

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

POTENCIAL ANTIOXIDANTE E INIBIÇÃO DE ENZIMAS DIGESTIVAS DE
EXTRATOS DE PLANTAS DA AMAZÔNIA.

Bolsista: Marcela Da Costa Barbosa, CNPq

MANAUS
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL
PIB-S/0030/2011
POTENCIAL ANTIOXIDANTE E INIBIÇÃO DE ENZIMAS DIGESTIVAS DE
EXTRATOS DE PLANTAS DA AMAZÔNIA.

Bolsista: Marcela Da Costa Barbosa, CNPq
Orientador: Prof^o Dr^o Emerson Silva Lima

MANAUS
2012

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, ao Núcleo de Estudo e Pesquisa em Ciência da Informação e aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa, financiada pelo Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas, foi desenvolvida pelo Núcleo de Estudo e Pesquisa em Ciência da Informação e se caracteriza como sub projeto do projeto de pesquisa Bibliotecas Digitais.

RESUMO

Tem sido crescente a busca por fitoterápicos com potencial antioxidantes que combatam radicais livres e possam servir como alternativas terapêuticas no controle glicêmico e lipídico. A Amazônia possui uma gama de espécies vegetais, no entanto apresenta até então poucos estudos quanto a seus efeitos terapêuticos, principalmente nessa área de interesse. Este projeto propôs avaliar espécies vegetais presentes nesta região quanto ao seu potencial antioxidante e atividade de inibição de enzimas digestivas. Foram investigados 65 extratos de plantas da Amazônia sobre a atividade de enzimas digestivas. Foram também realizadas análises do potencial antioxidante pela a dosagem de inibição do radical DPPH, conteúdo de flavonóides totais, fenóis totais e atividade inibitória das seguintes enzimas lipase, α -amilase e α -glucosidases. O potencial redutor de DPPH, medido em concentração inibitória 50 (CI₅₀), revelou o melhor resultado para a casca de *Caesalpinia ferrea* (27±0,27 µg/mL). Os ensaios de flavonóides e fenóis totais não demonstraram resultados significativos em nenhuma espécie. Na atividade inibitória sobre as enzimas lipase e α -amilase os extratos também não mostraram inibição acima de 50% na concentração de 100 µg/mL. Em relação a α -glucosidase de fonte animal (rato) o extrato *Eugenia punicifolia* apresentou o melhor resultado de inibição com CI₅₀ de 2,4±0,05 µg/ml. Em relação a α -glucosidase de *S.cerevisiae* o melhor extrato de inibição foi encontrado na espécie de *Byrsonima japurensis* (95% a 100 µg/mL) e o melhor valor de CI₅₀ foi observado para a amostra 157-r (0,4±0,11 µg/ml). Esses resultados indicaram que de forma geral algumas das plantas mostraram-se promissoras fontes de antioxidantes naturais. Também algumas das espécies mostraram-se potenciais inibidores das enzimas estudadas podendo futuramente serem exploradas do ponto de vista biotecnológico.

Palavras-Chaves: Biodiversidade, potencial antioxidante, lipase, α -amilase, α -glucosidases.

ABSTRACT

Knowing the growing demand for herbal medicines with potential antioxidants that fight free radicals and alternative therapies in glycemic control and lipid, biodiversity in the Amazon has a huge range of plant species, but has so far few studies about their therapeutic effects, especially in this area of interest. In this sense, this project was to investigate plant species present in this region for their potential antioxidant activity and inhibition of enzymes digestivas. Para achieve this purpose, we investigated 65 Amazonian plant extracts on the activity of enzymes. Analyses of the antioxidant potential for the determination of DPPH, total flavonoids, total phenols and inhibitory activity of the following enzymes: lipase, α -amylase and α -glucosidase (sources: the rat intestine and *S.cerevisiae*). Antioxidant activity can to inhibit 50% (CI₅₀), showed the best result on the bark of *Caesalpinia ferrea* (27 μ g/mL). tests Flavonoids and phenolic compounds have not shown significant results in any species. The inhibitory activity of the enzymes lipase and α -amylase and also there were no inhibition above 50% between extracts. For α -glucosidase source animal (mouse) *Eugenia punicifolia* extract showed the best result for both inhibition (76%) as IC 50 (2.4 mg / ml). For *S.cerevisiae* α -glucosidase of the best extract of inhibition was found in species of *Byrsonima japurensis* (95%) and improved IC 50 value was contained in the species 157-r (0.4 mg / ml). In conclusion, these results present a view that some medicinal plants are promising sources of natural antioxidants. Although the inhibitory effect of these extracts have been established in vitro, these results indicate that the extract *Eugenia punicifolia* can potentially suppress the postprandial rise of glucose through its inhibitory potency on α -glucosidase. Considering that natural substances can be responsible for the protective effect against the risks of many pathological processes, results described here will stimulate further study to evaluate the isolated compounds of these active species.

Key Words: Biodiversity, antioxidant potential, lipase, α -amylase, α -glucosidase.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características e processo de obtenção de 65 extratos de plantas da Amazônia..	15
Tabela 2: Extratos vegetais avaliados quanto à atividade antioxidante.....	20
Tabela 3: Extratos vegetais avaliados quanto a atividade inibitória de enzimas digestivas..	23
Tabela 4: Concentração dos extratos ativos capaz de inibir 50% (CI ₅₀) a α -glucosidase de fonte animal(rato).....	24
Tabela 5: Concentração dos extratos ativos capaz de inibir 50% (CI ₅₀) a α -glucosidase de levedura (<i>S.cerevisiae</i>).....	26

LISTA DE FIGURAS

- Fig.1. Comparação do CI₅₀ concentração inibitória dos extratos de plantas e acarbose sobre a atividade de animal (rato) α -glucosidase.....25
- Fig.2. Comparação do CI₅₀ concentração inibitória dos extratos de plantas e acarbose sobre a atividade de leveduras α -glucosidase.....26

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	10
2.1 Diabetes e Obesidade.....	10
2.2 Potencial Antioxidante.....	10
2.3 Enzimas envolvidas no processo digestivo.....	11
2.3.1 α -Amilase.....	11
2.3.2 α -Glucosidase.....	12
2.3.3 Lipase.....	12
2.4 Plantas Medicinais da Amazônia.....	13
3 OBJETIVOS.....	14
3.1 Gerais.....	14
3.2 Específicos.....	14
4 METODOLOGIA.....	15
4.1 Escolha dos extratos.....	15
4.2 Atividade sequestrante de radical DPPH.....	16
4.3 Determinação de fenóis totais.....	17
4.4 Determinação de flavonoides totais.....	17
4.5 Teste de inibição da α -amilase.....	18
4.6 Teste de inibição da α -glucosidase.....	18
4.7 Teste de inibição da lipase.....	19
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
5.1. Atividade Antioxidante.....	19
5.2 Ensaio de inibição sobre Lipase pancreática.....	21
5.3 Ensaio de inibição sobre α -amilase.....	22
5.4 Ensaio de inibição sobre α -glucosidase.....	22
6 CONCLUSÃO.....	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

1. INTRODUÇÃO

Hoje em dia, uma grande esforço está sendo gasto para encontrar antioxidantes eficazes para o tratamento ou prevenção de radicais livres mediada por efeitos deletérios. O reino vegetal é uma boa fonte para produzir uma ampla gama de antioxidantes naturais com propriedades farmacológicas relacionadas à presença de compostos fenólicos, especialmente derivados de ácidos fenólicos e flavonóides (REITER et al., 1995).

A inibição de enzimas digestivas como α -amilases, α -glucosidase e lipase pode ter uma grande variedade de aplicações, por exemplo, o tratamento adjuvante de diabetes tipo II e obesidade, com possibilidades de redução dos níveis de glicemia pós-prandial, redução moderada e taxas de hemoglobina glicosilada e de altos teores de gordura (KANDRA et al., 2005; RABASA-LHORET et al., 2004; UDANI et al., 2007).

As α -amilases (E.C. 3.2.1.1) são endoenzimas que catalisam a hidrólise de polissacarídeos, como amido ou glicogênio em plantas, animais e microrganismos. Atuam sobre ligações glicosídicas α -1,4 internas da molécula do amido, formando unidades menores de carboidratos que possam ser completamente digeridas pelo organismo. Geralmente os inibidores não proteicos são moléculas de baixo peso molecular, como acarbose, que possuem alta atividade inibitória sobre α -amilase pancreática de porco e α -amilase pancreática humana (DJONOV et al., 2008; GENG et al., 2008; MACGREGOR et al., 2001; OUDJERIOUAT et al., 2003; PEREIRA et al., 2006; WANG et al., 2008; YOON et al., 2003).

A α -Glucosidase (EC 3.2.1.20) é uma enzima responsável pela quebra de carboidratos em monossacarídeos absorvíveis. Participa de processos bioquímicos fundamentais do metabolismo, como processamento de oligossacarídeos provenientes da alimentação, tornando disponíveis unidades monossacarídicas de glicose para geração de glicogênio e glicoproteínas celulares (GANEM et al., 1994; STUART et al., 2004).

