

Everton Macêdo Silva

**Ação inibitória de extratos de plantas do Cerrado
sobre α -amilases com ênfase em
*Kielmeyera coriacea***

Brasília, DF

2008



**Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde**

Everton Macêdo Silva

**Ação inibitória de extratos de plantas do Cerrado
sobre α -amilases com ênfase em
*Kielmeyera coriacea***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof. Dra. Laila Salmen Espindola

Brasília, DF

2008

À minha mãe e ao meu pai, que são o alicerce da minha vida.

Agradecimentos

A Deus, que permite a realização de tudo que sou e tudo que faço. Por todas as bênçãos e inspirações.

À Laila, pelos ensinamentos de vida nesses anos de aprendizado, pela orientação desse trabalho, por compartilhar dos momentos mais difíceis até agora e pela forma como encara sua vocação de professora e pesquisadora.

Aos meus pais, Fernando e Consolação, pela luta sem fim para preparar meu caminho até aqui, pelo apoio financeiro e afetivo. Agradeço por ver nos seus olhos que apostam tudo no futuro de seus filhos. Ao Elber, meu irmão querido, pela cumplicidade do olhar nos momentos de ajuda.

Ao meu amor, Keylinha, que me deu inspiração nos momentos de cansaço, com toda a paciência do mundo, e agradeço por tornar todos os momentos mais coloridos para mim.

A toda minha família, tanta gente que durante esse período mostrou compreensão nas minhas ausências.

A todos do Laboratório de Farmacognosia, especialmente Ellen, Renata, Aline, Nashira, Mariana, Thiago, Arthur, Daniella, Jair, Lorena, Fernanda, Clarice e Karla, que sempre foram companheiros no trabalho.

Ao Prof. Dr. José Elias de Paula, pelo conhecimento, atenção e generosidade dedicados à nossa pesquisa.

Ao Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira, pelo aprendizado precioso durante minha curta passagem na Universidade Federal do Ceará e pela oportunidade de aproveitar a estrutura do Centro Nordestino de Aplicação e Uso de Ressonância Magnética Nuclear

– CENAUREMN. À Renata Mendonça, gente finíssima que esteve sempre ao meu lado no laboratório no Ceará, pela gentileza, hospitalidade e amizade.

À Prof^ª. Dr^ª. Fátima Grossi de Sá, por abrir as portas do Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga (LIMPP) do Cenargen/Embrapa, parte essencial ao desenvolvimento do estudo e também por aceitar compor a banca examinadora. Ao Prof. Dr. Thales Rocha Lima, pela disponibilidade integral para ajudar em qualquer situação e por aceitar compor a banca examinadora.

Ao Arnúbio e ao Jorge, pelo apoio técnico e por serem tão prestativos. À gentileza da Lecir, à sua competência e presteza. A todos os colegas do LIMPP, que me auxiliaram em cada necessidade.

Ao Alain Fournet, pela colaboração científica com nossos trabalhos e por aceitar compor a banca examinadora.

À Capes, pela bolsa concedida.

Aos que me ajudaram a chegar até aqui, lembro-me de todos.

Muito obrigado.

Sumário

Dedicatória.....	II
Agradecimentos.....	III
Lista de abreviaturas.....	VIII
Lista de Figuras.....	X
Lista de Tabelas.....	XI
Resumo.....	XII
Abstract.....	XIII
1. Introdução.....	1
1.1 As α -amilases.....	1
1.2 Inibidores de α -amilases.....	5
1.2.1 Classificação.....	5
1.2.2 Aplicação da inibição de α -amilase para controle de insetos-praga.....	6
1.2.3 Aplicação da inibição de α -amilase para saúde.....	11
1.3 Diabetes mellitus.....	12
1.3.1 Classificação do Diabetes.....	14
1.3.2 Intervenções para Diabetes.....	15
1.3.2.1 Tratamento do Diabetes Tipo I: Insulina e seus análogos.....	16
1.3.2.2 Tratamento Farmacológico do Diabetes tipo II.....	19
1.4 <i>Kielmeyera coriacea</i> Mart. & Zucc.	27

1.5	Cerrado.....	34
2.	Objetivos.....	39
2.1	Objetivo geral.....	39
2.2	Objetivos específicos.....	39
3.	Materiais e Métodos.....	40
3.1	Materiais.....	40
3.1.1	Enzimas.....	40
3.1.2	Soluções e tampões.....	40
3.1.3	Material cromatográfico.....	42
3.2	Métodos.....	42
3.2.1	Obtenção dos extratos brutos.....	42
3.2.2	Fracionamento químico.....	43
3.2.2.1	Partição líquido-líquido.....	43
3.2.2.2	Coluna cromatográfica.....	45
3.2.2.3	Isolamento de substâncias.....	46
3.2.3	Identificação e elucidação estrutural.....	46
3.2.4	Determinação de compostos fenólicos.....	47
3.2.5	Obtenção dos insetos.....	47
3.2.6	Extração da α -amilase dos insetos.....	48
3.2.7	Preparação da α -amilase salivar humana.....	48
3.2.8	Determinação de condições ótimas de pH.....	48

3.2.9	Ensaio de inibição enzimática.....	49
3.2.10	Ensaio de inativação térmica.....	51
3.2.11	Determinação do perfil inibitório dos extratos ativos.....	51
3.2.12	Análise estatística.....	51
4.	Resultados e Discussão.....	52
5.	Conclusões.....	74
6.	Perspectivas.....	76
7.	Referências bibliográficas.....	77
Anexos	89

Lista de abreviaturas

- α -AI-1 – inibidor de α -amilase 1 (*α -amylase inhibitor 1*)
 α -AI-2 – inibidor de α -amilase 2 (*α -amylase inhibitor 2*)
 α -AI – inibidor de α -amilase (*α -amylase inhibitor*)
 μ g – micrograma
 μ g.mL⁻¹ – micrograma por mililitro
AcOEt – acetato de etila
AOA – α -amilase de *Acanthoscelides obtectus*
APP – α -amilase pancreática porcina
APH – α -amilase pancreática humana
ASH – α -amilase salivar humana
C – caule (madeira + cascas)
CC – casca do caule
CCD – cromatografia em camada delgada
CIM – concentração inibitória mínima
COSY – espectroscopia de correlação (*correlated spectroscopy*)
CR – casca da raiz
DL₅₀ – Dose letal para 50% da população
DMSO – dimetilsulfóxido
DNA – ácido desoxirribonucléico (*desoxiribonucleic acid*)
d - diclorometano
e – etanol
ECA – enzima conversora de angiotensina
F – folha
Fr – fruto
FS – fruto com semente
FT-IR espectroscopia de infravermelho (*fourier transform infrared spectroscopy*)
g – grama
g.kg⁻¹ – grama por quilograma
h – hexano
h – hora
HMBC – *heteronuclear multiple bond coherence*
HSQC – *heteronuclear single-quantum coherence*
IC₅₀ – concentração inibitória de 50% da capacidade enzimática
kg – quilograma
mg – miligrama

mg.kg⁻¹ – miligrama por quilograma

mL – mililitro

mM – milimolar

M – molar

MC – madeira do caule

MR – madeira da raiz

NOESY – espectroscopia do efeito nuclear overhauser (*nuclear overhauser effect spectroscopy*)

R – raiz (madeira + casca)

RMN – ressonância magnética nuclear

RP-HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (*reverse phase – high performance liquid chromatography*)

Rz - rizoma

sh – solução hidroetanólica

UB – Herbário da Universidade de Brasília

UnB – Universidade de Brasília

ZSA – α -amilase de *Zabrotes subfasciatus*

Lista de figuras

Figura 1 - Fórmula estrutural da amilose (a), fórmula estrutural da amilopectina (b).....	2
Figura 2 - Estrutura terciária da α -amilase pancreática porcina (APP).....	3
Figura 3 - (A) <i>Acanthoscelides obtectus</i> adulto; (B) Infestação de <i>A. obtectus</i> em grãos de feijão.....	9
Figura 4 - (A) <i>Zabrotes subfasciatus</i> adulto; (B) Infestação de <i>Z. subfasciatus</i> em grãos de feijão.....	10
Figura 5 - Perfil de ação das insulinas.....	19
Figura 6 - Mecanismo de ação das terapias medicamentosas no tratamento de diabetes.....	20
Figura 7 - Mecanismo de ação das sulfoniluréias.....	21
Figura 8 - Fórmula estrutural (A) glibenclamida, (B) glipizida, (C) glimepirida.....	22
Figura 9 - Fórmula estrutural (A) nateglinida, (B) repaglinida.....	23
Figura 10 - Fórmula estrutural da metformina.....	24
Figura 11 - Fórmula estrutural (A) pioglitazona, (B) rosiglitazona.....	25
Figura 12 - Fórmula estrutural (A) acarbose, (B) miglitol.....	27
Figura 13 - (A) Ramos e folhas, (B) frutos de <i>Kielmeyera coriacea</i>	28
Figura 14 - Distribuição geográfica mundial de <i>Kielmeyera coriacea</i>	28
Figura 15 - Compostos isolados de <i>Kielmeyera coriacea</i>	31
Figura 16 - Extensão do bioma Cerrado no território nacional.....	35
Figura 17 - Extratos vegetais de plantas do bioma Cerrado.....	43
Figura 18. Partição líquido-líquido do extrato hidroetanólico da casca do caule de <i>Kielmeyera coriacea</i>	44
Figura 19 - (A) Coluna cromatográfica aberta de sephadex LH-20 (B) Placa de CCD.....	45
Figura 20 - Microplaca do teste de atividade inibitória de extratos vegetais.....	50
Figura 21 - Fracionamento químico do extrato hidroetanólico da casca do caule de <i>Kielmeyera coriacea</i>	63
Figura 22 - Cromatograma obtido em RP-HPLC.....	70

Lista de Tabelas

Tabela 1. Países com maiores estimativas de casos de diabetes em 2000 e para 2030..	13
Tabela 2. Extratos vegetais avaliados quanto a atividade inibitória sobre α -amilases.....	52
Tabela 3. Atividade inibitória dos extratos vegetais sobre α -amilases de <i>Z. subfasciatus</i> (ZSA) e <i>A. obtectus</i> (AOA) a 1 mg.mL^{-1} e sobre α -amilase salivar humana (ASH) a $125 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$	55
Tabela 4. Concentração dos extratos ativos capaz de inibir 50% (IC_{50}) as α -amilases de <i>Z. subfasciatus</i> e de <i>A. obtectus</i>	60
Tabela 5. Inibição da α -amilase salivar humana (ASH) pelas diferentes fases obtidas da partição líquido-líquido do extrato hidroetanólico da casca do caule de <i>Kielmeyera coriacea</i>	62
Tabela 6. Teor de compostos fenólicos e taninos das fases da partição líquido-líquido do extrato hidroetanólico da casca do caule de <i>Kielmeyera coriacea</i>	65
Tabela 7. Grupos obtidos do fracionamento da fase 5, metanol/água, oriunda da partição líquido-líquido do extrato hidroetanólico da casca do caule de <i>K. coriacea</i> , em coluna cromatográfica aberta de sephadex LH-20 e % de inibição sobre α -amilase salivar humana (ASH) a $125 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$	67
Tabela 8. Grupos obtidos do fracionamento da fase clorofórmica oriunda da partição líquido-líquido do extrato hidroetanólico da casca do caule de <i>K. coriacea</i> , em coluna cromatográfica aberta de sílica-gel.....	69

Resumo

As α -amilases são enzimas digestivas amplamente distribuídas em microrganismos, plantas e animais, que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas α -1,4 e atuam no metabolismo de carboidratos. A inibição de α -amilases pode ser aplicada no controle de insetos-praga dependentes de dieta rica em amido para obtenção de energia, reduzindo a quantidade de nutrientes para evitar seu desenvolvimento. Essa ação permite o uso desses inibidores como bioinseticidas. A inibição da captação de carboidratos na saúde humana pode ser uma alternativa terapêutica no controle glicêmico, reduzindo picos de glicose pós-prandial no tratamento de doenças crônicas, tais como diabetes, obesidade e hiperlipidemia. Este projeto propõe a prospecção de moléculas ativas sobre as α -amilases. Nesse contexto, as plantas são fontes ricas em compostos que possam ser estudados. Assim, o potencial biológico do Banco de Extratos de Plantas do Bioma Cerrado, do Laboratório de Farmacognosia da Universidade de Brasília, foi avaliado sobre α -amilases de *Acanthoscelides obtectus*, *Zabrotes subfasciatus* e α -amilase salivar humana. Foram testados cento e oitenta e cinco extratos vegetais hexânicos, diclorometânicos, etanólicos e hidroetanólicos pertencentes a vinte e quatro espécies de dez famílias. O extrato hidroetanólico da casca do caule de *Kielmeyera coriacea* foi selecionado para estudo químico-biológico devido ao seu forte perfil inibitório, com IC_{50} 110,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 272,12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ sobre α -amilases de *Z. subfasciatus* e de *A. obtectus*, respectivamente. O extrato apresentou 97,09% de inibição sobre a isoforma humana a 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A partição líquido-líquido forneceu duas fases com alto potencial inibitório, a fase 1, precipitado metanol/hexano, que inibiu 96,35%, e a fase 5, metanol/água, que apresentou 99,35% de inibição a 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O fracionamento químico da fase 1 em coluna cromatográfica aberta de sephadex LH-20 permitiu a obtenção de 11 grupos. Dentre esses, os mais ativos sobre α -amilase humana foram o grupo 10 (95,24%) e o grupo 11 (99,00%). O conteúdo de fenóis totais e taninos foi analisado para o extrato bruto, fases e grupos ativos. A fase 1 demonstrou um forte teor de compostos fenólicos, com 1 mg.mL^{-1} , sendo 53,56% de taninos e a fase 5 apresentou 0,95 mg.mL^{-1} de polifenóis, dos quais 35,96% são taninos. O grupo 11 mostrou 81,03% de constituintes taninos e inibiu 82% da α -amilase salivar humana a apenas 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A avaliação de extratos e taninos sobre α -amilases demonstraram atividade promissora na inibição de captação de carboidratos, representando uma alternativa para o controle do diabetes e obesidade, assim como um potencial bem interessante na inibição de α -amilases de insetos.

Palavras-chave: α -amilase, inibidor, Cerrado, *Kielmeyera coriacea*, diabetes, insetos-praga.

Abstract

α -amylases are digestive enzymes widely distributed in microorganisms, plants and animals, that catalyze hydrolysis of α -1,4 glycosidic bonds and act in carbohydrate metabolism. The inhibition of α -amylases can be applied on control of insect pests that depends on starch-rich diet to energy production, reducing the amount of nutrients to avoid its development. This action allows the use of these inhibitors like bio-insecticides. The inhibition of carbohydrate uptake in human health could be an alternative therapeutic on glycemic control, reducing post-prandial glucose peaks in chronic diseases treatment, such as diabetes, obesity and hyperlipidaemia. This project purposes the prospection of active molecules. In this context, plants are rich sources of compounds that could be studied. Then, the biologic potential of Cerrado Biome Plant Extract Bank, of University of Brasilia Pharmacognosy Laboratory, was evaluated on *Acanthoscelides obtectus* α -amylases, *Zabrotes subfasciatus* α -amylases and human saliva α -amylase. One hundred eighty-five hexanic, dichlorometanic, ethanolic and hidro-ethanolic extracts belonging to twenty-four species from ten families. The hidro-ethanolic bark stem extract of *Kielmeyera coriacea* was selected to chemical-biological study because of its strong inhibitory profile, with IC_{50} 110,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 272,12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ towards *Z. subfasciatus* and *A. obtectus* α -amylases, respectively. The extract presented 97,09% of inhibition of human isoform at 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. The liquid-liquid partition yielded two phases with a great inhibitory potential, phase 1, methanol/hexan precipitated, that inhibited 96,35%, and phase 5, methanol/water, that presented 99,35% of inhibition at 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. The chemical fractionation of phase 1 in open chromatographic sephadex LH-20 column allowed the separation of 11 groups. Among them, the most active on human α -amylase were group 10 (95,24%) and group 11 (99,00%). The content of total phenols and tannins was analysed to crude extract, phases and active groups. Phase 1 demonstrated a high level of phenolic compounds, with 1 mg.mL^{-1} , including 53,56% of tannins and phase 5 showed 0,95 mg.mL^{-1} of polyphenols content, in which 35,96% are tannins. Group 11 showed 81,03% of tannins content which inhibited 82% of human saliva α -amylase at only 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. The evaluation of extracts and tannins on α -amylases demonstrated a promising activity in carbohydrate uptake inhibition, representing an alternative to control diabetes and obesity, as well as a really interesting potential to insects α -amylases inhibition.

Keywords: α -amylase, Cerrado, diabetes, *Kielmeyera coriacea*, inhibitor, insects-pest.

1. Introdução

1.1 As α -amilases

As α -amilases, que são α -1,4-glucano-4-glucanohidrolases classificadas pela sigla EC 3.2.1.1, são enzimas que catalisam a hidrólise de polissacarídeos, como amido ou glicogênio, em plantas, animais e microrganismos (MacGregor *et al.*, 2001; Djonov *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008). Essas enzimas são carboidrases que atuam sobre ligações glicosídicas α -1,4 (Yoon e Robyt, 2003; Pereira *et al.*, 2006), formando unidades menores de carboidratos que possam ser completamente digeridas pelo organismo. A hidrólise realizada sobre substratos solúveis ocorre em diversos passos, começando com a ligação interna à cadeia, seguida da separação do polímero, e mais adiante outro processo hidrolítico para liberação de diversas moléculas de maltose e oligossacarídeos (Oudjeriouat *et al.*, 2003).

As enzimas que atuam na degradação de amido podem ser classificadas de acordo com seu modo de ação: endoamilases, exoamilases e enzimas de desramificação. As endoamilases são representadas pelas α -amilases, que têm como alvo os polímeros pertencentes à composição do amido, como a amilose (Figura 1a) e amilopectina (Figura 1b). Além disso, as α -amilases podem hidrolisar regiões internas do substrato que levam a um rápido decréscimo da viscosidade da solução de amido. As exoamilases englobam as glucoamilases fúngicas, as β -amilases bacterianas e de cereais. Essas liberam unidades de glicose e maltose gradativamente, a partir das extremidades do polímero, resultando na diminuição mais lenta da viscosidade da solução. Já as enzimas de desramificação atuam sobre ligações glicosídicas α -1,6 que não podem ser clivadas por α - e β -amilases. As

pullulanases produzidas pelo fungo fitopatogênico *Aureobasidium pullulans* são as principais enzimas dessa classe (Muralikrishna e Nirmala, 2005).

A degradação de amilose pelas α -amilases *in vitro* têm dois mecanismos propostos: o ataque múltiplo e o ataque em multicadeia. No primeiro modo, a enzima pode se ligar a determinada região do substrato e liberar apenas uma molécula, enquanto a outra porção mais longa do polímero é retida para uma hidrólise posterior. Neste processo ocorre a formação de oligossacarídeos; ao contrário do ataque em multicadeia, em que o complexo enzima-substrato resulta em apenas uma reação hidrolítica, liberando duas moléculas de tamanhos semelhantes (Muralikrishna e Nirmala, 2005).

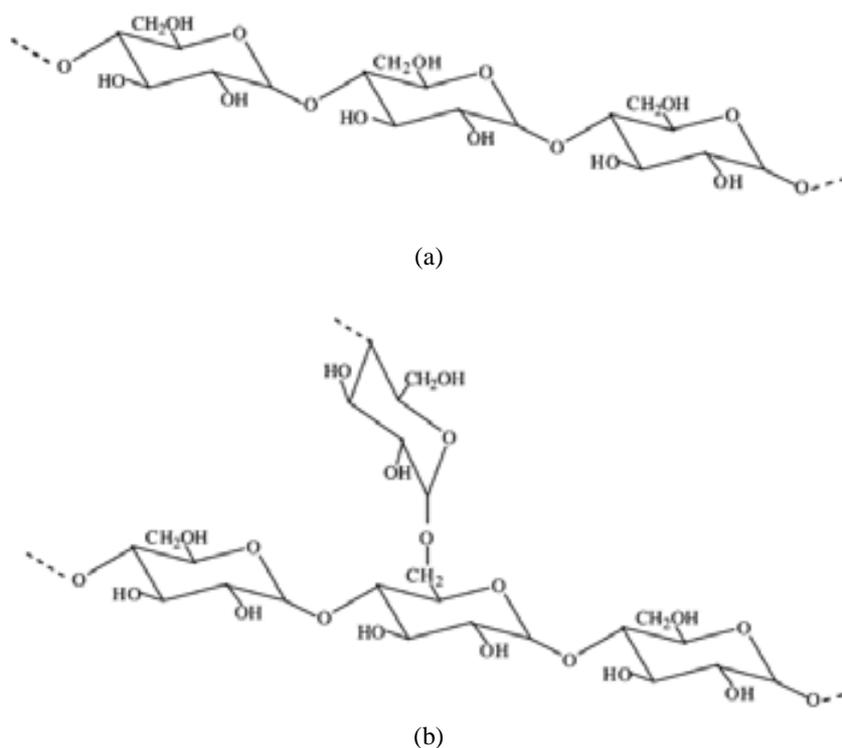


Figura 1. Fórmula estrutural da amilose (a), fórmula estrutural da amilopectina (b).

Fonte: Muralikrishna & Nirmala, 2005.

Em mamíferos e insetos, a α -amilase é estruturada em três domínios protéicos: o domínio (A), que proporciona estrutura para as duas porções flexíveis, o domínio (B), com formação mista de folhas β e α -hélices, e uma unidade globular que constitui o domínio (C), localizado no lado oposto à inserção do domínio (B) em (A) (Figura 2) (Kandra *et al.*, 2005). A ligação do substrato à enzima ocorre nos subsítios formados na interface dos domínios A e B, sendo que o número e natureza química dos subsítios variam de acordo com a origem da α -amilase. As isoformas da enzima possuem uma estrutura cuja integridade é cálcio-dependente, além de serem ativadas na presença de íons cloreto. Os sítios de ligação desses íons, que são funcionalmente importantes para a atividade enzimática, envolvem também os domínios A e B (Payan, 2004).



Figura 2. Estrutura terciária 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 um

derivado da acarbose (em verde) ligado ao sítio ativo, e ligantes monossacarídeos e dissacarídeos na superfície dos sítios de ligação. Fonte: Payan, 2004.

O ser humano produz duas formas distintas de amilases, a salivar humana (ASH) e a pancreática (APH), sendo ambas amplamente estudadas como indicadores importantes de distúrbios das glândulas salivares e do pâncreas. As duas formas estão entre as mais bem caracterizadas em relação à estrutura tridimensional, permitindo observar pequenas diferenças que levam a perfis de hidrólise e inibição distintos (Zajoncova *et al.*, 2005).

A primeira etapa da degradação de polissacarídeos é a clivagem do amido, que constitui um passo essencial à captação de carboidratos por organismos vivos. As α -amilases, responsáveis pela clivagem, possuem um papel essencial na alimentação dos diversos seres que a secretam. A inibição dessa enzima pode ter uma grande variedade de aplicações, por exemplo, o tratamento adjuvante de diabetes tipo II e obesidade (Kandra *et al.*, 2005), com possibilidades de redução dos níveis de glicemia pós-prandial e redução moderada de taxas de hemoglobina glicosilada (HbA1c). Esses efeitos podem ocorrer devido ao retardamento da digestão de carboidratos, que por sua vez torna mais lenta a absorção de glicose (Rabasa-Lhoret e Chiasson, 2004; Udani e Singh, 2007). Outra aplicação que vem sendo bem estudada para a inibição dessas enzimas é o controle de insetos-pragas na agricultura.

1.2 Inibidores de α -amilases

1.2.1 Classificação

Diversos tipos de compostos orgânicos são conhecidos por sua atividade inibitória sobre α -amilase. Geralmente os inibidores não protéicos são moléculas de baixo peso molecular, como acarbose, acarviosina-glicose, isoacarbose e ciclodextrinas, que possuem alta atividade inibitória sobre α amilase pancreática Porcina (APP) e α -amilase pancreática humana (APH) (Geng & Baia, 2008).

Os inibidores protéicos de α -amilase podem ser classificados de acordo com sua estrutura. Há um grupo encontrado em fungos do gênero *Streptomyces* e outros seis grupos oriundos de vegetais superiores (Payan, 2004, Svensson *et al.*, 2004). Dentre os inibidores protéicos de origem microbiana, têm-se os denominados Paim, Tendamistat e Haim. São proteínas de 74 a 76 resíduos de aminoácidos que atuam sobre isoformas enzimáticas de mamíferos e bactérias. O Tendamistat apresenta complexação com APP semelhante à acarbose durante a inibição, demonstrando um mecanismo mimético ao carboidrato inibidor. Este inibidor Tendamistat possui estrutura tridimensional quase idêntica ao inibidor Haim (Qin *et al.*, 2006).

Dentre os inibidores protéicos de origem vegetal temos: knotinas, γ -tioninas, proteínas-CM, inibidores tipo-Kunitz, taumatinas e lectinas. As knotinas possuem a menor sequência peptídica entre esses inibidores e possui atividade sobre amilases de insetos assim como as γ -tioninas. As proteínas-CM são também conhecidas como inibidores de origem cereal, com até 160 resíduos de aminoácidos. Geralmente têm atividade não somente sobre α -amilases como também sobre tripsinas, ao contrário de outros inibidores que apresentam especificidade apenas para amilases (Svensson *et al.*, 2004).

Proteínas tipo-Kunitz (BASI, WASI e RASI), são inibidores com massa molecular de 20 kDa, que foram estudados por sua capacidade de inibir especificamente α -amilases de insetos e cereais, além da atividade inibitória sobre a subtilisina, classificada como uma serino-protease (Yamasaki *et al.*, 2006). Em geral, proteínas taumatinas não são capazes de atuar sobre α -amilase, pois agem apenas sobre ligações β -1,3-glucano. No entanto, a zeamatina, um homólogo dessa família presente em *Zea mays*, possui um importante potencial inibitório sobre α -amilases de insetos (Fierens *et al.*, 2007). Já as lectinas compreendem as proteínas obtidas de *Phaseolus vulgaris*, conhecidas como α -AI-1, com ação sobre insetos e mamíferos, e α -AI-2, específico apenas para insetos (Svensson *et al.*, 2004).

1.2.2 Aplicação da inibição de α -amilase para controle de insetos-praga

As plantas são uma fonte alimentar rica em carboidratos, que estão distribuídos em várias partes do vegetal. Esses açúcares desempenham diversas funções relacionadas ao desenvolvimento, crescimento e mecanismos de defesa da planta contra agentes patogênicos (Bellincampi *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2007). Muitas espécies de insetos, que têm o amido como principal hábito alimentar, utilizam as α -amilases para o metabolismo de carboidratos. A fim de garantir a eficiência desse processo de digestão importante, algumas isoformas de α -amilase são encontradas na mesma espécie de inseto-praga (Sivakumar *et al.*, 2006).

Dessa forma, a variedade de isoformas no trato digestivo de uma espécie busca se sobrepôr à ação de elementos defensivos das plantas-alvo. A disputa entre os mecanismos dos insetos e elementos de defesa da planta é conhecida como fenômeno de co-evolução,

descrito por Erlich e Raven (1964). A relação entre ambos consiste na resposta do predador aos novos instrumentos desenvolvidos pela planta-alvo para se defender e também a busca do vegetal por novas defesas a fim de garantir sua sobrevivência à ação das pragas (Erlich e Raven, 1964).

As plantas contêm metabólitos secundários e inibidores enzimáticos protéicos que possuem importante papel regulatório e defensivo da planta (Hartman, 2007). Determinadas espécies vegetais apresentam maior grau de resistência à ação das amilases de insetos, tornando-se promissoras para a pesquisa de genes, que possam ser expressos em outras plantas susceptíveis por meio de transgenia (Xu *et al.*, 2007). Diversas classes de metabólitos secundários, como alcalóides, terpenos e glicosídeos cianogênicos foram definitivamente associados com a defesa da planta contra a ação de insetos (Franco *et al.*, 2002). O efeito de metabólitos secundários sobre as α -amilases ainda é pouco estudado, embora já se saiba que espécies distintas de bruquídeos apresentam diferenças na susceptibilidade a determinados compostos. Isso sugere que algumas classes dessas substâncias tenham maior importância que outras na resistência a insetos (Yamada *et al.*, 2005).

Atualmente, toneladas de defensivos agrícolas sintéticos são aplicados na agricultura, no entanto somente 5% desses produtos atingem o organismo alvo, devido a diversos fatores como a metabolização destes compostos químicos pela planta e também pelas pragas-alvo (Van Eerd *et al.*, 2003). A larga utilização desses defensivos agrícolas vem causando diversos efeitos deletérios à saúde humana e ao meio ambiente. Desde então, os inibidores enzimáticos têm sido considerados uma alternativa para o controle de insetos-praga (Sivakumar *et al.*, 2006).

Os inibidores protéicos de enzimas digestivas têm sido amplamente estudados para insetos das ordens Coleoptera e Lepidoptera, demonstrando eficiência contra essas pragas de grande importância econômica (Sivakumar *et al.*, 2006). Como esses insetos são totalmente dependentes das α -amilases para sua sobrevivência, essas enzimas também são alvos interessantes para bio-inseticidas inibidores enzimáticos (Franco *et al.*, 2002; Svensson *et al.*, 2003; Thomas e Read, 2007), principalmente para espécies que apresentam resistência aos inibidores disponíveis. O interesse é a utilização de um composto com atividade específica a baixas concentrações, que permite um controle mais adequado do desenvolvimento desses insetos.

Na ordem Coleoptera, os bruquídeos são pragas de cultivo associadas ao armazenamento de grãos, tendo como exemplos mais relevantes o *Zabrotes subfasciatus* (caruncho do feijão) e *Acanthoscelides obtectus*. O interesse sobre ambos torna-se maior sabendo de sua capacidade de infestação sobre dois dos grãos mais consumidos mundialmente, *Phaseolus vulgaris* (feijão comum) e *Vigna unguiculata* (feijão caupi). O *Z. subfasciatus* produz uma variedade de isoenzimas que pode ser alterada de acordo com a semente atingida. Foi relatada a habilidade deste inseto de modular a concentração de enzimas digestivas, secretando maior quantidade de duas isoformas de α -amilase e uma de α -glucosidase para *P. vulgaris* quando comparada a *V. unguiculata* para se adaptar melhor às defesas dessas plantas (Silva *et al.*, 2001a, Pelegrini *et al.*, 2006).

A espécie *A. obtectus* é amplamente distribuída na América Latina, África, Nova Zelândia, Estados Unidos e o sul da Europa, adaptando-se bem em regiões de clima temperado e subtropical. Os adultos são acinzentados e oblongos, com tamanho variando entre 2 a 4 mm, sendo a fêmea duas vezes maior que o macho. O ciclo é iniciado com a postura de ovos não aderentes na superfície do feijão e as larvas emergentes utilizam um

forte aparelho bucal para penetrar no grão. A duração total do ciclo de vida é de 20 a 40 dias, finalizando com a eclosão dos grãos para liberação dos adultos (Food and Agriculture Organization, 2008).

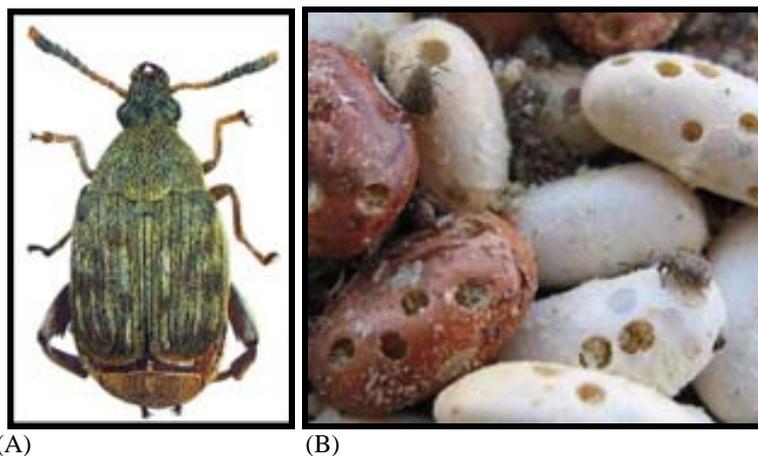


Figura 3 (A) *Acanthoscelides obtectus* adulto; (B) Infestação de *A. obtectus* em grãos de feijão. Fonte: <http://claude.schott.free.fr/Bruchidae/Fiches/Acantobtec.html>

O armazenamento dos grãos de feijão é uma etapa adequada para a infestação por *Z. subfasciatus*, que tem maior distribuição na América Central e América do Sul. O inseto adapta-se melhor ao clima tropical, embora esteja sendo introduzido em países de clima temperado pelo transporte de feijões infestados. A fêmea realiza a ovogênese apenas na presença do feijão e o ciclo de vida começa com a ovoposição sobre a semente. Em seguida, ocorre a penetração das larvas no grão para completar seu desenvolvimento, que eclodem na forma adulta, completando o ciclo em cerca de 30 a 40 dias (Figura 4) (Sari *et al.*, 2003).



Figura 4. (A) *Zabrotes subfasciatus* adulto; (B) Fêmea infestando grãos de feijão.

Fonte: http://www2.unine.ch/Jahia/site/leae/lang/en_GB/pid/6121

O inibidor protéico α -AI-1, presente em espécies do gênero *Phaseolus*, é capaz de inibir isoformas de α -amilase de mamíferos em geral, como a pancreática porcina (Valencia *et al.*, 2000), além de larvas de *Callosobruchus chinensis* e *Callosobruchus maculatus*. Porém esse inibidor não apresenta efeito sobre a α -amilase de *Z. subfasciatus*, além do trato digestivo do inseto ser capaz de secretar uma serino-proteinase que tem efeito sobre a molécula do inibidor (Silva *et al.*, 2001b).

Por outro lado, o inibidor protéico α -AI-2 não é capaz de agir sobre os mesmos alvos do α -AI-1, como por exemplo, mamíferos. Esse composto protéico, α -AI-2, tem alta capacidade de inibir a α -amilase de *Z. subfasciatus*, além de não ser susceptível à ação de proteases desse inseto devido a diferenças na estrutura terciária. O α -AI-1 e o α -AI-2 têm 78% de identidade da sequência de resíduos de aminoácidos, demonstrando uma distinção evolutiva interessante entre duas isoformas protéicas numa mesma espécie vegetal. Diante dessa diferença na estrutura primária, observa-se uma evidente adaptação da planta ao ataque de *Z. subfasciatus*, passando a produzir isoformas capazes de atuar sobre um

organismo resistente a outros inibidores, como o α -AI-1 (Ishimoto & Chrispeels, 1996, Klueh *et al.*, 2005). Atualmente o inibidor α -AI-2 é considerado um potencial fator de resistência de bruquídeos devido à especificidade para α -amilases de insetos (Nishizawa *et al.*, 2007). Além disso, nenhuma das isoformas de α -AI tem atividade inibitória sobre *Acanthoscelides obtectus*, justificando a necessidade de estudos de caracterização de isoformas de α -amilases presentes nessa espécie, como realizado por Franco *et al.* (2005).

1.2.3 Aplicação da inibição de α -amilase para saúde

A aplicação da inibição de α -amilases para redução eficiente da captação de carboidratos tem sido estudada há mais de 20 anos (Bo-Lin *et al.*, 1982; Hollenbeck *et al.*, 1983; Udani e Singh, 2007). Tendo como base que a digestão de carboidratos se inicia na boca por ação da ASH e continua no intestino pela APH, a redução ou bloqueio dessa atividade enzimática pode proporcionar uma diminuição na degradação de polissacarídeos em glicose, maltose e maltotriose (Wong e Jenkins, 2007). Essa interrupção no metabolismo de uma dieta rica em carboidratos permitiria evitar conseqüentes picos hiperglicêmicos, bem como o desequilíbrio de triglicerídeos e ácidos graxos (Wong e Jenkins, 2007).

Diversos inibidores de α -amilases foram extraídos de microrganismos e plantas (Kandra *et al.*, 2004), como por exemplo a acarbose, um eficiente inibidor enzimático de glicosidases utilizado clinicamente no tratamento de diabetes. Uma desvantagem do seu uso é sua degradação por enzimas digestivas e de microrganismos, acarretando diarreia e distúrbios abdominais. Portanto, há uma clara necessidade de novos agentes terapêuticos, assim como candidatos que possam ser adicionados no alimento ou como suplementos (Loo e Huang, 2007).

A capacidade de alguns alimentos derivados de plantas em reduzir o risco de doenças crônicas é atribuída, pelo menos em parte, a metabólitos secundários não-nutrientes, incluindo diversos grupos de polifenóis. Esses produtos comercializados em formas farmacêuticas com propriedades benéficas à saúde deixam de ser classificados como alimento ou medicamento e têm sido denominados nutracêuticos. O interesse nesse tipo de alternativa para controle da saúde vem aumentando, já que se trata de produtos que podem ser adicionados como suplemento à dieta (Espín *et al.*, 2007).

1.3 Diabetes mellitus

O diabetes mellitus pode ser descrito como um distúrbio metabólico de etiologia múltipla. Caracteriza-se pela ocorrência de hiperglicemia crônica, causando um desequilíbrio no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos, devido a disfunções na secreção de insulina, além da ação desse hormônio sobre os tecidos alvos ou ambos fatores. A doença possui sinais clínicos como sede, poliúria, distúrbio visual e perda de peso e características bioquímicas como alterações de níveis glicêmicos em jejum e pós-prandial (WHO, 1999, 2006).

Geralmente os sintomas não costumam ser facilmente identificáveis, por isso a ocorrência de hiperglicemia é capaz de causar danos patológicos e funcionais durante um longo período antes do diagnóstico (WHO, 1999, 2006). O desenvolvimento progressivo do diabetes aumenta consideravelmente os riscos de complicações macrovasculares (doença vascular periférica, doença cardiovascular e doença cerebrovascular) e microvasculares (retinopatia, nefropatia e neuropatia). Essa relação pode ser observada a partir da prevalência de hipertensão arterial em indivíduos com diabetes tipo II, que atinge cerca de

80%. Dentre os principais fatores de riscos da prevalência de hipertensão em diabetes estão a idade, a obesidade e etnia (Hunter e Bell, 2006). Há também uma predisposição genética estabelecida para indivíduos com diabetes tipo II, com diversos mecanismos propostos, como a regulação do tônus vascular (Hunter e Bell, 2006).

