

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ALINE FERNANDA ANTUNES

ATIVIDADE INIBITÓRIA DE EXTRATOS VEGETAIS
DO CERRADO SOBRE ALFA-AMILASES

BRASÍLIA
2008

ALINE FERNANDA ANTUNES

ATIVIDADE INIBITÓRIA DE EXTRATOS VEGETAIS DO CERRADO SOBRE
 α -AMILASES

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Laila Salmen Espindola

BRASÍLIA
2008

TERMO DE APROVAÇÃO

ALINE FERNANDA ANTUNES

ATIVIDADE INIBITÓRIA DE EXTRATOS VEGETAIS DO CERRADO SOBRE
 α -AMILASES

Dissertação aprovada pela seguinte banca examinadora como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília:

Prof.^a Dr.^a Laila Salmen Espíndola – Universidade de Brasília
Presidente

Dr. Thales Lima Rocha – Cenargen / Embrapa
Examinador

Prof. Dr. José Realino de Paula – Universidade Federal de Goiás
Examinador

Prof.^a Dr.^a Maria Fátima Grossi de Sá – Cenargen / Embrapa
Examinador

Brasília, 4 de julho de 2008.

Este trabalho reflete a realização de um sonho triplo. Por isso, é dedicado às duas pessoas que sempre o compartilharam comigo: meus pais, Sebastiana e Osmar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço muito a Deus, pela oportunidade e eterna companhia.

Aos meus pais, Sebastiana e Osmar, irmãos Lusi, Neide, João e Denise e à tia Neusa, por todo amor, por quem sou, pela confiança e apoio.

A todos os amigos, pela paciência, carinho, incentivo e, principalmente, pela amizade.

Aos amigos e companheiros de pós graduação Arnúbio, Jorge, Ellen e Everton, pelo constante apoio e ajuda, tão essenciais na realização deste trabalho. E aos demais colegas que também me incentivaram e contribuíram com os trabalhos.

A todos os professores envolvidos, especialmente às professoras Laila e Fátima e aos Professores José Elias, Edilberto, Carlos Bloch, Thales e José Realino, pela acolhida, orientação, colaboração e confiança.

Ao Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga / Cenargen / Embrapa, que sempre disponibilizou todas as suas estruturas, recursos, pessoal e conhecimento para a realização deste estudo.

À CAPES, pela bolsa de pesquisa concedida e ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde.

RESUMO

As α -amilases, enzimas produzidas por animais, vegetais e microrganismos, participam de etapas extremamente importantes no metabolismo de carboidratos. A sobrevivência dos seres vivos que dependem do aproveitamento de carboidratos como fonte energética está associada à atividade das amilases. A atividade dessas enzimas também está envolvida com a progressão da cárie e da placa dentária, com a formação do pico de concentração posprandial de glicose e com a velocidade do esvaziamento gástrico. Por isso, pesquisas no sentido de se conseguir uma inibição efetiva de α -amilases têm ganhado expressão internacional, já que inibidores de α -amilases podem ser aplicados, dentre outras áreas: (i) no desenvolvimento da resistência de culturas agrícolas a pragas que utilizam amilases endógenas para se alimentar de grãos ou raízes alimentícias, provocando depreciação comercial desses produtos; (ii) no tratamento do diabetes mellitus e da obesidade; (iii) na prevenção de cáries dentárias e outros distúrbios odontológicos; (iv) na investigação do papel antinutricional de alimentos que contêm inibidores de amilases; (v) no processamento industrial de alimentos e bebidas que contêm carboidratos, bem como de papéis e tecidos; e (vi) no diagnóstico e tratamento de distúrbios que envolvem condições de hiperamilasemia. O Cerrado, segundo maior bioma brasileiro, suporta uma enorme variedade de espécies, até então pouco estudadas quanto a seus efeitos terapêuticos e no controle de insetos-praga. Então decidiu-se pela realização deste trabalho, que teve como objetivo verificar a atividade inibitória de extratos vegetais do Cerrado sobre alfa-amilases. Cento e noventa extratos de diferentes polaridades foram preparados a partir de 31 espécies oriundas de 13 famílias botânicas. Os extratos a 1 mg/mL foram pré-incubados com α -amilases extraídas de *Zabrotes subfasciatus* Boheman e de *Acanthoscelides obtectus* Say, insetos-praga de feijão, utilizando-se amido solúvel como substrato e ácido dinitrossalicílico reativo como reagente cromogênico. Os extratos também foram testados sobre α -amilase salivar humana, na concentração de 125 μ g/mL. Os resultados mostram atividade inibitória sobre amilases de extratos etanólicos pertencentes às famílias Monimiaceae, Meliaceae, Sapotaceae, Burseraceae e Sapindaceae, com destaque especial à espécie *Matayba guianensis* Aublet. O extrato etanólico da casca da raiz de *M. guianensis* exibiu CI_{50} de 88,30 μ g/mL, 140,09 μ g/mL e 42,04 μ g/mL sobre as amilases de *Z. subfasciatus*, *A. obtectus* e salivar humana, respectivamente. A quantificação de compostos fenólicos e de taninos totais na fração metanólica oriunda do fracionamento do extrato etanólico da casca da raiz de *M. guianensis*, contendo os compostos maiores que 30 kDa, aponta para a atribuição da atividade inibitória a taninos condensados. E os resultados obtidos mostram a importância de se explorar o Cerrado brasileiro na busca por moléculas ativas biologicamente.

Palavras-chave: Cerrado. Amilase. *Zabrotes subfasciatus*. *Acanthoscelides obtectus*. Amilase salivar humana. Taninos.

