



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**FRACIONAMENTO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE CONSTITUINTES
QUÍMICOS DO EXTRATO BRUTO DE *POUTERIA RAMIFLORA* (MART.)
RADLK (SAPOTACEAE) BIOMONITORADOS PELA INIBIÇÃO *IN VITRO* DA
ATIVIDADE DA ALFA-AMILASE SALIVAR HUMANA (HSA)**

Aluna: Vilma Lúcia Moura

Orientador: Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

Uberlândia/MG

2008

VILMA LUCIA MOURA

**FRACIONAMENTO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE CONSTITUINTES
QUÍMICOS DO EXTRATO BRUTO DE *POUTERIA RAMIFLORA* (MART.)
RADLK (SAPOTACEAE) BIOMONITORADOS PELA INIBIÇÃO *IN VITRO* DA
ATIVIDADE DA ALFA-AMILASE SALIVAR HUMANA (HSA)**

**Dissertação apresentada ao Programa de pós-
graduação em Genética e Bioquímica da
Universidade Federal de Uberlândia como
requisito parcial para obtenção do título de mestre
em Genética e Bioquímica.**

Área de concentração: Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

Uberlândia/MG

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

M929f Moura, Vilma Lucia, 1970-
Fracionamento e caracterização parcial de constituintes químicos do extrato bruto de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk (Sapotaceae) biomonitorados pela inibição *in vitro* da atividade da alfa-Amilase Salivar Humana (HSA) / Vilma Lucia Moura. - 2008.
55 f. : il.

Orientador: Foued Salmen Espindola.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.

1. Biotecnologia - Teses. 2. Enzimas - Teses. 3. Plantas medicinais - Teses. I. Espindola, Foued Salmen. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU:60

Elaborado pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**FRACIONAMENTO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE CONSTITUINTES
QUÍMICOS DO EXTRATO BRUTO DE *POUTERIA RAMIFLORA* (MART.)
RADLK (SAPOTACEAE) BIOMONITORADOS PELA INIBIÇÃO *IN VITRO* DA
ATIVIDADE DA ALFA-AMILASE SALIVAR HUMANA (HSA)**

Aluna: Vilma Lúcia Moura

Orientador: Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

Comissão examinadora

Presidente: _____ (orientador)

Examinadores:

Data da defesa: ____/____/____

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

(Orientador)

DEDICATÓRIA

*Dedicado este trabalho a minha família: Eudes, Sindalva, Glaucio
e Marcos;*

Co meu orientador prof. Dr. Foued Salmen Espindola- UFU

Co Labibi-UFU

"A falsa ciência gera ateus; a verdadeira ciência leva os homens a se curvar diante da divindade."

Voltaire

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus: fonte de Vida Eterna, Amigo sempre presente, responsável pelo meu lapidar dia a dia;

A minha família, responsável pelo que sou e grande incentivadora dos meus ideais;

Ao Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia/UFU;

Ao meu orientador Prof. Dr. Foued Salmen Espindola pela oportunidade de trabalhar na linha de pesquisa com plantas medicinais, pela demonstração de confiança, pela troca de idéias e discussões para a confecção deste trabalho e pelo companheirismo;

Aos Profs. Drs. Paulo Sérgio Pereira e Suzelei de Castro França -Unidade de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP pela parceria, suporte técnico e científico durante a execução da parte de fracionamento;

À Sarazete Izidia Vaz Pereira, técnica do Laboratório em Química de Produto Natural/ Unidade de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP pelo auxílio técnico;

Aos amigos e professores do Laboratório de Química de Produto Natural, Laboratório de Farmacologia e Neurociências/UFU por compartilharem o espaço físico;

A Prof. Dra. Laila Salmen Espindola do Laboratório de Farmacognosia, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, DF por fornecer parte dos extratos utilizados nos ensaios;

Ao Prof. Dr. Marcelo Tavares da Faculdade de Matemática/UFU pelas análises estatísticas dos dados;

A minha grande amiga e parceira de trabalho Neire Moura de Gouveia pelo carinho, companheirismo e por compartilhar principalmente idéias e otimismo nas horas difíceis;

Aos amigos do LABIBI-LABES/UFU pelas dicas e auxílio técnico, pelo carinho e amizade no decorrer desse tempo;

A todos que de uma forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	01
--------------------------	-----------

CAPÍTULO I - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	03
---	-----------

Alfa-Amilases: Comparação estrutural, alvo para inibidores e aplicação terapêutica e agronômica	4
Resumo	4
Abstract.....	5
Introdução.....	6
Glicosilhidrolases: A Família das alfa-Amilases	6
Similaridade estrutural entre alfa-Amilase Salivar Humana (HSA) e Pancreática (HPA).....	7
Inibidores de alfa-Amilases: impactos na saúde e agricultura.....	10
Conclusão.....	15
Referências.....	16

CAPÍTULO II.....	21
-------------------------	-----------

Fracionamento e caracterização parcial de constituintes químicos do extrato bruto de <i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.) Radlk (Sapotaceae) biomonitorados pela inibição in vitro da atividade da alfa-Amilase Salivar Humana (HSA)	22
Resumo	22
Abstract.....	23
Introdução.....	23
Resultados e discussão	26
Seção experimental	36
Enzima.	37
Substrato.....	37
Coleta, preparo do material vegetal e obtenção dos extratos brutos.	37
Avaliação da atividade inibitória in vitro dos extratos de <i>Pouteria ramiflora</i> sobre a atividade da alfa-Amilase Salivar Humana (HSA).	38
Fracionamento do extrato bruto EHPF de <i>Pouteria ramiflora</i> direcionado pelo ensaio de inibição in vitro da atividade de HSA.	39
Análise das frações de EHPF em CLAE analítica e semipreparativa.....	40
Análises estatísticas	40
Referências.....	40

LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO I

Figura 1: (a) Estrutura dimérica de HSA: domínio A (laranja), B (azul) e C (verde); íons cálcio (esfera preta) e cloreto (vermelha); I, II e III (região de interdigitação entre os monômeros); (b) coordenação dos íons às cadeias laterais dos resíduos.....9

LISTA DE FIGURAS DO CAPITULO II

Figura 1: (a) Efeito do aumento da concentração do substrato GalG2CNP na atividade enzimática de HSA (6 nM), (b) gráfico de duplo recíproco de Lineweaver e Burk mostrando a relação entre o recíproco da atividade enzimática (1/V) e o recíproco da concentração do substrato (1/S).

.....27

Figura 2: Atividade inibitória de HSA (%) na presença de extratos de *Pouteria ramiflora* a 10 mg/mL após pré-incubação de 10 e 30min. A concentração de extrato no volume final de reação é de 32 µL/mL. Os resultados são expressos como médias ± DP (n=11), * p< 0.05 pelo teste Scott-Knott (1974).

.....28

Figura 3: Perfil cromatográfico em sílicagel das frações do EHPF provenientes da coluna em Sephadex LH20, fase móvel BAW (n-butanol:ácido acético:água-4:1:5 v/v) reveladas com NP/PEG (solução metanólica 1 % de difenilborinato de 2-aminoetila e polietilenoglicol (solução etanólica 5 %); em (a) frações reunidas da coluna em sephadex LH20 (F1 a F15-linhas de 1 a 15) em (b) frações reunidas denominadas de POU1a, POU1b e POU2 respectivamente.

.....32

Figura 4: Obtenção do composto (1) proveniente da fração POU1aF e do composto 2 em mistura proveniente da fração POU1bF do EHPF de *Pouteria ramiflora* provenientes da separação em CLAE semipreparativa, coluna octadecilsilano C18 fase reversa 250 x 10.0 mm, 5 µm de diâmetro, usando como eluente metanol e água com 0.01 % de ácido acético a 280 nm. Em (a) fração POU1aF (25-30), (b) fração POU1bF (31-32). (c) e (d) corresponde a CLAE analítica, coluna octadecilsilano C18 fase reversa 250 x 4.6 mm, 5 µm de diâmetro, usando como eluente metanol e água com 0.1 % de ácido acético a 254 nm de POU1aF (25-30) e POU1b (31-32).

.....34

LISTA DE TABELAS DO CAPITULO II

Tabela 1: Efeito dos diferentes extratos (solventes e parte da planta) de <i>P. ramiflora</i> sobre a inibição da atividade da alfa-Amilase da amostra de HSA pré-incubada 30 minutos com os extratos na concentração de 10 mg/mL.....	29
Tabela 2: Rendimento (mg) das frações provenientes do fracionamento em coluna Sephadex LH20 do extrato EHPF de <i>P. ramiflora</i> e efeito inibitório destas frações sobre a atividade da HSA (%)......	31
Tabela 3: Rendimento (mg) e inibição (%) da atividade de HSA das sub-frações de POU1aF, POU1bF e POU2F provenientes da cromatografia em CLAE semipreparativa.....	33

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CCD: cromatografia em camada delgada
CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência
CNP: cloronitrofenol
DMSO: dimetilsulfóxido
EADPC: extrato aquoso por decocção da casca de *P. ramiflora*
EAIPC: extrato aquoso por infusão da casca de *P. ramiflora*
EDTA: ácido etilenodiaminotetracético
EECC: extrato etanólico da casca do caule de *P. ramiflora*
EECR: extrato etanólico da casca da raiz de *P. ramiflora*
EEF: extrato etanólico da folha de *P. ramiflora*
EEMC: extrato etanólico da madeira do caule de *P. ramiflora*
EEMR: extrato etanólico da madeira da raiz de *P. ramiflora*
EGTA: ácido etilenoglicoltetracético
EHPC: extrato hidroalcoólico da casca de *P. ramiflora*
EHPF: extrato hidroalcoólico da casca de *P. ramiflora*
Gal-G2: β -(1,4)-galactopiranosilmaltosídeo
GalG2CNP: 2-cloro-4-nitrofenil- β -(1,4)-galactopiranosilmaltosídeo
HPA: alfa-Amilase Pancreática Humana
HSA: alfa-Amilase Salivar Humana
NP: difenilborinato de 2-aminoetila
PBS: tampão fosfato em salina
PEG: polietilenoglicol
SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecilsulfato de sódio
Tris-HCl: tampão base tris adicionada de ácido clorídrico

APRESENTAÇÃO

O conhecimento e a utilização de plantas medicinais sempre têm acompanhado a evolução do homem através dos tempos. Nas últimas décadas, graças ao avanço nas pesquisas científicas houve um grande progresso no conhecimento das ações farmacológicas de espécies medicinais. No entanto, mesmo com toda a investigação científica realizada até agora, esta acaba por ser pequena em relação a toda biodiversidade brasileira disponível.

Na área farmacêutica é nítido o interesse em produtos naturais como protótipos para o desenvolvimento de fármacos e como fonte de matérias-primas farmacêuticas para obtenção de medicamentos fitoterápicos que são elaborados exclusivamente à partir de espécies vegetais.

Atualmente, entre as enzimas de interesse industrial as amilases apresentam amplo campo de aplicação biotecnológica. Na indústria de alimentos, na liquefação do amido para a obtenção de glicose, em produtos de panificação, em cervejarias e bebidas fermentadas, na indústria de papel e celulose, indústria têxtil e química. Na área farmacêutica sua aplicação é na produção de vitaminas e antibióticos. As alfa-Amilases de origem salivar e pancreática atuam na degradação de carboidratos da dieta humana e são de grande interesse no diagnóstico clínico. A inibição da função dessas enzimas envolvidas na digestão de carboidratos pode ser útil no controle de diabetes mellitus tipo 2 e obesidade.

No entanto, o presente estudo enfoca-se na inibição da atividade da alfa-Amilase Salivar Humana. Esta preferência pelo uso de HSA nos modelos de inibição é devido à maior disponibilidade da amostra, sua abundância na saliva, pela similaridade estrutural com HPA que é o alvo para diminuição da disponibilidade de glicose para o organismo e por ser a saliva coletada por método não invasivo oferecendo biossegurança de classe I.

Em um estudo anterior, conduzido em nosso laboratório, verificou-se a atividade inibitória de 100 extratos hexânicos e etanólicos de extratos de plantas do Cerrado sobre a atividade da alfa-Amilase Salivar Humana. Este ensaio de bioprospecção mostrou que os extratos etanólicos de *Pouteria*

ramiflora (Mart.) Radlk (Sapotaceae) exibiam níveis de atividade inibitória de 61 a 100%. Na literatura há poucos relatos de estudos referentes a espécies deste gênero. Considerando o potencial desta espécie em inibir a atividade da alfa-Amilase Salivar Humana, procurou-se neste estudo isolar e identificar esses compostos ativos na perspectiva de obter moléculas promissoras que possam servir futuramente de modelos na busca de uma nova estratégia terapêutica para tratar as desordens do metabolismo de açúcar e obesidade.

Esta dissertação é apresentada em dois capítulos, formatado de acordo com a revista a ser submetida e a formatação final da dissertação, de acordo com a exigência deste Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. O primeiro capítulo apresenta uma revisão da literatura sobre a similaridade estrutural entre as alfa-Amilases Humana (Salivar e Pancreática) e aplicação dos inibidores de amilase na saúde humana e agricultura. O segundo capítulo apresenta os estudos de inibição de extratos aquosos, etanólicos e hidroalcoólicos das cascas e folhas de *Pouteria ramiflora* (preparados com matéria prima coletada em Uberlândia e extratos fornecidos pela UNB), escolhendo o extrato mais potente para o fracionamento, purificação e isolamento dos ativos do extrato bruto de *Pouteria ramiflora*, monitorados pelos testes de inibição *in vitro* da atividade da alfa-Amilase Salivar Humana com posterior elucidação estrutural por meio de técnicas espectrofotométricas. Os ensaios de inibição da atividade enzimática foram realizados utilizando ensaio cinético tendo como substrato sintético o GalG2CNP realizado em microplacas em equipamento termostatizado. A enzima utilizada nestes ensaios foi preparada a partir de um pool de saliva humana de voluntários saudáveis, segundo protocolo de rotina e submetida à coluna de cromatografia de troca iônica obtendo-se uma fração enriquecida em alfa-Amilase.