As estimativas desde 2000 são de que a prevalência mundial da doença aumente de 171 milhões de casos para 366 milhões até 2030. No cenário atual o diabetes atinge pessoas de 45-64 anos em países em desenvolvimento, enquanto nos países desenvolvidos a população apresenta a doença a partir de 64 anos (Wild *et al.*, 2004).

Tabela 1. Países com maiores estimativas de casos de diabetes para 2000 e 2030.

Posição	2004		2030	
	País	Pessoas com diabetes (milhões)	País	Pessoas com diabetes (milhões)
1	Índia	31,7	Índia	79,4
2	China	20,8	China	42,3
3	Estados Unidos	17,7	Estados Unidos	30,3
4	Indonésia	8,4	Indonésia	21,3
5	Japão	6,8	Paquistão	13,9
6	Paquistão	5,2	Brasil	11,3
7	Rússia	4,6	Bangladesh	11,1
8	Brasil	4,6	Japão	8,9
9	Itália	4,3	Filipinas	7,8
10	Bangladesh	3,2	Egito	6,7

Fonte: Adaptado de Wild *et al.*, 2004.

Nos dois casos a distribuição por sexo é semelhante para homens e mulheres, tendência que deve se manter futuramente. Os países mais afetados permanecem os

mesmos em 2000 e 2030, Índia, China, USA e Indonésia, com destaque para a Índia que deve atingir os 79,4 milhões de casos, enquanto o Brasil, atualmente com 4,6 milhões de casos, tem a previsão de aumentar esses números em 241% até 2030, chegando a 11,3 milhões de diabéticos (Tabela 1) (Wild *et al.*, 2004).

1.3.1 Classificação do Diabetes

O diagnóstico estabelecido classifica a doença de acordo com a etiologia manifestada em diabetes mellitus tipo I e tipo II, além do diabetes gestacional e diabetes de outros tipos específicos. O diabetes tipo I ocorre quando a produção de insulina pelo pâncreas é insuficiente ou nula, devido a destruição de células β -pancreáticas, que geralmente é atribuído a algum processo auto-imune (Campbell, 2006a). A manifestação clínica ocorre de forma abrupta, geralmente antes dos 30 anos, afetando principalmente crianças e adolescentes, podendo apresentar complicações no controle glicêmico decorrentes do desenvolvimento, assim como mudanças físicas e psicológicas do indivíduo (Campbell, 2006a).

O diabetes tipo II é conhecido como um distúrbio progressivo no metabolismo de carboidratos, caracterizado por um aumento gradual da resistência dos órgãos periféricos à ação da insulina, ocasionando um quadro crônico de hiperglicemia (Campbell, 2006b). Ocorre também a perda de secreção de insulina paralelamente à resistência periférica, embora no momento do diagnóstico ainda seja possível perceber a presença de secreção do hormônio. Dos 5% da população mundial que são diagnosticados como diabéticos, 85% apresentam o tipo II. Os principais fatores de risco para o desenvolvimento do diabetes tipo

II são a obesidade, a hipertensão e dislipidemias, que por sua vez mesmo isolados podem levar a complicações cardiovasculares (Campbell, 2006b).

Como critérios utilizados no diagnóstico de diabetes temos a glicemia de jejum (8 horas sem captação de calorias), que para pacientes saudáveis deve estar menor que 100 mg/dL, enquanto para pacientes com pré-diabetes esse valor varia de 100 a 125 mg/dL e maior que 126 mg/dL para diabéticos. A glicemia casual, que deve ser menor que 140 mg/dL para saudáveis, entre 140 e 199 mg/dL para pré-diabéticos e maior que 200 para pacientes com diabetes. O teste de tolerância oral a glicose, que visa avaliar a glicemia do indivíduo duas horas após ingerir uma solução equivalente a 75 g de glicose dissolvida em água. Os valores deste teste seguem os mesmos limites da glicemia casual (Institute for Clinical Systems Improvement, 2005; American Diabetes Association, 2008).

1.3.2 Intervenções para Diabetes

O controle glicêmico é feito com base na medida dos níveis de glicose em jejum, glicose pós-prandial e a taxa de hemoglobina glicosilada ou glicada (HbA1c). A utilização deste parâmetro permite obter dados precisos na determinação dos níveis glicêmicos a longo prazo. A HbA1c é formada a partir de uma glicosilação contínua durante o tempo de vida do eritrócito, permitindo portanto avaliar a variação de glicose sanguínea com um retrospecto de seis a oito semanas. Assim, na prática clínica, a severidade da hiperglicemia e a adesão do paciente ao tratamento podem ser acompanhados com maior confiabilidade, já que a glicosilação de hemoglobina não é influenciada por ingestão alimentar, atividade física nem por estresse metabólico agudo (Institute for Clinical Systems Improvement, 2005).

As intervenções realizadas no tratamento do paciente têm como objetivos controlar os níveis sanguíneos de glicose para maximizar a qualidade de vida do indivíduo, prevenir emergências diabéticas como cetoacidose e coma hiperosmolar. São objetivos também a manutenção dos níveis de HbA1c controlados para retardar a progressão da doença, reduzir os riscos de complicações macro e microvasculares e minimizar os efeitos adversos do tratamento (Campbell, 2006b).

O tratamento do paciente inclui diversas medidas que vão atuar adaptando-o à condição da doença em vários aspectos. Hábitos alimentares para redução da ingestão desequilibrada de carboidratos e atividade física podem beneficiar o indivíduo, retardando a progressão da resistência periférica a insulina. O paciente diabético possui uma peculiaridade essencial ao sucesso do controle glicêmico, ou seja, como esse monitoramento diário dos níveis de glicose depende da própria pessoa, todos os passos da terapia envolvem o comprometimento do mesmo em melhorar a qualidade de vida. É essencial tanto a administração de insulina ou farmacoterapia como práticas de vida saudável que colaborem para a ação eficaz do hormônio ou do agente hipoglicemiante utilizado (WHO, 2003).

1.3.2.1 Tratamento do Diabetes Tipo I: Insulina e seus análogos

A investigação científica na busca por insulinas exógenas para o tratamento de diabetes tipo I teve seu início com a utilização de extratos experimentais de pâncreas para suprir a ausência do hormônio nesses indivíduos. Os avanços tecnológicos permitiram a aplicação de técnicas de purificação e cristalização de proteínas, além da obtenção de insulina de origem suína e bovina ou até mesmo o uso da tecnologia de DNA recombinante

para produção de insulina humana e obtenção dos seus análogos (lispro, aspart, glulisina, glargina e detemir). O interesse terapêutico atual busca por soluções como a variação da concentração da insulina a ser administrada, modulação do tempo de ação e disponibilização de formas farmacêuticas que garantam a possibilidade de uso das vias oral, transdérmica, sublingual e respiratória (Martindale, 2006).

As insulinas e seus análogos disponíveis são classificadas de acordo com o tempo de ação: rápida, intermediária e prolongada. Além desse parâmetro farmacocinético, outros dois são utilizados para avaliar as situações de uso de acordo com suas propriedades, o pico de ação e a duração do efeito. No grupo de insulinas de ação rápida temos a insulina regular ou cristalina, a lispro, a aspart ou aspartato e a glulisina. Essas proteínas são análogos resultantes de alterações na estrutura primária da insulina humana endógena, aumentando a rapidez de absorção subcutânea, agilizando o início de ação da insulina e obtendo uma duração de efeito menor (Fonseca e Kulkarni, 2008).

A insulina Lispro difere da forma endógena pela mudança de posição de um resíduo de lisina por outro de prolina, entre as posições B28 e B29. Na aspart, a alteração observada é a troca de uma prolina na posição B28 pelo aspartato (Hirsch, 2005). Essas modificações conferem redução de 20 a 30% de efeitos hipoglicêmicos noturnos e uma leve melhora de 0,3 a 0,5% de redução dos níveis de HbA1c, sendo que essas vantagens são observadas também para a glulisina. Essa classe geralmente é utilizada na terapia *bolus*, ou seja, a administração é feita de 20 a 30 minutos antes das refeições para o controle da glicemia pós-prandial. Além desse protocolo de tratamento, esses análogos são indicados ainda para situações de cetoacidose, gestação e trabalho de parto, emergências e combinação com insulinas de ação intermediária ou prolongada (Wannmacher, 2005).

As insulinas de ação intermediária incluem a NPH (Neutral Protamine Hagedorf) ou isófana, a lenta e a detemir, que são utilizadas na normalização dos níveis glicêmicos basais para ambos tipos de diabetes, já que seu perfil de dissolução após aplicação subcutânea é gradual. Seu perfil de ação proporciona um controle adequado da glicemia, com menor risco de hipoglicemia noturna e menor perda de peso (Davis, 2006).

Para o controle glicêmico durante todo o dia com liberação de baixas concentrações são utilizadas as insulinas de ação prolongada, a ultralenta, a protamina de zinco (IPZ) e a glargina (Figura 5), que podem levar até 6 horas para o início de ação, apresentando menos eventos hipoglicêmicos e aumento da qualidade de vida em relação à insulina de ação intermediária, principalmente quando relaciona-se qualidade de vida a adesão ao tratamento, pois neste caso a aplicação pode ser feita em dose única diária (Davis, 2006; Heller *et al.*, 2007).

A utilização de pré-misturas de insulinas de ação rápida e de ação prolongada apresentam os mesmos benefícios quando comparadas à utilização separada das duas classes, quando são observados aspectos de risco de efeitos hipoglicêmicos, eficiência na redução de HbA1c e tolerabilidade (Wannmacher, 2005). A grande variabilidade de respostas entre os indivíduos para os regimes terapêuticos não permite o estabelecimento consolidado de uma forma de controle glicêmico. Por isso, a escolha da alternativa mais adequada de insulinoterapia depende principalmente do perfil de glicemia individualizado (Heller *et al.*, 2007).

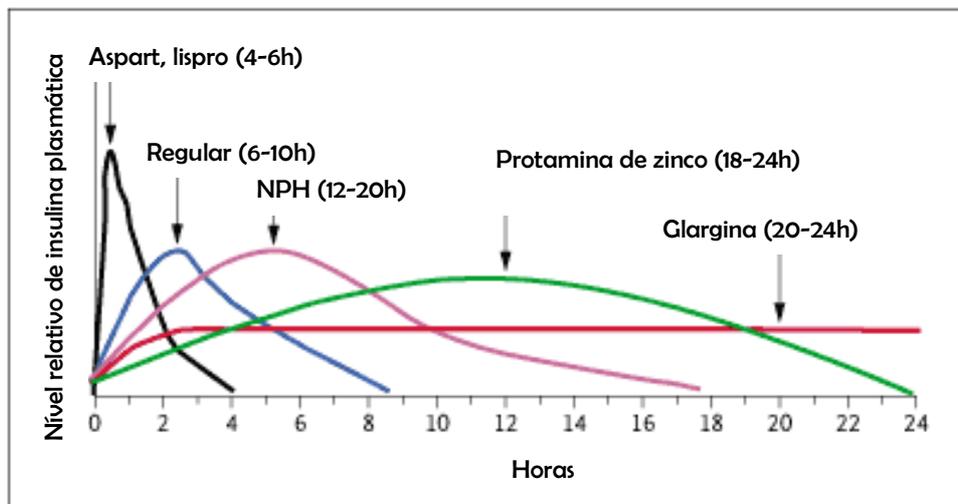


Figura 5. Perfil de ação das insulinas. Fonte: Davis, 2006.

1.3.2.2 Tratamento Farmacológico do Diabetes tipo II

A terapia medicamentosa para o tratamento do diabetes é necessária quando o paciente não apresenta controle glicêmico apenas com alterações dos hábitos alimentares e atividade física. Como o tipo II da doença é caracteristicamente marcado pelo aumento gradual da resistência periférica a insulina, há comprometimento na captação de glicose pelos órgãos e tecidos, na síntese de glicogênio e no controle à glicogenólise e à gliconeogênese (Massi-Benedetti e Orsini-Federeci, 2008). Por isso, a busca por agentes hipoglicemiantes baseia-se em mecanismos que compensem a incapacidade do organismo de responder à ação da insulina. É necessário reduzir a resistência de órgãos e tecidos para potencializar o efeito do hormônio circulante, aumentar a secreção de insulina, de forma a ultrapassar o limiar de resistência, e reduzir a captação de carboidratos para evitar o aumento dos níveis de glicose (Wannmacher, 2005).

Os medicamentos utilizados para evitar a hiperglicemia são divididos de acordo com o mecanismo de ação: secretagogos de insulina, que compreendem as sulfoniluréias, metiglinidas e inibidores da 4-dipeptidilpeptidase; os sensibilizadores de insulina, como as tiazolidinedionas/glitazonas e as biguanidas; e os inibidores da captação de carboidratos, grupo formado basicamente pelos inibidores de α -glucosidase (Figura 6) (Inzucchi, 2006).

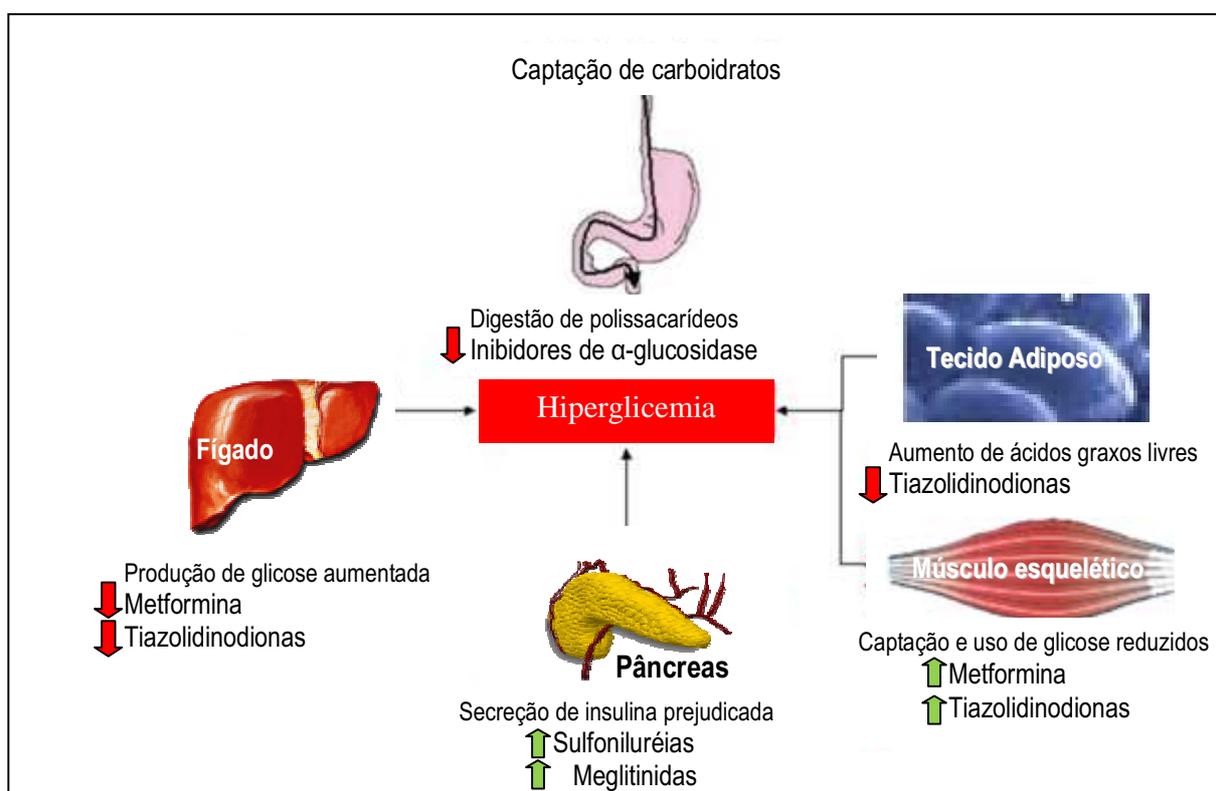


Figura 6. Mecanismo de ação das terapias medicamentosas no tratamento de diabetes. Inibidores da α -glucosidase, atuam inibindo a captação de carboidratos; Biguanidas (metformina) e tiazolidinodionas, reduzem a produção hepática de glicose, aumenta a captação de glicose principalmente no músculo esquelético, enquanto as tiazolidinodionas ainda diminuem o acúmulo de ácidos graxos no tecido adiposo; Sulfoniluréias e meglitinidas, aumentam a produção e secreção de insulina pelas células β -pancreáticas.

Fonte: Evans & Rushakoff, 2007.

Secretagogos de insulina

As sulfoniluréias são fármacos que atuam sobre as células β -pancreáticas, aumentando a produção e secreção de insulina, levando a um aumento da ação desse hormônio sobre os tecidos e órgãos alvos. Elas se ligam a receptores específicos na membrana das células β , inibindo o efluxo de potássio e aumentando a concentração intracelular de cálcio, então a célula se despolariza e facilita a secreção de insulina (Figura 7) (Aguilar-Bryan *et al.*, 1999; Zimmerman, 1997).

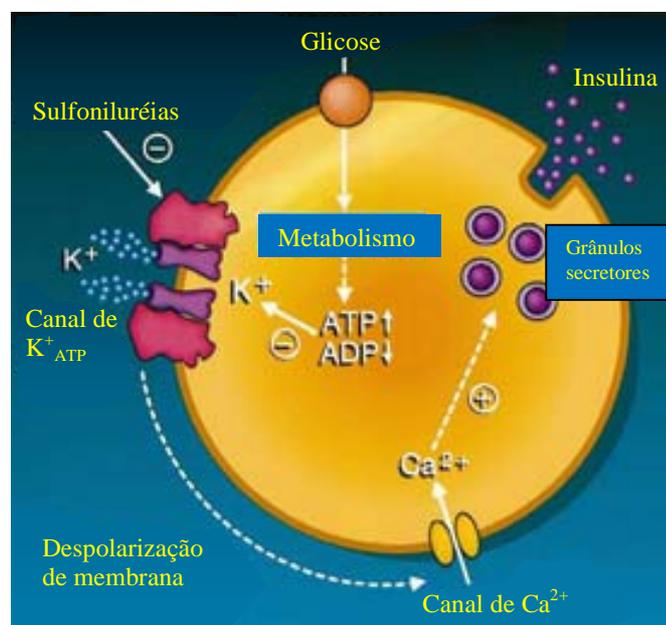


Figura 7. Mecanismo de ação das sulfoniluréias. Essa classe de fármacos induz a liberação de insulina através da inibição de canais K_{ATP} na membrana de células β no pâncreas. A captação de glicose aumenta a síntese de ATP nessas células, fechando os canais K_{ATP} e evitando o efluxo de K^+ . Essa cascata resulta numa despolarização de membrana que abre canais de influxo de Ca^{2+} , e conseqüentemente a exocitose de insulina. Fonte: Adaptado de Brady *et al.*, 1998.

Esses hipoglicemiantes são divididos em sulfoniluréias de primeira geração, como a tolbutamida, a clorpropamida e a acetohexamida e os representantes da segunda geração,

glipizida, glimepirida e glibenclamida (Figura 8). Ambas gerações apresentam eficácia bem semelhante, com controle glicêmico adequado, diferindo apenas quanto aos efeitos adversos do tratamento, pois os fármacos de primeira geração apresentam maior ocorrência de crises hipoglicêmicas e ganho de peso, que podem variar de acordo com o perfil farmacocinético de cada fármaco. Por isso, apesar da redução semelhante de HbA1c (cerca de 1,5 a 2%), as sulfoniluréias de primeira geração vêm sendo substituída pelas mais modernas (Chan e Abrahamson, 2003).

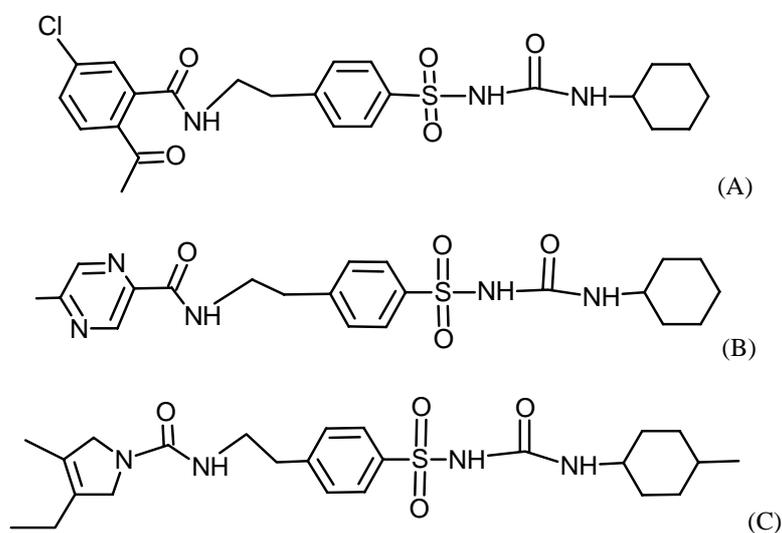


Figura 8. Fórmula estrutural (A) glibenclamida, (B) glipizida, (C) glimepirida.

Outros hipoglicemiantes orais que otimizam a secreção de insulina são as meglitinidas, que possuem a capacidade de se ligar a receptores de sulfoniluréias, produzindo o mesmo efeito sobre a produção e secreção de insulina. Além disso esses medicamentos possuem afinidade por receptores específicos dessa classe, contribuindo para seu efeito sobre o pâncreas. A nateglinida e a repaglinida (Figura 9), representantes da classe, são conhecidas como secretagogos de curta duração, devido à sua baixa meia-vida, fator que também reduz o risco de efeitos hipoglicêmicos, com o controle glicêmico

adequado, apesar do custo elevado. Essas podem ser alternativas ao tratamento com sulfoniluréias para pacientes com alergia a sulfas (Nathan, 2002; Zhang *et al.*, 2006).

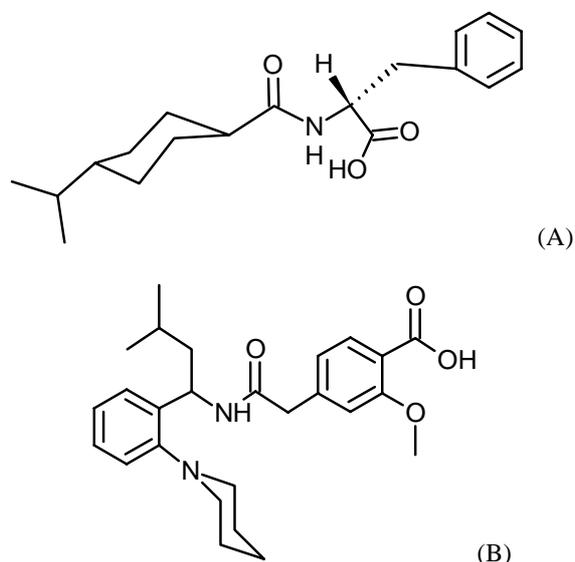


Figura 9. Fórmula estrutural (A) nateglinida, (B) repaglinida.

Os inibidores de dipeptidil-peptidase IV (DPP-IV) constituem a classe mais recente de agentes orais no controle de diabetes tipo II, inibindo a degradação enzimática do peptídeo glucagon-1 (GLP-1). O GLP-1 é uma incretina hormonal secretada no intestino delgado e liberada na corrente sanguínea. Tem a capacidade de limitar a hiperglicemia pós-prandial inibindo a liberação pancreática de glucagon e estimulando a produção de insulina. Uma vez inibida a degradação de GLP-1, os DPP-IV promovem uma redução de HbA1c de 0,5 a 1,0%, sem ganho de peso ou risco de hipoglicemia, porém há limitações quanto à efetividade e segurança (De Luis *et al.*, 2008).

Sensibilizadores de insulina

A manifestação do diabetes tipo II implica no aumento gradual de resistência à ação da insulina, que se torna um alvo no tratamento do distúrbio metabólico no indivíduo. Nesse sentido, são utilizados os sensibilizadores de insulina, que atuam no organismo otimizando as condições para a ação da insulina circulante que o diabético apresenta, mesmo que a quantidade secretada seja apenas parcial (Krentz e Bailey, 2005).

A metformina é o único representante da classe das biguanidas, como substituta da fenformina devido à acidose láctica relatada em 1975. Apesar de ser um dos fármacos mais antigos no tratamento do diabetes, a metformina (Figura 10) continua sendo largamente utilizada e amplamente conhecida em relação à eficácia e segurança. Sua ação deve-se à inibição da gliconeogênese, podendo reduzir a produção hepática de glicose em até 75%, e também ao aumento moderado da sensibilidade à insulina. Uma vantagem significativa na terapia com metformina é a associação do controle glicêmico à perda de peso e a redução moderada de triglicerídeos, principalmente VLDL – *Very Low Density Lipid*, observadas durante o tratamento. Esses fatores se tornam relevantes devido à história natural da doença que apresenta a obesidade como fator de risco para o surgimento de doenças cardiovasculares (Heine *et al.*, 2006). Por isso, esse fármaco é a primeira escolha para diabéticos tipo II obesos, com resultados comprovados de benefício na taxa diminuição de mortalidade desse grupo.

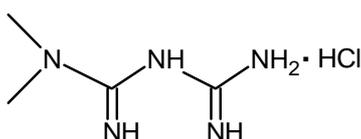


Figura 10. Fórmula estrutural da metformina.

A redução de HbA1c é semelhante às sulfoniluréias, cerca de 1,5%. Como seu mecanismo de ação envolve um controle dos níveis glicêmicos a partir da inibição da produção de glicose hepática, é correto afirmar que a metformina é basicamente um agente anti-hiperglicemiante, ao contrário das sulfoniluréias, que têm ação hipoglicemiante. Por isso a ocorrência de casos hipoglicêmicos é bem menor para as biguanidas (Fowler, 2007).

As tiazolidinedionas ou glitazonas compreendem a rosiglitazona e a pioglitazona (Figura 11), já que a troglitazona foi retirada do mercado em 2000 devido à hepatotoxicidade. Esses sensibilizadores se ligam a receptores nucleares PPARs (*Peroxisome proliferator-activated receptors*), principalmente nas células musculares e adipócitos, estimulando a secreção de diversas proteínas que favorecem a atuação da insulina, como a adipotecina. Outro mecanismo proposto é o bloqueio da transcrição de proteínas responsáveis pela resistência à insulina ou proteínas pró-inflamatórias (Mazzone *et al.*, 2006).

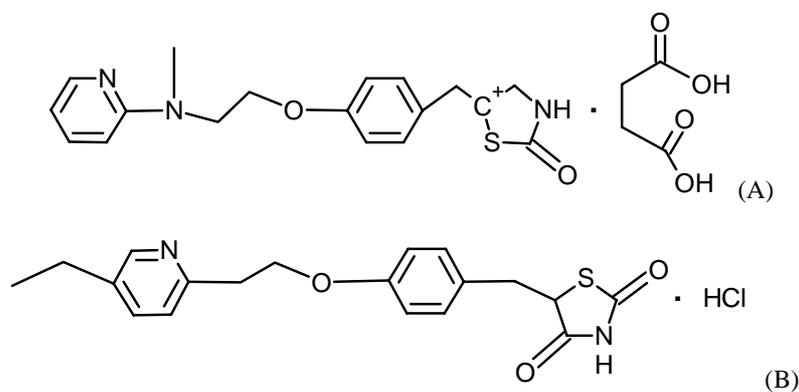


Figura 11. Fórmula estrutural (A) rosiglitazona, (B) pioglitazona.

Dentre as diferentes formas de PPARs existentes (PPAR α , PPAR δ e PPAR γ), as tiazolidinedionas possuem maior especificidade pela isoforma γ , que é mais expressa no tecido adiposo. Sua eficácia no controle de HbA1c é menor, variando entre 0,5 e 1,5%. A prática clínica com esses fármacos possui desvantagens como ganho de peso, necessidade de monitoramento freqüente da função hepática, possível formação de edema e aumento do risco de infarto miocárdico (Nissen e Wolski, 2007).

Inibidores da captação de carboidratos

Uma alternativa terapêutica que também pode ser explorada na busca por soluções para o controle glicêmico em pacientes diabéticos é a inibição da captação de carboidratos no trato gastrointestinal. Com essa meta são utilizados os inibidores enzimáticos para retardar a absorção intestinal de glicose, evitando a ocorrência de hiperglicemia. Os inibidores de α -glucosidase, representados pelo miglitol, voglibose e principalmente acarbose (Figura 12), evitam a degradação de carboidratos em monossacarídeos e retardam a absorção gastrointestinal desses compostos (Schnell *et al.*, 2007). Essa redução da concentração de glicose promovida pela acarbose é associada a uma redução da necessidade de produção de insulina, além do aumento moderado da sensibilidade à insulina (Gabbay, 2007).

A redução de HbA1c promovida pelos inibidores de α -glucosidase está entre 0,5 e 0,8%, e o controle glicêmico é significativo apenas para a glicemia pós-prandial. O principal efeito adverso observado é a presença de sintomas gastrointestinais, como dor abdominal, diarreia, náusea e flatulência, que ocorrem devido a produtos de sua degradação por enzimas digestivas e fermentação dos produtos de degradação por microorganismos

(Kandra *et al.*, 2005). Apesar disso, a acarbose é utilizada como adjuvante em esquemas terapêuticos de combinação com outras classes de agentes orais (Van de Laar *et al.*, 2005).

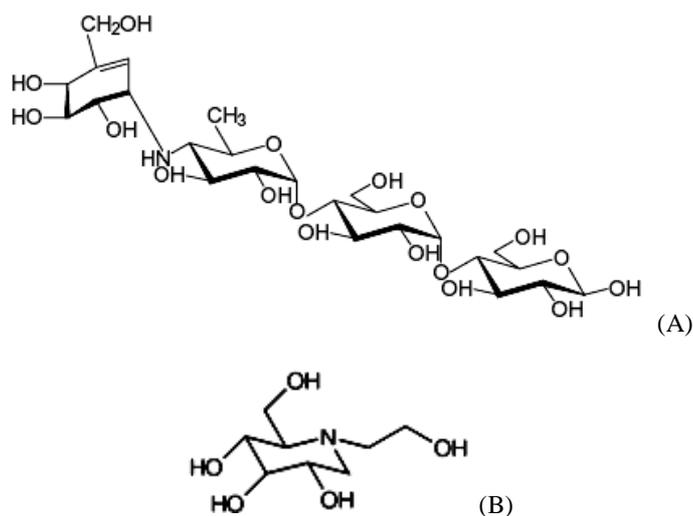


Figura 12. Fórmula estrutural (A) acarbose, (B) miglitol. Fonte: Kandra et al., 2005; Evans & Rushakoff, 2007.

1.4 *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc.

A espécie *Kielmeyera coriacea*, pertencente à família Clusiaceae (Guttiferae), é popularmente conhecida como “Pau-Santo” ou “Saco-de-Boi” e compõe a vegetação típica do Cerrado em áreas mais abertas. É uma planta caducifólia, com tronco de consistência suberosa e folhas de aspecto coriáceo no ápice dos ramos (Figura 13). Quando atinge a fase adulta, a árvore pode atingir de 3 a 6 metros de altura e suas sementes são disseminadas pelo vento (Lorenzi, 1992).



Figura 13. (A) Ramos e folhas, (B) frutos de *Kielmeyera coriacea*.

A família Clusiaceae é representada no Brasil por 21 gêneros e cerca de 183 espécies, incluindo o gênero *Kielmeyera*, caracteristicamente endêmico da América do Sul (Figura 14) (Barroso, 1978; Sultanbawa, 1980).



Figura 14. Distribuição geográfica mundial de *Kielmeyera coriacea*. Fonte: Global Biodiversity Information Facility (GBIF) Geospatial Consortium Services. Acesso em 12/05/08: www.gbif.org

O extrato aquoso da madeira do caule é utilizado tradicionalmente no tratamento de doenças tropicais como esquistossomose, leishmaniose, malária, infecções fúngicas e bacterianas (Alves *et al.*, 2000). O gênero *Kielmeyera* tem o maior número de espécies da família, que apresenta diversos outros gêneros cujo potencial biológico é parcialmente abordado na literatura científica (Obici *et al.*, 2008). O estudo químico de espécies do gênero *Kielmeyera*, bem como da família Clusiaceae, possibilitou a identificação de algumas substâncias químicas, principalmente flavonóides (Audi *et al.*, 2002).

A principal classe de constituintes encontradas nesse gênero são as xantonas, relatadas em diversas análises fitoquímicas. A partir do extrato benzênico da madeira do caule de *Kielmeyera petiolaris* foram obtidas quatro metoxi-xantonas, além de uma metoxi-xantona acetilada e quatro metoxi-xantonas hidroxiladas (Gottlieb *et al.*, 1966). Também foram isoladas xantonas em *K. ferruginea*, osajaxantona na casca do caule, previamente descrita em *Maclura pomifera* (Moraceae) (Wolfson *et al.*, 1965), *Calophyllum scriblitifolium* (Ackson *et al.*, 1967), *C. canum* (Clusiaceae) (Carpenter *et al.*, 1969) e *Kielmeyera corymbosa* (Gottlieb *et al.*, 1968). Além de 6-hidróxi-jacareubina, previamente descrita em *C. brasiliense*, *C. scriblitifolium* e *K. speciosa*. A jacareubina foi relatada em diversas espécies do gênero *Calophyllum* e as metóxi-xantonas hidroxiladas relatadas no gênero *Kielmeyera* (Gottlieb *et al.*, 1968). A presença de osajaxantona em *K. coriacea* foi obtida a partir do extrato de caule e folhas em hexano-acetato de etila (4:1), apresentando atividade inédita sobre *Schistosoma mansoni*, quando aplicada topicamente em animais (Lopes *et al.*, 1977).

O estudo fitoquímico do extrato benzênico do caule de *Kielmeyera rubriflora* permitiu o isolamento e identificação de 2-hidroxi-xantona, 2,4-dimetoxi-3-hidroxi-xantona, 2,3-dimetoxi-4-hidroxi-xantona, 4-hidroxi-2,3-metileno-dioxi-xantona, 4-metoxi-

2,3-metileno-dioxi-xantona, kielcorina e β -sitosterol (Gottlieb *et al.*, 1971). Todos esses compostos haviam sido descritos em outras espécies de *Kielmeyera*, permitindo portanto observar a semelhança quimiotaxonômica na formação do grupo químico a partir desse gênero vegetal. Mais adiante, o estudo de vias de obtenção de xantonas permitiu a síntese de xantonas conhecidas, como a kielcorina e *cis*-kielcorina (Pinto *et al.*, 1987).

A prospecção fitoquímica de *K. coriacea* rendeu o isolamento de xantonolignóides e diversas xantonas preniladas com potencial antimicrobiano. O fracionamento químico dos extratos diclorometânico e metanólico das folhas e caule, envolvendo cromatografia em coluna aberta de sílica gel, sephadex LH-20 e cromatografia líquida de alta eficiência semi-preparativa, CLAE (HPLC), em combinação com um espectrômetro de massa acoplado permitiu, a partir do extrato diclorometânico, a detecção de 10 xantonas (Figura 15), além de um bifenil e uma mistura de triterpenos (Cortez *et al.*, 1998).

Cortez *et al.* (1998) isolaram a xantona inédita, 1,3,7-trihidroxi-2-(3-hidroxi-3-metilbutil)-xantona (Figura 15.9), a mistura de ésteres cinâmicos triterpênicos e os outros compostos e avaliaram sobre fungos. Quatro xantonas e o bifenil apresentaram atividade sobre o fungo fitopatogênico *Cladosporium cucumerinum*, a somente 0,65 μg a 6,25 μg em ensaio de bioautografia. Duas xantonas preniladas inibiram o crescimento de *Candida albicans* com apenas 10 μg de cada composto utilizando-se o mesmo método. A aucuparina e a 1,3,7-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona mostraram atividade sobre *Bacillus subtilis* com Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 3,12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 12,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. Sobre *Staphylococcus aureus*, o bifenil apresentou potencial antimicrobiano com CIM de 12,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Porém, as substâncias não foram ativas sobre bactérias Gram-negativas. O perfil bactericida foi verificado pelo monitoramento dos meios de cultura, não sendo observado crescimento posterior do microrganismo. A biossíntese de

aucuparina ainda não está plenamente esclarecida quanto à sua presença constitutiva na planta ou síntese por estímulos ambientais, ou ambos (Cortez *et al.*, 2002).