ABSTRACT

Alpha-amylases, enzymes produced by animals, plants and microorganisms, participate in several important carbohydrate metabolism steps. The survival of the living beings that depend on carbohydrate use as an energy supply source is associated with amylases activity. The activity of these enzymes is also involved with the progression of dental caries and plaques, with the formation of the postprandial peak of glucose concentration and with the speed of gastric emptying. Consequently, researches aiming to obtain an effective α -amylase inhibition have become of extremely important worldwide, once α -amylases inhibitors can be used, among other fields: (i) on the resistance development of agricultural cultures against pests that use endogenous amylases to feed on eatable grains or roots, causing a commercial depreciation on these products; (ii) on diabetes mellitus and obesity treatments; (iii) on the prevention of dental caries and other odontological diseases; (iv) on the investigation of the antinutritional role of foods that contain amylases inhibitors; (v) on the industrial processing of foods and drinks that contain carbohydrates, as well as paper and textiles; and (vi) on diagnostic and treatment of diseases that involve hiperamylasemy. Cerrado, the second biggest Brazilian's bioma, supports a variety of species, few studied regarding your therapeutic effects and against agricultural pests. Thus, was decided about the realization of this research work, which has the objective of verify the inhibitory activity of the Cerrado plants extracts against alpha-amylases. One hundred and ninety extracts of different polarities were made from 31 species from 13 botanical families. The extracts containing 1 mg/mL were pre-incubated with α -amylases extracted from *Zabrotes subfasciatus* Boheman and *Acanthoscelides obtectus* Say, common bean pest insects, using soluble starch as a substrate and the chromogenic reagent dinitrosalicylic acid. The extracts were also tested against human salivary α -amylase, at concentration of 125 μ g/mL. The results showed inhibitory activity on amylases from ethanolic extracts of Monimiaceae, Meliaceae, Sapotaceae, Burseraceae and Sapindaceae, with special attention to *Matayba guianensis* Aublet. The ethanolic extract of *M. guianensis* root bark showed IC_{50} of 88,30 μ g/mL, 140,09 μ g/mL and 42,04 μ g/mL on the *Z. subfasciatus*, *A. obtectus* and human salivary amylases, respectively. The quantification of phenolic compounds and total tannins present in the methanolic fraction, originated from the *M. guianensis* root bark ethanolic extract fractioning, that contained molecules bigger than 30 kDa, points to an inhibitory activity by condensed tannins. The results obtained in this work demonstrate the relevance in explore the Brazilian Cerrado as a source of biologically active molecules.

Key-words: Cerrado. Amylase. *Zabrotes subfasciatus*. *Acanthoscelides obtectus*. Human salivary amylase. Tannins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Estrutura química da amilose	18
FIGURA 2 – Estrutura química da amilopectina	18
FIGURA 3 – Especificidade de algumas enzimas que participam da digestão de carboidratos	20
FIGURA 4 – Digestão de carboidratos da dieta	21
FIGURA 5 – Broca do feijão mexicano, <i>Zabrotes subfasciatus</i>	22
FIGURA 6 – Estrutura tridimensional da amilase pancreática porcina (APP)	23
FIGURA 7 – Estrutura química da acarbose	28
FIGURA 8 – Área de distribuição do Cerrado no Brasil	38
FIGURA 9 – Vegetação típica do Cerrado	39
FIGURA 10 – Distribuição da espécie <i>Matayba guianensis</i>	41
FIGURA 11 – Exemplar de <i>M. guianensis</i>	41
FIGURA 12 – Quatro éteres glicosídicos isolados do extrato hexânico da casca da raiz de <i>M. guianensis</i>	42
FIGURA 13 – Obtenção dos extratos brutos	44
FIGURA 14 – Ensaio de inibição das amilases	46
FIGURA 15 – Diversidade de formas, cores e texturas dos extratos vegetais obtidos	55
FIGURA 16 – Vias utilizadas na tentativa de purificação de inibidores de amilases a partir do extrato etanólico da casca da raiz de <i>M. guianensis</i>	70
FIGURA 17 – Primeira cromatografia em coluna aberta de sephadex LH20	72
FIGURA 18 – Fracionamento líquido-líquido	75
QUADRO 1 – Classificação dos compostos fenólicos	78
FIGURA 19 – Características estruturais de taninos hidrolisáveis	80
FIGURA 20 – Características estruturais de taninos condensados	80

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 – Atividade inibitória (AI) dos extratos vegetais sobre α -amilases de *Zabrotes subfasciatus* (AZS) e *Acanthoscelides obtectus* (AAO) a 1 mg/mL e sobre α -amilase salivar humana (ASH) a 125 μ g/mL57
- TABELA 2 – Concentração dos extratos vegetais capaz de inibir 50% da atividade total (CI₅₀) das amilases de *Zabrotes subfasciatus* (AZS), *Acanthoscelides obtectus* (AAO) e salivar humana (ASH)68
- TABELA 3 – Atividade inibitória (AI) sobre as α -amilases de *Zabrotes subfasciatus* (AZS) das frações obtidas do fracionamento do extrato etanólico da casca da raiz de *M. guianensis* em coluna cromatográfica aberta de sílica gel G6071
- TABELA 4 – Atividade inibitória (AI) sobre as α -amilases de *Zabrotes subfasciatus* (AZS) dos grupos obtidos do primeiro fracionamento do extrato etanólico da casca da raiz de *M. guianensis* (2g) em coluna cromatográfica aberta de sephadex LH2073
- TABELA 5 – Atividade inibitória (AI) sobre as α -amilases de *Zabrotes subfasciatus* (AZS) dos grupos obtidos do segundo fracionamento consecutivo do extrato etanólico da casca da raiz de *M. guianensis* (702 mg) em coluna cromatográfica aberta de sephadex LH2074

LISTA DE SIGLAS

α -AI	- inibidor de α -amilases isolado de espécies do gênero <i>Phaseolus</i>
AAI	- inibidor de α -amilases isolado de <i>Amaranthus hypochondriacus</i>
AAO	- α -amilase de <i>Acanthoscelides obtectus</i>
AI	- atividade inibitória
APH	- α -amilase pancreática humana
APP	- α -amilase pancreática porcina
ASH	- α -amilase salivar humana
AZS	- α -amilase de <i>Zabrotes subfasciatus</i>
BASI	- inibidor de α -amilases isolado da cevada
C	- caule (madeira + casca)
CC	- casca do caule
CCD	- cromatografia em camada delgada
CNP-G ₃	- 2-cloro-4-nitrofenil maltotriosídeo
CR	- casca da raiz
DM	- diabetes mellitus
ADNS	- ácido dinitrossalicílico
EC	- classe enzimática
F	- folha
FL	- flor ou capítulo floral
FR	- fruto
FS	- fruto com semente
Gal-G ₂ -CNP	- 2-cloro-4-nitrofenil-4-O- β -D-galactopiranosilmaltosídeo
G-TH	- glucopiranosilideno-espiro-tioidantoína
Cl ₅₀	- concentração do extrato vegetal capaz de inibir 50% da atividade da enzima
MC	- madeira do caule
MR	- madeira da raiz
p-NPM	- p-nitrofenil- α -D-manopiranosídeo
PTS-G-T	- acarviosinil-glucopiranosilideno-espiro-tioidantoína
PvCAI	- inibidor de amilase de <i>P. vulgaris</i> com atividade quitinolítica
R	- raiz (madeira + casca)
RASI	- inibidor de α -amilases isolado do arroz
RBI	- inibidor bifuncional isolado de <i>Eleusine coracana</i>

SI α	- inibidores isolados de <i>Sorghum bicolor</i>
WASI	- inibidor de α -amilases isolado do trigo
DMSO	- dimetilsulfóxido
UnB	- Universidade de Brasília
UB	- sigla do Herbário da Universidade de Brasília
U	- unidade de atividade