CAPÍTULO I – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Alfa-Amilases: Comparação estrutural, alvo para inibidores e aplicação terapêutica e agronômica

Capítulo de revisão a ser submetido a revista Journal of Natural Products

Alfa-Amilases: Comparação estrutural, alvo para inibidores e aplicação terapêutica e agrônômica

Vilma L. Moura, †Foued S. Espindola*†

†Instituto de Genética e Bioquímica, Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil

Resumo

As alfa-Amilases são enzimas importantes na primeira etapa do metabolismo de carboidratos em microorganismos, animais e plantas. Humanos possuem as alfa-Amilases Salivar (HSA) e Pancreática (HPA) similares na seqüência de aminoácidos e estrutura e que hidrolisam as ligações glicosídicas alfa-(1-4) do amido na cavidade oral e intestino. Esta similaridade é importante em pesquisas iniciais, de inibidores da digestão de amido, para o desenvolvimento de novas drogas potenciais para o controle da hiperglicemia pós-prandial através de pesquisa *in vitro* tendo HSA como alvo. HSA além de abundante na saliva possui vantagens na coleta e processamento permitindo estudos de caracterização dos inibidores naturais. Esta revisão mostra aspectos de comparação estrutural entre HSA e HPA, origem dos inibidores e sua aplicação na terapêutica e agricultura. Discute também aspectos contraditórios do uso da faseolamina como suplemento alimentar para perda de peso. A faseolamina é uma glicoproteína de *Phaseolus vulgaris* que inibi a atividade da amilase assim como outros inibidores. Além disso, nutracêuticos inibidores de alfa-Amilase podem ser úteis no controle da hiperglicemia pós-prandial em pacientes diabéticos e obesos. A descoberta de inibidores de amilases em plantas pode direcionar a clonagem desses genes podendo ser expressos em cultivares ajudando no combate a pragas que causam perdas econômicas na agricultura.

Palavras-chave: alfa-Amilase Salivar Humana, inibidores naturais, hiperglicemia pós-prandial.

Abstract

The alpha-amylases are enzymes important in the first's steps of carbohydrate metabolism in microorganisms, animals and plants. Humans have saliva and pancreatic alpha-amylases similar in sequence and structure to hydrolyze of alfa-(1-4) glycosidic linkages starch in the oral cavity and in the intestine. This similarities are important to initially search natural inhibitors of starch digestion that could be used as potential new drugs to control postprandial hyperglycemic throughout of *in vitro* approaches targeting HSA. HSA is abundant in saliva sample and has many advantages to be collected and processed allowing screening and characterization studies searching for these natural inhibitors. This review shows aspect estructural of HSA and HPA and the origin of available inhibitors and its application in therapeutics and agricultural. Moreover, discuss contradictory aspects of using phaseolamine, as food supplement to weight lost. Phaseolamine is a glycoprotein from the *Phaseolus vulgaris* that inhibit amylase activity such as other inhibitors. Therefore, nutraceuticals that inhibits alpha-amylase may are useful in postprandial hyperglycemic control with potential therapeutic application for diabetics and obeses patients. Also, the discoveries of plant amylase inhibitors can drive cloning of these inhibitors genes that can be expressed in cultivars helping in the combat of insects that cause economical lost in the agricultural.

Key words: Human Salivary alpha-Amylase, natural inhibitors, postprandial hyperglycemic.

Introdução

A saliva é um fluido presente na cavidade oral, produzida por diferentes glândulas salivares (parótida, submandibular e sublingual) apresentando uma composição variada em proteínas multifuncionais. Algumas proteínas são únicas deste fluido além de compostos inorgânicos como cálcio e fosfato que mantêm integridade mineral do dente, sódio e cloreto que mantêm a secreção final hipotônica, flúor, potássio, bicarbonato (tampão) e magnésio. As PRP's (proteínas ricas em prolinas) correspondem a 70% das proteínas totais na saliva, já as histatinas e estaterinas, mucinas, lactoferrinas e peroxidases, entre outras, estão presentes em menor concentração. ^{1,2,3}

A enzima mais abundante da saliva é a alfa-Amilase (E.C.3.2.1.1.) que catalisa a hidrólise de ligações glicosídicas internas no amido e de poli e oligossacarídeos, provenientes da alimentação, transformando em pequenas unidades que podem ser assimiladas pelo organismo. O amido não digerido na boca pela amilase salivar é levado ao intestino delgado onde sofre a ação da amilase pancreática. Esta revisão apresenta nosso interesse nas alfa-Amilases Humana que devido a sua natureza multifuncional pode ser usada como alvo para o design e eficiência de novas drogas que venham contribuir para o controle e tratamento das desordens metabólicas do açúcar, reduzindo os níveis de glicose pós-prandial, importante em pacientes com diabetes e obesidade ⁴ através da inibição de sua atividade. Aborda também a aplicação de inibidores de amilases humana e de insetos na terapêutica e para o controle de pragas e insetos na agricultura respectivamente.

Glicosilhidrolases: A Família das alfa-Amilases

As glicosilhidrolases (EC 3.2.1 a 3.2.3) constituem um amplo grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas entre dois ou mais carboidratos ou de polissacarídeos estrutural ou de reserva. ^{5,6} Estas enzimas têm sido agrupadas e classificadas em famílias de acordo com a similaridade na seqüência de aminoácidos. Quando a seqüência de duas ou mais glicosilhidrolases se alinham ao longo de um domínio, elas são agrupadas dentro de uma mesma família. A maioria das enzimas que convertem o amido

pertencem a família da alfa-Amilase ou família 13 de glicosilhidrolase catalisando uma variedade de reações incluindo hidrólise, transglicosilação, ciclização agindo sobre vários substratos catalisando as ligações $\alpha(1,4)$, $\alpha(1,6)$ ou $\alpha(1,1)$. As hidrolases e transferases que pertencem à família das α -amilases são endoglicosidases presentes em microorganismos (fungos, bactérias), plantas, animais e crustáceos se diferenciando na especificidade pelo substrato.^{7,8} Estas enzimas exibem um número variável de domínios, mas possuem em comum a estrutura em barril $(\alpha/\beta)_8$ que contém os resíduos catalíticos.⁹ Todas têm quatro regiões altamente conservadas em sua seqüência primária contendo o sítio catalítico e os mais importantes sítios de ligação ao substrato. Todas possuem resíduos Asparagina, Glutamina e Asparagina no sítio catalítico correspondendo a Asparagina 206, Glutamina 230 e Asparagina 270 da Taka-amilase A de *Aspergillus oryzae*. Agem sobre o amido, glicogênio, polissacarídeos e oligossacarídeos de maneira randômica, reduzindo grupos os quais são liberados na configuração alfa. O termo “alfa” se refere à configuração anomérica inicial do açúcar liberado e não a configuração da ligação hidrolisada.^{9,10}

Similaridade estrutural entre alfa-Amilase Salivar Humana (HSA) e Pancreática (HPA)

A alfa-Amilase Humana existe em duas formas, a alfa-Amilase Salivar Humana (HSA) e alfa-Amilase Pancreática (HPA), por isso a quebra do amido em hexoses simples ocorre em duas etapas iniciando na cavidade oral por HSA e finalizando no intestino delgado sob ação de HPA. Esta enzima digestiva chave produz uma mistura de produtos oligossacárides incluindo maltose, maltotriose e oligoglicanos $\alpha(1,6)$ e $\alpha(1,4)$. Os genes que codificam a amilase humana têm sido clonados e classificados por comparação direta da seqüência do exon de três clones de DNA de amilase humana previamente isolada do pâncreas e da saliva.¹¹ Por este critério, o genoma haplóide humano contém dois genes para amilase pancreática AMY2A e AMY2B^{11,12} e três genes que codificam amilase salivar (AMY1A, AMY1B e AMY1C) os quais não são coexpressos no pâncreas e saliva. Estes estudos mostram que há uma forte especificidade tecidual para expressão destes genes uma vez que os

genes AMY2A e AMY2B são expressos em níveis elevados no pâncreas e somente AMY2B é expresso no fígado, enquanto os genes AMY1 são expressos somente na glândula salivar. As duas alfa-Amilases possuem várias isozimas que foram separadas por focalização isoelétrica e eletroforese em gel de poliacrilamida.¹³ A análise da presença de isozimas da alfa-Amilase no soro é utilizada em diagnóstico clínico. A medida de sua atividade no soro, urina, saliva e outros fluidos biológicos serve como diagnóstico clínico indicando por exemplo a presença de tumor ovariano (níveis elevados de amilase salivar) enquanto elevados níveis de amilase pancreática pode estar associado à pancreatite aguda.¹¹

Estudos^{7,10,14-17} mostram que existe uma similaridade estrutural e funcional entre HSA (alfa-Amilase Salivar Humana) e HPA (alfa-Amilase Pancreática) com 97% de homologia entre as duas alfa-Amilases. Esta característica é particularmente fundamental em estudos de inibição de sua atividade como alvo para desenvolvimento de fármacos que venham contribuir para o controle de diabetes e obesidade, pois é simples a coleta da saliva humana para obtenção de HSA. A HSA é uma glicoproteína monomérica ligante de cálcio e dependendo do grau de glicosilação sua massa molecular pode variar entre 56 kDa (isoforma não glicosilada) e 62 kDa (glicosilada).¹³ Está envolvida na digestão inicial de carboidratos catalisando a hidrólise das ligações α -1,4 internas do amido e dextrinas levando a formação de oligossacarídeos e glicose. Sua estrutura consiste de uma única cadeia polipeptídica com 496 aminoácidos distribuídos em três domínios (A, B,C). O domínio A compreende os resíduos 1-99 e 169-404 e a estrutura em barril $(\alpha/\beta)_8$; o domínio B, resíduos 100-168 que consiste de um loop aberto contendo várias hélices e fitas β . O domínio C contém os resíduos 405-496 sendo composto por 10 fitas β .¹⁰ Acredita-se que este domínio tem papel importante na estabilidade do domínio A.⁹ Os resíduos catalíticos ácido aspártico 197, glutamina 233 e ácido aspártico 300 estão no domínio A. O íon cloreto está no domínio A próximo do sítio ativo ligado às cadeias laterais de Arginina 195, ácido aspártico 298, Arginina 337, a uma molécula de água e o íon cálcio está ligado a Histidina 201 no domínio A e por ácido aspártico 100, Arginina 158 e ácido aspártico 167 no domínio B juntamente com três

moléculas de água. Posicionamento estratégico dos íons cálcio e cloreto bem como os resíduos histidina e triptofano podem desempenhar um importante papel na diferenciação entre as extremidades glicosídica e aglicona do substrato polissacarídeo.^{10,16} Estudos¹⁸ revelam que todas as alfa-Amilases possuem pelo menos um íon cálcio fortemente conservado o qual é requerido para integridade estrutural e atividade enzimática. Estudos recentes de cristalografia de raios-X⁷ mostram que HSA pode apresentar ainda forma dimérica que pouco se diferencia das formas monoméricas anteriormente descritas.¹⁰ Embora seja o primeiro relato de HSA dimérica ainda não há evidência biológica descrita em literatura para sua ação.

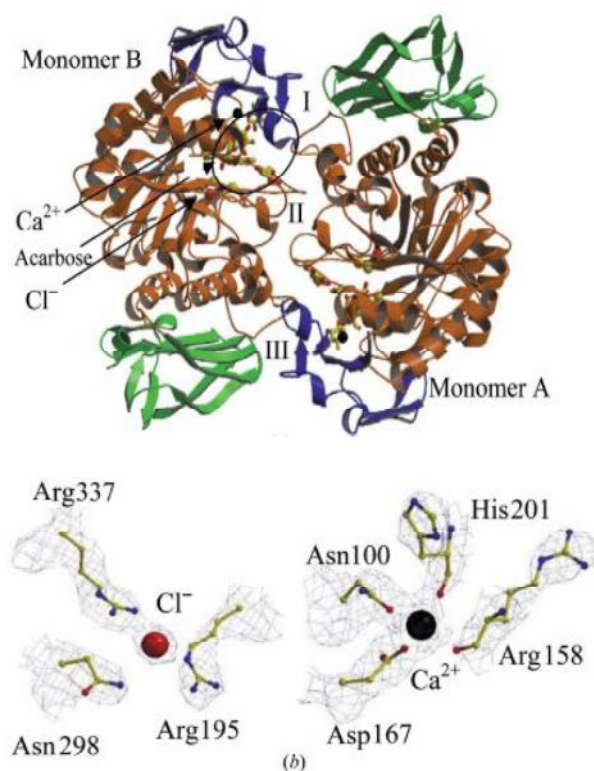


Figura 1: (a) estrutura dimérica de HSA: domínio A (laranja), B (azul) e C (verde); íons Cálcio (esfera preta) e Cloreto (vermelha); I,II e III (região de interdigitação entre os monômeros); (b) coordenação dos íons às cadeias laterais dos resíduos.

A estrutura da alfa-Amilase pancreática humana foi determinada por técnicas de difração de raio-X. HPA é uma proteína de 56 kDa com uma única cadeia polipeptídica de 496 aminoácidos, composta estruturalmente por três domínios A, B e C.¹⁹ O domínio A possui estrutura de barril (β/α)₈ que liga o íon cloreto alostericamente e o sítio ativo possui forma em “V”. O domínio B liga um íon cálcio e parece ser necessário para estabilidade estrutural do sítio ativo.