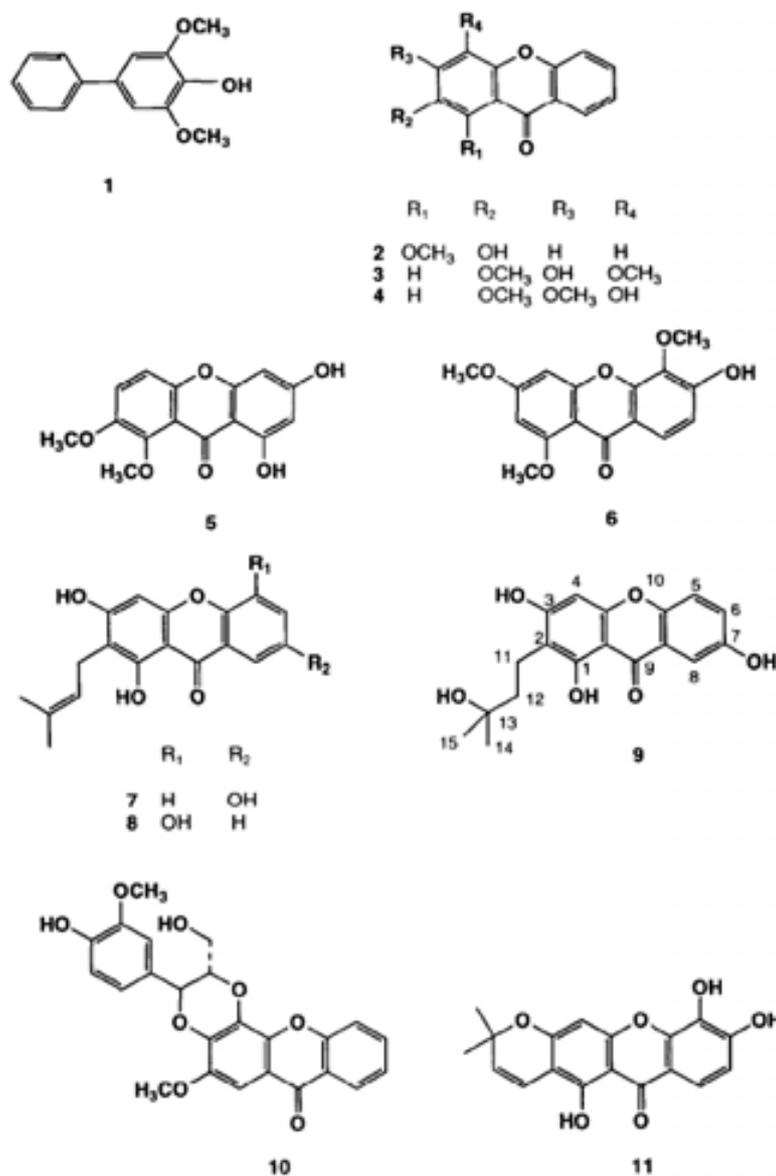


Figura 15. Aucuparina (1), 2-hidroxi-1metoxixantona (2), 3-hidroxi-2,4-dimetoxi-xantona (3), 4-hidroxi-2,3dimetoxixantona (4), swertinina (5), 6-hidroxi-1,3,5-trimetoxixantona (6), 1,3,7-triidroxi-2(3-metilbut-2-enil)-xantona (7), 1,3,5-triidroxi-2(3-metilbut-2-enil)-xantona (8), 1,3,7-triidroxi-2-(3-hidroxi-3-metil-butil)-xantona (9), kielcorina (10), jacareubina (11). Fonte: Cortez *et al.*, 1998.

Quanto à toxicidade de *K. coriacea*, a literatura científica apresenta informações sobre o extrato diclorometânico do caule, avaliado experimentalmente por via oral e intraperitoneal em camundongos, demonstrando baixa toxicidade tanto aguda como crônica. Os altos valores de DL_{50} permitem inferir uma margem ampla de segurança para as substâncias do extrato, pois são maiores que 500 mg.kg^{-1} e 1 g.kg^{-1} (Obici *et al.*, 2008).

A atividade do extrato etanólico das folhas de *K. coriacea* foi avaliada sobre o sistema nervoso em camundongos para verificar o efeito ansiolítico ou antidepressivo. O tratamento oral de camundongos a 120 mg.kg^{-1} por 30 dias permitiu observar um efeito ansiolítico significativo. No entanto, os testes realizados para detecção da redução de sinais depressivos não apresentaram benefício no desempenho dos animais, mesmo em altas concentrações (Audi *et al.*, 2002).

Ainda explorando metabólitos secundários do gênero *Kielmeyera*, Cruz *et al.* (1998a, 1998b) isolaram cinco novas fenilcumarinas do extrato hexânico do caule de *K. reticulata*, 7-hidroxi-8-(4-cinamoil-3-metil-1-oxobutil)-4-fenil-2',2'-dimetil-2H,6H-benzo[1,2-b:3,4-b']-dipirano-2-ona; 7-hidroxi-8-(4-hidroxi-3-metil-1-oxobutil)-4-fenil-2',2'-dimetil-2H,6H-benzo[1,2-b:3,4-b']-dipirano-2-ona; 5-hidroxi-6-(4-cinamoil-3-metil-1-oxobutil)-4-fenil-2',2'-dimetil-2H,6H-benzo [1,2-b: 3,4-b']-dipirano-2-ona; 5,7-dihidroxi-6-(4-cinamoil-3-metil-1-oxobutil)-S-(3-metil-2-butenil)-4-fenil-2H-1-benzopirano-2-ona e 5,7-dihidroxi-6-(4-hidróxi-3-metil-1-oxobutil)-8-(3-metil-2-butenil)-4-fenil-2H-1-benzopirano-2-ona.

Foram publicadas também as estruturas de duas cumarinas preniladas inéditas presentes no extrato hexânico do caule de *K. reticulata*, 7-hidroxi-8-(4-cinamoil-3-metil-1-oxobutil)-4-*n*-propyl-2',2'-dimetil-2H,6H-benzo[1,2-b:3,4-b']-dipirano-2-ona e 5-hidroxi-6-(4-cinamoil-3-metil-1-oxobutil)-4-*n*-propyl-2',2'-dimetil-2H,6H-benzo[1,2-b:3,4-b']-dipirano-2-ona, e duas já conhecidas, 7-hidroxi-8-(4-cinamoil-3-metil-1-oxobutil)-4-fenil-

2',2'-dimetil-2H,6H-benzo[1,2-b:3,4-b']-dipirano-2-ona e 5-hidroxi-6-(4-cinamoil-3-metil-1-oxobutil)-4-fenil-2',2'-dimetil-2H,6H-benzo[1,2-b:3,4-b']-dipirano-2-ona (Cruz *et al.*, 1998a).

Essas cumarinas foram isoladas também do extrato hexânico do caule de *K. argentea*. Apesar da descrição de xantonas como principais constituintes em espécies do gênero *Kielmeyera*, o estudo fitoquímico de *K. argentea* e *K. reticulata* não encontrou quaisquer metabólitos desse grupo químico. É interessante observar que isso ocorreu após a realização de um trabalho envolvendo o mesmo órgão vegetal utilizado em pesquisas anteriores com espécies similares, bem como o método de extração sólido-líquido com solventes de polaridade próximas (Cruz *et al.*, 1998b).

A atividade do extrato metanólico dos galhos de *K. variabilis* foi avaliada sobre o vetor da esquistossomose, *Biomphalaria glabrata*. O fracionamento químico permitiu o isolamento de três xantonas: assiguxantona B, 1,3,5,6-tetra-hidroxi-2-prenilxantona e a kielcorina, além do isolamento do ácido 2,5-dihidro-benzóico. Apesar da atividade observada no extrato bruto, os testes realizados com as substâncias isoladas não apresentaram resultados relevantes, sobretudo quando comparadas à niclosamida, fármaco anti-helmíntico que também é utilizado como moluscicida (Pinheiro e Cortez, 2003).

O fracionamento por cromatografia gasosa (CG) foi utilizado para o estudo de óleos essenciais extraídos das folhas, flores e frutos de *K. rugosa*, permitindo a identificação majoritária de compostos sesquiterpênicos. Os principais constituintes isolados do fruto foram δ -valerolactona, α -cubebeno, α -copaeno, β -cariofileno, α -humuleno, α -selineno, (*E,E*)- α -farneseno, δ -cadineno e 1-*epi*-cubenol. Nas folhas foram encontrados principalmente: (*Z*)-3-hexen-1-ol, α -cubebeno, α -copaeno, β -cubebeno, β -cariofileno,

germacreno D, *cis-β*-guaieano, α -selineno, δ -cadineno e 1-*epi*-cubenol. Nas flores foram isolados o benzil-álcool, 2-fenil-etanol e eugenol (Andrade *et al.*, 2006).

1.5 Cerrado

Interesses ambientais, econômicos e científicos vêm se mobilizando para o conhecimento do Cerrado brasileiro, que representa um bioma de grande diversidade química e riquezas naturais. A vegetação do Cerrado tem uma área original de 2 milhões de km², abrangendo cerca de 23% do território nacional, ou seja, compreendendo praticamente um quarto da superfície do Brasil (Klink e Machado, 2005). O Cerrado é considerado a última fronteira agrícola mundial, gerando, portanto, o interesse econômico da agricultura na região (Borlaug, 2002). Estima-se que cerca de 40% da flora nativa tenha sido substituída por monoculturas, principalmente soja, e outras formas de agricultura emergentes no país. A imensa extensão desse bioma é superada apenas pela Amazônia com 3,5 milhões de km². A diversidade química presente em sua vegetação deve-se a diferentes maneiras de adaptação às condições climáticas, de solo e geográficas (Machado *et al.*, 2004).

O Cerrado é dividido sistematicamente de acordo com sua forma de manifestação vegetal (Ratter *et al.*, 1997; Machado *et al.*, 2004). O Cerrado abrange desde a região de fronteira com a floresta amazônica e se estende aos estados do sudeste como São Paulo e Paraná, e também focos isolados em Roraima e Amapá, além de Bolívia, Paraguai e Venezuela (Figura 16).



Figura 16. Extensão do bioma Cerrado no território nacional. Fonte: www.wikimedia.org

No Cerrado observa-se temperaturas entre 22 e 27 °C e um período de seca muito intenso, que no Brasil Central se manifesta entre abril e setembro, seguido de um período chuvoso de outubro a março. Um componente muito importante nessa vegetação é a resistência das espécies ao fogo, que ocorre com frequência no período de seca e devido à ação antrópica. As plantas apresentam tronco retorcido, espessamento da casca do caule e ramificações, folhas rígidas, assim como a alta capacidade de regeneração, permitindo o desenvolvimento de novos órgãos após o período destrutivo (Ratter *et al.*, 1997).

As variações vegetativas encontradas podem ser classificadas de acordo com as características botânicas de cada área. O Cerrado inclui ecossistemas distintos, que apresentam por exemplo, desde locais com árvores de maior porte, com 12 a 15 m de altura (Cerradão), mais populosa; a locais como Cerrado *sensu stricto*, que engloba arbustos com 2 a 8 m, e cobre entre 20 a 70% do bioma; ou o Cerrado de campo, incluindo campo sujo e campo limpo, de acordo com a presença ou ausência de indivíduos vegetais maiores; e as

matas ciliares ou matas de galeria presentes junto aos rios e córregos (Brannstrom *et al.*, 2008).

Considerando-se as plantas de portes herbáceo, arbustivo, arbóreo e cipós, são contabilizadas aproximadamente sete mil espécies vegetais. Estima-se que 44% dessas espécies sejam endêmicas. Em relação às plantas herbáceas, as espécies exclusivas da região podem atingir 70% de endemismo (Filgueiras, 2002). Além disso, esse nível de endemismo de plantas do Cerrado contribui em 12% para a riqueza de espécies total que o Brasil apresenta (Klink e Machado, 2005).

Dentre os fatores que influenciam o metabolismo secundário das plantas do Cerrado estão sazonalidade, ritmo circadiano, temperatura, altitude, índice pluviométrico, ataque de patógenos e herbivoria. Praticamente todas as classes de compostos secundários sofrem variações sazonais, de acordo com a época do ano e oscilações circadianas, que ocorrem devido às mudanças climáticas e a composição atmosférica durante o dia e a noite. Há grupos de compostos beneficiados por baixas temperaturas e outros que contrariamente, necessitam do aumento da temperatura para otimização da biossíntese. A variação da presença ou não de certos compostos é observada também em exemplares de plantas da mesma espécie que se desenvolvem em regiões de diferentes altitudes (Gobbo-Neto e Lopes, 2007).

A disponibilidade de recursos hídricos para a planta influencia processos como fotossíntese, mobilização de reservas e expansão foliar, e podem levar a alterações no metabolismo secundário. Do mesmo modo, quando a planta sofre ataques de patógenos ou herbivoria, a tendência natural é o desenvolvimento de metabólitos de defesa que permitam sua sobrevivência. Em efeito, os danos causados por agentes externos levam a respostas bioquímicas, produzindo metabólitos secundários defensivos (Hartmann, 2007).

E essas condições ambientais e estímulos externos causados às plantas geram um conjunto magnífico de diversidade química no Cerrado, que dificilmente pode ser encontrado em outros biomas. A seca prolongada, exigindo um maior esforço para captação de água, as condições do solo com poucos nutrientes, as taxas elevadas de alumínio e a necessidade de resistência ao fogo estimulam a produção de metabólitos secundários. A extensão do bioma sobre as regiões do país com diferentes circunstâncias ambientais favorecem a multiplicidade de compostos químicos que as plantas são capazes de sintetizar. Isso aumenta a importância científica e tecnológica do Cerrado, com a biossíntese de diversos recursos naturais ainda minimamente estudado (Rangel *et al.*, 2007).

O Cerrado é tido como um dos 25 pontos críticos (*hotspots*) mundiais para conservação da biodiversidade, ou seja, uma área com abundância de espécies endêmicas em risco, e que necessita urgentemente de proteção ambiental. Esse conceito visa direcionar esforços para minimizar impactos do desenvolvimento humano sobre a natureza e coordenar os recursos de conservação para as regiões mais ameaçadas (Rangel *et al.*, 2007). Estima-se que caso a taxa de desmatamento anual do Cerrado permaneça em 2,2 milhões de hectares, teremos seu desaparecimento até 2030 (Machado *et al.*, 2004).

O solo do Cerrado apresenta características adversas à agricultura, pois é pobre em nutrientes e com alta acidez. Assim, as atividades agrícolas são induzidas pela utilização de fertilizantes e calcário, que causam sérios danos para a reestruturação da vegetação nativa, com erosões, falta de matéria orgânica e mudança de pH (Rodrigues *et al.*, 2007).

Além disso, a crescente monocultura de soja no Centro-Oeste e Norte do país provocam prejuízos não apenas associados ao cultivo, mas também às ações como queimadas para a limpeza do solo, que fogem ao controle dos produtores e atingem áreas de proteção ambiental. O fogo utilizado nessas ocasiões é mais intenso que o suportado pelas

plantas nativas. O incêndio de áreas dominadas pelo capim-gordura são mais quentes e mais prolongados, reduzindo a capacidade de regeneração do Cerrado (Klink e Machado, 2005).

No sentido de combater o desmatamento e a destruição do Cerrado, iniciativas de organizações não-governamentais, governos estaduais, pesquisadores e algumas empresas privadas junto ao Ministério do Meio Ambiente, promovem práticas de conservação e aplicação de práticas de desenvolvimento sustentável. Para maiores adesões a essas práticas é preciso que a sociedade conheça a importância do Cerrado. Assim como a legislação brasileira, quando por exemplo, no Código Florestal brasileiro, exige a manutenção de apenas 20% da área de Cerrado como reserva legal em propriedades privadas (esse percentual é de 80% em regiões da Amazônia) (Klink e Machado, 2005).

A possibilidade de aplicação científico-tecnológica do Cerrado pode ser visualizada em todos esses aspectos, sobretudo no que diz respeito à riqueza de metabólitos que pode proporcionar à humanidade. Um exemplo dessa diversidade química pode ser observada nos trabalhos de nossa equipe, com extratos de plantas e substâncias do bioma Cerrado, com potencial biológico sobre *Plasmodium falciparum* (Mesquita *et al.*, 2005; Mesquita *et al.*, 2007), sobre larvas de *Aedes aegypti* (Rodrigues *et al.*, 2006), ou pela atividade leishmanicida e tripanocida (Espindola *et al.*, 2004; Vieira *et al.*, 2008), dentre outros diversos potenciais do bioma.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial inibitório de extratos e compostos de plantas do Cerrado sobre α -amilases dos insetos *Zabrotes subfasciatus*, *Acanthoscelides obtectus* e α -amilase salivar humana.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar extratos de plantas do Cerrado com atividade inibitória sobre α -amilases
- Determinar o IC₅₀ dos extratos ativos
- Selecionar extrato para fracionamento químico biomonitorado
- Determinar os compostos responsáveis pela atividade inibitória
- Elucidar a estrutura de compostos isolados

3. Materiais e Métodos

3.1 Materiais

3.1.1 Enzimas

α -amilase salivar humana tipo XII (Sigma-Aldrich)

α -amilase de insetos extraída das larvas de *Zabrotes subfasciatus* e *Acanthoscelides obtectus*

3.1.2 Soluções e tampões

Tampão Succínico pH 5,0

Ác. succínico 0,15 M	1,77 g
NaCl 10 mM	58 mg
CaCl ₂ 20 mM	222 mg
Água destilada q. s. p.	100 mL

Tampão Citrato pH 6,0

Citrato de sódio	1,04 g
NaCl 10 mM	58 mg
CaCl ₂ 20 mM	222 mg
Água destilada q. s. p.	100 mL

Tampão Fosfato pH 7,0

Fosfato de sódio 0,1 M	1,68 g
NaCl 10 mM	58 mg
CaCl ₂ 20 mM	222 mg
Água destilada q. s. p.	100 mL

Tampão Tris pH 8,0

Tris 0,05 M	0,61 g
NaCl 10 mM	58 mg

CaCl ₂ 20 mM	222 mg
Água destilada q. s. p.	100 mL

Tampão Tris pH 9,0

Tris 0,1 M	1,22 g
NaCl 10 mM	58 mg
CaCl ₂ 20 mM	222 mg
Água destilada q. s. p.	100 mL

Ácido Dinitrosalicílico (DNS)

NaOH 1M	4,0 g
Ácido 3,5-dinitrosalicílico	2,5 g
Tartarato de sódio e potássio	75 g
Água destilada q.s.p.	250 mL

Solução de amido 1%

Amido solúvel (Sigma-Aldrich)	1 g
Solução tampão q.s.p.	100 mL

Solução de FeCl₃

FeCl ₃	1,62 g
Solução de HCl 0,001 M	1L

Solução de lauril sulfato de sódio/ trietanolamina

Lauril sulfato de sódio 1% p/v

Trietanolamina	5% (v/v)
Isopropanol	20% (v/v)
Água destilada q. s. p.	100 mL

Solução de Albumina Sérica Bovina (BSA) em Tampão Acetato pH 4,9

Solução tampão acetato de sódio pH 4,9.

Ácido acético glacial 0,20 M	11,44 mL
Acetato de sódio 0,27 M	22,15 g
Cloreto de sódio 0,17 M	9,945 g
Água destilada q. s. p.	1 L

Albumina sérica bovina (BSA) 1 mg por mL de solução tampão acetato pH 4,9.

3.1.3 Material cromatográfico

Hexano P. A.

Clorofórmio P. A.

Acetato de etila P. A.

Metanol absoluto P. A.

Solução etanol-água (9:1)

Sephadex LH-20 (Sigma)

Placas de sílica gel F₂₅₄ para cromatografia em camada delgada (Merck®)

Soluções reveladoras: Solução I – Vanilina etanólica 1% p/v

Solução II - Solução etanólica de ácido sulfúrico 10% v/v

3.2 Métodos

3.2.1 Obtenção dos extratos brutos

As plantas foram coletadas no bioma Cerrado nos arredores de Brasília-DF e identificadas pelo botânico Prof. José Elias de Paula/UnB. Foram depositadas exsiccatas no Herbário (UB)/UnB para assegurar a autenticidade da espécie coletada. Os órgãos vegetais foram separados em cascas e madeira do caule e da raiz, fruto, sementes e folhas a fim de direcionar o estudo de cada órgão vegetal. E então dessecado, estabilizado e pulverizado em moinho de facas para otimização do processo de extração.

O pó do material botânico foi submetido a extrações sucessivas por maceração, visando a obtenção de soluções extrativas de acordo com solventes de polaridade distinta (hexano, diclorometano, etanol e solução hidroetanólica 90%), esgotando as substâncias de diferente natureza química presentes nos diferentes órgãos vegetais.

Após a pré-filtração com uma membrana porosa e filtração com papel de filtro, a solução extrativa foi recuperada e concentrada em aparelho rotavapor a 40 °C e pressão reduzida, para eliminação do solvente. O extrato foi armazenado em frascos e então dessecado com soprador térmico, a fim de eliminar o teor residual de solvente. Os extratos foram armazenados em freezer a -20 °C (Figura 17). Para realização dos testes *in vitro* os extratos foram ressuspensos em dimetilsulfóxido (DMSO) a 20 mg mL⁻¹.



Figura 17. Extratos vegetais de plantas do bioma Cerrado.

3.2.2 Fracionamento químico

3.2.2.1 Partição líquido-líquido

O estudo fitoquímico do extrato hidroetanólico da casca do caule de *Kielmeyera coriacea* foi iniciado com o método de extração de substâncias por partição líquido-líquido.

A técnica consiste na separação de moléculas de acordo com sua afinidade pelos solventes orgânicos, já que estes possuem características físico-químicas distintas, que permitem a migração de substâncias em meio líquido para o solvente de polaridade mais semelhante. À medida que adiciona-se um solvente com diferente polaridade é possível obter diversas soluções com gradientes de polaridade distintos (Figura 18).



Figura 18. Partição líquido-líquido do extrato hidroetanólico da casca do caule de *Kielmeyera coriacea*.

O extrato vegetal (6,0 g) foi dissolvido completamente em metanol e a solução obtida foi colocada em funil de separação. Então foi adicionado hexano, observando-se a formação de duas fases. A fase apolar foi recuperada e posteriormente foi feito o mesmo procedimento seqüencial adicionando clorofórmio e acetato de etila à fase metanólica, adicionando moderadamente água quando necessário para facilitar a formação do conjunto bifásico. Foram obtidas cinco fases de polaridade distinta: um precipitado insolúvel em metanol/hexano (2,09 g), fase hexânica (0,11 g), fase clorofórmica (0,62 g), fase acetato de

etila (0,02 g) e fase metanol/água (3,08 g). Estas foram dessecadas em soprador térmico e avaliadas quanto ao potencial inibitório sobre α -amilase.

3.2.2.2 Coluna cromatográfica

A partir da fração metanol/água obtida na partição líquido-líquido foi realizada cromatografia utilizando coluna aberta de sephadex LH-20. Para tanto, foi usada uma coluna de vidro com 50 cm de altura e 1,5 cm de diâmetro para colocar 30 g de sephadex previamente ressuspensionado em 300 mL de metanol. Após adicionar a resina, o empacotamento da coluna foi realizado mantendo a coluna fechada por 24 h, para permitir a conformação da fase estacionária de maneira adequada. Foram aplicados 1,308 g de amostra na coluna, com um fluxo de 1 gota/3 segundos para coletar 165 frações de 8 mL cada (Figura 19).

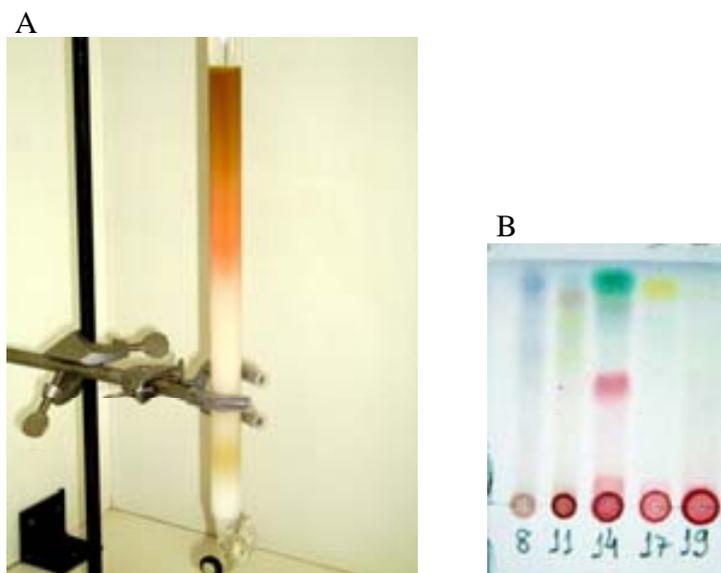


Figura 19. (A) Coluna cromatográfica aberta de sephadex LH-20 da fase metanólica da partição líquido-líquido obtida a partir do extrato bruto hidroetanólico da casca do caule de *Kielmeyera coriacea*. (B) Placa de CCD de frações obtidas na coluna cromatográfica no

sistema de eluente clorofórmio:acetato de etila:metanol (30:60:10) e reveladas com vanilina sulfúrica.

A reunião dessas frações foi feita por cromatografia em camada delgada (CCD) em placas de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck), usando como soluções reveladoras a vanilina etanólica/solução sulfúrica (Figura 19). Os sistemas de eluentes da CCD foram clorofórmio:acetato de etila:metanol (30:60:10) para as frações 1 a 32 e butanol:ácido acético:água (60:20:20 e 50:25:25) para as frações 33 a 165.

Foi realizado também o estudo da fase clorofórmica em coluna cromatográfica aberta flash, utilizando-se como fase estacionária sílica-gel 230-400 mesh (Merck), eluindo-se com hexano-CHCl₃ (50:50, 30:70, 15:85) CHCl₃ puro, CHCl₃:AcEt (90:10, 50:50), AcEt puro e MeOH puro. As 36 subfrações coletadas foram monitoradas e reunidas por CCD.

3.2.2.3 Isolamento de substâncias

As subfrações 18-21 obtidas a partir do fracionamento da fase clorofórmica foram aplicadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência, em coluna de fase reversa C₁₈ (RP-HPLC) para isolamento e purificação.

3.2.3 Identificação e elucidação estrutural

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) unidimensionais (¹H e ¹³C) e bidimensionais (HSQC, HMBC, COSY e NOESY) foram obtidos em espectrômetro Bruker 300 e 500 MHz, utilizando piridina para solubilização das amostras. Os espectros de infravermelho (FT-IR) foram obtidos em espectrofotômetro com amostras em pellets de KBr.

3.2.4 Determinação de compostos fenólicos

A determinação dos compostos fenólicos e taninos totais foi realizada pelo método de Hagerman e Butler (1978).

Fenóis totais: Em um tubo de ensaio colocou-se 2 mL de solução contendo 1% (p/v) de lauril sulfato de sódio, 5% de trietanolamina (p/v) e 20% de isopropanol. Foi adicionado 1 mg de amostra e 1 mL de solução cromogênica de FeCl_3 , seguido de repouso por 15 min e então foi feita a leitura da absorbância a 510 nm. Utilizou-se ácido tânico para a construção de uma curva-padrão de quantificação.

Taninos totais: A reação de quantificação com 1 mL (1 mg) de amostra foi realizada, adicionando-se 2 mL de solução de albumina sérica bovina (1 mg.mL^{-1} , tampão acetato 0,2 M, pH = 4,9). O conjunto foi deixado em repouso por 15 min e então centrifugado por 15 min a 3000 rpm. O sobrenadante foi descartado, enquanto o precipitado foi dissolvido em 4 mL de solução de lauril sulfato de sódio 1%, contendo trietanolamina 5% e isopropanol 20%. Adicionou-se 1 mL de solução ácida (HCl 1 mM) de FeCl_3 ($1,62 \text{ mg.mL}^{-1}$) como reagente cromogênico. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 510 nm. Ambos ensaios de quantificação foram realizados em triplicata. Para quantificação de taninos totais em cada amostra, foi preparada uma solução de ácido tânico a 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 e 0,8 mg.mL^{-1} , permitindo a elaboração de uma curva-padrão.

3.2.5 Obtenção dos insetos

A colônia de *Zabrotes subfasciatus* e *Acanthoscelides obtectus* foi mantida em estufa a 28 °C e umidade relativa de 80%. O ciclo de vida completo das duas espécies possuía duração de 28 a 31 dias, iniciando-se com a ovoposição e finalizando com a eclosão do

inseto a partir das sementes de feijão. A extração de larvas para os ensaios foi realizada abrindo-se os grãos entre os dias 15 a 20, que permitia o desenvolvimento ótimo desejado.

3.2.6 Extração da α -amilase dos insetos

A extração das larvas de cada espécie nos grãos foi feita cerca de 15 a 20 dias após a infestação, permitindo o desenvolvimento adequado para a extração das α -amilases. As larvas foram homogeneizadas a 4 °C em 5 volumes de NaCl 10 mM contendo 20 mM de CaCl₂, centrifugadas a 10000 g em três ciclos de 20 min a 4 °C. O sobrenadante obtido foi fonte do *pool* de enzimas, dentre elas a α -amilase. O material foi congelado a - 20 °C para preservação da atividade enzimática em alíquotas.

3.2.7 Preparação da α -amilase salivar humana

A α -amilase salivar humana tipo XII foi adquirida da Sigma-Aldrich, dissolvida em solução de CaCl₂ 10 mM e armazenada em alíquotas em tampão fosfato (pH = 7,0).

3.2.8 Determinação de condições ótimas de pH

Foram determinadas as condições ótimas de pH para a α -amilase de cada inseto, por meio de uma curva de atividade pH dependente com tampão succinato (pH 4,0 e 5,0), tampão citrato (pH 6,0), tampão fosfato (pH 7,0) e tampão Tris (pH 8,0 e 9,0). A atividade enzimática foi testada segundo Bernfeld (1955), incubando 6 unidades de atividade da enzima diluída no tampão respectivo e 50 μ L de solução de amido 1% (Sigma-Aldrich) por 20 min a 37 °C.

A reação enzimática foi interrompida adicionando 100 μ L de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) 1% (em NaOH 1 N e tartarato de sódio e potássio 30%) e depois levada ao banho-

maria por 5 min em ebulição. A formação do complexo maltose-DNS fornece a coloração laranja avermelhado intenso.

Foi adicionado 1 mL de água destilada após o fim da reação e posteriormente verificada a absorbância a 550 nm em espectrofotômetro leitor de microplacas (Biorad®). A atividade inibitória foi determinada pela comparação da atividade da enzima na ausência do inibidor avaliado. Cada experimento foi realizado em triplicata. Foi considerada uma unidade de atividade a quantidade de enzima necessária para aumentar em 0,1 a absorbância.

3.2.9 Ensaios de inibição enzimática

Os ensaios *in vitro* de atividade enzimática foram realizados segundo o método de Bernfeld (1955) com adaptações. Foram incubadas 6 unidades de atividade da enzima por 20 min a 37 °C com 5 µL de extrato vegetal a 20 mg.mL⁻¹ e tampão succínico 0,15 M (pH 5,0). Então foram adicionados 50 µL de solução de amido 1% (Sigma-Aldrich) em tampão succínico 0,15 M (pH 5,0) para reação por 20 min, com a concentração final do extrato a 1 mg.mL⁻¹. Após a interrupção da reação com DNS, foi adicionado 1 mL de água destilada e feita a leitura da absorbância a 550 nm. A atividade inibitória (Figura 20) foi determinada pela seguinte fórmula:

$$\text{Atividade inibitória (\%)} = 100 - \frac{(T - BI) \times 100}{(CE - BE)}$$

Onde:

T representa a absorbância do teste de inibição enzimática, contendo enzima, extrato vegetal, solução de amido e ácido 3,5-dinitrossalisílico (DNS). O valor obtido em cada

leitura refere-se à atividade enzimática residual da α -amilase após sofrer a ação do extrato pré-incubado;

BI representa a absorvância do branco de inibição, contendo extrato vegetal, solução de amido e DNS, visando eliminar variações relacionadas à coloração característica do extrato vegetal, além da possibilidade de atividade amilolítica endógena do mesmo e/ou o teor de maltose possivelmente presente no extrato antes do experimento;

CE representa a absorvância do controle de atividade enzimática, contendo enzima, solução de amido e DNS. Essa variável fornece o referencial da atividade máxima de α -amilase usada para realização do experimento;

BE representa a absorvância do branco de inibição, contendo solução de amido e DNS. Utilizado para evitar variações relacionadas à absorvância da coloração tipicamente amarela do ácido dinitrossalicílico (DNS) e do amido.

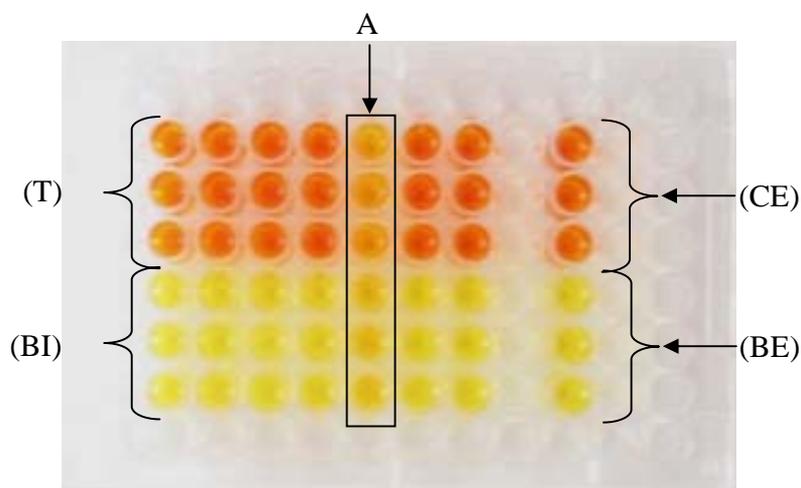


Figura 20. Microplaca do teste de atividade inibitória de extratos vegetais. Cada coluna representa uma amostra avaliada em triplicata. (A) representa a triplicata do teste (T) com coloração mais clara devido à menor formação de complexo maltose-DNS, indicando inibição da α -amilase, em comparação com o controle da enzima, além da respectiva triplicata do branco de inibição (BI). O controle de enzima (CE) refere-se à capacidade

máxima da enzima na formação de maltose, tipicamente com laranja avermelhado mais intenso. (BE) representa a coloração típica do DNS e do amido.

3.2.10 Ensaio de inativação térmica

As amostras ativas foram submetidas a estresse térmico, a fim de avaliar a capacidade dos inibidores na manutenção da atividade inibitória. Elas foram aquecidas em banho-maria a 100 °C por 10 min e então testadas sobre a α -amilase dos insetos. Foi observada a produção de maltose após o aquecimento, para determinar a termoestabilidade do composto responsável pela atividade.

3.2.11 Determinação do perfil inibitório dos extratos ativos

Os extratos com atividade inibitória significativa, ou seja, maior que 80%, foram selecionados para a avaliação do potencial inibitório em diluições seriadas a fim de determinar a concentração de inibição de 50% da atividade da enzima (IC_{50}). Cada extrato ativo foi testado a 1000, 800, 600, 400, 200, 120 e 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para construir a curva de inibição.

3.2.12 Análise estatística

O cálculo de IC_{50} foi feito a partir de gráficos relacionando a atividade inibitória concentração-dependente, utilizando os dados das triplicatas de cada teste para realizar a análise de regressão não-linear no programa MS Excel®.

4. Resultados e Discussão

A atividade inibitória dos extratos vegetais foi avaliada em testes preliminares sobre duas fontes distintas de α -amilase, os insetos-praga de feijão *Zabrotes subfasciatus* e *Acanthoscelides obtectus*. Foram testados 185 extratos brutos, dentre os quais eram 81 hexânicos, 49 etanólicos, 30 diclorometânicos e 25 hidroetanólicos, apresentados na Tabela 2. Do total de extratos obtidos de acordo com cada órgão vegetal envolvido, havia 42 extratos originados de folhas (F), 33 de casca do caule (CC), 32 de madeira do caule (MC), 27 de madeira da raiz (MR), 20 de casca da raiz (CR), 12 de caule (madeira + casca) (C), 12 de raiz (madeira + casca) (R), 4 de fruto com semente (FS), 2 de rizomas (Rz) e 1 extrato vegetal obtido a partir de fruto (Fr).

Tabela 2. Extratos vegetais avaliados quanto a atividade inibitória sobre α -amilases.

Família	Parte da planta usada (solvente)	Número de Herbário
<i>Echinodorus macrophyllus</i> (Kunth) Micheli	F ¹ (d,sh)	(UB) 3748
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	F(h,d,sh), C ² (h,d,sh), MR ³ (h,d,sh)	(UB) 3753
<i>Annona crassiflora</i> Mart.	F(h,e), CC ⁴ (h,e), MC ⁵ (h,e), CR ⁶ (e), MR(e)	(UB) 3700
<i>Cardiopetalum calophyllum</i> Schtdl.	F(h,e), CC(h,e), MC(h,e), R ⁷ (h,e)	(UB) 3703
<i>Duguetia furfuracea</i> (A. St. Hil.) Saff.	F(h,e), C(h,e), CR(h,e), MR(h,e)	(UB) 3679
<i>Xylopia aromatica</i> (Lam.) Mart.	F(h,e), CC(h,e), MC(h,e), CR(h,e), MR(h,e)	(UB) 3699

<i>Xylopia emarginata</i> Mart.	F(h,e), CC(h,e), MC(h,e), CR(h,e), MR(h,e)	(UB) 3690
Apocynaceae		
<i>Aspidosperma macrocarpon</i> Mart.	F(h,e), CC(h,e), MC(h,e), CR(h,e), MR(h,e)	(UB) 3692
<i>Aspidosperma tomentosum</i> Mart.	F(h,d,sh), C(h), CC(h,d,sh), MC(h,d), R(d)	(UB) 3732 (UB) 3663
<i>Condylocarpon isthmicum</i> (Vell.) A. DC.		
<i>Hancornia pubescens</i> Nees & Mart.	F(h,e), CC(h,e), MC(h,e)	(UB) 3677
<i>Himatanthus obovatus</i> (Mull. Arg.) Woodson	F(h,e), CR(h,e), MR(h,e)	(UB) 3678
<i>Peschiera affinis</i> (Mull. Arg.) Miers var. <i>campestris</i>	F(h,e), CR(h,e), MR(h,e)	(UB) 3717
Rizzini	CC(h,e), MC(h,e), R(h,e)	
Asteraceae		
<i>Eremanthus glomeratus</i> Less.	F(h,e), CC(h,e), MC(h,e), CR(h,e), MR(h,e)	(UB) 3721
<i>Piptocarpha macropoda</i> (DC.) Baker	CC(h,e)	(UB) 3680
Clusiaceae		
<i>Calophyllum brasiliense</i> auct. non Camb.	F(h,d,sh), CC(h,d,sh), MC(h,d,sh), R(h,d,sh)	(UB) 3754
<i>Kielmeyera coriacea</i> Mart. & Zucc.	CC(h,d,sh), MC(h), CR(h), MR(h,d), Fr ⁸ (h)	(UB) 3745
Malpighiaceae		
<i>Byrsonima crassa</i> Nied.	F(h,d,sh), MC(h,d,sh), CC(d), MR(h)	(UB) 3743
Mimosaceae		
<i>Enterolobium ellipticum</i> Benth.	F(h,d,sh), C(h,d,sh), MR(h,d,sh)	(UB) 3739
<i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville	F(h,d), MC(h,d)	(UB) 3740
Rubiaceae		
<i>Chomelia pohliana</i> Mull. Arg.	R(sh)	(UB) 3741
<i>Palicourea rigida</i> Kunth	C(h)	(UB) 3744

Vochysiaceae

<i>Qualea grandiflora</i> Mart.	F(h,d,sh), C(h,d), CC(h,e), FS ⁹ (h,d,sh), MC(h,d,e,sh),	(UB) 3746
<i>Qualea parviflora</i> Mart.	R(h,e,sh), CR(d,sh), CC(h,d,sh), MC(h), CR(h,sh), MR(h,d,sh), FS(h)	(UB) 3742

Zingiberaceae

<i>Renealmia alpinia</i> (Rottb.) Maas.	Rz ¹⁰ (h,d)	(UB) 3719
---	------------------------	-----------

¹F: Folha, ²C: Caule (Madeira + Casca), ³MR: Madeira da Raiz, ⁴CC: Casca do Caule, ⁵MC: Madeira do Caule, ⁶CR: Casca da Raiz, ⁷R: Raiz (Madeira + Casca), ⁸Fr: Fruto, ⁹FS: Fruto + Semente, ¹⁰Rz: Rizoma. Solventes: h: hexano, d: diclorometano, e: etanol, sh: solução hidroetanólica.

