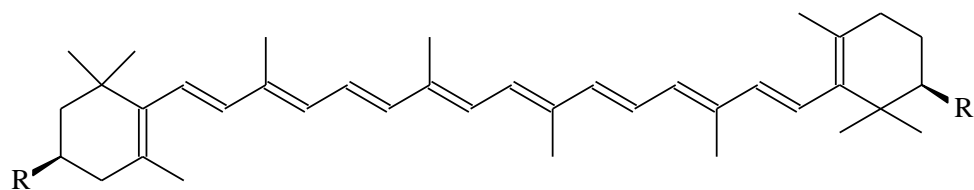
A avaliação da composição fitoquímica de frutos frescos da espécie *Chrysophyllum cainito* L. permitiu a identificação dos compostos polifenólicos catequina [16a], epicatequina [16b], galocatequina [40a], epigalocatequina [40b], quercetina [3a], quercetrina [3c], isoquercetrina [38b], miricitrina [38c] e ácido gálico [2], responsáveis pela capacidade antioxidante *in vitro* apresentada pelo extrato (82). A presença de ácido gálico [2] foi também relatada em frutos de *Mimusops elengi* L. (83).



Compostos com capacidade antioxidante, *in vitro*, foram identificados na fração acetato de etila dos extratos brutos dos frutos frescos de *P. sapota* e *P. viridis*, sendo eles: ácido gálico [2], galocatequina [40a], catequina [16a], epicatequina [16b], diidromiricetina [39], catequina-3- *O*- galato [16c] e miricitrina [4d].

Carotenoides e compostos fenólicos foram quantificados e identificados por CLAE-EM no extrato bruto dos frutos de *P. sapota* Jacq. H. E. Moore & Stearn, sendo descritos como os mais abundantes o β -caroteno [41a], luteína [41b], violaxantina [42] e os ácidos benzoicos {principalmente ácidos ρ -hidroxibenzoico [44], protocatéuico[30] e gálico [2]} (84, 85). Em ensaios de avaliação da capacidade

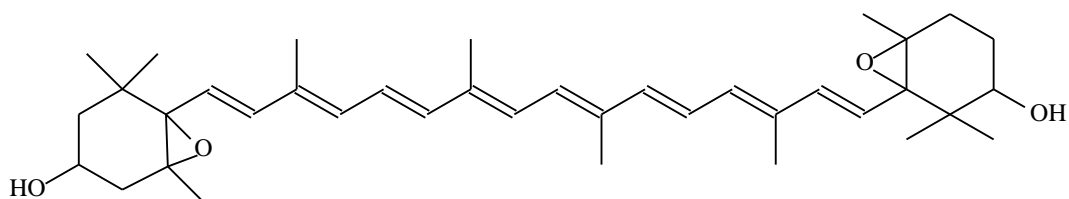
antioxidante foi possível identificar a fração hidrofílica, obtida a partir do extrato bruto, como a mais ativa frente aos métodos usados (85).



R

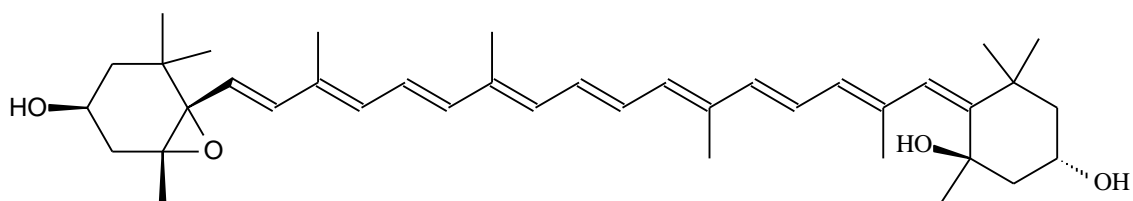
41a H β -caroteno

41b OH luteína

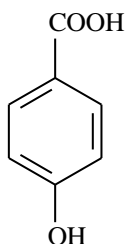


42 violaxantina

Os carotenoides violaxantina [42] e neoxantina [43] foram identificados, como mais predominantes, na polpa do fruto de *P. campechiana* (Kunth) Baehni (86). Ácido gálico [2] e catequina [16a] foram também isolados da fração acetona do extrato bruto dos frutos frescos dessa espécie (87).

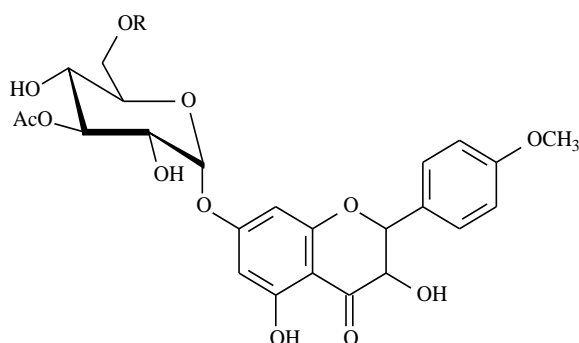


43 neoxantina



44 ácido p-hidroxibenzoico

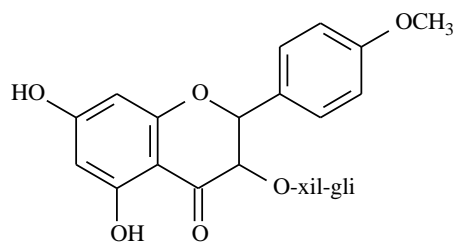
A presença dos flavonoides glicosilados *2R,3R-4'O*-metildiidrokaempferol-7-*O*-[3"-*O*-acetil]- β -D-glicopiranosídeo [**45a**], *2R,3R-4'O*-metildiidrokaempferol-7-*O*- β -D- β -L-xilopiranosil-(1" \rightarrow 6")-[3"-*O*-acetil]- β -D-glicopiranosídeo [**45b**], *2R,3R-4'O*-metildiidrokaempferol-3-*O*- β -D- β -L-xilopiranosil-(1" \rightarrow 6")-[3"-*O*-acetil]- β -D-glicopiranosídeo [**46**], além de ácido gálico [**2**] foi identificada em extratos de frutos secos de *P. obovata* (88).



R

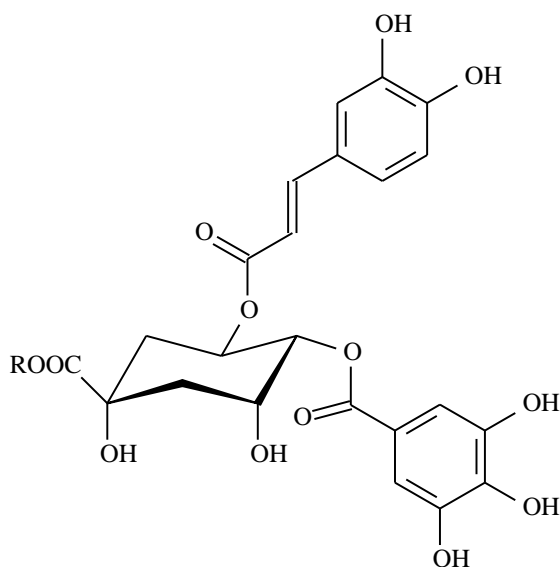
45a H *2R,3R,4'O*-metildiidrokaempferol-7-*O*-[3"-*O*-acetil]- β -D-glicopiranosídeo45b xil *2R,3R,4'O*-metildiidrokaempferol-7-*O*- β -L-xilopiranosil-(1" \rightarrow 6")-[3"-*O*-acetil]- β -D-glicopiranosídeo

É importante destacar que na referência original os autores denominaram o composto **46** como *2R,3R-4'O*-metildiidrokaempferol-3-*O*- β -D- β -L-xilopiranosil-(1" \rightarrow 6")-[3"-*O*-acetil]- β -D-glicopiranosídeo (88). Contudo, no mesmo trabalho, nos dados de RMN apresentados não foi possível observar valores de deslocamento químico para os carbonos do grupo acetila.



46 2R-3R-4'-O-metildiidrokaemferol-7-O- β -D- β -L-xilopiranosil-(1''' \rightarrow 6'')- β -D-glicopiranosídeo

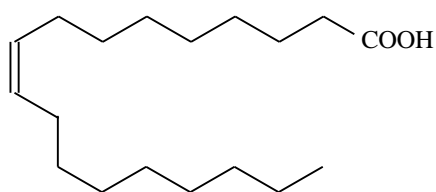
A análise de extratos dos frutos frescos de *Manilkara zapota* cv levou à caracterização dos compostos polifenólicos clorogenato de metila, diidromiricetina [4d], quercetina [3a], miricetina [4d], catequina [16a], epicatequina [16b], galocatequina [40a] e ácido gálico [2], além dos compostos 4-*O*-galoilclorogenato de metila e ácido 4-*O*-galoilclorogênico. Alta capacidade antioxidante e atividade citotóxica, em ensaio de citotoxicidade nas linhagens celulares humanas HCT-116 e SW-480 (células de carcinoma de cólon) foram identificadas nos compostos ácido 4-*O*-galoilclorogênico [47a] e 4-*O*-galoilclorogenato de metila [47b] e] (89).



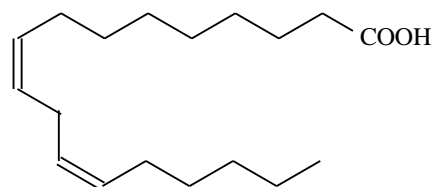
- R
 47a H ácido 4-*O*-galoilclorogênico
 47b CH₃ 4-*O*-galoilclorogenato de metila

A correlação entre a atividade inibitória da enzima α -glicosidase e a quantidade de compostos fenólicos foi avaliada para o extrato aquoso da polpa do fruto de *P. lucuma*, *in vitro*. Os resultados apontaram que apesar de não ter sido possível a identificação de compostos fenólicos pelo método CLAE-EM, no referido extrato, sua capacidade de inibição enzimática foi em torno de 85% (90).

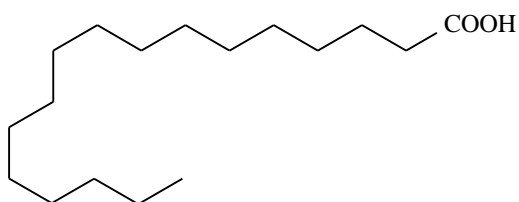
Estudo químico dos ácidos graxos obtidos das sementes dos frutos de *Madhuca longifolia* (Koenig) permitiu a identificação dos ácidos oleico [48], linoleico [49], esteárico [50] e palmítico [51] como mais abundantes; foram ainda caracterizados β -sitosterol [52] e δ -tocoferol [53] (91).



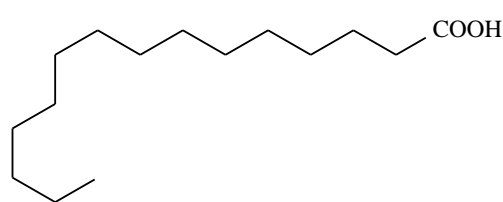
48 ácido oleico



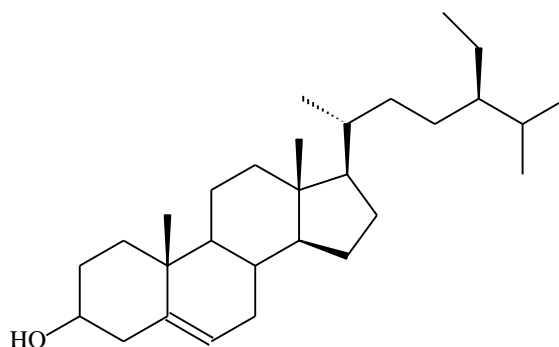
49 ácido linoleico

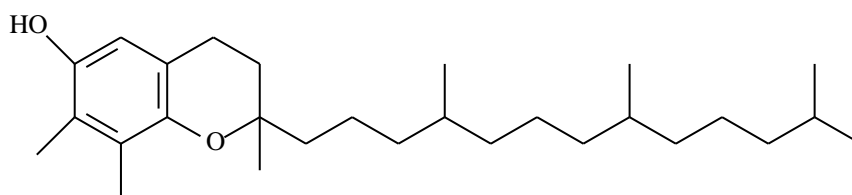


50 ácido esteárico



51 ácido palmítico

52 β -sitosterol

53 γ -tocoferol

Com isso, considerando que até o presente momento, não há referências, quanto à fitoquímica e potenciais atividades biológicas de frutos frescos de *P. torta* (Mart.) Ralck, e a grande importância da espécie no bioma do Cerrado, torna-se relevante seu estudo visando possível desenvolvimento de novo agente terapêutico.

3. JUSTIFICATIVA

Considerando que:

1. As plantas medicinais são largamente utilizadas por indivíduos portadores de diferentes doenças, sobretudo as crônicas, de tratamento difícil e/ou demorado, no intuito de que os sintomas sejam minimizados.
2. A ampla biodiversidade da flora brasileira, em especial a vegetação do Cerrado, apresenta um potencial ainda inexplorado para a realização de estudos que identifiquem atividades terapêuticas de substâncias fitoativas.
3. Existe uma necessidade de conhecimento das características químicas e atividades biológicas de espécies vegetais do Cerrado, com o intuito de serem determinados padrões de qualidade em atendimento à legislação para produção e comercialização de fitofármacos, pois muitas espécies brasileiras são utilizadas como medicinais, baseando-se tão somente nas informações etnomedicinais, sem que haja comprovação das atividades farmacológicas preconizadas ou sua composição química, bem como sem uma metodologia eficiente para o Controle da Qualidade.

Os seguintes objetivos são propostos:

4. OBJETIVO

Avaliar a atividade inibidora enzimática, por ensaio de atividade de inibição da α -amilase, do epicarpo de fruto de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk, por meio de um estudo biomonitorado.

4.1. Objetivos específicos

- Determinar a composição micromolecular do extrato bruto do epicarpo de fruto de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk por meio de técnicas espectrométricas e cromatográficas.
- Caracterizar a(s) fração(ões) ou substância(s) isolada(s) da espécie em questão responsável(eis) pela atividade de inibição enzimática.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Reação de acetilação

Em um balão de fundo redondo, contendo 100 mg de amostra, foram adicionados 4 mL de anidrido acético e 2 mL de piridina e a mistura foi mantida sob agitação. Após 1 hora, foram adicionados mais 4 mL de anidrido acético e 2 mL de piridina e a reação foi acompanhada por CCD, sendo agitada periodicamente e após 48 horas a reação se completou. Após esse período foram adicionados, ao balão, aproximadamente 200 mL de gelo triturado. A mistura foi transferida para um funil de separação e foram adicionados 200 mL de diclorometano, procedendo-se a separação das fases. A fração acetilada foi seca com Na₂SO₄ anidro e após filtração o solvente foi retirado por destilação a vácuo (92).

5.2. Cromatografia em camada delgada (CCD)

5.2.1. Fase estacionária (FE):

- Placas de sílica gel 60G (Merck), preparadas em suporte de vidro, com 0,25 mm de espessura (analítica) previamente ativadas a 105°C.
- Placas de sílica gel 0,2 mm Kieselgel 60 ALUGRAM SIL G. (MACHEREY-NAGEL).

5.2.2. Fase móvel:

FM1: AcOEt: HCO₂H: CH₃COOH: H₂O (100: 10: 10: 15)

FM2: AcOEt: HCO₂H: CH₃COOH: H₂O (100: 10: 10: 20)

FM3: CHCl₃: MeOH: H₂O (70: 30: 5)

FM4: AcOEt: propanol (7: 3)

FM5: AcOEt: HCO₂H: CH₃COOH: H₂O (100: 10: 10: 8)

FM6: MeOH: CHCl₃ (1: 1)

FM7: CHCl₃

FM8: AcOEt: HCO₂H: CH₃COOH: H₂O (100: 6: 6: 4)

FM9: AcOEt : HCO₂H (100:2)

FM10: Hexano: CH₂Cl₂ (8:2)

FM11: AcOEt: HCO₂H: CH₃COOH: H₂O (100: 11: 11: 26)

5.3. Reveladores (93)

5.3.1. R1 – Solução ácida de anisaldeído

Reagente para detecção de esteroides, prostaglandinas, carboidratos, fenóis, glicosídeos, sapogeninas, terpenos de modo geral (óleos essenciais), antibióticos, micotoxinas.

Solução A: Solução de anisaldeído em ácido acético 2%.

Solução B: Solução etanólica de H₂SO₄ 20%.

A cromatoplaça foi borrifada com a solução A, em seguida, com a solução B e foi então aquecida à temperatura de 100°C. Revelador geral.

5.3.2. R2 – Reagente NP/PEG

Reagente para detecção de flavonoides e outras substâncias fenólicas pela intensificação da fluorescência.

Solução A: solução metanólica de difenilboriloxietilamina 2%.

Solução B: solução etanólica de polietilenoglicol – 400 (PEG 400) 5%.

A cromatoplaça foi borrifada com a solução A, em seguida com a solução B e observada sob luz ultravioleta ($\lambda = 365$ nm).

5.3.3. R3 – reagente vanilina 1%

Reagente para detecção de esteroides, triterpenos, prostaglandinas e saponinas.

Solução A: solução etanólica de vanilina a 1%.

Solução B: solução etanólica de H_2SO_4 a 5%.

A cromoplaça foi borrifada com a solução A, em seguida, com a solução B e foi então aquecida à temperatura de 100 °C.

5.3.4. R4 – radiação ultravioleta

A cromatoplaça foi sistematicamente analisada sob luz ultravioleta ($\lambda = 365$ nm).
Detecção de substância contendo grupos cromóforos.

5.4. Cromatografia em coluna (CC)

5.4.1. Exclusão em gel Sephadex

O sephadex (Sephadex TM LH-20 Amersham Biosciences) foi suspenso no solvente utilizado como fase móvel, mantido em repouso por 24 horas e empacotado em coluna de vidro até total decantação do gel. A coluna foi mantida sob repouso por 24

horas. A amostra foi dissolvida em quantidade suficiente do eluente e então aplicada no topo da coluna que foi, em seguida, eluída até completo esgotamento.

5.4.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises por CLAE foram realizadas em equipamento da marca Hitachi Lachrom Elite e utilizados os detectores arranjo diodos (DAD) e índice de refração (IR). As amostras foram dissolvidas em solvente apropriado e filtradas.

- métodos analíticos:

CLAE 01: coluna: Lichrospher 100 NH₂, 250 mm x 4,0 mm (HP 5 µm) mantida a 30°C; fluxo: 1mL/min; eluente: bomba A (acetonitrila), bomba B (água); detector: por índice de refração (IR); sistema de eluição: isocrático; programa de eluição: bomba A: bomba B (80:20).

CLAE 02: coluna: LichroCART 150-4,6 Purospher STAR RP 18e (5µm); Pré-coluna: LichroCART 4-46 Purospher STAR RP 18e (5µm); fluxo: 0,6mL/min; eluente: bomba A (água, acidificada com 1% de solução de ácido fosfórico 0,1M), bomba B (acetonitrila); detector: DAD; intervalo de análise: 230-400 nm; sistema de eluição: gradiente.

Programa de eluição:

Tempo (min)	Bomba A (%)	Bomba B (%)
0	90	10
40	70	30
50	50	50
55	90	10

5.5. Análises espectrométricas

5.5.1. Espectrometria no infravermelho (IV)

O espectro foi obtido no espectrofotômetro Bomem Hartmann & Braun MB – 100 (Alemanha), com as frequências vibracionais expressas em cm^{-1} .

As amostras foram analisadas em pastilhas preparadas com brometo de potássio (KBr) (Instituto de Química – IQ – UnB, realizada pela Profa. Inês Sabioni Resck).

5.5.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C foram obtidos à temperatura ambiente no espectrômetro Varian Mercury Plus (300MHz, 7,04T, E.U.A), utilizando sondas de detecção ATB e SW de 5 mm de diâmetro interno. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm, os acoplamentos escalares em hertz (Hz) e os solventes deuterados foram D_2O , CD_3OD e CDCl_3 , com TMS (tetrametilsilano) e DSS como referências internas (Instituto de Química – IQ – UnB, realizada pela Profa. Inês Sabioni Resck).

5.6. Ensaio biológicos

5.6.1. Atividade citotóxica

- **Toxicidade a larvas de *Artemia salina* (94)**

- **Preparação da solução salina:** Uma solução de sal marinho sintético (36 g/L) foi preparada e ajustada, com uma solução 0,1 M de NaOH até pH 8-9. Essa solução foi utilizada para a eclosão dos ovos de *A. salina* e para o preparo das diluições do extrato bruto hidroalcoólico e algumas frações dos epicarpos frescos do fruto de *Pouteria torta*.

- **Eclosão dos ovos:** os ovos de *A. salina* foram postos em solução salina aquosa com aeração constante e expostos à luz diurna por 48 horas para eclodir.

- **Preparação das diluições seriadas:** As amostras foram solubilizadas em 0,2 mL de DMSO e o volume completado para 20 mL com solução salina (1000 ppm). Desta solução foram preparadas diluições seriadas (500, 250 e 125 ppm) em triplicata. Em cada tubo foram adicionadas 10 larvas de *A. salina*.

- **Controle positivo:** Uma amostra de 2,00 mg/mL de dicromato de potássio foi submetida a mesma condição teste da amostra a ser analisada.

- **Controle negativo:** Tubos contendo 0,2 mL de DMSO e 10 larvas de *A. salina*, nas mesmas condições da amostra a ser analisada.

- **Bioensaio:** Os tubos foram mantidos sob iluminação e, após 24 horas, as larvas sobreviventes foram contadas. O cálculo de DL₅₀ foi realizado utilizando o programa PROBITOS[®] (94).

5.6.2. Atividade antioxidante

- **Método de redução do complexo fosfomolibdênio (95)**

A avaliação da capacidade antioxidante desenvolvida neste estudo foi baseada na metodologia descrita por Prieto, Pineda e Aguilar (1999) com algumas modificações (95). A capacidade redutora do complexo de fosfomolibdênio foi avaliada em comparação com a quercetina, ácido ascórbico e 2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol (BHT), compostos de atividade antioxidante conhecida. As absorbâncias foram registradas em espectrofotômetro Shimadzu (UV - 1601) em $\lambda=695$ nm (Laboratório de Farmacologia Molecular da Faculdade de Ciências da Saúde - UnB).

- Reagente

O reagente foi preparado com a mistura de 0,025 L de solução aquosa de fosfato de sódio (Na_3PO_4 , 28 mM), 0,025 L de solução de molibdato de amônio tetraidratado [$(\text{N}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 4 mM] e 0,025 L de solução aquosa de ácido sulfúrico (H_2SO_4 , 0,6 M).

- Substâncias de referência

Ácido ascórbico (Dinâmica): para a construção da curva-padrão foi preparada solução estoque de ácido ascórbico (1 mg/mL) em etanol. A partir dessa solução, foram realizadas diluições nas concentrações de: 0,05; 0,10; 0,20; 0,40; 0,60; e 0,80 mg/mL, em etanol.

2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenol (BHT) (Vetec): para a construção da curva-padrão foi preparada solução estoque de BHT (1 mg/mL) em etanol. A partir dessa solução, foram realizadas diluições nas concentrações de: 0,05; 0,10; 0,20; 0,40; 0,60; e 0,80 mg/mL, em etanol.

Quercetina (amostra gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Lauro E. S. Barata do Laboratório de Produtos Naturais de Instituto de Química da Unicamp): para a construção da curva-padrão foi preparada solução estoque de quercetina (1 mg/mL) em etanol. A partir dessa solução, foram realizadas diluições nas concentrações de: 0,05; 0,10; 0,20; 0,40; 0,60; e 0,80 mg/mL, em etanol.

- Obtenção das curvas de calibração

Em microtubos de centrifuga (Axigen), 0,1 mL da solução estoque e das diluições das substâncias de referência foram adicionadas em 1 mL de reagente, em triplicata. Os tubos foram tampados e mantidos em banho-maria a 95 °C por 90 min. Após este período, as amostras foram deixadas arrefecer até temperatura ambiente. Para o branco do experimento, foi utilizado a mistura 0,1 mL de etanol e 1 mL do reagente mantido sob as mesmas condições acima descrita.

O conteúdo de cada microtubo foi transferido para cubetas de plástico (caminho óptico 1 cm) e analisado sob comprimento de onda 695 nm em espectrofotômetro, previamente zerado com o branco do experimento.

A análise estatística foi realizada utilizando o programa Prisma 5.0 e as curvas-padrão foram construídas pelo método de regressão não linear (curva sigmoidal).

- Construção da curva padrão do ácido ascórbico

A Figura 7 apresenta a curva padrão das concentrações de ácido ascórbico utilizadas. Os valores apresentados referem-se à média das absorbâncias obtidas em cada triplicata e o desvio padrão referente a cada concentração.

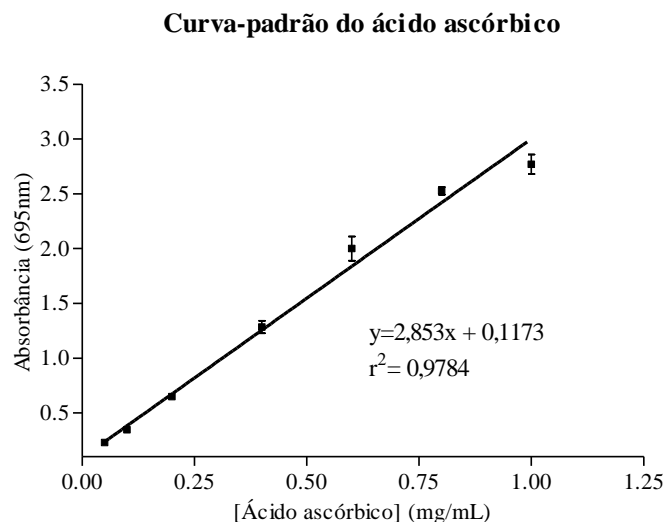


Figura 7: Atividade redutora do ácido ascórbico no método do fosfomolibdênio. Curva padrão construída com a média das absorbâncias de concentrações crescentes do ácido ascórbico. Cada ponto representa a média das absorbâncias \pm desvio-padrão para cada concentração.

- Construção da curva padrão do BHT

A Figura 8 apresenta a curva padrão das concentrações de BHT utilizadas. Os valores apresentados referem-se à média das absorbâncias obtidas em cada triplicata e o desvio padrão referente a cada concentração.

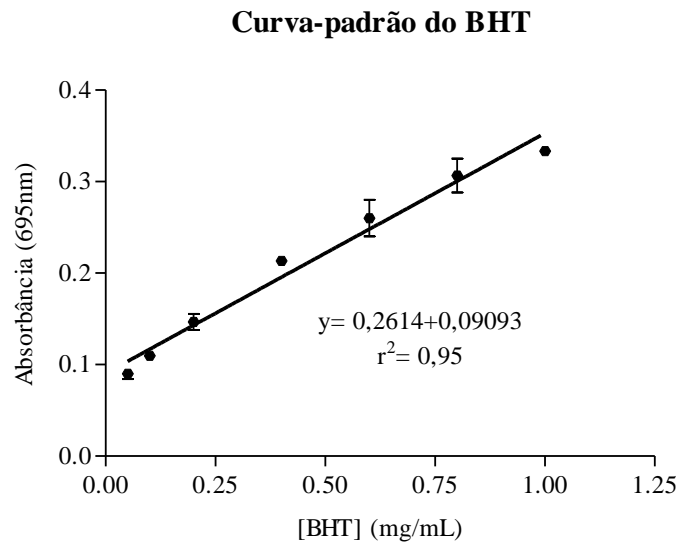


Figura 8: Atividade redutora do BHT no método do fosfomolibdênio. Curva padrão construída com a média das absorbâncias de concentrações crescentes de BHT. Cada ponto representa a média das absorbâncias \pm desvio-padrão para cada concentração.

- Construção da curva padrão de quercetina

A Figura 9 apresenta a curva padrão das concentrações de quercetina utilizadas. Os valores apresentados referem-se à média das absorbâncias obtidas em cada triplicata e o desvio padrão referente a cada concentração.

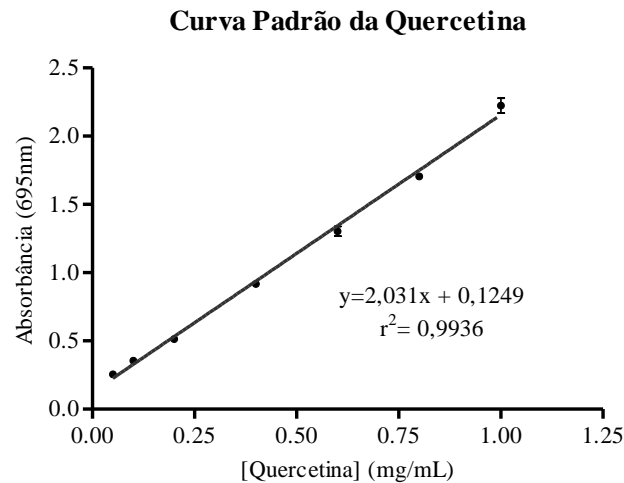


Figura 9: Atividade redutora da quercetina no método do fosfomolibdênio. Curva padrão construída com a média das absorbâncias de concentrações crescentes de quercetina. Cada ponto representa a média das absorbâncias \pm desvio-padrão para cada concentração.

- Teste de atividade antioxidante

Foram preparadas soluções etanólicas das amostras (extrato bruto e frações) na concentração de 1 mg/mL. Uma alíquota de 0,1 mL de cada amostra foi misturada a 1 mL do reagente e foi seguido o mesmo protocolo descrito na obtenção das curvas de calibração com as substâncias de referência.

Para calcular a equivalência dos compostos analisados com relação às substâncias antioxidantes - ácido ascórbico, BHT e quercetina - foram utilizadas as equações das retas obtidas das curvas-padrão. Os valores médios das absorbâncias, dos compostos estudados, obtidos no comprimento de onda de 695 nm foram aplicados às equações das retas e, desta forma, foram obtidas as concentrações relativas aos controles. A equivalência foi calculada dividindo a concentração obtida para o padrão pela concentração usada para os compostos analisados. O resultado é dado em equivalentes de ácido ascórbico, BHT e quercetina.

5.6.3. Atividade de inibição enzimática

A atividade de inibição sobre α -amilase foi determinada usando o método colorimétrico adaptado da Sigma-Aldrich, descrito por Bernfeld (1955) (96).

5.6.3.1. Reagentes e soluções

A. Tampão fosfato de sódio 20 mM com cloreto de sódio 6,7 mM, pH 6,9: A solução tampão foi preparada pela mistura de 45 mL de solução aquosa de fosfato de sódio monobásico (0,2 M), 55 mL de solução fosfato de sódio dibásico (0,2 M), 0,38 g de cloreto de sódio e água destilada (q.s.p) 1000 mL.

B. Solução de amido 1% (Sigma): Foi preparada solução de amido 1% na solução A. Para solubilização, a solução de amido foi mantida em banho maria sob agitação por 15 minutos. Após este período, foi deixada arrefecer, sob agitação, até temperatura ambiente.

C. Reagente DNS: O reagente foi preparado dissolvendo-se, sob agitação constante, 19,8 g de hidróxido de sódio (Vetec), 306,0 g de tartarato de sódio e potássio (Vetec), 8,3 g de bissulfito de sódio (Vetec) e 10,6 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico (Sigma) em 1 L de água destilada. A solução reagente DNS foi mantida acondicionada em frasco âmbar à temperatura ambiente.

D. Solução de α -amilase: Imediatamente antes da utilização, a α -amilase pancreática suína (EC 3.2.1.1, tipo VI, Sigma) foi dissolvida na solução A para obtenção de uma solução contendo α -amilase na concentração de 40 UI/mL.

E. Solução de *Triticum aestivum* (Sigma) (controle positivo): Solução de *Triticum aestivum* (1 mg/mL) foi preparada em água deionizada gelada e mantida sob refrigeração. Em seguida foi contruída curva dose - resposta com as seguintes concentrações finais no teste de inibição: 20; 40; 60; 80; 100; 120 e 140 μ g/mL.

F. Solução de acarbose (Sigma) (controle positivo): Solução de acarbose (1 mg/mL) foi preparada em água destilada. Em seguida, foi construída curva dose - resposta com as seguintes concentrações finais no teste de inibição: 1; 2; 5; 10; 20; 40; 60 e 80 μ g/mL.

5.6.3.2. Preparo das amostras

- **Extrato bruto do epicarpo dos frutos de *P. torta***: Foi preparada solução estoque na concentração de 80,25 mg/mL do extrato hidroalcoólico bruto da espécie estudada em etanol:DMSO (3:1). O extrato bruto foi mantido em contato com o solvente por aproximadamente 24 horas. A partir dessa solução estoque foi realizado teste de inibição com extrato na concentração final de 1 mg/mL e em seguida foi elaborada um curva dose - resposta com concentração final do extrato bruto no teste de inibição: 1000; 500; 250; 125; 62,5 e 31,25 µg/mL.

O mesmo esquema de diluição foi repetido utilizando água destilada na solubilização do extrato bruto, porém foi utilizado logo após preparação.