O domínio C é o domínio ligante de amido e considerando a seqüência primária, o domínio C é o mais variável entre as amilases de diferentes origens. Nestes estudos há uma comparação da estrutura de HPA com a de outras enzimas funcionalmente relacionadas como PPA (alfa-Amilase Pancreática de Porco), HSA e alfa-Amilases de fungos. Segundo apresentado por esses autores a seqüência primária de HPA possui 97% de homologia com HSA, mas funcionalmente não possui o mesmo padrão de clivagem quando testados frente a vários substratos. Uma característica estrutural que difere HPA de HSA é o resíduo de glutamina N-terminal que sofre modificação pós-traducional espontânea para formar um derivado pirrolidona estável que pode ser um mecanismo de defesa contra amino-peptidases e outras enzimas digestivas que estão presentes no meio. Esta característica é também comum para alfa-Amilase Pancreática de Porco.¹⁴ A estrutura de várias amilases como *Aspergillus niger*,¹⁹ cevada,²⁰ pancreática de porco,²¹ salivar humana¹⁰ e pancreática humana^{14,17} foram determinadas; todas estas estruturas mostram a presença de três ácidos carboxílicos no sítio ativo (D197, E233, D300-HPA) os quais desempenham papel chave na hidrólise. Devido a HPA desempenhar papel chave na digestão do amido proveniente da dieta e considerando essa similaridade estrutural com HSA, a inibição de sua atividade tem potencial valor terapêutico no tratamento de doenças como diabetes e obesidade. Portanto, conhecer o mecanismo catalítico de HSA é essencial como modelo ou ferramenta para o desenvolvimento de novas drogas que venham contribuir para uma qualidade de vida melhor para os pacientes que sofrem das desordens metabólicas do açúcar e lipídios.

Inibidores de alfa-Amilases: impactos na saúde e agricultura

As alfa-Amilases são proteínas que desempenham um importante papel no metabolismo de carboidratos de microorganismos, animais e plantas⁴ catalisando a hidrólise das ligações glicosídicas do amido e vários oligossacarídeos além de serem largamente utilizadas em biotecnologia na degradação do amido e na síntese química para a produção de oligossacarídeos por transglicosilação. Os carboidratos constituem o principal componente da dieta em humanos e insetos e sua clivagem pela alfa-Amilase é

essencial para sua assimilação. Inibindo a atividade desta enzima há uma redução do pico de glicose pós-prandial importante principalmente em pacientes diabéticos assim como diminuição do ataque de pragas em cultivares.

As plantas desenvolveram sofisticados mecanismos de defesa durante o processo de evolução, entre os quais se incluem diversos compostos químicos encontrados nos diferentes tecidos vegetais, constitutivos ou cuja síntese é induzida em resposta ao ataque de pragas e/ou patógenos. Dentre esses compostos denominados de metabólitos secundários do vegetal, encontram-se antibióticos, terpenos, alcalóides, glicosídeos cianogênicos, quitinases, lectinas, arcelinas, vicilinas,²² saponinas (ácidos oleanólicos e ursólicos)²³, taninos,^{24,25} catequinas e flavonóides; muitos destes apresentam atividade inibidora da alfa-Amilase. Atualmente, genes que conferem resistência a insetos podem ser introduzidos em plantas de interesse para reduzir sua susceptibilidade.

Considerando que as alfa-Amilases são importantes no processo metabólico de insetos, principalmente aqueles que vivem em sementes e grãos ricos em amido, muitos estudos tem sido feitos no sentido de descobrir inibidores dessas enzimas digestivas dos insetos.²⁶⁻²⁸ Sete classes de inibidores protéicos de alfa-Amilase são definidas pela similaridade na seqüência e estrutura tridimensional; seis tipos são de plantas superiores²² e um tipo ocorre em espécies de *Streptomyces*.²⁹ As seis classes^{4,22} correspondem aos tipos lectina (encontrada no feijão cujos inibidores são alfa-AI1 e alfa-AI2,^{26,30} knotina (*Amaranthus sp*), inibidor AA1,^{31,32} cereal (trigo e cevada), kunitz (trigo, arroz e cevada), taumatina (milho) e γ -purotionina (sorgo) e podem ser utilizados no controle de pestes.^{22,33} Estas classes de inibidores mostram uma variedade estrutural levando a diferentes modos de inibição e especificidade. Alguns inibidores de alfa-Amilase são altamente específicos agindo sobre alfa-Amilase de insetos (ação inseticida) não inibindo alfa-Amilase de mamíferos e outros inibidores possuem alta afinidade tanto para alfa-Amilase de inseto como de mamíferos. Entre os inibidores mais estudados estão os de trigo (*Tritium aestivum* L., Gramineae) e os de feijão (*Phaseolus vulgaris* L. Fabaceae)^{22,33-40} sendo alguns de natureza protéica.⁴¹ Os inibidores de amilases do trigo são classificados segundo sua mobilidade eletroforética em 0.19, 0.28, 0.53 sendo que os dois primeiros inibem

consideravelmente HSA, PPA e alguns insetos e o último inibe fracamente as amilases de mamíferos além de insetos; e WRP25, WRP26, WRP27 que não atuam sobre HSA e PPA, mas possuem alta afinidade por amilases de insetos. O inibidor do *Tritium aestivum* L., Gramineae var. *zarrin*,³⁹ (cultivar iraniano) denominado de 0.66 segundo sua mobilidade em eletroforese inibiu 97 % a atividade de HSA e 89,87% a de *Bacillus subtilis*. Outro estudo³⁷ levou a caracterização de um inibidor do tipo cereal no centeio, *Secale cereale* L. (Poaceae) cuja massa molecular é de 13756 Da possuindo alta homologia com inibidores bifuncionais (de alfa-Amilase e tripsina) do trigo e cevada. Apesar dessa homologia, não possui atividade contra tripsinas e não inibe amilases de mamíferos, mas inibi efetivamente amilases de insetos. Os inibidores do tipo cereal são conhecidos por suas propriedades alergênicas. A compreensão dos mecanismos inibitórios de alfa-Amilases de insetos e mamíferos proporciona sua aplicação na terapêutica, para o tratamento de diabetes e na agronomia em proteção de cultivares.

Avanços recentes no conhecimento da atividade da α -amilase e da α -glicosidase têm contribuído para o desenvolvimento de novos suplementos nutricionais e agentes farmacológicos. Substâncias como faseolamina, acarbose e voglibose atuam inibindo competitivamente a α -glicosidase.^{42,43} Como a maior parte da alimentação humana é constituída de carboidratos e a maioria do carboidrato ingerido é constituída por amido⁴ uma alternativa para reduzir a absorção deste nutriente baseia-se no uso de inibidores naturais de alfa-Amilase que é a enzima chave na hidrólise dessa molécula.

Em 1975³⁴ foi purificado um inibidor denominado de faseolamina caracterizado do feijão comum, *P. vulgaris*. Este inibidor é uma glicoproteína de massa molecular entre 45 e 50 kDa que segundo esses autores, é específica para alfa-Amilase animal (inibindo cerca de 100% a HPA e 94% HSA), mas não atua sobre as alfa-Amilases bacterianas e de plantas. Nas plantas são armazenadas nas sementes e serve como agente protetor contra insetos e outros predadores em virtude de sua habilidade em inibir a amilase digestiva desses insetos. Além da faseolamina, o grão do feijão contém substâncias tóxicas denominadas de fitohemaglutininas e faseolotoxinas e para sua comercialização deve estar livre dessas substâncias que são potencialmente aglutinantes de hemácias. Com a descoberta de que feijão, trigo, aveia, soja

possam conter níveis relativamente elevados de inibidores de alfa-Amilase, tem havido um grande interesse em suas propriedades nutricionais e terapêuticas. Este inibidor de alfa-Amilase é promissor como agente terapêutico destinado a bloquear a ação da amilase pancreática, diminuindo a hidrólise de amido e a sua posterior absorção como glicose a nível intestinal contribuindo para o tratamento de obesidade e diabetes. O efeito deste inibidor sobre a absorção de amido foi estudado em ratas e observou-se redução no ganho de peso.⁴⁶

A partir dos anos 80 muitos suplementos contendo faseolamina foram lançados no mercado como “bloqueadores de amido” para o controle da obesidade e diabetes. Entretanto a maior parte desses produtos consistia de simples extrato de *P. vulgaris* que além de possuir baixo conteúdo do inibidor continha altos teores de fitohemoaglutininas.⁴⁵ Desde então a Pharmachem Laboratories modernizou o mercado disponibilizando o Phaseolamin 2250® (enriquecida em inibidor e com menor teor de lectinas). A pesquisa clínica que comprove a eficácia desses produtos, além de escassa e com poucas publicações disponíveis, apresenta resultados controversos. Estudos⁴⁶ mostraram que as concentrações de glicose sanguínea pós-prandial e insulina do plasma não revelaram diferenças significativas entre os grupos de tratamento e placebo. Outro estudo⁴⁷ utilizando os produtos comerciais Calorex® e Starchex® mostra que os inibidores de amilase exercem efeito sobre a oxidação média dentro de 6h da refeição de teste comparado ao placebo (Starchex 27.7+3.5%, Calorex 25.7+2.4%, placebo 27.4+3.9%) conforme medido pelo dióxido de carbono exalado, rotulado por C¹³, sugerindo falha em retardar a digestão e metabolismo do amido em relação ao placebo.⁴⁸ utilizando preparações purificadas de inibidor aspergidas diretamente no duodeno de humanos em doses clinicamente aceitáveis de 2.0, 3.5 ou 5.0 mg/mL a 5 mL/min demonstraram inibir a atividade da amilase intraluminal em 9%, 99% e 99.9% respectivamente. A ingestão do inibidor purificado de *P. vulgaris* juntamente com 50 g de amido reduz níveis de glicemia pós-prandial em indivíduos saudáveis e diabéticos.⁴⁹ Estudo recente⁵⁰ mostrou que após 30 dias de dieta suplementada com extrato padronizado de *P. vulgaris*, houve uma significativa diminuição no peso corporal sugerindo diminuição da massa gorda mantendo massa corporal magra comparada com os sujeitos que receberam placebo. No mercado encontram-se ainda produtos comercializados

como faseolamina na forma de cápsulas indicada para perda de peso. Em um estudo preliminar em nosso laboratório, verificou-se que alguns destes produtos dependendo da origem continham grande quantidade de fitohemaglutininas e baixa capacidade em inibir uma fração de saliva humana enriquecida em alfa-Amilase utilizando o método cinético com substrato sintético (GalG2CNP). Neste sentido há necessidade de maiores estudos que comprovem a pureza do inibidor (livre de fitohemaglutininas) juntamente com comprovação de sua eficácia para a indicação de uso antes de sua exposição à população.

Um outro estudo de bioprospecção de inibidores de alfa-Amilase Salivar Humana a partir de extratos de plantas do Cerrado realizado por nosso grupo de pesquisa ⁵¹ verificou-se a atividade inibitória de 100 extratos hexânicos e etanólicos sobre a α -amilase salivar humana. Foram avaliadas 17 espécies, distribuídas em 6 famílias e 15 gêneros, e os extratos foram referentes a diversas partes das plantas (madeira e casca do caule e da raiz e folha). As famílias Flacourtiaceae, Sapotaceae e Sapindaceae contêm espécies que se destacaram. Os extratos etanólicos de *Pouteria ramiflora* (Sapotaceae) exibiram níveis de atividade inibitória de 61 a 100% sobre a saliva humana em concentrações de 0.02 mg/ml a 0.2 mg/ml. Nestes estudos preliminares, foi utilizada saliva humana, coletada pelo método do cuspe ⁵² utilizando para medida de atividade da enzima o kit amilase por Caraway nº 211 da Analisa ®.

Nos últimos anos vários estudos têm demonstrado o efeito hipoglicêmico de espécies medicinais pela inibição da alfa-Amilase. Grande parte desses estudos aponta os compostos polifenólicos presentes nestas espécies como os responsáveis pela inibição de enzimas digestivas. A estes compostos são atribuídas propriedades antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatórias, anticarcinogênicos entre outras. Um estudo mostrou a atividade anti-amilase de compostos do extrato etanólico e aquoso da folha de *Olea europaea* L. (Oleaceae), uma planta usada popularmente na Europa para diabetes. ⁵³ Eles verificaram que tanto o extrato aquoso (com IC₅₀ de 67 e 70.2 mg/mL) como o etanólico (IC₅₀ 4.0 e 0.02 mg/mL) inibiu a atividade de HSA e HPA respectivamente. Esses autores isolaram e identificaram os compostos ativos como sendo luteolina (flavonóide) e ácido oleanólico, ambos inibiram o aumento de glicose pós-prandial em ratos diabéticos e humanos. Um

flavonóide da Acerola *Malpighia puniceifolia* L. (Malpighiaceae) denominado de aceronidina o qual foi utilizado em testes de inibição tanto de alfa-glicosidase quanto de alfa-Amilase comparando seu efeito com outros compostos flavonoídicos e tânicos.⁵⁴ Aceronidina além do poder antioxidante, mostrou ser mais efetiva sobre a alfa-glicosidase (mais de 50% de inibição) quando comparada com isoquercitrina, quercetrina e catequina (todas menos de 50%). Em relação a alfa-Amilase, a inibição foi cerca de 34% (valor considerado baixo pelos autores). As frações polifenólicas de plantas podem alterar a utilização de glicose, independentemente da capacidade antioxidante, por influência direta sobre a atividade enzimática, ou seja, com atividade inibitória efetiva sobre a α -glicosidase intestinal.⁵⁵

Os trabalhos desenvolvidos⁵⁶ com pericarpo de *Garcinia mangostana* L. (Guttiferae) avaliou se a atividade alfa-AI dos compostos fenólicos sobre alfa-Amilase Pancreática de Porco (PPA) é comparável a de outros polifenóis com atividade alfa-AI. A fração III testada em ensaios *in vitro* é 56 vezes mais potente que o ácido tânico e tão efetivo contra acarbose. Se por um lado têm-se os benefícios de uma dieta ou suplementos ricos em taninos, por outro lado seu consumo excessivo se torna perigoso devido a suas propriedades quelantes de metais como cálcio, efeitos hepatotóxicos em coelhos. Na Malásia foi investigado o potencial antidiabético de plantas medicinais com base na inibição da PPA. Dos seis extratos de plantas testados somente o extrato hexânico de quebra pedra *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn. (Euphorbiaceae) inibiu a atividade da enzima, sugerindo que a diminuição da glicose sanguínea seja em parte devido aos compostos lipofílicos.²³

Conclusão

As alfa-Amilases são enzimas importantes na digestão de carboidratos nos seres vivos em geral. Os estudos de elucidação estrutural das amilases humana HSA e HPA mostram que há uma grande homologia na seqüência e estrutura entre elas. Este fato é importante uma vez que HPA é a enzima chave na digestão de carboidratos e esta similaridade permite usar HSA (de fácil coleta e processamento) como alvo para descoberta de novas drogas que possam atuar no controle da hiperglicemia pós-prandial em pacientes

diabéticos e obesos. Considerando que a maior parte da dieta humana é composta de carboidratos, os estudos envolvendo inibidores de alfa-Amilases se fazem importantes para o controle das desordens do metabolismo de açúcares e lipídios.