A Lipase (E.C. 3.1.1.3) é uma enzima hidrolítica que atua sobre a ligação éster de vários compostos, possuem a função de catalisar a hidrólise de triacilgliceróis aos ácidos graxos correspondentes e glicerol. Seus inibidores são representados principalmente pelo fármaco Orlistat, que se liga de maneira irreversível no sítio ativo da lipase por meio de ligações covalentes (CAMPOLARGO, 2008; COSTA, 1999; GODOI et al., 2008; SANTANIELLO et al., 1990; THEIL, 1995).

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Diabetes e Obesidade

O controle dos níveis de glicose pós-prandial no plasma é fundamental no tratamento do diabetes e redução das complicações vasculares crônicas. Um dos mecanismos terapêuticos para reduzir a hiperglicemia pós-prandial é impedir a absorção de carboidratos após ingestão de alimentos. Estes hidratos de carbono, polissacarídeos complexos principalmente, devem ser hidrolisados por enzimas digestivas (α -amilase e α -glucosidase) para os monossacarídeos serem absorvidos do lúmen intestinal transportado através da corrente sanguínea. Assim, os inibidores sintéticos da enzima, considerados para o tratamento de diabetes (Voglibose, Acarbose e Miglitol) são amplamente utilizados em combinação com drogas que estimulam a secreção de resistência à insulina ou diminuição para obter um efeito sinérgico, mostrado como uma alternativa eficaz para prorrogar o período de controle (I.F.F., 2001; IQB, 2004; YOUNG et al., 2003).

Tem sido relatado que a ingestão maior de alimentos com energia e alto teor de gordura na dieta leva ao aumento da ingestão calórica e, portanto, promove o armazenamento de gordura corporal e ganhos de peso corporal em humanos e animais. Há muitas experiências para descobrir a terapêutica para este crítico problema público de obesidade. Uma das abordagens terapêuticas para a prevenção obesidade está a de retardar a absorção de ácidos graxos pela inibição de lipase nos órgãos digestivos. Uma variedade de produtos naturais, incluindo extratos e compostos isolados de plantas, pode induzir o peso corporal, redução e prevenção da obesidade induzida pela dieta. Portanto, eles têm sido amplamente utilizada no tratamento da obesidade. Um crescente número de enzimas envolvidas em vias metabólicas dos lipídeos estão sendo identificados e caracterizados. Eles representam um conjunto precioso de potenciais alvos terapêuticos para a obesidade (BALLINGER et al., 2002; BRAY et al., 1998, 1999; HAN et al., 2005a; MENIKOVA et al., 2006; MORO et al., 2000; RAYALAM et al., 2008; SHI et al., 2004; YANOVSKI et al., 2002).

2.2 Potencial Antioxidante

Uma série de mecanismos antioxidantes e extracelulares é essencial para limpar "intermediários reativos" que são gerados continuamente em quase todas as células aeróbicas. No entanto, a produção excessiva de radicais livres resultam no aparecimento de inúmeras doenças e acelera o envelhecimento (CRYSTAL, 1991; EL-KHATIB, 1997; FREI, 1997; NIESINK et al., 1996). (HALLIWELL, 1995).

Um grande número de experimentos têm sido realizados a respeito da atividade antioxidante de diversos extratos de plantas e pós. Os resultados destes experimentos revelam que, a atividade é devido a vários metabólitos fenólicos secundário, especialmente compostos, por exemplo, flavonóides e taninos. Polifenóis têm sido sugerido para exercer efeitos farmacológicos benéficos sobre distúrbios neurológicos, com base em observações *in vitro*, potencial anticarcinogênico, efeitos cardioprotetores e antimutagênica ligada ao seu radical livre. Polifenóis também são relatados como agentes quimiopreventivos pela diminuição do colesterol a cerca de limitar os danos celulares (ALGHAZEER et al., 2008; FERREIRA et al., 2002; MOOSMANN et al., 1999; PARR et al., 2000; SANTOS-BUELGA et al., 2000).

2.3 Enzimas envolvidas no processo digestivo

2.3.1 α -amilase

α -amilases (1,4- α -glucano-glucanohidrolase) são endoenzimas amplamente distribuídas em microrganismos, plantas e animais que catalisam a hidrólise de polissacarídeos, como amido ou glicogênio. Essas enzimas são carboidrases que atuam sobre ligações glicosídicas α -1,4 internas da molécula do amido, formando unidades menores de carboidratos que possam ser completamente digeridas pelo organismo (MACGREGOR et al., 2001; DJONOV et al., 2008; WANG et al., 2008; YOON & ROBYT, 2003; PEREIRA et al., 2006; OUDJERIOUAT et al., 2003).

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

A inibição dessa enzima pode ter uma grande variedade de aplicações, por exemplo, o tratamento adjuvante de diabetes tipo II e obesidade, com possibilidades de redução dos níveis de glicemia pós-prandial e redução moderada e taxas de hemoglobina glicosilada (Hb_{1c}). Esses efeitos podem ocorrer devido ao retardamento da digestão de carboidratos, que por sua vez torna mais lenta a absorção de glicose (KANDRA et al., 2005; RABASA-LHORET & CHIASSON, 2004; UDANI & SINGH, 2007).

2.3.2 α -glucosidase

α -Glucosidases (E.C 3.2.1.20) são enzimas que catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 de carboidratos como os dissacarídeos e oligossacarídeos provenientes da alimentação. Após a hidrólise do amido pela α -amilase, a maltose e as unidades menores de oligossacarídeos são clivadas pela ação da α -glucosidase, levando a produção de glicose que será absorvida pelo organismo. A α -glucosidase cliva as unidades terminais de glicose da amilose ou amilopectina, tendo preferência por malto-oligossacarídeos menores, liberando glicose com uma configuração α (GANEM et al., 1994, (SHINDE, et al. 2008; VAN DER MAAREL, et al. 2002).

As múltiplas funções da enzima α -glucosidase no organismo justifica a procura por agentes terapêuticos como potenciais inibidores para serem utilizados no tratamento de doenças como diabetes, obesidade, infecções pelo HIV e tumores (LEE, et al. 2001; MELO, et al. 2006; OTA, et al. 2009).

2.3.3. Lipase

As lipases (E.C. 3.1.1.3) são enzimas hidrolíticas que possuem a função de catalisar a hidrólise de triacilgliceróis liberando ácidos graxos correspondentes e glicerol. (BRACCO, 1994).

Entre os tratamentos para a obesidade, uma das estratégias mais promissoras no esforço para reduzir a ingestão de energia através de mecanismos gastrointestinal, sem alterar os mecanismos central, é o desenvolvimento de digestão de nutrientes e inibidores da absorção. Gordura na dieta não é diretamente absorvida pelo intestino, a menos que a gordura tenha sido submetido à ação da lipase pancreática. Portanto, a lipase pancreática é um dos mais amplamente mecanismos estudados para determinar o potencial de produtos naturais com eficácia como agentes anti-obesidade. Orlistat é um mecanismo de inibição de lipase, por meio de uma ligação covalente ao sítio ativo da lipase. Embora este inibidor da lipase pancreática é clinicamente aprovado para tratamento da obesidade, o orlistat tem certos efeitos colaterais gastrointestinal desagradáveis. (BIRARI et al., 2007, BALLINGER et al., 2002; HADVÁRY et al., 1988, 1991; TSUJITA et al., 2006; KARAMADOUKIS et al., 2009; THURAIRAJAH et al., 2005).

2.4 Plantas Medicinais da Amazônia

No Brasil encontram-se cerca de 20% das 250 mil espécies medicinais catalogadas pela Organização das Nações Unidas (ONU), facilitando o aproveitamento do potencial curativo dos vegetais para o tratamento de doenças. Na Amazônia existe grande diversidade vegetal, onde se encontram muitas plantas com propriedades medicinais e, que durante milênios são utilizadas pelas comunidades nativas (DRUMOND et al., 2004).

As plantas medicinais sempre foram objeto de estudo na tentativa de descobrir novas fontes de obtenção de princípios ativos. Muitas plantas possuem atividades tóxicas e o seu uso indiscriminado pode causar sérios problemas. Com os avanços científicos, esta prática milenar perdeu espaço para os medicamentos sintéticos, entretanto, o alto custo destes fármacos e os efeitos colaterais apresentados contribuíram para o ressurgimento da terapia através das plantas (ALEMÃO, 1892; SCHVARTSMAN, 1990).

3.OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a atividade antioxidante e o potencial inibitório de extratos de plantas da Amazônia sobre α -amilase, α -glucosidase, e lipase.

3.2 Específicos

- Estudar o efeito inibitório de extratos de plantas da Amazônia sobre a atividade da α -amilase, α -glucosidase e lipase *in vitro*.
- Avaliar o potencial antioxidante de extratos de plantas da Amazônia e relacionar com a atividade de inibição das enzimas α -amilase, α -glucosidase e lipase.
- Determinar CI₅₀ dos extratos mais ativos.

4.METODOLOGIA

4.1. Escolha dos extratos

Foram selecionados 65 extratos secos (Tabela 1) obtidos por maceração de folhas, sementes, partes aéreas, casca, caule, galhos e raízes de plantas colhidas na Amazônia. Os extratos foram provenientes do banco de extratos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM e da Coordenação de Pesquisa em Produtos Naturais (CPPN) do Instituto de Pesquisas da Amazônia (INPA), por colaboração com a Dra. Cecília Verônica Nunes. As 65 amostras de extratos que foram submetidas aos testes foram identificadas por códigos. A não revelação de algumas das espécies e a apresentação por códigos se deu propositalmente devido ao fato de alguns desses dados serem objeto de pedido de patente após confirmação das atividades em outros experimentos.