- **Frações hexânica (FH), acetato de etila (FAET) e aquosa (FA)**: Foram preparadas soluções estoques das frações hexânica, acetato de etila e aquosa na concentração de 6,6 mg/mL em etanol: DMSO (3:1). A partir dessas soluções estoques, as referidas frações foram testadas com concentração final de 125 µg/mL no teste de inibição enzimática.

- **Frações metanólica (FM), acetona (FAC) e insolúvel (FI₂)**: Foram preparadas soluções estoques das frações FM e FAC na concentração de 6,6 mg/mL em etanol:DMSO (3:1). A partir dessas soluções estoques, as referidas frações foram testadas com concentração final de 125 µg/mL no teste de inibição enzimática.

A fração FI₂ foi preparada em etanol: DMSO: H₂O (3: 1: 0,01) na concentração de 6,6 mg/mL (solução estoque). A partir dessa solução estoque, a referida fração foi testada com concentração final de 125 µg/mL no teste de inibição enzimática.

As frações que apresentaram atividade de inibição foram selecionadas para a avaliação do potencial de inibição em diluições seriadas. Foram construídas curvas dose-resposta para cada fração selecionada determinando-se o valor do IC₅₀. A concentração capaz de inibir metade da inibição máxima (IC₅₀) é a medida da eficácia de um composto na função biológica ou bioquímica de inibição.

Foi preparada solução estoque da fração aquosa (FA) na concentração de 6,6 mg/mL em água destilada. A partir dessa solução estoque, foi construída curva dose - resposta com concentração final no teste de inibição: 250; 125; 62,5; 31,25 e 15,62 µg/mL.

Foi construída curva dose - resposta com concentração final no teste de inibição: Para FM e FI₂ concentração de 250; 125; 62,5; 31,25 e 15,62 µg/mL; enquanto para FAC as concentrações de 3,9; 7,81; 15,62; 31,25; 62,5; 125 e 250 µg/mL.

A curva de inibição foi obtida construindo um gráfico com a porcentagem de inibição versus o logaritmo da concentração do inibidor. Para tanto, foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.0.

5.6.3.3. Teste de inibição da α -amilase

- Ensaio enzimático

A. Pré-incubação: Em tubo de ensaio foram misturados 2 mL de tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 6.9) contendo cloreto de sódio 6.7 mM e 100 µL da solução de α -amilase. Os tubos foram mantidos a 25°C por 30 min. Após esse período segue para o ensaio enzimático.

B. Ensaio enzimático: Depois da pré-incubação, 0,5 mL do pré-incubado (item A) foi misturado a 1 mL de solução de amido 1% e 0,5 mL tampão fosfato de sódio 20 mM. Os tubos foram incubados a 40°C por 20 min. Após o período determinado, a reação foi interrompida com a adição de 1 mL de solução do reagente DNS. As amostras foram então aquecidas em ebulição por 5 minutos e resfriadas a temperatura ambiente. A mistura de reação foi diluída adicionando 9 mL de água destilada. A atividade da α -amilase foi determinada pela absorbância em espectrofotômetro a 540 nm.

Concentrações finais no ensaio: Em 2 mL da mistura, as concentrações finais foram 0,5% (p/v) do amido e 1 UI/mL de enzima.

- Ensaio de inibição enzimática

A. Pré-incubação: Em tubo de ensaio, 40 µL de inibidor/amostras foram misturados a 2 mL de tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 6,9) contendo cloreto de sódio 6,7 mM e 100 µL da solução de α -amilase. Os tubos foram mantidos a 25°C por 30 min. Após esse período, segue para ensaio de inibição enzimática.

B. Ensaio de inibição enzimática: Depois da pré-incubação, 0,5 mL do pré-incubado (item A) foi misturado a 1 mL de solução de amido 1% e 0,5 mL tampão fosfato de sódio 20 mM. Os tubos foram incubados a 40°C por 20 min. Após o período determinado, a reação foi interrompida com a adição de 1 mL de solução do reagente DNS. As amostras foram então aquecidas em ebulição por 5 minutos e resfriadas à temperatura ambiente. A mistura de reação foi diluída adicionando 9 mL de água destilada. A atividade da α -amilase foi determinada pela absorbância em espectrofotômetro a 540 nm.

Concentrações finais no ensaio: Em 2 mL da mistura, as concentrações finais foram 0,5% (p/v) do amido e 1 UI/mL de enzima.

C. Branco do substrato: Em tubo de ensaio, 1 mL de solução de amido 1% foi misturado a 1 mL de tampão fosfato de sódio 20 mM. Os tubos foram incubados a 40°C por 20 min. Após o período determinado, a reação foi interrompida com a adição de 1 mL de solução do reagente DNS. As amostras foram então aquecidas em ebulição por 5 minutos e resfriadas à temperatura ambiente. A mistura de reação foi diluída adicionando 9 mL de água destilada. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro a 540 nm.

D. Branco dos extratos e frações: Em tubo de ensaio, 40 μ L da solução estoque de extrato/ frações foram misturados a 2 mL de tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 6,9) contendo cloreto de sódio 6,7 mM. Os tubos foram mantidos a 25°C por 30 min. Após esse período, 0,5 mL dessa solução foi adicionada a 1 mL de solução de amido 1% e 0,5 mL tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 6,9). Os tubos foram incubados a 40°C por 20 min. Após o período determinado, foi acrescido 1 mL de solução do reagente DNS. As amostras foram então aquecidas em ebulição por 5 minutos e resfriadas à temperatura ambiente. A mistura de reação foi diluída adicionando 9 mL de água destilada. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro a 540 nm.

Essas soluções foram utilizadas visando eliminar possíveis variações relacionadas à coloração característica do extrato bruto e frações, além da possibilidade de atividade amilolítica do mesmo ou teor de maltose e açúcares redutores presentes no extrato antes do experimento.

E. Branco do reagente DNS: Em tubo de ensaio, 1,5 mL de tampão fosfato de sódio 20 mM foi incubado a 40°C por 20 min. Após o período determinado, foi acrescido de 0,75 mL de solução do reagente DNS. A amostra foi então aquecida em ebulição por 5 minutos e resfriada à temperatura ambiente. A mistura de reação foi diluída adicionando 9 mL de água destilada. Solução utilizada como zero do espectrofotômetro.

A determinação da porcentagem de inibição das amostras foi realizada tomando-se como referência a atividade máxima da enzima, isto é, o ensaio contendo somente enzima e substrato. Assim, as porcentagens referentes à capacidade de inibição das amostras foram calculadas de acordo com a equação abaixo:

$$\% \text{ inibição} = [(C - A) / C] \times 100$$

Onde:

$C = (\text{absorbância enzima} + \text{substrato}) - (\text{absorbância branco substrato})$

$A = (\text{absorbância amostra}) - (\text{absorbância branco do extrato})$

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados obtidos foram apresentados na forma de média ponderada, com os respectivos desvios padrão. Os valores encontrados foram comparados ao controle com uso do teste estatístico paramétrico *t* de Student bicaudal, utilizando como hipótese nula a diferença entre as médias. Ou seja, o teste busca identificar se as médias obtidas para a amostra e para o controle são significativamente diferentes. O critério de significância foi o valor de $p < 0,05$, com intervalo de confiança de 95%. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa GraphPad Prism versão 5.0 para Windows.

5.6.4. Quantificação de fenólicos totais

O conteúdo total de polifenóis do extrato bruto e frações foi determinado colorimetricamente utilizando o método de Folin-Ciocalteu com algumas modificações (97). Uma alíquota de 65 μL da amostra, na concentração de 2 mg/mL, foi misturada com 0,25 mL de carbonato de sódio 10% e 0,25 mL do reagente Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich), completando-se o volume para 2,5 mL com água destilada. A

absorbância da reação foi medida em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1601) a 760 nm, após 1 hora à temperatura ambiente. Para quantificação foi empregada uma curva padrão com solução de ácido gálico e a quantidade de polifenol total foi expressa em $\mu\text{g}/\text{mg}$ em equivalentes de ácido gálico em relação ao extrato bruto e frações.

5.6.5. Quantificação de flavonoides

O conteúdo total de flavonoides do extrato bruto e frações foi determinado utilizando o método descrito por Woisky and Salatino com modificações (98, 99). Foram preparadas soluções metanólicas das amostras (extrato bruto e frações) na concentração de 2 mg/mL. Uma alíquota de 0,5 mL de cada amostra foi misturada a 0,25 mL da solução metanólica de cloreto de alumínio 5% e o volume completado para 2,5 mL. Após 1 hora à temperatura ambiente, a absorbância foi medida em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1601) a 425 nm. Para quantificação foi empregada uma curva padrão com solução de quercetina e a quantidade de flavonoides totais foi expressa em $\mu\text{g}/\text{mg}$ em equivalentes de quercetina em relação ao extrato bruto e frações.

5.7. Estudo biomonitorado do epicarpo do frutos maduros de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk

5.7.1. Descrição botânica

Família: Sapotaceae

Gênero: *Pouteria*

Espécie: *Pouteria torta* (Mart.) Radlk

Sinonímia popular: abiu-do-cerrado, abiu-piloso, guapeva, curriola, abiurana, pêssego – do – cerrado, grão de galo.

Pouteria torta (Mart.) Radlk (Sapotaceae) é uma árvore caducifólia, lactescente, medindo de 6-18 m de altura. Apresenta tronco áspero com diâmetro de até 32 cm, com aspecto retorcido; cinza-claro, com fissuras e cristas sinuosas e possui ramos tortuosos e pubescentes (100, 101).

As folhas são simples, alternadas e espiraladas com margens inteiras e onduladas; elípticas, oblongas ou suborbiculares, medindo de 8 a 20 cm de comprimento e 4 a 12 cm de largura; congestas no ápice dos ramos (100).

As flores são esverdeadas, dispostas em fascículos sobre ramos desnudos (folhas já caídas), de até 1 cm de comprimento; com 4 pétalas unidas (100, 101).

Os frutos são globosos ou ovóides, carnosos com superfície pilosa e enrugada. Possuem até 8 cm de comprimento; alaranjados quando maduros e com polpa gelatinosa de sabor adocicado. A frutificação ocorre entre os meses de novembro e janeiro com produção abundante de frutos. As sementes são elipsóides, medindo até 2 cm de comprimento e de cor amarelada; uma por fruto (100, 101).

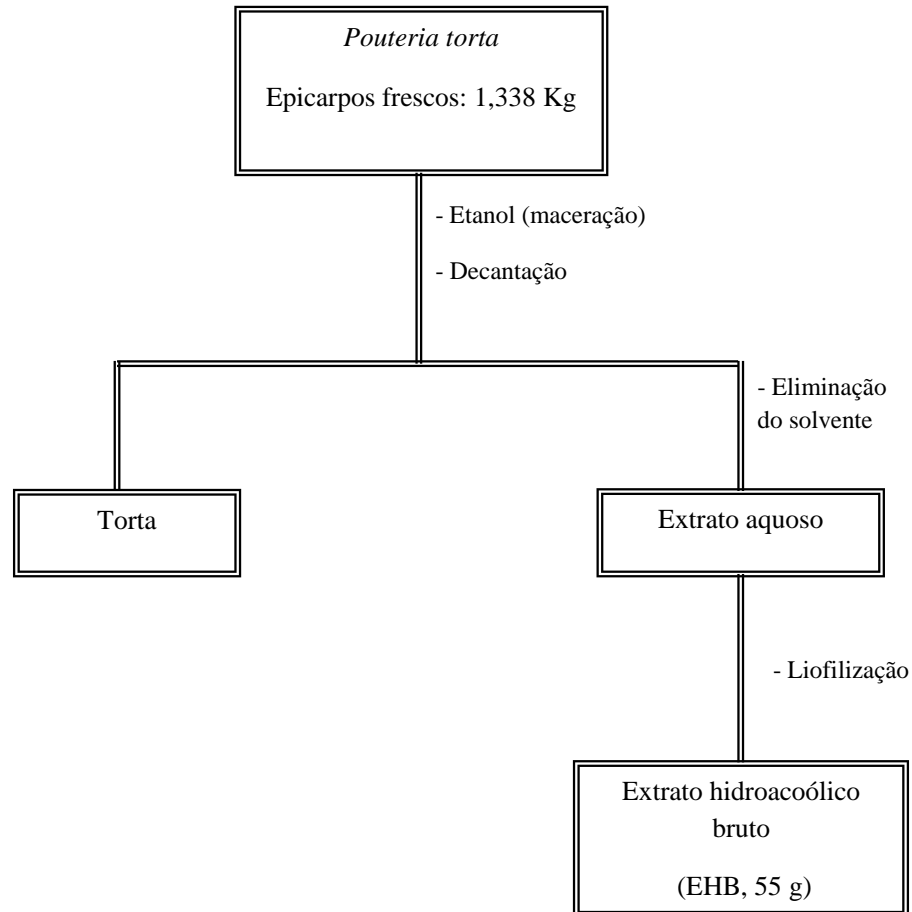
5.7.2. Obtenção do material botânico

Os frutos maduros de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk foram coletados no campus da Universidade de Brasília- UnB em 20 de dezembro de 2008. O espécimen é comparável à exsicata depositada no Herbário da Universidade de Brasília (JElías de Paula 3674). Os frutos frescos foram separados em epicarpo, mesocarpo e sementes. O epicarpo foi pulverizado em moinho de facas e seguiu-se para a obtenção do extrato bruto.

5.7.3. Obtenção do extrato bruto

A obtenção do extrato bruto foi realizada seguindo a metodologia descrita por Ma et al (2004) com modificações (87). O material botânico fresco pulverizado (1,338 Kg) foi submetido à extração por maceração a frio, por duas vezes, perdurando 48 horas cada, utilizando etanol 95% como solvente. Após decantação, a solução extrativa foi concentrada sob vácuo a uma temperatura de aproximadamente 40 °C, para eliminação do solvente orgânico. Após congelamento, a solução aquosa resultante foi submetida à liofilização, fornecendo o extrato hidroalcoólico bruto liofilizado (Esquema 1). O rendimento do extrato hidroalcoólico bruto (EHB) foi de 4,1% (55 g).

Esquema 1: Obtenção do extrato hidroalcoólico bruto (EHB) dos epicarpós frescos do fruto de *Pouteria torta*



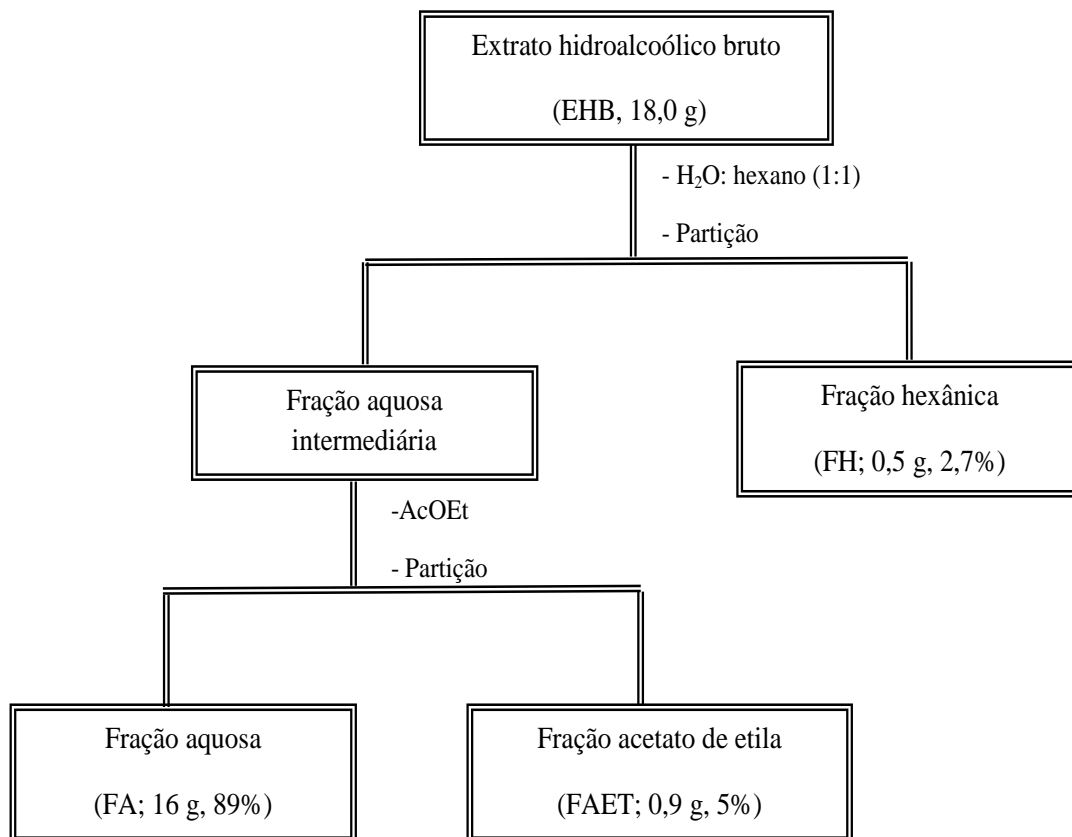
5.7.4. Monitoramento do extrato hidroalcoólico bruto (EHB)

O extrato hidroalcoólico bruto (EHB), obtido conforme Esquema 1, foi submetido a teste de inibição da enzima α -amilase *in vitro*.

Parte do extrato hidroalcoólico bruto (EHB, 18 g) foi submetido à partição entre líquidos imiscíveis, conforme descrito por Ma *et al.* (2004) (87). Ao extrato hidroalcoólico bruto foi primeiramente acrescido 30 mL de água destilada, que foi submetida à partição entre os solventes hexano e acetato de etila, respectivamente

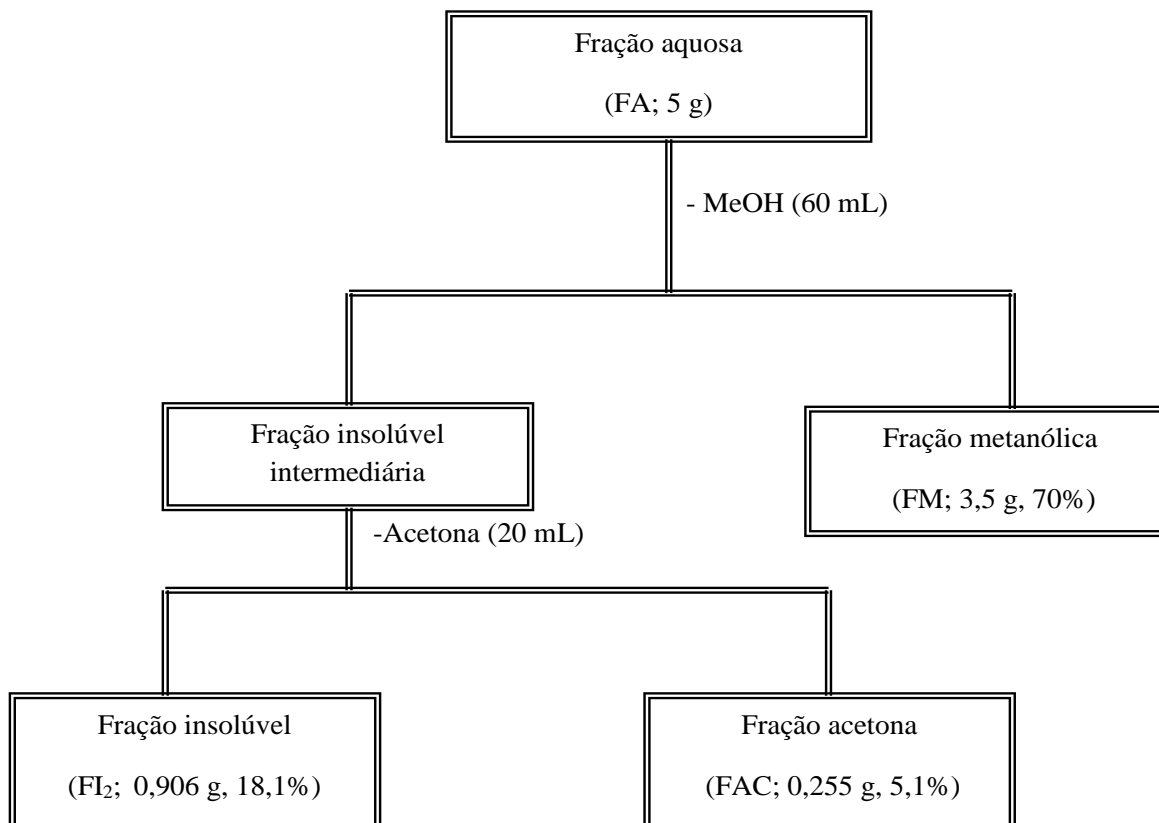
(Esquema 2). Desse procedimento foram obtidas 3 frações: hexânica (FH; 0,5 g, 2,7%), acetato de etila (FAET; 0,9 g, 5%) e a aquosa (FA; 16 g, 89%). As frações hexânica e acetato de etila foram concentradas em evaporador rotatório sob vácuo a uma temperatura de aproximadamente 40 °C. A fração aquosa foi submetida à liofilização.

Esquema 2: Partição biomonitorada do extrato hidroalcoólico bruto do epicarpo do fruto de *Pouteria torta* (EHB)



5.7.5. Elaboração e biomonitoramento da fração aquosa (FA)

Parte da fração aquosa (FA) (5 g) foi submetida a um processo de extração utilizando primeiramente metanol (60 mL). A fração insolúvel intermediária restante foi então submetida à extração por acetona (20 mL). O procedimento acima descrito está sumarizado no Esquema 3.

Esquema 3: Elaboração e biomonitoramento da fração aquosa (FA) quanto à atividade de inibição da α -amilase**5.7.6. Elaboração da Fração insolúvel (FI₂)****5.7.6.1. Primeira estratégia na elaboração da fração insolúvel (FI₂)**

Parte da fração FI₂ (80,0 mg) foi submetida à cromatografia por exclusão em gel utilizando coluna de Sephadex LH-20 (altura= 26 cm; diâmetro= 2,5 cm), empacotada e eluída com mistura MeOH:H₂O (8:2), fornecendo um total de 54 frações de 10 mL cada. As frações foram concentradas em evaporador rotativo e comparadas por CCD. A análise dos cromatogramas permitiu a reunião das frações em 8 grupos, conforme Tabela 2.

Tabela 2: Cromatografia por exclusão em Sephadex LH-20 da fração insolúvel (FI₂) da fração aquosa do extrato hidroalcoólico bruto do epicarpo do fruto de *Pouteria torta* – primeira estratégia

FI ₂	Frações	Massa (g)
01	1-3	0,0003
02	4	0,0090
03	5 e 6	0,0650
04	7	0,0020
05	8	0,0006
06	9 e 10	0,0002
07	11-13	0,0002
08	14-54	0,0012

FI₂02 (9 mg): apresentou-se como um sólido esbranquiçado pastoso, solúvel em água, denominado PTE01. Quando avaliado por CCD (FM1, R1), apresentou uma mancha azulada.

FI₂03 (65 mg): apresentou-se como um sólido de cor marrom clara, solúvel em água, denominado PTE02. Quando avaliado por CCD (FM1, R1), apresentou duas manchas azuladas, sendo que uma delas possuía o mesmo padrão da mancha presente na análise do CCD da fração FI₂02 ($R_f = 0,43$ e $0,42$, respectivamente).

5.7.6.2. Segunda estratégia na elaboração da fração insolúvel (FI₂)

Parte da fração insolúvel (FI₂, 100 mg) foi submetida à reação de acetilação. O material acetilado (designado FIA), após a elaboração, rendeu 90,4 mg e foi submetido à cromatografia por exclusão em gel utilizando coluna de Sephadex LH-20 (altura= 26 cm; diâmetro= 2,5 cm), empacotada e eluída com metanol, fornecendo um total de 64 frações de 3 mL cada. As frações foram concentradas em evaporador rotativo e comparadas por CCD. A análise dos cromatogramas permitiu a reunião das frações em 10 grupos, conforme Tabela 3.

Tabela 3: Cromatografia por exclusão em Sephadex LH-20 da fração insolúvel (FI2) da fração aquosa do extrato hidroalcoólico bruto do epicarpo do fruto de *Pouteria torta* – segunda estratégia

FIA	Frações	Massa (g)
01	1-5	-
02	6-9	0,0105
03	10	0,0096
04	11	0,0167
05	12	0,017
06	13 e 14	0,0249
07	15	0,005
08	16-21	0,004
09	22-24	0,0025
10	25-64	0,0002

FIA03 (9,6mg): apresentou-se como um sólido esbranquiçado pastoso, solúvel em clorofórmio, denominado FIA1. Quando avaliado por CCD (FM1, R1), apresentou uma mancha azulada.

5.7.7. Elaboração da Fração acetona (FAC)

- Cromatografia por exclusão em gel Sephadex LH-20

Parte da fração acetona (70 mg) foi submetida à cromatografia por exclusão em gel utilizando Sephadex LH-20 (altura = 20 cm; diâmetro = 2,5 cm), empacotada e eluída com metanol, fornecendo um total de 123 frações de 3 mL. As frações foram concentradas em evaporador rotativo e comparadas por CCD (FM5, R1 e R3). A análise dos cromatogramas permitiu a reunião das frações em grupos (Tabela 4).

FAC 03 (39 mg): apresentou-se como um sólido esbranquiçado, solúvel em metanol. Quando avaliado por CCD (FM5, R1), apresentou duas manchas próximas de coloração cinza escura que foi denominado FP.

Tabela 4: Cromatografia por exclusão em Sephadex LH-20 da fração acetona (FAC) da fração aquosa do extrato hidroalcoólico bruto do epicarpo do fruto de *Pouteria torta*

FAC	Frações	Massa (g)
01	1-15	-
02	16	0,003
03	17-20	0,039
04	21-22	0,008
05	23-44	0,004
06	45-59	0,003
07	60-85	0,002
08	86-123	0,004

- Tentativa de purificação

Parte da fração FAC (170 mg) foi solubilizada em metanol e em seguida adicionada de acetona, gota a gota. Durante o processo, houve a formação de um precipitado sólido esbranquiçado que foi separado por decantação. O sobrenadante foi submetido a sucessivas lavagens com acetona. Ao final, os sobrenadantes foram reunidos e concentrados em rotaevaporador.

As duas frações resultantes, precipitado (0,072 g) e sobrenadante (0,086 g), foram avaliadas por CCD (FM4, R1 e R3). A análise do cromatograma obtido mostrou que o precipitado, solúvel em metanol, apresentou-se como duas manchas próximas de coloração cinza escura após revelação com R3 que possuía o mesmo padrão de manchas da fração FAC 03, depois de comparados por CCD, sendo mantida a denominação anterior FP.

A subfração FP foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE 01) e mostrou-se tratar de uma mistura de três constituintes. As substâncias supracitadas foram comparadas com padrões autênticos.

A fração sobrenadante, sólido amarelo pastoso, solúvel em metanol, mostrou-se como uma mancha de cor rosa intenso após revelação com R3 que foi identificada como FS.

5.7.8. Fitoquímica das frações hexânica (FH), acetato de etila (FAET) e metanólica (FM)

Apesar das frações FH, FAET e FM terem apresentado pouca ou nenhuma capacidade de inibição da enzima α -amilase, foram submetidas a estudo químico, considerando que, até onde vai nosso conhecimento, não há relato na literatura de estudos acerca do extrato hidroalcoólico bruto do epicarpo do fruto de *Pouteria torta*.

5.7.8.1. Elaboração da Fração Hexânica (FH)

Parte do material desta fração (0,5 g) foi exaustivamente lavado com hexano, fornecendo 0,184 g de um sólido esverdeado (FHa) solúvel em metanol. O sólido foi avaliado por CCD (FM6, R1) e apresentou-se como uma mancha de coloração rosa intenso, contudo devido à complexidade apresentada pela fração, optou-se por não estudá-la.

A fase hexânica, denominada FHb, foi concentrada e, em seguida, o material resultante foi lavado com acetona, ocorrendo a solubilização de parte do material (FHb1) e outra permanecendo insolúvel (FHb2) (Esquema 4). FHb1 e FHb2 foram separados e avaliados por CCD de sílica.

FHb2 (0,013 g) apresentou-se como um sólido branco, solúvel em clorofórmio, caracterizando-se como uma mancha amarronzada quando avaliado por CCD de sílica (FM7, R1) sendo identificado como FH1. A fração FHb1 apresentou uma composição complexa, quando analisada por CCD de sílica, não sendo possível purificá-la e analisá-la.

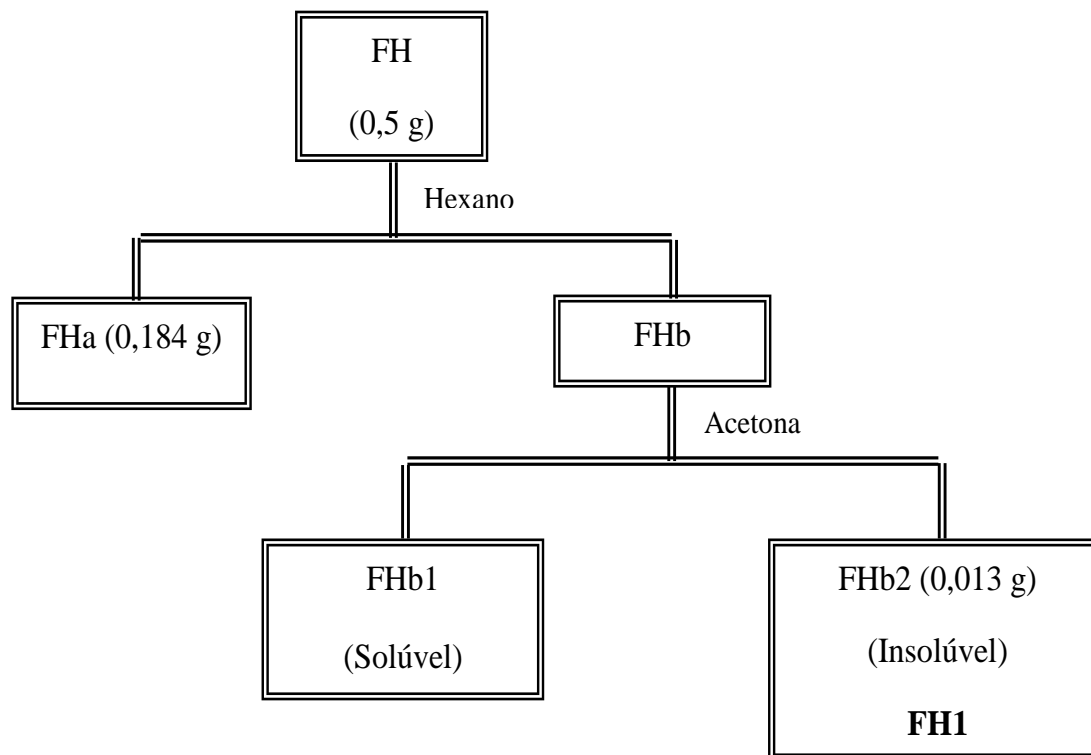
5.7.8.2. Elaboração da fração acetato de etila (FAET)

A análise por CCD de sílica revelou que a fração acetato de etila (FAET) apresentava-se como uma mistura pouco complexa e foi submetida a processos de elaboração na tentativa de purificação dos compostos ali presentes.

Parte de FAET (0,08 g) foi submetida à cromatografia por exclusão em gel sephadex LH-20 (altura = 20 cm; diâmetro = 2,5 cm), empacotada e eluída com metanol, fornecendo um total de 89 frações de 10 mL cada. As frações foram concentradas em evaporador rotativo e comparadas por CCD de sílica (FM8, FM9, R1 e R2). A análise dos cromatogramas permitiu a reunião das frações em 8 grupos, como apresentado na Tabela 5.

FAET02 (0,0348 g): apresentou-se como sólido branco amarelado, solúvel em metanol. Sob análise por CCD (FM9, R1), apresentou uma mancha rosada, denominado FAET2.

Esquema 4: Elaboração da fração hexânica (FH) do extrato hidroalcoólico bruto do epicarpo do fruto de *Pouteria torta*



-Tentativa de purificação

Parte da fração FAET (0,5 g) foi submetida a um processo de lavagem com o solvente acetato de etila. Durante o processo, parte da amostra foi solubilizada e o restante permaneceu insolúvel, em seguida, o sobrenadante (FAETa) e o precipitado (FAETb) foram separados por decantação. A fração FAETb foi submetida a sucessivas lavagens com acetato de etila. Ao final, os sobrenadantes foram reunidos e concentrados em rotaevaporador.