Diante do exposto, é inegável a contribuição dos metabólitos secundários de plantas como possíveis agentes terapêuticos para o tratamento de diabetes. Mais estudos são necessários a fim de elucidar o mecanismo de ação pelo qual esses ativos interferem na utilização e disponibilidade de glicose além de ensaios clínicos que comprove sua eficácia com doses terapêuticas adequadas e ausência de toxicidade. Nosso país possui uma enorme biodiversidade, com cerca de 10% de toda a flora mundial, com muitas potencialidades, mas sem dúvida pouco estudada, com menos de 1% das espécies vegetais analisadas sob o ponto de vista químico e farmacológico. ²⁴

Referências

- (1) Dodds, M.W.J.; Johson, D.A.; Yeh, C.K. *Journal of dentistry*, 2005, vol.33, 223-233.
- (2) Vanderspek, J.C.; Wyandt, H.E.; Skare, J.C.; Milunsky, A.; Oppenheim, F.G.; Troxler, R.F. *Am. J. Hum. Genetic*, 1989, 45:381-387.
- (3) Scheen, A. *J Drugs*, 2003; 63(10):933-51. Review.
- (4) Payan, F. *Biochim Biophys Acta*. 2004,12;1696(2):171-80. Review
- (5) Henrissat, B.; Callebaut, I.; Fabregas, S.; Lehn, P.; Mornon, Jean-Paul; Davies, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, vol.92, pp.7090-7094
- (6) Kuriki, T.; Imanaka, T. *Journal of Bioscience and Bioengineering* vol.87, nº 5, 557-565, 1999.
- (7) Fisher, S.Z.; Govindasamy, L.; TU, C.; McKenna, M.A.; Silverman, D.N.; Rjanieme, H.J.; McKenna, R. *Acta Crystallographica*, 2006, F62, 88-93.
- (8) Pujadas, G. & Palau, J. *Soc. Mol. Biol. Evol.* 2001, 18(1): 38-54.
- (9) MacGregor, E. A., Janecek, S. & Svensson, B. *Biochim. Biophys. Acta*, 2001, 1546: 1–20, 2001.

- (10) Ramasubbu, N.; Paloth, V.; Luo, Y.; Brayer, G. D. ; Levine, 1996.
- (11) Samuelson, Linda C.; Wiebauer, K.; Gumucio, D.L.; Meisler, M.H. *Nucleic Acids Research*, 1988, vol.16, n.17, pp. 8261-8276.
- (12) Groot, P.C.; Bleeker, M.J.; Pronk, J.C.; Arwert, F.; Mager, W.H.; Planta, R.J., Eriksson, A.W.; Frants, R.R. *Nucleic Acids Research*, 1988, vol.16, n.10, pp. 4724.
- (13) Bank, R.A.; Hetteema, E.H.; Arwert, F.; Amerongen, A.V.; Pronk, J.C. *Electroforesis*, 1991, 12(1), 74-79.
- (14)Brayer, G.D.; Luo, Y.; Withers, S.G. *Protein Science*, 1995, 4:1730-1742.
- (15)Ramasubbu, N.; Rangunath, C.; Sundar, K.; J. Mishra, Thomas, L.M. Gyémant,G. *FEBS Journal*, 2004, 271; 2517-2529.
- (16)Ramasubbu, N.; Rangunath, C.; Sundar, K.; J. Mishra, P.; Gyémant,G.;
- (17)Kandra, L.. *Biologia,Bratislava*, 2005, 60/Suppl.16:47-56.
- (18)Brayer, G.D.; Sidhu, G.; Maurus, R.; Rydberg, E.H.; Braun, C.; Wang, Y.; Nguyen, N. T.; Overall, C.M.; Withers, S.G. *Biochemistry*, 2000, 39, 4778-4791.
- (19)Aghajari, N.; Feller, G.; Gerday, C.; Haser, R. *Protein Science*, 2002, 11:1435-1441
- (20)Brady, R.L., Brzozowski, A.M., Derewenda, Z.S., Dodson, E.J., Dodson, G.G. *Acta Crystallog. sect B* , 1991, 47, pp. 527–535.
- (21)Kadziola, A., Abe, J., B. Svensson and R. Haser,. *J. Mol. Biol.* 239, 1994, 104–121.
- (22)Buisson, G.; Dueé, E.; Haser R.; Payan F. *The EMBO Journal*, 1987, v.6, n°13, 3909-3916.
- (23)Franco, O. L.; Rigden, D. J.; Melo, F.R.;Grossi-de-Sá, M. F. Structure, function and potencial for crop protection. *Eur.J. Biochem.*, 2002, 269:397-412.
- (24)Ali, H., Houghton, P.J., Soumyanath, A.. *J.Ethnopharmacology*, 2006, vol. 107(3), 449-455.

- (25)Kandra, L.; Zajácz, A.; Remenyik, J.; Gyémánt, G. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 334,824-828.
- (26)Zajácz, A.; Gyémánt, G.; vittori, N.; Kandra,L. *Carbohydrate Research*, 2007, 342, 717-723.
- (27)Grossi de Sá, M. F., Chrispeels, M. J. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1997, 24:4,271-281.
- (28)Da Silva, M.C.M.; Grossi de Sá, M.F.; Chrispeels, M;J.; Togawa, R.C.; Neshich, G. *Protein Engineering*, 2000, vol13, n. 3, 167-177.
- (29)Grossi de Sá, M. F., Mirkov T.E., Ishimoto, M. , Colucci, G., Bateman, K.S., Chrispeels, M.J. *Planta*, 2004, vol.203,n.03, 295-303.
- (30)Murao, S.; Goto, A.; MATSUI, Y.; OHYAMA, K. *Agric. Biol. Chem.*, 1980, 44: 316-322.
- (31)Nahoum, V.; Roux, G.; Anton, V.; Rougé, P.; Puigserver, A.; Bischoff,H.; Henrissat, B., Payan, F. *Biochem. J.*, 2000, 346,201-208.
- (32)Lu, S. Deng, P., Liu, X., Luo, J., Han, R.,Gu, X.,Liang, S., Wang, X.,Li, F., Lozanov, V., Patthy, A., Pongor, S. *J. Biol. Chem.*,1999, 274, 20437-20478.
- (33)Martins, J.C.Enassar, M., Willen, R.,Wieruzeski, J.M., Lippens, G., Wodak, S.J. *Eur. J. Biochem.*, 2001, 268,2379-2389.
- (34)Franco, O.L., Rigden, D.J, Melo, F.R., Junior, C.B., Silva, C.P., Grossi de Sá, M.F. *Eur. J. Biochem.*, 2000, 267, 2166-2173.
- (35)Marshall, J.J.; Lauda, C, M. *J. Biol. Chem.*, 1975, 25;250(20):8030-7.
- (36)Moreno, J.; Altabella, T.; Chrispeels, M.J. *Plant Physiol.*, 1990, 92,703-709.
- (37)Le Berre-Anton, V.; Bompard-Gilles, C.;Payan, F.; Rougé,P.. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1997, 1343, 31-40.
- (38)Iulek, J.; Franco, O. L.; Silva, M.; Slivinski, C. T.; Jr., C.B.; Rigden, D. J.; Grossi-de-Sá, M. F. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2000, 32, 1195-1204.
- (39)Dayler, C.S.A.; Mendes, P.A.M.; Prates,M. V.; Jr., C.B.; Franco, O.L. ;

- Grossi-de-Sá, M. F. *FEBS Letters*, 2005, 579, 5616-5620.
- (40) Heidari, R.; Zareae, S.; Heidarizadeh, M. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2005, 4(2): 101-105.
- (41) Kokiladevi, E.; Manickam, A.; Thayumanavan, B. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 2005, 46: 189-196.
- (42) O' Donnell, M.D. And McGeeney, K.F. *Biochim. Biophys. Acta*, 1976, 422, 159-169.
- (43) Udany, J; Hardy M; Madsen, D. *Altern. Med. Re.*, 2004, 9:63-69.
- (44) Scheen, A. *J Drugs*, 2003; 63(10):933-51. Review.
- (45) Jaffe, W G, Vega, Leitte, C. L. *J Nutr.*, 1968, 94:203-10.
- (46) Liener, I.E.; Donatucci, D.A.; Tarcza, J.C. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1984, 39:196-200.
- (47) Carlson, G.L., Li, B.U., Bass, P., Olsen, W.A. *Science.*, 1983, 219:393-395.
- (48) Garrow, J.S., Scott, P.F., Heels, S., Nair, K.S., Halliday, D. *Hum Nutr Clin Nutr.*, 1983, 37C:301-305.
- (49) Layer, P., Carlson, G.L., Dimagno, E.P. *Gastroenterology.*, 1985, 88:1895-1902.
- (50) Layer, P.; Zinsmeister, A.R.; Dimagno, E.P. *Gastroenterology*, 1986v. 91, p. 41-48.
- (51) Celleno, L.; Tolaine, M.V.; D'Amore, A.; Perricone, N.Y.; Preuss, H.G. *Int. J. Med. Sci.*, 2007; 4(1):45-52.
- (52) Albuquerque, C. L. Monografia apresentada para conclusão de graduação em Ciências Biológicas, 2004, UFU, 25 p.
- (53) Navazesh, M. *Ann. N.Y. Acad. Sc.*, 1993, 20; 694:72-77
- (54) Komaki, E., Yamaguchi, S., Maru, I., Kinoshita, M., Kakehi, K., Ohta, Y., Tsukada, Y. *Food, Sci. Technol. Res.*, 2003, 9(1), 35-39.
- (55) Kawaguchi, M., Tanabe, H., Nagamine, K.. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2007, 71(5), 1130-1135.

(56) Matsui, T., Ueda, T., Oki, T., Sugita, K., Terahara, N., Matsumoto, K. *J Agric Food Chem.*, 2001, 49(4):1952-62.

(57) Loo, A.E.K., Huang, D. *J. Agric. And Food Chemistry*, 2007, 55(24), 9805-9810.

CAPÍTULO II

Fracionamento e caracterização parcial de constituintes químicos do extrato bruto de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk (Sapotaceae) biomonitorados pela inibição *in vitro* da atividade da alfa-Amilase Salivar Humana (HSA)

Capítulo a ser submetido a revista Journal of Natural Products

Fracionamento e caracterização parcial de constituintes químicos do extrato bruto de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk (Sapotaceae) biomonitorados pela inibição *in vitro* da atividade da alfa-Amilase Salivar Humana (HSA)

Vilma L. Moura, [†] Neire M de Gouveia, [†] Paulo S. Pereira, [‡] Suzelei de C. França, [‡] Marcelo Tavares, [§] Laila S. Espindola, [⊥] Foued S. Espindola*[†]

[†]Instituto de Genética e Bioquímica, Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Uberlândia, MG, Brasil

[‡]Unidade de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP

[§]Faculdade de Matemática, Universidade Federal de Uberlândia, MG, Brasil

[⊥]Laboratório de Farmacognosia, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Distrito Federal, Brasil

Resumo

Pouteria ramiflora (Mart.) Radlk é uma espécie pertencente a família Sapotaceae, conhecida popularmente como massaranduba, curriola, grão de galo e pitomba de leite. O fracionamento, isolamento e identificação de bioativos do extrato bruto de *P. ramiflora* biomonitorados pela inibição da atividade da alfa-Amilase Salivar Humana (HSA) *in vitro* através de método cinético GalG2CNP em microplacas, constituiu-se o objetivo deste estudo. Após screening da atividade inibitória dos extratos sobre a atividade da HSA *in vitro*, o extrato hidroalcoólico da folha de *P. ramiflora* foi fracionado por apresentar maior inibição da atividade da HSA (64%). O fracionamento do extrato da folha foi conduzido monitorando as frações em cromatografia de camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os perfis em CCD das frações obtidas apresentaram como compostos principais flavonóides e taninos. As frações com maior ação inibitória sobre a atividade da HSA foram analisadas por CLAE analítica e semi-preparativa permitindo obter o composto (1) isolado e uma fração em mistura rica no composto (2), correspondentes a flavonóides que não foram identificados. As frações que contem esses compostos possuem baixa atividade inibitória sobre HSA (15 e 20% respectivamente) indicando que o efeito do extrato bruto se deve aos

fitocomplexos que quando separados perdem parte de suas propriedades inibitórias.