Tabela 1: Características e processo de obtenção dos 65 extratos de plantas da Amazônia:

<i>n</i>	<i>Código</i>	<i>Família</i>	<i>Espécie</i>	<i>Material</i>	<i>Solvente</i>
1	031				MeOH
2	162			Folha	DCM
3	145			folha	MeOH
4	091			Folhas	MeOH
5	162			Caule	H ₂ O
6	1475			Semente	H ₂ O
7	230			Galho	MeOH
8	230			casca	MeOH
9	157			Raiz	MeOH
10	145			Semente	MeOH
11	146			Galho	H ₂ O
12	307			galho	MeOH
13	146			Galho	MeOH
14	234			Casca	MeOH
15	152			Folha	H ₂ O
16	230			Folha	MeOH
17	0,91			Casca	MeOH
18	152			Folha	MeOH
19	145			Galho	MeOH
20	234			Galho	MeOH
21	102			Folha	H ₂ O
22	73			Casca	MeOH
23	234			Folha	MeOH
24	24			Galho	MeOH
25	162			Folha	MeOH
26	162			Galho	H ₂ O
27	157			Folhas	MeOH
28	146			Folha	MeOH
29	125			Partes aéreas	H ₂ O
30	162			Galho	MeOH
31	162			Caule	MeOH
32	PBP-001				
33	PBP-002				
34	PBP-003				

35	PBP-004			
36	PBP-005			
37	PBP-006			
38	PBP-007			
39	PBP-008			
40	PBP-009			
41	PBP-010			
42		<i>Rubiaceae</i>	<i>Calycophyllum spruceanum</i>	H ₂ O
43		<i>Rubiaceae</i>	<i>Calycophyllum spruceanum</i>	H ₂ O/EtOH
44		<i>Malpighiaceae</i>	<i>Byrsonima japurensis</i>	H ₂ O
45		<i>Malpighiaceae</i>	<i>Byrsonima japurensis</i>	H ₂ O/EtOH
46		<i>L.Caesalpinoideae</i>	<i>Caesalpinia ferrea</i>	Vagem
47		<i>L.Caesalpinoideae</i>	<i>Caesalpinia ferrea</i>	Casca
48		<i>Bignoniaceae</i>	<i>Arrabidaea chica</i>	H ₂ O/EtOH
49		<i>Celastraceae</i>	<i>Maytenus guyanensis</i>	EtOH
50		<i>Olacaceae</i>	<i>Ptychopetalum olacoides</i>	EtOH
51		<i>Bignoniaceae</i>	<i>Arrabidaea chica</i>	EtOH
52		<i>Clusiaceae</i>	<i>Vismia guianensis</i>	
53		<i>Passifloraceae</i>	<i>Passiflora nítida</i>	
54		<i>Liliaceae</i>	<i>Smilax brasiliensis</i>	
55		<i>L.Papilionoideae</i>	<i>Derris floribunda</i>	MeOH
56		<i>L.Papilionoideae</i>	<i>Derris floribunda</i>	DCM
57		<i>L.Papilionoideae</i>	<i>Derris floribunda</i>	H ₂ O
58		<i>Malpighiaceae</i>	<i>Byrsonima japurensis</i>	EtOH
59		<i>Myrtaceae</i>	<i>Eugenia punicifolia</i>	
60		<i>Vitaceae</i>	<i>Cissus sicyoides</i>	
61	249			Galho
62	249			Folha
63	249			Galho
64	249			Folha
65	249			Folha

Solventes: DCM: diclorometano;H₂O:água;H₂O/EtOH: solução hidroetanólica; H₂O:água; MeOH: metanol.

Prepararam-se os extratos na concentração de 10mg/ml em DMSO. A partir dessa concentração fez-se a concentração de 1mg/ml com o mesmo diluente (DMSO) a fim de executar os testes.Todos as metodologias a seguir, foram realizadas em triplicatas e o uso de seus respectivos padrões, usando-os nas mesma concentração dos extratos (1mg/ml). O cálculo de inibição baseado na absorbância do controle, utilizou-se o programa Excell® e Origin ® 6.0 para o cálculo de CI₅₀. Realizaram-se os testes pelo método espectrofotométrico em microplacas de poliestireno de fundo chato contendo 96 poços (modelo Kartell) lidos no Leitor de Elisa (DTX 800, Multimode Detector, Beckman Coulter) com o uso de incubadora de Placas de ELISA (NI 1721) e pipetas automáticas de várias marcas e capacidades.

4.2 Atividade sequestrante de radical DPPH

Para a avaliação de propriedades de radicais livres, usou-se o 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH),segundo metodologia utilizada por MOLYNEUX (2004), com modificações. Fez-se 8

diluições sucessivas (seriadas) do extrato, adicionando 60 µL do extrato no primeiro poço. Colocou-se 30 µL de DMSO nos 7 poços restantes, retirou-se 30 µL do extrato e fez-se a diluição seriada em todos os poços e desprezou-se os 30 µL finais. O mesmo foi feito com o padrão quercetina, na concentração de 100 µg/mL, com suas respectivas diluições. Para o controle, foram utilizados 270 µL de DPPH e 30 µL de etanol. A placa foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente no escuro e a leitura no leitor de em 517 nm. Em seguida foi feito o cálculo de inibição através da seguinte fórmula: $AA = 100 - (\text{Abs amostra} / \text{Abs controle}) * 100$. Todos os extratos são testados diferentes concentrações entre 0,78125 e 100 µg/mL. A partir dos resultados de inibição calculou-se a concentração capaz de inibir 50% da atividade enzimática (CI₅₀). Os resultados foram expressos como média e desvio padrão (±) apresentados em tabela.

4.3 Determinação de fenóis totais

A determinação do teor de fenóis totais foi realizada por meio de espectroscopia na região do visível utilizando o método de Folin–Ciocalteu, com modificações (BONOLI et al. 2004). Os extratos, dissolvidos em DMSO, encontram-se na mesma concentração do padrão ácido gálico (mg/ml). Adicionou-se 10 µL do extrato na microplaca e em seguida 50 µL de Folin, incubando por 8 minutos em temperatura ambiente. Adicionou-se 240 µL de Carbonato de Sódio (0,4%) e aguardou-se 3 minutos em temperatura ambiente. Fez a determinação da absorbância da leitura no comprimento de onda de 620 nm (A₂). O branco (A₁) foi preparado com 50 µL de água destilada, 10 µL do extrato e 240 µL de carbonato de sódio (0,4%). O ensaio é realizado em triplicata. Logo após, é calculada a determinação do teor pela seguinte fórmula: $FT = (\text{Abs amostra } A_2 - A_1) / (\text{Abs padrão}) * 100$. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão (±) apresentados em tabela.

4.4 Determinação de flavonóides totais

A determinação de flavonóides totais foi realizada, segundo metodologia utilizada por CHANG et al. (2002), com modificações. Primeiramente, os extratos foram diluídos em etanol na concentração de 1mg/mL. Em seguida, adicionou-se 30µL de cada extrato e/ou quercetina (diluída em etanol 80% na concentração de 0,1mg/mL) e 90µL de etanol 95% em cada cavidade da microplaca. Logo após, foi adicionado 6µL de cloreto de alumínio a 10% e 6µL de acetato de potássio 1M, ambos diluídos em água destilada. Para finalizar, adicionou-se mais 168µL de água destilada. E para o branco, foram utilizados 30µL de extrato e/ou padrão quercetina e 270µL de

etanol (A1). Incubou-se a placa por 30min em temperatura ambiente e, em seguida, foi feita a determinação da absorbância da leitura no comprimento de onda de 405nm (A2). O ensaio é realizado em triplicata. Logo após, é calculada a determinação do teor de flavonóides pela seguinte fórmula: Fl. Totais= (Abs amostra A2-A1) / (Abs padrão A2-A1) *10. O padrão utilizado, quercetina, apresenta-se nas mesmas concentrações dos extratos (mg/ml). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão e apresentados em tabela.

4.5 Teste de inibição da alfa-amilase

O teste de inibição da amilase foi realizado de acordo com SUBRAMANIAN et al., (2008), com modificações. A inibição da α -amilase se baseia no princípio da degradação de um substrato de amido e a posterior reação com o reativo de trabalho (Iodo) com a utilização do kit Amilase (LabTest, Lagoa Santa, MG, Brasil), que revela a inibição da atividade da amilase pelo extrato. Adicionou-se 30 μ L do extrato e/ ou DMSO (controle) e 30 μ L da enzima amilase salivar humana (ASH) a 0,5% mg/ml diluída em tampão PBS 20nm ph 6,9. A placa é incubada por 5 minutos/ 37° C. Decorrido este tempo, adicionou-se 25 μ L do substrato de Amido 0,25% e 25 μ L de Tampão. Realiza-se a primeira leitura (A1) na absorbância de 620 nm. Em seguida, incuba-se por 7 minutos e 30 segundos/37° C, em seguida adiciona-se 190 μ L de Iodo. Fez-se a determinação da absorbância da leitura no comprimento de onda de 540 nm (A2). A preparação do padrão (acarbose) e controle (DMSO) se dá na substituição do extrato (30 μ L), permanecendo as demais sequencia. O ensaio é realizado em triplicata. A inibição da amilase é calculada através da fórmula: Inibição (%) = 100 - (A2 amostra - A1 amostra / A2 controle - A1 controle) * 100. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão e apresentados em tabela.