A capacidade inibitória enzimática significativa, ou seja, maior que 80% de inibição sobre *Z. subfasciatus* a 1mg.mL⁻¹, foi observada para 12 extratos, correspondendo a 6,49% do total de extratos avaliados. Os 12 extratos ativos sobre α -amilases de *Z. subfasciatus* (ZSA) foram avaliados sobre α -amilases de *A. obtectus* (AOA) e α -amilase salivar humana (ASH). Cinco desses obtiveram atividade semelhante sobre AOA na mesma concentração, sendo obtidos a partir das espécies *Byrsonima crassa*, *Calophyllum brasiliense*, *Kielmeyera coriacea* e *Qualea parviflora* (Tabela 3). Entre os 12 extratos ativos sobre ZSA, observamos ainda que 7 deles inibem entre 50 e 80% tanto AOA quanto ASH. Os extratos hidroetanólicos da casca do caule de *K. coriacea*, madeira do caule de *C. brasiliense* e madeira do caule de *B. crassa* inibiram fortemente a atividade das α -amilases de *Z. subfasciatus*, *A. obtectus* e salivar humana. Esses resultados obtidos a partir da atividade de extratos brutos podem ser valorizados pelo isolamento de compostos puros. Dentre as 11

famílias estudadas, as espécies mais ativas pertencem às famílias Annonaceae, Apocynaceae, Clusiaceae, Vochysiaceae e Malpighiaceae.

Tabela 3. Atividade inibitória dos extratos vegetais sobre α -amilases de *Z. subfasciatus* (ZSA) e *A. obtectus* (AOA) a 1 mg.mL^{-1} e sobre α -amilase salivar humana (ASH) a $125 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Espécie	Órgão vegetal (solvente)	Inibição (%)		
		ZSA (1 mg.mL^{-1})	AOA (1 mg.mL^{-1})	ASH ($125 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$)
<i>Annona crassiflora</i>	F ¹ (e)	86,58 ± 1,89	68,54 ± 9,11	44,75 ± 0,36
<i>Aspidosperma macrocarpon</i>	MR ² (h)	100 ± 5,34	14,69 ± 0,27	0 ± 3,45
<i>Byrsonima crassa</i>	MC ³ (sh)	99,64 ± 6,21	92,41 ± 2,34	95,12 ± 0,44
	CC ⁴ (d)	98,23 ± 1,70	43,07 ± 1,98	62,05 ± 4,79
<i>Calophyllum brasiliense</i>	CC(sh)	96,92 ± 4,15	68,77 ± 6,00	84,03 ± 0,64
	MC(sh)	100 ± 3,39	86,39 ± 3,74	80,63 ± 2,31
	R ⁵ (sh)	99,05 ± 7,30	100 ± 9,57	71,00 ± 1,50
<i>Kielmeyera coriacea</i>	CC(sh)	100 ± 3,28	96,14 ± 4,36	97,09 ± 0,69
<i>Qualea grandiflora</i>	F(sh)	96,42 ± 2,00	62,20 ± 4,71	52,00 ± 1,04
<i>Qualea parviflora</i>	CC(sh)	90,65 ± 2,56	16,60 ± 0,03	11,89 ± 1,55
	CR ⁶ (sh)	90,26 ± 4,59	51,17 ± 6,94	79,67 ± 1,05
	MR(sh)	96,19 ± 1,93	89,33 ± 3,79	78,35 ± 0,50

¹F: Folha, ²MR: Madeira da Raiz, ³MC: Madeira do Caule, ⁴CC: Casca do Caule, ⁵R: Raiz (Madeira + Casca), ⁶CR: Casca da Raiz. Solventes: e: etanol, h: hexano, sh: solução hidroetanólica 90%, d: diclorometano. Os resultados estão representados pelo valor de inibição em % ± desvio padrão da triplicata das amostras testadas.

Os órgãos vegetais que apresentaram maior capacidade de inibição foram principalmente os oriundos de caule e raiz, com 6 e 4 extratos ativos cada, respectivamente. Esse fato pode estar relacionado a uma maior presença de carboidratos nesses órgãos, provocando a necessidade da planta em produzir substâncias capazes de evitar a ação predatória. Foi observada uma predominância de extratos polares com atividade biológica, pois dentre os 12 ativos, 9 foram obtidos a partir da extração com solução hidroetanólica (Tabela 3). A alta polaridade dos extratos testados confere a presença de moléculas que possivelmente são capazes de interagir com as α -amilases de forma mais eficiente. Esses resultados condizem com trabalhos anteriores, cuja atividade inibitória relatada sobre glicosidases e capacidade de precipitação e inibição enzimática está associada a compostos polares, como flavononas (Kim *et al.*, 2006), taninos (Kandra *et al.*, 2004) e outros compostos polifenólicos (Qiang *et al.*, 2006).

Nos testes de determinação do pH ótimo para as duas espécies de insetos utilizadas, foi observado um pico de atividade enzimática para ambas isoformas em meio ácido, mais especificamente pH 5,0. De acordo com a literatura, na ordem Coleoptera o intestino desses insetos no estágio larval apresenta meio fisiológico ácido, com pH ótimo entre 4,5 e 5,5 (Sivakumar *et al.*, 2006). A temperatura ideal para as enzimas do trato digestivo desses insetos-praga é bem descrita, demonstrando seu caráter termolábil, com melhor atividade entre 30 e 40 °C (Gibbs e Alli, 1998). Em nossos estudos, quando testada a manutenção da atividade biológica das amostras após estresse térmico, não ocorreu redução da capacidade inibitória de nenhum dos extratos ativos. Em relação à estabilidade térmica de certos inibidores protéicos, essa geralmente é variável em experimentos nas mesmas condições estabelecidas (Valência-Jimenez *et al.*, 2008).

Com potencial inibitório sobre ZSA entre 99 e 100%, destacaram-se os extratos hidroetanólicos da casca do caule de *Kielmeyera coriacea*, madeira do caule de *Calophyllum brasiliense* e madeira do caule de *Byrsonima crassa*, além do extrato hexânico da madeira da raiz de *Aspidosperma macrocarpon* (Tabela 3). Esses extratos foram capazes de inibir fortemente a hidrólise de amido a 1 mg.mL^{-1} . Para os testes com AOA, foram obtidos valores de inibição entre 14,69% e 100% na mesma concentração de 1 mg.mL^{-1} de extrato, onde o extrato hidroetanólico da raiz de *C. brasiliense* inibiu totalmente a degradação do substrato pela α -amilase de *A. obtectus* (Tabela 3). Valência *et al.* (2000) relataram a inibição de 80% da α -amilase de *Hyppothenemus hampei*, a broca do café, quando utilizado 1 mg do extrato protéico de sementes de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*).

Os estudos realizados na busca por inibidores enzimáticos do estágio larval do inseto *A. obtectus* permitem observar maior resistência das isoformas encontradas no seu trato digestivo. Ishimoto e Chrispeels (1996) demonstraram diferentes mecanismos de resistência para espécies distintas de bruquídeos, utilizando vários inibidores de α -amilase protéicos, como α AI-1 e α AI-2, além de caracterizar a incapacidade de todos eles em inibir a enzima de *A. obtectus*. Também na busca por inibidores potentes, extratos protéicos da semente de *Dipterix alata* foram avaliados e apresentaram inibição sobre α -amilases de *Callosobruchus maculatus* (80%) e de *Anthonomus grandis* (70%), porém não inibiram AOA e a α -amilase pancreática porcina (APP) (Bonavides *et al.*, 2007).

Os extratos ativos sobre ZSA também tiveram sua atividade inibitória avaliada sobre a α -amilase salivar humana (ASH) a $125 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$. O extrato hidroetanólico da casca do caule de *K. coriacea* manteve sua excelente ação sobre a degradação de amido, ainda que em concentrações menores, reduzindo a atividade enzimática de ASH a apenas cerca de 3%

da sua capacidade ótima. O mesmo efeito não foi observado para *A. macrocarpon* e *Q. parviflora*, cujos extratos tiveram grande especificidade para a isoforma de *Z. subfasciatus*.

É interessante ressaltar a especificidade do único extrato ativo nessa polaridade, o extrato hexânico da madeira da raiz de *A. macrocarpon*, que inibiu totalmente a atividade da ZSA e não alterou a atividade da α -amilase salivar humana. Essa especificidade também ocorreu em nível da AOA, que foi inibida em apenas 14% por esse extrato. Podemos destacar ainda o extrato hidroetanólico da casca do caule de *Qualea parviflora*, que inibiu em 90% a ZSA, enquanto apenas 11% sobre a ASH. A compreensão dos mecanismos de inibição para α -amilases de mamíferos e insetos pode ser considerada essencial para a busca de inibidores de alta afinidade e especificidade, com aplicação inclusive na agricultura (Payan, 2004). O estudo de inibidores específicos para aplicação na proteção contra pragas agrícolas preenche um requisito extremamente benéfico quando observa-se um efeito significativamente menor em organismos não-alvo (Franco *et al.*, 2002).

O extrato hidroetanólico da casca do caule de *C. brasiliense* inibiu em 84,03% a ASH, enquanto o extrato hidroetanólico da casca do caule de *K. coriacea* obteve 97,09% de inibição sobre essa enzima e o extrato hidroetanólico da madeira do caule de *B. crassa* restringiu em mais de 95% a atividade amilolítica da ASH (Tabela 3). Estudos anteriores relataram a capacidade de extratos aquoso e etanólico de *Varthemia iphionoides* (Asteraceae) em inibir cerca de 15 e 21% de APP a $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Al-Dabbas *et al.*, 2006), enquanto um extrato de *Phaseolus coccineus*, rico em proteínas foi testado sobre ASH e APP, inibindo completamente as isoformas de mamíferos a $50 \mu\text{g.}\mu\text{L}^{-1}$ (Valencia-Jimenez *et al.*, 2008).

Neste trabalho, a observação de valores de inibição relevantes sobre ASH, às vezes até mais importantes que sobre as α -amilases de *A. obtectus* coincidem com relatos da

susceptibilidade da α -amilase humana. Em efeito, as adaptações progressivas dos insetos-praga às defensinas vegetais (Franco *et al.*, 2002; Rekha *et al.*, 2004) levam a alterações evolutivas que são observadas na comparação das sequências de resíduos de aminoácidos da α -amilase salivar humana e de *Z. subfasciatus*, que possuem apenas cerca de 50% de identidade e 71% de similaridade (Grossi-de-Sá e Chrispeels, 1997).

Objetivando-se o estudo do perfil inibitório desses extratos vegetais, foi determinada a concentração dos extratos ativos capaz de inibir 50% (IC_{50}) da capacidade enzimática de ZSA e AOA (Tabela 4). Dos 12 extratos testados, 5 apresentaram valores significativos de inibição entre 196 e 110 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Foi possível observar uma seletividade de inibição sobre ZSA, pois os menores valores de IC_{50} foram observados para *Z. subfasciatus*. Iulek *et al.* (2000) demonstraram esse comportamento seletivo do inibidor cereal BIII em relação à atividade sobre AOA. Esse inibidor, purificado, reduziu em 52% a ação de APP a 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e na mesma concentração inibiu em 79% a AOA e 85% a ZSA.

O extrato hidroetanólico da casca do caule de *K. coriacea* inibiu expressivamente a enzima, com valores de IC_{50} de 110,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para ZSA e 272,12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para AOA. O extrato hidroetanólico da raiz de *C. brasiliense* também apresentou inibição bem promissora, com IC_{50} de 131,37 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para ZSA e 257,18 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para AOA. A expressividade desses valores pode ser compreendida quando comparamos com estudos recentes que testaram frações protéicas de sementes de *Pterodon pubescens* (Fabaceae), com 65% de inibição sobre α -amilase de *C. maculatus* a 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e um inibidor protéico isolado de sementes de papaia, cujo IC_{50} foi aproximadamente 49 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Silva *et al.*, 2007).

Tabela 4. Concentração dos extratos ativos capaz de inibir 50% (IC₅₀) as α -amilases de *Z. subfasciatus* e de *A. obtectus*.

Espécie	Órgão vegetal (solvente)	IC ₅₀ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	
		<i>Z. subfasciatus</i>	<i>A. obtectus</i>
<i>Annona crassiflora</i>	F ¹ (e)	802,67	546,25
<i>Aspidosperma macrocarpa</i>	MR ² (h)	755,42	> 1000
<i>Byrsonima crassa</i>	MC ³ (sh)	167,90	486,58
	CC ⁴ (d)	567,82	> 1000
<i>Calophyllum brasiliense</i>	CC(sh)	151,97	523,88
	MC(sh)	196,00	400
	R ⁵ (sh)	131,37	257,18
<i>Kielmeyera coriacea</i>	CC(sh)	110,00	272,12
<i>Qualea grandiflora</i>	F(sh)	646,98	699,04
<i>Qualea parviflora</i>	CC(sh)	480,16	> 1000
	CR ⁶ (sh)	210,02	1000
	MR(sh)	267,28	282,19

¹F: Folha, ²MR: Madeira da Raiz, ³MC: Madeira do Caule, ⁴CC: Casca do Caule, ⁵R: Raiz (Madeira + Casca), ⁶CR: Casca da Raiz. Solventes: e: etanol, h: hexano, sh: solução hidroetanólica 90%, d: diclorometano. Os resultados estão representados pela concentração responsável pela inibição de 50% da atividade enzimática. Os testes foram realizados em triplicata.

A busca por novos inibidores enzimáticos, como alternativa no controle de insetos-praga, vem estimulando cada vez mais a realização de estudos para o uso de técnicas

transgênicas de inserção de genes de resistência a insetos, ou ainda para o desenvolvimento de bioinseticidas específicos (Murad *et al.*, 2007). Esses resultados obtidos de atividade de extratos vegetais de plantas do Cerrado sobre α -amilases de insetos e mamíferos podem contribuir com as perspectivas de novas estratégias no controle de pragas, observando ainda a especificidade dos possíveis inibidores sobre as enzimas-alvo. O isolamento dos compostos responsáveis pela inibição, por meio de fracionamento químico biomonitorado, associado a estudos de interação inibidor-enzima, fornecerá maiores informações que permitirão conhecer novos meios de proteção contra insetos.

O extrato hidroetanólico da casca do caule de *K. coriacea* foi selecionado para estudo químico-biológico devido ao seu forte perfil inibitório sobre α -amilase salivar humana (ASH), atingindo mais de 95% de inibição a $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Esse extrato apresentou maior especificidade para a isoforma humana dessa enzima, já que nas concentrações de 110,00 e $272,12 \mu\text{g.mL}^{-1}$ inibiu, respectivamente, 50% da atividade de α -amilases dos insetos-praga *Z. subfasciatus* e *A. obtectus*. Assim, o estudo químico do extrato hidroetanólico da casca do caule de *K. coriacea* foi monitorado sobre α -amilase salivar humana.

O estudo químico foi iniciado por meio da separação líquido-líquido (Figura 21). A partição de 6 g de extrato bruto forneceu cinco fases de acordo com a afinidade química das substâncias pelos diferentes solventes utilizados. Durante esse processo de separação, a adição de hexano à amostra dissolvida em metanol formou duas fases orgânicas, além de um precipitado cristalino e avermelhado quando seco, parcialmente solúvel em metanol ou água, recuperado como fase 1 (2,09 g). A fase hexânica foi recuperada e denominada fase 2 (0,11 g). A continuação do processo de partição forneceu ainda a fase clorofórmica, denominada fase 3 (0,625 g), a de acetato de etila, denominada fase 4 (0,02 g) e por fim a

fase hidrometanólica, fase 5 (3,08 g) (Figura 21), de aspecto vermelho e forma semelhante à porção insolúvel inicial.

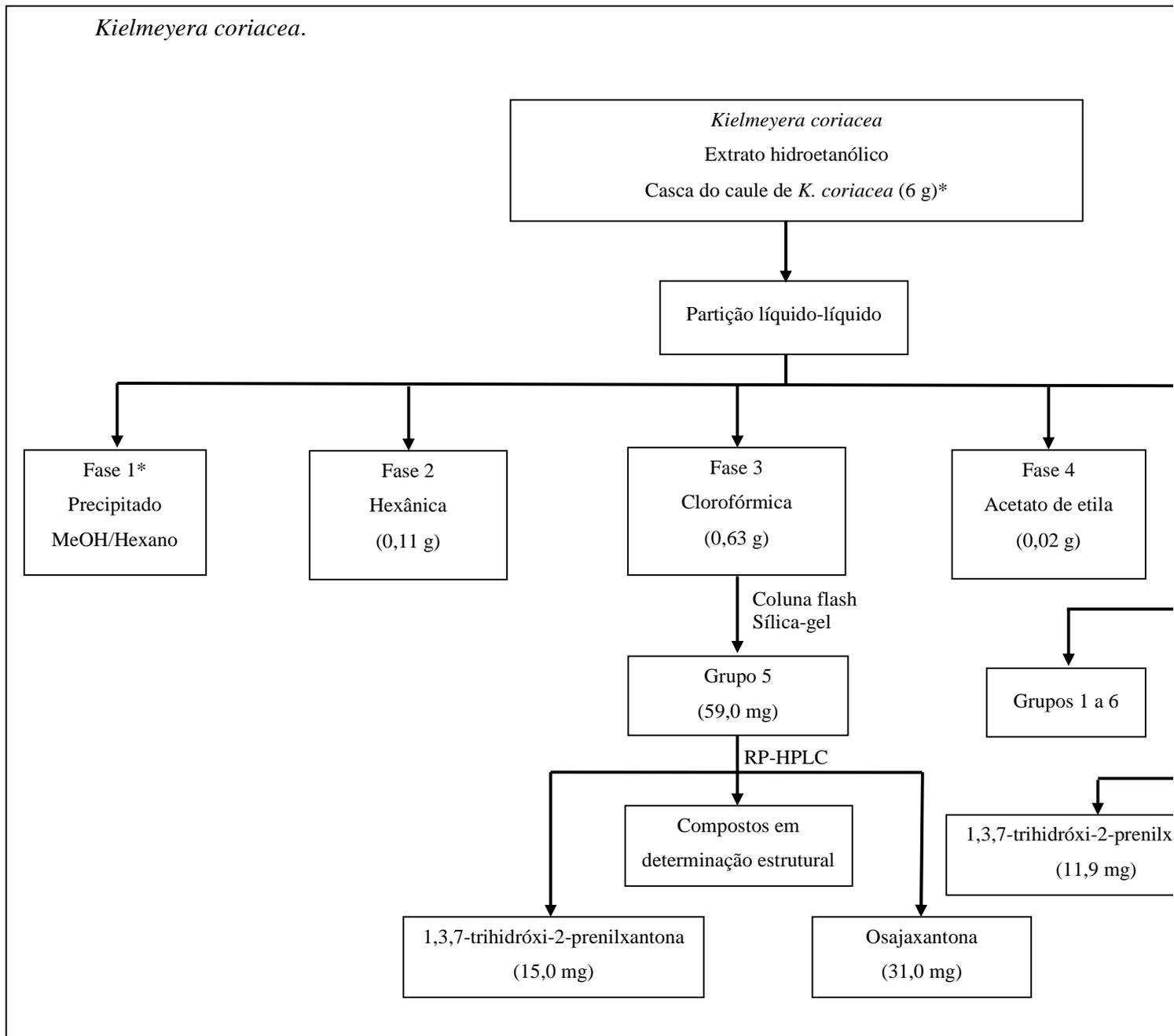
As fases 2 e 3 não mostraram atividade relevante sobre α -amilase salivar humana (ASH) a $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto a fase 4 demonstrou uma maior capacidade de inibição, atingindo 63,55% de redução da capacidade enzimática. As fases de maior rendimento, 1 e 5, mais polares, demonstraram a presença de potentes inibidores, atingindo 99,35 e 96,35% de inibição, sobre α -amilase salivar humana (Tabela 5).

Tabela 5. Inibição da α -amilase salivar humana (ASH) pelas diferentes fases obtidas da partição líquido-líquido do extrato hidroetanólico da casca do caule de *Kielmeyera coriacea*.

Fase	Descrição	Atividade a $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (%) ^a	Rendimento g (%)
1	Precipitado MeOH/hexano	$99,35 \pm 0,26$	2,09 (34,83)
2	Fase hexânica	$7,58 \pm 0,96$	0,11(1,83)
3	Fase clorofórmica	$13,55 \pm 1,46$	0,625 (10,42)
4	Fase acetato de etila	$63,55 \pm 0,45$	0,02 (0,33)
5	Fase MeOH/água	$96,35 \pm 0,78$	3,08 (51,33)
6	Extrato hidroetanólico	$98,60 \pm 0,68$	6 (100)

^aResultados de inibição expressos em porcentagem \pm desvio padrão das triplicatas de cada teste.

Figura 21. Fracionamento químico do extrato hidroetanólico da casca do caule de *Kielmeyera coriacea*.



* Acompanhamento da atividade inibitória sobre α -amilase salivar humana.

O conteúdo de fenóis totais das fases da partição líquido-líquido e do extrato bruto hidroetanólico da casca do caule de *K. coriacea* foi analisado pela técnica de Hagerman Butler (1978) e estão dispostos na Tabela 6. As fases responsáveis pela importante ação biológica, fases 1 e 5, demonstraram ser constituídas por um forte teor de compostos fenólicos, com presença expressiva de taninos. Os resultados encontrados dessas fases sobre ASH permitem relacionar a ligação entre a concentração dessas substâncias e a capacidade de inibição enzimática. A fase 1, precipitado metanol/hexano, que inibiu mais de 99% a ASH, apresentou basicamente apenas compostos polifenólicos, com 1 mg.mL^{-1} equivalente de ácido tânico, sendo 53,56% de taninos totais. A fase 5, metanol/água, que inibiu mais de 96% a ASH, continha cerca de $0,95 \text{ mg.mL}^{-1}$ de compostos fenólicos, dos quais aproximadamente 35,96% são taninos (Tabela 6). As fases 2 e 3, hexânica e clorofórmica, não foram solúveis em metanol/água (1:1) para a realização dos experimentos de dosagem de compostos fenólicos e taninos totais.

Os taninos têm propriedade de complexação com proteínas em diversos graus, o que confere uma capacidade variável de inibição enzimática (Zajác *et al.*, 2007). Portanto, há estudos relatando a atividade desses compostos sobre diversas enzimas, como os taninos hidrolizáveis e condensados, ativos sobre a xantina-oxidase, os elagitaninos ativos sobre a proteína kinase C e as proantocianidinas, que são taninos condensados, com capacidade inibitória sobre a enzima conversora de angiotensina (ECA) (Zajác *et al.*, 2007). Com base nessas propriedades dos taninos sobre enzimas, McDougall *et al.* (2005) estudaram o potencial inibitório de extratos aquosos de frutos de *Fragaria ananasia* (Rosaceae), *Vaccinium corymbosum* (Ericaceae), *Ribes nigrum* (Grossulariaceae) e *Rubus idaeus* (Rosaceae) sobre α -amilase salivar humana, α -amilase pancreática porcina (APP) e α -glucosidase. Os extratos dos frutos de *F. ananasia* e *R. idaeus*, ricos em taninos,

apresentaram mais de 70% de inibição de ASH utilizando-se 50 µg de fenóis totais e 50% de inibição de APP com 100 µg de fenóis totais.

Tabela 6. Teor de compostos fenólicos e taninos das fases da partição líquido-líquido do extrato hidroetanólico da casca do caule de *Kielmeyera coriacea*.

Fração	Compostos fenólicos totais (mg.mL ⁻¹ eq. ác. tânico) % ^a	Taninos totais (mg.mL ⁻¹ eq. ác. tânico) % ^b
1	1,00 (100 ± 2,54)	0,54 (53,56 ± 0,38)
2	- ^c	-
3	-	-
4	0,36 (35,56 ± 5,31)	0,15 (15,02 ± 0,65)
5	0,95 (94,91 ± 6,31)	0,36 (35,96 ± 0,60)
6	1,00 (100 ± 3,11)	0,75 (74,52 ± 0,25)

^a % de compostos fenólicos totais em mg.mL⁻¹ equivalente de ácido tânico. ^b % de taninos totais em mg.mL⁻¹ equivalente de ácido tânico. ^c fases não solúveis em metanol água (1:1) para a realização dos testes.

Em estudos com frações ricas em taninos extraídas de *Garcinia mangostana* (Clusiaceae) sobre α-amilase pancreática porcina, Loo *et al.* (2007) sugerem que a interação entre enzimas e compostos polifenólicos tem caráter específico, onde essa ligação dependeria mais da estrutura e não apenas do teor encontrado. Se considerarmos essa possibilidade para nossos resultados, a concentração de polifenóis na fase 1 (1,00 mg.mL⁻¹)

e 5 (0,95 mg.mL⁻¹), assim como a concentração de taninos totais (0,54 e 0,36 mg.mL⁻¹, respectivamente) explicam apenas parcialmente o potencial inibitório dessas fases.

Embora a metodologia de doseamento de taninos totais utilize o ácido tânico como composto referência, esse ácido, constituinte vários taninos hidrolisáveis (ésteres formados a partir de ácidos e açúcares), apresenta, segundo a literatura, baixa capacidade de inibição de α -amilase pancreática porcina, com IC₅₀ de 305,7 μ g.mL⁻¹ (Loo *et al.*, 2007). As fases obtidas nesse trabalho apresentaram alta concentração de compostos fenólicos, particularmente taninos quantificados pelo método de Hagerman & Butler (1978). Foram feitas análises preliminar em HPLC e RMN ¹H sobre as fases ativas 1 e 5, é possível sugerir que há um elevado grau de polimerização e diversos grupos hidroxila, que poderiam possivelmente estar relacionados à presença de taninos (Fu *et al.*, 2007).

A técnica de Infravermelho (FT-IR) tem sido utilizada para diferenciar taninos condensados de taninos hidrolisáveis. Bandas de absorção a aproximadamente 1285 cm⁻¹ são associadas a grupos químicos C-O em anéis pirano-derivados, sendo possível observar esse sinal em taninos condensados (Edelmann e Lendl, 2002). Em espectros de taninos hidrolisáveis, essa banda não pode ser observada, portanto, nos dados FT-IR obtidos no nosso trabalho a partir das fases 1 e 5 (Anexo III), com sinais em 1283,41 e 1286,66 cm⁻¹, respectivamente, corroboram a hipótese de presença de taninos condensados ativos sobre α -amilase. Também temos picos intensos a 3422,01 cm⁻¹ para a fase 1 e 3412,06 cm⁻¹ para a fase 5, relacionados à deformação axial de grupos O-H de fenóis e álcoois (Silverstein *et al.*, 2005), informações que estão de acordo com a análise preliminar de RMN ¹H, em que foi observada a presença de diversos grupos hidroxila. Bandas de absorção bem características de carbonilas conjugadas, C=O, foram observadas nessas fases a

aproximadamente 1615 cm^{-1} em ambas fases, 1 e 5, sinal que poderia estar relacionado a presença de xantonas (Loo *et al.*, 2007).

A fase 5, metanol/água, que apresentou potencial inibitório bem alto, foi selecionada para dar prosseguimento ao estudo químico-biológico. A realização de uma coluna cromatográfica de sephadex LH-20 permitiu obter 11 grupos reunidos pelo monitoramento em CCD (Tabela 7).

Tabela 7. Grupos obtidos do fracionamento da fase 5, metanol/água, oriunda da partição líquido-líquido do extrato hidroetanólico da casca do caule de *K. coriacea*, em coluna cromatográfica aberta de sephadex LH-20 e % de inibição sobre α -amilase salivar humana (ASH) a $125\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Grupo	Fração ^a	Massa (mg)	Rendimento (%)	Atividade sobre ASH ($125\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$) (%)
1	F 1	3,1	0,24	4,89
2	F 2-3	8,6	0,65	0,00
3	F 4	8,3	0,63	6,24
4	F 5	21,6	1,64	8,95
5	F 6-10	147,5	11,19	4,50
6	F 11-12	58,2	4,42	2,37
7	F 13-18	182,9	13,88	65,16
8	F 19-21	40,1	3,04	79,75
9	F 22-32	72,8	5,52	88,36
10	F 33-37	25,6	1,94	95,24
11	F 38-165	156,3	11,86	99,00
Total		725	55,01	

Foram aplicados 1,308g da fase metanol/água na coluna. Eluente utilizado para fracionamento: metanol 100%.

Com a avaliação desses grupos sobre ASH, foi possível observar um aumento gradual de atividade, sendo os últimos grupos os maiores responsáveis pela ação anti-amilolítica. Os grupos 1 a 6 apresentaram capacidade de inibição irrelevante a $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$. São os grupos que continham substâncias com fraca interação com α -amilase, devido aos baixos valores de inibição encontrados. Os grupos 7, 8 e 9 apresentaram um aumento significativo de atividade, atingindo de 65,16 a 88,36% de inibição. Os dois últimos grupos concentraram as substâncias ativas, pois há inibidores no grupo 10 capazes de inibir em 95,24% a ASH, enquanto o grupo 11 mostrou atividade ainda maior, com 99,00% de inibição. Este grupo, obtido da porção adsorvida à resina, atingiu ainda 82% de inibição a apenas $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e apresentou ser constituído por 81,03% taninos. A ligação desses grupos à coluna de sephadex e sua coloração característica rósea em cromatografia de camada delgada (CCD) também corroboram a rica presença de taninos (Hagerman, 2002; Dixon *et al.*, 2005; Haslam 2007).

O grupo 7 (Tabela 7), quando ressuspendido em metanol, formou um precipitado amarelo intenso, parcialmente solúvel em AcOEt. Esse material foi recuperado e aplicado em um cromatógrafo líquido de alta eficiência com coluna reversa (RP-HPLC), permitindo o isolamento de osajaxantona (5,0 mg), previamente isolada de *Maclura pomifera* (Moraceae) (Wolfrom *et al.*, 1965) e 1,3,7-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona (11,9 mg), isolada de *Garcinia forbesii* (Clusiaceae) (Harrison *et al.*, 1993) (Figura 19). Essas duas xantonas não apresentaram potencial inibitório sobre ASH.

O fracionamento em coluna cromatográfica aberta de sílica gel da fase clorofórmica (fase 3), forneceu 14 grupos (Tabela 8). O grupo 5 (59,0 mg), formado pelas frações 18-21, possibilitou o isolamento das xantonas preniladas, igualmente encontradas na fase 5

(metanol/água), osajaxantona (31,0 mg) e 1,3,7-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona (15,0 mg), além de outros 2 compostos, que estão em fase de determinação estrutural.

Tabela 8. Grupos obtidos do fracionamento da fase clorofórmica (fase 3) oriunda da partição líquido-líquido do extrato hidroetanólico da casca do caule de *K. coriacea*, em coluna cromatográfica aberta de sílica-gel.

Grupo	Fração	Eluente	Massa (mg)	Rendimento (%)
1	F 1-8	Hexano/CHCl ₃ ^a (50:50)	10,1	1,616
2	F 9-11	Hexano/CHCl ₃ (50:50)	20	3,2
3	F 12-15	Hexano/CHCl ₃ (50:50) Hexano/CHCl ₃ (30:70)	25,5	4,08
4	F 16-17	Hexano/CHCl ₃ (30:70) Hexano/CHCl ₃ (15:85)	25,9	4,144
5	F 18-21	Hexano/CHCl ₃ (15:85) CHCl ₃ puro	59	9,44
6	F 22-23	CHCl ₃ puro	14	2,24
7	F 24-25	CHCl ₃ puro CHCl ₃ /AcOEt (90:10)	24,9	3,984
8	F 26-27	CHCl ₃ /AcOEt (90:10) CHCl ₃ /AcOEt (50:50)	52,4	8,384
9	F 28-29	CHCl ₃ /AcOEt (50:50)	12,4	1,984
10	F 30-31	CHCl ₃ /AcOEt (50:50)	11,3	1,808
11	F 32-34	CHCl ₃ /AcOEt (50:50)	8,5	1,36
12	F 35-37	CHCl ₃ /AcOEt (50:50) AcOEt ^b puro	6,5	1,04
13	F 38-39	AcOEt puro	18,7	2,992
14	F 40-41	Metanol puro	70,5	11,28
Total			359,7	57,552

Foram aplicados 625,0 mg da fase clorofórmica. ^a CHCl₃: Clorofórmio, ^b AcOEt: Acetato de etila.

A osajaxantona foi isolada anteriormente em *K. coriacea* a partir do extrato de caule e folhas em hexano-acetato de etila (4:1) e teve sua atividade sobre *Schistosoma mansoni* descrita (Lopes *et al.*, 1977). A 1,3,7-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona é relatada na literatura pela atividade antimicrobiana sobre *Bacillus subtilis*, apresentando uma Concentração Inibitória Mínima (CIM) de $12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Cortez *et al.*, 2002).

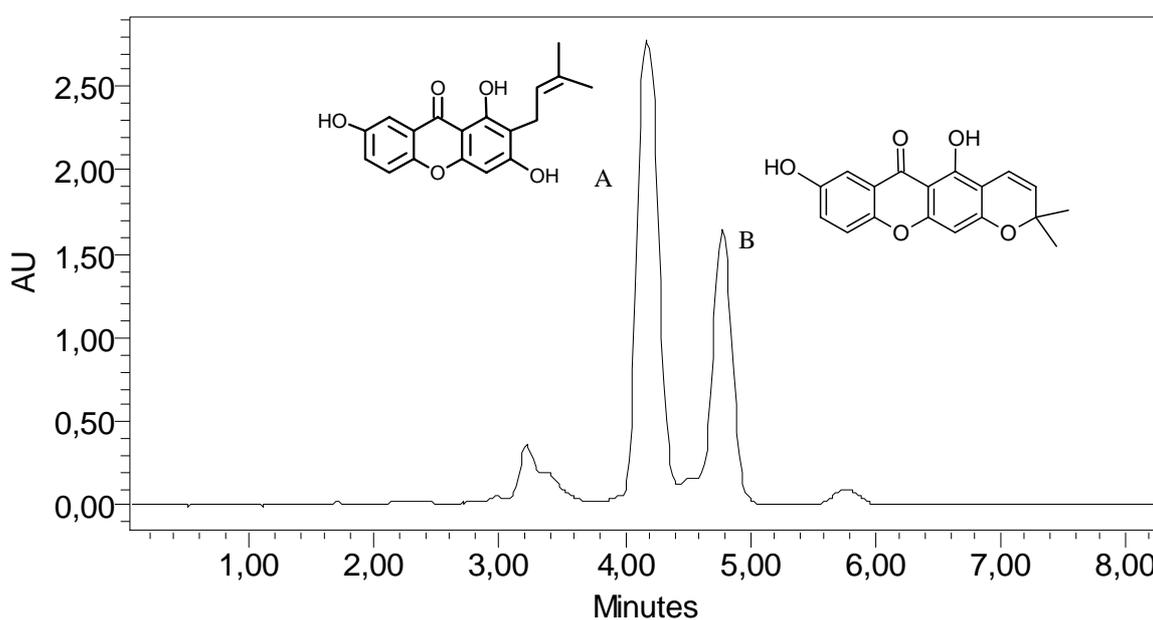


Figura 22. Cromatograma obtido em RP-HPLC, demonstrando os picos dos compostos osajaxantona (A) e 1,3,7-trihidroxi-2-prenilxantona (B) isolados em $\text{H}_2\text{O.TFA } 0,2\% / \text{CH}_3\text{CN} - 10:90 \text{ v:v}$.

A inibição de 82% da ASH encontrada na análise do grupo 11, obtido a partir do fracionamento em coluna aberta de sephadex LH-20 (Tabela 7), a $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pode ser comparada a outros estudos. Polifenóis do chá verde chinês comercial (*Camellia sinensis*) testados por He *et al.* (2006) foram relatados pelo potencial de inibir 61% da ASH na mesma concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Extratos aquosos e etanólicos de *V. iphionoides*

tiveram seu potencial avaliado sobre α -amilase pancreática porcina, demonstrando cerca de 14,8 e 21,2% de inibição a $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente, pelo método de iodeto-amido também utilizado neste trabalho. Metóxiflavonas isoladas dessa espécie inibiram 42% da atividade a $149,95 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Al-Dabbas *et al.*, 2006).

Embora os taninos sejam compostos que se ligam a proteínas, os mecanismos envolvidos na interação química entre ambos ainda é parcialmente compreendida. Hagerman (2002) mostra que a reação de taninos com proteínas, em condições específicas de pH e força iônica permite a complexação entre essas moléculas. Uma das relações sugerida é a grande presença de grupos hidroxila na posição *orto*-fenol dos taninos, que pode estar associada às suas atividades biológicas (Haslam, 2007). Nos taninos hidrolisáveis esse aspecto está representado principalmente pelos resíduos de ácidos gálico e elágico, enquanto nos taninos condensados os grupos hidroxila do anel B e os ésteres de galato desempenham esse papel. Considera-se ainda que pelo menos em parte, a atividade biológica atribuída a esses compostos seja possível devido à concentração dos grupos *orto*-fenólicos e sua distribuição espacial (Schofield *et al.*, 2001).