Abstract

Pouteria ramiflora (Mart.) Radlk is a plant specie of the Sapotaceae family , known popularly in Brazil as *massaranduba*, *cariola*, rooster grain and *pitomba*. The fractionation, isolation and identification of bioactive compounds from the crude extract of *P. ramiflora* were monitored by the inhibition of human salivary alpha-amylase (HSA) activity by in *vitro* microplate assay using enzymatic kinetic method with GalG2CNP as substrate. Probing these HSA activity with different crude extracts of *P. ramiflora* revealed that a leaf hydroalcoholic extract with higher inhibition property (64%). The fractionation of this leaf extract were conducted monitoring fractions through thin layer chromatography (TLC) analyses, liquid chromatography of high efficiency (HPLC) purification and inhibitory HSA activity. The TLC plates revealed the presence of flavonoids and tannins. Those factions showing higher inhibition activity were investigated by analytic and semi-preparative HPLC allowing the obtention of an isolated compound in one fraction and mixture of not identified flavonoids in the other one. The flavonoids presented in both fractions were less effective to inhibit HSA activity (15 and 20% respectively). This finding suggest an inhibitory effect of the *P. ramiflora* crude extract associated to a phytocomplex that could be lost during its phytochemistry fractionation.

Introdução

As alfa-Amilases Salivar e Pancreática (HSA e HPA) tem sido objeto de estudos bioquímicos e caracterização estrutural. ¹⁻⁵ Para realizar sua função enzimática na digestão de carboidratos essas enzimas possuem uma estrutura tridimensional capaz de se ligar ao substrato e pela ação de grupos altamente específicos, promover a quebra das ligações glicosídicas. ⁶ Assim, o conhecimento das particularidades estruturais de cada uma e de sua interação com o substrato é de fundamental importância para a compreensão e elucidação dos mecanismos de ação e inibição dessas enzimas. Inibidores de alfa-Amilases que tem seletividade e alta afinidade têm potencial aplicação

desde o tratamento de diabetes até proteção de cultivares, por isso o crescente interesse em novos agentes e estratégias terapêuticas que possam agir na regulação fisiológica da incorporação de glicose e níveis de açúcar no sangue em mamíferos e insetos. ⁴

Hoje as terapias existentes utilizam a acarbose e voglibose, inibidores sintéticos de alfa-glicosidases para estabilizar a glicose sanguínea pós-prandial, mas o uso destes inibidores é inconveniente, pois seus produtos digestivos se acumulam no lúmen intestinal, tendo como efeitos colaterais diarreia e flatulência. ⁷⁻¹¹ Estudos *in vitro* têm demonstrado que os inibidores de alfa-Amilases diminuem a hidrólise de macromoléculas, mas não de glicose, dessa forma, os produtos digestivos não se acumularão no lúmen intestinal, e conseqüentemente os efeitos colaterais serão evitados. ¹¹

Vários estudos demonstram que o uso de extratos vegetais, principalmente aqueles ricos em polifenóis são potentes inibidores da atividade destas enzimas. ¹²⁻¹⁴ A planta objeto de nosso estudo é pertencente à família Sapotaceae que compreende cerca de 110 gêneros e mais de 1000 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, sendo que 12 destes gêneros (103 espécies) se encontram no Brasil. ^{15,16} Algumas espécies possuem importância econômica, pois o látex é utilizado na produção de goma comercial, matéria-prima para especiarias, madeira de qualidade e muitos gêneros que produzem frutos comestíveis, tais como *Chrysophyllum oppositum* (Ducke) Ducke (abiurana), *Manilkara*, *Mimusops* e *Pouteria*. ^{17,18} Na medicina popular as espécies desta família são utilizadas para fins diversos como antibacteriana, câncer de próstata, antifúngica, antihiperlipidêmica, tripanosomicida entre outras. ^{19,20,22} Estudos fitoquímicos efetuados com espécies de Sapotaceae têm revelado a ocorrência de alcalóides, flavonóides, saponinas, terpenóides, polifenóis e esteróides. ^{19-21,23-27}

O gênero *Pouteria* é diversificado em espécies, porém há pouca investigação científica a respeito de sua fitoquímica e seu aproveitamento farmacológico. *P. ramiflora* e *Pouteria gardnerii* (Mart. & Miq.) Baehni podem ser encontradas no Cerrado do Distrito Federal, Brasil, *Pouteria torta* (Mart.) Radlk e *Pouteria caimito* (Ruiz & Pav) Radlk podem ser encontradas em todo o Brasil. Ainda que não exista uma política de exploração comercial dos frutos de *P. torta*, *P. caimito* e *P. ramiflora*, as populações residentes no Cerrado usam

tais espécies como alimentos e remédio caseiro. A casca da árvore *P. torta*, comumente chamada de “guapeva”, “curriola”, “acá ferro”, “abiu do cerrado” e “grão de galo”, é utilizada como remédio contra desintéria. As raízes e a casca de *P. ramiflora*, chamada de “grão de galo”, “massaranduba” ou “pitomba de leite”, também são usadas como remédios contra desintéria, bem como vermífugo. *P. caimito*, conhecida como abiu, também é útil em desintéria, além de afecções pulmonares e contra malária.²⁸ Há relatos de que frutos de *Pouteria sapota* (México) são processados para sorvetes, marmeladas, perfumaria e outros produtos; a decocção das cascas de *Pouteria cambodiana* é usada para promoção da lactação na Tailândia e outras partes da planta são usadas na medicina popular para tratar vômitos, náuseas e febre.^{29,30} Um estudo realizado³¹ mostrou que o extrato metanólico da casca do caule apresentou boa atividade imunomoduladora e baixa atividade antioxidante o que explica em parte a utilização popular desta planta no tratamento de febres e erupção cutânea. A decocção da casca de outras espécies dessa família, como *Pouteria campechiana*, nativa da América Central, é usada como antipirético no México bem como para erupções cutâneas em Cuba. O extrato de suas sementes tem sido empregado para tratamento de úlceras.³²

Constantes estudos são realizados a fim de validarem novas substâncias com propriedades terapêuticas.³³⁻³⁵ Distúrbios como Diabetes mellitus e obesidade acometem grande parte da população mundial e em países subdesenvolvidos, tratamentos para tais desordens são onerosos para a população³⁶ e a descoberta de agentes terapêuticos efetivos provenientes de plantas tornaria mais fácil o acesso ao tratamento e poderia reduzir os custos para os pacientes. Além disso, há vários estudos comprovando a redução da glicemia pós-prandial e o retardo do esvaziamento gástrico por meio da inibição de enzimas digestivas de carboidratos e polissacarídeos.³⁷⁻³⁹

Para desenvolver os estudos com *P. ramiflora* baseamos em um screening realizado em nosso laboratório⁴⁰ utilizando extratos de espécies pertencentes a diferentes famílias encontradas na região do Cerrado próximo ao Distrito Federal. Neste ensaio os extratos aquosos, etanólicos e hidroalcoólicos da espécie *ramiflora* apresentaram excelente inibição sobre a atividade da alfa-Amilase Salivar Humana (60 a 100%). A escolha pelo uso de HSA nos ensaios de inibição de sua atividade *in vitro* foi devido a sua similaridade estrutural (97%)

com HPA, facilidade de obtenção da amostra de saliva e abundância desta enzima na amostra. Além disso, os ensaios *in vitro* constituem excelentes modelos para caracterização do efeito inibitório de extratos brutos, frações e moléculas ativas purificadas antes de serem aplicadas em modelos animais para verificar a diminuição da digestão de carboidratos.

No presente estudo avaliou-se a efetividade de inibição da enzima HSA por extratos de diversas partes de *P. ramiflora* e posterior fracionamento visando isolamento e identificação estrutural das substâncias que poderiam estar envolvidas neste processo.

Resultados e discussão

A amostra de HSA alvo dos ensaios de inibição aqui apresentados representa uma amostra enriquecida em alfa-Amilase exclusivamente eluída de uma cromatografia da saliva total na presença dos quelantes EGTA e EDTA em coluna de troca aniônica. A utilização da saliva como fonte de alfa-Amilase é vantajoso porque a sua coleta é não-invasiva e representa nível de biossegurança classe I e por HSA possuir seqüência e estrutura bastante similar a alfa-Amilase pancreática. Investigou-se em ensaios de atividade enzimática, a 37°C com ou sem pré-incubação da HSA com os extratos, a diluição mais adequada da amostra de HSA entre 1:100-1:1000 no tampão de reação. Nesta amostra de HSA a atividade catalítica foi diretamente proporcional a quantidade de amostra da enzima no meio reacional. Escolheu-se a diluição de 1:595 da amostra de HSA por considerar que esta diluição fornece uma atividade enzimática dentro da faixa de linearidade do método e também devido a concentração estimada da enzima HSA estar na faixa de 2 e 6 nM conforme relatado em outro estudo⁴¹ sobre os efeitos de tanino na cinética da HSA purificada e disponível comercialmente. A concentração do extrato de *P. ramiflora* no volume final de reação foi fixada em 32 µg/mL, após obtenção de uma curva de inibição com diferentes concentrações entre 1-32 µg/mL para melhor avaliar a atividade inibitória sobre a resposta enzimática da HSA. A utilização de extrato bruto e não de uma substância purificada requer o uso de concentrações maiores, pois contém várias substâncias provenientes do metabolismo secundário do vegetal das quais uma ou um complexo pode

contribuir para a ação inibitória. Os ensaios de inibição da atividade da HSA utilizando concentrações de 0.5-2.0 mM do substrato GalG2CNP indicaram que a concentração de 2.0 mM era a mais adequada para realização dos testes. A atividade catalítica da HSA aumentou proporcionalmente ao aumento de sua concentração (dados não apresentados).

Os ensaios cinéticos preliminares realizados para a amostra de HSA estão representados na Figura 1. As curvas obtidas para equação de Michaelis e Mentem (Figura 1a) e de Lineweaver e Burk (Figura 1b) permitiram fixar a concentração do substrato GalG2CNP em 10 mM com uma boa resposta de absorção em 405 nm e atividade da enzima dentro da faixa de linearidade do método. Além disso, esta análise cinética permitiu calcular o valor de Km da amostra de HSA ($K_m = 22$) a partir da equação de reta $Y = 0.1328x - 0.0059$ com $R^2 = 0.9931$. O extrato EHPF ainda não foi caracterizado em relação à cinética de sua inibição da atividade da amostra de HSA. Entretanto, outros estudos sobre inibição da atividade da alfa-Amilase relatam que os inibidores isolados de extratos vegetais podem ser competitivos ou possuir inibição mista.

41-44

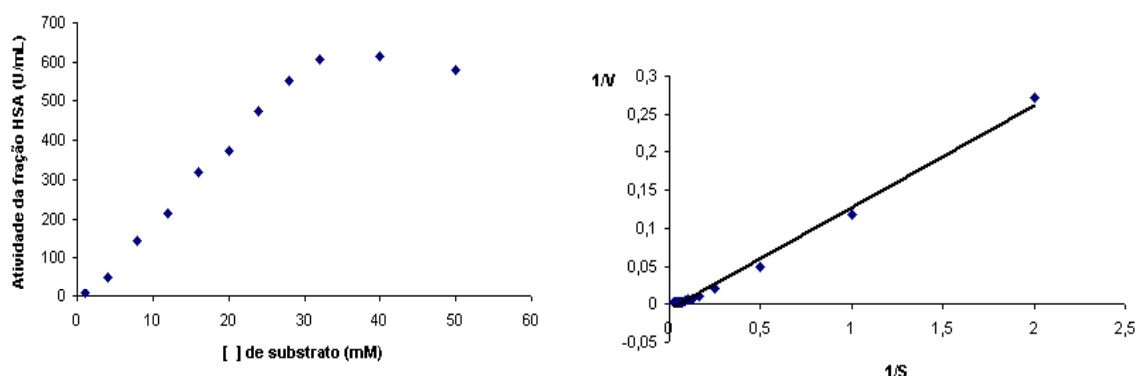


Figura 1: (a) Efeito do aumento da concentração do substrato GalG2CNP na atividade enzimática de HSA (6nM), (b) gráfico de duplo recíproco de Lineweaver e Burk mostrando a relação entre o recíproco da atividade enzimática (1/V) e o recíproco da concentração do substrato (1/S).

No presente estudo utilizou-se preferencialmente o substrato sintético GalG2CNP porque em estudo prévio da inibição de HSA presente em amostra de saliva total utilizou-se o método cinético Caraway modificado, que usa amido como substrato.⁴⁰ A análise destes dados prévios mostrou que os valores de atividade de HSA não eram reprodutíveis em cada ensaio com uma variação da média intra e inter ensaio muito grande. Por outro lado, o substrato GalG2CNP não requer enzimas adicionais para liberar CNP além de ser

exclusivamente clivado na ligação aglicona resultando somente dois produtos de degradação, β -D-galactopiranosilmaltose (Gal2) e cloronitrofenol (CNP). Além disso, o GalG2CNP é resistente a transglicosilação porque possui na porção final não reduzida uma molécula de D-galactose. A absorção do CNP liberado é cerca de vinte vezes maior do que o 2-nitrofenol e sua absorção em 405 nm é proporcional a atividade enzimática.⁴²

Os ensaios de atividade inibitória da HSA investigados sem pré-incubação dos extratos com a amostra da HSA, isto é, adicionando o extrato no momento da reação, revelaram baixa atividade inibitória (dados não mostrados). Entretanto, quando os extratos foram pré-incubados por 10 ou 30 minutos com a amostra de HSA antes de adicionar o substrato e iniciar o ensaio, verificou-se maior porcentagem de inibição da atividade de HSA com o tempo de 30 minutos de pré-incubação para todos os extratos testados (Figura 2).