4.6 Teste de inibição da α -glucosidase

O ensaio de inibição de α -glucosidase foi determinado de acordo com ANDRADE-CETTO et al., (2008), com modificações. Utilizou-se 2 fontes: α -glucosidase de extrato acetônico de intestino de rato (Sigma Aldrich Chemical, Co, USA) e α -Glucosidase de *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma Aldrich Chemical, Co, USA), ambas diluídas em tampão fosfato 10 mM PH 6,9 em 4mg/ml e 0,1 mg/ml de peso, respectivamente. Em placa, adicionou-se 30 μ L do extrato e 170 μ L da solução de enzima, incubada por 5 minutos/37° C. Realiza-se a primeira leitura (A1) na absorbância em 405nm. Adiciona-se 100 μ L do reagente de cor 4-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo

(Sigma Aldrich Chemical, Co, USA) diluído em tampão (mg/ml), incuba-se a placa nas mesmas condições e realizam-se leituras de 5 em 5 minutos, com leitura final após 30 minutos (A2). A preparação do padrão (acarbose) e controle (DMSO) se dá na substituição do extrato (30 µL), permanecendo as demais sequencia. O ensaio é realizado em triplicata. Ao fim do teste é realizado o cálculo da inibição aplicando-se a fórmula: $\text{Inibição (\%)} = 100 - \frac{(A2 \text{ amostra} - A1 \text{ amostra})}{(A2 \text{ controle} - A1 \text{ controle})} * 100$. A partir dos resultados de inibição calculou-se a concentração capaz de inibir 50% da atividade enzimática (CI₅₀) utilizando o teste de regressão sigmoidal, através do o programa Origin® 6.0, em concentrações entre 0,390625 e 100 µg/ml. Para efeito de comparação, a acarbose foi testada e determinada a CI₅₀. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão e apresentados em tabela.

4.7. Teste de inibição de Lipase

Para a determinação da atividade inibitória sobre a lipase utilizou-se o procedimento de LEE et al.,(1993) com modificações.Preparou-se uma solução de lipase de pâncreas de porco (Sigma Aldrich Chemical, Co, USA) diluída em tampão Tris-HCl 75mM amarelado (pH=8.5).Em uma placa, adicionou-se 30 µL do extrato e 80 µL da solução da enzima (mg/ml).Incuba-se por 5 minutos/37°C/120 rpm.Adiciona-se 170 µL de tampão e lê-se a placa em absorbância em 405nm (A1).Em seguida, adiciona-se 20 µL de reativo p-nitrofenilpalmitato (PNP - Sigma Aldrich Chemical, Co, USA), preparada em 3mg/ml em acetonitrila e diluída 1:4 em etanol. Incuba-se por 25 minutos/37°C.Fez-se a determinação da absorbância da leitura no comprimento de onda de 405 nm (A2). A preparação do padrão (orlistat) e controle (DMSO) se dá na substituição do extrato (30 µL), permanecendo as demais sequencia A inibição dos é calculada pela seguinte fórmula: $\text{Inibição (\%)} = 100 - \frac{(A2 \text{ amostra} - A1 \text{ amostra})}{(A2 \text{ controle} - A1 \text{ controle})} * 100$. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão e apresentados em tabela.

5.RESULTADOS

5.1 Atividade antioxidante

Diante da alta atividade dos extratos em apresentar capacidade antioxidante, determinou-se a concentração dos extratos ativos capaz de inibir 50% (CI₅₀), quanto menor o valor de CI₅₀ significa maior poder anti-radicais.Os valores de CI₅₀ encontrados variam entre 27-71 µg/ml (média de 37 µg/ml). O extrato *Caesalpinia férrea* (casca) apresentou o melhor valor CI₅₀ com 27 µg/ml,

entre concentrações 0,781 e 100 µg/ml. Cerca de 19 extratos não apresentaram concentrações suficientes para a realização da CI₅₀ (Tabela 2).

O teor de flavonóides totais teste apresentou baixos resultados significativos nos 65 extratos de plantas medicinais analisados como mostrados na Tabela 2. O extrato 157-f apresentou o maior teor (7,7 mg/ml), seguido por 162-f (5,7 mg/ml), *Derris floribunda* (5,4 mg/ml), *Arrabidea chica* (he) (5mg/ml) e 234-f (4,9 mg/ml).

O teste de fenóis totais apresentou baixos resultados significativo nos 65 extratos de plantas medicinais analisados como mostrados na Tabela 2. Os valores variaram entre 0,1 - 41 mg/ml equivalentes de ácido gálico (EAG), controle positivo utilizado neste teste. Entre os mais baixos teores de compostos fenólicos (<10 mg GAE/mg) é representado pelas a espécie *Eugenia puniceifolia* (0,1%), seguida de *Cissus sicyoides* (0,8%) e 125-a (1,6%). Apenas quatro extratos apresentaram teores entre 35 - 41 (mg GAE/mg): *Caesalpinia ferrea-v* (41%) , 234-cc (40%) , *Byrsonima japurensis* (35%) e 234-f (35%) .

Extratos de planta com potencial antioxidante elevado pode ser considerado como uma fonte rica dietética de potentes antioxidantes. Para avaliar a contribuição de cada componente, é necessário o conhecimento de sua estrutura molecular. Infelizmente, em pesquisa de novos compostos ativos em matrizes complexas, isto nem sempre é possível. Além disso, o conceito moderno para isolar compostos puros não podem atingir os resultados desejados, como observado na versão natural (TIWARI, 2001).

Tabela 2: Extratos vegetais avaliados quanto à atividade antioxidante:

n°	Código	DPPH CI ₅₀ * (µg/ml)	Flavonóides Totais (%)** (mg quercetina/ml)	Compostos Fenólicos (%)** (mg GAE.ml)
1	031	39±1,6	1,1±0,07	16±1,0
2	162-f	-	3,8±0,65	4,7±0,06
3	145-f	38±2,4	1,3±0,20	13±0,87
4	091-f	32±1,5	1,4±0,11	22±0,72
5	162-c	40±0,7	0,2±0,07	11±0,82
6	1475-s	-	0,28±0,05	7,1±0,26
7	230-g	37±2,1	1,5±0,14	19±0,59
8	230-cc	30±1,3	1,3±0,15	21±2,7
9	157-r	40±0,6	-0,09±0,05	10±0,44
10	145-s	37±1,5	1,7±0,33	16±0,88
11	146-g	43±0,7	2,7±0,36	19±7,7
12	307-g	31±0,2	5,0±1,7	14±0,32
13	146-g	65±1,8	0,32±0,05	6,7±0,02
14	234-cc	28±0,9	0,41±0,03	40±1,4
15	152-f	44±2,9	2,5±0,29	12±1,0
16	230-f	37±1,8	4,0±0,05	15±0,55

17	0,91-cc	38±3,6	0,17±0,04	11±0,31
18	152-f	30±1,0	4,0±0,08	19±0,85
19	145-g	32±0,4	-0,52±0,03	26±1,5
20	234-g	32±0,14	0,63±0,11	18±0,91
21	102-f	28±1,4	1,8±0,35	30±1,5
22	73-cc	33±5,7	-1,3±0,15	23±0,64
23	234-f	71±1,6	4,9±0,55	14±0,51
24	24 -g	28±1,0	0,13±0,08	35±2,8
25	162-f	28±0,68	5,7±0,18	25±0,8
26	162-g	41±2,0	0,51±0,17	8,9±0,53
27	157-f	28±0,57	7,7±0,56	18±0,45
28	146-f	34±0,26	3,1±0,17	19±1,8
29	125-a	-	0,15±0,13	1,6±0,32
30	162-g	41±1,1	0,72±0,07	11±0,34
31	162-c	36±3,4	0,77±0,20	13±0,73
32	PBP-001	34±1,9	1,3±0,62	15±0,64
33	PBP-002	28±0,4	0,63±0,2	21±0,97
34	PBP-003	-	-0,2±0,2	7,8±0,27
35	PBP-004	35±0,24	2,2±0,49	14±0,35
36	PBP-005	35±0,88	3,8±0,31	17±0,84
37	PBP-006	32±0,35	2,2±0,33	20±0,32
38	PBP-007	-	3,4±0,52	6,4±0,09
39	PBP-008	33±0,9	2,9±0,23	13±0,45
40	PBP-009	-	2,2±0,30	6,6±0,11
41	PBP-010	47±2,4	-3,1±0,03	10±0,26
42	<i>Calycophyllum spruceanum</i> (a)	-	0,05±0,10	7,4±0,23
43	<i>Calycophyllum spruceanum</i> (he)	34±2,5	0,52±0,17	13±0,38
44	<i>Byrsonima japurensis</i> (a)	39±1,9	-0,07±0,02	29±1,4
45	<i>Byrsonima japurensis</i> (he)	37±0,92	-2,6±0,2	35±1,7
46	<i>Caesalpinia férrea-v</i>	28±7,8	3,0±0,17	34±0,94
47	<i>Caesalpinia férrea-c</i>	27±0,27	3,9±0,19	41±1,0
48	<i>Arrabidaea chica</i> (he)	-	5,0±0,61	5,3±0,28
49	<i>Maytenus guyanensis</i> (e)	39±0,67	-0,31±0,38	15±0,38
50	<i>Ptychopetalum olacoides</i> (e)	-	1,1±0,74	5,3±0,1
51	<i>Arrabidaea chica</i> (e)	-	0,65±0,14	3,8±0,3
52	<i>Vismia guianensis</i>	31±0,51	11±0,24	17±0,9
53	<i>Passiflora nítida</i>	47±0,99	4,1±0,11	12±0,67
54	<i>Smilax brasiliensis</i>	44±0,50	0,25±0,15	15±0,55
55	<i>Derris floribunda</i> (m)	-	5,4±0,17	3,5±0,37
56	<i>Derris floribunda</i> (d)	-	0,27±0,09	6,6±0,27
57	<i>Derris floribunda</i> (a)	-	0,39±0,02	2,6±0,24
58	<i>Byrsonima japurensis</i> (e)	49±3,0	-0,08±0,001	20±1,0
59	<i>Eugenia punicifolia</i>	-	-0,13±0,005	0,1±0,03
60	<i>Cissus sicyoides</i>	-	-0,13±0,017	0,8±0,23
61	249-g	58±1,2	-0,06±0,01	12±0,27
62	249-f	-	-0,03±0,01	1,8±0,57
63	249-g	-	0,87±0,06	2,6±0,04
64	249-f	-	-0,61±0,007	2,5±0,26
65	249-f	-	0,005±0,002	2,8±0,11