Tabela 5: Cromatografia por exclusão em Sephadex LH-20 da fração acetato de etila (FAET) do extrato hidroalcoólico bruto do epicarpo do fruto de *Pouteria torta*

FAET	Frações	Massa (g)
01	1-10	0,0011
02	11-17	0,0348
03	18-23	0,0176
04	24-32	0,006
05	33-39	0,004
06	40-59	0,002
07	60-67	0,006
08	68-89	0,006

FAETa (0,299 g) apresentou-se como um sólido amarelo pastoso, solúvel em metanol. Quando avaliado por CCD de sílica (FM2, R2), apresentou uma mancha amarela que se intensificava ao ser submetida à luz UV, após revelação com R2, sendo denominado FAET3.

FAETb sofreu uma segunda lavagem com metanol, ocorrendo novamente a solubilização de parte da amostra (FAETb1) e outra permanecendo insolúvel (FAETb2).

As duas frações resultantes, FAETb1 (0,1 g) e FAETb2 (0,08 g), foram avaliadas por CCD de sílica. A análise do cromatograma obtido mostrou que FAETb1, sólido amarelado, solúvel em metanol, possuía o mesmo padrão de mancha da fração FAET02, permanecendo com a denominação anterior FAET2.

FAETb2 (0,08 g) apresentou-se como sólido branco, solúvel em clorofórmio e após avaliado por CCD de sílica (FM10, R1) mostrou-se como uma mancha violácea, sendo denominado FAET1.

5.7.8.3. Elaboração da fração metanólica (FM)

Parte da fração metanólica (0,1 g) foi submetida à cromatografia por exclusão em gel sephadex LH-20 (altura = 16 cm; diâmetro = 1,0 cm), empacotada e eluída com metanol, fornecendo um total de 35 frações de 3 mL cada. As frações foram concentradas em evaporador rotativo e comparadas por CCD de sílica (FM11, R2 e R3). A análise dos cromatogramas permitiu a reunião das frações em 7 grupos, como apresentado na Tabela 6.

Tabela 6: Cromatografia por exclusão em Sephadex LH-20 da fração metanólica (FM) do extrato hidroalcolólico bruto do epicarpo do fruto de *Pouteria torta*

FM	Frações	Massa (g)
01	1-9	0,003
02	10-11	0,004
03	15-19	0,012
04	20-21	0,015
05	22-23	0,004
06	24-28	0,047
07	29-35	0,008

FM06 (0,047 g) apresentou-se como sólido amarelo pastoso, solúvel em metanol e após avaliado por CCD de sílica (FM11, R3) mostrou-se como uma mancha de coloração rosa, sendo denominado FM1.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. **Biomonitoramento do extrato hidroalcoólico bruto e frações do epicarpo do fruto de *Pouteria torta* por ensaio de inibição da α -amilase.**

O estudo biomonitorado enfatiza o conhecimento da estrutura dos constituintes químicos de uma planta, com ênfase em substâncias com atividade biológica ou farmacológica e não somente com foco central ao isolamento e determinação estrutural, como na fitoquímica clássica (1).

A partir de uma prospecção realizada em nosso laboratório com espécies do Cerrado (102), visando avaliar atividade de inibição sobre a enzima α -amilase, foi possível identificar o epicarpo fresco do fruto da espécie *Pouteria torta* (Mart.) Raldk como um dos extratos mais promissores para a realização de um estudo biomonitorado sobre a referida atividade inibitória.

6.1.1. **Avaliação do perfil de inibição enzimática do *Triticum aestivum* (semente de trigo) e acarbose**

A atividade inibição do extrato hidroalcoólico bruto e frações foi comparada aos controles *Triticum aestivum* (semente de trigo) e acarbose, inibidores conhecidos de α -amilase.

6.1.1.1. **Obtenção da curva dose - resposta do *Triticum aestivum* (semente de trigo)**

O perfil inibitório do *Triticum aestivum*, inibidor proteico de α -amilase isolado de semente de trigo, foi avaliado por meio de ensaio utilizando concentrações crescentes do referido inibidor (Figura 10). Foram testadas as seguintes concentrações finais: 20, 40, 60, 80, 100, 120 e 140 $\mu\text{g/mL}$. α -Amilase, na ausência do inibidor, foi utilizada como controle positivo, referenciada como apresentando 100% de atividade.

A análise dos resultados mostrou que nas concentrações de 80, 100, 120 e 140 $\mu\text{g/mL}$ as atividades inibitórias não se apresentaram significativamente

diferentes, sendo a inibição máxima obtida com o *Triticum aestivum* de 62% ($IC_{50} = 39,2 \mu\text{g/mL}$).

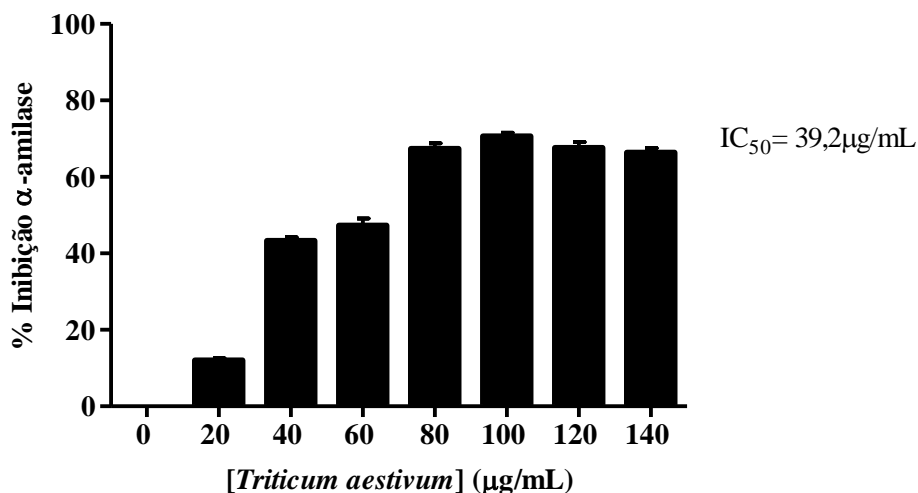


Figura 10: Avaliação do perfil de inibição sobre α -amilase por *Triticum aestivum*. Foram utilizadas concentrações finais crescentes do inibidor (20, 40, 60, 80, 100, 120 e 140 $\mu\text{g/mL}$). α -Amilase sem tratamento foi utilizada como 100% de atividade enzimática (controle negativo). Cada ponto representa a média \pm desvio-padrão em triplicata.

6.1.1.2. Obtenção da curva dose - resposta da acarbose

Acarbose, inibidor não proteico de α -amilase e princípio ativo do medicamento Glucobay®, marca Bayer, também teve seu perfil inibitório avaliado por meio da utilização de concentrações crescentes do referido inibidor (Figura 11). Foram testadas as seguintes concentrações finais: 1, 2, 5, 10, 20, 40, 60 e 80 $\mu\text{g/mL}$. α -Amilase, na ausência do inibidor, foi utilizada como controle negativo, referenciada como apresentando 100% de atividade.

A análise dos resultados mostrou que nas concentrações de 20, 40, 60 e 80 $\mu\text{g/mL}$ as atividades inibitórias não se apresentaram significativamente diferentes, sendo a inibição máxima obtida com a acarbose de 83% ($IC_{50} = 6,3 \mu\text{g/mL}$).

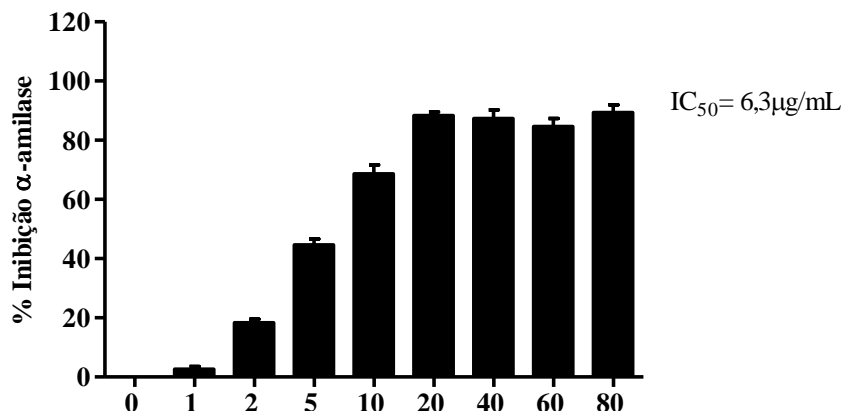
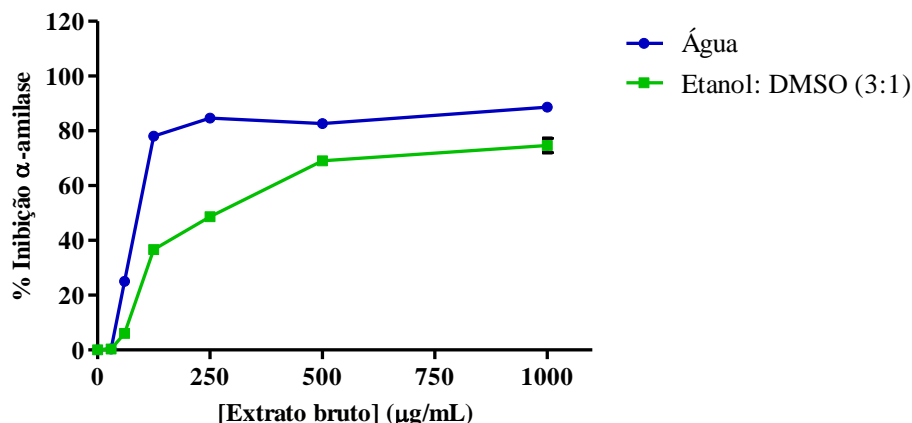


Figura 11: Avaliação do perfil de inibição sobre α -amilase por acarbose. Foram utilizadas concentrações finais crescentes do inibidor (1, 2, 5, 10, 20, 40, 60 e 80 $\mu\text{g/mL}$). α -Amilase sem tratamento foi utilizada como 100% de atividade enzimática (controle negativo). Cada ponto representa a média \pm desvio-padrão em triplicata.

6.1.2. Avaliação da atividade de inibição sobre α -amilase pelo extrato hidroalcoólico bruto (EHB)

A capacidade de inibição sobre α -amilase pelo extrato hidroalcoólico bruto (EHB) do epicarpo do fruto de *P. torta* foi avaliada frente a dois sistemas de solvente, com a construção de curva dose - resposta. No primeiro sistema, foi utilizada água destilada na solubilização do extrato; enquanto, no segundo sistema, o solvente utilizado na solubilização do extrato foi mistura etanol: DMSO (3:1). A Figura 12 expõe os resultados obtidos.

As análises dos resultados mostraram que o sistema de solvente aquoso promoveu inibição enzimática superior ao sistema etanol: DMSO (3:1), com capacidade máxima inibitória de 88% ($\text{IC}_{50} = 79,0 \mu\text{g/mL}$) em comparação a 64% ($\text{IC}_{50} = 139,2 \mu\text{g/mL}$) de inibição máxima apresentada pelo segundo sistema de solvente.



Água $IC_{50} = 79 \mu\text{g/mL}$

Etanol: DMSO (3:1) $IC_{50} = 139,2 \mu\text{g/mL}$

Figura 12: Comparação entre a curva dose - resposta de inibição da α -amilase por extrato hidroalcoólico bruto do epicarpo do fruto de *Pouteria torta* em água e etanol: DMSO (3:1) como solvente. Foram utilizadas concentrações crescentes do extrato bruto do epicarpo do fruto de *Pouteria torta* (30, 60, 125, 250, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$). α -Amilase sem tratamento foi utilizada como 100% de atividade enzimática (controle negativo). Cada ponto representa a média \pm desvio-padrão em triplicata.

6.1.3. Avaliação da atividade de inibição sobre α -amilase das frações obtidas por partição líquido-líquido do extrato hidroalcoólico bruto (EHB)

O extrato bruto (EHB) foi submetido à partição utilizando solventes imiscíveis, conforme descrito no Esquema 2. Foram obtidas 3 (três) frações a saber: fração hexânica (FH), fração acetato de etila (FAET) e fração aquosa (FA).

As frações foram avaliadas quanto à capacidade de inibição enzimática e comparadas com os controles *T. aestivum* e acarbose (Figura 13). As frações FH e FAET foram testadas na concentração final de 125 $\mu\text{g/mL}$, solubilizadas em mistura etanol:DMSO (3:1). A fração aquosa foi testada na mesma concentração final das anteriores, solubilizada tanto em etanol:DMSO (3:1) quanto em água destilada (inibição 40% vs 85%, respectivamente), sendo utilizada a fração aquosa em água destilada nas análises comparativas entre as referidas frações (FH, FAET e FA).

Os resultados apontaram para uma maior atividade de inibição da FA em água destilada e, quando comparada com acarbose (85% vs 83%,

respectivamente), não ocorreu diferença estatística na capacidade inibitória de ambas.

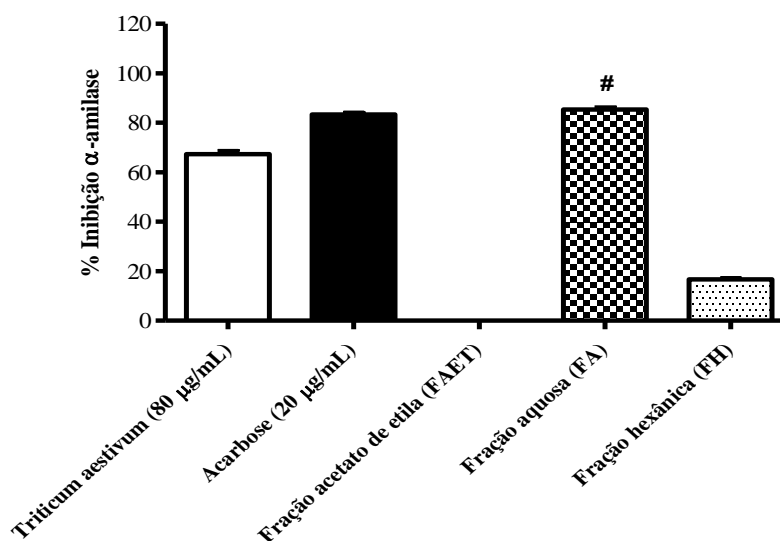


Figura 13: Teste de inibição de α -amilase com frações hexânica (FH), aquosa (FA) e acetato de etila (FAET). As frações FH e FAET foram solubilizadas em etanol: DMSO (3:1) e a FA foi solubilizada em água destilada. As amostras foram testadas na concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$ e comparadas com *Triticum aestivum* (80 $\mu\text{g/mL}$) e acarbose (20 $\mu\text{g/mL}$). α -Amilase sem tratamento foi utilizada como 100% de atividade enzimática. Cada ponto representa a média \pm desvio-padrão em triplicata. (# $p < 0,05$ vs *Triticum aestivum*).

6.1.3.1. Curva dose - resposta da atividade de inibição sobre α -amilase da fração aquosa (FA)

O perfil inibitório da fração aquosa (FA) sobre α -amilase foi avaliado por meio da observação da capacidade de inibição em relação à concentração da amostra aplicada.

Foram utilizadas concentrações crescentes da FA (10, 30, 60, 125, 250 $\mu\text{g/mL}$) em água destilada como solvente. Os resultados mostraram uma inibição máxima de 85% que foi alcançada a partir da concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$ com o valor do IC_{50} de 79,1 $\mu\text{g/mL}$.

6.1.3.2. Avaliação da atividade de inibição sobre α -amilase das frações obtidas a partir da fração aquosa (FA)

A fração aquosa foi submetida ao processo de extração conforme Esquema 3, dando origem a 3 (três) frações, a saber: fração metanol (FM), fração acetona (FAC) e fração insolúvel (FI₂).

As frações FM, FAC e FI₂ foram testadas na concentração final de 125 $\mu\text{g/mL}$, sendo FM e FAC solubilizadas em etanol: DMSO (3:1). Devido à baixa solubilidade da fração insolúvel, foi utilizada a mistura etanol:DMSO:H₂O (3:1:0,01) na preparação da referida amostra.

Os resultados apontaram não haver diferença significativa entre a atividade de inibição da acarbose e da FI₂, com atividade de 83% para ambas ($p > 0,05$). A fração acetona (FAC) apresentou atividade de inibição sobre a enzima em 77% com $p < 0,05$ em relação aos inibidores conhecidos (*Triticum aestivum* e acarbose), conforme mostra a Figura 14.

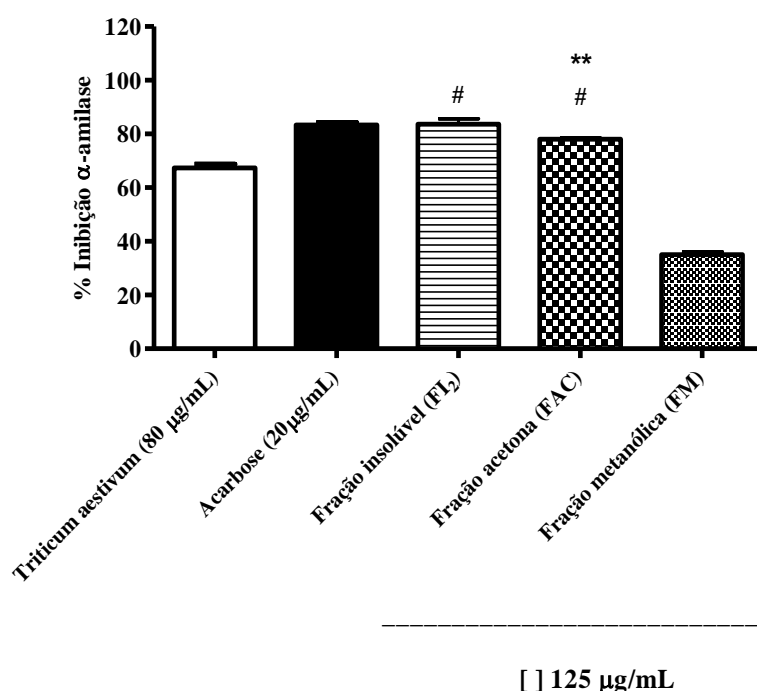


Figura 14: Teste de inibição sobre α -amilase das frações metanólica (FM), acetona (FAC) e insolúvel (FI₂). As frações FM e FAC foram solubilizadas em etanol: DMSO (3:1) e a FI₂ foi solubilizada com a mistura etanol: DMSO: H₂O (3:1:0,01). As amostras foram testadas na concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$ e comparadas com *Triticum aestivum* (80 $\mu\text{g/mL}$) e acarbose (20 $\mu\text{g/mL}$). α -Amilase sem tratamento foi utilizada como 100% de atividade enzimática. Cada ponto representa a média \pm desvio-padrão em triplicata. (** $p < 0,05$ vs acarbose; # $p < 0,05$ vs *Triticum aestivum*).

6.1.3.2.1. Curva dose - resposta da atividade de inibição sobre α -amilase das frações insolúvel (FI₂), acetona (FAC) e metanólica (FM)

O perfil de inibição das frações FM, FAC e FI₂ sobre a enzima α -amilase foi avaliado por meio da construção de curva dose-resposta e determinação do valor de IC₅₀ (concentração que produz 50% de inibição).

Para construção da curva dose-resposta da FM e FI₂ foram utilizadas as seguintes concentrações: 15,62; 31,25; 62,5; 125 e 250 μ g/mL em etanol:DMSO (3:1) como solvente. Para a FAC foram utilizadas as concentrações: 3,9; 7,81; 15,62; 31,25; 62,5; 125 e 250 μ g/mL em etanol: DMSO (3:1). Os resultados para o valor do IC₅₀ obtidos a partir da construção de curva dose-resposta estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7: Valores de IC₅₀ das frações FM, FAC e FI₂

Amostra	IC ₅₀ (μ g/mL) \pm DP	Capacidade máxima de inibição (%) \pm DP
FM	91,02 \pm 0,1	71 \pm 0,03
FAC	9,10 \pm 0,1	94 \pm 0,01
FI ₂	29,90 \pm 0,3	95 \pm 0,01
Acarbose ^a	6,30 \pm 0,1	86 \pm 0,01
<i>Triticum aestivum</i> ^b	39,20 \pm 0,3	73 \pm 0,02

^a e ^b controles positivos.

6.1.3.2.2. Avaliação da atividade de inibição sobre α -amilase das frações obtidas a partir da fração insolúvel (FI₂)

A fração FI₂ foi submetida à cromatografia por exclusão em Sephadex LH-20 da qual foram obtidas 54 subfrações que foram monitoradas por CCD e reunidas em 8 grupos denominados: FI₂-01, FI₂-02, FI₂-03, FI₂ -04, FI₂ -05, FI₂ -06, FI₂ -07 e FI₂ -08, de acordo com o descrito na Tabela 3.

As frações FI₂-01 a FI₂-08 foram avaliadas com relação à capacidade de inibição sobre α -amilase na concentração final de 125 μ g/mL utilizando como solvente água destilada. Os resultados obtidos mostraram que nenhuma das frações apresentou atividade inibitória enzimática.

6.1.4. Avaliação da atividade de inibição sobre α -amilase das frações obtidas a partir da fração acetona (FAC)

A fração FAC foi submetida a processo de tentativa de purificação sendo obtidas 2 frações: fração precipitado (FP) e fração sobrenadante (FS).

As subfrações FP e FS foram avaliadas quanto à capacidade de inibição da enzima α -amilase na concentração final de 125 $\mu\text{g/mL}$ utilizando etanol:DMSO (3:1) como solvente.

De acordo com a Figura 15 foi possível verificar que a subfração FS apresentou atividade de inibição sobre a enzima α -amilase em 88%, sendo esta inibição estatisticamente diferente em comparação aos inibidores utilizados como controle positivo com $p < 0,05$. A fração FP apresentou atividade inibitória inferior a 5%.

O perfil de inibição da fração FS foi então avaliado através da construção de curva dose-resposta e o valor de IC_{50} foi calculado (IC_{50} 22,1 $\mu\text{g/mL}$).

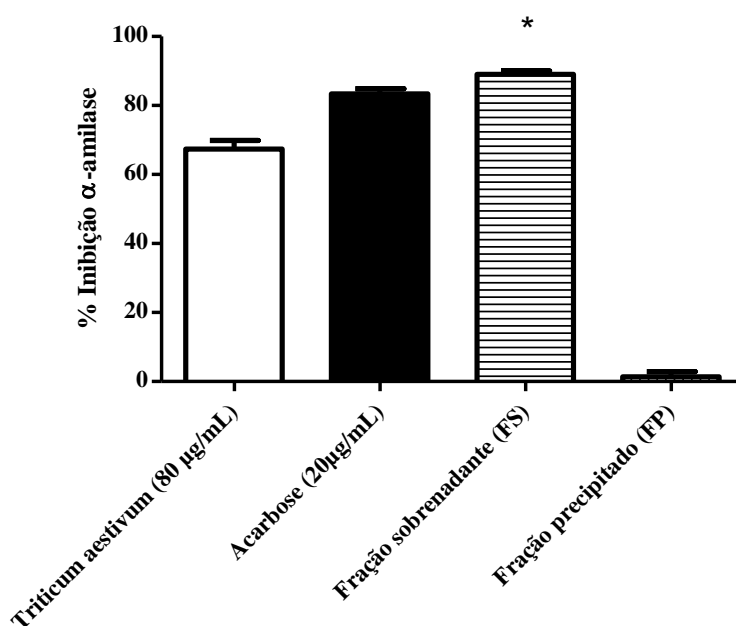


Figura 15: Teste de inibição sobre α -amilase das frações sobrenadante (FS) e precipitado (FP). As amostras foram testadas na concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$ e comparadas com *T. aestivum* (80 $\mu\text{g/mL}$) e acarbose (20 $\mu\text{g/mL}$). α -Amilase sem tratamento foi utilizada como 100% de atividade enzimática. Cada ponto representa a média de 2 experimentos, em triplicata \pm desvio-padrão. (* $p < 0,05$ vs acarbose e *T. aestivum*).

6.2. Avaliação da atividade antioxidante total através de ensaio da redução do complexo de fosfomolibdênio

A capacidade antioxidante total de uma substância pode ser avaliada quantitativamente a partir de método espectrométrico (95). A redução em meio ácido do molibdênio VI (Mo^{6+}) em molibdênio V (Mo^{5+}) por composto antioxidante e a subsequente formação de um complexo de cor azulada (complexo fosfato/ molibdênio V) consiste no fundamento desse método.

A partir do extrato hidroalcoólico bruto (EHB) e frações (FH, FAET e FA) do epicarpo do fruto de *Pouteria torta*, foram preparadas soluções na concentração de 1 mg/mL, utilizando etanol como solvente.

Nos resultados aqui descritos, a capacidade redutora foi avaliada pela comparação dos valores de absorvância (ABS) encontrados para as amostras analisadas, em comparação com os padrões quercetina, ácido ascórbico e BHT e apresentados em equivalentes dos referidos padrões (Tabela 8).

Tabela 8: Equivalência do extrato bruto e frações do epicarpo do fruto de *Pouteria torta* em relação à quercetina, ácido ascórbico e BHT

AMOSTRAS		PADRÃO		
		Equivalentes em mg/mL		
Concentração	ABS	Quercetina	Ácido ascórbico	BHT
EHB	0,50	0,18	0,13	1,56
FH	1 mg/mL	0,26	0,07	0,65
FAET		0,83	0,35	2,83
FA		0,28	0,08	0,72

EHB – Extrato hidroalcoólico bruto; FH – Fração hexânica do extrato hidroalcoólico bruto; FAET – Fração acetato de etila do extrato hidroalcoólico bruto; FA – Fração aquosa do extrato hidroalcoólico bruto.

Todas as amostras analisadas (EHB, FH, FAET e FA) foram capazes de reduzir o complexo fosfomolibdênio, porém a natureza redutora das amostras foi mais intensa quando comparada ao padrão BHT. As amostras EHB e FAET mostraram uma maior capacidade antioxidante em comparação com o padrão, em 56% e 183%, respectivamente.

Uma capacidade antioxidante equivalente a 25% de ácido ascórbico e 35% de quercetina foi apresentada pela FAET. As demais frações mostraram atividade

antioxidante variando entre 5-18% tanto em relação ao ácido ascórbico como à quercetina. Vale salientar que os valores em porcentagem foram obtidos em relação a 100% da atividade total atribuída aos padrões utilizados no ensaio.

6.3. Atividade citotóxica

O bioensaio envolvendo *Artemia salina* L. consiste em avaliar os efeitos da exposição deste microcrustáceo a um determinado composto, visando a avaliação preliminar de toxicidade de metais pesados, extratos de plantas, além de outras substâncias químicas, sendo uma ferramenta útil para predizer efeitos de exposições agudas a extratos de plantas (103).

Estão descritas correlações entre o ensaio com larvas de *A. salina* e a toxicidade de extratos de plantas sobre algumas linhagens de células tumorais, tais como KB, P-388 e L-1210 (104) e ensaios *in vivo* (teste em ratos) (103), sugerindo que testes utilizando o microcrustáceo podem ser utilizados como uma avaliação preliminar do efeito citado. A análise é feita mediante o cálculo da concentração letal média (CL_{50}) tornando possível determinar e avaliar a atividade biológica (toxicidade) de certo composto ou mistura de compostos.

Desta forma, o efeito tóxico do extrato hidroalcoólico bruto do epicarpo do fruto de *P. torta* (EHB) e das frações hexânica (FH), acetato de etila (FAET) e aquosa (FA) foi avaliado de acordo com o método descrito por Meyer et al. (1982) (94). Segundo o método, os extratos brutos e frações são classificados como tóxicos quando apresentam $CL_{50} < 1000$ ppm (1 mg/mL).

Com base nessa classificação, foi observado que todas as amostras avaliadas apresentaram $CL_{50} > 1$ mg/mL, sendo consideradas de baixa toxicidade às larvas de *A. salina* (Tabela 9).

Tabela 9: Avaliação citotóxica às larvas de *Artemia salina*

Amostra	CL ₅₀ (ppm)	Atividade
EHB	> 1000	Inativo
FH	> 1000	Inativo
FAET	> 1000	Inativo
FA	> 1000	Inativo

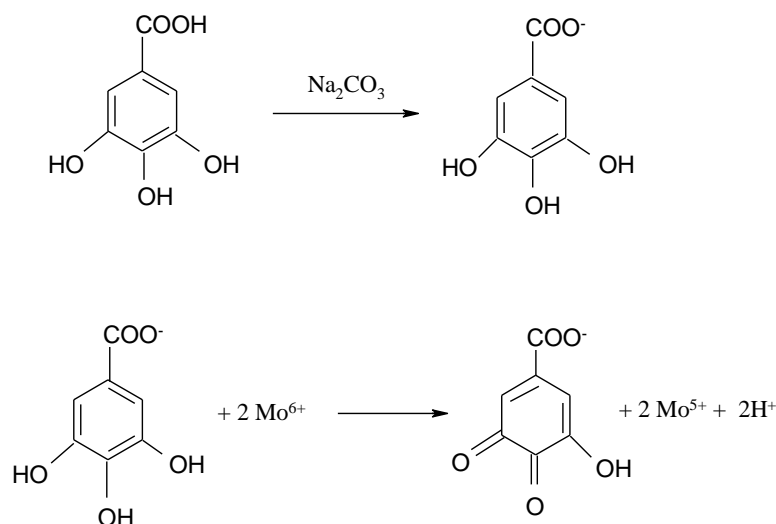
EHB – Extrato hidroalcoólico bruto; FH – Fração hexânica do extrato hidroalcoólico bruto; FAET – Fração acetato de etila do extrato hidroalcoólico bruto; FA – Fração aquosa do extrato hidroalcoólico bruto.

6.4. Quantificação de polifenóis e flavonoides

Alguns métodos para quantificação de compostos fenólicos são descritos na literatura (105, 106); contudo, o que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu é o mais amplamente citado.

O reagente de Folin-Ciocalteu consiste de uma mistura de ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico, onde o molibdênio encontra-se em seu maior estado de oxidação (VI); porém, na presença de certos agentes redutores, como compostos fenólicos, formam-se complexos molibdênio-tungstênio [$(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^{4-}$], de coloração azul, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 (V) e 6 (VI) e cuja intensidade da coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras que, não necessariamente, apresentam natureza fenólica (107).

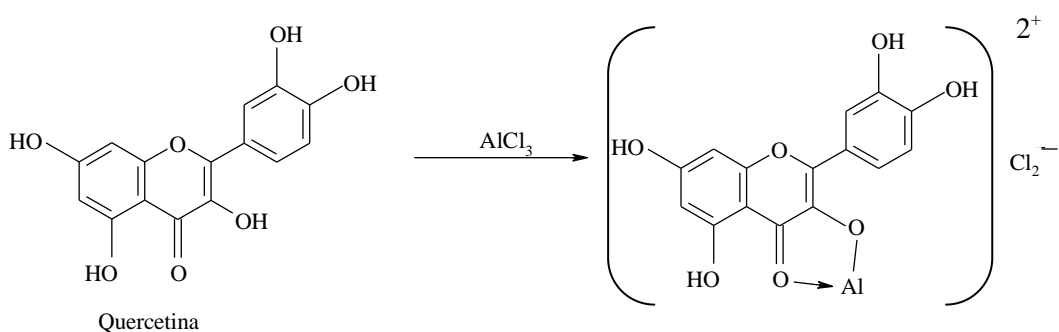
A reação entre os compostos fenólicos e o reagente de Folin-Ciocalteu ocorre em meio básico e inicia-se com a desprotonação do composto fenólico gerando os ânions fenolatos. Em seguida, ocorre reação de oxidação-redução entre o ânion carboxilato e o reagente de Folin, na qual o molibdênio sofre redução de Mo (VI) a Mo (V) com alteração da coloração de amarela para azulada, sendo possível a quantificação da absorbância da solução na região do visível (760 nm) (97, 107). O Esquema 5 exemplifica o mecanismo da reação com o ácido gálico.



Esquema 5: Reação do ácido gálico com molibdênio presente no reagente de Folin-Ciocalteu (108).

Os flavonoides constituem um dos mais amplos e diversificados grupos de compostos fenólicos com diversidade de atividades biológicas e químicas. A mensuração do teor de flavonoídes presentes no extrato bruto e frações foi realizada por método colorimétrico utilizando o cloreto de alumínio (AlCl_3) como reagente.

Na reação, o cátion alumínio forma complexos estáveis com os flavonoides em metanol, sendo possível a quantificação dos complexos formados através da leitura em comprimento de onda a 425 nm (109). O Esquema 6 exemplifica a reação de formação do complexo flavonoide-Al.



Esquema 6: Formação do complexo flavonoíde-Al, em solução metanólica de cloreto de alumínio (110).

A Tabela 10 mostra os teores totais de polifenóis e flavonoides do extrato bruto e frações do epicarpo do fruto de *P. torta*. Pode ser observado que FAET apresentou os maiores teores de polifenóis e flavonoides (252,1 µg/mg e 19,3 µg/mg de amostra, respectivamente). Em contrapartida, FH apresentou o menor teor de polifenóis (56,15 µg/mg de amostra) e o segundo maior teor de flavonoides (0,32 µg/mg) entre as amostras testadas.