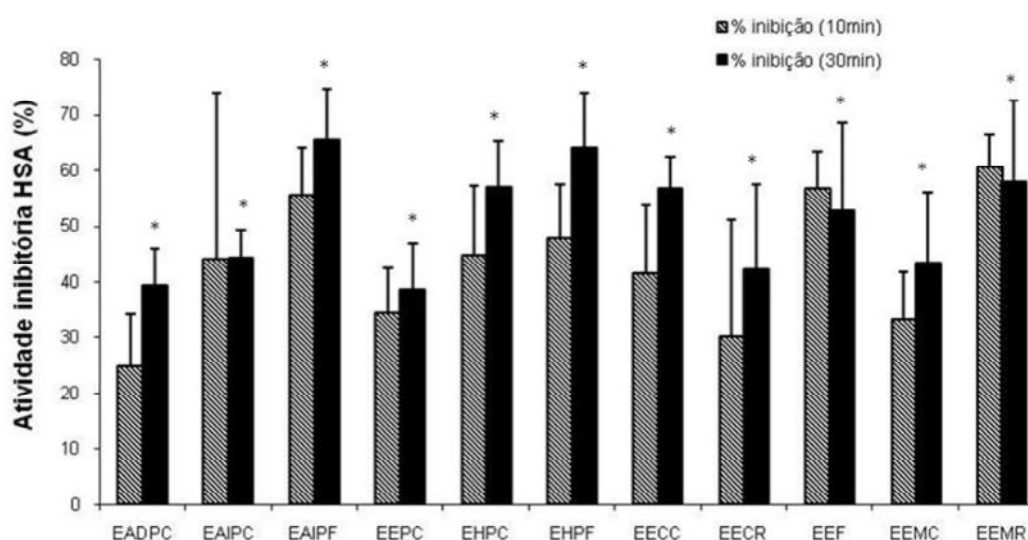


Figura 2: Atividade inibitória de HSA (%) na presença de extratos de *Pouteria ramiflora* a 10mg/mL após pré-incubação de 10 e 30min respectivamente. A concentração de extrato no volume final de reação é de 32 μ L/mL. Os resultados são expressos como médias \pm DP (n=11), * p < 0.05 pelo teste Scott-Knott (1974).

As atividades inibitórias dos extratos estão mostradas na Tabela 1. Observa-se que estas atividades variaram de 42 a 65%. O extrato EAIPF apresentou a maior atividade inibitória seguida pelos extratos EHPF, EHPC, EECC, EEMR, mas não foram estatisticamente diferentes. O extrato EADPC apresentou a menor atividade inibitória. Para os extratos aquosos da casca de *P. ramiflora*, verificou-se que o modo de preparo não influenciou na inibição da

atividade da enzima. Porém, em relação ao solvente utilizado observou-se que para os extratos da casca de *P. ramiflora*, houve maior inibição usando solvente hidroalcoólico 1:1 v/v e etanol. Os extratos aquosos e hidroalcoólicos da folha não apresentaram diferença significativa sobre a inibição da atividade de HSA como apresentado na Tabela 1. Quanto aos extratos etanólicos verificou-se que a inibição da atividade de HSA variou de 38 a 58%. Estes dados apontam como candidatos potenciais ao fracionamento o extrato da folha (aquoso e hidroalcoólico) com porcentagens de inibição da enzima HSA de 65 e 64% respectivamente e o extrato hidroalcoólico da casca com 57% de inibição.

Tabela 1: Efeito dos diferentes extratos (solventes e parte da planta) de *P. ramiflora* sobre a inibição da atividade da alfa-Amilase da amostra de HSA pré-incubada 30 minutos com os extratos na concentração de 10 mg/mL.

Extratos*	Solvente	Parte usada	Inibição alfa-Amilase (%)
EADPC	água	casca do caule	39.3 ± 6.0 a
EAIPC	água	casca do caule	44.1 ± 5.0 a
EAIPF	água	Folha	65.3 ± 9.0 b
EEPC	etanol	Casca	38.6 ± 8.0 a
EHPC	etanol /água	Casca	57.0 ± 8.0 b
EHPF	etanol/água	Folha	64.0 ± 9.0 b
EECC	etanol	Casca	56.7 ± 5.0 b
EECR	etanol	casca da raiz	42.1 ± 15.0 b
EEF	etanol	Folha	52.7 ± 15.0 b
EEMC	etanol l	madeira da casca	43.2 ± 12.0 a
EEMR	etanol	madeira da raiz	57.8 ± 14.0 b

* As siglas dos extratos de *P. ramiflora* indicam EADPC(extrato aquoso decocção da casca), EAIPC e EAIPF (extrato aquoso infusão da casca e folha respectivamente), EHPC e EHPF (extrato hidroalcoólico da casca e folha, respectivamente), EECC, EECR, EEF, EEMC e EEMR são respectivamente (extrato etanólico da casca do caule, casca da raiz, folha, madeira do caule, madeira da raiz). As letras subscritas (a e b) indicam diferenças significativas entre os tratamentos, para $p < 0.05$ pelo teste Scott-Knott (1974) , dados expressos como média ± DP (n=11), extratos a 10 mg/mL.

O estudo de inibição da HSA avaliando extratos (10mg/mL) provenientes de folha e casca do caule de *P. ramiflora* mostrou que EHPF (64%) e EHPC (57%) diminuíram significativamente com $p < 0.05$ a hidrólise do substrato sintético GalG2CNP pela HSA. A escolha de EHPF à EHPC se deve ao fato da coleta da folha ser menos invasiva para a planta sem correr riscos de danificar o caule no momento da coleta preservando o espécimen no seu habitat natural.

Os inibidores presentes no extrato bruto de *P.ramiflora* podem afetar a atividade da enzima HSA de diferentes maneiras, tais como competir com o substrato pela ligação no sítio ativo da enzima ou por alterar irreversivelmente as propriedades catalíticas da enzima. Resultados similares aos nossos estudos ³⁴ foram encontrados, como a atividade de HSA de dois extratos brutos de plantas utilizadas popularmente no Egito como hipoglicêmicas, foi medida através de método cinético usando GalG2CNP como substrato. Segundo esses autores a inibição quase completa da atividade da alfa-Amilase foi obtida em concentrações superiores a 4 mg/mL para um dos extratos e 20 mg/mL para outro extrato das plantas investigadas. Outro estudo ⁴⁴ também investigou a atividade inibitória de HSA pelo extrato hexânico de *quebra pedra Phyllanthus amarus* (planta utilizada no tratamento de diabetes na Malásia). Neste caso o extrato a 1mg/mL com IC₅₀ de 32 µg/mL foi capaz de inibir quase 100% a atividade de HSA. Estudos como estes apresentados aqui e de outros utilizando extratos vegetais ainda são escassos, mas representam um grande potencial para a descoberta de drogas dirigidas para inibição da alfa-Amilase. A relevância destas descobertas está no possível uso como suplemento alimentar ou mesmo terapêutico para potenciais bloqueadores da digestão de carboidratos diminuindo a absorção de glicose a nível intestinal e conseqüentemente reduzindo os níveis da glicemia pós-prandial. Neste sentido, alguns estudos foram desenvolvidos com extratos de plantas avaliando seu efeito sobre a glicemia pós-prandial a partir de inibição de enzimas digestivas. ^{33,45-48}

Os experimentos referentes ao fracionamento do extrato bruto EHPF de *Pouteria ramiflora* foram conduzidos pelo ensaio de inibição *in vitro* da atividade de HSA. Para isso foi realizado uma primeira partição líquido-líquido que resultou em 7 frações (F1 a F7) das quais a fração F2 foi mais ativa sobre a inibição de HSA com 72% (fração insolúvel em metanol/hexano) e as demais frações variando a porcentagem de inibição de HSA entre 10 a 40% (fração solúvel em diclorometano). A fração F2 foi submetida a uma segunda partição líquido-líquido utilizando clorofórmio, diclorometano, acetato de etila e água originando 4 outras frações (F1' a F4') das quais a fração aquosa (F4') se mostrou mais ativa com 45% de inibição sobre a atividade de HSA seguida pela fração acetato (26%). A concentração das substâncias em cada fase está

relacionada com o coeficiente de partição ou distribuição apresentado em cada uma delas. Este ensaio constituiu numa etapa inicial que direcionou a etapa subsequente de fracionamento em coluna aberta. Este fracionamento preliminar mostrou que os compostos do extrato EHPF responsáveis pela inibição da atividade de HSA são substâncias polares, solúveis em água, indicando que o fracionamento do extrato em coluna aberta seria mais efetivo, por isso a escolha da resina Sephadex LH-20 para separação desses compostos com base no seu peso molecular.

As 120 frações obtidas da coluna de sephadex foram agrupadas de acordo com perfil semelhante apresentado em CCD, CLAE analítica e submetidas ao ensaio de inibição com GalG2CNP. Os rendimentos (mg) e inibição (%) das 15 frações agrupadas obtidas da coluna estão apresentados na Tabela 2. As frações com maior porcentagem de inibição e com rendimento acima de 100mg foram escolhidas para etapa posterior de isolamento dos compostos. A revelação das placas em CCD com vanilina sulfúrica e NP/PEG mostrou a presença de compostos fenólicos como taninos e flavonóides.

Tabela 2: Rendimento (mg) das 15 frações agrupadas provenientes do fracionamento em coluna Sephadex LH20 do extrato EHPF de *P.ramiflora* e efeito inibitório destas frações sobre a atividade da HSA (%).

Frações	Rendimento (mg)	Inibição α-Amilase (%)
F1 (1-13)	32.6	4.66
F2 (14-21)	6.5	7.54
F3 (22-31)	34.47	9.60
F4 (32-48)	320.4	15.30
F5 (49-55)	84.6	6.93
F6 (56-66)	111.9	15.4
F7 (67-84)	374.2	23.46
F8 (85-108)	192.2	13.43
F9 (109-114)	31.8	8.43
F10 (115)	86.6	13.52
F11 (116)	230.0	49.64
F12 (117)	14.8	7.15
F13 (118)	14.3	1.76
F14 (119)	323.6	31.75
F15 (120)	916.0	31.56

Neste estudo evidências de flavonóides foi observada nas frações F6 a F8 e F9 a F13, uma vez que as manchas nas cromatoplacas em CCD se mostraram alaranjadas após revelação com NP/PEG (Figura 3 (a) e (b)). Estas

frações foram reagrupadas em dois subgrupos sendo denominadas de POU1a (F6 e F7-486.1 mg), POU1b (F8-192.2 mg) e POU2 (F9 a F13-377.5 mg) as quais foram recromatografadas em CLAE semi-preparativa nas mesmas condições anteriores. As frações F14 e F15 apesar de terem alto rendimento não foram escolhidas para recromatografar por corresponderem à fração rica em taninos de alto peso molecular visualizado em CCD.

As frações POU1a, POU1b e POU2 de EHPF submetidas a CLAE semipreparativa tiveram suas sub-frações coletadas e reagrupadas (denominadas de POUF) e submetidas a inibição da atividade de HSA. Os rendimentos destas frações bem como a inibição da atividade enzimática estão apresentados na Tabela 3. O perfil cromatográfico em CLAE semipreparativa de POU1aF e POU1bF está representado na Figura 4.

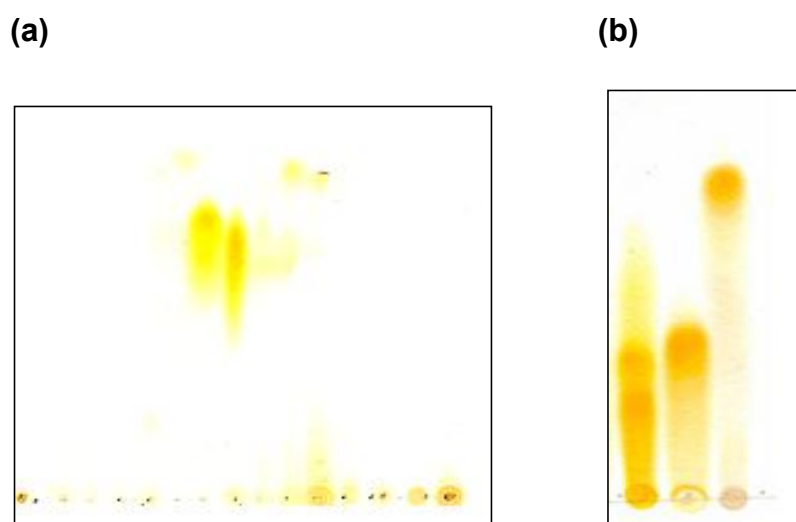


Figura 3: Perfil cromatográfico em sílicagel das frações do EHPF provenientes da coluna em Sephadex LH20, fase móvel BAW (n-butanol:ácido acético:água-4:1:5 v/v) reveladas com NP/PEG (solução metanólica 1% de ácido dienilbórico-2-aminoetil-éster e polietilenoglicol (solução etanólica 5%); em (a) frações reunidas da coluna em sephadex LH20 (F1 a F15-linhas de 1 a 15) em (b) frações reunidas denominadas de POU1a, POU1b e POU2 respectivamente.

Tabela 3: Rendimento (mg) e inibição (%) da atividade de HSA das sub-frações de POU1aF, POU1bF e POU2F provenientes da cromatografia em CLAE semipreparativa.

Frações	Rendimento (mg)	Inibição α-Amilase (%)
POU 1aF (4-5)	5.7	11.2
POU 1aF (25-30)	51.7	20.0
POU 1aF (31-54)	15.4	9.5
POU 1bF (5)	13.4	12.4
POU 1bF (7,18-30)	10.4	16.8
POU 1bF (31-32)	2.3	15.0
POU 1bF (33-40)	5.4	6.2
POU2F (5,6)	13.4	13.3
POU2F (12-30)	8.2	8.5
POU2F (31-60)	38.4	5.6

As frações POU1a, POU1b e POU2 obtidas do fracionamento de EHPF de *P. ramiflora* mostraram a presença de flavonóides. A partir da fração POU1b (81-95) obteve-se o composto 1 (7.0 mg) que possui tempo de retenção de 24.05 min em CLAE analítica a 254 nm. Observa-se pelo perfil apresentado por CCD e pelo cromatograma em CLAE analítica (Figura 4) que este composto se encontra puro na amostra, mas devido ao seu baixo rendimento não foi possível sua identificação pelos métodos espectrofotométricos. O composto 2 (51.0 mg) obtido em mistura a partir da fração POU1a (65-85) possui tempo de retenção de 23.98 min. Os resultados do presente estudo mostraram que as frações do extrato de *P. ramiflora* (EHPF) que deram origem a esses compostos inibiram a atividade enzimática em (15 e 20%). Apesar de baixo valor de inibição, esses resultados estão condizentes com outros resultados ¹³ de isolamento e caracterização de um flavonóide (aceronidina) que também mostrou baixo (34%) efeito inibitório sobre HSA, sendo mais efetiva em inibir alfa-glicosidase (60%). A inibição de alfa-glicosidases tem sido utilizada como alvo do controle da glicemia de diabéticos pelo uso de medicamentos a base de acarbose.