LISTA DE ABREVIATURAS

Asp	- asparagina
Da	- Dalton
kDa	- quiloDalton
pH	- potencial hidrogeniônico
Prof	- professor
rpm	- rotações por minuto

LISTA DE SÍMBOLOS

α	- alfa
β	- beta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 ASPECTOS GERAIS	14
1.2 OBJETIVO GERAL	15
1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 AS AMILASES	17
2.1.1 Definição e função	17
2.1.2 Caracterização molecular	22
2.1.3 Importância das amilases como alvo biológico.....	24
2.2 OS INIBIDORES DE AMILASES	24
2.2.1 Inibidores protéicos	25
2.2.2 Inibidores não protéicos	27
2.3 APLICABILIDADE DOS INIBIDORES DE AMILASES	29
2.3.1 Tratamento do Diabetes mellitus e da obesidade	29
2.3.2 Aplicações agrônômicas	31
2.3.3 Outras aplicações	32
2.4 MÉTODOS UTILIZADOS NA VERIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DE α -AMILASES	33
2.5 RAZÕES PARA A BUSCA DE NOVOS INIBIDORES DE AMILASES	36
2.6 O BIOMA CERRADO	37
2.6.1 Características gerais	37
2.6.2 <i>Matayba guianensis</i> Aublet	40
3 MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 ESTUDO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DE EXTRATOS VEGETAIS SOBRE AMILASES.....	44
3.1.1 Obtenção dos extratos brutos	44
3.1.2 Obtenção das enzimas	45
3.1.3 Teste de inibição sobre α -amilases	45
3.1.4 Seleção do tampão de atividade	48
3.1.5 Concentração do extrato vegetal capaz de inibir 50% da atividade total da AZS, AAO e ASH (Cl ₅₀).....	48
3.2 PRIMEIRA VIA DE PURIFICAÇÃO	49

3.2.1 Fracionamento em coluna cromatográfica aberta de sílica gel G60	49
3.3 SEGUNDA VIA DE PURIFICAÇÃO	50
3.3.1 Primeira cromatografia em coluna aberta de sephadex LH20	50
3.3.2 Segunda cromatografia em coluna aberta de sephadex LH20	50
3.4 TERCEIRA VIA DE PURIFICAÇÃO	51
3.4.1 Fracionamento líquido-líquido	51
3.4.2 Exclusão molecular em membrana filtrante	52
3.4.3 Quantificação de compostos fenólicos totais	52
3.4.4 Quantificação de taninos totais	53
3.4.5 Comprimento de onda de máxima absorvância e termoestabilidade	53
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS	55
4.2 SELEÇÃO DO TAMPÃO DE ATIVIDADE	55
4.3 ATIVIDADE INIBITÓRIA DOS EXTRATOS VEGETAIS SOBRE α AMILASES ...	56
4.4 CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO VEGETAL CAPAZ DE INIBIR 50% DA ATIVIDADE TOTAL DA AZS, AAO E ASH (CI_{50})	67
4.5 VIAS DE PURIFICAÇÃO	69
4.5.1 Primeira via de purificação	70
4.5.2 Segunda via de purificação	71
4.5.2.1 Primeira cromatografia em coluna aberta de sephadex LH20	71
4.5.2.2 Segunda cromatografia em coluna aberta de sephadex LH20	73
4.5.3 Terceira via de purificação	74
4.5.3.1 Fracionamento líquido-líquido	74
4.5.3.2 Exclusão molecular em membrana filtrante	75
4.5.3.3 Caracterização da fração ativa	76
a. Comprimento de onda de máxima absorvância e termoestabilidade	76
b. Quantificação de compostos fenólicos totais	78
c. Quantificação de taninos totais	82
5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	83
5.1 CONCLUSÃO	84
5.2 PERSPECTIVAS	85
REFERÊNCIAS	86

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS

Os carboidratos constituem a classe de substâncias de maior importância na dieta dos ocidentais. Entretanto, os carboidratos são moléculas complexas e, para que sejam aproveitados como fonte energética pelos seres vivos, precisam ser degradados em moléculas menores capazes de serem absorvidas pelo trato gastrointestinal. Posteriormente, essas moléculas menores penetram nas células e participam de reações catabólicas intracelulares de liberação de energia.

Por serem moléculas complexas, os carboidratos dependem de várias enzimas para a sua degradação e posterior absorção. Dentre essas enzimas encontram-se as α -amilases, que clivam as ligações glicosídicas α -1,4 dos carboidratos e que foram selecionadas como objeto deste estudo.

Vegetais dependem de α -amilases para a mobilização dos carboidratos, que armazenam especialmente sob a forma de amido. Muitas plantas também as utilizam durante a germinação de sementes.

Vários insetos, inclusive os que se alimentam de sementes e outros órgãos vegetais agricultáveis e economicamente importantes, também utilizam α -amilases para degradar carboidratos de suas fontes alimentares e, por causa disso, causam sérios prejuízos à economia agrícola de vários países.

Microrganismos e outros animais que também utilizam carboidratos como fonte de energia, como o homem, também dependem de amilases. Em humanos, a amilase é produzida tanto pelas glândulas salivares, sendo denominada amilase salivar humana (ASH), quanto pelo pâncreas exócrino, denominada amilase pancreática humana (APH). Além dessas duas isoformas da enzima contribuírem para o aproveitamento energético de carboidratos, elas também estão relacionadas a alguns distúrbios orais e metabólicos.

Como exemplo, sabe-se que a ASH pode estar diretamente envolvida na progressão da cárie e na formação da placa dentária; a APH, principalmente, está relacionada a condições de hiperamilasemia; e a inibição de amilases humanas leva à diminuição no pico de glicemia pós-prandial e ao retardamento do esvaziamento gástrico.

Por isso, tem-se investigado a aplicabilidade de inibidores de amilases para o tratamento de distúrbios metabólicos como diabetes e condições de hiperamilasemia, bem como no controle da obesidade e no desenvolvimento de espécies agricultáveis resistentes a insetos-praga dependentes de amilases.

O Cerrado, com sua enorme diversidade vegetal, possibilitou realizar a prospecção de inibidores das amilases de *Zabrotes subfasciatus*, *Acanthoscelides obtectus* e salivar humana.

1.2 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho consiste em buscar nos extratos de plantas do Cerrado inibidores de α -amilases, devido à sua potencial utilização agrônômica como bioinseticidas e clínica como adjuvante no tratamento de diabetes mellitus, obesidade e cáries dentárias, dentre outras aplicações.