Tabela 10: Teores de polifenóis e flavonoides presentes no extrato bruto e frações do epicarpo do fruto de *Pouteria torta*

Amostra	Descrição	Teor de polifenóis (µg/mg amostra) ± DP ^{a,b}	Teor de flavonoides (µg/mg amostra) ± DP ^{a,b}
EHB	Extrato hidroalcoólico bruto do epicarpo do fruto	125,25±0,01	0,14±0,006
FH	Fração hexânica	56,15±0,004	0,32±0,01
FAET	Fração acetato de etila	252,10±0,06	19,3±0,02
FA	Fração aquosa	98,50±0,01	0,08±0,005

^a Valores expressos como média de 3 experimentos, em triplicata ± desvio padrão. ^b Os teores de polifenóis e flavonoides são expressos em equivalentes de ácido gálico e quercetina, em µg/mg de amostra, respectivamente.

6.5. Estudo químico dos extratos e frações do epicarpo do fruto de *Pouteria torta*

6.5.1. Constituintes químicos presentes na fração insolúvel (FI₂)

6.5.1.1. Sacarose (PTE01)

PTE01 (9 mg) foi isolado da fração insolúvel (FI₂), na forma de um sólido esbranquiado pastoso resultante da cromatografia por exclusão em Sephadex LH-20.

Foi realizada a comparação de PTE01 com a amostra autêntica de sacarose por CCD em sílica (FM1; R1) sendo observado o mesmo padrão de manchas entre ambas ($R_f=0,43$ e $R_f=0,44$, respectivamente). A análise espectrométrica de PTE01 confirmou o resultado obtido por CCD, conforme mostrou o espectro de RMN de ¹H de PTE01 (Figura 16). A expansão da região entre δ2,80 e δ5,50 (Figura 17)

mostrou um duplete em $\delta 5,40$ ($J= 4,2$ Hz) e um duplo duplete em $\delta 3,55$ característicos de H1' e H2' respectivamente, em carboidratos. Duplo duplete em $\delta 4,04$ ($J= 8,1$ Hz) foi atribuído a H4' também característico de açúcares.

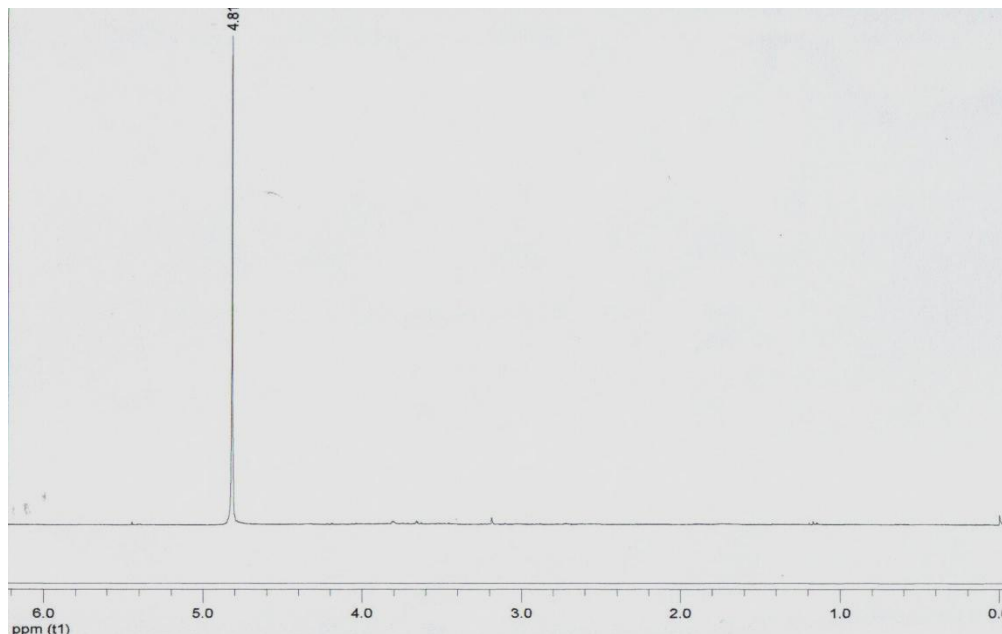


Figura 16: Espectro de RMN de ^1H de PTE01 (300MHz, D_2O)

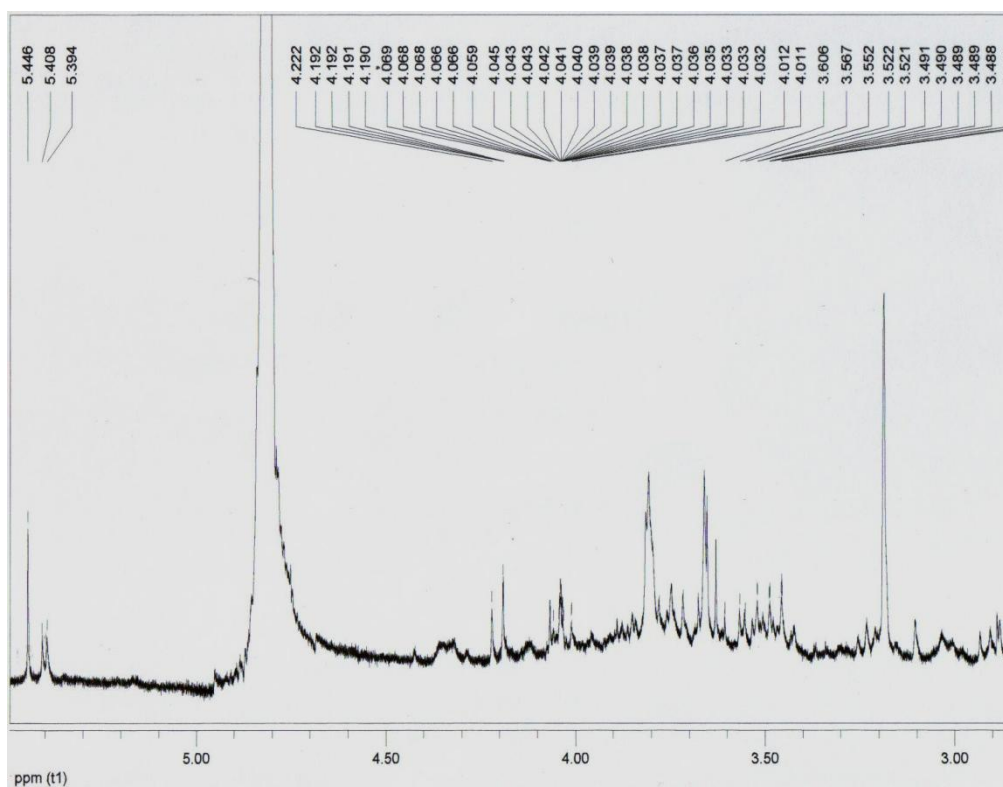


Figura 17: Espectro de RMN de ^1H de PTE01 - Expansão da região entre $\delta 5,5$ e $\delta 2,8$ (300MHz, D_2O)

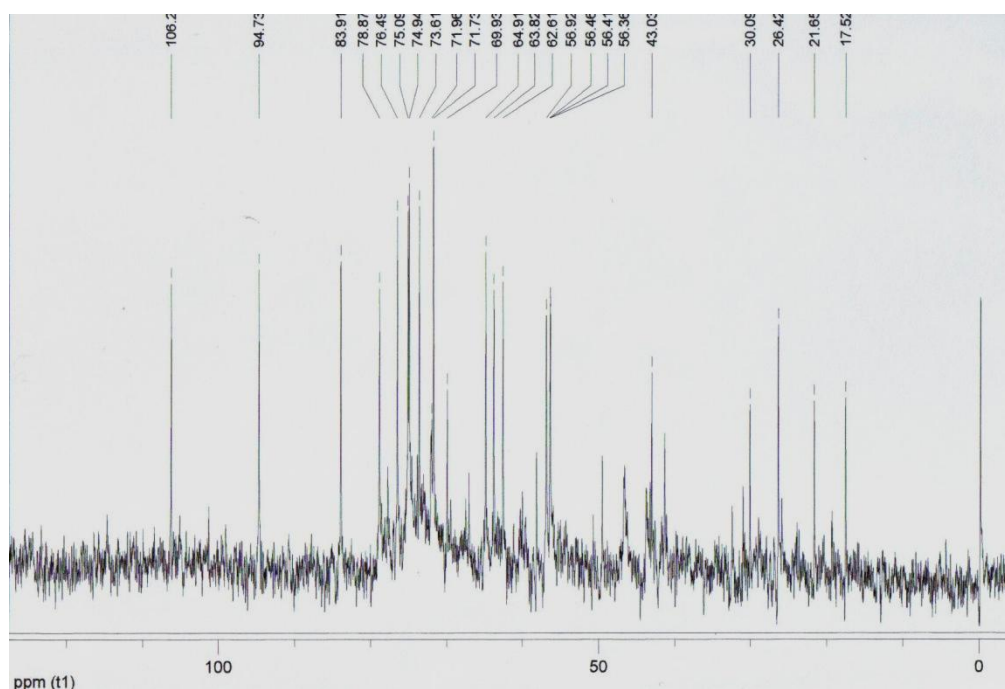
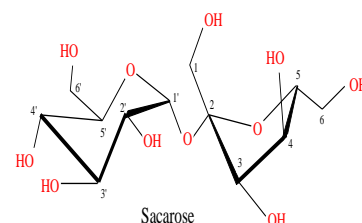


Figura 18: Espectro de RMN de ^{13}C de PTE01 (75MHz, D_2O)

O espectro de RMN de ^{13}C de PTE01 (Figura 18) revelou a presença de sinal em $\delta 94,73$ que pode ser atribuído a carbono anomérico (111). A comparação dos deslocamentos químicos de PTE01 com dados da literatura permitiu caracterizar essa substância como sacarose (Tabela 11).

Tabela 11: Deslocamentos químicos de PTE01 em RMN de ^{13}C (δ , 75MHz, D_2O) em comparação com os dados da literatura relatados para sacarose (111)

Carbono	Tipo	Sacarose (δ_{C}) (111)	PTE01 (δ_{C})
1'	CH	94,6	94,7
2'	CH	73,5	73,6
3'	CH	75,1	75,0
4'	CH	71,9	71,9
5'	CH	74,9	74,9
6'	CH_2	62,9	62,6
1	CH_2	63,9	63,8
2	C	106,0	106,2
3	CH	79,0	78,8
4	CH	76,7	76,4
5	CH	84,0	83,9
6	CH_2	65,0	64,9



A confirmação de PTE01 como sendo sacarose foi corroborada pela análise do produto resultante da reação de acetilação de FI₂. A elaboração da fração insolúvel acetilada (FIA), seguida da separação por cromatografia por exclusão em Sephadex LH-20, permitiu o isolamento do produto acetilado designado por FIA1.

FIA1 apresentou padrão espectrométrico semelhante a PTE01, quando foram analisados e comparados os espectros do RMN de ¹³C (Figuras 19 a 21) destes derivados. As diferenças essenciais foram observadas nas regiões entre δ 20,66 e δ 21,52 e entre δ 172,46 e δ 171,25. Estes sinais foram atribuídos a grupos metilas e acilas, respectivamente, presentes em FIA1.

Esta substância foi identificada como sendo o octa-acetato da sacarose por comparação dos seus dados de RMN de ¹³C com aqueles descritos na literatura para o derivado peracetilado da sacarose (112), como apresentado na Tabela 12.

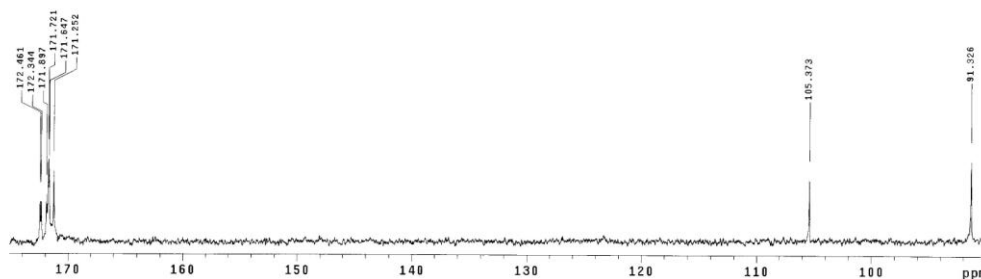
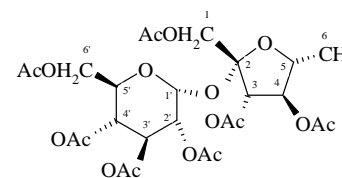


Figura 19: Espectro de RMN de ¹³C de FIA1 (75MHz, CDCl₃)

Tabela 12: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de FIA1 (50 MHz, CDCl_3) e aqueles descritos para o octaacetato da sacarose (75 MHz, CD_3OD) (112)

Carbono	Octaacetato da sacarose (δ_{C})	FIA1 (δ_{C})
1'	89,93	91,32
2'	70,26	70,92
3'	69,61	69,74
4'	68,17	68,21
5'	68,5	68,21
6'	61,75	63,26
1	62,85	64,11
2	104,02	105,37
3	75,68	77,25
4	74,98	76,48
5	79,14	80,53
6	63,63	64,91
<u>CO</u>	170,66 a 169,5	172,46 a 171,25
<u>OCH₃</u>	20,56 a 20,74	21,50 a 20,66



6.5.1.2. Mistura de açúcares (PTE02)

PTE02 (65 mg) foi obtido na forma de um sólido esbranquiado pastoso da fração insolúvel (FI_2) resultante da cromatografia por exclusão em Sephadex LH-20.

A avaliação por CCD em sílica (FM1, FM2 e FM3; R1) revelou a presença de 2 (duas) manchas azuladas, sendo uma delas apresentando o mesmo padrão da mancha presente na CCD em sílica (FM1; R1) de PTE01. Foi então realizada a comparação com amostra autêntica de sacarose, sendo observado o mesmo padrão de manchas entre sacarose e uma das manchas da amostra.

O espectro de RMN de ^1H de PTE02 (Figura 22) mostrou-se bastante complexo. Contudo, na expansão da região entre $\delta 2,60$ e $\delta 5,60$ (Figura 23) foi possível observar a presença de dois dupletos ($\delta 5,40$ e $\delta 5,20$) sugerindo a presença de 2 hidrogênios anoméricos.

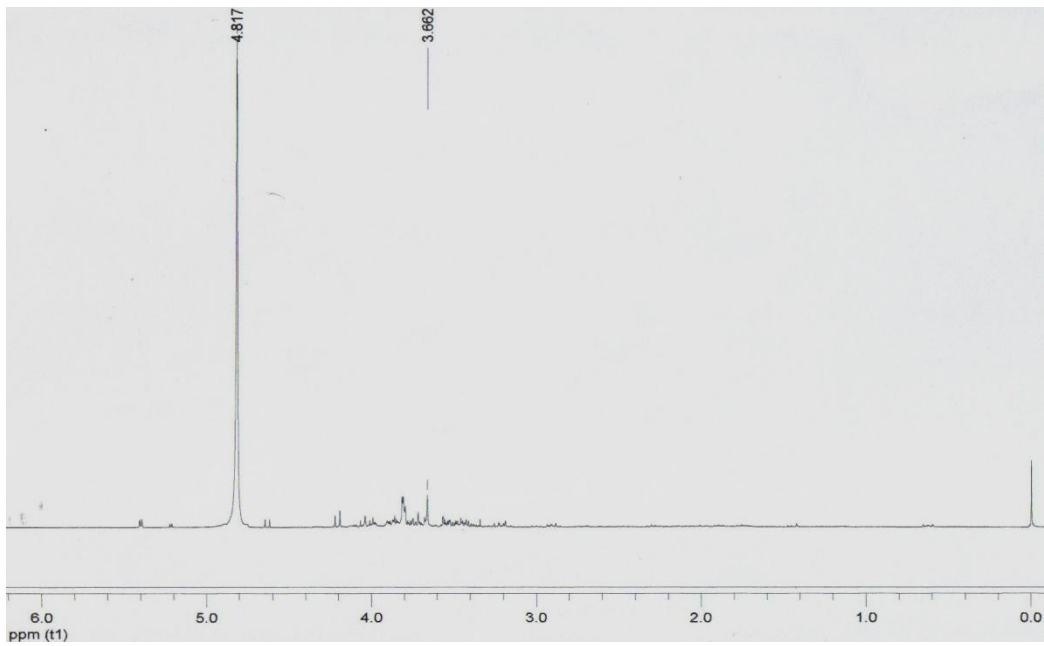


Figura 22: Espectro de RMN de ^1H de PTE02 (300MHz, D_2O)

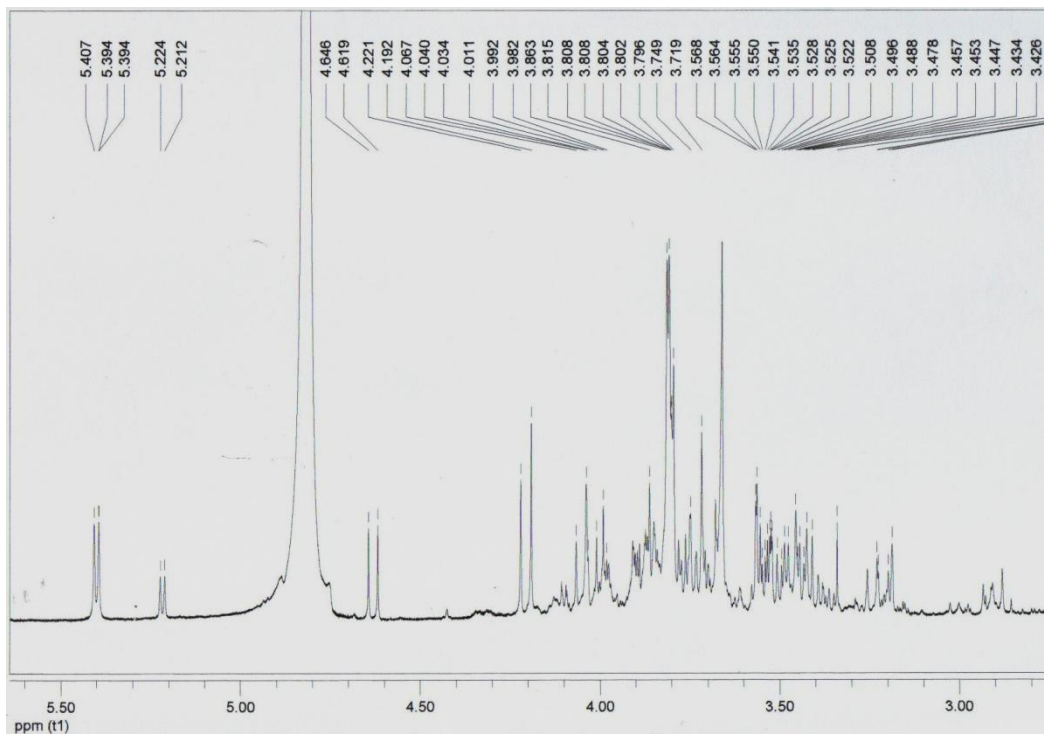


Figura 23: Espectro de RMN de ^1H de PTE02 – Expansão da região entre $\delta 5,60$ e $\delta 2,60$ (300MHz, D_2O)

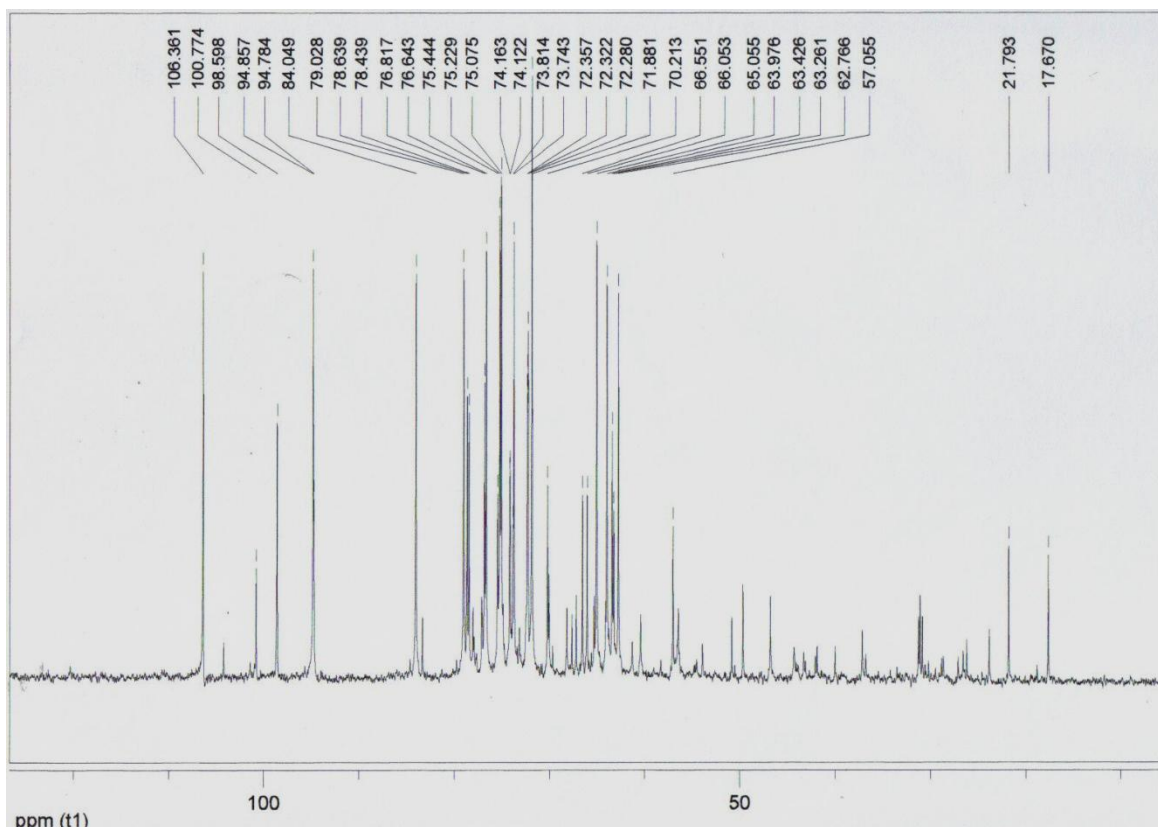


Figura 24: Espectro de RMN de ^{13}C de PTE02 (75MHz, D_2O)

A análise do espectro de RMN de ^{13}C de PTE02 (Figura 24) revelou a presença dos sinais característicos de sacarose, em comparação com dados da literatura. Foi possível observar ainda a presença de outros sinais além daqueles atribuídos à sacarose.

A análise de PTE02 por CLAE-IR deu origem a um cromatograma apresentando 3 picos (Figura 25). A comparação com o tempo de retenção (t_R) de amostras de açúcares, mostrou que PTE02, além de sacarose ($t_R = 11,95$ min), continha frutose ($t_R = 7,25$ min) e glicose ($t_R = 8,36$ min).

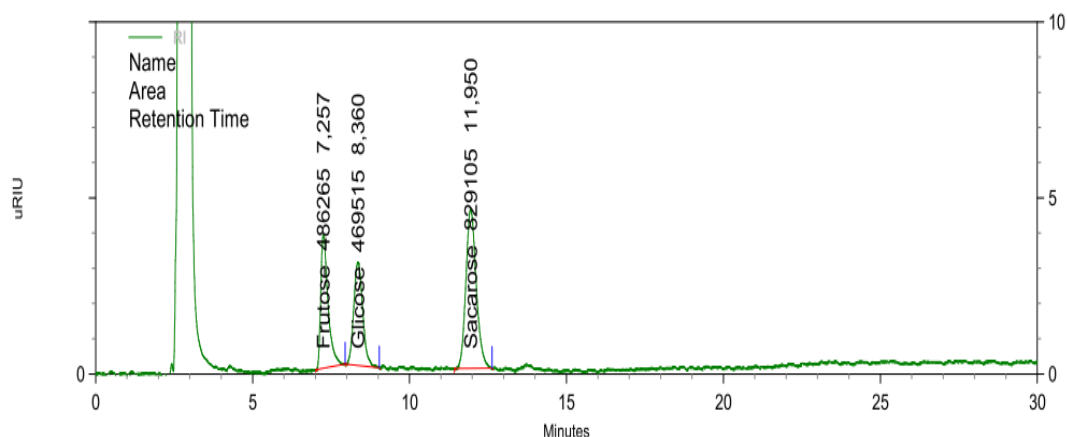
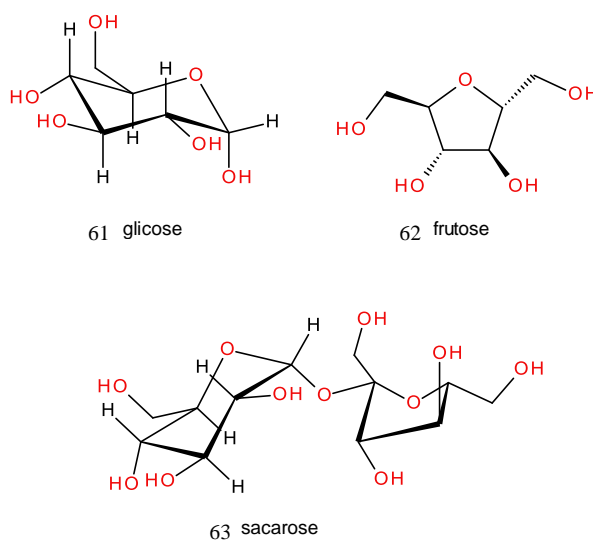


Figura 25: Cromatograma de PTE02 em CLAE-IR da mistura frutose, glicose e sacarose em comparação ao padrão analítico. Condições de análise: coluna: Lichrospher 100 NH₂, 250 mm x 4,0 mm (HP 5 μm) mantida a 30°C; fluxo: 1mL/min; eluente: bomba A (acetonitrila), bomba B (água); detector: por índice de refração (IR); sistema de eluição: isocrático; programa de eluição: bomba A: bomba B (80:20); Região de análise entre 230nm e 400nm.



6.5.2. Constituintes químicos presentes na fração acetona (FAC)

O perfil cromatográfico da fração FAC foi avaliado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a detector DAD. A análise dos cromatogramas e espectros de UV (região entre 230 nm e 400 nm) mostrou que a fração é composta por uma mistura de constituintes, com predominância de epicatequina.

Sendo FAC de constituição complexa, a análise de suas subfrações mostrou de forma mais evidente, a presença desses e outros componentes.

6.5.2.1. Mistura de açúcares (FP)

FP (72 mg) foi obtido, na forma de um sólido esbranquiçado, da fração acetona (FAC), conforme descrição na página 101.

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C de FP (Figuras 26, 29 e 30) apresentaram características semelhantes às aquelas anteriormente descritas para o composto identificado como sacarose proveniente da fração PTE01. A expansão da região entre $\delta 7,0$ e $\delta 5,0$ (Figura 28) mostrou um duplete em $\delta 5,4$ ($J = 3,9$ Hz) e um duplete em $\delta 5,1$ ($J = 3,9$ Hz) e um duplo duplete em $\delta 3,48$ ($J = 2,4$ Hz e $3,0$ Hz), característicos de H1' e H2' em carboidratos. O duplo duplete em $\delta 3,42$ ($3,6$ Hz) foi atribuído a H4 também característico de açúcares (Figura 27). Sinais entre $\delta 3,5$ e $\delta 3,6$ ($J = 4,2$ e $10,2$ Hz), característicos de H1 e H2 respectivamente, em carboidratos (Figura 27). Sinal em $\delta 4,04$ ($J = 8,1$ Hz) foi atribuído a H4 também característico de açúcares (Figura 27).

A análise dos dados apresentados e comparação com a literatura sugeriram que FP seja composta de uma mistura de açúcares. Os deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C estão na Tabela 13.

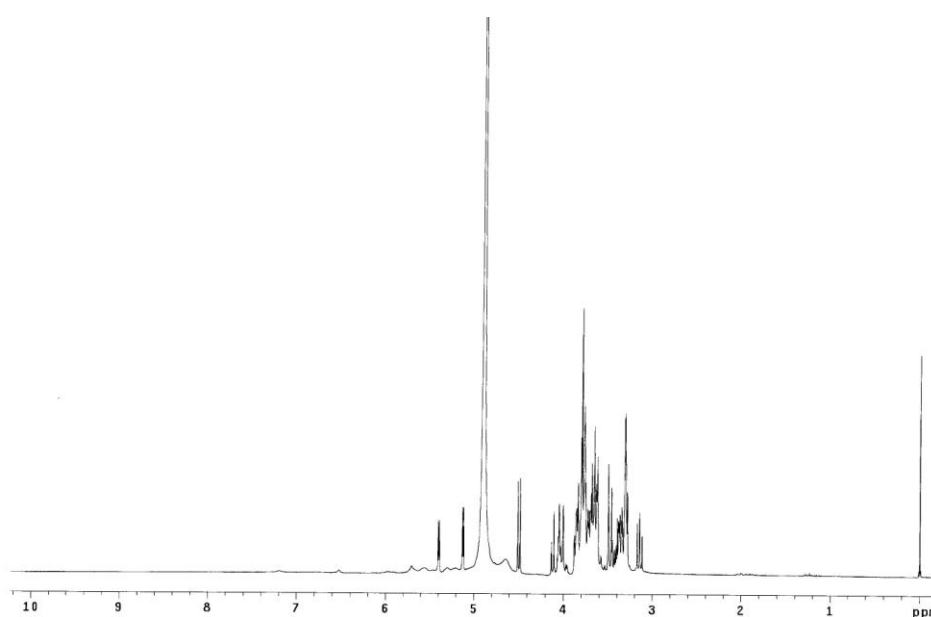


Figura 26: Espectro de RMN de ^1H de FP (300MHz, CD_3OD)

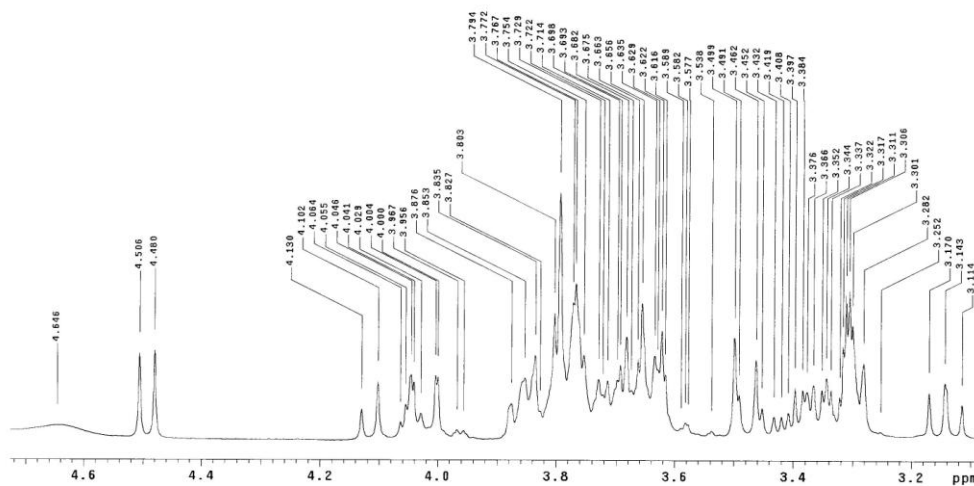


Figura 27: Espectro de RMN de ^1H de FP – Expansão da região entre $\delta 5,2$ e $\delta 3,1$ ppm (300MHz, CD_3OD)

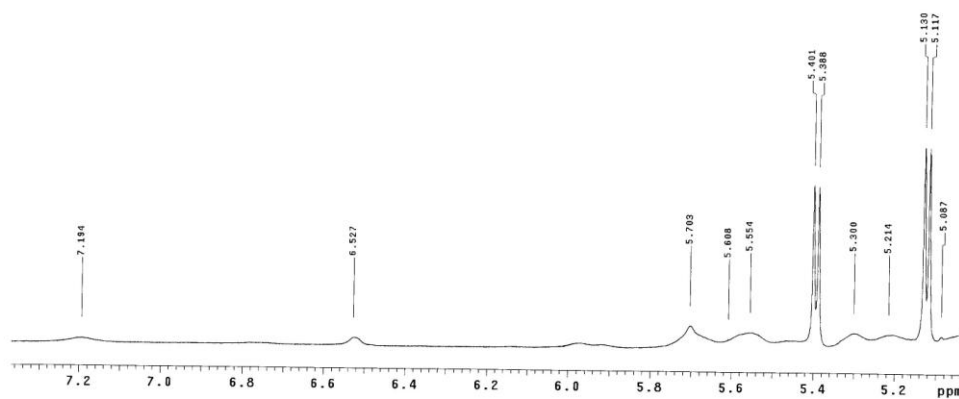


Figura 28: Espectro de RMN de ^1H de FP – Expansão da região entre $\delta 7,0$ e $\delta 5,0$ ppm (300MHz, CD_3OD)

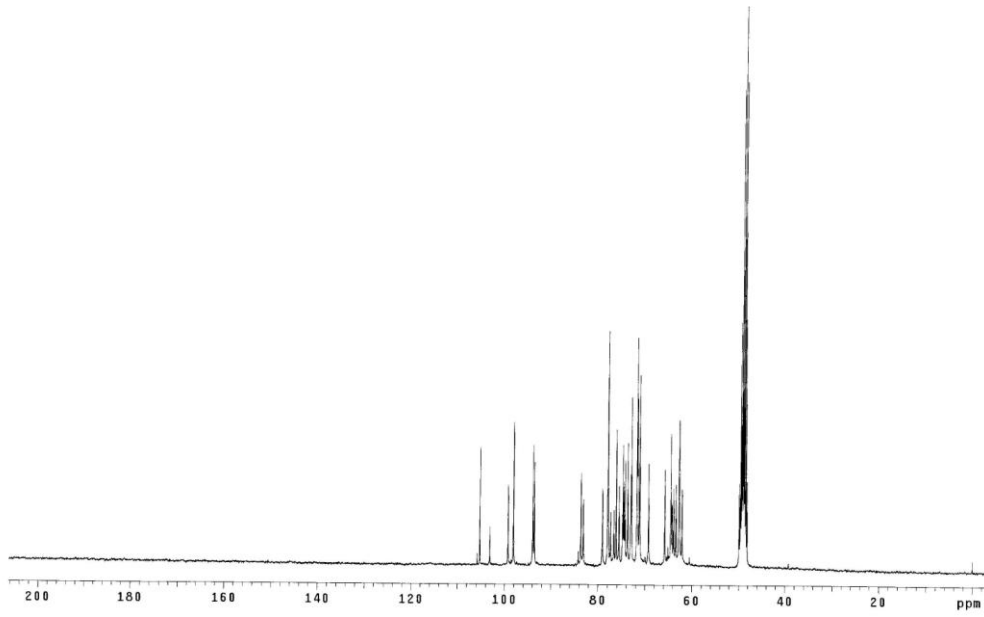


Figura 29: Espectro de RMN de ¹³C de FP (75MHz, CD₃OD)

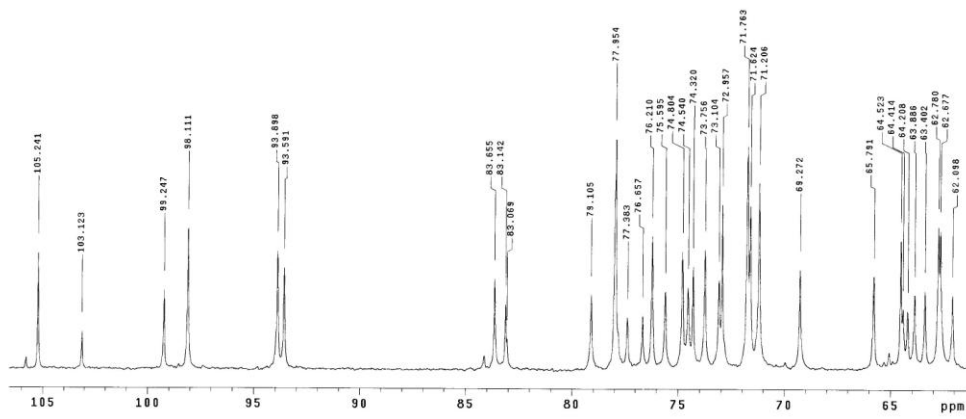


Figura 30: Espectro de RMN de ¹³C de FP – Expansão da região entre δ106,0 e δ62,0 ppm (75MHz CD₃OD)

Tabela 13: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de FP (75MHz, CD_3OD) e aqueles descritos na literatura para sacarose, glicose e frutose (111, 113)

Carbono	Glicose (δ_{C})	FP (δ_{C})	Frutose (δ_{C})	FP (δ_{C})	Sacarose (δ_{C})	FP(δ_{C})
1'					94,6	93,8
2'					73,5	73,7
3'					75,1	75,5
4'					71,9	71,7
5'					74,9	74,8
6'					62,9	62,7
1	93,0	93,5	65,9	65,7	63,9	63,8
2	72,4	72,9	99,1	99,2	106,0	105,2
3	73,7	73,7	70,9	71,2	79,0	79,1
4	70,7	71,2	71,3	71,6	76,7	76,6
5	72,3	71,7	70,0	69,2	84,0	83,6
6	61,8	62,0	61,9	62,0	65,0	64,5

A fração FP foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de índice de refração (CLAE-IR), utilizando o método CLAE01. A análise do cromatograma obtido (Figura 31) mostrou a presença de três constituintes na amostra. A comparação com o tempo de retenção (t_{R}) de padrões analíticos de açúcares, mostrou que FP contém sacarose ($t_{\text{R}} = 11,95$ min), frutose ($t_{\text{R}} = 7,25$ min) e glicose ($t_{\text{R}} = 8,36$ min).