Partes da planta: a, partes aéreas; c, caule; cc, casca; f, folha; g, galho; r, raiz; s, semente. Solventes: (a), água; (d), diclorometano; (e), etanol; (he), hidroetanólico; (m), metanol.

*Concentração efetiva 50% calculada através de regressão linear do gráfico obtido com os valores encontrados de % de atividade antioxidante para cada concentração. Controle positivo: extrato padronizado de Quercetina Anidra nas mesmas concentrações que os extratos. ** % de fenóis e flavonoides totais dos extratos após a média de três análises. Controle positivo: quercetina anidra e ácido gálico nas mesmas concentrações que os extratos para flavonóides totais e compostos fenólicos, respectivamente.

5.2 Ensaios de inibição sobre lipase pancreática

Avaliando os resultados, todos os extratos testados apresentaram resultados inferiores a 50% de inibição, sendo assim, considerados como pobre inibidores de lipase pancreática.

Considerando os valores positivos, os valores variaram de 0,48 - 46% (média 15% de inibição). Cinco extratos apresentaram atividade moderada entre 30 – 46% de inibição de lipase: 249-f (46%), *Byrsonima japurensis*(e) (38%), *Cissus sicyoides* (33%), 249-g (33%) e *Arrabidaea chica* (e) (30%).

O controle positivo, orlistat, foi utilizado para garantir a fiabilidade dos resultados. Portanto, mais estudos devem ser efetuados com técnicas distintas das quais foram testadas neste presente estudo.

5.3 Ensaio de inibição sobre α -amilase

Extratos de plantas testados sobre atividade inibitória da enzima α -amilase salivar humana (ASH), demonstraram resultados não significativos de inibição entre 10 - 43% de inibição em 100 μ g/ml. O controle positivo, acarbose, resultou em 70% inibição em mesma concentração. O extrato das folhas de 64 ,induziu a maior inibição entre os extratos testados, apresentou 43% de inibição, seguida das espécies 249-g e *Derris floribunda* (d) com 40% de inibição (Tabela 3).

5.4 Ensaio de inibição sobre α -glucosidase

A atividade inibitória dos extratos vegetais foi avaliada em testes preliminares sobre duas fontes distintas sobre a α -glucosidase: extrato acetônico do intestino do rato (animal) e levedura (*S. cerevisiae*) em concentração final de 100 μ g/ml (Tabela 3).

Os valores de inibição entre todos os extratos analisados sobre a fonte animal (rato) apresentou média de 11% de inibição. A capacidade inibitória enzimática significativa, ou seja, maior que 70% de inibição sobre a fonte animal (rato), foi observada em apenas 1 extrato de espécie *Eugenia punicifolia* com 76% de inibição sobre a α -glucosidase, seguida da espécie *Ptychopetalum olacoides* que representou 56% de inibição sobre a enzima. Os demais extratos apresentaram valores inferiores a 50% de inibição.

É interessante ressaltar a especificidade do único extrato ativo, o extrato *Eugenia punicifolia*, que inibiu a atividade da α -glucosidase em fonte animal (rato). Essa especificidade não ocorreu em nível de α -glucosidase de *S. cerevisiae*, que foi inibida em apenas 46% por esse extrato. Já em relação ao extrato *Ptychopetalum olacoides* mostrou elevada atividade inibidora tanto

em fonte animal 56% (rato) quanto em levedura 69% (*S.cerevisiae*).

Tabela 3: Extratos vegetais avaliados quanto a atividade inibitória de enzimas digestivas:

n°	Código	Lipase* Inibição(%)	α -amilase** Inibição(%)	α -glucosidase** (Rato) Inibição(%)	α -Glucosidase** (<i>S. cerevisiae</i>) Inibição(%)
1	031	11±1,3	19±1,3	5,3±0,16	69±1,4
2	162-f	6,3±0,95	25±1,9	6,5±0,6	28±2,6
3	145-f	13±1,3	22±0,03	11±0,6	25±3,5
4	091-f	-10±0,01	14±0,6	5,9±0,7	16±0,75
5	162-c	6,5±0,49	12±1,1	5,8±0,6	7,5±1,6
6	1475-s	13±0,71	18±0,8	6,5±0,3	56±2,3
7	230-g	13±0,12	16±0,4	2,6±0,2	62±4,3
8	230-cc	-10,2±1,1	17±0,8	2,2±0,3	59±1,04
9	157-r	12±0,14	13±0,7	5,7±0,5	88±1,8
10	145-s	-8,8±0,30	25±1,4	9,6±0,4	67±3,4
11	146-g	-8,1±0,20	27±1,2	3,4±0,4	61±0,78
12	307-g	-11±1,0	24±0,7	1,0±0,1	37±0,49
13	146-g	-13±1,0	22±0,9	18±0,7	56±1,0
14	234-cc	-6,4±0,75	28±1,2	22±0,3	66±2,5
15	152-f	7,1±0,79	10±1,1	1,5±0,09	40±1,0
16	230-FPX	2,7±0,90	19±0,1	2,6±0,2	38±2,4
17	0,91-cc	-5,4±1,6	22±0,6	3,8±0,01	63±1,2
18	152-f	2,1±1,0	10±0,7	10±0,8	59±1,3
19	145-g	0,48±0,19	27±1,4	4,3±0,03	-20±0,60
20	234-g	15±0,89	20±0,5	3,1±0,3	30±0,47
21	102-f	-20±0,48	16±0,5	1,7±0,03	91±0,6
22	73-cc	-12±1,4	26±0,7	28±2,3	93±2,3
23	234-f	-24±2,7	11±0,5	8,8±0,6	2,0±1,1
24	24 -g	-25±1,3	41±2,0	6,9±0,4	15±0,99
25	162-f	27±3,3	26±0,7	3,5±0,2	31±1,6
26	162-g	10±0,03	15±1,3	3,6±0,1	-56±0,49
27	157-f	-23±0,11	12±0,6	3,5±0,3	92±2,7
28	146-f	-5,3±0,54	21±1,1	3,9±0,2	6,6±2,7
29	125-a	-11±2,7	18±0,5	21±1,2	-181±2,8
30	162-g	10±0,86	20±0,9	17±1,2	37±2,5
31	162-c	5,6±0,4	22±1,2	17±0,7	18±0,54
32	PBP-001	-1,0±0,3	23±1,0	21±2,1	32±0,15
33	PBP-002	-5,7±0,7	19±0,2	21±1,9	15±0,71
34	PBP-003	-17±1,0	22±1,7	25±0,9	-103±1,4
35	PBP-004	3,8±1,1	25±1,4	20±1,0	47±2,8
36	PBP-005	-32±3,3	26±2,2	15±0,4	18±0,06
37	PBP-006	-16±1,6	26±1,8	11±0,1	-57±2,4
38	PBP-007	7,2±0,5	28±0,6	11±0,09	-100±5,1
39	PBP-008	10±0,3	25±0,6	11±1,5	-40±0,11
40	PBP-009	8,4±0,45	22±1,1	9,1±0,2	8,5±1,3
41	PBP-010	15±1,2	25±0,5	13±1,0	59±0,3
42	<i>Calycophyllum spruceanum</i> (a)	16±1,0	21±0,5	3,8±0,01	56±2,0
43	<i>Calycophyllum spruceanum</i> (he)	21±2,6	20±1,0	2,3±0,1	76±3,4
44	<i>Byrsonima japurensis</i> (a)	20±0,1	26±0,7	3,0±0,01	16±0,92
45	<i>Byrsonima japurensis</i> (he)	29±2,7	23±1,3	5,6±0,5	95±1,1
46	<i>Caesalpinia férrea-v</i>	7,3±0,08	19±0,6	5,8±0,7	17±1,4
47	<i>Caesalpinia férrea-c</i>	2,1±0,90	17±0,77	11±1,2	13±1,1
48	<i>Arrabidaea chica</i> (he)	-5,4±0,59	22±0,3	47±0,58	38±1,0
49	<i>Maytenus guyanensis</i> (e)	-17±1,9	18±0,1	48±1,4	19±0,12