Schafer e Hogger (2007) relataram um potencial inibitório do Pycnogenol[®], um extrato padronizado da casca do caule de pinheiro marinho (*Pinus maritima*), sobre α -glucosidase, ainda maior que o da acarbose. Os autores observaram ainda que os compostos diméricos e triméricos presentes no Pycnogenol[®] foram menos ativos que os tetrâmeros e procianidinas maiores; assim como as fases e grupos ativos do nosso trabalho possuem alto grau de polimerização. Em geral, os inibidores não protéicos de α -amilase e α -glucosidase, mais estudados para o tratamento de obesidade e diabetes, são moléculas de baixo peso molecular (Franco *et al.*, 2002). Esse grupo inclui aminoligossacarídeos como acarbose, adiposinas, amilostatinas, oligostatinas e trestatinas (Geng e Baia, 2008), Portanto, é

interessante observar o elevado potencial inibitório das fases 1 e 5 (Tabela 5) e grupos 10 e 11 (Tabela 7), constituídos por compostos de alto peso molecular. O estudo dos possíveis mecanismos de ação destes compostos pode trazer novas possibilidades de formas de ligação e explicar a reação entre taninos e enzimas digestivas (Schafer e Hogger, 2007). Além de permitir alternativas na inibição de α -amilases que possam auxiliar no tratamento de diabetes e obesidade (He *et al.*, 2006, Loo *et al.*, 2007).

A triagem de extratos brutos de *K. coriacea* permitiu observar que apenas os extratos hidroetanólicos, portanto mais polares, apresentam capacidade inibitória sobre α -amilase salivar humana. De acordo com as informações que obtivemos até o momento, este é o primeiro estudo sobre a atividade anti-amilolítica de componentes da planta. Obici *et al.* (2008) relatam dados preliminares da toxicidade aguda e crônica do extrato diclorometânico do caule de *K. coriacea*, sendo observados valores de DL_{50} maiores que 500 mg.kg^{-1} e 1 g.kg^{-1} , respectivamente. Esses altos valores de DL_{50} permitem inferir que este extrato possui uma ampla margem de segurança. Porém, não há dados disponíveis sobre a toxicidade e citotoxicidade de extratos mais polares de *K. coriacea*. Portanto, estudos são necessários para determinar a segurança desses extratos e dos taninos presentes. Alguns estudos buscam maior conhecimento sobre as propriedades citoprotetoras, anti-infecciosas e toxicológicas de taninos (Marles *et al.*, 2003; McDougall *et al.*, 2005), porém a alta complexidade desses compostos, o grau de polimerização e a distribuição de grupos fenóis na molécula requerem pesquisas mais aprofundadas (Schofield *et al.*, 2001).

Informações da literatura científica sugerem que proantocianidinas possuem potencial para o tratamento de diabetes e obesidade (Tomaru *et al.*, 2007) devido à capacidade de inibição de enzimas digestivas e sua atividade antioxidante (Lee *et al.*, 2007, Li *et al.*, 2007, Ho *et al.*, 2007). Essas vantagens permitiriam o controle da captação de carboidratos e

também a redução do estresse oxidativo presente no diabetes (Lee *et al.*, 2007; Tomaru *et al.*, 2007). O uso de diversas plantas na medicina tradicional para o tratamento do diabetes é bem antigo e gradualmente dados científicos vêm comprovando algumas dessas aplicações (Schafer e Hogger, 2007). Nesse aspecto, existem várias plantas com potencial para o desenvolvimento de fármacos anti-diabéticos. O agente hipoglicemiante metformina foi desenvolvido a partir de uma biguanida derivada de guanidinas da planta *Galega officinalis* (Fabaceae) (Vuksan e Sievenpiper, 2005).

Na maioria dos casos, os componentes dos extratos ativos ainda não estão identificados e o histórico de efeitos hipoglicêmicos permanece em estudo (Vuksan & Sievenpiper, 2005). Metabólitos secundários de plantas têm apresentado vários mecanismos, como a estimulação de vias de sinalização de insulina, aumento da secreção de insulina, inibição da concentração de corticosteróides e inibição da produção endógena de glicose (Schafer e Hogger, 2007). A inibição de enzimas digestivas também têm sido relatada para a ação anti-diabética de várias plantas (Kim *et al.*, 2005). Inclusive o mecanismo de dois fármacos utilizados no controle glicêmico do diabetes, a acarbose e o miglitol, é a inibição da enzima digestiva α -glucosidase. No entanto, esses inibidores causam sério desconforto gastrointestinal. Portanto, plantas com propriedades inibitórias sobre enzimas digestivas podem ter o potencial de reduzir a hiperglicemia pós-prandial, permitindo alternativas para terapias adjuvantes em combinação com outros hipoglicemiantes orais (Van de Laar *et al.*, 2005).

5. Conclusões

A triagem do Banco de Extratos de Plantas do Bioma Cerrado do Laboratório de Farmacognosia/UnB sobre α -amilases do inseto *Zabrotes subfasciatus* resultaram na seleção de 12 extratos ativos a 1 mg.mL^{-1} para estudo do perfil inibitório. Foi determinada a concentração inibitória de 50% da capacidade enzimática (IC_{50}) para as isoformas de α -amilase de *Zabrotes subfasciatus* e *Acanthoscelides obtectus*. Esses 12 extratos foram avaliados sobre α -amilase salivar humana a $125 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ e o extrato hidroetanólico da casca do caule de *Kielmeyera coriacea* foi selecionado para estudo químico-biológico devido ao seu forte perfil inibitório, pois apresentou IC_{50} de 110,00 e $272,12 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ sobre α -amilases de *Zabrotes subfasciatus* e *Acanthoscelides obtectus*, respectivamente. O extrato apresentou 97,09% de inibição a $125 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ sobre α -amilase salivar humana.

O fracionamento químico biomonitorado foi realizado com 6 g de extrato bruto. Foram obtidas 5 fases do processo de partição líquido-líquido de acordo com a afinidade das substâncias pelos solventes utilizados. Cada fase foi testada sobre α -amilase salivar humana e foi selecionada a fase metanol/água, denominada fase 5, para fracionamento devido ao potencial inibitório de 96,35% e a fase 1, que apresentou 99,35% de atividade inibitória sobre α -amilase salivar humana. Foi possível obter 11 grupos da fase 5, reunidos por cromatografia em camada delgada, que foram avaliados sobre α -amilase salivar humana. Os mais ativos foram o grupo 10, capaz de inibir 95,24% da enzima, e o grupo 11, com 99,00% de inibição a $125 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$. O grupo 11, atingiu ainda 82% de inibição sobre a α -amilase salivar humana a apenas $50 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$.

O conteúdo de fenóis totais e taninos totais das fases da partição líquido-líquido, do extrato bruto e dos grupos 10 e 11, obtidos do fracionamento da fase metanol/água (5), foi

analisado. As fases mais ativas, fases 1 e 5, demonstraram ser constituídas por um forte teor de compostos fenólicos, com 1 mg.mL^{-1} e $0,95 \text{ mg.mL}^{-1}$ de polifenóis, respectivamente. Foi observada a presença de 53,56% de taninos na fase 1, enquanto a fase 5 apresentou 35,96%. O grupo 11 apresentou ser constituído por 81,03% de taninos.

A partir do fracionamento da fase 5 foram obtidas ainda as xantonas 1,3,7-trihidroxil-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona e osajaxantona, porém não apresentaram nenhuma atividade relevante sobre α -amilases. Essas xantonas foram isoladas também a partir da fase clorofórmica da partição líquido-líquido, além de outros compostos com determinação estrutural em andamento.

Os grupos ricos em taninos avaliados sobre α -amilase salivar humana demonstraram atividade promissora na inibição de captação de carboidratos como alternativa para o controle do diabetes e obesidade.

6. Perspectivas

- Prosseguir o fracionamento químico da fase 1 e dos grupos 10 e 11, obtidos na fase 5, a fim de isolar os compostos responsáveis pela atividade inibitória sobre α -amilases
- Determinar as estruturas das substâncias ativas por técnicas espectrométricas de ressonância magnética nuclear (RMN) de uma dimensão (1D) (^1H e ^{13}C) e bidimensional (2D) (COSY, HSQC, HMBC, NOESY), infra-vermelho, ultra-violeta e espectrometria de massa
- Obter a IC_{50} dos compostos isolados sobre as três isoformas de α -amilases
- Avaliar o potencial inibitório dos extratos e compostos isolados sobre outras fontes de α -amilase
- Testar a estabilidade do inibidor purificado em condições fisiológicas

7. Referências Bibliográficas

AGUILAR-BRYAN, L.; NICHOLS, C.G.; WECHSLER, S.W.; CLEMENT, J.P. 4TH; BOYD, A.E. 3RD; GONZALEZ, G.; HERRERA-SOSA, H.; NGUY, K.; BRYAN, J.; NELSON, D.A. Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. **Science**, v. 268, p. 423–426 1999.

AL-DABBAS, M.M.; KITAHARA, K.; SUGANUMA, T.; HASHIMOTO, F.; TADERA, K. Antioxidant and alpha-amylase inhibitory compounds from aerial parts of *Varthemia iphionoides* Boiss. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v. 70, n. 9, p. 2178-2184, 2006.

ALVES, T.M.A.; SILVA, A.F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T.S.M.; SMÂNIA, E.F.; SMÂNIA, J.R.A.; ZANI, C.L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 367–373, 2000.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of *diabetes mellitus*. **Diabetes Care**, v. 31, n. 1, p. S55-S60, 2008.

ANDRADE, M.S.; SAMPAIO, T.S.; NOGUEIRA, P.C.L.; RIBEIRO, A.S.; BITTRICH, V.; AMARAL M.C.E. Volatile compounds of leaves, flowers and fruits of *Kielmeyera rugosa* Choisy (Clusiaceae). **Flavour and Fragrance Journal**, v. 22, n. 1, p. 49-52, 2006.

AUDI, E.A.; OTOBONE, F.; MARTINS, J.V.C.; CORTEZ, D.A.G. Preliminary evaluation of *Kielmeyera coriacea* leaves extract on the central nervous system. **Fitoterapia**, v. 73, p. 517–519, 2002

BARROSO, G.M. Sistemática de angiospermas do Brasil. São Paulo: EDUSP, v. 1, 1978. 139p.

BELLINCAMPI, D.; CAMARDELLA, L.; DELCOUR, J.A.; DESSEAUX, V.; D’OVIDIO, R.; DURAND, A.; ELLIOT, G.; GEBRUES, K.; GIOVANE, A.; JUGE, N. Potential physiological role of plant glycosidase inhibitors. **BBA - Proteins & Proteom.**, v. 1696, p. 265-274, 2004.

BERNFELD, P. Amylases α and β . **Methods Enzymol.**, v. 1, p. 149-154, 1955.

BO-LIN, G.W.; SANTANA, C.A.; MORAWSKI, S.G.; FORDTRAN, J.S. Starch-blokers – their effect on calorie absorption from high-starch meal. **N. Eng. J. Med.**, v. 307, n. 23, p. 1413-1416, 1982.

BONAVIDES, K.B.; PELEGRINI, P.B.; LAUMANN, R.A.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; BLOCH, JR.C.; MELO, J.A.T.; QUIRINO, B.F.; NORONHA, E.F.; FRANCO, O.L. Molecular identification of four different α -amylase inhibitors from baru (*Dipteryx alata*) seeds with activity toward insect enzymes. **J. Biochem.Mol. Biol.**, v. 40, n. 4, p. 494-500, 2007.

BORLAUG, N.E. Feeding a world of 10 billion people: the miracle ahead. In: R. Bailey (ed.). Global warming and other eco-myths. Roseville (EUA): **Competitive Enterprise Institute**, p. 29-60, 2002.

BRANNSTROM, C.; JEPSON, W.; FILIPPI, A.M.; REDO, D.; XU, Z.; GANESH, S. Land change in the Brazilian Savanna (Cerrado), 1986–2002: Comparative analysis and implications for land-use policy. **Land Use Policy**. In press, doi:10.1016/j.landusepol.2007.11.008, 2008.

CAMPBELL, A. Glycaemic control in type 1 diabetes. **Clinical Evidence**, 2006a. Disponível em: <<http://clinicalevidence.bmj.com/ceweb/index.jsp>>. Acesso em 16 janeiro 2008.

CAMPBELL A. Glycaemic control in type 2 diabetes. **Clinical Evidence**, 2006b. <<http://clinicalevidence.bmj.com/ceweb/index.jsp>>. Acesso em 16 janeiro 2008.

CHAN, J.L.; ABRAHAMSON, M.J. Pharmacological management of type 2 *diabetes mellitus*: Rationale for rational use of insulin. **Mayo. Clin. Proc.**, v. 78, p. 459-467, (2003).

CORTEZ, D.A.G. ABREU-FILHO, B.A.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Antibacterial activity of a biphenyl and xanthenes from *Kielmeyera coriacea*. **Pharm. Biol.**, v. 40, n. 7, p. 485-489, 2002.

CORTEZ, D.A.G.; YOUNG, M.C.M.; MARSTON, A.; WOLFENDER, J.-L.; HOSTETTMANN, K. Xanthenes, triterpenes and biphenyl from *Kielmeyera coriacea*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 7, p. 1367-1374, 1998.

CRUZ, F.G.; MOREIRA, L.M.; DAVID, J.M.; GUEDES, M.L.S.; CHAVEZI, J.P. Coumarins from *Kielmeyera reticulata*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 7, p. 1363-1366, 1998a.

CRUZ, F.G.; SANTOS, N.A.S.; DAVID, J.M.; GUEDES, M.L.S.; CHÁVEZ, J.P. Coumarins from *Kielmeyera argentea*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 4, p. 703-706, 1998b.

DAVIS, S.N. (2006). Insulin, oral hypoglycemic agents, and the pharmacology of endocrine pancreas. In: BRUTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. (Eds). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 11. ed. New York: McGraw-Hill, p. 1613-1645.

DE LUIS, D.A.; SAGRADO, M.G.; CONDE, R.; ALLER, R.; IZAOLA, O. The effects of two different hypocaloric diets on glucagon-like peptide 1 in obese adults, relation with insulin response after weight loss. **J. Diabetes Complicat.**, In press. doi:10.1016/j.jdiacomp.2007.12.006, 2008.

DIXON, R.A.; XIE, D.; SHARMA, S.B. Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoid research? **New Phytol.**, v. 165, p. 9–28, 2005.

- DOJNOV, B.; BOŽIĆ, N.; NENADOVIĆ, V.; IVANOVIĆ, J.; VUJČIĆ, Z. Purification and properties of midgut α -amylase isolated from *Morimus funereus* (Coleoptera: Cerambycidae) larvae. **Comp. Biochem. Phys. B**, v. 149, p. 153–160, 2008.
- EDELMANN, A.; LENDL, B. Towards the optical tongue: Flow-through sensing of tannin-protein interactions based on FTIR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 124(49), p. 14741–14747, 2002.
- ERLICH, P.R.; RAVEN, P.H. Butterflies and plants: a study in co-evolution. **Evolution**, v 1, p. 18, 1964.
- ESPÍN, J.C.; GARCÍA-CONESA, M.T.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Nutraceuticals: Facts and fiction. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2986–3008, 2007.
- ESPINDOLA, L.S.; VASCONCELOS, JR J.R., MESQUITA, M.L.; MARQUIE, P.; PAULA, J.E.; MAMBU, L.; SANTANA, J.M. Trypanocidal activity of a new diterpene from *Casearia sylvestris* var. lingua. **Planta Medica**, v. 70, p. 1093-1095, 2004.
- EVANS, J.L.; RUSHAKOFF, R.J. Oral pharmacological agents for type 2 diabetes: Sulfonylureas, meglitinides, metformin, thiazolidinediones, α -glucosidase inhibitors and emerging approaches. 2007. Disponível em: <www.endotext.org/diabetes>. Acesso em 15 maio 2008:
- FIERENS, E.; ROMBOUTS, S.; GEBRUERS, K.; GOESAERT, H.; BRIJS, K.; BEAUGRAND, J.; VOLCKAERT, G.; VAN CAMPENHOUT, S.; PROOST, P.; COURTIN, C.M.; DELCOUR, J.A. TLXI, a novel type of xylanase inhibitor from wheat (*Triticum aestivum*) belonging to the thaumatin family **Biochem. J.**, v. 403, p. 583–591, 2007.
- FILGUEIRAS, T.S. Herbaceous plant communities. In: The Cerrados of Brazil: Ecology and natural history of a neotropical savanna. Columbia University Press, p. 122-139, 2002.
- FONSECA, V.A.; KULKARNI, K.D. Management of Type 2 Diabetes: Oral agents, insulin, and injectables. **J. Am. Diet Assoc.**, v. 108, n. 4, p. S29-S33, 2008.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Disponível em: <<http://www.fao.org/inpho/content/compend/text/ch02-01.htm>>. Acesso em 24 janeiro 2008.
- FOWLER, M. J. Diabetes treatment, Part 2: Oral agents for glycemic management. **Clinical Diabetes**, v. 25, n. 4, p. 131-134, 2007.
- FRANCO, O.L.; MELO, F.R.; MENDES, P.A.; PAES, N.S.; YOKOYAMA, M.; COUTINHO, M.V.; BLOCH, JR C.; GROSSI DE SÁ, M.F. Characterization of two *Acanthoscelides obtectus* α -amylases and their inactivation by wheat inhibitors. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 1585-1590, 2005.

- FRANCO, O.L.; RIGDEN, D.J.; MELO, F.R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases: Structure, function and potential for crop protection. **Eur. J. Biochem.**, v. 269, p. 397-412, 2002.
- FU, C.; LOO, A.E.K.; CHIA, F.P.P.; HUANG, D. Oligomeric proanthocyanidins from mangosteen pericarps. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, p. 7689-7694, 2007.
- GABBAY, M.A.L. Adjunctive therapies to glycaemic control of type 1 diabetes mellitus. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 52, n. 2, p. 279-287, 2008.
- GENG, P.; BAIA, G. Two novel aminooligosaccharides isolated from the culture of *Streptomyces coelicoflavus* ZG0656 as potent inhibitors of α -amylase. **Carbohydr. Res.**, v. 343, p. 882-892, 2008.
- GIBBS, B.F.; ALLI, I. Characterization of a purified α -amylase inhibitor from white kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). **Food Res. Int.**, v. 31, n. 3, p. 217-225, 1998.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
- GOTTLIEB, O.R.; LINS, A.A.M.; MARTINS DA SILVA, E.; MELO, M.T. Xanthones of *Kielmeyera ferruginea*. **Phytochemistry**, v. 8, p. 665-666, 1968.
- GOTTLIEB, O.R.; LINS, A.A.M.; NAGEM, T.J. Xanthones of *Kielmeyera rubriflora*. **Phytochemistry**, v. 8, p. 665-666, 1971.
- GOTTLIEB, O.R.; TAVEIRA, M.M.; STEFANI, G.M. The chemistry of brazilian Guttiferae - Part VI. **Tetrahedron**, v. 22, p. 1789-1795, 1966.
- GROSSI DE SÁ, M.F.; CHRISPEELS, M.J. Molecular cloning of bruchid (*Zabrotes subfasciatus*) α -amylase cDNA and interactions of the expressed enzyme with bean amylase inhibitors. **Insect Biochem. Molec. Biol.**, v. 27, n. 4, p. 271-281, 1997.
- HAGERMAN, A.E. **Tannin Handbook**. 2002. Disponível em: <<http://www.users.muohio.edu/hagermae/tannin.pdf>>. Acesso em 12 maio 2008.
- HAGERMAN, A.E.; BUTLER, L.G. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. **J. Agric Food Chem.**, v. 26, p. 809-812, 1978
- HARRISON, L.J.; LEONG, L.-S.; SIA, G.-I.; SIM, K.-Y.; TAN, H. T.-W. Xanthones from *Garcinia forbesii*. **Phytochemistry**, v. 33, n. 3, p. 727-728, 1993.
- HARTMANN, T. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2831-2846, 2007.
- HASLAM, E. Vegetable tannins – Lessons of a phytochemical lifetime. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2713-2721, 2007.

- HE, Q.; LV, Y.; YAO, K. Effects of tea polyphenols on the activities of α -amylase, pepsin, trypsin and lipase. **Food Chem.**, v. 101, p. 1178–1182, 2006.
- HEINE, R.J.; DIAMANT, M.; MBANYA, J.; NATHAN, D.M. Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes. **Brit. Med. J.**, v. 333, p. 1200–1204, 2006.
- HELLER, S.; KOZLOVSKI, P.; KURTZHALS, P. Insulin's 85th anniversary-An enduring medical miracle. **Diabetes Res. Clin.Pr.**, v. 78, p. 149–158, 2007.
- HIRSCH, I.B. Insulin analogues. **N. Engl. J. Med.**, v. 352, n. 2, p. 174-183 2005.
- HO, S.; HWANG, L.S.; LIN, C. Suppressive effect of a proanthocyanidin-rich extract from Longan (*Dimocarpus longan* Lour.) flowers on nitric oxide production in LPS-stimulated macrophage cells. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, n. 26, p. 10664–10670, 2007.
- HOLLENBECK, C.B.; COULSTON, A.M.; QUAN, R. Effects of a commercial starch blocker preparation on carbohydrate digestion and absorption: *in vitro* and *in vivo* studies. **Am. J. Nutr.**, v. 38, n. 4, p498-503, 1983.
- HUNTER, S.J.; BELL, P.M. Diabetes and hypertension. **Medicine**, v. 34, n. 2, p. 76-79, 2006.
- INSTITUTE FOR CLINICAL SYSTEMS IMPROVEMENT (ICSI) Management of type 2 *diabetes mellitus*. Bloomington (MN): Institute for Clinical Systems Improvement (ICSI), 2005. 79 p.
- INZUCCHI, S.E. Management of Hyperglycemia in the Hospital Setting. **N. Engl. J. Med.**, v. 355, p. 1903-1911, 2006.
- ISHIMOTO, M.; CHRISPEELS, M.J. Protective mechanism of the mexican bean weevil against high levels of α -amylase inhibitor in the common bean. **Plant. Physiol.**, v. 111, n. 2, p. 393-401, 1996.
- IULEK, J.; FRANCO, O.L.; SILVA, M.; SLIVINSKI, C.T.; BLOCH, JR C.; RIGDEN, D.J.; GROSSI DE SÁ M. F. Purification, biochemical characterisation and partial primary structure of a new α -amylase inhibitor from *Secale cereale* (rye). **Int. J. Biochem Cell Biol.**, v. 32, p. 1195–1204, 2000.
- KANDRA, L.; GYÉMÁNT, G.; ZÁJÁ CZ, A.; BATTA, G. Inhibitory effects of tannin on human salivary α -amylase. **Biochem. Biophys. Res. Co.**, v. 319, p. 1265–1271, 2004.
- KANDRA, L.; REMENYIK, J.; BATTA, G.; SOMSÁK, L.; GYÉMÁNT, G.; PARK, K.H. Enzymatic synthesis of a new inhibitor of α -amylases: acarviosinyl-isomaltosyl-spirothiohydantoin. **Carbohydr. Res.**, v. 340, p. 1311–1317, 2005
- KIM, J.H.; RYU, Y.B.; KANG., N.S.; LEE, B.W.; HEO, J.S.; JEONG, I.; PARK, K.H. (2006). Glycosidase inhibitory flavonoids from *Sophora flavescens*. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 29, n. 2, p. 302-305, 2006.

- KIM, Y.M.; JEONG, Y.K.; WANG, M.H.; LEE, W.Y.; RHEE, H.I. Inhibitory effect of pine extract on alpha-glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. **Nutrition**, v. 21, p. 756–761, 2005.
- KIM, Y.-H.; WOLOSHUK, C.P.; CHO, E.H.; BAE, J.M.; SONG, Y.-S.; HUH, G.H. Cloning and functional expression of the gene encoding an inhibitor against *Aspergillus flavus* α -amylase, a novel seed lectin from *Lablab purpureus* (*Dolichos lablab*). **Plant. Cell. Rep.** 26, p. 395–405, 2007.
- KLINK, C.A.; MACHADO, R.B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 147-155, 2005.
- KLUH, I.; HORN, M.; HÝBLOVÁ, J.; HUBERT, J.; DOLECKOVÁ-MARESOVÁ, L.; VOBURKA, Z.; KUDLÍKOVÁ, I.; KOCOUREK, F.; MARESA, M. Inhibitory specificity and insecticidal selectivity of α -amylase inhibitor from *Phaseolus vulgaris*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 31–39, 2005.
- KRENTZ, A.J.; BAILEY, C.J. Oral antidiabetic agents: current role in type 2 *diabetes mellitus*. **Drugs.**, v. 65, n. 3, p. 385-411, 2005.
- LEE, Y.A.; CHO, E. J.; TANAKA, T.; YOKOZAWA, T. Inhibitory activities of proanthocyanidins of persimmon against oxidative stress and digestive enzymes related to diabetes. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.**, v. 53, p. 287-292, 2007
- LI, H.; TANAKA, T.; ZHANG, Y.; YANG, C.; KOUNO, I. Rubusuaviins A–F, monomeric and oligomeric ellagitannins from chinese sweet tea and their α -amylase inhibitory activity. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 55, n, 9, p. 1325-1331, 2007.
- LOO, A.E.K.; HUANG, D. Assay-guided fractionation study of α -amylase inhibitors from *Garcinia mangostana* pericarp. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, n. 24, p. 9805–9810, 2007.
- LOPES, J.L.C.; LOPES, J.N.C.; GILBERT, B.; BONINI, S.E. Osajaxanthone from *Kielmeyera coriacea*. **Phytochemistry**, v. 16, p. 1101, 1977.
- LORENZI, H. Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. São Paulo: Ed. Nova Odessa, 1992. 352p.
- MACGREGOR, E.A.; JANECEK, S.; SVENSSON, B. Relationship of sequence and structure to specificity in the α -amylase family of enzymes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1546, n. 1, p. 1-20, 2001.
- MACHADO, R.B.; NETO, M.B.R.; PEREIRA, P.G.P.; CALDAS, E.F.; GONÇALVES, D.A.; SANTOS, N.S.; TABOR, K.; STEININGER, M. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. **Relatório Conservação Internacional**, p.1-23, 2004.
- MARLES, M.A.S.; RAY, H.; GRUBER, M.Y. New perspectives on proanthocyanidin biochemistry and molecular regulation. **Phytochemistry**, v. 64, p. 367–383, 2003.

MARTINDALE: The Complete Drug Reference. 2006. In: *MICROMEDEX*. Disponível em: <<http://www.thomsonhc.com/hcs/librarian>>. Acesso em 14 janeiro 2008.

MASSI-BENEDETTI, M.; ORSINI-FEDERICI, A. Treatment of type 2 diabetes with combined therapy: What are the pros and cons? **Diabetes Care**, v. 31, p. 131-135, 2008.

MAZZONE, T.; MEYER, P.M.; FEINSTEIN, S.B.; DAVIDSON, M.H.; KONDOS, G.; D'AGOSTINO, R.B.; PEREZ, A.; PROVOST, J.; HAFFNER, S.M. Effect of pioglitazone compared with glimepiride on carotid intima-media thickness in type 2 diabetes. **JAMA**, v. 296, p. 1-10, 2006.

MCDOUGALL, G.J.; SHPIRO, F.; DOBSON, P.; SMITH, P.; BLAKE, A.; STEWART D. Different polyphenolic components of soft fruits inhibit α -amylase and α -glucosidase. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 2760-2766, 2005.

MESQUITA, M.L.; GRELLIER, P.; BLOND, A.; BROUARD, J.; DE PAULA, J.E.; ESPINDOLA, L.S.; MAMBU, L. New ether diglycosides from *Matayba guianensis* with antiplasmodial activity. **Bioorgan. Med. Chem.**, v. 13, p. 4499-4506, 2005.

MESQUITA, M.L.; GRELLIER P., MAMBU L., DE PAULA J. E., ESPINDOLA L. S. *In vitro* antiplasmodial activity of brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. **J. Ethnopharmacol.**, v. 110, p. 165-170, 2007.

MURAD, A.M. LAUMANN, R.A.; LIMA, T.A.; SARMENTO, R.B.; NORONHA, E.F.; ROCHA, T.L.; VALADARES-INGLIS, M.C.; FRANCO, O.L. Screening of entomopathogenic *Metarhizium anisopliae* isolates and proteomic analysis of secretion synthesized in response to cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*) exoskeleton. **Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.**, v. 142, p. 365-370, 2006.

MURALIKRISHNA, G.; NIRMALA, M. Cereal α -amylases - an overview. **Carbohydr. Polym.**, v. 60, p. 163-173.

NATHAN, D.M. Initial management of glycemia in type 2 diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 347(17), p. 1342-1349, 2002

NISHIZAWA, K.; TERAISHI, M.; UTSUMI, S.; ISHIMOTO, M. Assessment of the importance of α -amylase inhibitor-2 in bruchid resistance of wild common bean. **Theor. Appl. Genet.**, v. 114, p. 755-764, 2007.

NISSEN, S.E.; WOLSKI, K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. **N. Engl. J. Med.**, v. 356, p. 2457-2471, 2007.

OBICI S. OTOBONE, F.J.; SELA, V.R.S.; ISHIDA, K.; SILVA, J.C.; NAKAMURA, C.V.; CORTEZ, D.A.G.; AUDI, E.A. Preliminary toxicity study of dichloromethane extract of *Kielmeyera coriacea* stems in mice and rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 115, p. 131-139, 2008.

OUJERIOUAT, N.; MOREAU, Y.; SANTIMONE, M.; SVENSSON, B.; MARCHIS-MOUREN, G.; DESSEAUX, V. On the mechanism of α -amylase: Acarbose and cyclodextrin inhibition of barley amylase isozymes. **Eur. J. Biochem.**, v. 270, p. 3871-3879, 2003.

PAYAN, F. Structural basis for the inhibition of mammalian and insect α -amylases by plant protein inhibitors. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1696, p.171– 180, 2004.

PELEGRINI, P.B.; MURAD, A.M.; GROSSI DE SÁ, M.F.; MELLO, L.V.; ROMEIRO, L.A.; NORONHA, E.F.; CALDAS, R.A.; FRANCO, O.L. Structure and enzyme properties of *Zabrotes subfasciatus* alpha-amylase. **Arch Insect Biochem Physiol.**, v. 61, n. 2, p. 77-86, 2006.

PEREIRA, R.A.; BATISTA, J.A.N.; SILVA, M.C.M.; OLIVEIRA NETO, O.B.; FIGUEIRA, E.L.Z.; VALENCIA-JIMÉNEZ, A.; GROSSI DE SÁ, M.F. An α -amylase inhibitor gene from *Phaseolus coccineus* encodes a protein with potential for control of coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*). **Phytochemistry**, v. 67, p. 2009–2016, 2006.

PINHEIRO, L.; CORTEZ, D.A.G. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade moluscicida da *Kielmeyera variabilis* Mart. (Clusiaceae). **Quim. Nova**, v. 26, n. 2, p. 157-160, 2003

PINTO, M.M.M.; MESQUITA, A.A.L.; GOTTLIEB, O.R. Xanthonolignoids from *Kielmeyera coriacea*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 7, p. 2045-2048, 1987.

QIANG, H.; YUANPING L.; YAO, K. Effects of tea polyphenols on the activities of α -amylase, pepsin, trypsin and lipase. **Food Chem.**, v. 101, p. 1178–1182, 2006.

QIN, M.; ZHANG, J.; WANG, W. Effects of disulfide bonds on folding behavior and mechanism of the β -sheet protein Tendamistat. **Biophys. J.**, v. 90, p. 272–286, 2006.

RABASA-LHORET, R.; CHIASSON, J.L. Alpha-glucosidase inhibitors (3rd ed.). In: Defronzo R. A., Ferrannini E., Keen H., Zimmet P. UK: John Wiley: International textbook of *diabetes mellitus*, 2004.

RANGEL, T.F.L.V.B.; BINIB, L.M.; DINIZ-FILHO, J.A.F.; PINTO, M.P.; CARVALHO, P.; BASTOS, R.P. Human development and biodiversity conservation in Brazilian Cerrado. **Appl. Geography**, v. 27, p. 14–27, 2007.

RATTER, J.A.; RIBEIRO, J.F.; BRIDGEWATER, S. The brazilian Cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Ann. Bot.*, v. 80, p. 223-230, 1997.

REKHA, M.R.; SASIKIRAN, K.; PADMAJA, G. Inhibitor potential of protease and α -amylase inhibitors of sweet potato and taro on the digestive enzymes of root crop storage pests. **J. Stored Prod. Res.**, v. 40, p. 461–470, 2004.

RIBEIRO, J.F.; WALTER, B.M.T. Fitofisionomias do Cerrado. **Cerrado: ambiente e flora**. Embrapa Cerrados, p. 87-166, 1998.

RODRIGUES, A.M.S.; DE PAULA, J.E.; DEGALLIER, N.; MOLEZ, J.; ESPINDOLA, L.S. Larvicidal activity of some cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. **J. Am. Mosquito Contr.**, v. 22, n. 2, p. 314-317, 2006.

RODRIGUES, G.B.; MALTONI, K.L.; CASSIOLATO, A.M.R. Dinâmica da regeneração do subsolo de áreas degradadas dentro do bioma Cerrado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, n. 1, p. 73–80, 2007.

SARI, L.T.; RIBEIRO-COSTA, C.S., PEREIRA, P.R.V.S. Aspectos biológicos de *Zabrotes subfasciatus* (Bohemann, 1833) (Coleoptera, Bruchidae) em *Phaseolus vulgaris* L. cv. Carioca (Fabaceae), sob condições de laboratório. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 47, n. 4, p. 621-624, 2003.

SCHAFER, A.; HOGGER, P. Oligomeric procyanidins of french maritime pine bark extract (Pycnogenol[®]) effectively inhibit α -glucosidase. **Diabetes Res. Clin. Pr.**, v. 77, p. 41–46, 2007.

SCHNELL, O.; MERTES, G.; STANDL, E. Acarbose and metabolic control in patients with type 2 diabetes with newly initiated insulin therapy. **Diabetes Obes. Metab.**, v. 9, p. 853–858, 2007.

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D.M.; PELL A.N. Analysis of condensed tannins: a review. **Anim. Feed Sci. Tech.**, v. 91, p. 21-40, 2001.

SILVA, C.P.; TERRA, W.R.; GROSSI DE SÁ, M.F.; SAMUELS, R.I.; ISEJIMA, E.M.; BIFANO, T.D.; ALMEIDA, J.S. Induction of digestive α -amylases in larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) in response to ingestion of common bean α -amylase inhibitor 1. **J. Insect Physiol.**, v. 47, p. 1283–1290, 2001b.

SILVA, C.P.; TERRA, W.R.; XAVIER-FILHO, J.; GROSSI DE SÁ, M.F.; ISEJIMA, E.M.; DAMATTA, R.A.; MIGUENS, F.C.; BIFANO, T.D. Digestion of legume starch granules by larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) and the induction of α -amylases in response to different diets. **Insect Biochem. Molec.**, v. 31, p. 41–50, 2001a.

SILVA, D.P. CASADO-FILHO, E.L.; CORRÊA, A.S.R., FARIAS, L.R.; BLOCH, JR. C.; GROSSI DE SÁ, M.F.; MENDES, P.A.M.; QUIRINO, B.F.; NORONHA, E.F.; FRANCO, O.L. Identification of an α -amylase inhibitor from *Pterodon pubescens* with ability to inhibit cowpea weevil digestive enzymes. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, p. 4382-4387, 2007.

SIVAKUMAR, S.; MOHAN M; FRANCO, O.L.; THAYUMANAVAN, B. Inhibition of insect pest α -amylases by little and finger millet inhibitors. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 85, n. 3, p. 155-160S, 2006.

SULTANBAWA, M.U.S. Xanthonoids of tropical plants. **Tetrahedron**, v. 36, n. 11, p. 1465-1506, 1980.

SVENSSON, B.; KENJI, F.; NIELSEN, P.K.; BØNSAGER, B.C. Proteinaceous α -amylase inhibitors. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1696, p. 145–156, 2004.

THOMAS, M.B.; READ A.F. Fungal bioinsecticide with a sting: A fungus engineered to express a scorpion toxin may prove useful in combating insect pests. **Nat. Biotechnol.**, v. 5, n. 12, p. 1367-1368, 2007

TOMARU, M.; TAKANO, H.; OSAKABE, N.; YASUDA, A.; INOUE, K.-I.; YANAGISAWA, R.; OHWATARI, T.; UEMATSU, H. Dietary supplementation with cacao liquor proanthocyanidins prevents elevation of blood glucose levels in diabetic obese mice. **Nutrition**, v. 23, p. 351–355, 2007.

UDANI, J.; SINGH, B.B. Blocking carbohydrate absorption and weight loss: a clinical trial using a proprietary fractionated white bean extract. **Altern. Ther. Health. Med.**, v. 13, n. 4, p. 32-36, 2007

VALENCIA, A.; BUSTILLO, A.E.; OSSA, G.E.; CHRISPEELS, M.J. α -amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. **Insect Biochem. Molec.**, v. 30, p. 207–213., 2000.

VALENCIA-JIMÉNEZ, A.; VALENCIA, J.W.A.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Activity of α -amylase inhibitors from *Phaseolus coccineus* on digestive α -amylases of the coffee berry borer. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, p. 2315–2320, 2008.

VAN DE LAAR, F. LUCASSEN, P.L.; AKKERMANS, R.P.; VAN DE LISDONK, E.H.; RUTTEN, G.E.; VAN WEEL, C. α -glucosidase inhibitors for patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 28, p. 154-163, 2005.

VAN EERD, L.L.; HOAGLAND, R.E.; ZABLOTOWICZ, R.M.; HALL, J.C. Pesticide metabolism in plants and microorganisms. **Weed Science**, v. 51, p. 472–495, 2003.