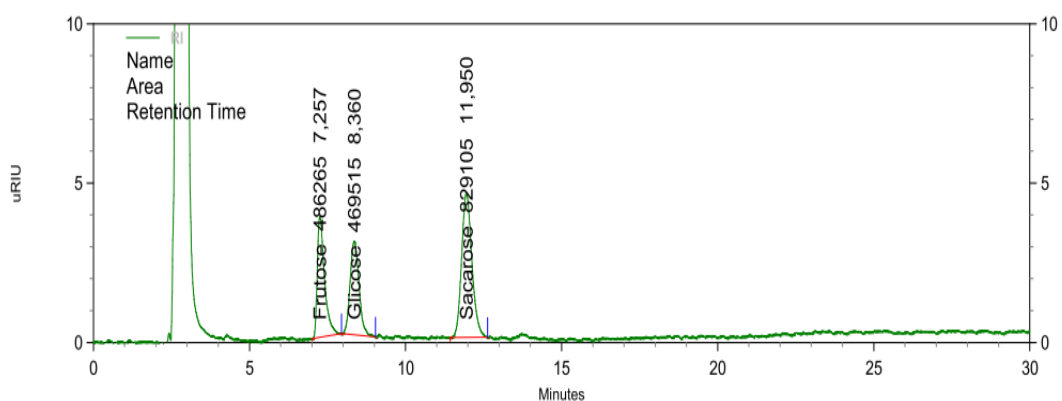
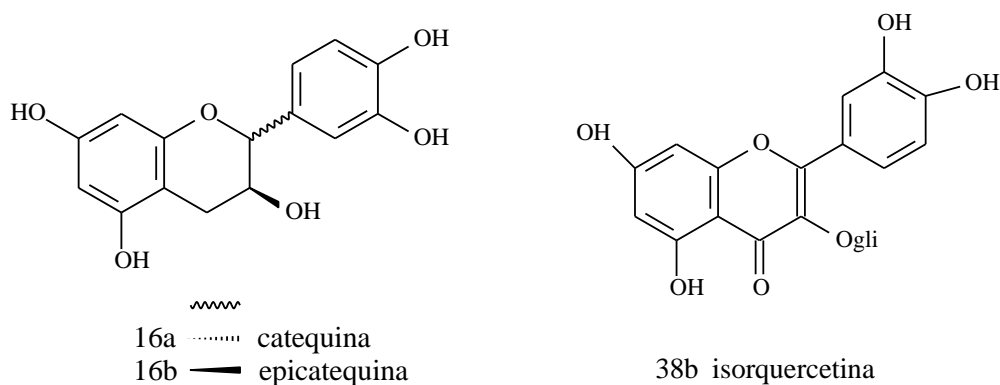


Figura 31: Cromatograma de FP em CLAE-IR da mistura frutose, glicose e sacarose em comparação ao padrão analítico. Condições de análise: coluna: Lichrospher 100 NH₂, 250 mm x 4,0 mm (HP 5 μm) mantida a 30°C; fluxo: 1mL/min; eluente: bomba A (acetonitrila), bomba B (água); detector: por índice de refração (RI); sistema de eluição: isocrático; programa de eluição: bomba A: bomba B (80:20); Região de análise entre 230 nm e 400 nm.

Foi realizada uma nova análise da fração FP utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector DAD (CLAE-DAD). A análise dos cromatogramas com os respectivos espectros de UV (na região entre 230 nm e 400 nm) sugeriu a presença de uma mistura contendo catequina [**16a**] e isoquercetrina [**38b**], sendo o composto isoquercetrina predominante, conforme mostrado nas Figuras 32 e 33. A presença do referido composto foi confirmada em comparação entre o t_R e o espectro de UV do cromatograma de FP, com aquele obtido para o padrão analítico de isoquercetrina.



Com isso, foi possível concluir que a fração FP é composta da mistura de isoquercetrina ($t_R= 28,8$ min), catequina ($t_R=14,1$ min), sacarose ($t_R= 13,82$ min), frutose ($t_R= 7,79$ min) e glicose ($t_R=9,2$ min).

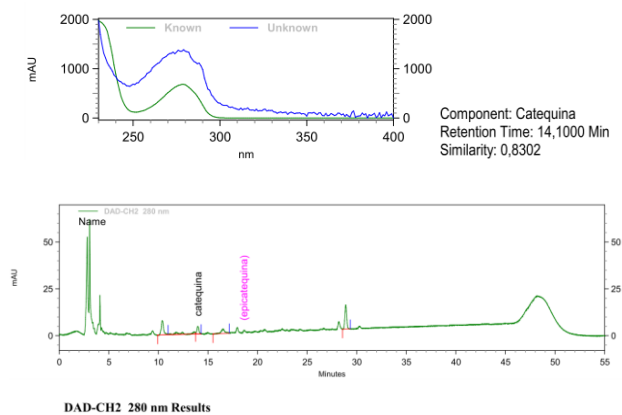


Figura 32: Cromatograma da fração FP em 280 nm e espectro no ultravioleta referente ao pico no $t_R= 14,1$ min em comparação ao padrão analítico catequina. Condições de análise: coluna: LichroCART 150-4,6 Purospher STAR RP 18e (5 μ m); Pré-coluna: LichroCART 4-46 Purospher STAR RP 18e (5 μ m); fluxo: 0,6mL/min; eluente: bomba A (água, acidificada com 1% de solução de ácido fosfórico 0,1M), bomba B (acetonitrila); detector: DAD; intervalo de análise: 230-400 nm; sistema de eluição: gradiente.

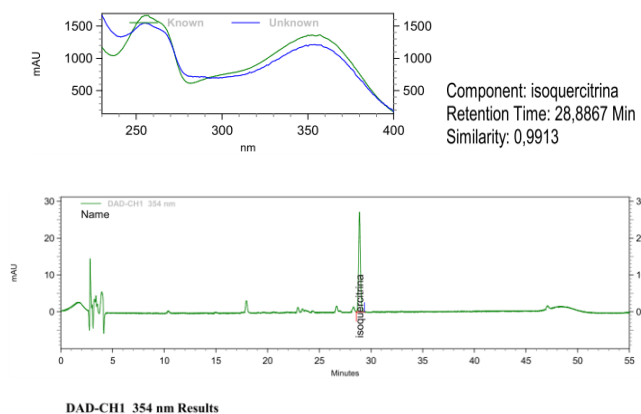


Figura 33: Cromatograma de FP em 354 nm e espectro no ultravioleta do composto isoquercetrina referente ao pico $t_R= 28,8$ em comparação ao padrão analítico. Condições de análise: coluna: LichroCART 150-4,6 Purospher STAR RP 18e (5 μ m); Pré-coluna: LichroCART 4-46 Purospher STAR RP 18e (5 μ m); fluxo: 0,6mL/min; eluente: bomba A (água, acidificada com 1% de solução de ácido fosfórico 0,1M), bomba B (acetonitrila); detector: DAD; intervalo de análise: 230-400 nm; sistema de eluição: gradiente.

6.5.2.2. Mistura de epicatequina (16b) e derivados de catequina (FS)

A amostra FS (86 mg) foi obtida na forma de um sólido amarelo, da fração acetona (FAC). A análise de FS por CCD, utilizando o revelador vanilina 1%, sugeriu que FS continha polifenóis, especificamente, catequinas, devido às manchas de coloração rosa intensa (114, 115).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 34) exibiu sinais, apesar de pouco evidentes, característicos de hidrogênios aromáticos que, quando comparados com dados da literatura (116-118), sugeriram a presença de catequinas, corroborando os achados em CCD. Dessa forma os sinais entre $\delta 6,70 - \delta 6,80$ foram atribuídos a H-5', H-2' e H-6'; os sinais entre $\delta 6,90 - \delta 7,0$, foram atribuídos a H-2' em epicatequina; entre $\delta 5,90 - \delta 6,0$, atribuídos a H-6 e H-8 (Figura 35). Foi ainda possível observar, um sinal largo em torno de $\delta 4,10$, atribuído a H-3 em epicatequina e um multiplete entre $\delta 4,0 - \delta 4,06$, característico de H-3 em catequina (Figura 36).

O espectro de RMN de ^{13}C mostrou-se complexo, com sinais intensos na região acima de $\delta 120,0$ (Figura 37), atribuídos a carbonos não hidrogenados do núcleo flavanol, onde os deslocamentos entre $\delta 154,0 - \delta 158,0$ correspondem aos carbonos C5, C7 e C9; os sinais entre $\delta 144,0 - \delta 146,5$ correspondentes aos carbonos C3' e C4' e os sinais entre $\delta 131,5 - \delta 133,0$ atribuído ao carbono C1' (Figuras 38 e 39) (116-118).

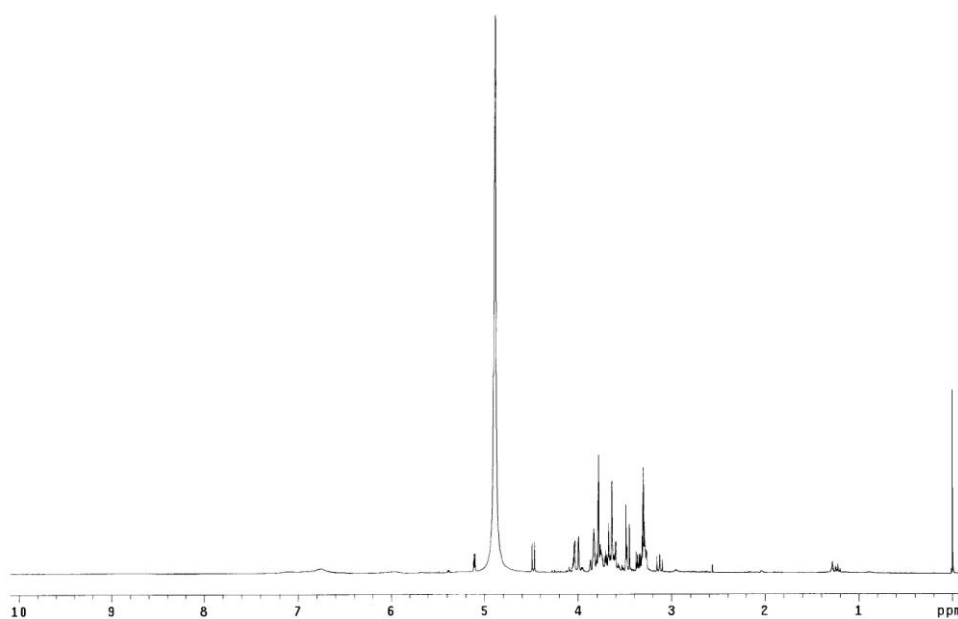


Figura 34: Espectro de RMN de ^1H de FS (300MHz, CD_3OD)

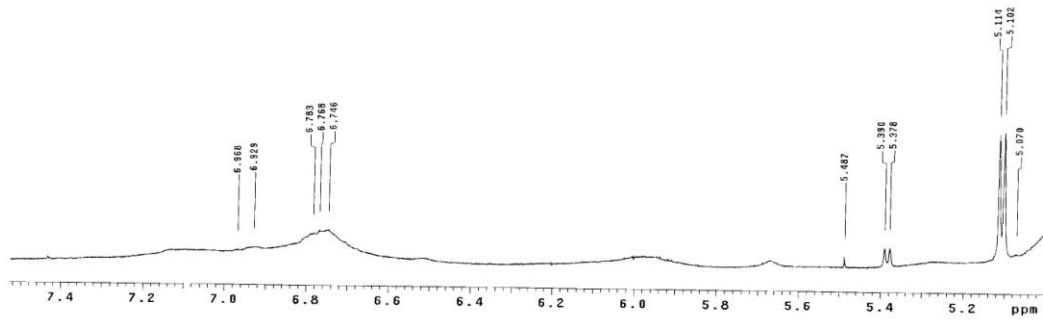


Figura 35: Espectro de RMN de ^1H de FS – Expansão da região entre $\delta 7,52$ e $\delta 5,04$ (300MHz, CD_3OD)

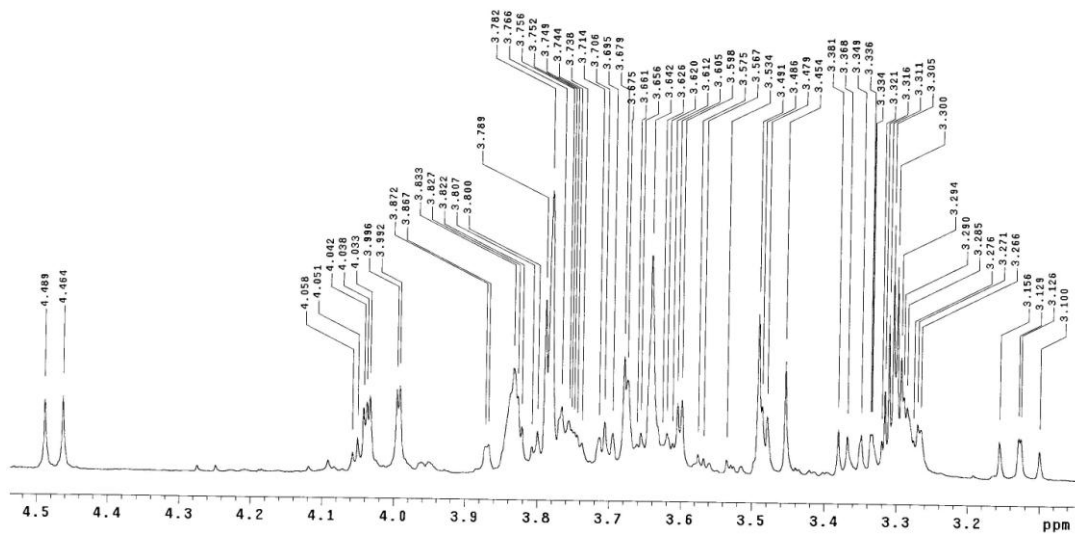


Figura 36: Espectro de RMN de ^1H de FS – Expansão da região entre $\delta 4,52$ e $\delta 3,06$ (300MHz, CD_3OD)

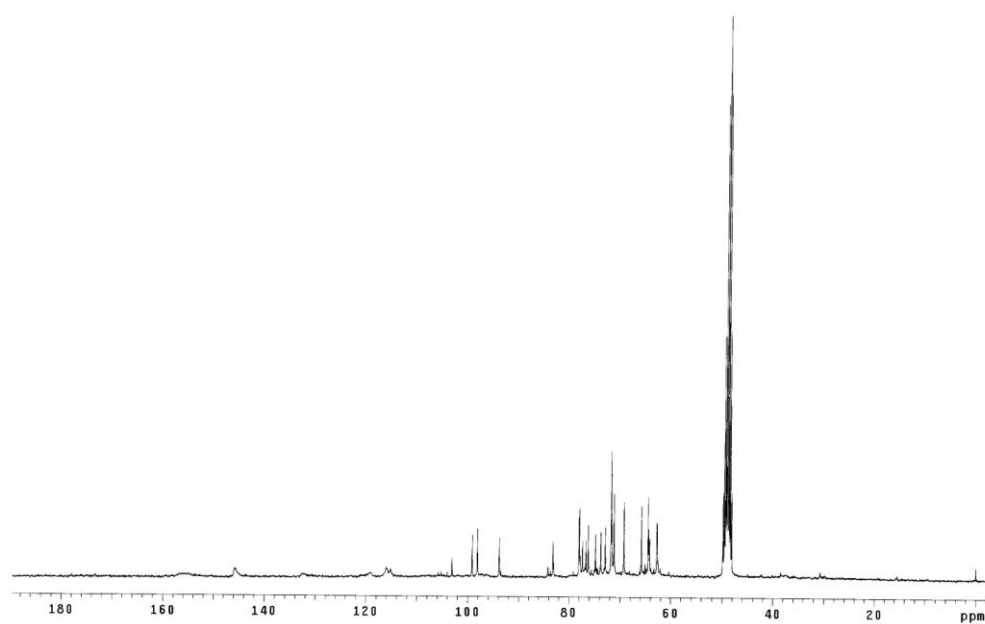


Figura 37: Espectro de RMN de ^{13}C de FS (75MHz, CD_3OD)

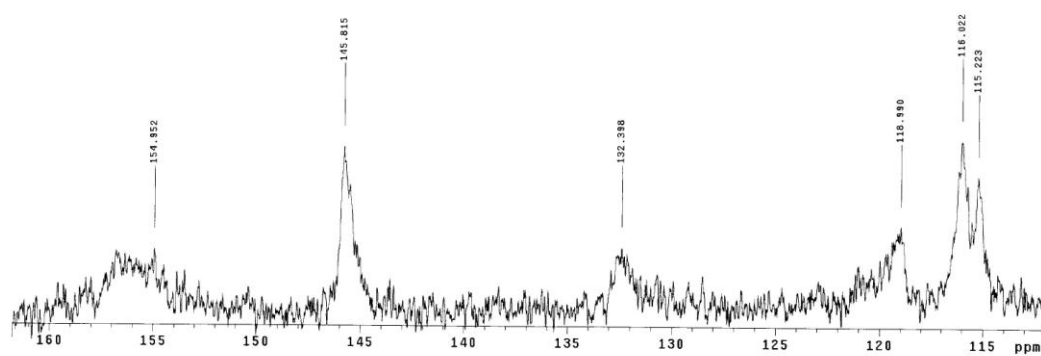


Figura 38: Espectro de RMN de ^{13}C de FS – Expansão da região entre $\delta 160,0$ e $\delta 112,0$ (75MHz, CD_3OD)

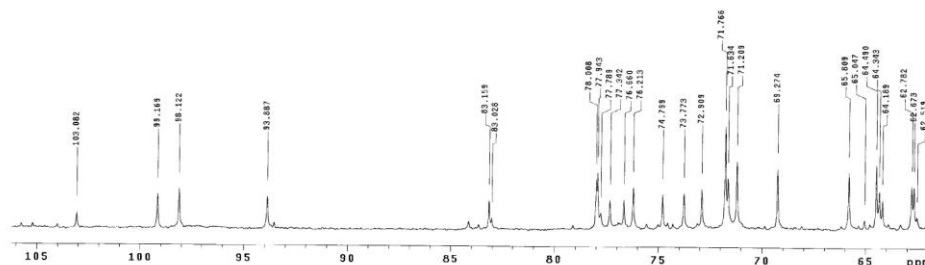


Figura 39: Espectro de RMN de ^{13}C de FS – Expansão da região entre $\delta 106,0$ e $\delta 62,0$ (75MHz, CD_3OD)

A presença de catequina [**16a**] em FS foi confirmada por análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), utilizando o método CLAE02. A análise do cromatograma obtido e dos respectivos espectros de UV (na região de 230 nm a 400 nm), também sugeriu a presença prevalente de epicatequina, que foi confirmada com a comparação entre os t_R e espectros de UV do cromatograma de FS, com aqueles obtidos para padrão analítico de epicatequina, conforme a Figura 40. Além de epicatequina, o cromatograma também sugeriu a presença de derivados de catequina. .

Dessa forma, foi possível confirmar que FS contém, dentre outros compostos, epicatequina ($t_R = 18,6$ min) e derivados de catequina.

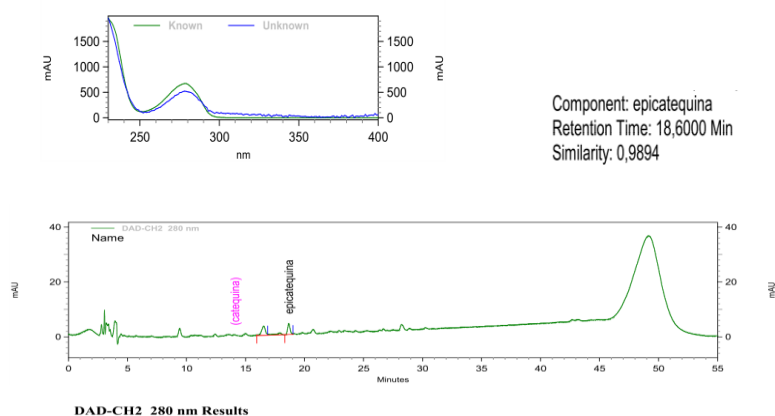


Figura 40: Cromatograma de FS em 280 nm e espectro no ultravioleta do composto epicatequina referente ao pico $t_R= 18,6$ em comparação ao padrão analítico. Condições de análise: coluna: LichroCART 150-4,6 Purospher STAR RP 18e (5 μ m); Pré-coluna: LichroCART 4-46 Purospher STAR RP 18e (5 μ m); fluxo: 0,6mL/min; eluente: bomba A (água, acidificada com 1% de solução de ácido fosfórico 0,1M), bomba B (acetonitrila); detector: DAD; intervalo de análise: 230-400 nm; sistema de eluição: gradiente.

6.5.3. Identificação das substâncias presentes na fração acetato de etila (FAET)

A fração FAET foi submetida à análise utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) utilizando o método CLAE02.

A comparação dos dados de FAET com o t_R e o espectro no UV de padrões analíticos permitiu identificar os compostos quercetina ($t_R= 46,8$ min), isoquercetrina ($t_R= 28,8$ min), catequina ($t_R=14,1$ min) e epicatequina ($t_R= 18,6$ min), conforme cromatogramas e espectros de UV gerados na região entre 230 nm e 400 nm (Figuras 41 e 42).

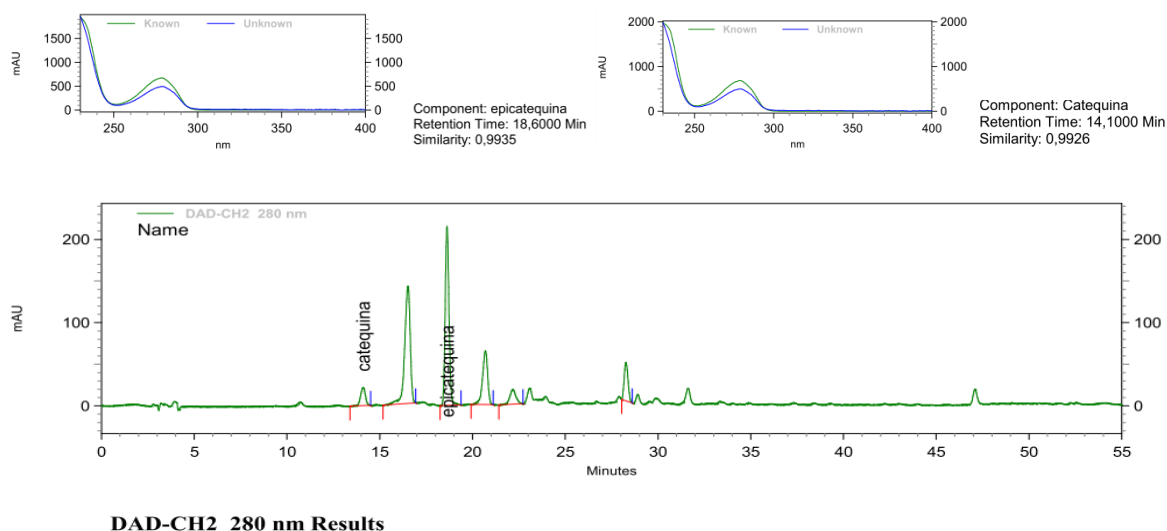


Figura 41: Cromatograma de FAET em 280 nm e espectro no ultravioleta dos compostos catequina ($t_R= 14,1$ min) e epicatequina ($t_R= 18,6$ min) em comparação aos padrões analíticos. Condições de análise: coluna: LichroCART 150-4,6 Purospher STAR RP 18e ($5\mu\text{m}$); Pré-coluna: LichroCART 4-46 Purospher STAR RP 18e ($5\mu\text{m}$); fluxo: 0,6mL/min; eluente: bomba A (água, acidificada com 1% de solução de ácido fosfórico 0,1M), bomba B (acetonitrila); detector: DAD; intervalo de análise: 230-400 nm; sistema de eluição: gradiente.

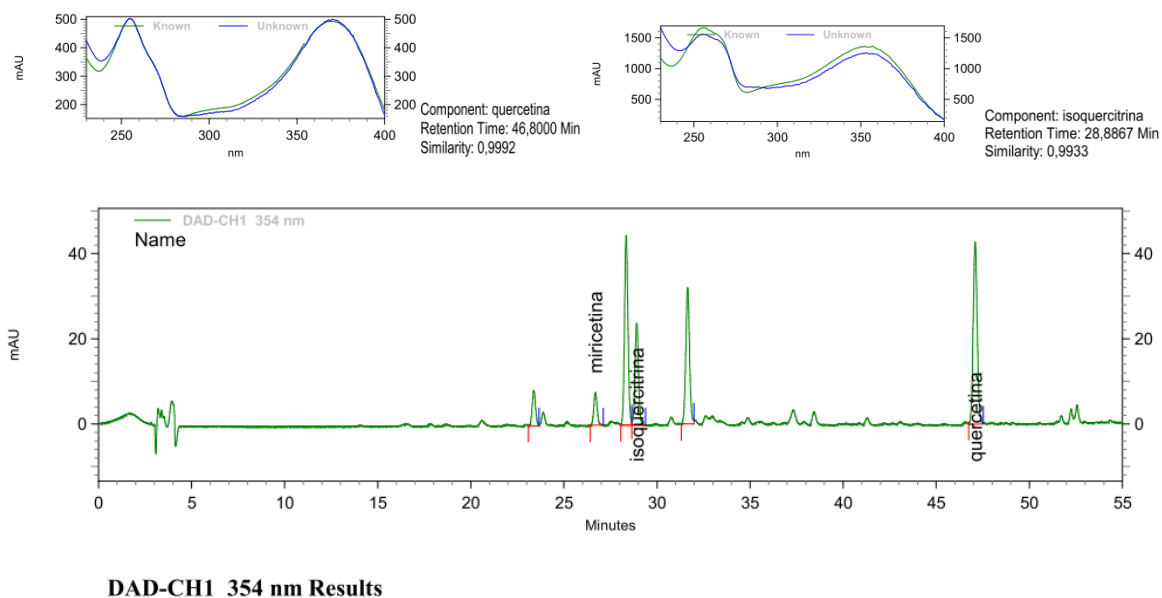


Figura 42: Cromatograma de FAET em 354 nm e espectro no ultravioleta dos compostos quercetina ($t_R= 46,8$ min) e isoquercetrina ($t_R= 28,8$ min) em comparação aos padrões analíticos. Condições de análise: coluna: LichroCART 150-4,6 Purospher STAR RP 18e ($5\mu\text{m}$); Pré-coluna: LichroCART 4-46 Purospher STAR RP 18e ($5\mu\text{m}$); fluxo: 0,6mL/min; eluente: bomba A (água, acidificada com 1% de solução de ácido fosfórico 0,1M), bomba B (acetonitrila); detector: DAD; intervalo de análise: 230-400 nm; sistema de eluição: gradiente.

6.5.3.1. Lupeol e acetato de β -amirina (FAET1)

A amostra FAET1 (80 mg) foi obtida da elaboração da fração acetato de etila (FAET), resultante do fracionamento do extrato hidroalcoólico bruto do epicarpo de *P. torta* (Esquema 2). Apresentou-se como sólido branco, solúvel em clorofórmio.

A análise do espectro na região do IV (KBr, cm^{-1}), de FAET1 (Figura 43) mostrou a presença de bandas de absorção em 2946 cm^{-1} e 2875 cm^{-1} , estiramento de ligação C-H de carbono sp^3 ; em 1735 cm^{-1} atribuída a estiramento de ligação C=O de éster; 1639 cm^{-1} , atribuída a estiramento de ligação dupla C=C de olefinas; 1458 cm^{-1} e 1373 cm^{-1} , atribuídas a deformação de ligação C-H; em 1245 cm^{-1} , atribuída a estiramento de ligação C-O de éster; e em 1027 cm^{-1} , referente a estiramento de ligação C-O.