50	<i>Ptychopetalum olacoides</i> (e)	10±0,56	31±1,7	56±1,6	69±0,9
51	<i>Arrabidaea chica</i> (e)	30±1,0	24±1,2	3,0±0,5	61±1,5
52	<i>Vismia guianensis</i>	3,5±3,1	25±1,4	7,0±0,8	35±2,5
53	<i>Passiflora nítida</i>	28±1,7	17±1,2	1,5±0,06	70±6,0
54	<i>Smilax brasiliensis</i>	24±0,18	26±1,0	5,6±0,06	10±1,2
55	<i>Derris floribunda</i> (m)	-22±1,7	18±1,5	5,6±0,4	-40±2,5
56	<i>Derris floribunda</i> (d)	17±1,0	40±1,3	7,2±0,4	-40±2,6
57	<i>Derris floribunda</i> (a)	21±0,54	18±1,3	6,4±0,7	-31±1,3
58	<i>Byrsonima japurensis</i> (e)	38±1,7	19±1,8	3,5±0,7	44±0,85
59	<i>Eugenia punicifolia</i>	22±2,3	16±0,2	76±0,04	46±2,6
60	<i>Cissus sicyoides</i>	33±2,2	10±0,7	5,9±0,1	-25±2,5
61	249-g	5,1±0,97	17±0,9	5,8±0,7	49±1,6
62	249-f	17±0,85	16±1,6	4,8±1,1	42±3,6
63	249-g	33±0,3	40±1,7	7,4±0,4	63±2,5
64	249-f	46±2,2	43±1,1	-9,1±0,1	45±1,4
65	249-f	-37±1,7	16±0,6	-4,5±0,8	0,58±0,12

Partes da planta: a, partes aéreas; c, caule; cc, casca; f, folha; g, galho; r, raiz; s, semente. Solventes: (a), água; (d), diclorometano; (e), etanol; (he), hidroetanólico; (m), metanol.

*Padrão orlistat na concentração de 100µg/mL: 62% de inibição.

** Padrão acarbose na concentração de 100µg/mL: 70% de inibição.

Objetivando-se o estudo do perfil inibitório desses extratos vegetais, foi determinada a concentração dos extratos ativos capaz de inibir 50% (CI₅₀) da capacidade enzimática nas duas fontes distintas estudadas (Tabela 4,5).

A Tabela 4 mostra os valores de CI₅₀ dos 2 extratos mais ativos quanto a sua atividade inibitória sobre a enzima α -glucosidase de fonte animal (rato). Os valores de CI₅₀ destes dois compostos revelaram que a espécie *Eugenia punicifolia* (2,4µg/ml) é um inibidor da α -glucosidase mais significativo em comparação com *Ptychopetalum olacoides* (67 µg/ml), sendo, portanto a espécie mais ativa entre as testadas.

Tabela 4: Concentração dos extratos ativos capaz de inibir 50% (CI₅₀) a α -glucosidase de fonte animal(rato):

n°	Código	α -Glucosidase (rato) % Inibição	α -Glucosidase (rato) CI ₅₀
50	<i>Ptychopetalum olacoides</i>	56±1,6	67±1,8
59	<i>Eugenia punicifolia</i>	76±0,04	2,4±0,05

Os resultados estão representados pela concentração responsável pela inibição de 50% da atividade enzimática. Os testes foram realizados em triplicata.

Como pode ser observado na Fig. 1, o ensaio *in vitro* de α -glucosidase a partir de fonte animal (rato), *Eugenia punicifolia* (14 µg/ml) exerce a atividade mais potente de inibição e *Ptychopetalum olacoides* (67 µg /ml), sendo menos eficaz. O extrato *Eugenia punicifolia* exibiu uma maior actividade inibidora do que a acarbose (31µg/ml).

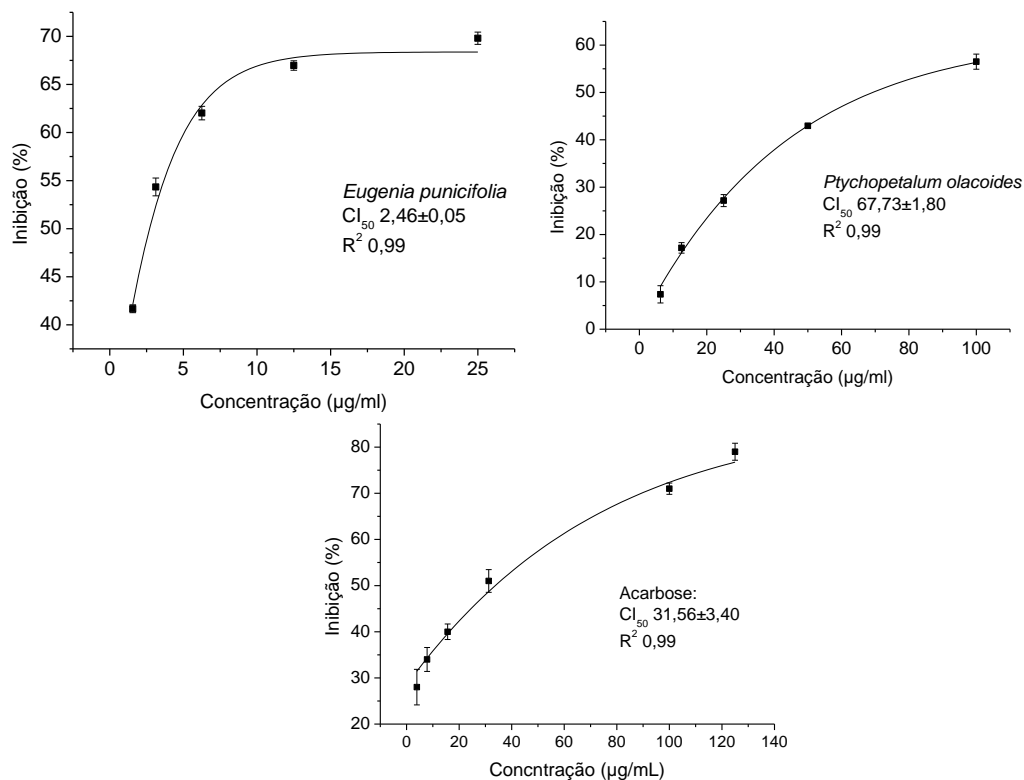


Fig.1. Comparação do CI₅₀ concentração inibitória dos extratos de plantas e acarbose sobre a atividade de animal (rato) α -glucosidase.

Os valores de inibição entre todos os extratos analisados sobre a fonte de levedura (*S.cerevisiae*) apresentou média de 27% de inibição sobre a enzima α -glucosidase. A capacidade inibitória enzimática significativa, ou seja, maior que 80% de inibição, foi observada em apenas 6 extratos, correspondendo a 9,2% do total de extratos avaliados: *Byrsonima japurensis* (he) (95%), 73-cc (93%), 157-f (92%), 102-f (91%), 157-r (88%), *Calycophyllum spruceanum* (he) (76%). Apenas o extrato *Ptychopetalum olacoides* obteve atividade inibitória semelhante sobre a fonte animal (rato) na mesma concentração, correspondendo a 56% de atividade inibitória. Entre os extratos ativos sobre de *S. cerevisiae*, observamos ainda que 17 deles inibem entre 50 e 80% (Tabela 5).

Os extratos foram testados quanto à sua atividade inibitória sobre a enzima α -glucosidase por avaliação dos seus valores de CI₅₀. A Tabela 5 mostra os valores de CI₅₀ dos 22 extratos mais ativos. O extrato metanólico 157-r inibiu expressivamente a atividade da enzima, com valores de CI₅₀ de 0,4 µg/mL, seguido dos extratos 73-cc (1,2 µg/ml), 102-f (1,5 µg/ml) e 157-f (2,4 µg/ml).

Diante desses valores, pode-se concluir que os extratos descritos acima continham mais atividade inibitória do que a acarbose, controle positivo utilizado neste estudo, que é capaz de inibir a atividade de α -glucosidase com um valor de CI_{50} estimado em 31 μ g/ml. Este achado é consistente com a literatura, onde acarbose foi encontrado para exercer pouca inibição em α -glucosidase atividade. Os resultados de *Eugenia punicifolia* serve de apoio para análise em estudos que possam representar a diminuição da hiperglicemia pós-prandial, retardar a absorção de glicose através da inibição da atividade da enzima α -glucosidase.