1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter extratos vegetais de plantas do bioma Cerrado para favorecer seu estudo e contribuir com a conservação do patrimônio genético vegetal brasileiro, por meio da ampliação da coleção de extratos do Laboratório de Farmacognosia / UnB, produzidos a partir de espécies do Cerrado;
- Verificar a capacidade de extratos vegetais em inibir *in vitro* a atividade de α -amilases;
- Identificar possíveis extratos de plantas com atividade inibitória isoforma-específica;
- Realizar o fracionamento químico biomonitorado de extratos ativos, visando purificar as moléculas responsáveis pela atividade biológica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AS AMILASES

2.1.1 Definição e função

Amilases são algumas das enzimas produzidas por animais, microrganismos e plantas que podem participar da degradação de carboidratos de forma a permitirem sua utilização como fonte energética.

Os carboidratos, substâncias produzidas durante o processo de fotossíntese realizado por plantas e outros organismos autotróficos, constituem a principal forma de armazenamento da energia do sol (PAYAN, 2004).

Entretanto, para que a energia solar armazenada na forma de carboidratos possa ser utilizada pelos seres vivos, os carboidratos precisam ser hidrolisados a monômeros e absorvidos (WHITCOMB & LOWE, 2007; PAYAN, 2004; IULEK *et al.*, 2000). Só assim podem participar dos processos catabólicos intracelulares, fornecendo a energia que armazenam.

Dessa forma, justifica-se: (i) a importância primordial das amilases no processo de digestão dos carboidratos, pois é esta enzima que permite a sua utilização como fonte energética por organismos autotróficos e heterotróficos (WANG *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2001); e (ii) a ampla distribuição destas enzimas na natureza (YOON & ROBYT, 2003), ocorrendo em microrganismos, plantas e animais (STROBL *et al.*, 1998).

No ocidente, os carboidratos correspondem a cerca de 40 a 50% das calorias ingeridas (WHITCOMB & LOWE, 2007) e constituem o principal componente da dieta, na forma de amido ou de açúcares simples (PAYAN, 2004).

O amido, principal forma de armazenamento de carboidratos nas plantas, inclusive naquelas utilizadas como alimento pelos humanos, é um carboidrato complexo de reserva nutritiva, formado por dois tipos de polímeros de glucose: amilose e amilopectina (WHITCOMB & LOWE, 2007; MURALIKRISHNA & NIRMALA, 2005; SORENSEN *et al.*, 2004). A amilose (Figura 1) é um polímero linear de moléculas de glucose unidas por ligações glucosídicas α -1,4 (WHITCOMB & LOWE, 2007; MURALIKRISHNA & NIRMALA, 2005; RAMASSUBU *et al.*, 2003) e

corresponde a aproximadamente 20% do amido da dieta (WHITCOMB & LOWE, 2007). A amilopectina (Figura 2), que corresponde a 80% do amido da dieta (WHITCOMB & LOWE, 2007), é um polímero ramificado: possui cadeias principais de glucoses unidas por ligações α -1,4 interligadas por ligações α -1,6 (WHITCOMB & LOWE, 2007; MURALIKRISHNA & NIRMALA, 2005) a cada 20 a 25 resíduos de glucose (WHITCOMB & LOWE, 2007).

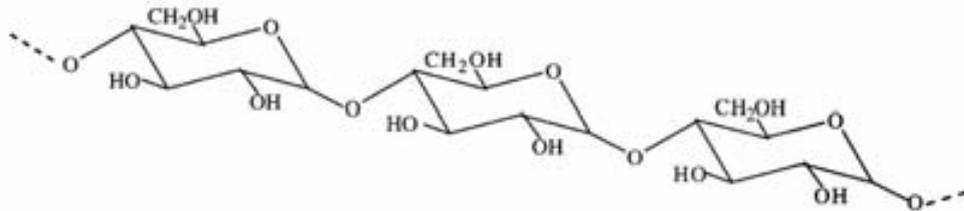


FIGURA 1 – Estrutura química da amilose
FONTE: Muralikrishna & Nirmala (2005)

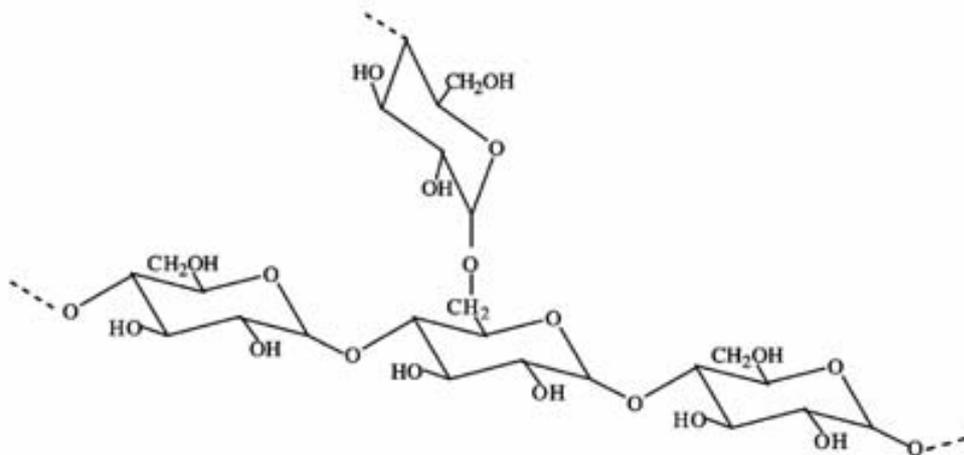


FIGURA 2 – Estrutura química da amilopectina
FONTE: Muralikrishna & Nirmala (2005)

Conseqüentemente, muitas enzimas são necessárias para a despolimerização completa do amido e para a sua conseqüente absorção e utilização pelos seres vivos como fonte energética (MURALIKRISHNA & NIRMALA, 2005).

Basicamente, essas enzimas podem ser divididas em três grupos principais, de acordo com seu mecanismo de ação: endo-amilases, exo-amilases e enzimas de desramificação (MURALIKRISHNA & NIRMALA, 2005).

As endo-amilases, também conhecidas como α -amilases (α -1,4-glucan-4-glucanoidrolase, enquadradas na classe enzimática EC 3.2.1.1), clivam as ligações

glucosídicas α -1,4 presentes na parte interna da amilose ou da amilopectina (YOON & ROBYT, 2003). As exo-amilases podem clivar as ligações glucosídicas α -1,4 externas da amilose, amilopectina e polissacarídeos relacionados (SORENSEN *et al.*, 2004), removendo gradativamente maltoses ou glucoses. Exemplos dessas enzimas são as β -amilases, encontradas em bactérias, cereais e fungos, e α -glucosidases. As enzimas desramificantes clivam as ligações glucosídicas α -1,6 presentes nos pontos de ramificação do amido, que são resistentes ao ataque por α e por β -amilases. Como exemplos destas enzimas, temos as glucoamilases, isoamilases e pululanases (MURALIKRISHNA & NIRMALA, 2005). α -glucosidases também são capazes de clivar ligações α -1,6, desde que possuam ligação α -1,4 adjacente (Figura 3).