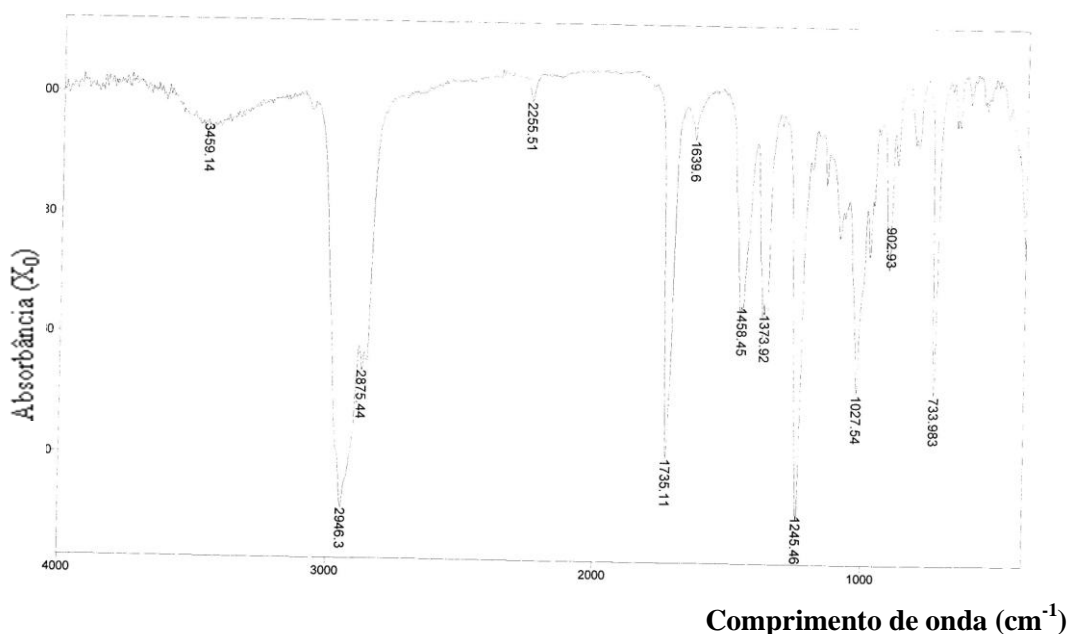


Figura 43: Espectro na região do infravermelho de FAET1 (KBr, cm^{-1})

A multiplicidade de sinais na região de menor blindagem nos espectros de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300M Hz) e de ^{13}C (CDCl_3 , 75MHz) (Figuras 44 e 45) revelou o caráter triterpênico dos constituintes dessa mistura.

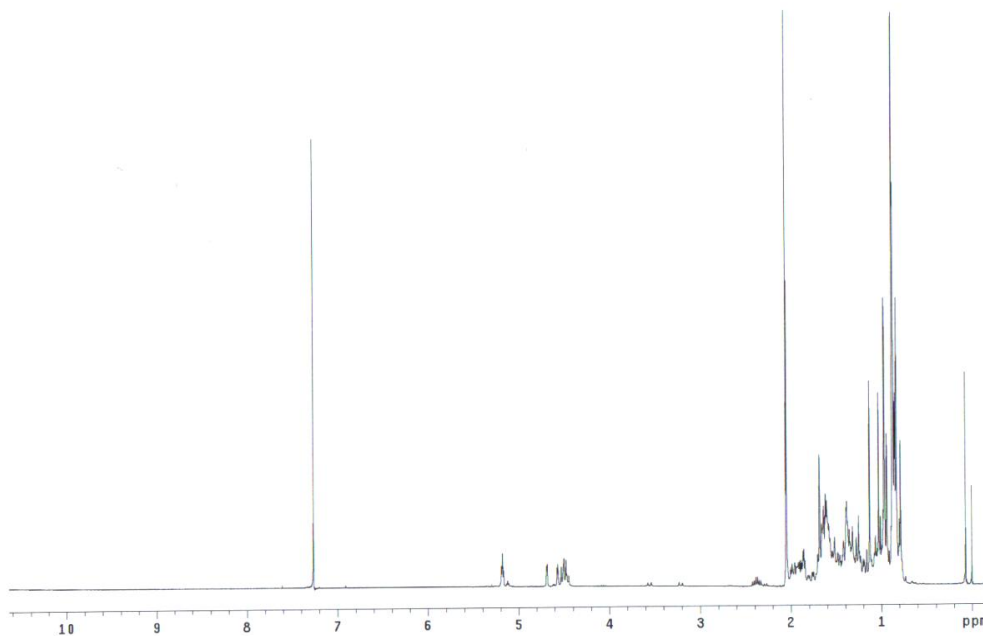


Figura 44: Espectro de RMN de ^1H de FAET1 (300 MHz, CDCl_3)

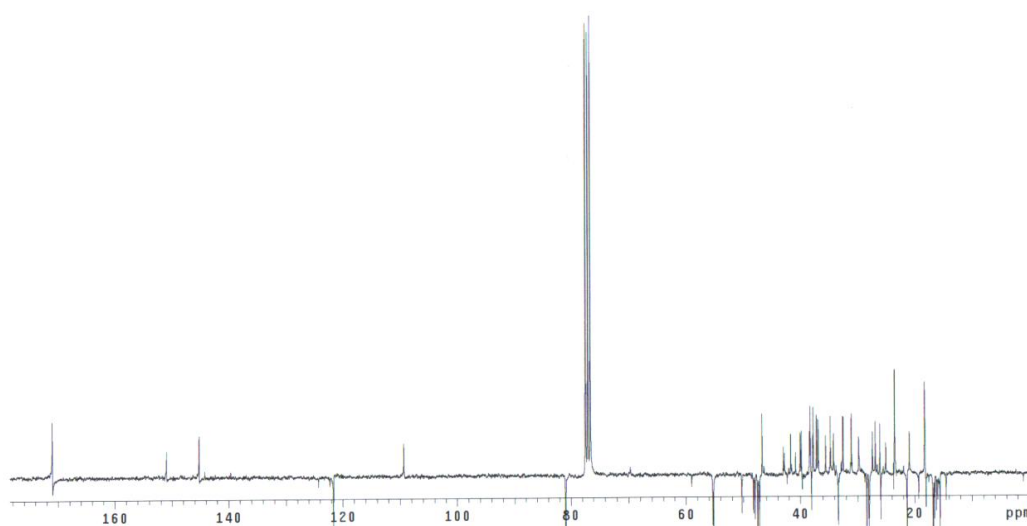


Figura 45: Espectro de RMN de ^{13}C -APT de FAET1 (75 MHz, CDCl_3)

Na expansão da região entre $\delta 4,30$ e $\delta 5,30$ do espectro de RMN de ^1H de FAET1 (Figura 46) foram observados sinais em $\delta 5,18$ (1H, *t*, $J = 3,6$ Hz) e em $\delta 5,12$ (1H, *t*, $J = 3,6$ Hz), atribuídos a hidrogênios ligados a carbonos olefínicos de esqueleto das classes ursano e oleano, respectivamente; $\delta 4,6$ (*d*, $J = 2,4$ Hz) atribuído a hidrogênios da dupla exocíclica em C29 para triterpenos com esqueleto lupano; um duplo duplete em $\delta 4,57$ ($J = 1,5$ Hz e $3,9$ Hz) que sugeriu a presença de um grupo hidroxila esterificado na posição C3 do esqueleto triterpênico.

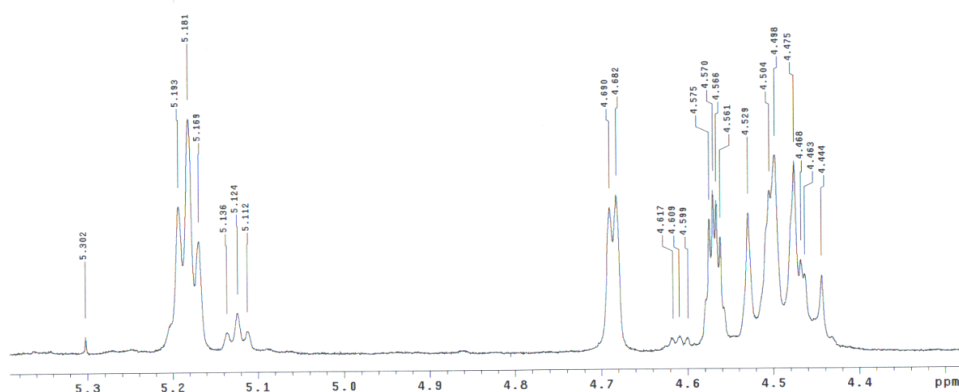


Figura 46: Espectro de RMN de ^1H de FAET1 – Expansão da região entre $\delta 4,3$ e $\delta 5,3$ (300 MHz, CDCl_3)

A expansão da região entre $\delta 3,1$ e $\delta 4,2$ do espectro de RMN de ^1H de FAET1 (Figura 47) mostrou sinal em $\delta 3,23$ (1H, *d*, $J = 11,1$ Hz), relativo a hidrogênio H-3 para ursanos e oleanos (119, 120). Na expansão da região entre $\delta 0,75$ e $\delta 2,5$ foram observados sinais entre $\delta 0,78$ e $\delta 2,05$, que correspondem a hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos (Figuras 48 e 49).

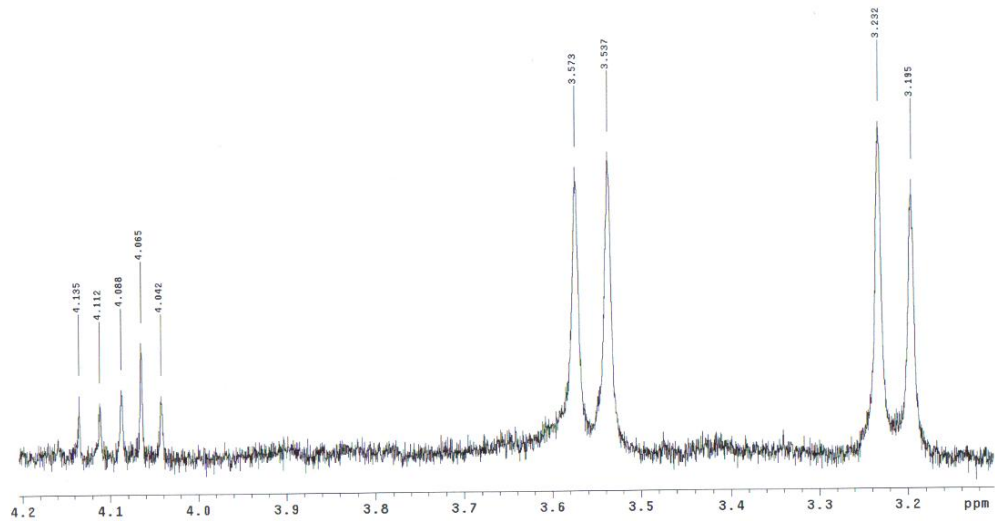


Figura 47: Espectro de RMN de ^1H de FAET1 – Expansão da região entre $\delta 4,2$ e $\delta 3,1$ (300 MHz, CDCl_3)

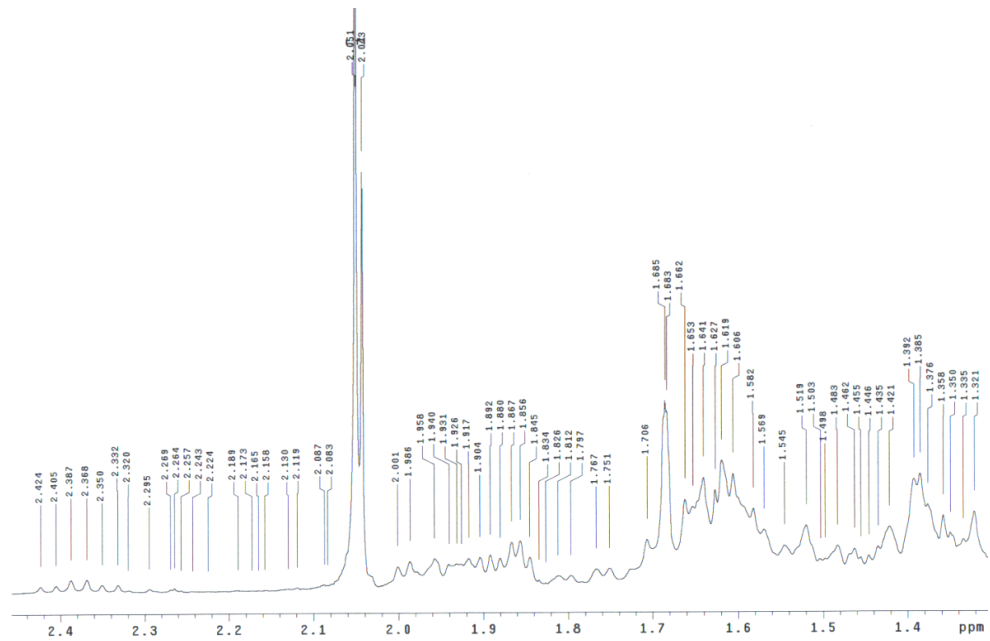


Figura 48: Espectro de RMN de ^1H de FAET1 – Expansão da região entre $\delta 2,4$ e $\delta 1,3$ (300MHz, CDCl_3)

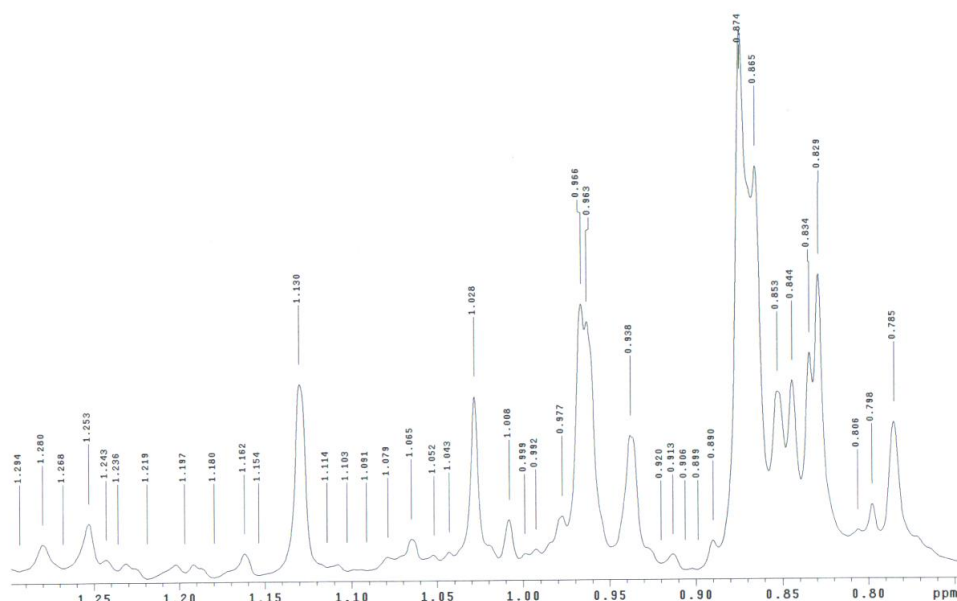


Figura 49: Espectro de RMN de ^1H de FAET1 – Expansão da região entre $\delta 1,29$ e $\delta 0,75$ (300MHz, CDCl_3)

A expansão da região entre $\delta 171,0$ e $\delta 74,0$ do espectro de RMN de ^{13}C (APT) de FAET1 (Figura 50) mostrou sinais na região de olefina para os carbonos sp^2 C13 (quaternário) e C12 em $\delta 121,8$ e $\delta 145,2$, respectivamente, característicos de esqueleto triterpênico do tipo oleano; e em $\delta 109,3$ e $\delta 150,9$ característicos de carbonos sp^2 C20 (quaternário) e C29 de esqueleto lupeno. Além disso, foi observado sinal em $\delta 80,9$ que corresponde a carbono carbinólico C3 no esqueleto do tipo oleano, ou oximetínico no esqueleto do tipo lupano. Como foram observados sinais referentes a ambos os tipos de esqueleto, é possível que dois sinais estejam sobrepostos.

Também foi possível observar a presença de sinal de carbono carbonílico de éster ($\delta 171,0$), análise corroborada pelos dados espectrais no espectro de IV que mostrou sinais referentes a grupo acílico de éster em 1735 cm^{-1} . O sinal em $\delta 21,3$, mostrado pela expansão da região entre $\delta 60,0$ e $\delta 14,0$ do espectro de RMN de ^{13}C de FAET1, sugeriu a presença de grupo metila ligado a carbono acílico (Figura 51).

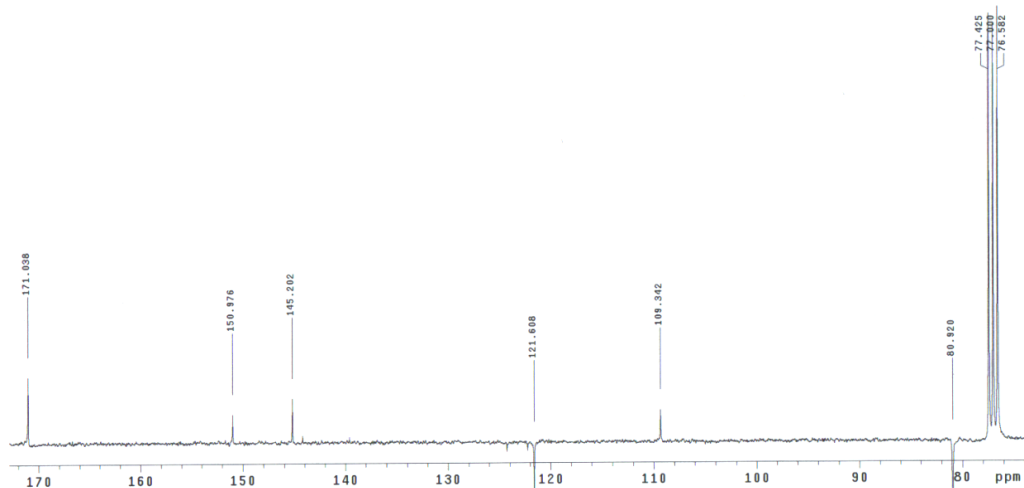


Figura 50: Espectro de RMN de ^{13}C -APT de FAET1– Expansão da região entre $\delta 171,0$ e $\delta 74,0$ (75MHz, CDCl_3)

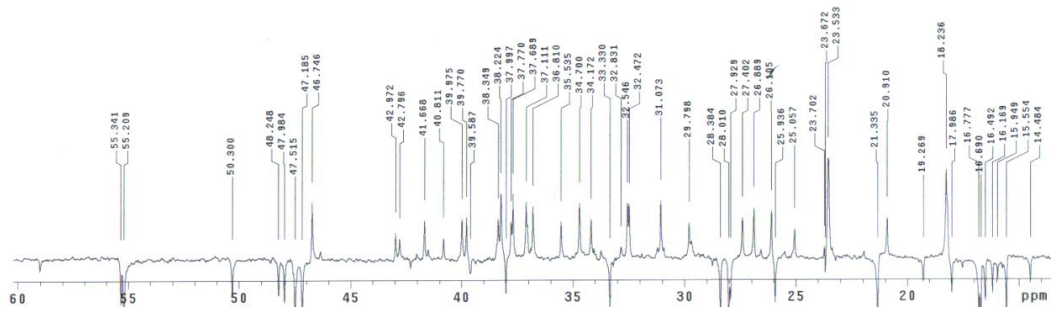
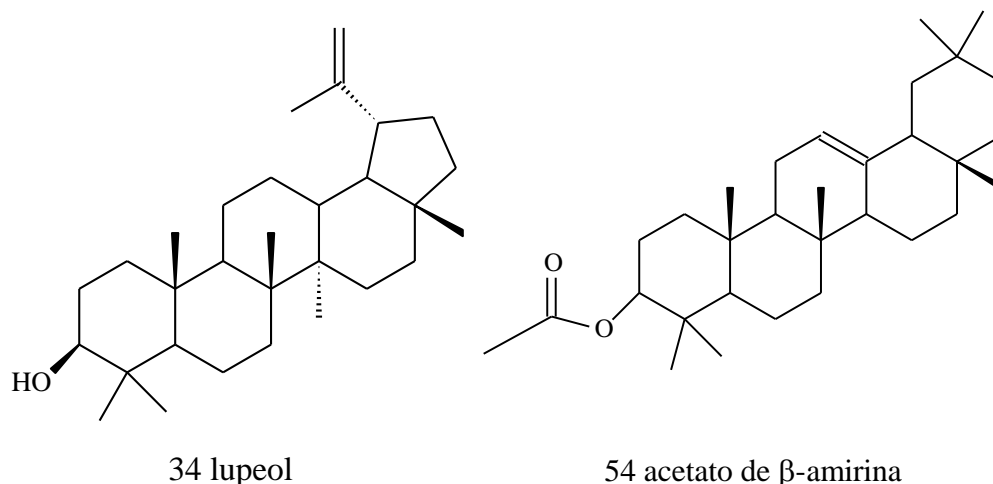


Figura 51: Espectro de RMN de ^{13}C -APT de FAET1– Expansão da região entre $\delta 60,0$ e $\delta 14,0$ (75MHz, CDCl_3)

A análise dos dados apresentados e comparação com a literatura sugeriram que FAET1 seja composta de uma mistura dos triterpenos lupeol [35] e acetato de β -amirina [54]. Os deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C estão na Tabela 14.

Tabela 14: Deslocamentos químicos de FAET1 em RMN de ^{13}C (δ , CDCl_3 , 75MHz) em comparação com os dados da literatura (δ , CDCl_3 , 75MHz) (121, 122)

Carbono	FAET1 (δ_{C})	Lupeol (δ_{C})	FAET1 (δ_{C})	Acetato de β -amirina (δ_{C})
1	38,3	38,7	38,3	38,2
2	27,4	27,4	26,8	26,6
3	80,9	81,0	80,9	80,9
4	37,9	37,8	37,7	37,7
5	55,3	55,4	55,3	55,2
6	18,2	18,2	18,2	18,2
7	34,7	34,3	32,5	32,6
8	40,8	40,9	38,2	38,4
9	50,3	50,4	47,5	47,5
10	37,1	37,1	36,8	36,8
11	20,9	21,0	23,6	23,6
12	25,0	25,1	121,6	121,6
13	38,2	38,1	145,2	145,2
14	42,7	42,9	41,6	41,7
15	27,4	27,5	26,1	26,1
16	35,5	35,6	26,8	26,9
17	42,9	43,0	32,8	32,9
18	48,2	48,3	47,1	47,1
19	47,9	48,0	46,7	46,8
20	150,9	150,9	31,0	31,0
21	29,7	29,9	34,7	34,7
22	39,9	40,0	37,1	37,1
23	28,0	28,0	28,0	28,0
24	16,4	16,5	15,5	15,5
25	16,1	16,2	15,5	15,7
26	15,9	16,0	16,7	16,8
27	14,4	14,5	25,9	25,9
28	17,9	18,0	28,3	28,3
29	109,3	109,4	33,3	33,3
30	19,2	19,3	23,7	23,6
CH_3CO	-	-	38,3	38,4
CH_3CO	-	-	170,8	170,9



6.5.3.2. Derivados de catequina e epicatequina (FAET2)

A fração FAET2 (35 mg) foi obtida da elaboração da fração acetato de etila (FAET), resultante do fracionamento do extrato hidroalcoólico bruto do epicarpo de *P. torta* (Esquema 2). Apresentou-se como sólido branco amarelado, solúvel em metanol.

FAET2 foi submetida a análise utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) utilizando o método CLAE02. O espectro de UV, referentes a maioria dos picos presentes no cromatograma sugeriu que FAET2 contém uma mistura de derivados de catequina e epicatequina.

6.5.3.3. Mistura de compostos fenólicos (FAET3)

A fração FAET3 (299 mg) foi obtida da elaboração da fração acetato de etila (FAET), resultante do fracionamento do extrato hidroalcoólico bruto do epicarpo de *P. torta* (Esquema 2). Apresentou-se como um sólido amarelo pastoso, solúvel em metanol. Quando avaliado por CCD de sílica (FM2, R2), apresentou uma mancha amarela que se intensificava ao ser submetida à luz UV, após revelação com R2.

FAET3 foi submetida à análise utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) utilizando o método CLAE02. A análise mostrou que a amostra é composta de uma mistura de quercetina ($t_R= 46,8$ min), isoquercetrina ($t_R= 28,8$ min), catequina ($t_R=14,1$ min) e epicatequina ($t_R= 18,6$ min), confirmada em comparação entre t_R e o espectro de UV do cromatograma de FAET3 gerado, com aqueles obtidos para os padrões analíticos (Figuras 52 e 53).

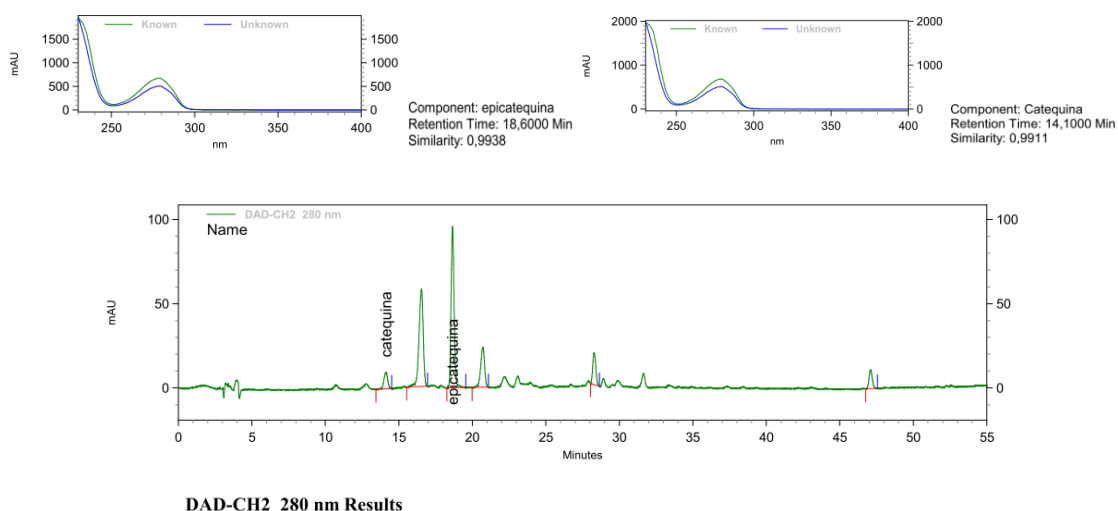


Figura 52: Cromatograma de FAET3 em 280 nm e espectro no ultravioleta dos compostos catequina e epicatequina referentes aos picos $t_R= 14,1$ min e $t_R= 18,6$ min, respectivamente, em comparação aos padrões analíticos. Condições de análise: coluna: LichroCART 150-4,6 Purospher STAR RP 18e ($5\mu\text{m}$); Pré-coluna: LichroCART 4-46 Purospher STAR RP 18e ($5\mu\text{m}$); fluxo: 0,6mL/min; eluente: bomba A (água, acidificada com 1% de solução de ácido fosfórico 0,1M), bomba B (acetonitrila); detector: DAD; intervalo de análise: 230-400 nm; sistema de eluição: gradiente.

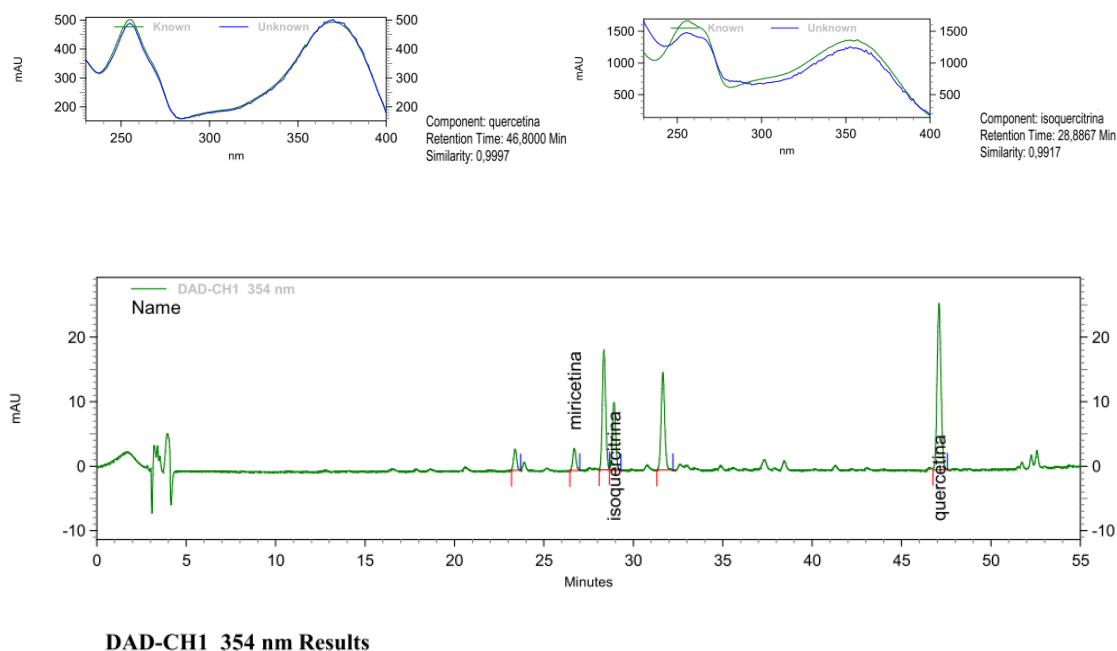


Figura 53: Cromatograma de FAET3 em 354 nm e espectro no ultravioleta dos compostos quercetina ($t_R = 46,8$ min) e isoquercetrina ($t_R = 28,8$ min) em comparação aos padrões analíticos. Condições de análise: coluna: LichroCART 150-4,6 Purospher STAR RP 18e ($5\mu\text{m}$); Pré-coluna: LichroCART 4-46 Purospher STAR RP 18e ($5\mu\text{m}$); fluxo: $0,6\text{mL}/\text{min}$; eluente: bomba A (água, acidificada com 1% de solução de ácido fosfórico $0,1\text{M}$), bomba B (acetonitrila); detector: DAD; intervalo de análise: 230-400 nm; sistema de eluição: gradiente.

6.5.4. Identificação das substâncias presentes na fração hexânica do extrato hidroalcoólico bruto

6.5.4.1. Acetato de β -amirina (FH1)

FH1 foi obtida na forma de um sólido branco, solúvel em clorofórmio, a partir da elaboração da fração hexânica (Esquema 4).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 54) mostrou sinal em: $\delta 5,18$ (1H, t, $J = 3,6\text{Hz}$) que corresponde a hidrogênio olefínico em C12 de esqueleto triterpênico; em $\delta 2,05$ correspondente aos hidrogênios do grupo acetila; sinais entre $\delta 0,82$ e $\delta 1,86$ correspondentes aos hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos. A presença dos simpletos em $\delta 0,87$ e $\delta 1,13$ caracteriza hidrogênios metílicos nos carbonos C27 e em C29, respectivamente, dos oleanos (Figura 55) (123).

A análise do espectro de RMN de ^{13}C de FH1 mostrou sinais na região de olefinas para os carbonos sp^2 de C13 (quaternário) e C12 em $\delta 121,6$ e $\delta 145,2$ de

oleanos (Figura 56); e sinal em 80,9 que corresponde a carbono carbinólico C3. Foi possível observar ainda sinais em δ 38,2 e δ 171,0 atribuídos aos carbonos do grupo acetila (Figuras 56 e 57) (122, 123).

A comparação com os dados obtidos na literatura sugeriu que FH1 seja caracterizado como acetato de β -amirina. Os deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C estão na Tabela 15.