Resultados similares aos nossos, apresentou outro trabalho ¹² que resultou no isolamento de três compostos do extrato etanólico das folhas de *Oliva europaea* com atividade anti-alfa-Amilases da saliva e pâncreas sendo que dois deles foram identificados como flavonóides (luteolina-7-O- β -glicosídeo e luteolina-4-O- β -glicosídeo) e o terceiro como ácido oleanólico. Outros

metabólitos secundários também se mostram efetivos em inibir a atividade de alfa-Amilases, entre eles as saponinas³⁴ e ácido hibisco (ácidos oleanólico e ursólico)⁵⁰ que foi efetivo em inibir alfa-Amilase Pancreática de Porco (PPA) e esta inibição não está ligada a sua propriedade ácida. Outro estudo⁴⁴ mostrou que ácidos triterpenóides (oleanólico e ursólico) isolados do extrato hexânico de *P. amarus* inibiram significativamente a atividade de HSA.

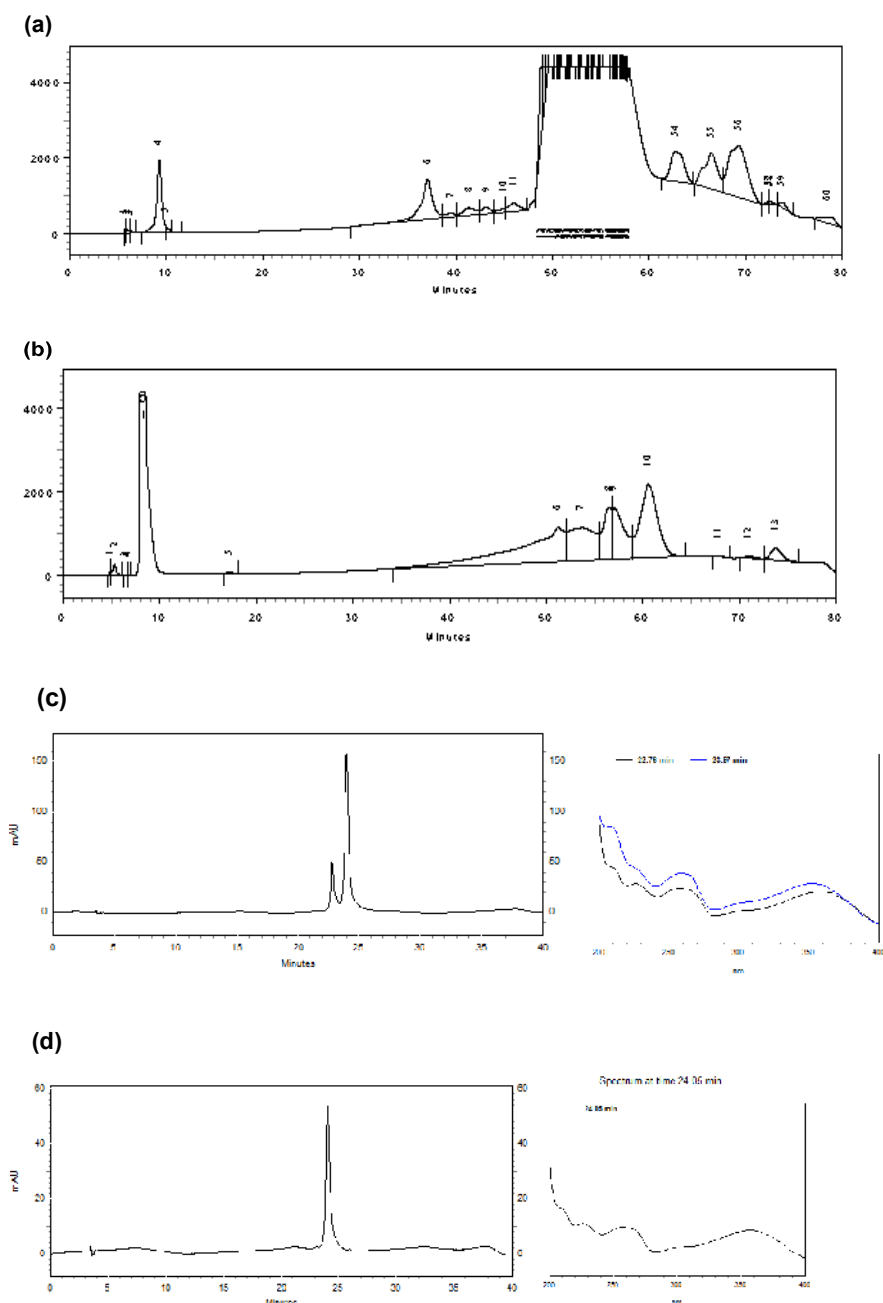


Figura 4: Obtenção do composto (1) proveniente da fração POU1aF e do composto 2 em mistura proveniente da fração POU1bF do EHPF de *Pouteria ramiflora* provenientes da separação em CLAE semipreparativa utilizando cromatógrafo Shimadzu SCL 10 ADVP, coluna octadecilsilano C18 fase reversa 250 x 10.0 mm, 5 µm de diâmetro, usando como eluente metanol e água com 0.01% de ácido acético por 80 min com fluxo de 2 mL/min a 280 nm. Em (a) fração POU1aF (25-30), (b) fração

POU1bF (31-32). (c) e (d) corresponde a CLAE analítica e espectro UV 254 nm utilizando cromatógrafo Shimadzu SCL 10 ADVP, coluna octadecilsilano C18 fase reversa 250 x 4.6 mm, 5 µm de diâmetro, usando como eluente metanol e água com 0.1% de ácido acético por 40 min. com fluxo de 1 mL/min a 254 nm de POU1aF (25-30) e POU1b (31-32).

Nota-se que atualmente muitas pesquisas têm sido realizadas no sentido de isolar e identificar no extrato bruto qual(is) substância(s) do metabolismo secundário do vegetal são responsáveis pelo efeito biológico e ou farmacológico das espécies medicinais a fim de elucidar o mecanismo de ação dessas substâncias.^{13,34,44,50,51} No entanto, como mostrado neste estudo a atividade de um extrato pode ser devido a um conjunto de substâncias que são denominadas de fitocomplexos onde mais de um composto é responsável pela atividade. Este fato pode justificar a diminuição do efeito inibitório apresentado pelas sub-frações das frações POU1a e POU1b as quais possuem maior conteúdo em flavonóides purificados.

Embora tenha um crescente aumento em pesquisas com plantas medicinais, para o gênero *Pouteria* encontram-se raros estudos fitoquímicos e ensaios farmacológicos. Alguns dos dados disponíveis sobre este gênero indicam para *P. ramiflora* efeitos alelopáticos atribuído a ácidos fenólicos, terpenóides e taninos⁵², efeito analgésico e antiinflamatório do extrato etanólico da raiz⁵³, mas não se conhece os compostos responsáveis por esses efeitos. Outros estudos mostram também atividade antioxidante dos extratos brutos etanólico de *P. torta* e *P. ramiflora*²⁸ e efeito fotoprotetor de *P. torta*, *ramiflora* e *caimito* atribuído a presença de flavonóides. Estudo realizado⁵¹ com extratos e frações de frutos de *Pouteria sapota*, *P. viridis* e *P. campechiana*, demonstrou a presença de flavonóides (dihidromiricetina e miricitrina) e catequinas (epicatequinas, galocatequina). Os flavonóides são compostos fenólicos de baixo peso molecular, de ocorrência bastante comum, produzidos praticamente em todos os órgãos do vegetal. Biologicamente são responsáveis pela proteção contra raios ultra-violeta, atração para polinizador, ação antioxidante, efeito alelopático, proteção contra patógenos e terapeuticamente são atribuídas ações antioxidantes, antiinflamatórias, antivirais, antitumorais.⁵⁴

Em conclusão, este estudo investigou o potencial inibitório de extratos de *P. ramiflora* sobre a atividade da alfa-Amilase Salivar Humana direcionando

as etapas de fracionamento para o extrato mais potente. Os resultados deste estudo mostraram que dos extratos brutos testados o EHPF causou uma significativa diminuição da atividade da enzima. Embora o extrato bruto tenha apresentado um forte efeito inibitório sobre HSA (64%) o mesmo não se observa para o composto isolado (1) e o composto (2) em mistura que tiveram seu efeito diminuído consideravelmente. Diante desses resultados pode-se sugerir que a atividade inibitória do extrato bruto se deve a um conjunto de substâncias ativas denominadas de fitocomplexo, que quando isoladas perdem parte de seu efeito. Essa ação em conjunto se torna interessante do ponto de vista farmacológico podendo utilizar na terapêutica, produtos a base de extratos brutos que sejam eficazes sem necessitar do uso dessas substâncias isoladas, cujos processos dispendiosos de obtenção vem muitas vezes como valor agregado aos medicamentos comerciais.

Seção experimental

Enzima. A enzima utilizada nos ensaios de inibição foi preparada no laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular/UFU segundo protocolo de rotina. A alfa-Amilase Salivar Humana foi obtida a partir de um pool de saliva de vários indivíduos saudáveis, submetida a um ciclo de congelamento e centrifugada. O sobrenadante da saliva foi diluído em tampão 25 mM Tris-HCl pH 8.0 contendo 10 mM de EGTA e EDTA e fracionado em coluna de cromatografia de troca aniônica Q-Sepharose (Amersham Bioscience). A coluna foi eluída com gradiente de NaCl (0-1 M) monitorando-se as frações a 280 nm, analisando seu perfil de proteína por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE). A banda correspondente à alfa-Amilase Salivar Humana (56 kDa) foi detectada em SDS-PAGE e Western blot sondando o filtro de nitrocelulose com anticorpo anti-alfa-Amilase salivar humano (Sigma). Dializou-se esta fração em 50 mM de bicarbonato de amônio sendo posteriormente liofilizada, solubilizada em 10 mM de tampão PBS pH 7.2 e armazenada a - 20°C para os ensaios da atividade enzimática da alfa-Amilase Salivar Humana (HSA) e sua inibição pelos extratos de *Pouteria*. Esta fração enriquecida em alfa-Amilase Salivar Humana

apresentou atividade cinco vezes maior (4.796 U/mL) em relação à saliva bruta (974,97 U/mL) contendo 20 µg/µL de proteína.

Substrato. Para os ensaios cinéticos de inibição utilizou-se o substrato sintético GalG2CNP (adquirido da Biotécnica/MG). Este substrato é cromogênico e de cadeia curta o qual não requer enzimas auxiliares para liberar o cromóforo 2-cloro-4-nitrofenol (CNP). Este ensaio se baseia na hidrólise do substrato (2-cloro-4-nitrofenil)-β-1,4-galactopiranosilmaltosideo (GalG2CNP) pela alfa-Amilase liberando somente dois produtos provenientes da degradação, CNP de coloração amarela que é proporcional à atividade enzimática e 1,4-galactopiranosilmaltosideo (Gal-G2).

Coleta, preparo do material vegetal e obtenção dos extratos brutos. O material vegetal (cascas e folhas) de *Pouteria ramiflora* foi coletado na Reserva Caça e Pesca em Uberlândia/MG em maio/2006 e identificado pela Prof. Dra. Ana Angélica Barbosa do Instituto de Biologia da UFU(Universidade Federal de Uberlândia). Um exemplar está depositado no herbário do Instituto de Biologia da UFU/Uberlândia (HFU) sob o n° (HUFU 45.535). As folhas foram lavadas em água corrente, desprezando-se aquelas danificadas por patógenos e das cascas foi retirado todo líquen. O material foi seco a sombra, temperatura ambiente até completa desnaturação enzimática, perda de água e conseqüente redução do volume. Posteriormente foram submetidos a moinho de facas para redução e homogeneização do tamanho das partículas. Foram preparados extratos aquosos por decocção e infusão (EADPC e EAIPC) da casca, infusão da folha (EAIPF) e extratos hidroalcoólicos 1:1 por maceração de cascas e folhas (EHPC e EHPP). Foram feitas duas extrações 1:10 (p/v) com tempo de maceração de 48 h. Em seguida as soluções foram filtradas e centrifugadas a 2000 x g, 4°C por 20 minutos. O sobrenadante das soluções extrativas hidroalcoólicas foram concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida e juntamente com os demais sobrenadantes foram submetidos à liofilização a - 40°C sendo armazenados a - 20°C até o momento de sua utilização. Os extratos etanólicos da casca do caule (EECC), casca da raiz (EECR), folha (EEF), madeira do caule (EEMC) e extrato da madeira da raiz

(EEMR) foram fornecidos pelo Laboratório de Farmacognosia/UNB (Universidade de Brasília/DF) e utilizados nos ensaios de inibição da atividade de HSA.