O grupo das endo ou α -amilases está largamente distribuído em microrganismos, plantas e secreções de animais (MURALIKRISHNA & NIRMALA, 2005; PAYAN, 2004; YOON & ROBYT, 2003) e os produtos resultantes da sua ação sobre o amido são oligossacarídeos de vários comprimentos de cadeia (MURALIKRISHNA & NIRMALA, 2005; HILL & MACGREGOR, 1988) chamados dextrinas, uma mistura de maltose, maltotriose e oligossacarídeos ramificados de 6 a 8 unidades de glucose, que contêm ligações α -1,4 e α -1,6 (WHITCOMB & LOWE, 2007).

Em humanos, as α -amilases são produzidas pelas glândulas salivares parótidas (80% da amilase presente na saliva), submandibulares e sublinguais (20% da amilase presente na saliva) (BUSCH *et al.*, 2002) e pelo pâncreas.

É a amilase salivar humana (ASH) que inicia a digestão do amido na boca (WHITCOMB & LOWE, 2007; YOON & ROBYT, 2003) (Figura 4), mas a sua efetividade enzimática depende do tempo que o alimento permanece na cavidade oral e da fonte do amido (WHITCOMB & LOWE, 2007).

Embora a ASH lançada na cavidade oral seja degradada pelo baixo pH do estômago (YOON & ROBYT, 2003), ela pode ainda ser detectada no duodeno, contribuindo significativamente para a hidrólise de amido em alguns casos (WHITCOMB & LOWE, 2007; GYÉMÁNT *et al.*, 2003).

Com a passagem do bolo alimentar para o intestino delgado, onde este é neutralizado, a digestão do amido é continuada pela amilase pancreática humana

(APH) (YOON & ROBYT, 2003) (Figura 4). Em indivíduos com deficiências de APH, a efetividade da ASH em digerir o amido na boca pode ser maior. Adiante, as enzimas da borda intestinal em escova, como a maltase e a isomaltase, terminam a digestão das dextrinas (WHITCOMB & LOWE, 2007) (Figura 4).

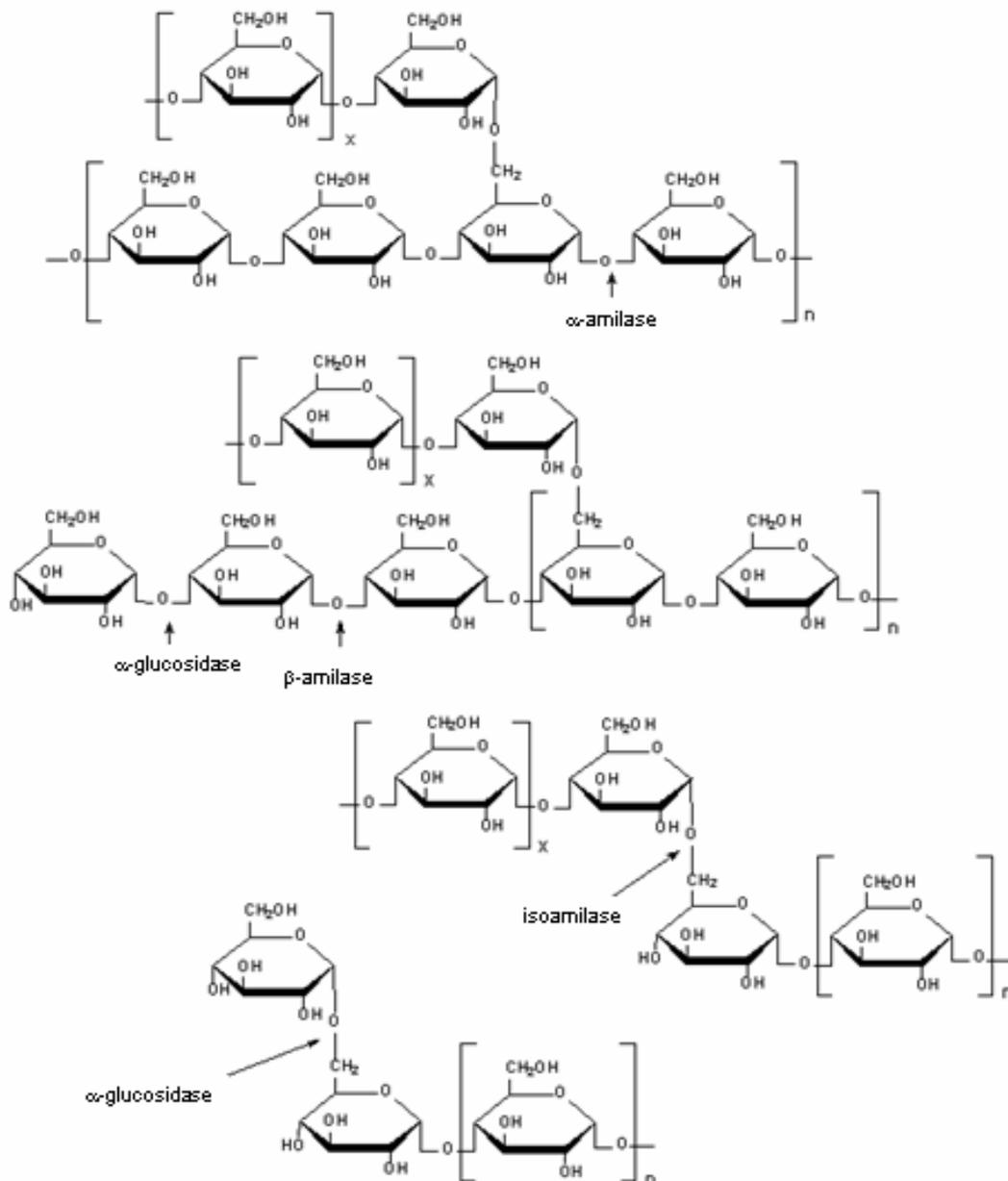


FIGURA 3 – Especificidade de algumas enzimas que participam da digestão de carboidratos. Algumas das várias enzimas que participam deste processo estão apontadas na figura, bem como a região do substrato onde haverá a clivagem decorrente da ação da enzima (setas pretas). FONTE: http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Biochemicals/Enzyme_Explorer/Key_Resources/Carbohydrate_Analysis.html (adaptado)