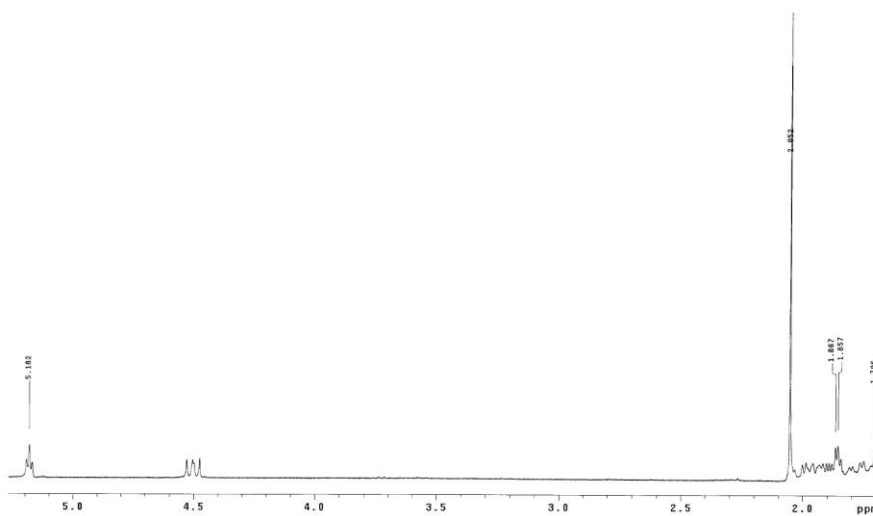


Figura 54: Espectro de RMN de ^1H de FH1 – Expansão da região entre δ 5,2 e δ 1,7 (300 MHz, CDCl_3)

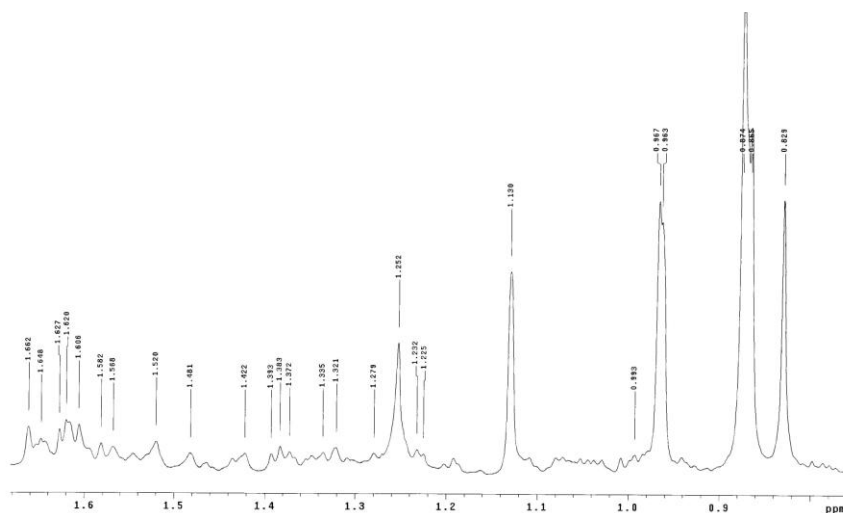


Figura 55: Espectro de RMN de ^1H de FH1 – Expansão da região entre $\delta 1,66$ e $\delta 0,80$ (300 MHz, CDCl_3)

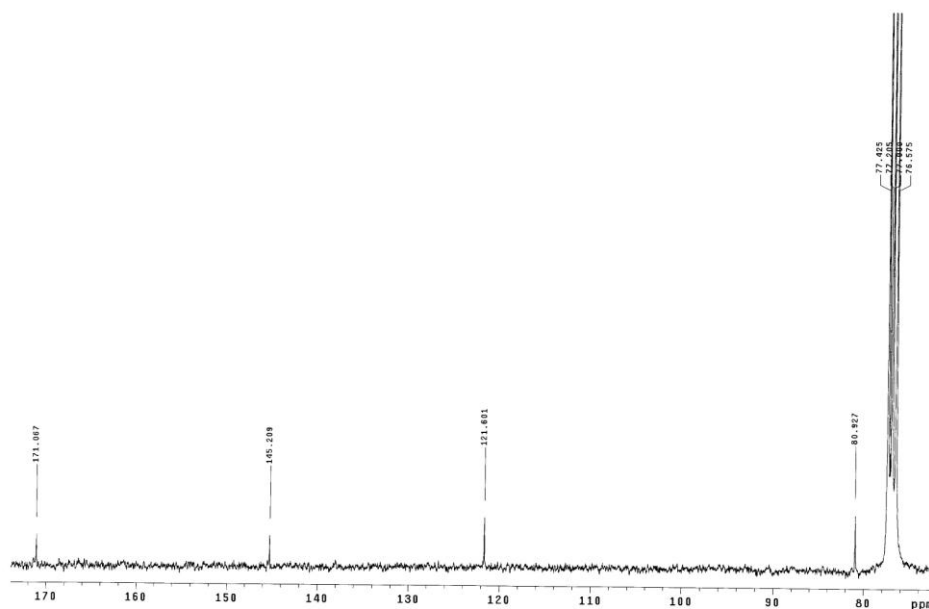


Figura 56: Espectro de RMN de ^{13}C de FH1 – Expansão da região entre $\delta 172,0$ e $\delta 74,0$ (75MHz, CDCl_3)

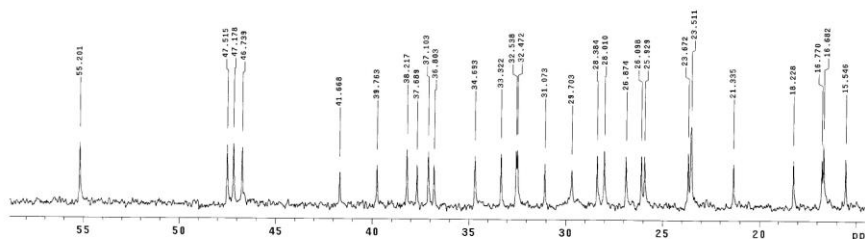
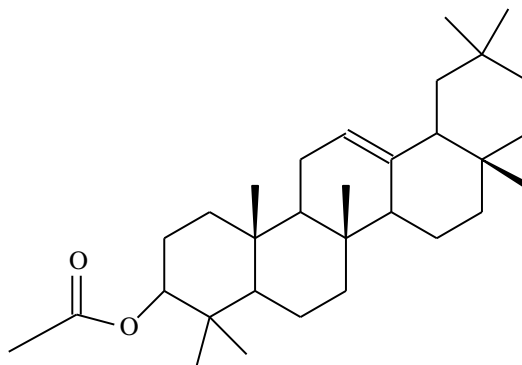


Figura 57: Espectro de RMN de ^{13}C de FH1– Expansão da região entre $\delta 58,0$ e $\delta 15,0$ (75MHz, CDCl_3)

Tabela 15: Deslocamentos químicos de FH1 em RMN de ^{13}C (δ , CDCl_3 , 75MHz) em comparação com os dados da literatura (δ , CDCl_3 , 75MHz) (122, 123).

Carbon o	FH1 (δ_{C})	Acetato de β -amirina (δ_{C})	Carbon o	FH1 (δ_{C})	Acetato de β -amirina (δ_{C})
1	38,2	38,2	17	32,5	32,9
2	26,8	26,6	18	47,1	47,1
3	80,9	80,9	19	46,7	46,8
4	37,6	37,7	20	31,0	31,0
5	55,2	55,2	21	34,6	34,7
6	18,2	18,2	22	37,1	37,1
7	32,4	32,6	23	28,0	28,0
8	38,2	38,4	24	15,5	15,5
9	47,5	47,5	25	15,5	15,7
10	36,8	36,8	26	16,7	16,8
11	23,6	23,6	27	25,9	25,9
12	121,6	121,6	28	28,3	28,3
13	145,2	145,2	29	33,3	33,3
14	41,6	41,7	30	23,6	23,6
15	26,0	26,1	CH_3CO	38,2	38,4
16	26,8	26,9	CH_3CO	171	170,9

54 acetato de β -amirina

6.5.5. Identificação das substâncias presentes na fração metanólica (FM)

O perfil cromatográfico da fração FM foi avaliado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a detector DAD. A análise dos cromatogramas e espectros de UV (região entre 230 nm e 400 nm) mostrou-se complexa, não sendo possível a identificação dos constituintes, com características estruturais compatíveis com o sistema de detecção utilizado, presentes na referida fração, em comparação aos padrões analíticos utilizados.

A indicação do uso de plantas medicinais para controle do DM2 tem perpetuado-se durante milênios pela medicina popular em diferentes culturas. Os efeitos benéficos dos inibidores de α -amilase provenientes de plantas medicinais são amplamente documentados em modelos *in vitro* e *in vivo* (124-126).

O estudo fitoquímico biomonitorado da fração FI₂ levou ao isolamento e identificação do constituinte sacarose e da mistura de sacarose, glicose e frutose. Sacarose padrão foi avaliada no ensaio de inibição da enzima α -amilase, porém nenhuma atividade foi observada para este composto.

Considerando esses achados, pode ser que uma possível polimerização das catequinas presentes pode ter ocorrido, levando à perda de atividade.

Assim, com as técnicas disponíveis em nosso laboratório, não foi possível a identificação do(s) constituinte(s) químico(s) presente(s) na fração FI₂ responsável (is) pela atividade de inibição da enzima α -amilase.

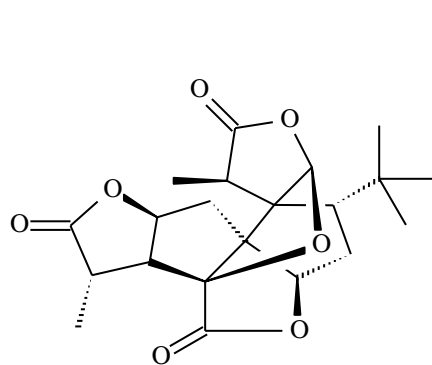
A investigação fitoquímica concluiu que a fração FAC é constituída da mistura de epicatequina, catequina, isoquercetrina, sacarose, glicose e frutose.

Com o fracionamento de FAC, a subfração obtida FP tornou-se enriquecida com os açúcares sacarose, glicose e frutose, além de ter sido identificada a presença de isoquercetrina, catequina e derivados de catequina; enquanto que na outra subfração obtida (FS) mostrou ser composta predominantemente de epicatequina, além de derivados de catequina.

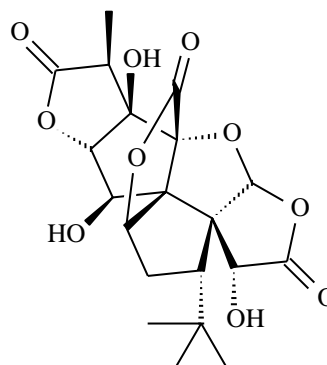
Porém, é interessante observar que FAC ($IC_{50} = 9,1 \mu\text{g/mL}$), mostrou-se mais potente que as subfrações obtidas: a avaliação da atividade de inibição da α -amilase mostrou que FP foi inativa, enquanto FS mostrou atividade de inibição. Contudo, a concentração inibitória calculada para FS ($IC_{50} = 22,1 \mu\text{g/mL}$) foi maior que a fração original, sugerindo que a atividade foi reduzida quando procedeu-se o fracionamento.

A redução ou mudança na atividade de extratos vegetais ativos, quando estes são submetidos a fracionamento é bem descrita na literatura. Interação sinérgica, *in vitro*, foi observada para a mistura dos ginkgolídeos A [55] e B [56], constituintes químicos presentes no *Ginkgo biloba* L., sobre o mecanismo de inibição do fator de ativação plaquetária (127). Foi verificada a ocorrência de maior atividade de antiagregação plaquetária quando os compostos foram testados em conjunto e uma redução em tal atividade quando testados separados (128), apesar do ginkgolídeo B ter sido identificado como antagonista específico do fator de ativação plaquetária (129-131).

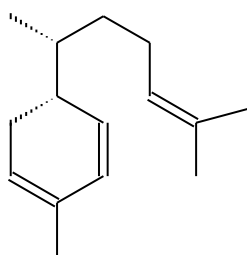
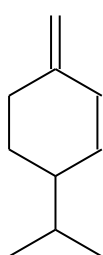
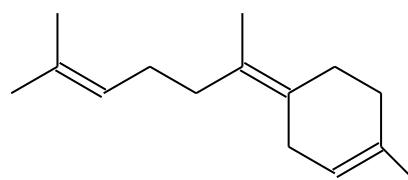
Da mesma forma, a interação sinérgica entre constituintes químicos está relacionada com os efeitos relatados para o *Zingiber officinalis* Roscoe (gengibre). Frações enriquecidas com α -zingibereno [57], β -felandreno [58], bisaboleno [59] e curcumeno [60] foram responsáveis por mais de 97% da atividade antiulcerogênica atribuída à espécie em contraste aos componentes isolados (132).



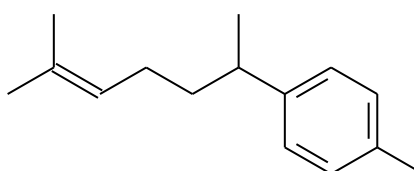
55 ginkgolídeo A



56 ginkgolídeo B

57 α -zingibereno58 β -felandreno

59 bisaboleno



60 curcumeno

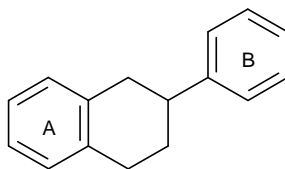
Em outro estudo, os flavonoides genisteína [15b], baicaleína [15c], hesperetina [13b], naringenina [13a] e quercetina [3a], extraídos de frutas cítricas, foram avaliados isolados e em combinações um a um em relação aos efeitos sobre a proliferação celular em linhagem de células de carcinoma humano (linhagem MDA-MB-435) e na tumorigênese mamária em ratas Sprague-Dawley, usando como agente cancerígeno o 7,12-dimetilbenzoantraceno (DMBA). Os resultados mostraram que os flavonoides quando testados em combinações um a um apresentaram maior efeito anti-proliferativo e anti-tumorigênese em comparação aos flavonoides avaliados isoladamente (133).

Com isso, é provável que os resultados obtidos para FAC e as subfrações FS e FP sejam devidos a um efeito sinérgico entre os compostos presentes na FAC e quando tais compostos foram separados, a potência da capacidade de inibição da enzima α -amilase foi reduzida, quando esta foi fracionada.

A presença de catequinas em frutos do gênero *Pouteria* foi previamente identificada (87), assim como, em outras espécies da família Sapotaceae (134, 135). Em frutos frescos de *Pouteria campechiana*, *P. sapota*, and *P. viridis* foram identificados (+)-galocatequina [40a], (+)-catequina [16a], (-)-epicatequina [16b] e (+)-catequina-3-O-galato [16c] (87). A presença de (+)-catequina, (-)-epicatequina e (+)-galocatequina foi também relatada para frutos de *Manilkara zapota*(134). De folhas da espécie *Chrysophyllum marginatum* foram identificadas a presença de (-)-epigalocatequina [40b] e (-)-epigalocatequina-3-O-galato [17] (135).

A inibição da enzima α -amilase por catequinas também foi previamente relatada. Um estudo mostrou que catequina e epicatequina apresentaram atividade de inibição sobre α -amilase salivar (13% e 11% de inibição, respectivamente; controle acarbose apresentando 9% de inibição (52). Koh et al. (2010) avaliaram a capacidade inibitória, sobre α -amilase salivar, de catequinas presentes em vários tipos de chás (66). Os resultados mostraram que galato de (-)-epigalocatequina e galato de (-)-epicatequina apresentaram valores para IC₅₀ em torno de 3 vezes menor que os encontrados para a acarbose, enquanto tal capacidade de inibição não foi verificada para hidrato de catequina (66).

Lo Piparo et al. (2008) avaliaram a interação entre flavonoides e a enzima α -amilase humana com o objetivo de elucidar o seu mecanismo molecular de inibição. A investigação mostrou que a potência de inibição está correlacionada com o número de grupamentos hidroxila presentes no anel B da estrutura do flavonóide. A interação ocorre com a formação de ligações de hidrogênio entre o grupamento hidroxila na posição R6 ou R7 do anel A e a posição R4' ou R5' do anel B do polifenol ligante com o resíduo catalítico presente no sítio de ligação da enzima. Em consequência, ocorre a formação de um sistema π conjugado que estabiliza a interação com o sítio ativo (52). O mecanismo de interação acima descrito é similar ao mecanismo proposto para a acarbose (53).



Esqueleto estrutural de flavonoides

Contudo, os dados aqui obtidos mostraram que a fração FAET, contendo os flavonoides quercetina, isoquercetrina e miricitrina não apresentou atividade de inibição da enzima α -amilase. E o ensaio de inibição enzimática realizado com quercetina revelou que, nas condições experimentais aqui utilizadas, a mesma não tem capacidade de inibição da enzima α -amilase.

Dados da literatura apontam certa capacidade de inibição enzimática para triterpenos dos tipos oleano, ursano e lupano (73). As condições experimentais desse trabalho mostraram que a fração FH apresentou baixo grau de inibição sobre a enzima α -amilase (17% de atividade inibitória). Estudos apontam o estresse oxidativo, resultante do estado de hiperglicemia prolongada, como um importante mecanismo patogênico envolvido na progressão acelerada da aterosclerose (136).

Os resultados mostraram que as complicações vasculares induzidas pela hiperglicemia estão relacionadas, provavelmente, a disfunções oxidativas geradas por espécies reativas de oxigênio (ERO) produzidas nas cadeias transportadoras de elétrons das mitocôndrias (136, 137).

Evidências relacionam o estado hiperglicêmico com a redução da capacidade natural das defesas antioxidantes. Em condições naturais, os radicais livres são rapidamente eliminados por substâncias antioxidantes como glutathione, vitaminas C e E. Contudo, níveis reduzidos de glutathione (138, 139) e vitamina E (140, 141) foram encontrados em pacientes diabéticos não controlados. Outro estudo mostrou ainda níveis reduzidos de vitamina C, em torno de 40-50%, em pacientes diabéticos quando comparados com não diabéticos (142, 143).

Vários compostos polifenólicos com potente capacidade antioxidante foram isolados de espécies da família Sapotaceae (87, 134, 135). A capacidade antioxidante total do extrato bruto do epicarpo do fruto de *P. torta* e as frações obtidas foi avaliada pelo método de redução do complexo fosfomolibdênio. Os resultados apresentados na Tabela 8 mostraram que tanto o extrato bruto como as

frações testadas possuem capacidade antioxidante significativa quando comparadas aos controles usados (ácido ascórbico, quercetina e BHT).

McDougall et al. (2005) verificaram a existência de correlação entre o consumo de extratos de frutos frescos ricos em polifenóis e a capacidade de inibição da enzima α -amilase. Segundo o autor, extratos com alta capacidade antioxidante possuíam também alta atividade de inibição da α -amilase (144). Contudo, os resultados obtidos, nas condições experimentais desse trabalho, evidenciaram fraca correlação entre os teores de polifenóis e flavonoides presentes nas amostras testadas com a capacidade de inibição enzimática.

A amostra FAET apresentou os maiores teores de polifenóis e flavonoides (quercetina [3a], isoquercetrina [38b], além de catequina [16a] e epicatequina [16b]), entre as amostras analisadas, porém não inibiu a atividade da α -amilase. Em contrapartida, FA mostrou alta capacidade de inibição enzimática a despeito de possuir teores medianos de polifenóis e teores baixos de flavonoides (Figuras 58 e 59). É interessante notar que tal correlação (polifenóis e inibição) também não foi observada em outro estudo com frutos nativos da flora brasileira: por exemplo, do uxi (*Endopleura uchi*), com alta capacidade antioxidante e alto teor de polifenóis não causaram inibição da α -amilase (145).

A redução da hiperglicemia por meio da supressão da hidrólise de carboidratos representa uma estratégia importante no controle do DM2. Os resultados aqui obtidos mostram que, nas condições experimentais utilizadas, a mistura dos constituintes epicatequina, catequina, derivados de catequina [16a], isoquercetrina [38b], sacarose [63], glicose [61] e frutose [62], presentes na fração FAC apresentou capacidade inibitória da α -amilase igual ou maior do que os controles, indicando que a fração FAC possui potencial de redução da absorção de glicose no intestino e, conseqüentemente, promoção de atividade hipoglicemiante.

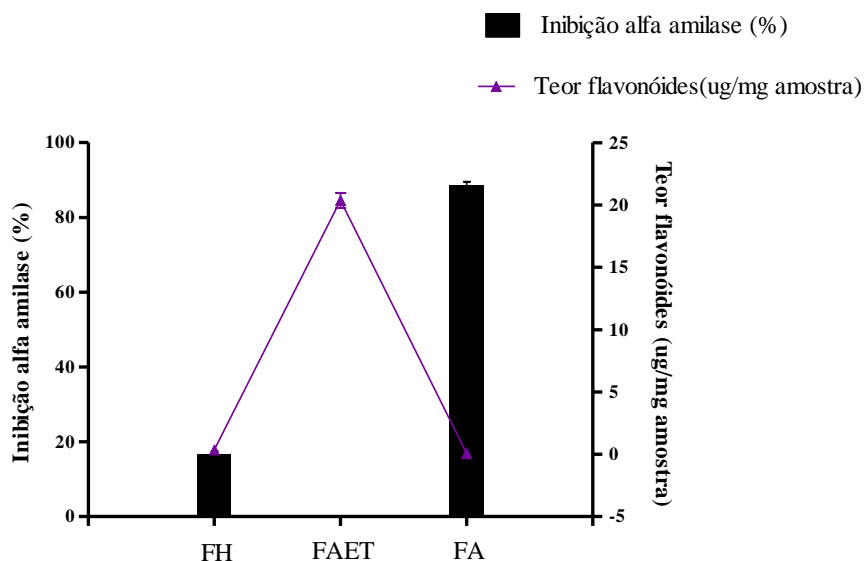


Figura 58: Comparação entre a capacidade inibitória de α -amilase (concentração da amostra 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e o teor de flavonóides ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de amostra) das frações FH, FAET e FA obtidas do extrato bruto do epicarpo do fruto de *P. torta*. Valores expressos como média de 3 experimentos, em triplicata \pm desvio padrão.

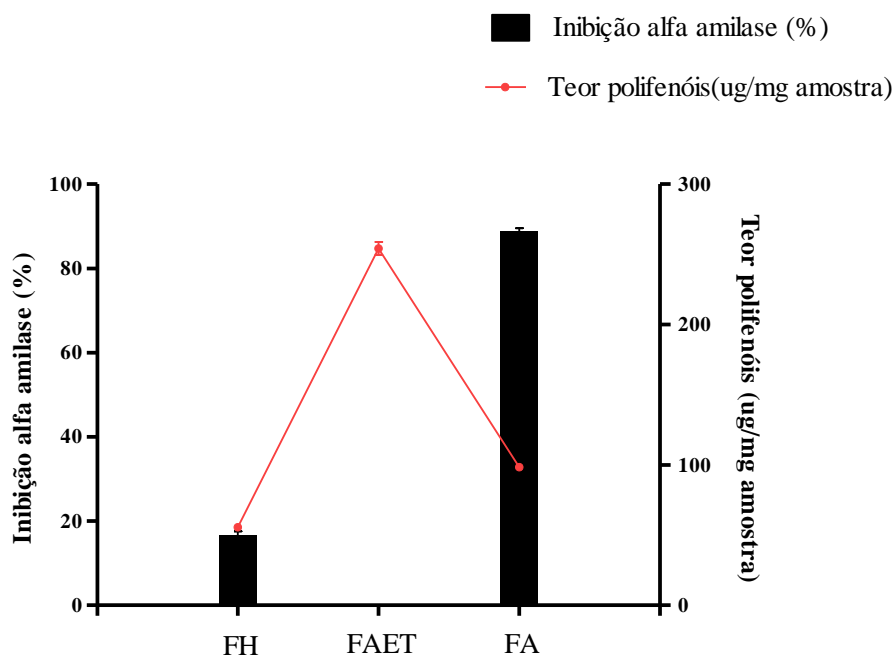
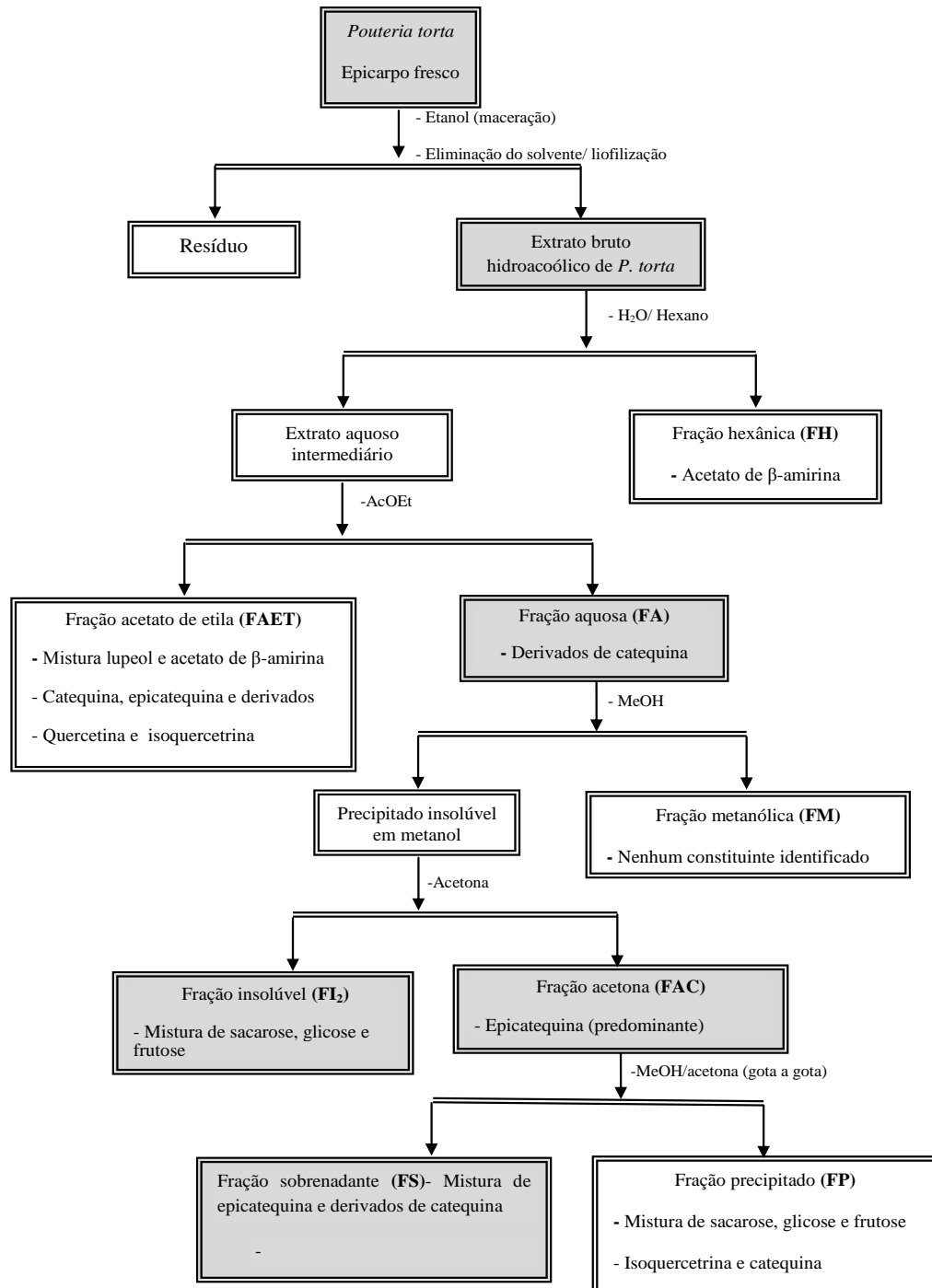


Figura 59: Comparação entre a capacidade inibitória de α -amilase (concentração da amostra 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e o teor de polifenóis ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de amostra) das frações FH, FAET e FA obtidas do extrato bruto do epicarpo do fruto de *P. torta*. Valores expressos como média de 3 experimentos, em triplicata \pm desvio padrão.

O Esquema 7 abaixo sumariza as etapas realizadas no estudo de biomonitoramento do epicarpo fresco do fruto de *P. torta*.



■ Atividade de inibição da α -amilase

Esquema 7: Fracionamento químico do extrato hidroalcoólico bruto do epicarpo do fruto de *Pouteria torta*.

7. CONCLUSÕES

A estratégia de biomonitoramento do extrato hidroalcoólico bruto do epicarpo do fruto de *P. torta*, descrita nesta tese, permitiu a obtenção e caracterização de duas frações com capacidade de inibição da enzima α -amilase de forma comparável ao dos controles utilizados, quais sejam, fração insolúvel (FI₂) e fração acetona (FAC).

A fração FI₂ apresentou alta capacidade de inibição da α -amilase, sendo identificada a presença de mistura composta por sacarose, frutose e glicose.

O monitoramento da atividade de inibição enzimática das subfrações, obtidas da fração FAC, permitiu observar que, nas condições experimentais, fração sobrenadante (FS) apresentou capacidade de inibição enzimática estatisticamente diferente aos controles utilizados (*Triticum aestivum* e acarbose), enquanto fração precipitado (FP) não apresentou tal atividade.

A avaliação do perfil de inibição enzimática da fração FAC e de sua subfração FS, por meio da obtenção do valor de IC₅₀, mostrou que a fração FAC possui potencial de inibição, aproximadamente, duas vezes maior que sua subfração FS, sugerindo que a atividade foi reduzida quando o material foi fracionado.

A análise química da FAC permitiu concluir que a fração é constituída por uma mistura de compostos, com predominância de epicatequina. A análise de suas subfrações mostrou que a fração FP é composta da mistura de catequina, isoquercetrina, sacarose, glicose e frutose e a fração FS é composta, dentre outros constituintes, pela mistura de epicatequina e derivados de catequina. Com isso, é provável que a mistura dos constituintes presentes na FAC sejam responsáveis pela atividade de inibição da enzima α -amilase apresentada por esta fração.

O extrato hidroalcoólico bruto e as frações hexânica, acetato de etila e aquosa não apresentaram atividade citotóxica quando avaliados em modelo de toxicidade às larvas de *Artemia salina*.

Quanto à atividade antioxidante, a redução do complexo de fosfomolibdênio, realizado de acordo com a modificação do método de Prieto (95), tanto o extrato bruto quanto as frações hexânica, acetato de etila e aquosa mostraram-se ativos em relação à quercetina, BHT e ácido ascórbico. Dentre eles, a fração FAET apresentou maior atividade antioxidante em comparação ao BHT, quercetina e ácido ascórbico.

A fração FAET apresentou os maiores teores de polifenóis e flavonoides, dentre as frações avaliadas, contudo não foi observada correlação entre teores de polifenóis e flavonoides e a capacidade de inibição da enzima α -amilase por esta fração.

Frutos de *P. torta* apresentam alto potencial econômico visto o grande rendimento de sua polpa (rendimento de aproximadamente 2%), podendo ser explorados comercialmente da mesma maneira que são os frutos de *P. caimito* (abiu). O epicarpo de frutos, por sua vez, usualmente é desprezado pela indústria alimentícia, sendo descartado em lixo comum ou enviado para compostagem. O conhecimento que o subproduto da industrialização desse fruto apresenta atividade biológica de interesse terapêutico constitui uma possibilidade real de agregação de valor a um material oriundo da biodiversidade brasileira.

Desta forma, o conjunto de informações referentes às potencialidades desta espécie pode ir, aos poucos, dando forma ao desenvolvimento de suplementos alimentares para controle glicêmico de pacientes diabéticos com baixa toxicidade. Contudo, para tal objetivo, faz-se necessário o emprego de outros modelos de atividade biológica visando assegurar a segurança e eficácia do produto.

Como perspectivas propõem-se a realização de ensaios, *in vivo*, visando estabelecer a eficácia e segurança do extrato bruto e da fração obtida e ainda a obtenção de fração padronizada objetivando o possível desenvolvimento de uma formulação fitoterápica.

8. REFERÊNCIAS

1. Pinto AC, Silva DHS, Bolzani VS, Lopes NP, Epifanio RA. Produtos naturais: Atualidades, desafios e perspectivas. *Química Nova*. 2002; 25(1):45-61.
2. Soares AC. Se bem não fizer, mal também não fará. *Revista eletrônica de Ciências*. 2002; 12.
3. Pinto AC, Silva DHS, Bolzani VS, Lopes NP, Epifania RA. Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. *Química nova*. 2002; 25(1):45-61.
4. Zangara A. The psychopharmacology of huperzine A: an alkaloid with cognitive enhancing and neuroprotective properties of interest in the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 2003; 75:675-86.
5. Chang HY, Kim TC, Jung M, Lim HY, Lee S, Kang S. Inhibition of Melanogenesis by Selina-4(14),7(11)-dien-8-one Isolated from *Atractylodis Rhizoma Alba*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2007; 30(4):719-23.
6. Arung ET, Shimizu K, Kondo R. Inhibitory effect of artocarpanone from *Artocarpus heterophyllus* on melanin biosynthesis. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2006; 29(9):1966-9.
7. Kotowaroo MI, Mahomoodall MF, Gurib-Fakim A, Subratty AH. Screening of traditional antidiabetic medicinal plants of Mauritius for possible alpha-amylase inhibitory effects in vitro. *Phytotherapy research*. 2006; 20(3):228-31.
8. Asano N. Glycosidase inhibitors: update and perspectives on practical use. *Glycobiology*. 2003; 13(10):93R-104R.
9. Melo EB, Carvalho I. α e β -glucosidases como alvos moleculares para desenvolvimento de fármacos. *Química Nova*. 2006; 29:840-3.
10. Watson AA, Fleet GW, Asano N, Molyneux RJ, Nash RJ. Polyhydroxylated alkaloids - natural occurrence and therapeutic applications. *Phytochemistry*. 2001; 56(3):265-95.
11. Laar FA, Lucassen PLBJ, Akkermans RP, Lisdonk EH, Rutten GEHM, Weel C. Alpha-glucosidase inhibitors for type 2 diabetes mellitus (Cochrane Review). *The Cochrane Library*. 2008; (4).
12. Yanovski SZ, Yanovski JA. Drug Therapy: Obesity. *New England Journal of Medicine*. 2002; 346(8):5991-602.
13. Touger-Decker R, Loveren CV. Sugars and dental caries. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2003; 78(suppl):88S-92S.
14. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004; 27(5):1047-53.
15. WHO. Diabetes Programme. 2012 [cited 2012 11 fev].
16. Aguiar LGK, Villela NR, Bouskela EA. Microcirculação no Diabetes: Implicações nas Complicações Crônicas e Tratamento da Doença. *Arquivos Brasileiro Endocrinologia e Metabologia*. 2007; 51(2):204-11.
17. Cheng AYY, Fantus IG. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes Mellitus. *Canadian Medical Association Journal*. 2005; 172(2):213-26.
18. Goke B, Herrmann-Rinke C. The evolving role of alpha-glucosidase inhibitors. *Diabetes and Metabolism Research*. 1998; 14(suppl 1):S31-S8.
19. Lebowitz HE. alpha-glucosidase inhibitors as agents in the treatment of diabetes *Diabetes Review*. 1998; 6(2):132-45.
20. Inzucchi SE. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes. *JAMA*. 2002; 287(3):360-72.