VIEIRA, N. C.; ESPÍNDOLA, L.S.; SANTANA, J.M.; VERAS, M.L.; PESSOA, O.D.; PINHEIRO, S.M.; DE ARAÚJO, R.M.; LIMA, M.A.; SILVEIRA, E.R. Trypanocidal activity of a new pterocarpan and other secondary metabolites of plants from Northeastern Brazil flora. **Bioor. Med. Chem.**, v. 16, n. 4, p. 1676-1682, 2008.

VUKSAN, V.; SIEVENPIPER, J.L. Herbal remedies in the management of diabetes: Lessons learned from the study of ginseng. **Nutr. Metab. Cardiovas.**, v. 15, p. 149-160, 2005.

WANG J.-R., WEI, Y.-M.; LONG, X.-Y.; YAN, Z.-H.; NEVO, E.; BAUM, B.R.; ZHENG, Y.-L. Molecular evolution of dimeric α -amylase inhibitor genes in wild emmer wheat and its ecological association. **BMC Evolutionary Biology**, v. 8, p. 91-105, 2008.

WANNMACHER, L. Novas insulinas: qual a real vantagem? **Uso Racional de Medicamentos: Temas Selecionados**, v. 2, n. 8, p. 1-6, 2005.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global prevalence of diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27, n. 5, p. 1047-53, 2004.

WOLFROM, M.L.; KOMITSKY, JR.; LOOKER, J.H. Osage Orange Pigments. 15. Estructure of osajaxanthone. Synthesis of dihidroosajaxanthone monomethyl ether. **J. Chem. Soc.**, v. 30, p.144-148, 1965.

WONG, J.M.W.; JENKINS, D.J.A. Carbohydrate digestibility and metabolic effects. **J. Nutrition**, v. 137, p. 2539S-2546S, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Definition, diagnosis and classification of *Diabetes mellitus* and its complications: report of a WHO consultation. 1999. Disponível em: <<http://www.who.int>>. Acesso em 10 janeiro 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Adherence to long-term therapies: evidence for action. 2003. Disponível em: <<http://www.who.int>>. Acesso em 10 janeiro 2008.

XU, X.; FANG, J.; WANG, W.; GUO, J.; CHEN, P.; CHENG, J.; SHEN, Z. Expression of a bacterial α -amylase gene in transgenic rice seeds. **Transgenic. Res.** In press. doi:10.1007/s11248-007-9144-5, 2007.

YAMADA, T. MORIYAMA, R.; HATTORI, K.; ISHIMOTO, M. Isolation of two α -amylase inhibitor genes of tepary bean (*Phaseolus acutifolius* A. Gray) and their functional characterization in genetically engineered azuki bean. **Plant Science**, v. 169, p. 502-511, 2005.

YAMASAKI, T.; DEGUCHI, M.; FUJIMOTO, T.; MASUMURA, T.; UNO, T.; KANAMARU, K.; YAMAGATA, H. Rice bifunctional α -amylase-subtilisin inhibitor: cloning and characterization of the recombinant inhibitor expressed in *Escherichia coli*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 70, n. 5, p. 1200-1209, 2006.

YOON, S.H.; ROBYT, J.F. Study of the inhibition of four alpha amylases by acarbose and its 4^{IV}- α -maltohexaosyl and 4^{IV}- α maltododecaosyl analogues. **Carbohydr. Res.**, v. 338, p. 1969-1980, 2003.

ZAJÁ CZ, A.; GYÉMÁ NT, G.; VITTORI, N.; KANDRA, L. Aleppo tannin: structural analysis and salivary amylase inhibition. **Carbohydr. Res.**, p. 342, p. 717-723, 2007.

ZAJONCOVA, L.; KOSINA, P.; VICAR, J.; ULRICHOVÁ, J.; PEC, P. Study of the inhibition of alpha-amylase by the benzo[c]phenanthridine alkaloids sanguinarine and chelerythrine. **J. Enzyme Inhib. Med. Chem.**, v. 20, n. 3, p. 261-7, 2005.

ZHANG, W.; HE, Y.-J.; HAN, C.-T.; LIU, Z.-Q.; LI, Q.; FAN, L.; TAN, Z.-R.; ZHANG, W.-X.; YU, B.-N.; WANG, D.; HU, D.-L.; ZHOU, H.-H. Effect of *SLCO1B1* genetic polymorphism on the pharmacokinetics of nateglinide. **Bri. J. Clin. Pharmacol.**, v. 62, n. 5, p. 567-572, 2006.

ZIMMERMAN, B.R. Sulfonylureas. **Endocrinol. Metab. Clin. North Am.**, v. 26, n. 3, p. 511-522, 1997.

Anexos

Anexo I

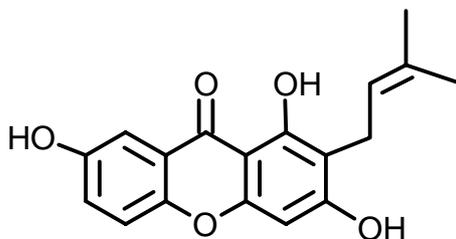
Espectros e Tabelas de RMN e IV

1,3,7-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona

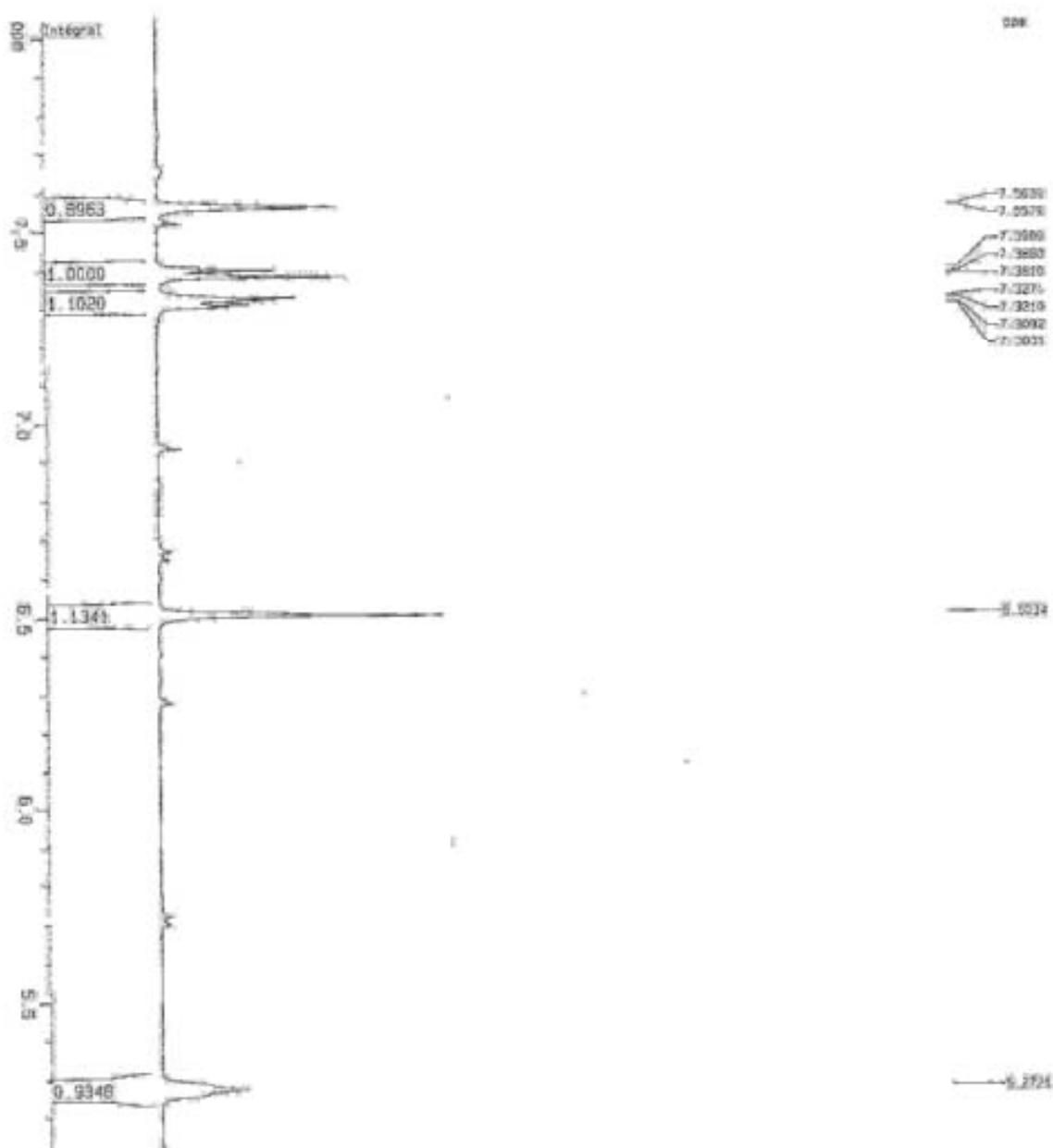
Dados de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ^{13}C e ^1H (HSQC)

1,3,7-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona

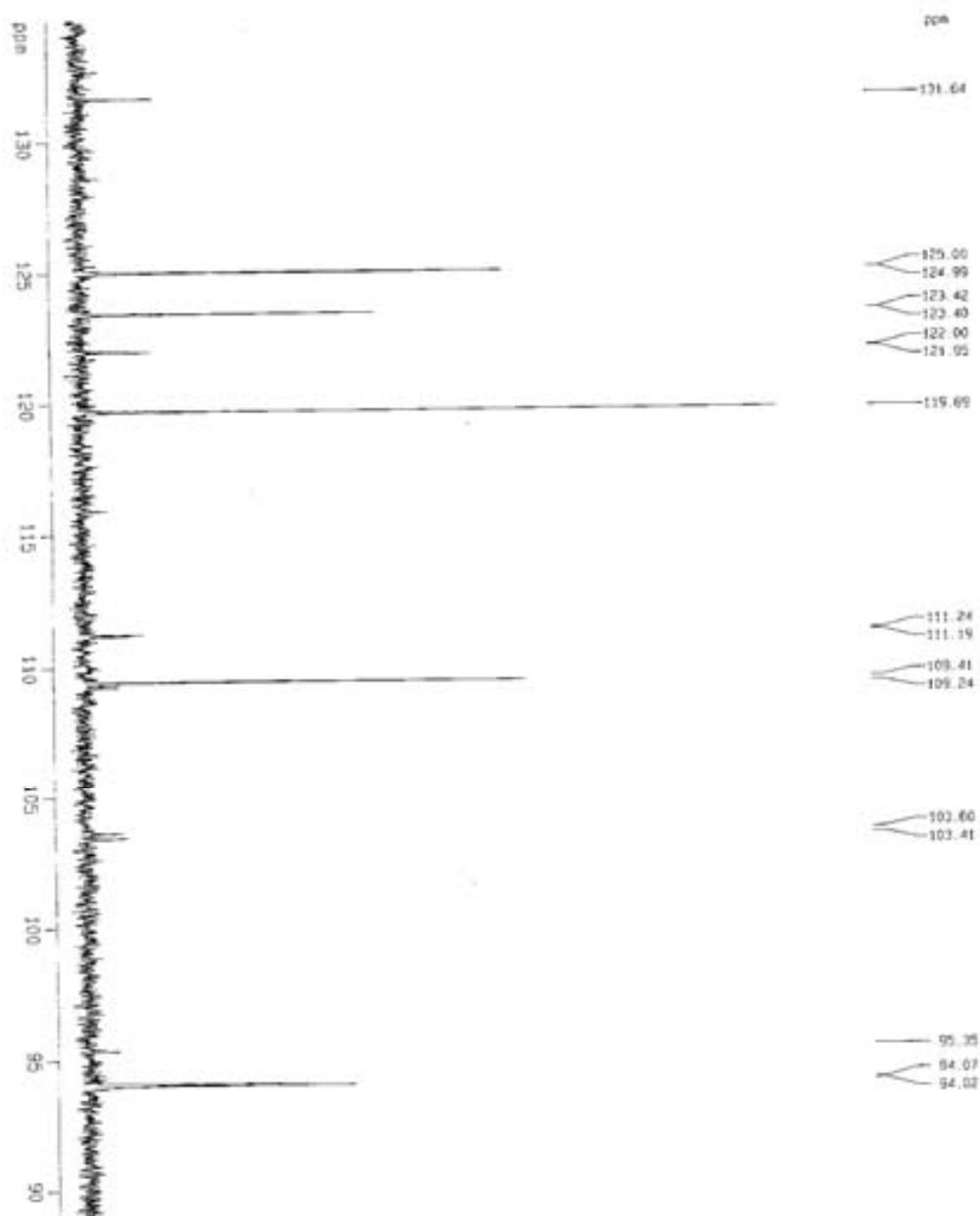
C	RMN ^{13}C	^1H (HSQC)
1	161,39	
2	111,24	
3	164,23	
4	94,02	
4 ^a	156,87	
5	119,69	
6	124,99	7,32 (1H, <i>dd</i> , $J=8,9$ e $3,0$ Hz)
7	154,86	
8	109,41	7,56 (1H, <i>d</i> , $J=3,0$ Hz)
8 ^a	121,95	
9	181,32	
9 ^a	103,60	
10 ^a	150,70	
11	22,03	3,3 (2H, <i>d</i> , $J=14,0$ Hz)
12	123,40	5,27 (1H, <i>t</i> , $J=$)
13	131,64	
14	25,95	1,64 (3H, <i>s</i>)
15	17,97	1,78 (3H, <i>s</i>)



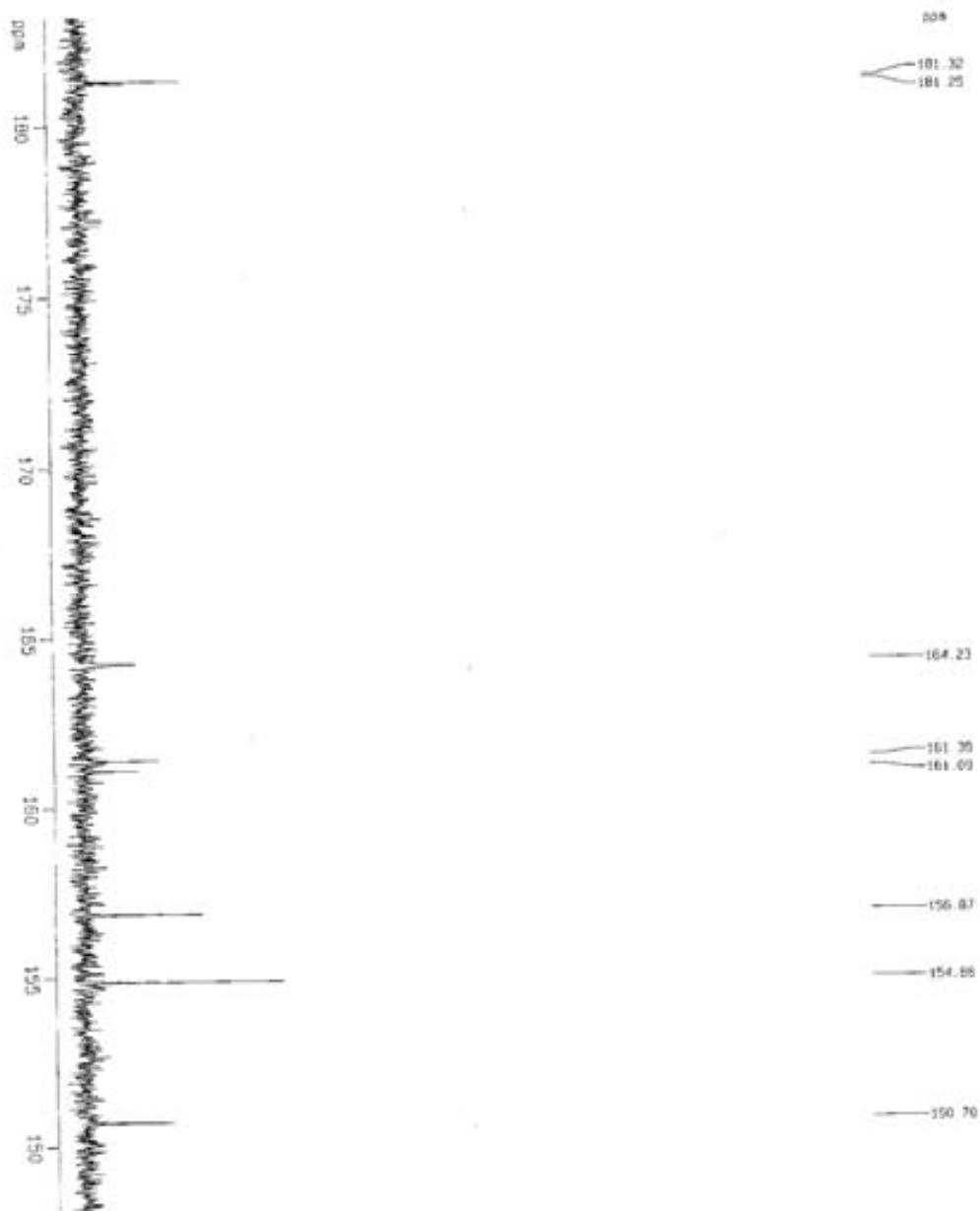
RMN 1H, acetona, 1,3,7-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona



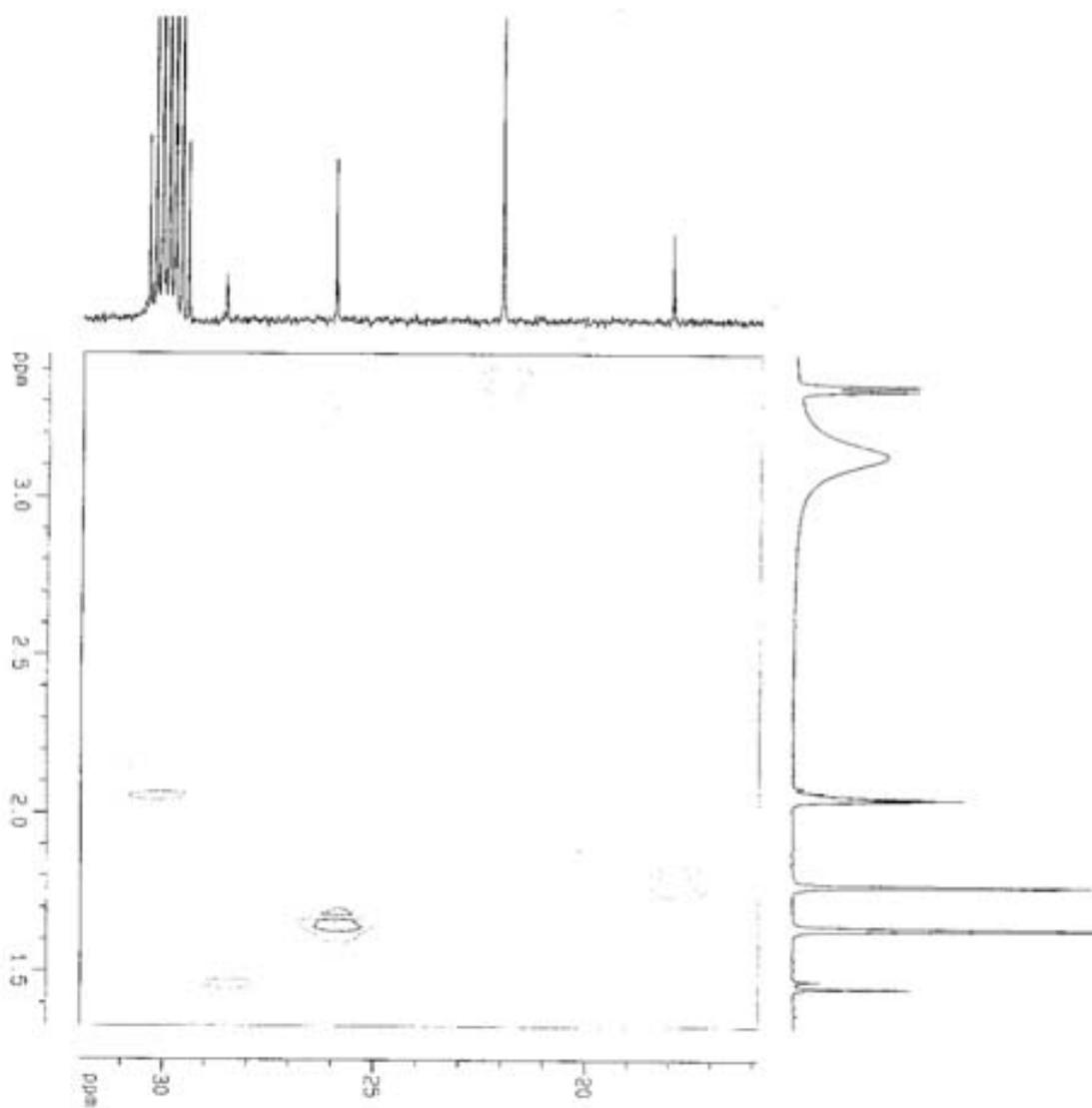
RMN ^{13}C -BB, piridina, 1,3,7-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona



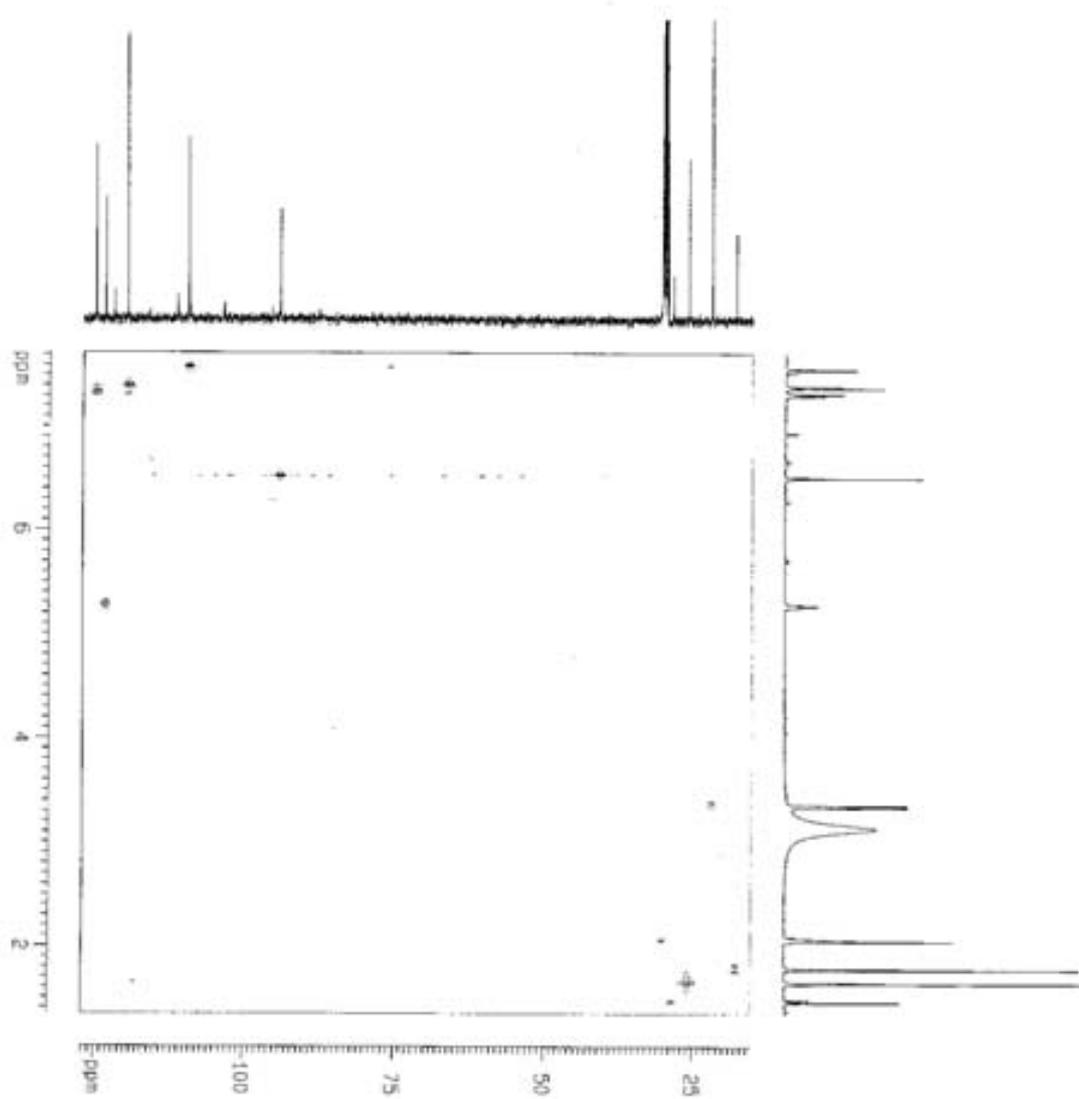
RMN ^{13}C -BB, piridina, 1,3,7-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona



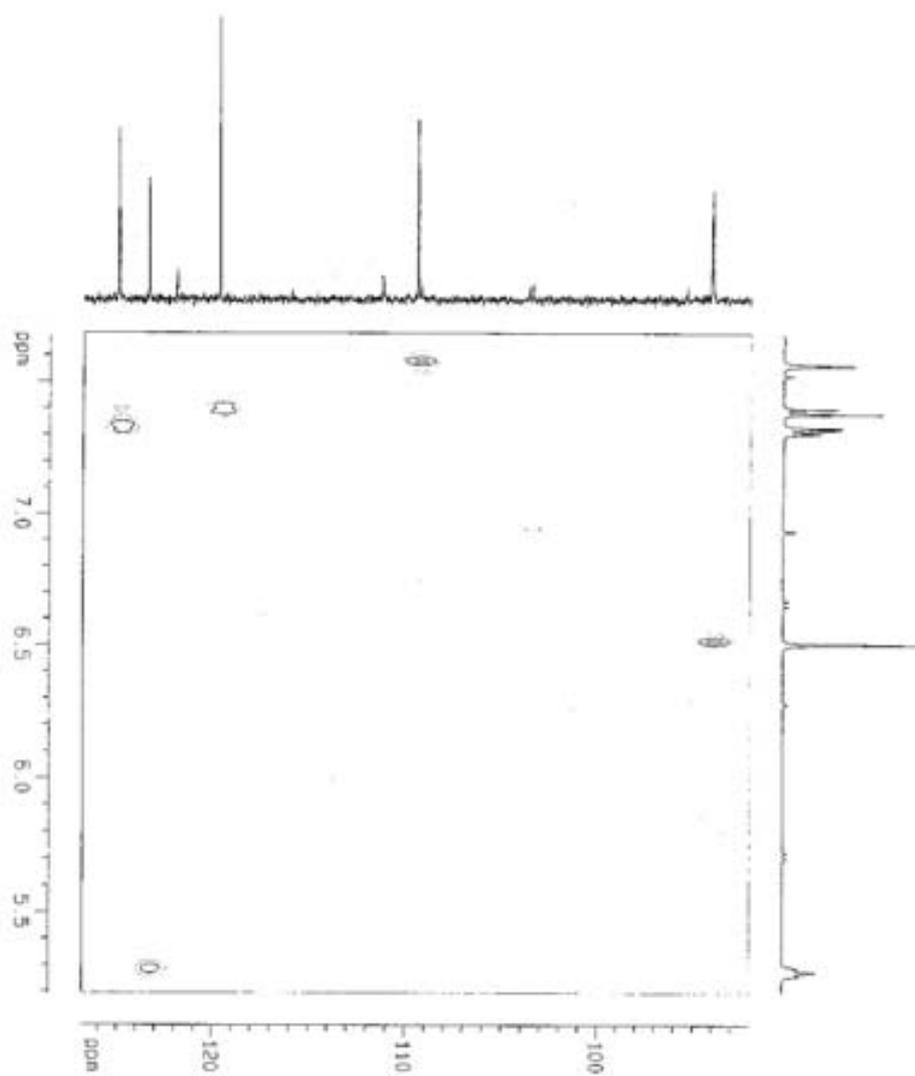
RMN HSQC, pyridina, 1,3,7-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona



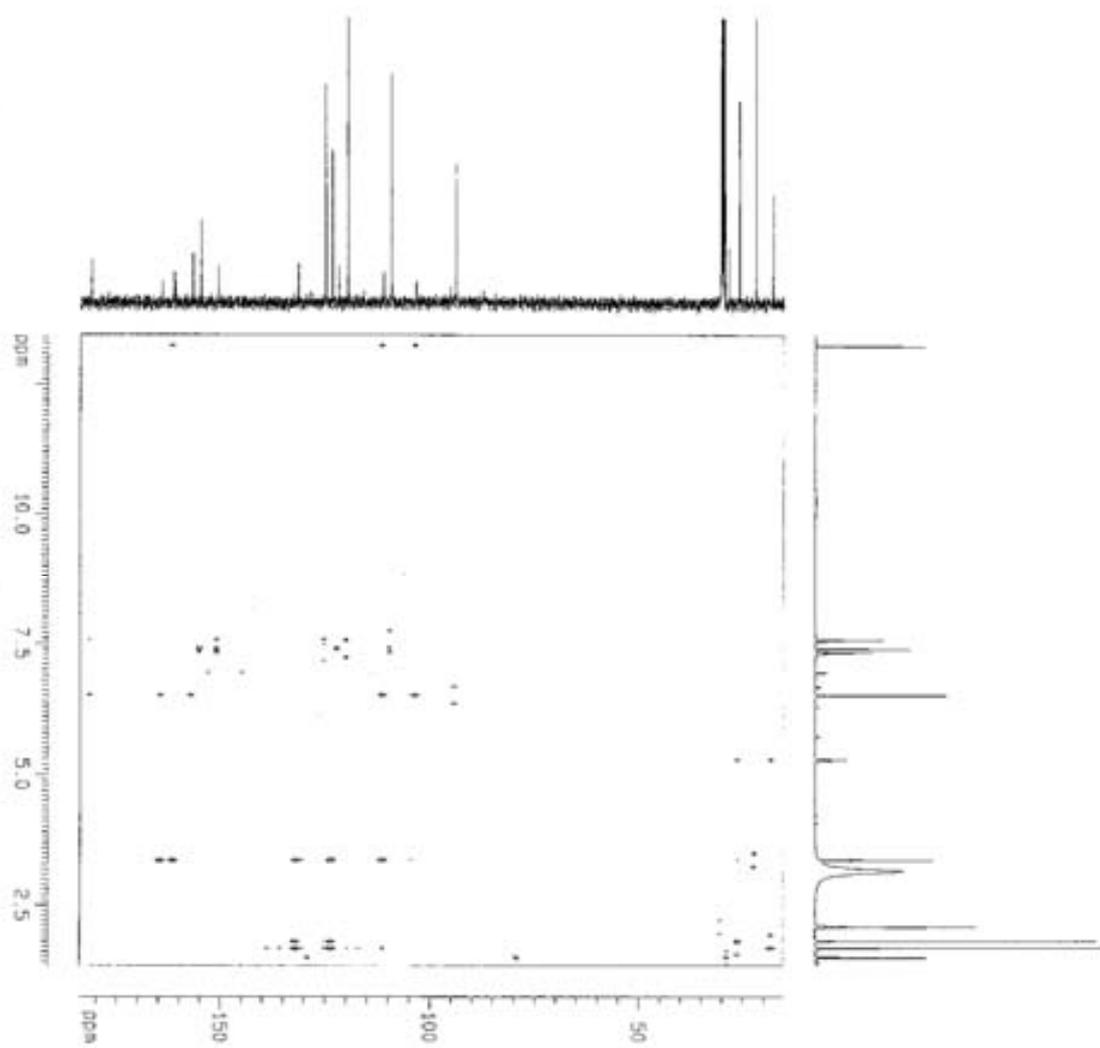
RMN HSQC, pyridina, 1,3,7-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona



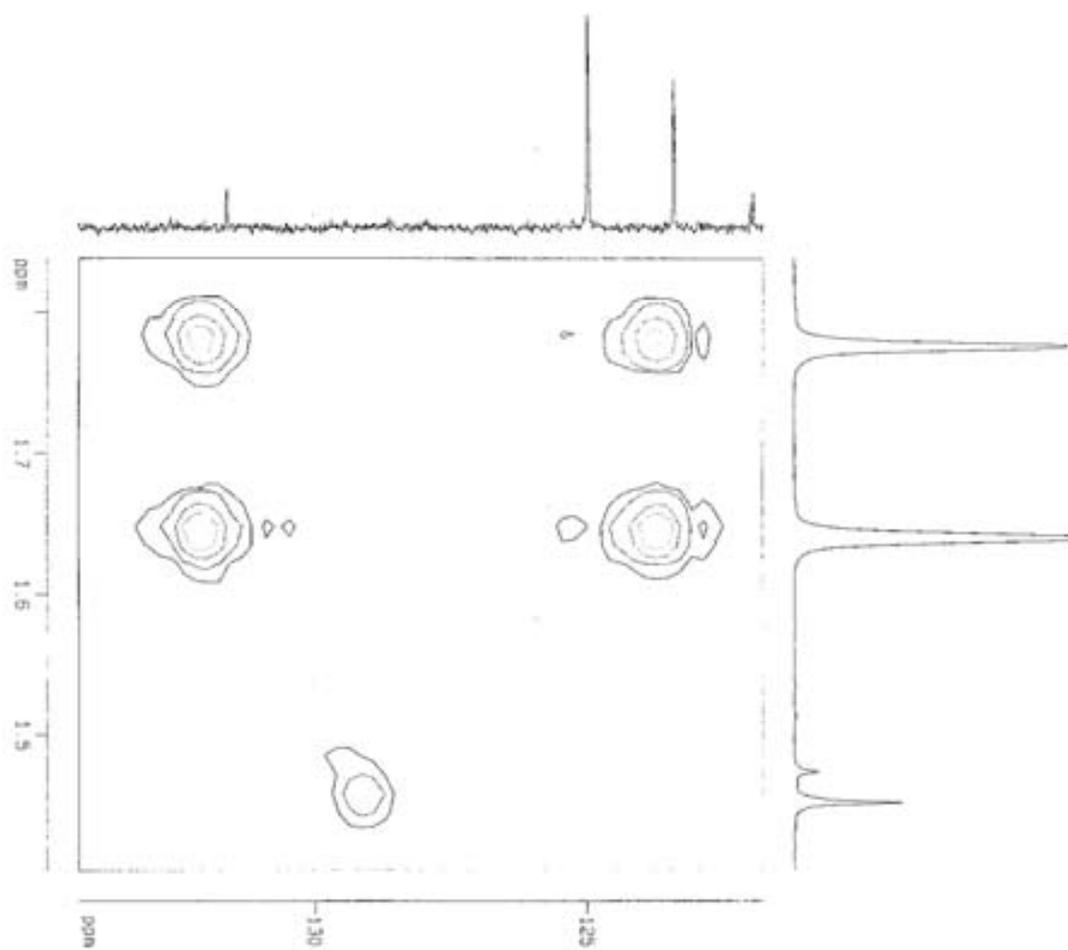
RMN HSQC, piridina, 1,3,7-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona



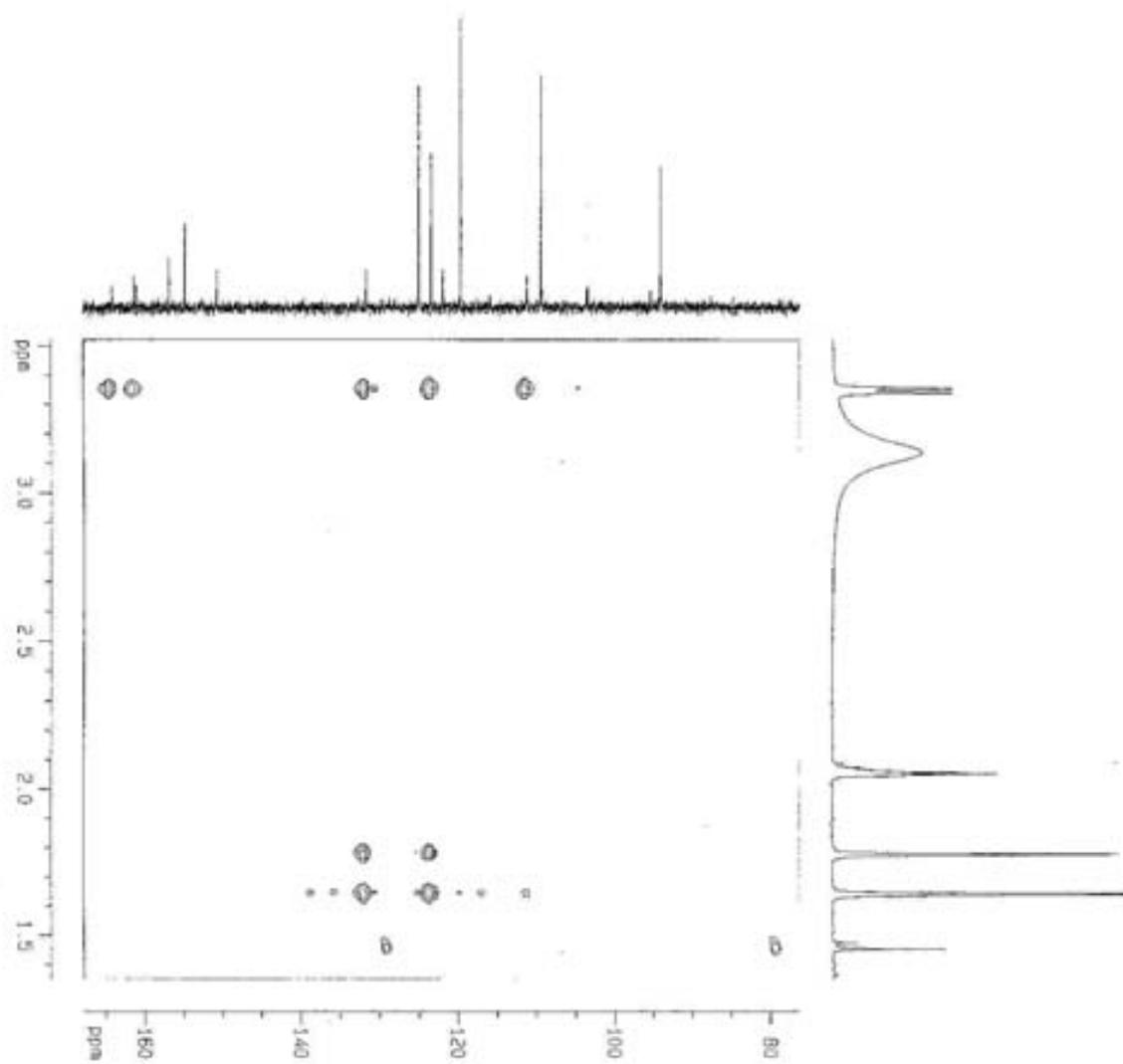
RMN HMBC, pyridina, 1,3,7-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona



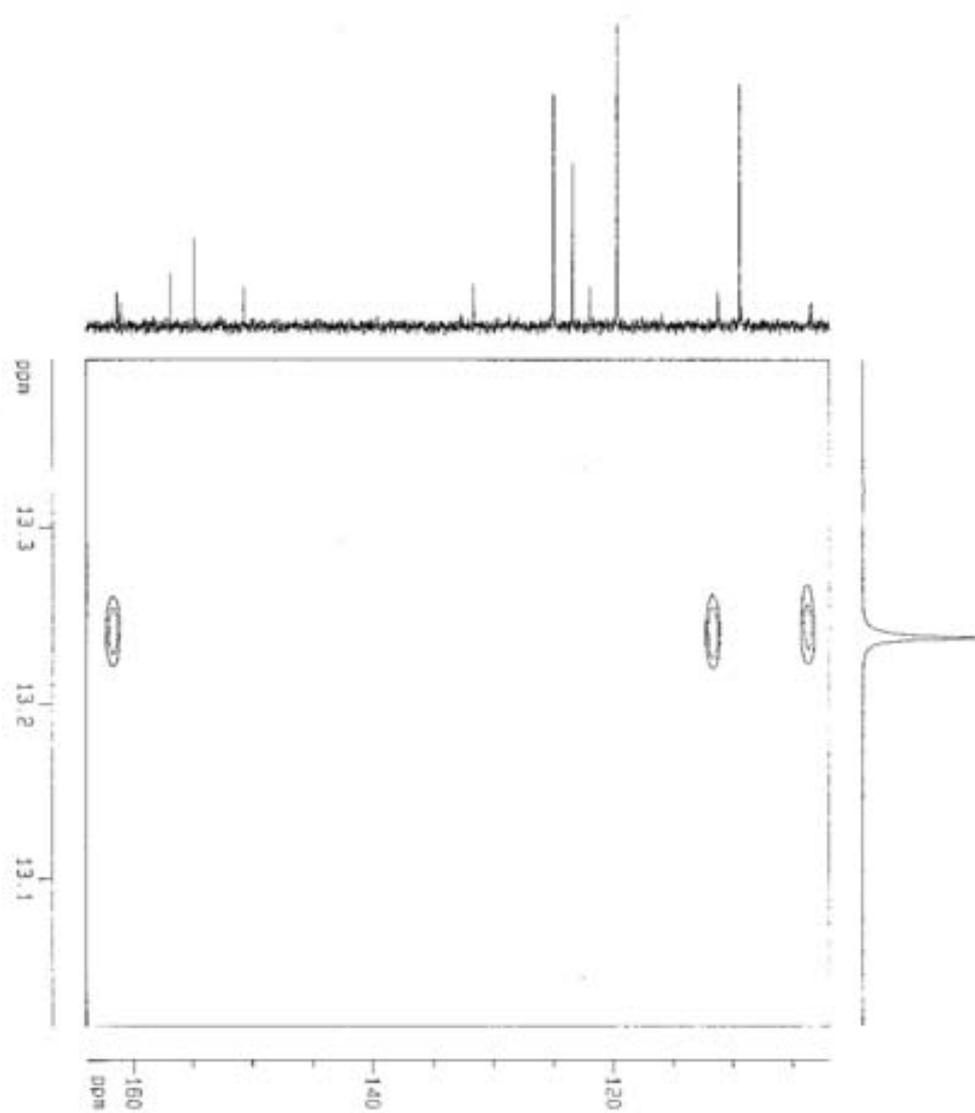
RMN HMBC, pyridina, 1,3,7-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona



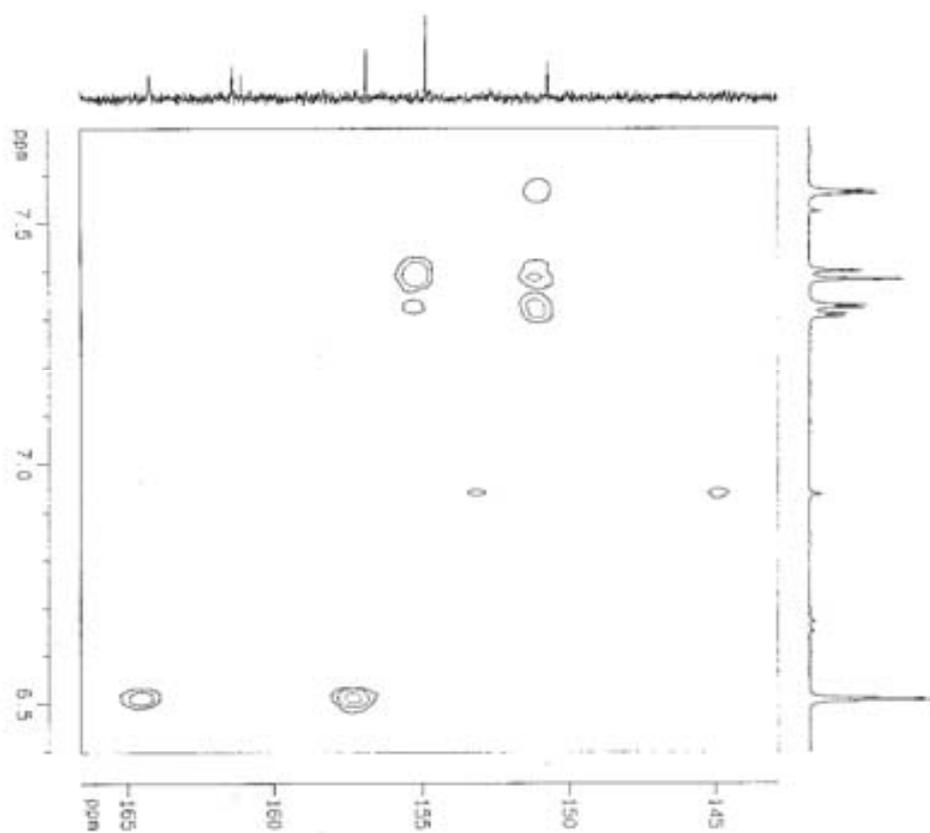
RMN HMBC, pyridina, 1,3,7-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona



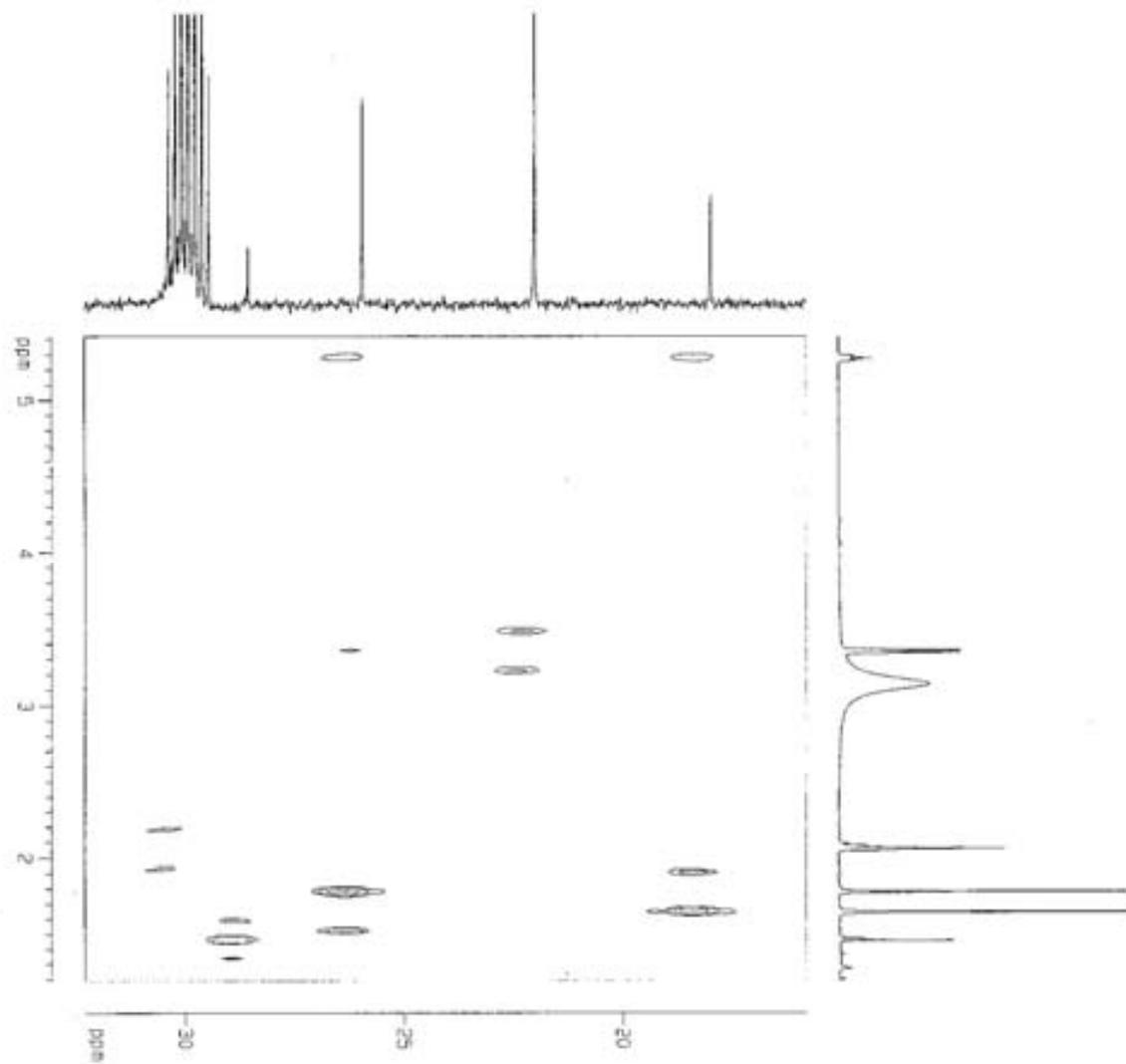
RMN HMBC, piridina, 1,3,7-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona



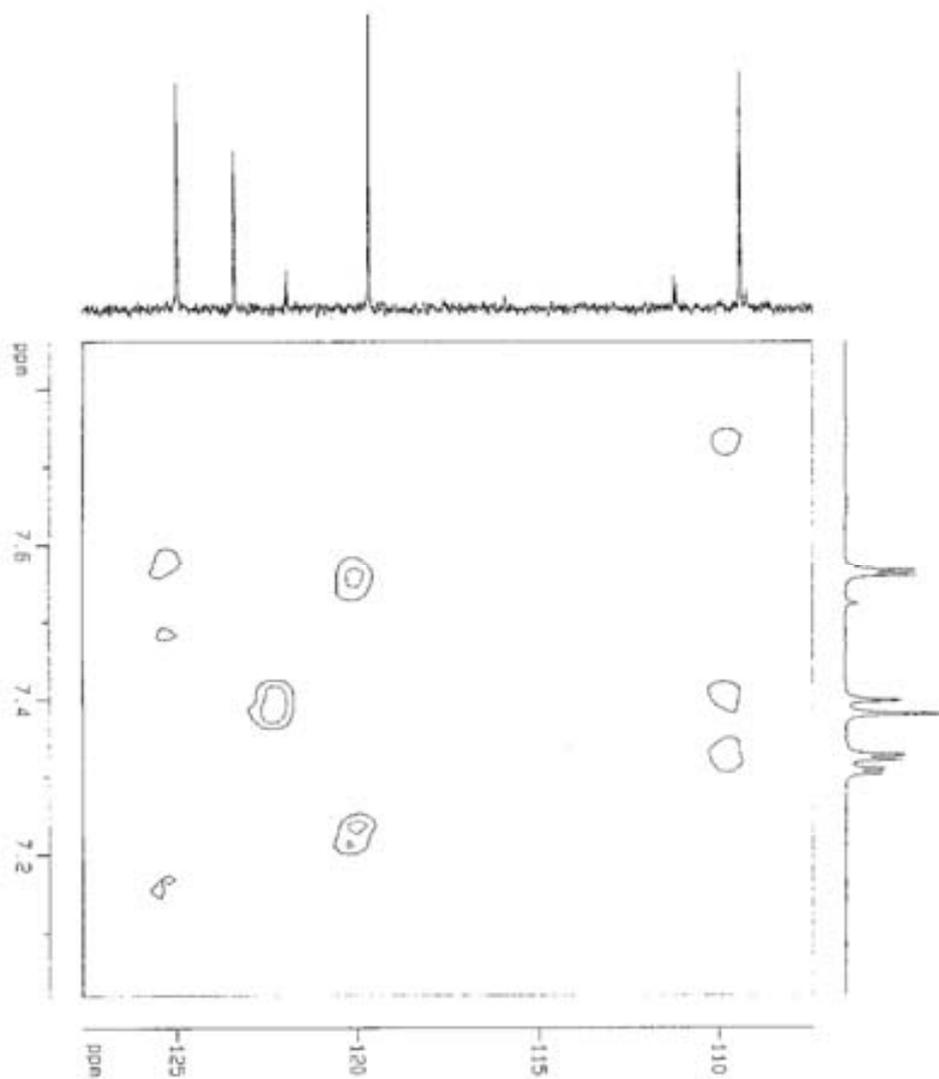
RMN HMBC, pyridina, 1,3,7-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona



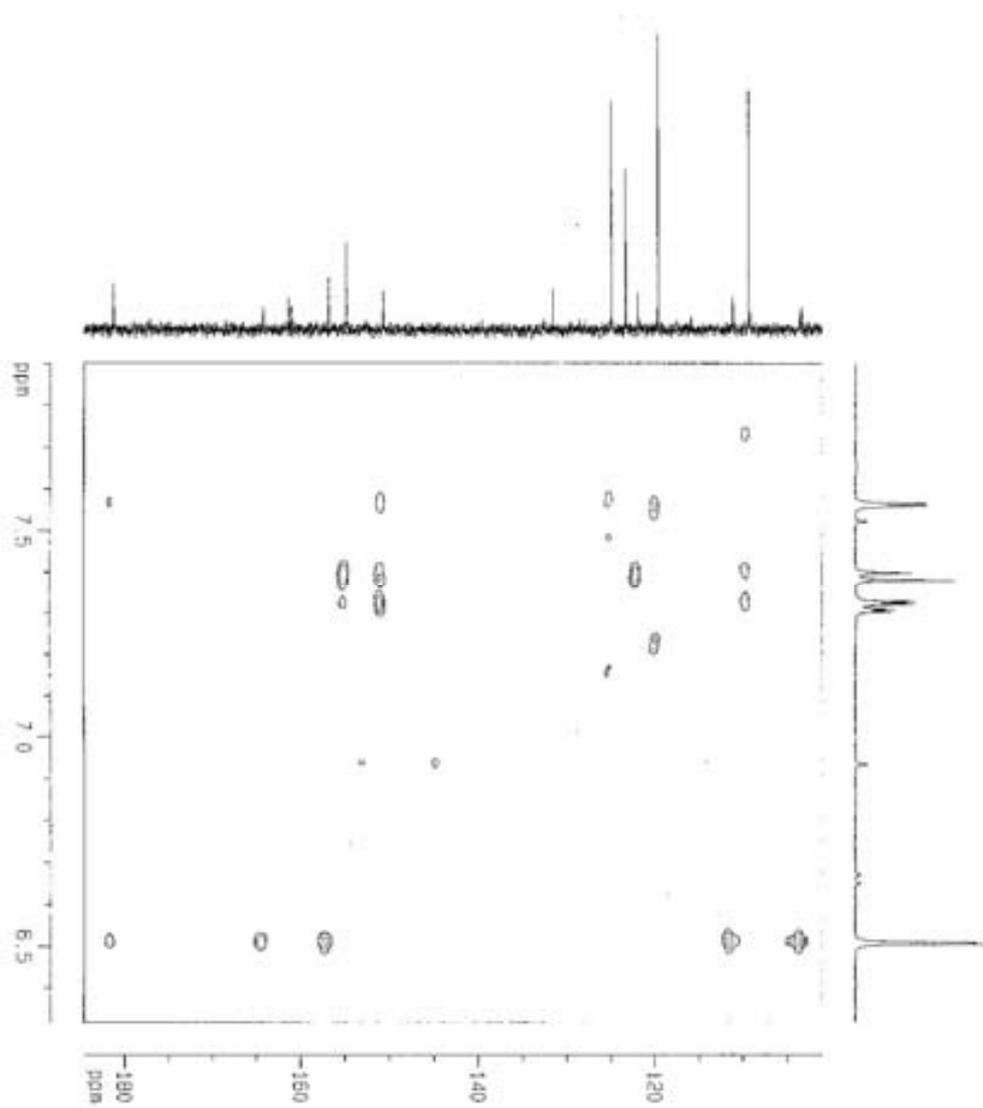
RMN HMBC, pyridina, 1,3,7-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona



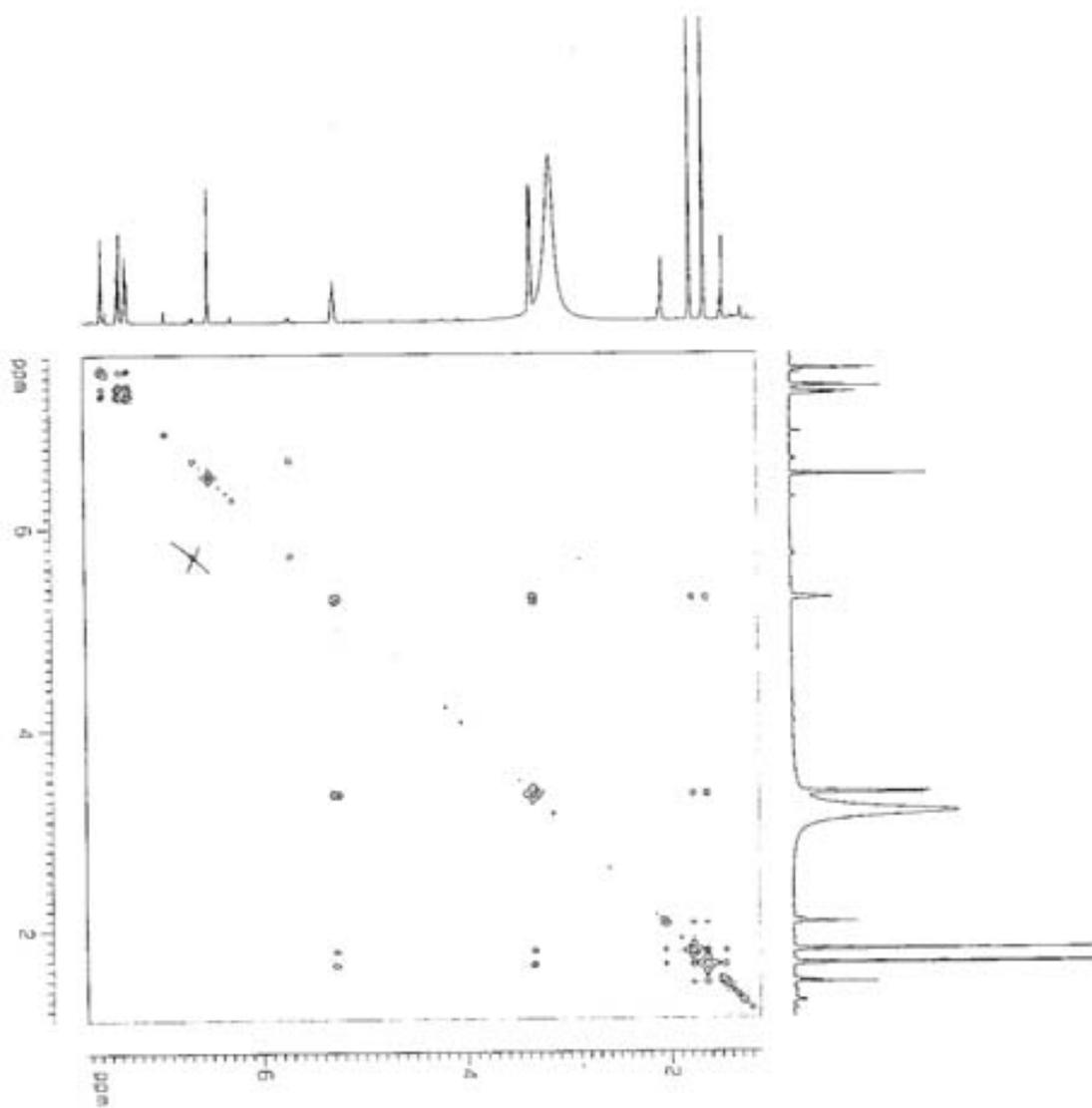
RMN HMBC, pyridina, 1,3,7-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona



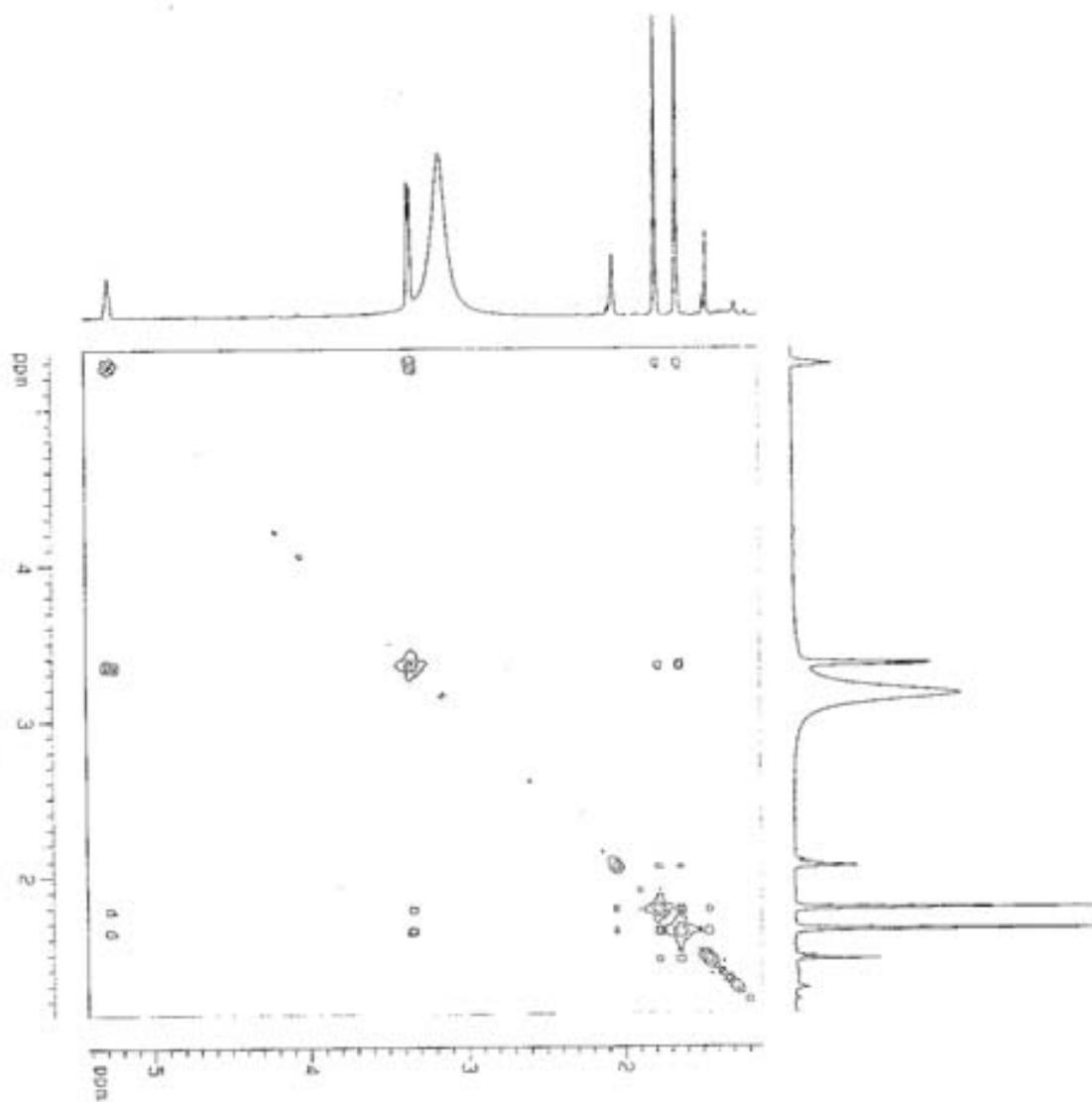
RMN HMBC, pyridina, 1,3,7-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona



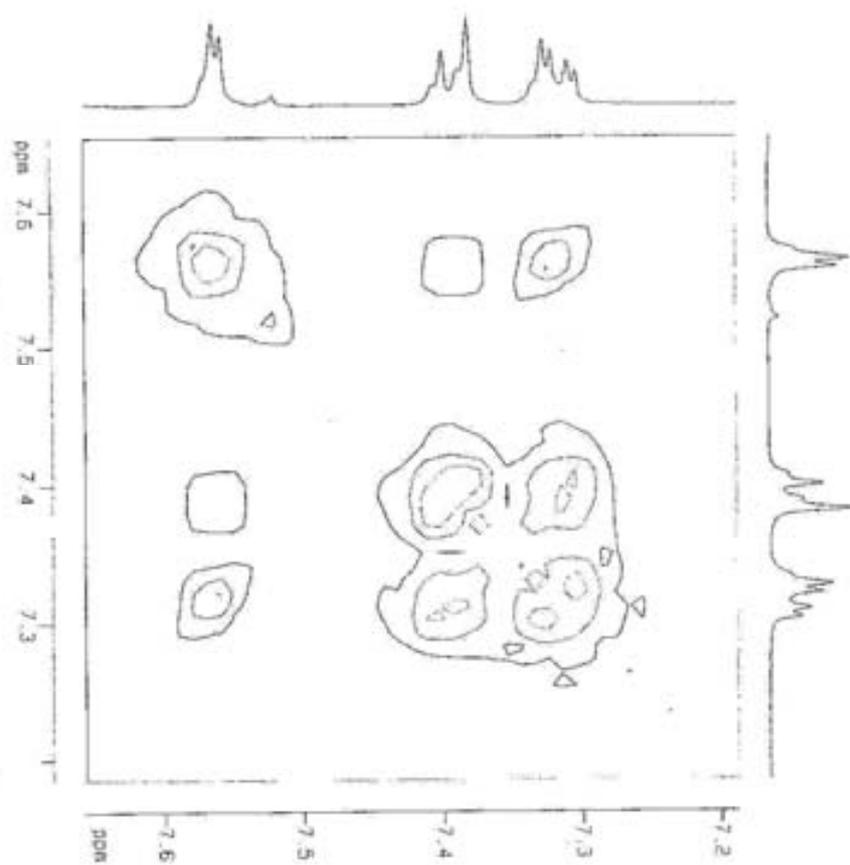
RMN COSY, acetona, 1,3,7-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona



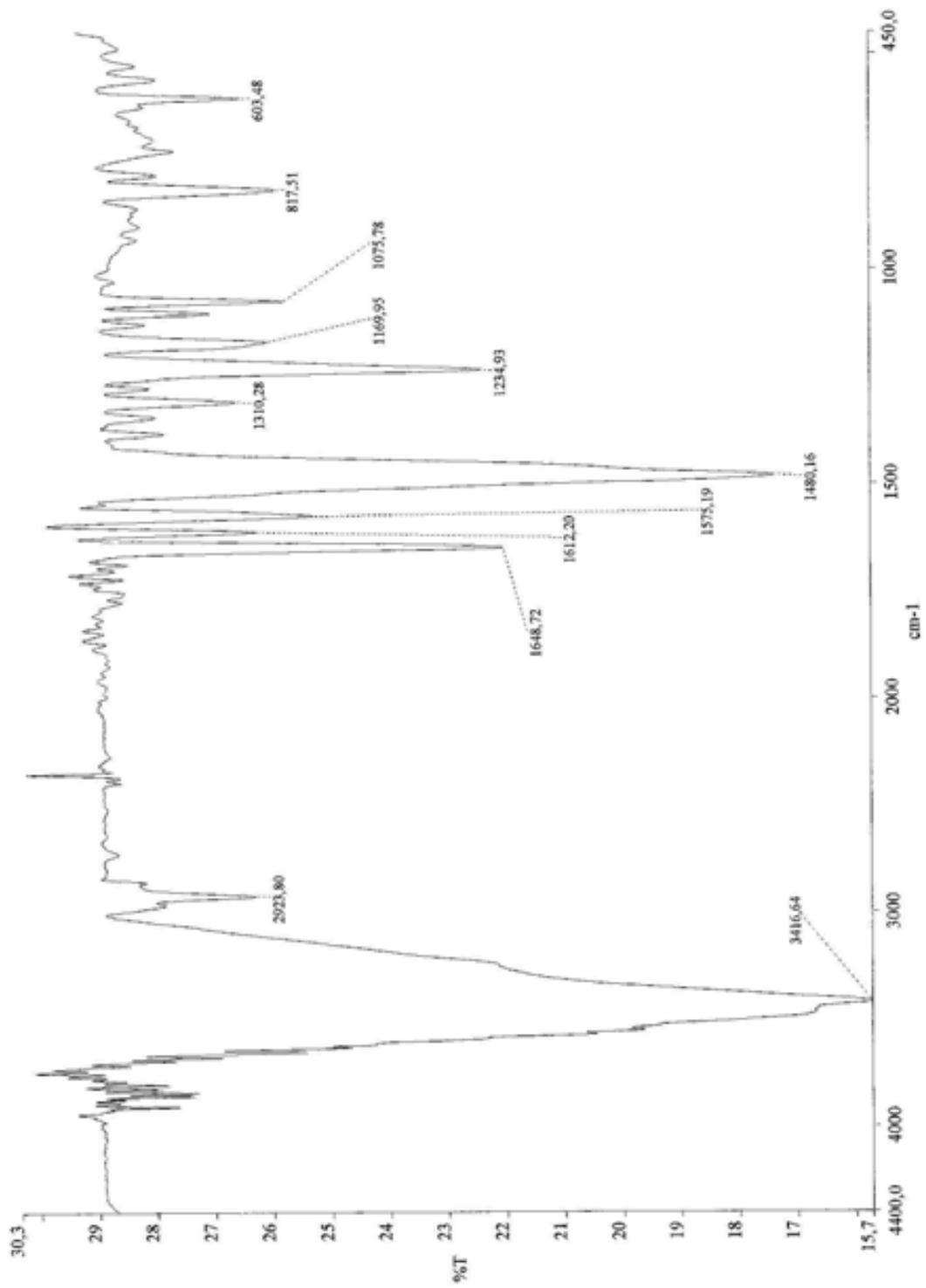
RMN COSY, acetona, 1,3,7-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona



RMN COSY, acetona, 1,3,7-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona



Espectro de Infravermelho - 1,3,7-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona

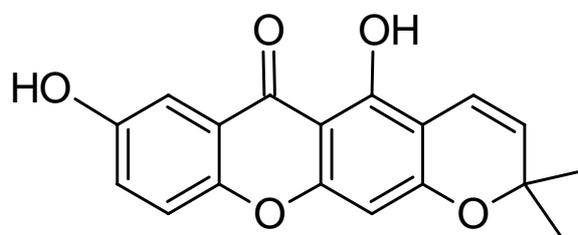


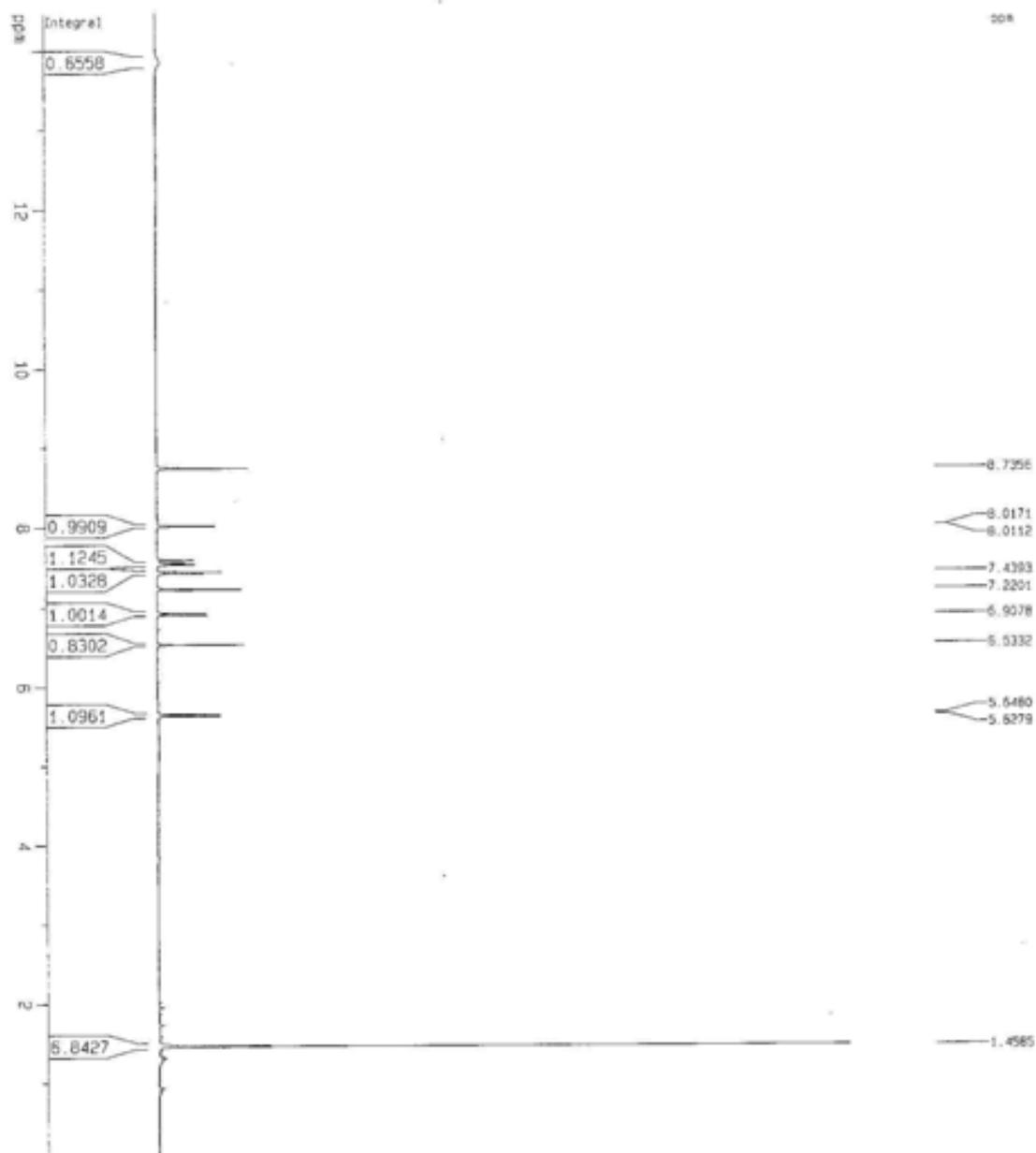
Anexo II
Espectros e Tabelas de RMN e IV
Osajaxantona

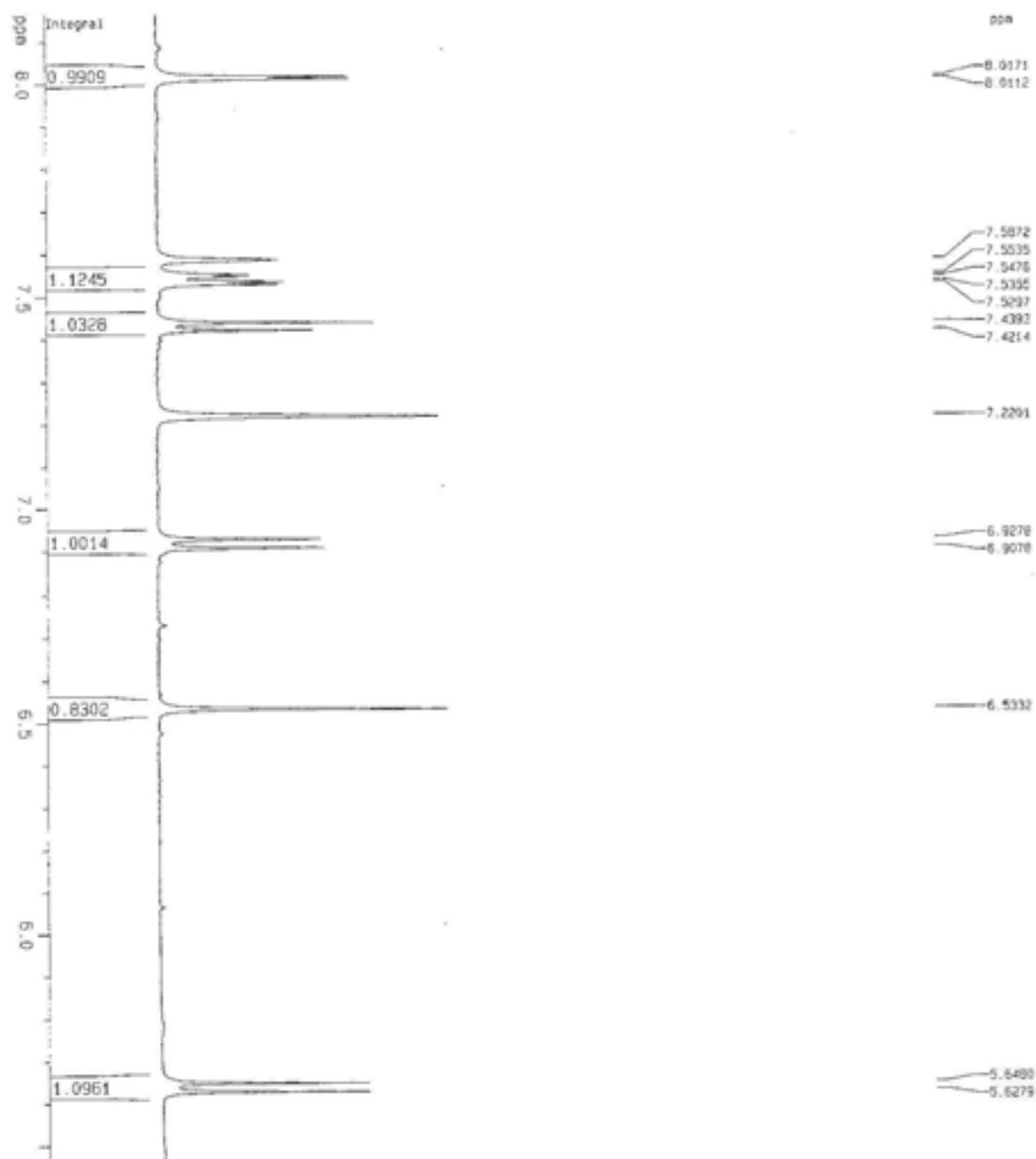
Dados de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ^{13}C e ^1H (HSQC)