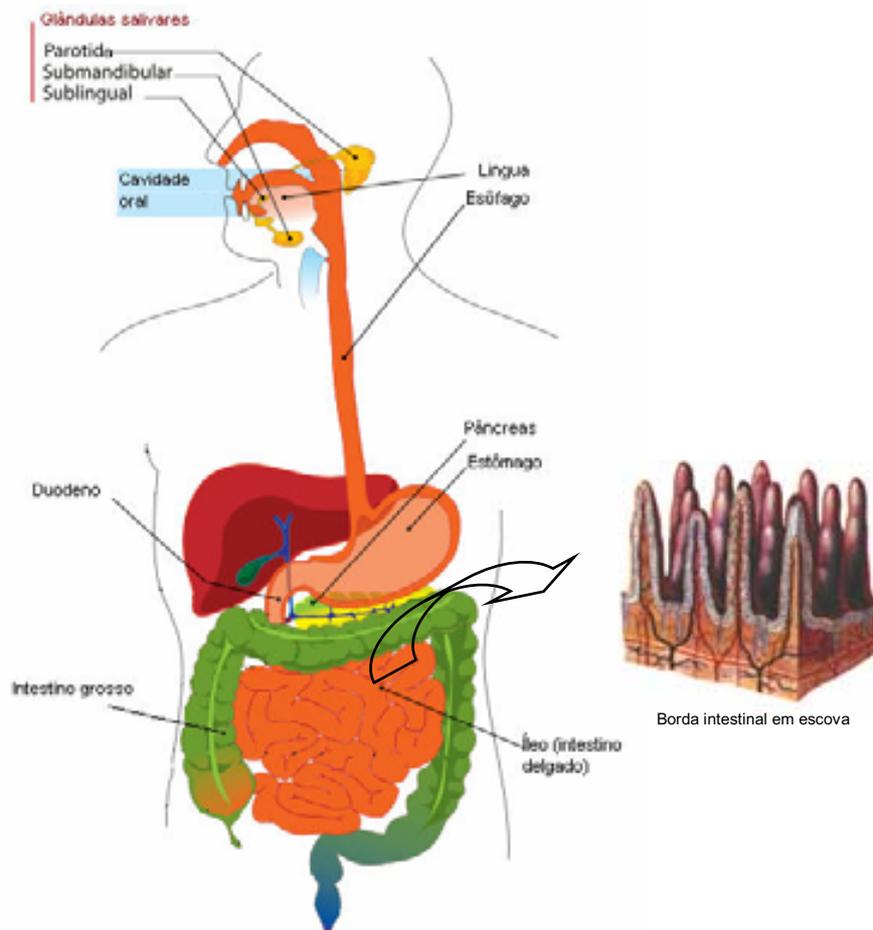


FIGURA 4 – Digestão de carboidratos da dieta. Na boca, a amilase salivar humana produzida pelas glândulas salivares inicia a digestão do amido. Com a deglutição, o bolo alimentar passa pelo esôfago e atinge o estômago, onde o baixo pH pode inativar as amilases salivares. Entretanto, em alguns casos, a atividade dessa enzima ainda pode ser detectada no duodeno, onde o bolo alimentar se mistura à amilase pancreática, que continua a digestão do amido. No intestino delgado, enzimas da borda em escova intestinal terminam a degradação dos carboidratos, para que os monossacarídeos possam ser absorvidos pelo intestino. FONTE: http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Digestive_system_diagram_en.svg e <http://www.juntadeandalucia.es/averroes/~29701428/salud/intestino.gif> (adaptado)

Além dos humanos, alguns insetos também se beneficiam da ação de amilases para consumirem órgãos de plantas ricos em amido, como sementes e raízes, o que os tornam severas pragas agrícolas por causarem a depreciação comercial destes produtos (WANG *et al.*, 2006; TITARENKO & CHRISPPEELS, 2000). Como exemplo, a broca do feijão mexicano *Zabrotes subfasciatus* Boheman (Figura 5), dentre outras pragas de armazenamento, são extremamente dependentes de amido e conseqüentemente de amilases, alimentando-se das sementes de feijão e causando severas perdas econômicas (DAYLER *et al.*, 2005).



FIGURA 5 – Broca do feijão mexicano, *Zabrotes subfasciatus*. FONTE: <http://www.mard.gov.vn/PPDHCMC/html/KDTV/imageKDTV/contrungmotdaumexico-truongthanh.gif> e <http://www.mard.gov.vn/PPDHCMC/html/KDTV/imageKDTV/contrungmotdaumexico-trieuchung.gif>

Outros mamíferos, bactérias e fungos (YOON & ROBYT, 2003) também possuem dieta rica em amido, sendo altamente dependentes desta fonte de energia e, conseqüentemente, da efetividade de α -amilases para sua sobrevivência (TITARENKO & CHRISPEELS, 2000).

Nas plantas, particularmente, as amilases também exercem um papel significativo na germinação e na maturação de sementes (MURALIKRISHNA & NIRMALA, 2005).

2.1.2 Caracterização molecular

A área de conhecimento sobre α -amilases foi bastante beneficiada com a determinação recente de muitas estruturas, inibidores e complexos (PAYAN 2004; GERRARD *et al.*, 2000), do ponto de vista bioquímico e molecular (TITARENKO & CHRISPEELS, 2000; STROBL *et al.*, 1998). Estudos revelam que a APH é uma glicoproteína de 57 kDa e, provavelmente, 512 resíduos de aminoácidos, com três domínios: A, B, e C. O local de ligação ao substrato encontra-se em uma fenda entre os domínios A e B. Resíduos de aminoácidos existentes nos domínios A e B ligam um átomo de cálcio, enquanto um átomo de cloreto se liga ao domínio A perto do sítio ativo. O domínio C dá forma a uma β -estrutura completa e parece ser um domínio independente com função desconhecida. Há ainda sugestões de que os resíduos Asp197 e Asp300 participam da catálise (WHITCOMB & LOWE, 2007).

A ASH, por sua vez, possui 496 resíduos de aminoácidos, um íon cálcio e um íon cloreto, também constituindo 3 domínios: A, B e C (KANDRA *et al.*, 2005). Existe uma justaposição bastante similar dos resíduos catalíticos presentes no domínio A das isoformas salivar e pancreática da α -amilase (RAMASUBBU *et al.*, 1996), além do fato de que estas isoformas exibem estruturas cristalográficas quase idênticas (WHITCOMB & LOWE, 2007). Entretanto, as seqüências de aminoácidos preditas para elas diferem entre 1% (RAMASUBBU *et al.*, 1996) e 6% (WHITCOMB & LOWE, 2007), o que pode justificar as diferentes ações na modificação de oligossacarídeos (NAGAMINE *et al.*, 1988) e na sua potência: segundo Guyton (1997) por exemplo, a APH é várias vezes mais potente que a ASH.