21. Chiasson JL, Josse RG, Gomis R, Hanefeld M, Karasik A, Laakso M. Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomized trial. *Lancet*. 2002; 359(9323):2072-7.
22. Ali H, Houghton PJ, Soumyanath A. [alpha]-Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2006; 107(3):449-55.
23. Brasil. Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Brasília-DF: Ministério da Saúde; 2006. p. 60.
24. Yunes RA, Calixto JB. Plantas medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna Santa Catarina: Editora Universitária: UNOSC/ Argos. 2001.
25. Barata LES. Fitomedicamentos no Brasil: realidade possível ou ficção? XX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, X International Congress of Ethnopharmacology. São Paulo. 2008.
26. Muralikrishna G, Nirmala M. Cereal α -amylases – an overview. *Carbohydrate Polymers*. 2005; 60(2):163-73.
27. Eren HA, Anis P, Davulcu A. Enzymatic One-bath Desizing - Bleaching - Dyeing Process for Cotton Fabrics. *Textile Research Journal*. 2009; 79(12):1091-8.
28. Van der Maarel MJEC, Van der Veen B, Uitdehaag JC, Leemhuis H, Dijkhuizen L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family *Journal of Biotechnology*. 2002; 94(2):137-55.
29. Kandra L. α -Amylases of medical and industrial importance. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*. 2003; 666-667:487-98.
30. Brayer GD, Luo Y, Withers SG. The structure of human pancreatic α -amylase at 1.8 Å resolution and comparisons with related enzymes. *Protein Science*. 1995; 4(9):1730-42.
31. Iulek J, Franco OL, Silva M, Slivinski CT, Bloch Jr C, Rigden DJ, et al. Purification, biochemical characterisation and partial primary structure of a new α -amylase inhibitor from *Secale cereale* (rye). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2000; 32:1195-204.
32. Tangphatsornruang S, Naconsie M, Thammarongtham C, Narangajavana J. Isolation and characterization of an α -amylase gene in cassava (*Manihot esculenta*). *Plant Physiology and Biochemistry*. 2005; 43:821-7.
33. Whitcomb DC, Lowe ME. Human Pancreatic Digestive Enzymes. *Digestive Diseases Sciences*. 2007; 52(1):1-17.
34. Payan F. Structural basis for the inhibition of mammalian and insect α -amylases by plant protein inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2004; 1696:171-80.
35. Janecek S, Svensson B, Henrissat B. Domain evolution in the α -amylase family. *Journal of Molecular Evolution*. 1997; 45(3):322-31.
36. Brayer GD, Sidhu G, Maurus R, Rydberg EH, Braun C, Wang Y, et al. Subsite mapping of the human pancreatic α -amylase active site through structural, kinetic and mutagenesis techniques. *Biochemistry*. 2000; 39:4778-91.
37. Groot PC, Bleeker MJ, Pronk JC, Arwert F, Mager WH, Planta RJ, et al. Human pancreatic amylase is encoded by two different genes. *Nucleic Acids Research*. 1988; 16:4724.
38. Gumucio DL, Wiebauer K, Caldwell RM, Samuelson LC, Meisler MH. Concerted evolution of human amylase genes. *molecular Cell Biology*. 1988; 8:1197-205.
39. Ramasubbu N, Paloth V, Luo Y, Brayer GD, Levine MJ. Structure of human salivary α -amylase at 1.6 Å resolution. *Acta Crystallography*. 1996; D 52:435-46.

40. Schmidt DD, Frommer W, Junge B, Müller L, Wingender W, Truscheit E, et al. α -Glucosidase inhibitors *Naturwissenschaften*. 1977; 64(10):535-6.
41. Geng P, Baia G. Two novel amino oligosaccharides isolated from the culture of *Streptomyces coelicoflavus* ZG0656 as potent inhibitors of α -amylase. *Carbohydrate Research*. 2008; 343:470-6.
42. Arai M, Sumida M, Fukuhara K, Kainosho M. Isolation and characterization of amylase inhibitors, (Glucose)_n - Deoxynojirimycin *Agricultural and Biological Chemistry*. 1986; 50(3):639-44.
43. Yokose K, Ogawa M, Ogawa K. New α -amylase inhibitor, trestatins. III. Structure determination of new trestatin components Ro 09-0766, Ro 09-0767 and Ro 09-0768. *Journal of Antibiotics*. 1984; 37(2):182-6.
44. Laar FA, Lucassen PLBJ, Akkermans RP, Lisdonk EH, Rutten GEHM, Weel C. α -glucosidase inhibitors for type 2 diabetes mellitus (Cochrane Review). In: *The Cochrane Library*. 2008; (4).
45. Yanovski SZ, Yanovski JA. Drug Therapy: Obesity. *The New England Journal of Medicine*. 2002; 346(8):5991-602.
46. Touger-Decker R, Loveren CV. Sugars and dental caries. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2003; 78(suppl):88S-92S.
47. Wong JMW, Jenkins DJA. Carbohydrate digestibility and metabolic effects. *The Journal of Nutrition*. 2007; 137:2539S-46S.
48. Yoon SH, Robyt JF. Study of the inhibition of four α amylases by acarbose and its 4IV- α -maltohexaosyl and 4IV- α -maltododecaosyl analogues. *Carbohydrate Research*. 2003; 338:1969-80.
49. Gyémánt G, Kandra L, Nagy V, Somsák L. Inhibition of human salivary α -amylase by glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003; 312:334-9.
50. Chakrabarti R, Rajagopalan R. Diabetes and insulin resistance associated disorders: Disease and the therapy. *Current Science*. 2002; 83:1533-8.
51. Kwon YI, Apostolidis E, Shetty K. *In vitro* studies of eggplant (*Solanum melongena*) phenolics as inhibitors of key enzymes relevant for type 2 diabetes and hypertension. *Bioresource Technology*. 2008; 99:2981-8.
52. Lo Piparo E, Scheib H, Frei N, Williamson G, Grigorov M, Chou CJ. Flavonoids for Controlling Starch Digestion: Structural Requirements for Inhibiting Human α -Amylase. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2008; 51(12):3555-61.
53. Li C, Begum A, Numao S, Park KH, Withers SG, Brayer GD. Acarbose rearrangement mechanism implied by the kinetic and structural analysis of human pancreatic α -amylase in complex with analogues and their elongated counterparts. *Biochemistry*. 2005; 44(9):3347-57.
54. Kandra L, Gyémánt G, Zajác A, Battab G. Inhibitory effects of tannin on human salivary α -amylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004; 319:1265-71.
55. Quideau S, Jourdes M, Saucier C, Glories Y, Pardon P, Baudry C. DNA topoisomerase inhibitor acutissimin A and other flavano-ellagitannins in red wine. *Angew Chemistry*. 2003; 42:6012-4.
56. Gin H, Rigalleau V, Caubet O, Aubertin J. Effects of red wine, tannic acid, or ethanol on glucose tolerance in non-insulin dependent diabetic patients and on starch digestibility *in vitro*. *Metabolism*. 1999; 48:1179-83.
57. Zajác A, Gyémánt G, Vittorib N, Kandra L. Aleppo tannin: structural analysis and salivary amylase inhibition. *Carbohydrate Research*. 2007; 342:717-23.

58. McGarvey DJ, Croteau R. Terpenoid metabolism. *The Plant Cell*. 1995; 7:1015-26.
59. Xu R, Fazio GC. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry*. 2004; 65:261-91.
60. Dzubak P, Hajduch M. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Natural Product Reports*. 2006; 23:394-411.
61. Melo CL, Queiroz MG. Betulinic acid, a natural pentacyclic triterpenoid, prevents abdominal fat accumulation in mice fed a high-fat diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009; 57(19):8776-81.
62. Al-Dabbas MM, Kitahara K, Suganuma T, Hashimoto F, Tadera K. Antioxidant and α -Amylase Inhibitory Compounds from Aerial Parts of *Varthemia iphionoides* Boiss. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2006; 70(9):2178-84.
63. Kim JS, Kwon CS, Son KH. Inhibition of α -glucosidase and amylase by luteolin, a flavonoid *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2000; 64(11):2458-61.
64. Funke I, Melzing MF. Traditionally used plants in diabetes therapy - phytotherapeutics as inhibitors of α -amylase activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2006; 16(1):1-5.
65. Mohamed GA. Alliucocide G, a new flavonoid with potent α -amylase inhibitory activity from *Allium cepa* L. *Arkivoc*. 2008:202-9.
66. Koh LW, Wong LL, Loo YY, Kasapis S, Huang D. Evaluation of Different Teas against Starch Digestibility by Mammalian Glycosidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010; 58(1):148-54.
67. Bhandari MR, Jong-Anurakkun N, Gao Hong JK. α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activities of Nepalese medicinal herb Pakhanbhed (*Bergenia ciliata*, Haw.). *Food Chemistry* 2008; 106:247-52.
68. Kawaguchi M, Tanabe H, Nagamine K. Isolation and characterization of a novel flavonoid possessing a 4,2"-glycosidic linkage from green mature acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2007; 71(5):1130-5.
69. Li H, Tanaka T, Zhang Y-J, Yang C-R, Kouno I. Rubusuaviins A-F, monomeric and oligomeric ellagitannins from chinese sweet tea and their α -amylase inhibitory activity. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 2007; 55(9):1325-31.
70. McCue PP, Shetty K. Inhibitory effects of rosmarinic acid extracts on porcine pancreatic amylase *in vitro*. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 2004; 13(1):101-6.
71. Ani V, Akhilender Naidu K. Antihyperglycemic activity of polyphenolic components of black/bitter cumin *Centratherum anthelminticum* (L.) Kuntze seeds. *European Food Research and Technology*. 2008; 226:897-903.
72. Conforti F, Statti G, Loizzo MR, Sacchetti G, Poli F, Menichini F. *In Vitro* Antioxidant Effect and Inhibition of α -Amylase of Two Varieties of *Amaranthus caudatus* Seeds. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2005; 28(6):1098-102.
73. Ali H, Houghton PJ, Soumyanath A. α amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2006; 107:449-55.
74. Fred-Jaiyesimi A, Kio A, Richard W. α -Amylase inhibitory effect of 3 β -olean-12-en-3-yl (9Z)-hexadec-9-enoate isolated from *Spondias mombin* leaf *Food Chemistry*. 2009; 116(1):285-8.

75. McDougall GJ, Shpiro F, Dobson P, Smth P, Blake A, Stewart D. Different Polyphenolic Components of Soft Fruits Inhibit α -Amylase and α -Glucosidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005; 53(7):2760-6.
76. Karthic K, Kirthiram KS, Sadasivam S, Thayumanavan B. Identification of α -amylase inhibitors from *Syzygium cumini* Linn seeds. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2008; 46:677-80.
77. Barroso G. *Sistemática de Angiospermas do Brasil*. Rio de Janeiro LTC/EDUSP; 1978.
78. Joly A. *Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal*. São Paulo: Companhia Editora Nacional; 1998.
79. Harhar H, Gharby S, Ghanmi M, El Monfalouti H, Guillaume D, Charrouf Z. Composition of the essential oil of *Argania spinosa* (Sapotaceae) fruit pulp. *Natural Products Communitions*. 2010; 5(6):935-6.
80. Charrouf Z, Hilali M, Jauregui O, Soufiaoui M, Guillaume D. Separation and characterization of phenolic compounds in argan fruit pulp using liquid chromatography–negative electrospray ionization tandem mass spectroscopy. *Food Chemistry*. 2007; 100:1398-401.
81. Guillaume D, Charrouf Z. Argan oil and other argan products: Use in dermocosmetology. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2011; 113(4):403-8.
82. Xiao Dong L, Basile MJ, Kennelly EJ. Polyphenolic Antioxidants from the Fruits of *Chrysophyllum cainito* L. (Star Apple). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002; 50(6):1379-82.
83. Boonyuen C, Wangkarn S, Suntornwat O, Chaisuksant R. Antioxidant capacity and phenolic content of *Mimusops elengi* fruit extract. *Kasetsart Journal Natural Science*. 2009; 43(1):21-7.
84. Torres-Rodríguez A, Salinas-Moreno Y, Valle-Guadarrama S, Alia-Tejacal I. Soluble phenols and antioxidant activity in mamey sapote (*Pouteria sapota*) fruits in postharvest. *Food Research International*. 2011; 44:1956-61.
85. Yahia EM, Gutiérrez-Orozco F, Arvizu-de-Leon C. Phytochemical and antioxidant characterization of mamey (*Pouteria sapota* Jacq. H.E. Moore & Stearn) fruit. *Food Research International*. 2011; 44:2175-81.
86. Costa TSA, Wondracek DC, Lopes RM, Vieira RF, Ferreira FR. Composição de carotenoides em canistel (*Pouteria campechiana* (Kunth) Baehni). *Revista Brasileira de Fruticultura*. 2010; 32(3):903-6.
87. Ma J, Yang H, Basile MJ, Kennelly EJ. Analysis of polyphenolic antioxidants from the fruits of three *Pouteria* species by selected ion monitoring liquid chromatography-mass spectrometry *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004; 52(19):5873-8.
88. Dini I. Flavonoid glycosides from *Pouteria obovata* (R. Br.) fruit flour. *Food Chemistry*. 2010; 124:884-8.
89. Ma J, Luo XD, Protiva P, Yang H, Ma C, Basile MJ, et al. Bioactive novel polyphenols from the fruit of *Manilkara zapota* (Sapodilla). *Journal of Natural Products*. 2003; 66(7).
90. Silva Pinto MD, Ranilla LG, Apostolidis E, Lajolo FM, Genovese MI, Shetty K. Evaluation of antihyperglycemia and antihypertension potential of native peruvian fruits using in vitro models. *Journal of Medicinal Food*. 2009; 12(2):278-91.
91. Ramadan MF, Sharanabasappa G, Parmjyothi S, Seshagiri M, Moersel JT. Profile and levels of fatty acids and bioactive constituents in mahua butter from fruit-

- seeds of buttercup tree [*Madhuca longifolia* (Koenig)]. European Food Research and Technology. 2006; 222:710-8.
92. Matos FJA. Introdução à fitoquímica experimental. Fortaleza: EUFC. 1988. 126p.
93. Wagner H, Bladt S, Zgainski EM. Plant Drug Analysis. Berlin: Springer Verlag. 1984.
94. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, Mc Laughlin JL. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *planta medica*. 1982; 45:31-4.
95. Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. *Analytical Biochemistry*. 1999; 269:337-41.
96. Bernfeld P. α and β - Amylases. *Methods in enzymology*. 1955; 1:149-58.
97. Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*. 2004; 84(3):329-.
98. Woisky RG, Salatino A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control *Journal of apicultural research*. 1998; 37(2):99-105.
99. Buriol L, Finger D, Schmidt EM, Santos JMT, Rosa MR, Quináia SP, et al. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. *Química nova*. 2009; 32(2):296-302.
100. Silva Júnior MC. 100 árvores do Cerrado: um guia de campo. Brasília: Rede de sementes do cerrado, 2005. .
101. Lorenzi HEM, Matos FJ. Plantas medicinais do Brasil / Nativas e exóticas Nova Odessa. 2002. 512p.
102. Souza PM. Atividade de inibição enzimática por espécies vegetais do bioma Cerrado. Brasília: Universidade de Brasília; 2011.
103. Parra AL, Yhebra IGS, Buela LI. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*. 2001; 8(5):395-400.
104. De Rosa S, De Giulio A, Iodice C. Biological effects of prenylated hydroquinones: structure-activity relationship studies in antimicrobial, brine shrimp and fish lethality *journal of Natural Products*. 1994; 57(12):1711-6.
105. Määttä-Riihinen KR, Kamal-Eldin A, Riitta Törrönen A. Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* species (Family Rosaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004; 52(20):6178-87.
106. Stratila P, Klejdusa B, Kubán V. Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. *Talanta*. 2007; 71:1741-51.
107. Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005; 53(6):1841-56.
108. Oliveira AC, Valentim IB, Goulart MOF, Silva CA, Bechara EJH, Trevisan MTS. Fontes Vegetais Naturais de Antioxidantes. *Química Nova*. 2009; 32(3):689-702.
109. Deng H, Van Berkel GJ. Electrospray mass spectrometry and UV/Visible spectrophotometry studies of aluminum(III)-flavonoid complexes. *Journal of mass spectrometry*. 1998; 33:1080-7.
110. Cornard JP, Merlin JC. Complexes of aluminium(III) with isoquercitrin: spectroscopic characterization and quantum chemical calculations. *Polyhedron*. 2002; 21:2801-10.

111. Chaughule RS, Mali PC, Patil RS, Joshi GD, Lo YM. Magnetic resonance spectroscopy study of sapota fruits at various growth stages. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2002; 3:185-202.
112. Nishida T, Ensell CR, Morris CA. Concerted use homo- and hetero- nuclear 2D NMR: ¹³C and ¹H assignment of sucrose octaacetate. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 1986; 24:179-82.
113. Agrawal PK. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry*. 1992; 31(10):3307-30.
114. Maoela MS, Arotiba OA, Baker PGL, Mabusela WT, Jahed N, Songa EA, et al. Electroanalytical determination of catechin flavonoid in ethyl acetate extracts of medicinal plants. *International Journal of Electrochemical Science*. 2009; 4:1497-510.
115. Mitsunaga T, Doi T, Kondo Y, Abe I. Color development of proanthocyanidins in vanillin-hydrochloric acid reaction. *Journal of Wood Science*. 1998; 44(2):125-30.
116. Lôbo LT, Castro KCF, Arruda MSP, Silva MN, Arruda AC, Müller AH, et al. Potencial alelopático de catequinas de *Tachigali myrmecophyla* (LEGUMINOSAE). *Química Nova*. 2008; 31(3):493-7.
117. Ayres MCC, Chaves MH. Constituintes químicos e atividade antioxidante de extratos das folhas de *Terminalia fagifolia* Mart. et Zucc. *Química Nova*. 2009; 32(6):1509-12.
118. Jullian C, Miranda S, Zapata-Torres G, Mendizábal F, Olea-Azarb C. Studies of inclusion complexes of natural and modified cyclodextrin with (+)catechin by NMR and molecular modeling. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2007; 15:3217-24.
119. Abreu AS, S. BP, Müller AH, Guilhon GMSP. Constituintes químicos do caule e das cascas do caules de *Croton pullei* Var. Glabrior (Euphorbiaceae). *Revista Virtual de Iniciação Acadêmica da UFPA*. 2001 1(2):1-9.
120. Pérez JCB, Best CR, Llanes F. Triterpenos pentacíclicos en propóleo. *Revista de la Sociedad Química del Perú*. 2009; 75(4):439-52.
121. Sholichin M, Yamasaki K, Kasai R, Tanaka O. ¹³C Nuclear magnetic resonance of lupane-type triterpenes, lupeol, betulinic acid. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 1980; 28(3):1006-8.
122. Mahato SB, Kundu AP. ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids - A compilation and some salient features. *Phytochemistry*. 1994; 37(6):1517-75.
123. Bandeira PN, Lemos TLG, Costa SMO, Santos HS. Obtenção de derivados da mistura triterpenoídica em β- e α-amirina. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2007; 17(2):204-8.
124. Subramanian R, Asmawi MZ, Sadikun A. In vitro α-glucosidase and α-amylase enzyme inhibitory effects of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide. *Acta Biochimica Polonica*. 2008; 55(2):391-8.
125. Kuppusamy A, Muthusamy U, Thirumalaisamy SA, Varadharajan S, Ramasamy K, Ramanathan S. In vitro (α-glucosidase and α-amylase inhibition) and in vivo antidiabetic property of phytic acid (IP6) in streptozotocin-nicotinamide-induced type 2 diabetes mellitus (NIDDM) in rats. *Journal of Complementary and Integrative Medicine: An international forum for evidence-based practices*. 2011; 8(1):9-15.
126. Patil A, Nirmal S, Pattan S, Tambe V, Tare M. Antidiabetic effect of polyherbal combinations in STZ induced diabetes involve inhibition of α-amylase and α-glucosidase with amelioration of lipid profile. *Phytopharmacology* 2012; 2(1):46-57.
127. Neiva TJC, Machado MJ, Hoehn M, Hermes EM, Vituri CL, Ferreira JS, et al. Efeito das catequinas (catequina e epicatequina) na agregação plaquetária. *Revista Brasileira de Hematologia e Hematoterapia*. 2003; 25(4):207-12.

128. Wagner H. New targets in the Phytopharmacology of Plants. In: Herbal medicine, a concise overview for healthcare professionals. Butterworth-Heinemann. 1999:34-42.
129. Smith PF, MacLennan K, Darlington CL. The neuroprotective properties of the Ginkgo biloba leaf: a review of the possible relationship to platelet-activating factor (PAF). *Journal of Ethnopharmacology*. 1996; 50:131-9.
130. Braquet P, Touqui L, Shen TY, Vargaftig BB. Perspectives in platelet-activating factor research. *Pharmacological Reviews*. 1987; 39:97-145.
131. MacLennan KM, Darlington CL, Smith PF. The CNS effects of Ginkgo biloba extracts and ginkgolide B. *Progress in Neurobiology*. 2002; 67:235-57.
132. Williamson EM. Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine*. 2001; 8(5):401-9.
133. Soa FV, Guthrie N, Chambers AF, Moussad M, Carrolle KK. Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices. *Nutrition and Cancer*. 1996; 26(2):167-81.
134. Ma J, Luo XD, Protiva P, Yang H, Ma C, Basile MJ, et al. Bioactive novel polyphenols from the fruit of *Manilkara zapota* (Sapodilla). *Journal of Natural Products*. 2003; 66(7):983-6.
135. Silva VC, Lopes MN, Bolzani VS. Chemical study of leaves of *Chrysophyllum marginatum* (HOOK. & ARN.) RADLK (Sapotaceae). *Quimica Nova*. 2006; 29(3):493-5.
136. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*. 2000; 404:787-90.
137. Brownlee M. The Pathobiology of Diabetic Complications: A Unifying Mechanism. *Diabetes*. 2005; 54:1615-25.
138. Yoshida K, Hirokawa J, Tagami S, Kawakami Y, Urata Y, Kondo T. Weakened cellular scavenging activity against oxidative stress in diabetes mellitus: regulation of glutathione synthesis and efflux. *Diabetologia*. 1995; 38:201-10.
139. Dominguez C, Ruiz E, Gussinye M, Carrascosa A. Oxidative stress at onset and in early stages of type 1 diabetes in children and adolescents. *Diabetes Care*. 1998; 21:1736-42.
140. Salonen JT, Nyssonen K, Tuomainen TP, Maenpaa PH, Korpela H, Kaplan GA, et al. Increased risk of non-insulin dependent diabetes mellitus at low plasma vitamin E concentrations: a four year follow up study in men. *British Medical Journal*. 1995; 311:1124-7.
141. Knekt P, Reunanen A, Marniemi J, Leino A, Aromaa A. Low vitamin E status is a potential risk factor for insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of Internal Medicine*. 1999; 245(1):99-102.
142. Chen MS, Hutchinson ML, Pecoraro RE, Lee WY, Labbe RF. Hyperglycemia-induced intracellular depletion of ascorbic acid in human mononuclear leukocytes. *Diabetes*. 1983; 32:1078-81.
143. Yue DK, McLennon S, Fisher E, Heffernan S, Capogreco C, Ross GR, et al. Ascorbic acid status and polyol pathway in diabetes. *Diabetes*. 1989; 38:257-61.
144. McDougall GJ, Shpiro F, Dobson P, Smith P, Blake A, Stewart D. Different polyphenolic components of soft fruits inhibit α -amylase and α -glucosidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005; 53(7):2760-6.
145. De Souza Schmidt Gonçalves AE, Lajolo FM, Genovese MI. Chemical Composition and Antioxidant/Antidiabetic Potential of Brazilian Native Fruits and

Commercial Frozen Pulps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010; 58(8):4666-74.

APÊNDICE

α -Amylase Inhibitors: A Review of Raw Material and Isolated Compounds from Plant Source

Paloma Michelle de Sales, Paula Monteiro de Souza, Luiz Alberto Simeoni, Pérola de Oliveira Magalhães, Dâmaris Silveira

Department of Pharmaceutical Sciences, School of Health Sciences, Campus Darcy Ribeiro, University of Brasília, Brasília, Brazil.

Received, October 25, 2011; Revised, January 8, 2012; Accepted, January 23, 2012; Published, January 25, 2012.

ABSTRACT - Inhibition of α -amylase, enzyme that plays a role in digestion of starch and glycogen, is considered a strategy for the treatment of disorders in carbohydrate uptake, such as diabetes and obesity, as well as, dental caries and periodontal diseases. Plants are an important source of chemical constituents with potential for inhibition of α -amylase and can be used as therapeutic or functional food sources. A review about crude extracts and isolated compounds from plant source that have been tested for α -amylase inhibitory activity has been done. The analysis of the results shows a variety of crude extracts that present α -amylase inhibitory activity and some of them had relevant activity when compared with controls used in the studies. Amongst the phyto-constituents that have been investigated, flavonoids are one of them that demonstrated the highest inhibitory activities with the potential of inhibition related to number of hydroxyl groups in the molecule of the compound. Several phyto-constituents and plant species as α -amylase inhibitors are being reported in this article. Majority of studies have focused on the anti-amylase phenolic compounds.

This article is open to **POST-PUBLICATION REVIEW**. Registered readers (see "For Readers") may **comment** by clicking on ABSTRACT on the issue's contents page.

INTRODUCTION

Disorders of carbohydrate uptake may cause severe health problems such as diabetes (1), obesity (2), and oral diseases (3), all of which threaten an increasing worldwide population. Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disorder resulting from deficiency in insulin secretion, insulin action, or both, promoting disturbance of carbohydrate, fat and protein metabolism. Long-term complications of diabetes mellitus include retinopathy, nephropathy, neuropathy, micro-angiopathy and increased risk of cardiovascular disease (1, 4, 5).

The therapeutic strategies for the treatment of type 2 diabetes include the reduction of the demand for insulin, stimulation of endogenous insulin secretion, enhancement of the action of insulin at the target tissues and the inhibition of degradation of oligo and disaccharides (6). The drugs commonly used in clinic to handle or control diabetes are insulin, sulfonyleureas, biguanide, glucosidase inhibitors, aldose reductase inhibitor, thiazolidinediones, carbamoylmethyl benzoic acid, insulin-like growth factor. The effect of these drugs is aimed to lower the level of blood glucose (4, 7, 8). One

therapeutic approach for treating type 2 diabetes mellitus is to decrease the post-prandial glucose levels. This could be done by retarding the absorption of glucose through the inhibition of the carbohydrates-hydrolysing enzymes, α -glucosidase and α -amylase, present in the small intestinal brush border that are responsible for the breakdown of oligosaccharides and disaccharides into monosaccharides suitable for absorption (1, 7, 9, 10). Inhibitors of these enzymes, like acarbose, delay carbohydrate digestion and prolong overall carbohydrate digestion time, causing a reduction in the rate of glucose absorption and consequently blunting the post-prandial plasma glucose rise (1, 4).

Dental caries and periodontal diseases are the most prevalent oral infectious diseases that cause significantly impact a person's overall health, having considerable economic impact, if not adequate treated (3, 11).

Corresponding Author: Pérola de Oliveira Magalhães, Universidade de Brasília/UnB Faculdade de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte CEP 70900-910, Brasília, Distrito Federal, Brasil. E-mail: perolamagalhaes@unb.br

Inhibitory Activity of α -Amylase and α -Glucosidase by Plant Extracts from the Brazilian Cerrado

Authors

Paula Monteiro de Souza¹, Paloma Michelle de Sales¹, Luiz Alberto Simeoni¹, Elton Clementino Silva², Dâmaris Silveira^{1,2}, Pérola de Oliveira Magalhães¹

Affiliations

¹ Department of Pharmaceutical Sciences, School of Health Sciences, Campus Darcy Ribeiro, University of Brasília, Brasília, Brazil

² Department of Pharmacy, Campus Cellândia, University of Brasília, Brasília, Brazil

Key words

- enzyme inhibition
- α -amylase
- α -glucosidase
- cerrado
- Brazilian savannah
- diabetes

Abstract

Diabetes mellitus is the most common disease in the world. One therapeutic approach for treating diabetes is inhibition of α -amylase and α -glucosidase activities to reduce postprandial blood glucose levels. *In vitro* tests showed that several plant extracts from Brazilian cerrado species can inhibit the activity of α -amylase and α -glucosidase. The extracts of *Eugenia dysenterica*, *Stryphnodendron adstringens*, *Pouteria caimito*, *Pouteria ramiflora*, and *Pouteria torta* showed strong α -amylase and α -glucosidase inhibitory activity. *Eugenia dysen-*

terica, *P. caimito*, *P. ramiflora*, and *P. torta* aqueous extracts exerted the highest activity against α -amylase (IC₅₀ values of 14.93, 13.6, 7.08, and 5.67 μ g/mL, respectively) and α -glucosidase (IC₅₀ values of 0.46, 2.58, 0.35, and 0.22 μ g/mL, respectively). *Stryphnodendron adstringens* ethanol extract also exhibited inhibitory activity against both enzymes (IC₅₀ 1.86 μ g/mL against α -amylase and 0.61 μ g/mL against α -glucosidase). The results suggest that the activity of these cerrado plants on α -amylase and α -glucosidase represents a potential tool for development of new strategies for treatment of diabetes.

Introduction

Diabetes mellitus is the most common disease in the world. About 171 million people were affected in 2000, and this is likely to increase to at least 366 million by 2030 [1]. Diabetes is a metabolic disorder of multiple etiology characterized by chronic hyperglycemia with disturbance of carbohydrate, fat, and protein metabolism [2], caused by inherited or acquired deficiency in insulin secretion, resulting in an increased blood glucose level [3]. One therapeutic approach for treating diabetes is to decrease the postprandial glycemia by the inhibition of enzymes that hydrolyze carbohydrates, such as α -amylase and α -glucosidase present in the digestive tract [2,4–7]. α -Amylase (EC 3.2.1.1) is responsible for cleaving large malto-oligosaccharides to maltose, which is converted to glucose by intestinal α -glucosidase (EC 3.2.1.20) [8,9]. Inhibitors of these enzymes delay the digestion of carbohydrates, producing a reduction in the rate of glucose absorption and consequently a reduction of the postprandial plasma glucose. α -Amylase and α -glucosidase inhibitors play a major role in managing postprandial hyperglycemia in diabetic patients; they inhibit the action of amylase and glucosidase en-

zymes leading to a reduction in starch hydrolysis which shows beneficial effects on glycemic index control in diabetic patients [10]. Examples of inhibitors used in therapy are acarbose, voglibose, and miglitol [6,11,12]. The main adverse effects of these inhibitors are gastrointestinal, including abdominal discomfort, flatulence, and diarrhea [12]. Thus, to look for more efficacious agents presenting lesser side effects is necessary in order to expand the therapeutical options to control diabetes. The search for safer and more hypoglycemic pharmaceuticals remains an important area of research [13]. Natural inhibitors from plants have shown an inhibitory effect against α -amylase and α -glucosidase activity and therefore can be potentially used as an effective therapy for postprandial hyperglycemia with minimal side effects [3,8,14].

The cerrado is the second biggest Brazilian biome and supports a wide variety of species. Plants from cerrado are known as a source of compounds of high biotechnological interest, which have applications on medical and food industries [15]. Plants of families found in the cerrado, as Apocynaceae, Sapotaceae, Fabaceae, among others, have interesting biological activities, such as antimicrobial, anti-inflammatory, and antifun-

received June 7, 2011
revised Nov. 8, 2011
accepted Nov. 10, 2011

Bibliography

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0031-1280404>
Planta Med 2011; 77: 1–7
© Georg Thieme Verlag KG
Stuttgart · New York ·
ISSN 0032-0943

Correspondence

Paula Monteiro de Souza
Departamento de Farmácia
Faculdade de Ciências da Saúde
Universidade de Brasília
Campus Universitário Darcy
Ribeiro
70919-970, Brasília, Distrito
Federal
Brasil
Phone: +55 61 92 36 40 20
paulasouza22@yahoo.com.br