Tabela 5: Concentração dos extratos ativos capaz de inibir 50% (CI_{50}) a α -glucosidase de levedura (*S.cerevisiae*).

n°	Código	α -Glucosidase (Levedura) Inibição (%)	α -Glucosidase (Levedura) CI_{50}
1	031	69±1,4	60±1,4
6	1475-s	56±2,3	1±0,11
7	230-g	62±4,3	49±4,9
8	230-cc	59±1,04	5,9±1,1
9	157-r	88±1,8	0,4±0,11
10	145-s	67±3,4	60±5,1
11	146-g	61±0,78	79±2,8
13	146-g	56±1,0	45±2,9
14	234-cc	66±2,5	46±4,0
17	0,91-cc	63±1,2	16±0,57
18	152-f	59±1,3	66±5,5
21	102-f	91±0,6	1,5±0,5
22	73-cc	93±2,3	1,2±0,18
27	157-f	92±2,7	2,4±0,1
41	PBP-010	59±0,3	59±1,8
42	<i>Calycophyllum spruceanum</i> (a)	56±2,0	28±2,6
43	<i>Calycophyllum spruceanum</i> (he)	76±3,4	45±0,75
45	<i>Byrsonima japurensis</i> (he)	95±1,1	3,5±0,42
50	<i>Ptychopetalum olacoides</i> (e)	69±0,9	5,7±1,1
51	<i>Arrabidea chica</i> (e)	61±1,5	39±3,0
53	<i>Passiflora nítida</i>	70±6,0	2,23±0,20
63	249-g	63±2,5	3,5±0,47

Partes da planta: a, partes aéreas; c, caule; cc, casca; f, folha; g, galho; r, raiz; s, semente. Solventes: (a), água; (d), diclorometano; (e), etanol; (he), hidroetanólico; (m), metanol.

*Os resultados estão representados pela concentração responsável pela inibição de 50% da atividade enzimática. Os testes foram realizados em triplicata.

Na Fig. 2, o ensaio *in vitro* de α -glucosidase a partir de fonte de levedura (*S.cerevisiae*), 157-r (0,46 μ g/ml) exerce a atividade mais potente de inibição, seguida da espécie 73-cc (1,2 μ g/ml) e 102-f (1,5 μ g/ml). Todos os extratos descritos exibiram uma maior atividade inibidora do que a acarbose (31 μ g/ml).

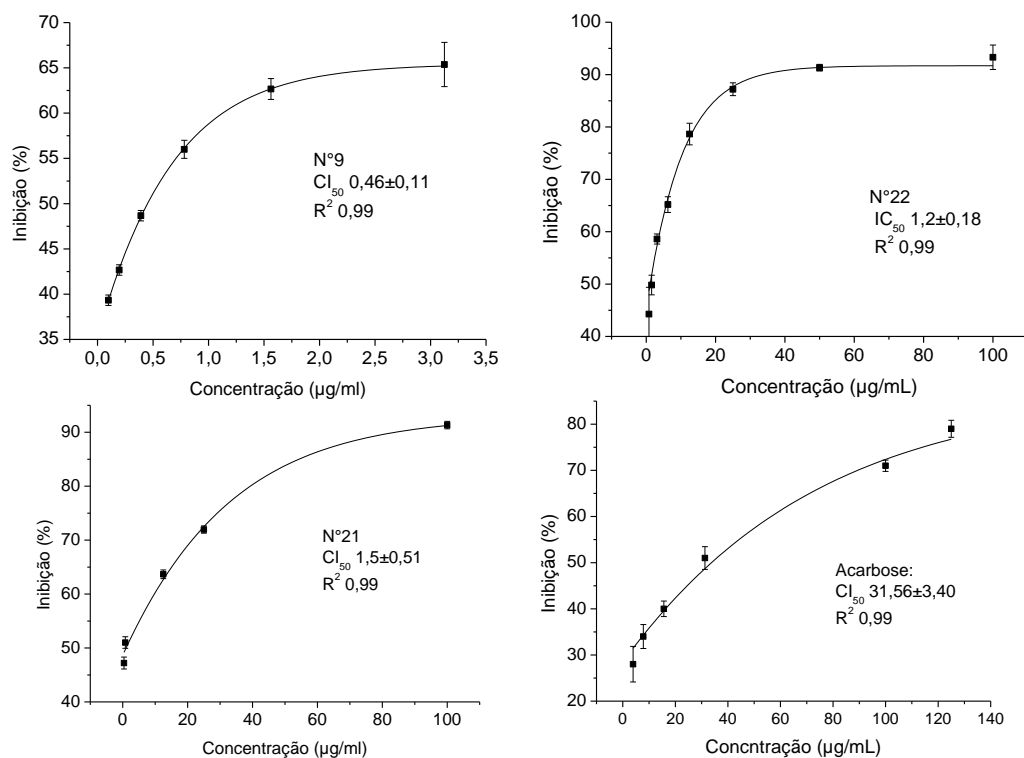


Fig.1. Comparação do CI_{50} concentração inibitória dos extratos de plantas e acarbose sobre a atividade de leveduras α -glucosidase.

Diante desses valores, pode-se determinar que os extratos descritos acima continham mais atividade inibitória do que a acarbose, controle positivo utilizado neste estudo, que é capaz de inibir a atividade de α -glucosidase com um valor de CI_{50} estimado em 31 mg/ml. Este achado é consistente com a literatura, onde acarbose foi encontrado por exercer pouca inibição em α -glucosidase atividade. Os resultados de *Eugenia punicifolia* serve de apoio para análise em estudos que possam representar a diminuição da hiperglicemia pós-prandial, retardar a absorção de glicose através da inibição da atividade da enzima α -glucosidase.

CONCLUSÃO

A atividade antioxidante apresentou excelentes resultados em relação à maioria dos extratos, sendo o motivo de sua triagem. No entanto, a concentração de inibitória CI_{50} foi melhor representada pelo o extrato *Caesalpinia ferrea* (c) (27 $\mu\text{g/ml}$). O Teor de flavonóides totais não apresentou valores tão significativos comparados a atividade antioxidante, o maior valor encontrado foi na espécie 157-f com 7 %. O teor de fenóis totais do extrato da casca de *Caesalpinia ferrea* apresentou o melhor resultado com 41%.

Este estudo, entre os extratos testados, não mostrou efeitos inibitórios contra lipase pancreática, pois apresentaram inibição inferiores a 46% na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. Na investigação sobre α -amilases também não houve resultados significativos em estudo do perfil inibitório, resultando em valores de inibição inferiores a 43% na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$.

Na investigação inibitória de α -glucosidase de fonte animal (rato) resultou na seleção de 2 extratos ativos na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ para estudo do perfil inibitório(%) e 22 extratos ativos na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ no perfil inibitório de α -glucosidase de fonte de levedura(*S.cerevisiae*). Em relação a concentração inibitória de 50% (CI_{50}), para as isoformas de α -glucosidase de animal (rato), o extrato *Eugenia punicifolia* apresentou tanto o melhor resultado de inibição (76%) quanto de CI_{50} (2,4 $\mu\text{g/ml}$). Em relação a α -glucosidase de *S.cerevisiae* o melhor extrato de inibição foi encontrado na espécie de *Byrsonima japurensis* (95%) e o melhor valor de CI_{50} estava contido na espécie 157-r (0,4 $\mu\text{g/mL}$)

Esses resultados apresentam uma visão de que algumas das espécies estudadas são promissoras fontes de antioxidantes naturais. Embora o efeito inibitório destes extratos terem sido estabelecido *in vitro*, estes resultados indicam que os extratos podem pó exemplo, potencialmente suprimir o aumento pós-prandial de glicose *in vivo*. Novos estudos devem realizar o seu devido isolamento e caracterização dos compostos ativos, utilizando técnicas distintas das quais realizadas neste presente estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEMÃO, Francisco Freire. *Considerações sobre as plantas medicinais da flora cearense*. Rio de Janeiro: Laemmert, 1862.220p.

ALGHAZEER, R.; GAO, H.; HOWELL, N.K.; Toxicol. Lett. 180, 202–211,2008

ANDRADE-CETTO, A; BECERRA-JIMÉNEZ, J; CÁRDENAS-VÁZQUEZ, R. *Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes*. Journal of Ethnopharmacology, 116, p. 27-32, 2008.

BALLINGER, A., & PEIKIN, S. I. R. (2002).*Orlistat:Its current status as an anti-obesity drug*. European Journal of Pharmaceutical Sciences,440,109–117.

BIRARI, R.B.; BHUTANI, K.K.*Pancreatic lipase inhibitors from natural sources:unexplored potential*. Drug Discov. Today 12, 879–889,2007.

BONOLI, M.; VERARDO, V.; MARCONI, E.; CABONI, M. F.; J. Agric. Food Chem. 2004, 52, 5195.

BRACCO, U. *Effect of triglyceride structure on fat absorption*. Am J Clin Nutr. 1994; 60(Suppl 6):1002S-9S.

BRAY, G. A., & POPKIN, B. M. (1998). *Dietary fat intake does affect obesity!*American Journal of Clinical Nutrition, 68, 1157–1173.

CAMPOLARGO, A.M.C. *Tratamento Farmacológico da Obesidade*. HDSInForma nº 25, 2008.

CHANG, CHIA-CHI; YANG, MING-HUA; WEN, HWEI-MEI; CHERN, JIING-CHUAN. *Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods*. Journal of Food and Drug Analysis, Vol. 10, No. 3, 2002, Pages 178-182.