Comparando-se a estrutura físico-química das amilases de mamíferos e de insetos, sabe-se que elas mostram alta similaridade em suas estruturas primárias e terciárias (STROBL *et al.*, 1998), e é provável que possuam um mecanismo de ação similar. Como a arquitetura das amilases de mamíferos e de insetos é bastante parecida (PAYAN, 2004), uma ilustração da estrutura tridimensional das amilases está representada pela amilase pancreática porcina (APP) na Figura 6.

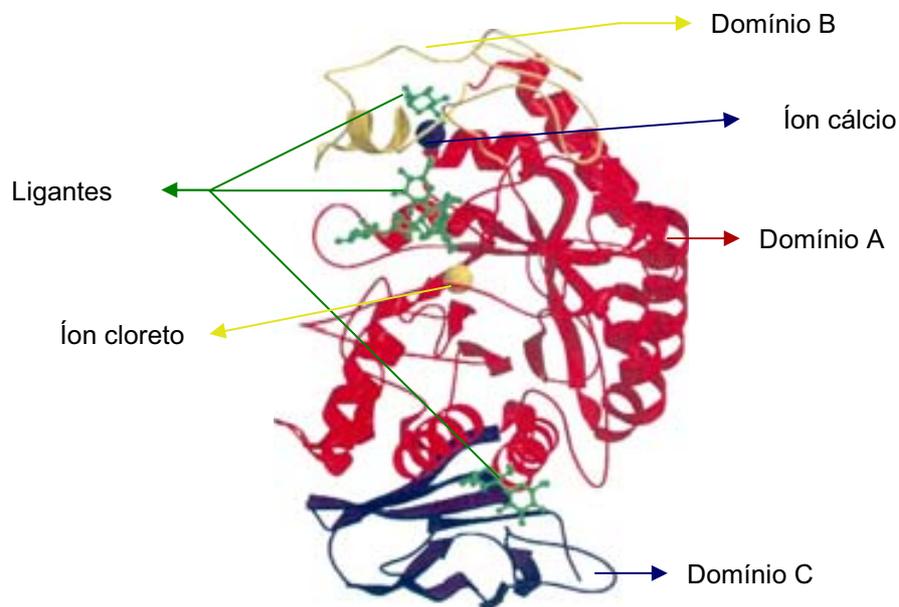


FIGURA 6 – Estrutura tridimensional da amilase pancreática porcina (APP). O domínio A está mostrado em vermelho, o domínio B em amarelo e o domínio C em roxo. O íon cálcio (esfera azul) e o íon cloreto (esfera amarela) também estão mostrados no centro catalítico. Ligantes da enzima estão representados em verde (representação de traços-e-bolas) na superfície do sítio ativo e na sua fenda. FONTE: Payan (2004)

2.1.3 Importância das amilases como alvo biológico

Para humanos, o processo de digestão e absorção rápida de carboidratos, do qual participam as amilases, tem benefícios em alguns aspectos da nutrição esportiva. Mas geralmente isso não é considerado desejável devido à sua relação com a progressão da cárie dentária (KANDRA *et al.*, 2005) e com respostas glicêmicas elevadas, especialmente para indivíduos com diabetes (ENGLYST & ENGLYST, 2005).

Como o amido também constitui a dieta de insetos pragas de culturas extensivas, é com base na atividade das amilases que esses animais se desenvolvem e causam a depreciação comercial de sementes cultivadas (PAYAN, 2004; SORENSEN *et al.*, 2004). Por isso, a efetividade das amilases nestes animais também não é desejável.

2.2 OS INIBIDORES DE AMILASES

Diversas plantas produzem inibidores de amilases, especialmente em sementes e tubérculos (SIVAKUMAR *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2006), e o número desses inibidores isolados e identificados é extremamente grande (PAYAN, 2004).

Existem diversas especulações a respeito do motivo da síntese desses inibidores pelo vegetal, dentre elas (i) a hipótese destes inibidores participarem em processos de desenvolvimento da planta, incluindo a programação da morte celular (SOLOMON *et al.*, 1999); (ii) de controlarem a atividade de amilases durante a germinação prematura de sementes, por prevenir a mobilização do amido armazenado (NIELSEN *et al.*, 2004); (iii) de exercerem papel importantíssimo na defesa das plantas que os produzem contra patógenos (SIVAKUMAR *et al.*, 2006; SOLOMON *et al.*, 1999).

Entretanto, apesar da forte presença de inibidores de amilases em plantas superiores, eles também ocorrem em microrganismos e em animais. Esses inibidores endógenos podem ser divididos em dois grandes grupos, a saber:

inibidores protéicos (proteínas e peptídeos) e inibidores não protéicos (representados principalmente pelos agentes complexantes, compostos fenólicos e açúcares) (SORENSEN *et al.*, 2004).

2.2.1 – Inibidores protéicos

Inibidores proteináceos de α -glicosidases são descritos desde 1930. Décadas depois, essas proteínas foram purificadas e sua estrutura e função caracterizadas (SORENSEN *et al.*, 2004).

Hoje, acredita-se que os inibidores proteináceos oriundos de plantas superiores possam ser agrupados pela similaridade em sua seqüência primária e por sua estrutura terciária em seis classes de inibidores, tipo: lectina, knotina, cereal, kunitz, g-purotionina e taumatina (PAYAN, 2004; SVENSSON *et al.*, 2004).

A superfamília dos inibidores tipo **lectina** é tipicamente representada pelos inibidores de feijões comuns, *Phaseolus vulgaris* L. (PAYAN, 2004). Segundo Gibbs & Alli (1998), *P. vulgaris* teve sua atividade inibitória sobre α -amilases descrita pela primeira vez em 1945 por Bowman e foi posteriormente confirmada por diversos investigadores. Hoje, sabe-se tratar de quatro isoformas de inibidores de amilases no gênero *Phaseolus*, α -AI-1, α -AI-2, α -AI-3 e tipo nulo (SILVA *et al.*, 2001), além de um inibidor chamado “inibidor de amilase de *P. vulgaris* com atividade quitinolítica” (PvCAI) (DAYLER *et al.*, 2005).

Esses inibidores exibem diferenças tanto na sua seqüência primária de resíduos de aminoácidos quanto na sua atividade inibitória sobre as enzimas de mamíferos e de insetos broquídeos (DAYLER *et al.*, 2005; PAYAN, 2004). O inibidor α -AI-1, a forma mais comumente encontrada, está envolvido na antibiose contra brocas do Velho Mundo (SILVA *et al.*, 2001; ISHIMOTO & CHRISPEELS, 1996), mas não inibe *in vitro* as amilases de uma preparação bruta de intestinos das larvas de *Z. subfasciatus* nem de *Acanthoscelides obtectus*, da mesma região geográfica, e que atacam estas espécies. Entretanto, α -AI-2, uma forma do inibidor derivada do feijão selvagem, é capaz de inibir a atividade de amilase de extratos brutos do intestino de *Z. subfasciatus* e causa antibiose contra esta espécie (SILVA *et al.*, 2001). Também

é descrita atividade de inibidores de feijões comuns sobre amilases de mamíferos (SVENSSON *et al.*, 2004).