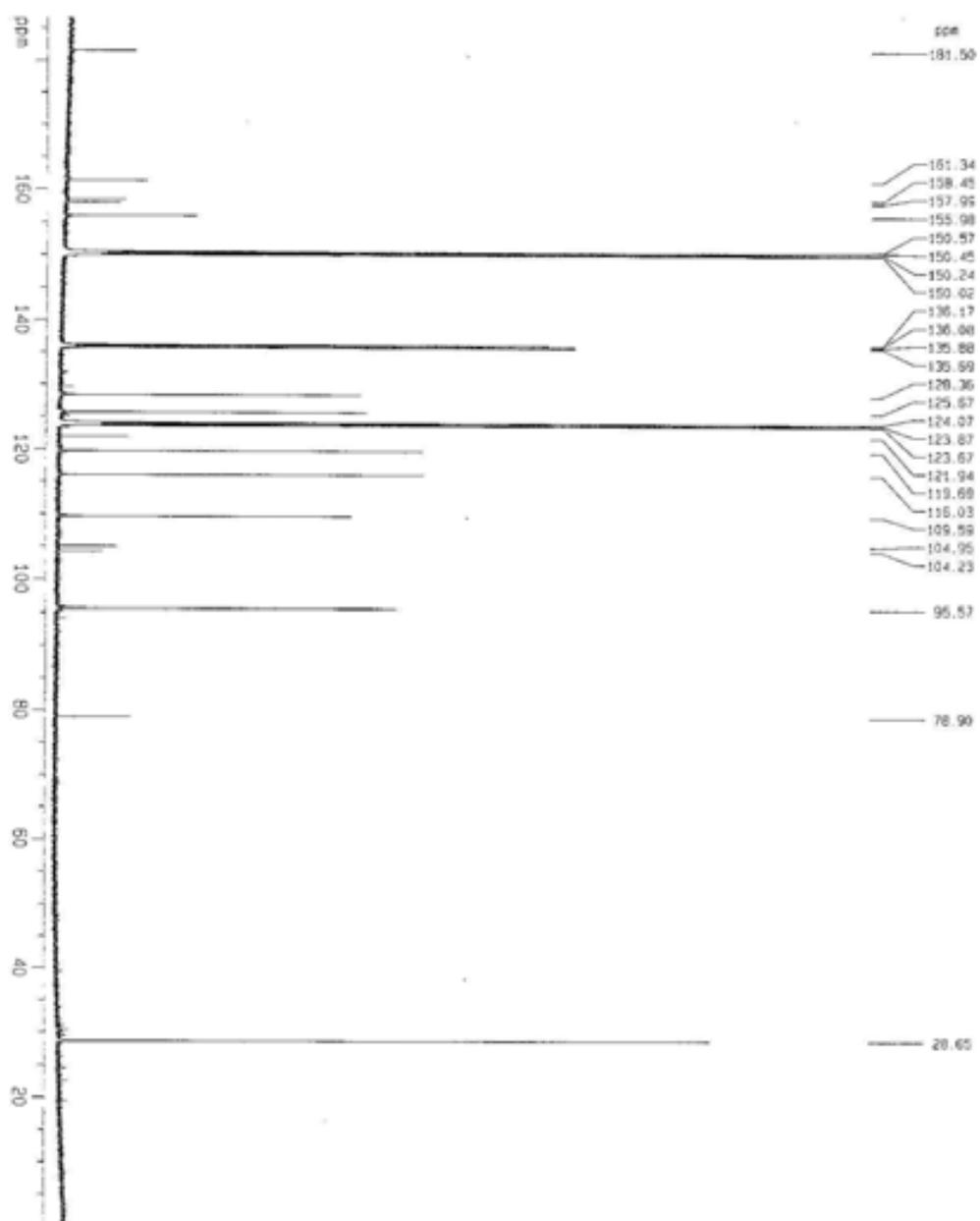
Osajaxantona

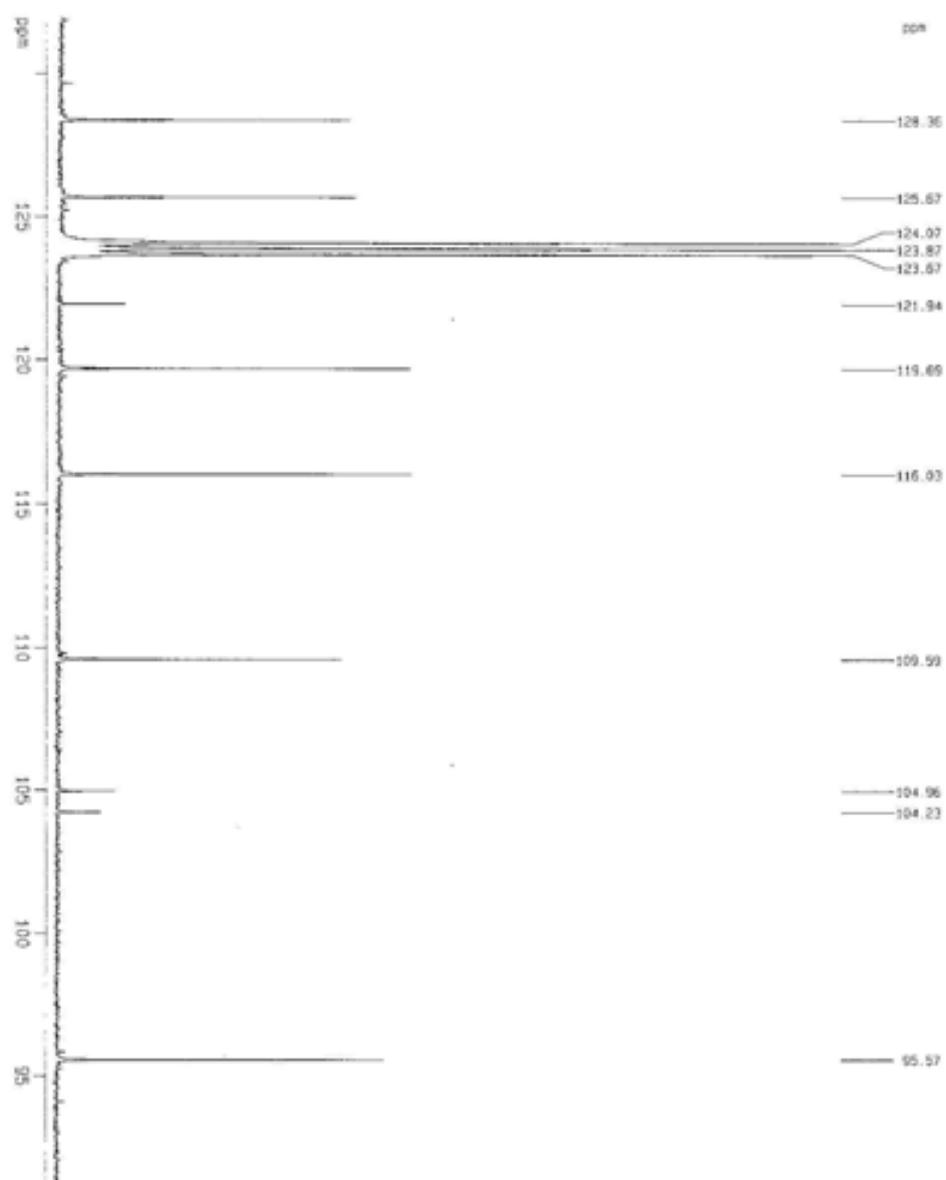
C	RMN ^{13}C	HSQC
1	124,06	
2	128,36	5,63 (1H, <i>dd</i> , $J = 10,1$ Hz)
3	116,03	6,92 (1H, <i>d</i> , $J=10$ Hz)
4	161,34	
5	181,50	
6	109,59	8,01 (1H, <i>d</i> , $J = 3,0$ Hz)
7	157,99	
8	125,67	7,54 (1H, <i>dd</i> , $J = 2,95$ e $9,0$ Hz)
9	119,69	7,43 (1H, <i>d</i> , $J = 10$ Hz)
10	95,57	6,53 (1H, <i>s</i>)
11	158,45	
12	104,96	
13	104,23	
14	121,94	
15	155,98	
16	157,99	
17	28,65	1,46 (6H, <i>s</i>)
18	78,90	

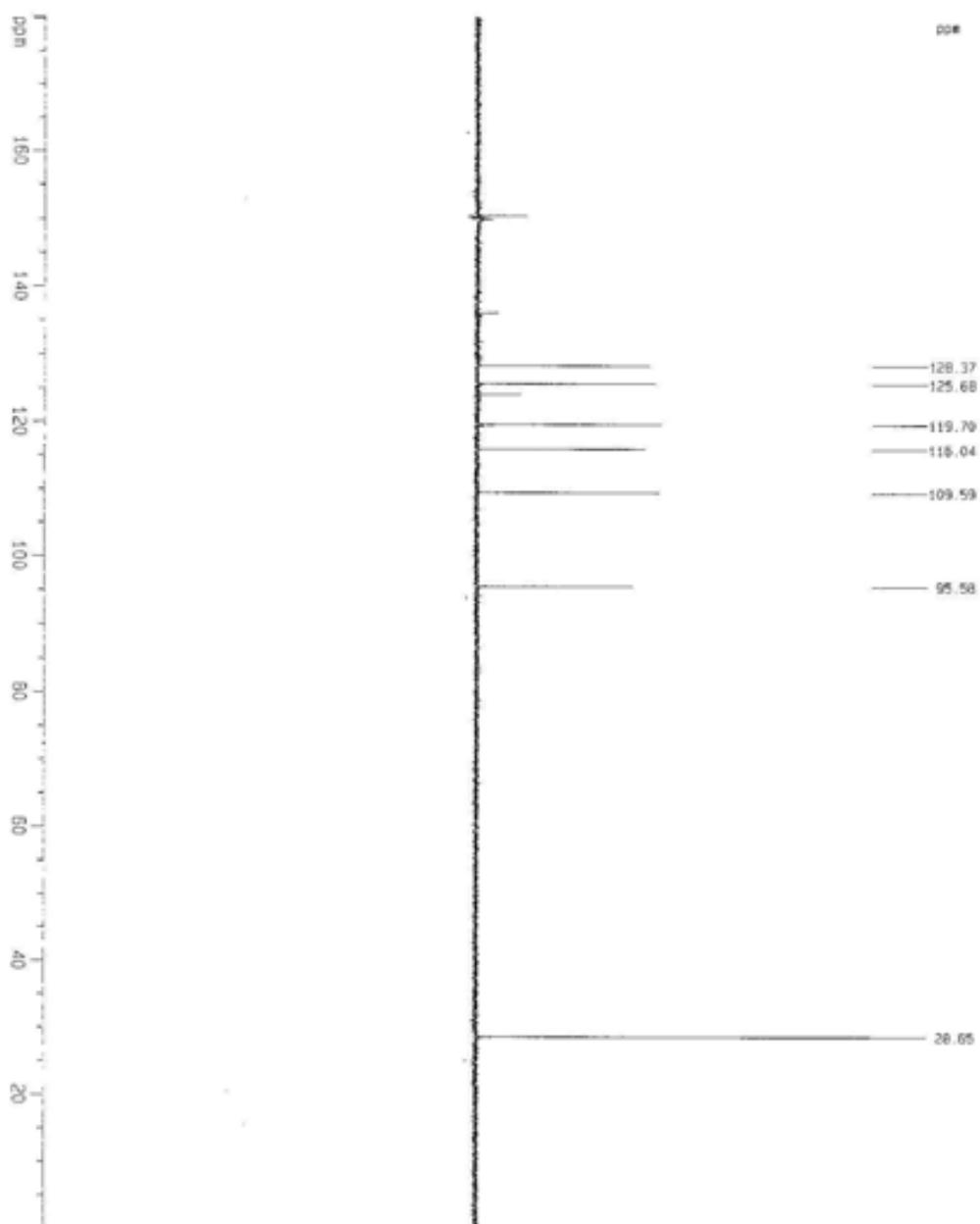


RMN ^1H , piridina, osajaxantona

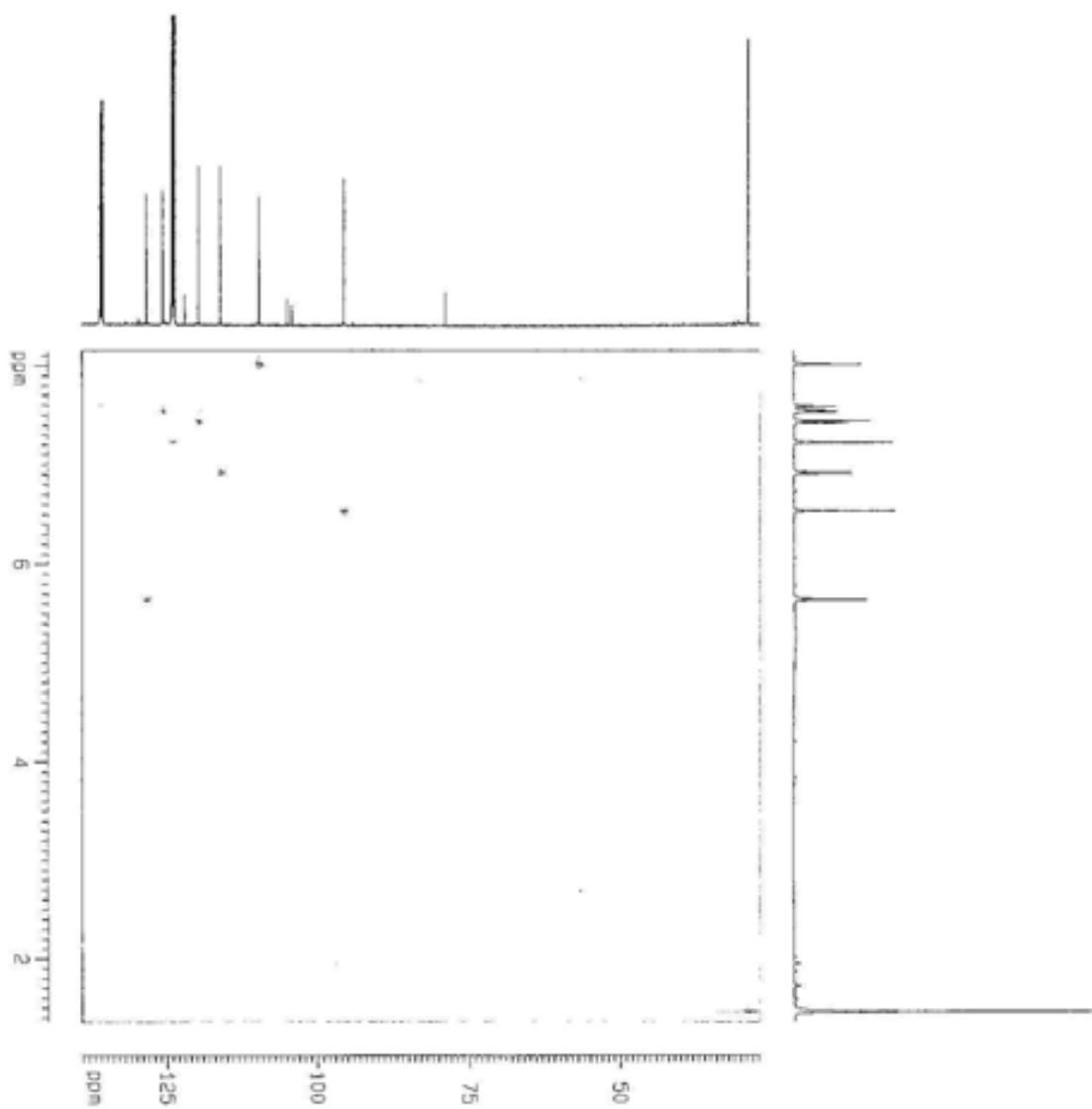
RMN ^1H , piridina, osajaxantona

RMN ^{13}C -BB, piridina, osajaxantona

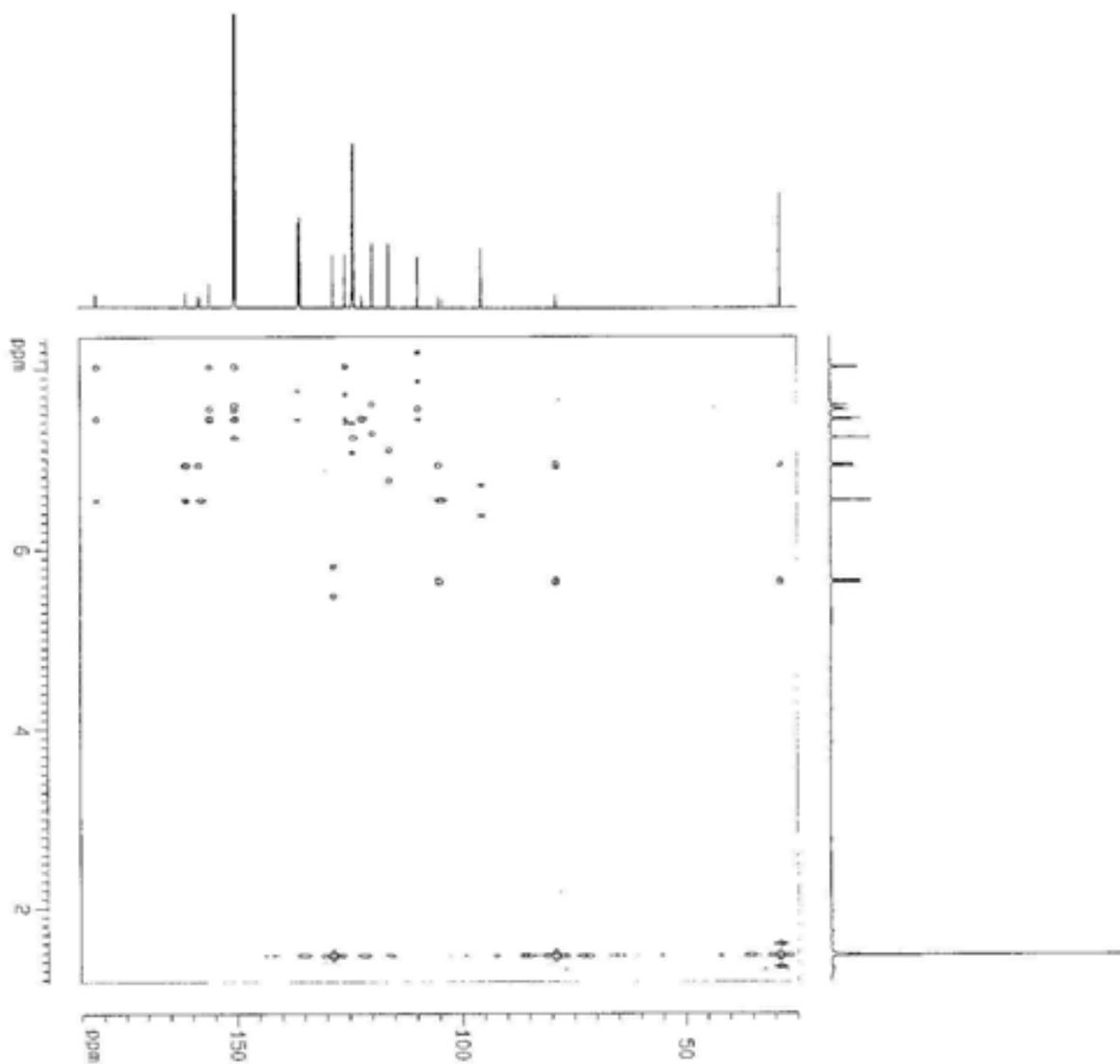
RMN ^{13}C -BB, piridina, osajaxantona

RMN ^{13}C D-135, piridina, osajaxantona

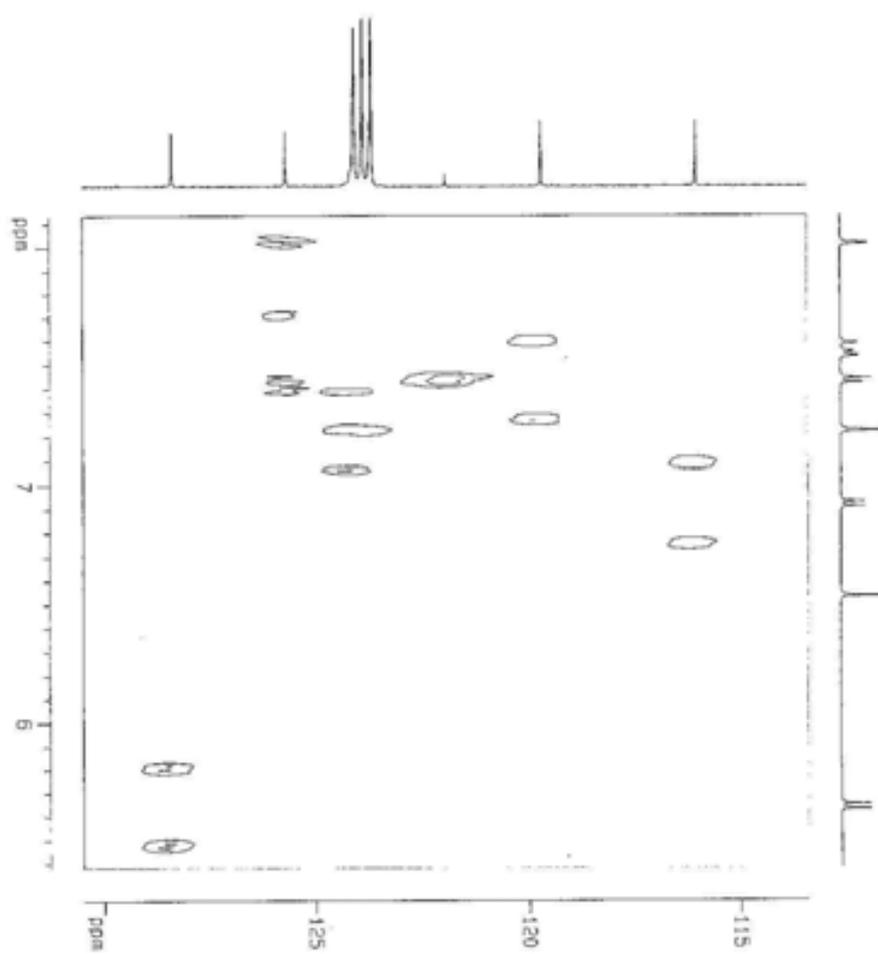
RMN HSQC, piridina, osajaxantona



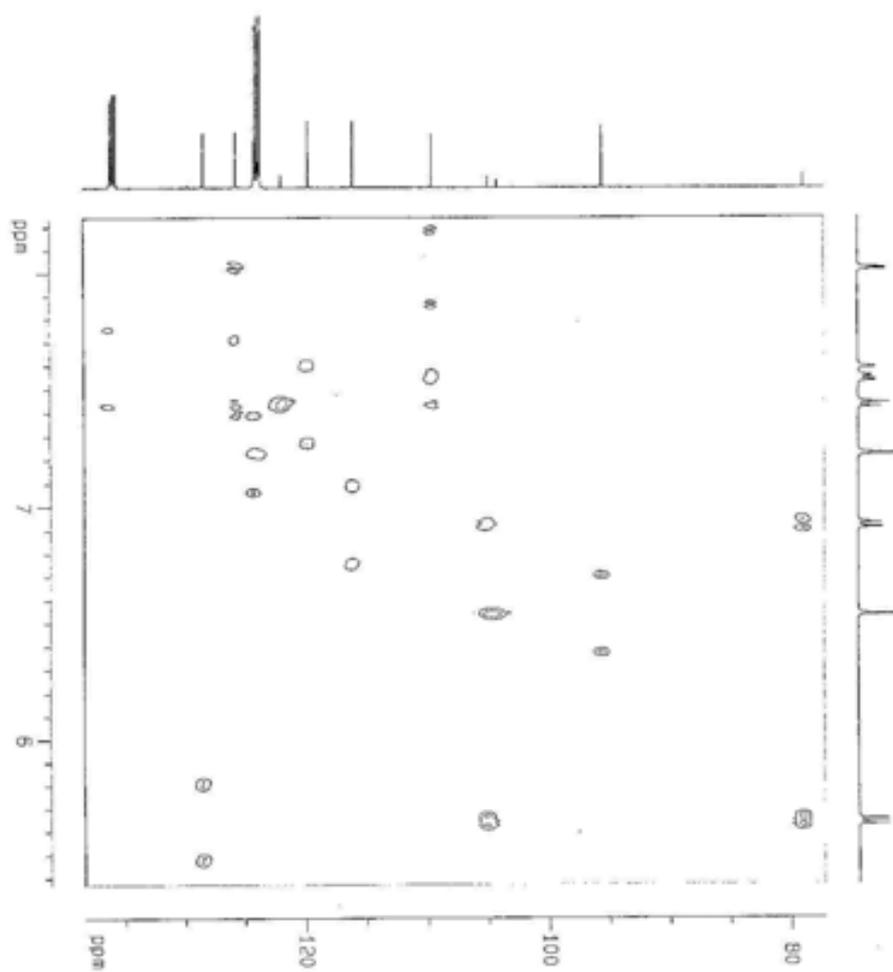
RMN HMBC, piridina, osajaxantona



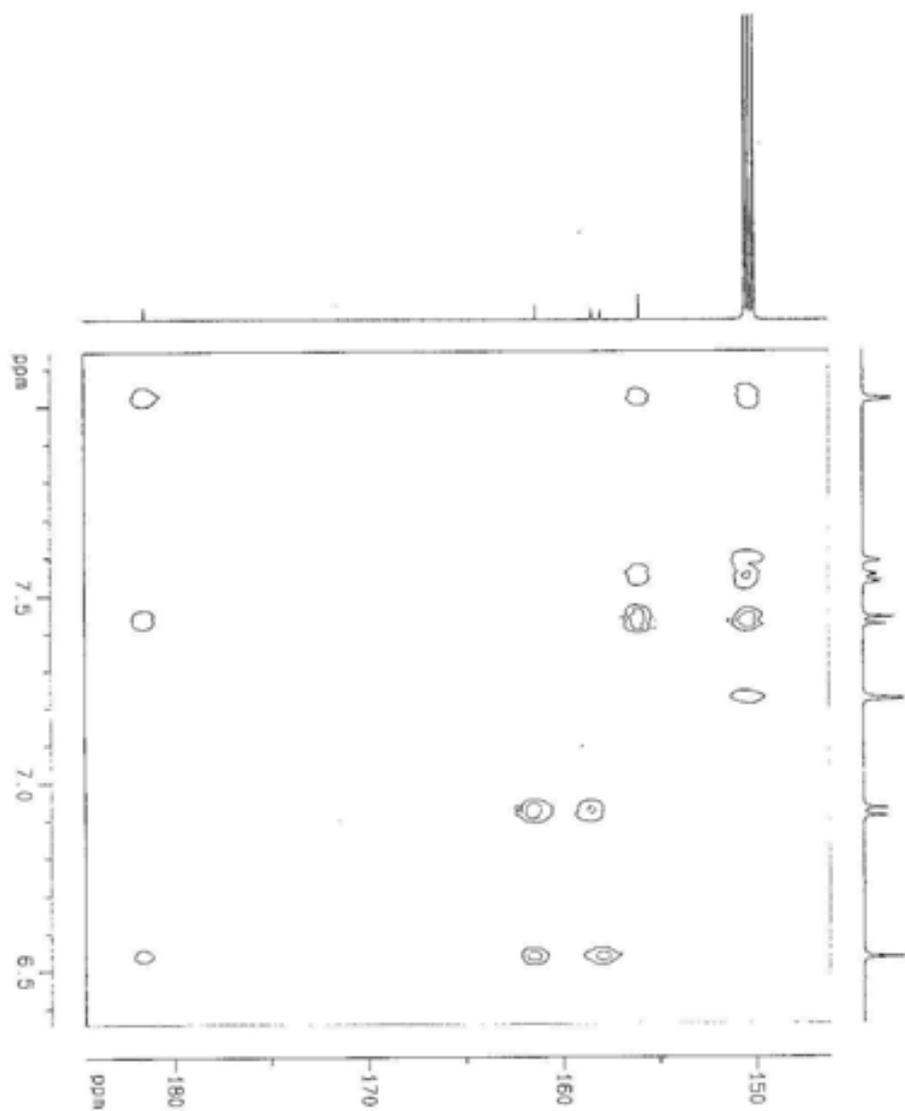
RMN HMBC, piridina, osajaxantona



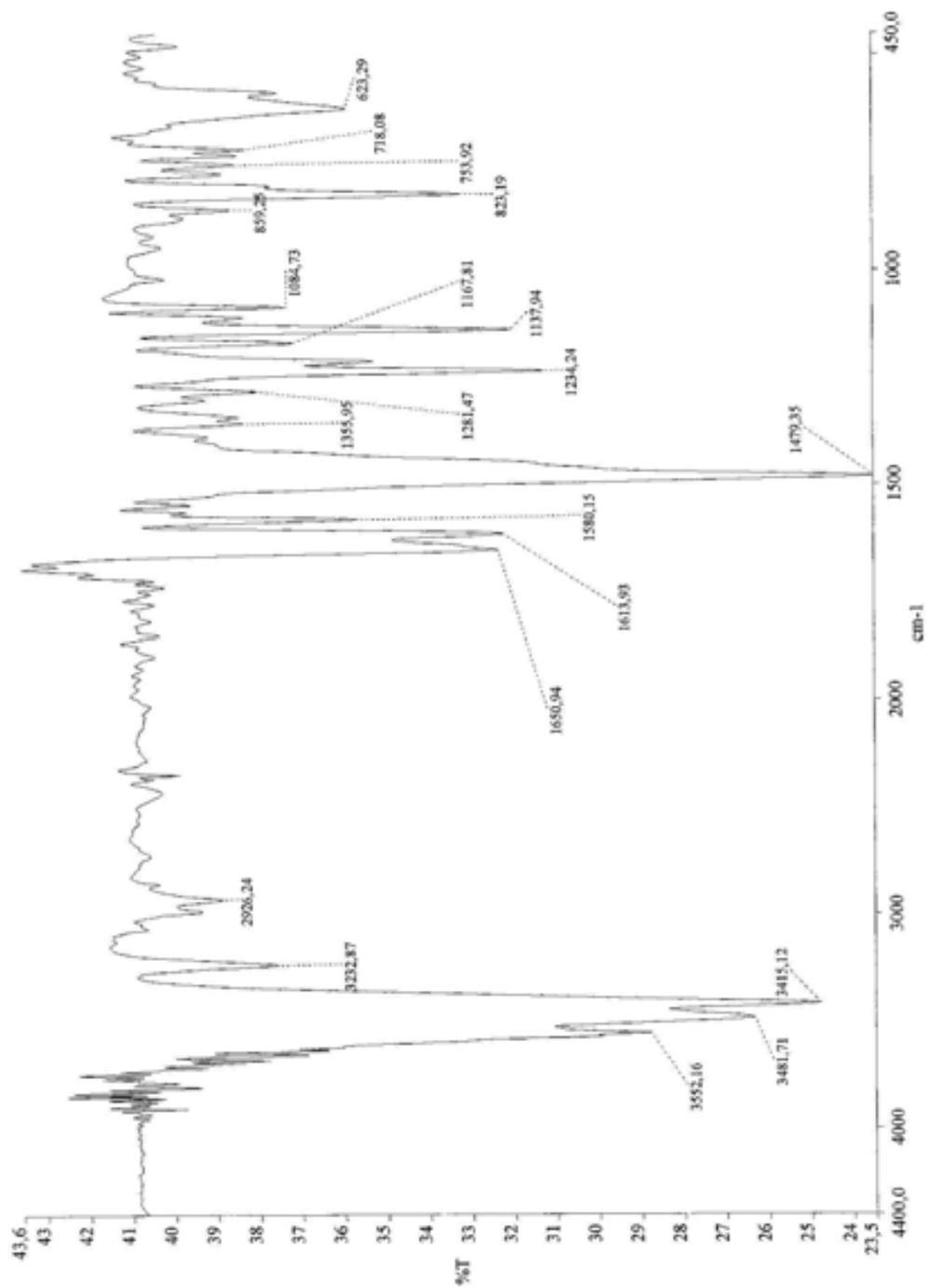
RMN HMBC, piridina, osajaxantona



RMN HMBC, piridina, osajaxantona



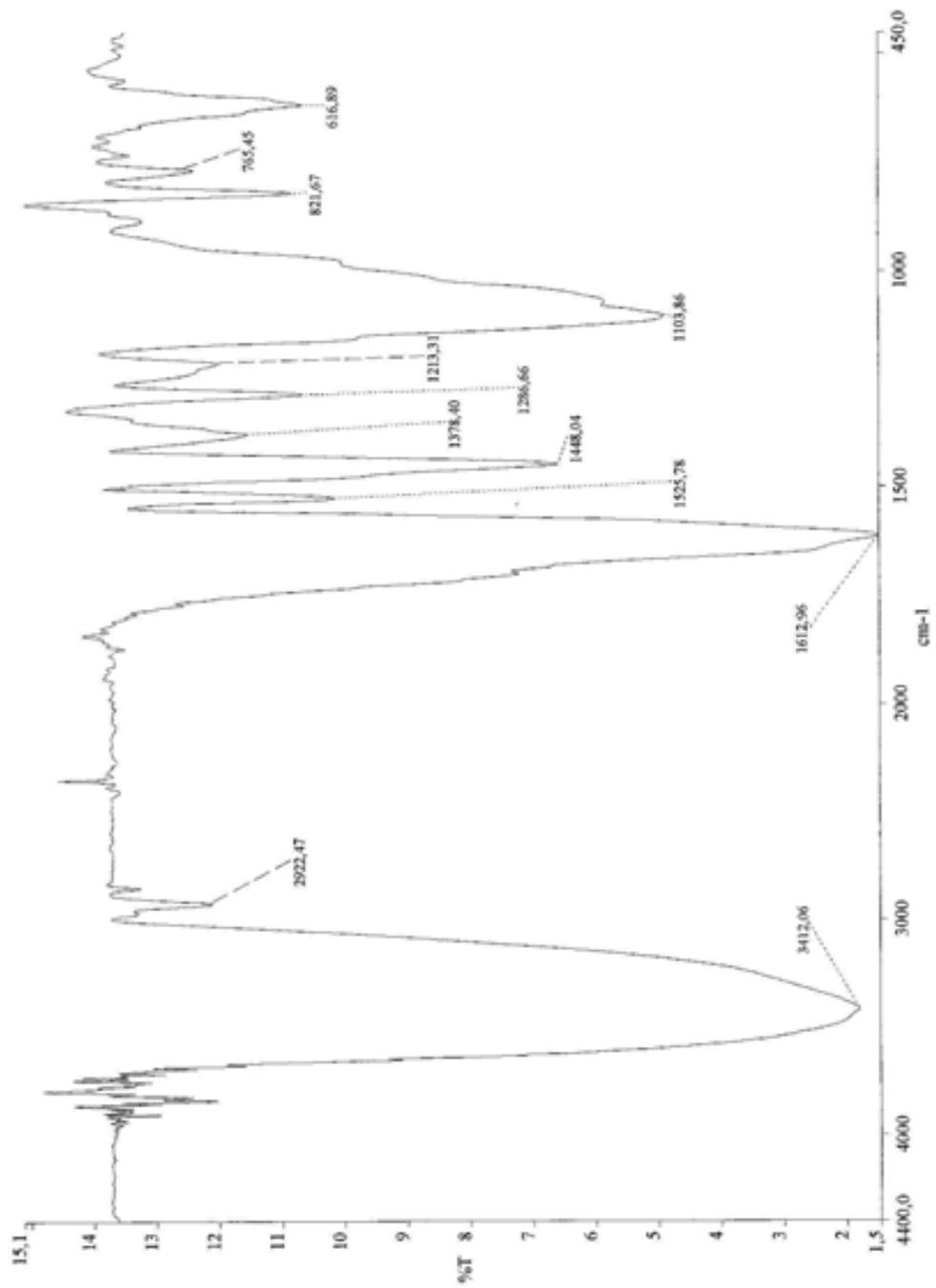
Espectro de Infravermelho - osajaxantona



Anexo III

Espectros IV Fase metanol/água e Precipitado metanol/hexano

Espectros Infravermelho - Fase metanol/água da partição líquido-líquido, fase 5



Espectro Infravermelho – Precipitado em metanol/hexano, fase 1