Avaliação da atividade inibitória *in vitro* dos extratos de *Pouteria ramiflora* sobre a atividade da alfa-Amilase Salivar Humana (HSA). Realizou-se ensaio cinético em microplaca utilizando como substrato sintético o GalG2CNP. Os extratos aquosos, etanólicos e hidroalcoólicos das cascas e folhas de *Pouteria ramiflora* foram solubilizados em DMSO (dimetilsulfóxido) na concentração de 10 mg/mL e utilizados no ensaio. Utilizou-se DMSO e enzima como controles, GalG2CNP a 2 mM recém preparado, fração enriquecida em alfa-Amilase 1:595. A atividade da enzima foi determinada pela medida da absorbância da mistura nos intervalos de 1,2 e 3 minutos em espectrofotômetro a 405 nm, termostatizado a 37°C. Dois tipos de experimentos foram realizados em quadruplicata. No primeiro experimento, sem pré incubação, 10 µL do extrato e 300 µL de GalG2CNP foram misturados. A reação foi iniciada pela adição de 10 µL da enzima. No segundo experimento, com pré-incubação de 10 e 30 min, 50 µL da enzima 1:595 foram pré-incubadas com 5 µL dos extratos. A reação iniciou-se retirando-se 10 µL desta mistura pipetando sobre a microplaca sendo imediatamente acrescida de 300 µL de GalG2CNP. Este teste se baseia na hidrólise do substrato GalG2CNP pela alfa-Amilase Salivar Humana liberando CNP e Gal-G2 e o aumento da absorbância resultante por minuto está diretamente relacionado com a atividade da alfa-Amilase. A atividade em U/mL é expressa de acordo com a fórmula:

$$\text{Atividade de } \alpha\text{-amilase U/mL} = \frac{\Delta \text{ abs./min} \times \text{Vt} \times \text{Fd}}{\text{A mM} \times \text{Va} \times \text{Clm}} = \frac{\Delta \text{ abs./min}}{12.9} \times \frac{0.310}{0.01} \times \frac{595}{0.97}$$

onde:

$\Delta \text{ abs./min}$ = diferença de absorbância por minuto

Vt= volume total no ensaio (mL)

Fd= fator de diluição da enzima

A mM= absorvidade milimolar (mM) do GalG2CNP , pH 6.0, 37 °C

Va= volume da amostra (mL)

Clm =caminho da luz percorrido na microplaca (clm)

A % de atividade da enzima foi calculada pela seguinte fórmula $(Ac - Ae)/Ac \times 100$ onde Ac é a absorbância do controle e Ae a absorbância do extrato e a porcentagem de inibição foi obtida por diferença das atividades (U/mL) obtidas, considerando a atividade da enzima como 100%.

Fracionamento do extrato bruto EHPF de *Pouteria ramiflora* direcionado pelo ensaio de inibição *in vitro* da atividade de HSA.

Este ensaio foi realizado em funil de separação por partição por solventes orgânicos de polaridade crescente, utilizando 1 g do extrato bruto hidroalcoólico da folha (EHPF) solubilizado em 50 mL de metanol. A partição implica uma dissolução seletiva da substância e foi realizada pela escolha de um sistema gradiente de solventes imiscíveis como hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol e água. Inicialmente verteu-se no funil o solvente de menor polaridade, hexano seguido pelos demais tendo suas respectivas frações recolhidas, as quais foram posteriormente evaporadas sob pressão reduzida, liofilizadas, solubilizadas em DMSO e submetidas aos ensaios de inibição da atividade enzimática de HSA. Utilizaram-se DMSO e enzima como controles. Foram pesados exatamente 5 g de EHPF que foi solubilizado em cerca de 14 mL de metanol (divididos em pequenas alíquotas) sendo centrifugadas cada uma delas tendo o sobrenadante aplicado em coluna empacotada com resina Sephadex LH-20 (210 cm x 3,3 cm) previamente equilibrada com metanol. A coluna foi eluída com metanol seguida por acetona e água. As frações resultantes foram analisadas por CCD (cromatografia em camada delgada) em sílica, reveladas com iodo seguido por vanilina ácido sulfúrico sendo logo após aquecida a 100°C e também reveladas com NP/PEG para detecção de flavonóides. As frações com perfil cromatográfico semelhante foram reunidas, rotaevaporadas sob pressão reduzida, liofilizadas e submetidas ao ensaio de inibição da atividade enzimática de HSA pelo método cinético GalG2CNP.

Análise das frações de EHPF em CLAE analítica e semipreparativa. As frações reunidas provenientes da coluna de Sephadex foram filtradas em filtro de 13 mm 0.45 µm e tiveram seu perfil analisado por

CLAE analítica em cromatógrafo Shimadzu SCL 10 ADVP coluna octadecilsilano C18 fase reversa 250 x 4.6 mm, 5 µm de diâmetro, usando como eluente metanol e água com 0.1% de ácido acético por 40 min. com fluxo de 1 mL/min. a 280 nm. As frações que apresentaram melhor efeito inibitório sobre a atividade de HSA e com rendimento satisfatório, tiveram seu perfil analisado em CLAE semipreparativa (coluna cromatográfica octadecilsilano C18 fase reversa) usando como gradiente metanol:água com ácido acético 0.01% (0 a 30%) sob fluxo de 2 mL/min a 280 nm, com tempo de análise de 170 min. visando a separação e purificação dos ativos.

Análises estatísticas. Os dados são expressos como valores de média ± desvio padrão (DP). Comparações entre os tratamentos foram feitas de acordo com o teste Scott-Knott (1974) com valores de $p < 0.05$ considerados significantes.

Referências

- (1) Brayer, G.D.; Luo, Y.; Withers, S.G. *Protein Science*, 1995, 4, 1730-174.
- (2) Ramasubbu, N.; Paloth, V.; Luo, Y.; Brayer, G. D. Levine, M. J. *Acta Crystallogr D. Biol. Crystallogr.*, 1996, 1;52(Pt 3), 435-46.
- (3) Brayer, G.D.; Sidhu, G.; Maurus, R.; Rydberg, E.H.; Braun, C.; Wang, Y.; Nguyen, N. T.; Overall, C.M.; Withers, S.G. *Biochemistry*, 2000, 39, 4778-4791.
- (4) Nahoum, V.; Roux, G.; Anton, V.; Rougé, P.; Puigserver, A.; Bischoff, H.; Henrissat, B., Payan, F. *Biochem. J.*, 2000, 346, 201-208.
- (5) Fisher, S.Z.; Govindasamy, L.; TU, C.; McKenna, M.A.; Silverman, D.N.; Rjanieme, H.J.; McKenna, R. *Acta Crystallographica*, 2006, F 62, 88-93.
- (6) Ramasubbu, N.; Ragunath, C.; Mishra, P.J. *J Mol Biol.* 2003, 325(5), 1061-76.
- (7) Hanefeld, M.; Cagatay, M.; Petrowitsch, T.; Neuser, D.; Petzinna, D.;

- Rupp, M. *Eur. Heart J.*, 2004a, 25(1), 10-6.
- (8) Hanefeld, M.; Chiasson, J.I.; Koehler, C.; Henkel, E.; Schaper, F.; Temelkova-Kurktschiev, T. *Stroke*. 2004b, 35(5), 1073-8.
- (9) Chiasson, J.L. *Endocr Pract.* , 2006, 12 Suppl 1, 25-30.
- (10) Satoh, N.; Shimatsu, A.; Yamada, K.; Aizawa-Abe, M.; Suganami, T.; Kuzuya, H.; Ogawa, Y. *Metabolism*. 2006, 55(6), 786-93.
- (11) Miura, T.; Koide, T.; Ohichi, R.; Kako, M.; Usami, M.; Ishihara, E.; Yasuda, N.; Ishida, H.; Seino, Y.; Tanigawa, K. *J. Nutr. Sci. Vitaminol*, 1998, 44(3):371-9.
- (12) Komaki, E., Yamaguchi, S., Maru, I., Kinoshita, M., Kakehi, K., Ohta, Y., Tsukada, Y. *Food, Sci. Technol. Res.*, 2003, 9(1), 35-39.
- (13) Kawaguchi, M., Tanabe, H., Nagamine, K. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2007, 71(5), 1130-1135.
- (14) Matsui, T., Ueda, T., Oki, T., Sugita, K., Terahara, N., Matsumoto, K. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 49(4):1952-62.
- (15) Barroso, G. Rio de Janeiro, 1978, LTC/EDUSP.
- (16) Joly, A. São Paulo, 1998, Companhia Editora Nacional.
- (17) Pennington, T.D. Monograph 52. Publ. New York, 1990.
- (18) Mabberley, D.J. Cambridge University Press: New York, 1993; p 520.
- (19) Kuete, V., Tangmouo, J.G., Penlap Beng, V., Ngounou, F.N., Lontsi, D. *Journal of Ethnopharmacology* , 2006, vol. 104(1-2), 5-11.
- (20) Bennani, H, Drissi, A, Giton, F, Kheuang, L, Fiet, J, Adlouni, A. *Cancer Detect. Prev.* , 2007, 31(1), 64-69.
- (21) Drissi, A., Bennani, H., Giton, F., Charrouf, Z., Fiet, J., Adlouni, A. *Cancer Invest.*, 2006, 24(6), 588-592.

- (22) Boleti, A.P., Freire, M.G.M., Coelho, M.B., Silva, W.da, Baldasso, P.A., Gomes, V.M., Marangoni, S., Novelho, J.C., Macedo, M.L. *J Agric Food Chem.*, 2007, 55(7), 2653-8.
- (23) Haraguchi, H., Hayashi, R., Ishizu, T., Yagi, A. *Planta Med.*, 69(9):853-855, 2003.
- (24) Eskander, J., Lavaud, C., Andel-Khalik, S.M., Soliman H.S.M, Mahmoud, I.I., Long, C. *J. Nat. Prod.*, 68 (6), 2005, 832 -841.
- (25) Eskander, J., Lavaud, C., Pouny, I., Soliman H.S.M., Andel-Khalik, S.M., Mahmoud, I.I. *Phytochemistry*, 2006, 67(16), 1793-1799.
- (26) Wandji, J.; Tillequin, F. ; Mulholland, D. A.; Chi Shirri, J. ; Tsabang, N. ; Seguin, E.; Verite, P.; Libot , F.; Fomum, Z. T. *Phytochemistry*, 2003, 64(4) 845-849.
- (27) Castro, C. F. de S., Silva, C. A. de M., Perfeito, J. P. S., Santos, M. L. dos, Resck, I. S, Paula, J. E. de, Silveira, D. 2006, Resumo apresentado na 29^a *Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*.
- (28) Godoy, H.T., Rodriguez-Amaya, B. *J. Agric. Food Chem.* 1994, 42, 1306–1313.
- (29) Wuttithamwe, J., W. *Encyclopedia of Herbs*. Odiean Store, Bangkok, 1996, 483.
- (30) Manosroi, A., Saraphanchotiwitthaya, A, Manosroi, J. *J. Ethnopharmacol.*, 2005, 101(1-3), 90-4.
- (31) Morton, J. F. *Fruits of Warm Climates*; Miami, FL, 1987; pp 398-405.
- (32) Arambewela, L.S., Arawwawala, .LD., Ratnasooriya, W.D. *J Ethnopharmacol.* ,2005,102(2), 239-45.

- (33) Gad, M.Z, El-Sawalhi, M.M., Ismail, M.F, El-Tanbouly, N.D. *Mol. Cell. Biochem.* 2006, 281(1-2):173-83.
- (34) Conforti, F., Loizzo, M.R., Statti, G.A, Menichini F. *Biol Pharm Bull.*, 2005 28(9), 1791-4.
- (35) Jonson, B. *Diabetologia*, 2002, 45, S5- S12.
- (36) Murai A., Iwamura K., Takada M., Ogawa K., Usui T., Okumura, J. *Life Sci.* , 2002, 71(12),1405-15.
- (37) Layer, P.; Rizza, RA.; Zinsmeister, AP.; Carlsin, GL.; Dimagno, EP. *Mayoclin. Proc.*, 1986a, 61, 442-447.
- (38) Layer, P.; Zinsmeister, AR.; Dimagno, EP. *Gastroenterology*, 1986 b, vol. 91, 41-48.
- (39) Albuquerque, CL. Monografia apresentada para conclusão de graduação em Ciências Biológicas, UFU, 2004, 25 .
- (40) Kandra, L., Zajács, A., Remenyik, J., Gyémánt, G. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 334,824-828.
- (41) Kandra, L., Gyémánt, G., Zajács, A., Batta, G. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 319, 2004, 1265-1271.
- (42) Kotowaroo, M.I., Mahomoodally, M.F., Gurib-Fakim, A., Subratty, A.H. *Phytotherapy Research*, 2006, 20, 228-231.
- (43) Ali, H., Houghton, P.J., Soumyanath, A.. *J.Ethnopharmacology*, 2006, vol. 107(3), 449-455.
- (44) Hamamura, T., Mayama, C., Aoki, H., Hirayama, Y., Shimizu, M. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2006, 70(8), 1813-1820.
- (45) Schoenfelder, T., Cirimbelli, T.M., Citadini-Zanette, V. *Journal of Ethnopharmacology*, 2006, 107, 456–459.

- (46) Mai, T.T., Chuyen, N.V. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2007, 71(1), 69-76.
- (47) Narvaéz-Mastache, J., Gardunõ-Ramírez, M.L., Alvarez, L., Delgado, G. *J. Nat. Prod.*, 2006, 69 (12), 1687 -1691.
- (48) Hansawasdi, C., Kawabata, J., Kasai, T. *Biosc. Biotechnol. Biochem.*, 2000, 64(5), 1041-1043.
- (49) Ma, J., Yang, H., Basile, M.J., Kennelly, E.J. *J. of Agric. And Food Chem.*, 2004, 52, 5873-5878.
- (50) Brito, N.R.S. Tese de Doutorado, 1986, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- (51) Fontes Júnior, E. de A. Dissertação (Mestrado) 2004– Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém.
- (52) Simões, C.M.O.(Org). Porto Alegre/Florianópolis, 2003, Editora da UFRGS/Editora da UFSC.