COSTA, V.E.U.; AMORIM, H.L.N.; *O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: Aspectos gerais sobre a influência do solvente*. Química Nova,Porto Alegre ,p 863-871,1999.

CRYSTAL, R.G. *Oxidants and antioxidants*. Am. J. Med. 91, 3S–10S,1991

DJONOV, B.; BOZIC, N.; NENADOVIC, V.; IVANOVIC, J.; VUJCIC, Z. *Purification and properties of midgut α -amilase isolated from *Morimus funereus* (Coleoptera:Cerambycidae) larvae*.Comp.Biochem.Phys.B., v.149, p. 153-160, 2008.

DRUMOND, M.R.S.; CASTRO, R.D. ; ALMEIDA, R.V.D.; PEREIRA, M.S.V.; PADILHA, W.W.N. *Estudo comparativo in vitro da atividade antibacteriana de produtos fitoterápicos sobre bactérias cariogênicas*. Pesq Bras Odontoped ClinIntegr, v.4, n.1, p.33-38, 2004.

EL-KHATIB, A.S.A *Review: biologically active free radicals and their scavengers*. Saudi Pharm. J. 5 (2–3), 79,1997

FERREIRA,D.; STADE, D. Nat. Prod. Rep. 19, 517,2002

FREI, B.*Natural Antioxidant in Health and Disease*. Academic Press, San Diago/New York/Boston/London/Sydney/Tokyo/Toronto,1997

GANEM, B. *Inhibitors of Carbohydrate-Processing Enzymes: Design and Synthesis of Sugar-Shaped Heterocycles*. Acc Chem Res. 1996;29:340-7.

GENG, P.; BAIA, G. *Two novel aminooligosaccharides isolated from the culture of Streptomyces coelicoflavus ZG0656 as potent inhibitors of α -amylase*. Carbohydr. Res., v.343, p. 882-892, 2008.

GODOI, T.G.; TEIXEIRA, M.A.C.; TOKUMOTO, P.M. *Ação celular de estrogênio e de antilipêmicos*.Holos,Vol. 8, No. 2 ,2008.

HADVÁRY, P., SIDLER, W., MEISTER, W., VETTER, W., WOLFER, H. *The lipase inhibitor tetrahydrolipstatin binds covalently to the putative active site serine of pancreatic lipase*. J. Biol. Chem. 266, 2021–2027,1991.

HADVÁRY, P.; LENGSELD, H., WOLFER, H. *Inhibition of pancreatic lipase in vitro by the covalent inhibitor tetrahydrolipstatin*. Biochem. J. 256, 357–361,1998.

HALLIWELLI, B.*Antioxidant characterization methodology and mechanism*. Biochemical Pharmacology 49, 1341–1348,1995.

HAN, L.K., KIMURA, Y., OKUDA, H. *Anti-obesity effects of natural products*. Stud. Nat. Prod. Chem. 30, 79–110,2005.

I.,F.F., *Actualización en antidiabéticos orales. Información Terapeutica del sistema nacional de salud*, 2001: p. 33-45.

Instituto Químico Biológico. *Plantas Medicinale y Diabetes*. 2004; Available from: http://www.iqb.es/D_Mellitus/Medicinas/plantas00.htm.

KANDRA, L.; REMENYIK, J.; BATTÁ, G.; SOMSÁK, L.; GYÉMÁNT, G.; PARK, K.H. *Enzymatic synthesis of a new inhibitor of α -amilase: acarviosinyl-isomaltosyl-spiro-*

thiohydantoin. Carbohydr.Res., v. 340, p.1311-1317, 2005.

KARAMADOUKIS, L.; SHIVASHANKAR, G.H.; LUDEMAN, L.; WILLIAMS, A.J. *An unusual complication of treatment with orlistat*. Clin. Nephrol. 71, 430–432,2009.

LEE, Y.P.;G.H. CHUNG and J.S. Rhee. *Purification and characterization of Pseudomonas fluorescens SIK W1 lipase expressed in E. coli*. Biochem. Biophys. Acta 1169: 156–164,1993.

MACGREGOR, E.A.; JANECEK, S.; SVENSSON, B.*Relationship of sequence and structure to specificity in the α -amilase family of enzymes*.Biochim.Biophys. Acta,v.1546,n.1,p.1-20,2001.

MELO, E.B.; GOMES, A.S.; CARVALHO, I. *α - and β -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity*. Tetrahedron. 2006;62:10277–302.

MENIKOVA, I., WAGES, D., 2006. *Antiobesity therapies*. Nat. Rev. Drug Discov. 5,369–370.

MOLYNEUX, P. *The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity*. Songklanakarin J. Sci. Technol., v. 26, n. 2, p. 211-219. 2004.

MOOSMANN, B.; BEHL, C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 8867,1999

MORO, C.O., BASILE, G., 2000. *Obesity and medicinal plants*. Fitoterapia 71, S73–S82.

NIESINK, R.J.M.; DE VRIES, J.; HOLLINGER, M.A.*Toxicology*.CRC Press, Boca Raton/New York/London/Tokyo, p. 289,1996

OTA, M.; OKAMOTO, T.; HOSHINO, W.; WAKABAYAH, H. *Action of α -D-glucosidase from Aspergillus niger towards dextrin and starch*.Carbohydrate Polymers. 2009;78:287–91.

OUJERIOUAT, N.; MOREAU, Y.; SANTIMONE, M.; SVENSSON, B.; MARCHISMOUREN,G.;DESSEAUX, V. *On the mechanism of α -amylase:Arcabose and cyclodextrin inhibition of barey amylase isozymes*.Eur.J.Biochen., v. 270, p. 3871-3879, 2003.

PARR, A.J.; BOLWELLI, G.P. J. Sci. Food Agric. 80, 985,2000

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

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

RAYALAM, S., DELLA-FERA, M.A., BAILE, C.A., 2008. *Phytochemicals and regulation of the adipocyte life cycle*. J. Nutr. Biochem. 19, 717–726.

REITER, R.J.; ROBINSON, G.D. *Wher Do Free Radicals Come From?* Melatonin. Bantam Book, USA, p. 24,1995.

SANTANIELLO, E.; FERRABOSCHI, P.; GRISENTI, P.; MANZOCCHI, A. Chem. Rev. 1990, 92, 1071.

SANTOS-BUELGA, C.; SCALBERT, A. J. Sci. Food Agric. 80, 1094,2000

SCHVARTSMAN, S. *Plantas venenosas. In: Manual sobre intoxicações alimentares*. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Pediatria, 1990. p.15-24.

SHI, Y., BURN, P., 2004. *Lipid metabolic enzymes: emerging drug targets for the treatment of obesity*. Nat. Rev. Drug Discov. 3, 695–710.

SHINDE, J.; TALDONE, T.; BARLETTA, M.; KUNAPARAJU, N.; HU, B.; KUMAR, S. et al. *Alpha- glucosidase inhibitory activity of Syzygium cumini (Linn.) Skeels seed kernel in vitro and in Goto-Kakizaki (GK) rats*. Carbohydr Res. 2008 May 19;343(7):1278-81.

STUART, A.R., GULVE, E.A.,WANG, M., *Chemistry and biochemistry of type 2 diabetes*. Chemical Reviews 104, 1255–1282. 2004.

SUBRAMANIAM, R; ASMAWI, M.Z; SADIKUN, A. *In vitro α -glucosidase and α -amylase enzyme inhibitory effects of Andrographis paniculata extract and andrographolide*. Acta Biochimica Polonica, v.55, n.02, p. 391-398, 200

THEIL, F. Chem. Rev., 95, 2203, 1995;

THURAIRAJAH, P.H.; SYN, W.K.; NEIL, D.A.; STELL, D.; HAYDON, G. *Orlistat (xenical)-induced subacute liver failure*. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 17, 1437–1438,2005.

TIWARI, A. K. (2001). *Imbalance in antioxidant defense and human diseases: Multiple approach of natural antioxidant therapy*. Current Science, 8, 1179–1187.

TSUJITA, T.; TAKAICHI, H.; TAKAKU, T.; AOYAMA, S.; HIRAKI, J. *Antiobesity action of e-polylysine, a potent inhibitor of pancreatic lipase*. J. Lipid Res. 47, 1852–1858,2006.

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

VAN DER MAAREL, M.J.; VAN DER VEEN, B.; UITDEHAAG, J.C.; LEEMHUIS, H.; DIJKHUIZEN, L. *Properties and applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family*. J Biotechnol. 2002 Mar 28;94(2):137-55.

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

YANOVSKI, S. Z., & YANOVSKI, J. A. (2002). *Obesity*. New England Journal of Medicine, 346, 591–602.

YOON, S.H.; ROBYT, J.F. *Study of the inhibition of four alpha amylases by arcabose and its 4^{IV} – α -maltohexaosyl and 4^{IV}- α maltododecaosyl analogues*. Carbohydr.Res.,v.388, p.1969-1980, 2003

YOUNG-JUN S., et al. *Inhibitory effect of aqueous extracto from the gall of Rhus Chinensis on alpha-glucosidase activity and postprandial blood glucose*. Journal of Ethnopharmacology 85 (2003) 283-287

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