Esta atividade inibitória sobre α -amilases encontrada em *P. vulgaris* rendeu a esta espécie uma atenção considerável devido à sua elevada potência inibitória comparada com os inibidores de outras espécies e ao fato de conter tipos distintos de inibidores (GIBBS & ALLI, 1998).

Os inibidores protéicos de α -amilases da superfamília dos **cereais** podem ser representados pelo inibidor bifuncional de α -amilase e de tripsina RBI, isolado de *Eleusine coracana Gaertneri* (SIVAKUMAR *et al.*, 2006; PAYAN, 2004; STROBL *et al.*, 1998) e pelos inibidores de 12, 24 ou 60 kDa isolados do trigo (*Triticum aestivum* L.) (PAYAN, 2004).

A superfamília de inibidores protéicos do tipo **Knotina** é bem representada pelo inibidor AAI isolado do amarante (*Amaranthus hypochondriacus* L.), também conhecido como pau-roxo. Com 32 resíduos aminoácidos, AAI é o menor inibidor de α -amilase já descrito e inibe as α -amilases de insetos, mas não as de mamíferos (PAYAN, 2004; SVENSSON *et al.*, 2004).

A superfamília **tionina** é representada pelos inibidores do sorgo (*Sorghum bicolor* L.) (SI α 1, SI α 2, SI α 3), ativos sobre amilases de insetos, enquanto a superfamília **Kunitz** tem como representantes os inibidores da cevada (BASI), do trigo (WASI) e do arroz (RASI) ativos sobre amilases de insetos e de cereais. A família **taumatina** tem como representante o inibidor do milho zeamatina, ativo sobre insetos (SVENSSON *et al.*, 2004).

Além dos exemplos apontados acima, a presença de inibidores proteínáceos de α -amilases também é abundante em outras plantas leguminosas e em cereais (SIVAKUMAR *et al.*, 2006; PAYAN, 2004), sendo descrita também para *Phaseolus coccineus* L. (VALENCIA-GIMÉNEZ *et al.*, 2007), centeio (GIBBS & ALLI, 1998), amendoim (GIBBS & ALLI, 1998), bulbo de *Colocasia esculenta* (L.) Schott (REKHA *et al.*, 2004; GIBBS & ALLI, 1988), batata doce (REKHA *et al.*, 2004) e *Cajanus cajan* (L.) Millsp. (GIRI & KACHOLE, 1998), dentre outras espécies.

Entretanto, segundo Sorensen e colaboradores (2004), a maioria dos compostos isolados mostra-se ativo sobre amilases de origem animal ou vegetal, sendo que poucos trabalhos descrevem efeitos em α -amilases de origem microbiana.

Além dos inibidores protéicos de plantas, também há relatos na literatura da obtenção de substâncias proteínicas inibitórias da enzima a partir do sobrenadante de culturas de bactérias do gênero *Sreptomycetes* (SVENSSON *et al.*, 2004; SUMITANI *et al.*, 2000): tendamistat, haim e paim, que inibem α -amilases de animais, de algumas outras espécies do gênero *Streptomycetes* e *Bacillus*. (SVENSSON *et al.*, 2004; SUMITANI *et al.*, 2000). Alguns análogos sintéticos mais curtos do tendamistat também mostraram inibição sobre amilases de mamíferos (HEYL *et al.*, 2005).

2.2.2 Inibidores não-protéicos

Dentre os inibidores não protéicos de α -amilases destacam-se os **inibidores carboidratos**. Essas substâncias correspondem a compostos pseudo-oligossacarídicos que contêm uma entidade estrutural específica chamada acarviosina (unidade ciclitol insaturada ligada a uma 4,6-dideoxi-4-amino-D-glucose) ligada por uma ligação α -(1,4)-O-glucosídica a um número variável de resíduos de glicose.

Um composto desta classe em particular, o pseudotetrassacarídeo acarbose (Figura 7), no qual a unidade acarviosina está ligada a uma molécula de maltose (PAYAN, 2004; YOON & ROBYT, 2003), é um potente inibidor de α -amilases usado para tratar diabetes (PAYAN, 2004; GYÉMÁNT *et al.*, 2003; GERRARD *et al.*, 2000). Muitos de seus derivados análogos exibem atividade inibitória superior à da acarbose sobre amilases de diversas fontes (YOON & ROBYT, 2003). Contudo, a acarbose, uma molécula pequena, é o inibidor de α -amilase melhor caracterizado (GERRARD *et al.*, 2000).

No intestino, a acarbose é degradada por enzimas digestivas e/ou por microrganismos e os seus produtos de degradação causam diarreia e desconforto abdominal. Estes efeitos colaterais que surgem com a utilização terapêutica da acarbose têm despertado o interesse médico no desenvolvimento de novos agentes ou estratégias terapêuticas (KANDRA *et al.*, 2005), como os inibidores alternativos açúcar-miméticos aza, isoxazoles e aminoaçúcares (SEO *et al.*, 2005).

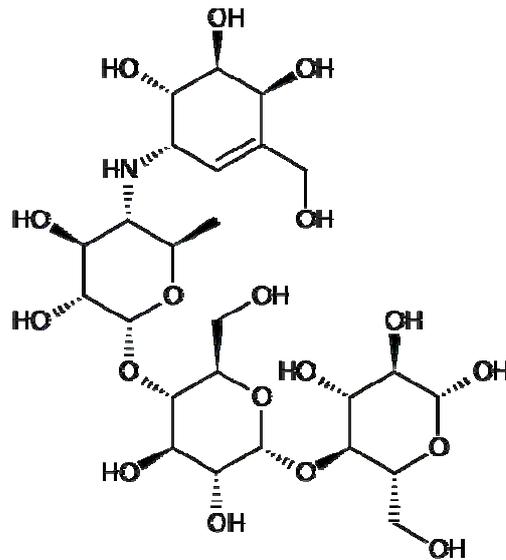


FIGURA 7 – Estrutura química da acarbose. FONTE: <http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:acarbose.svg>

Um polissacarídeo sintético contendo unidades repetidas de hexapiranosose 3-insaturada foi obtido por policondensação de unidades 3,6-di-O-acetil-D-glucal seguida de desacetilação e também mostrou atividade inibitória sobre a ASH (KÉKI *et al.*, 2006).

Uma outra classe de inibidores não-protéicos de amilases recentemente descrita (GERRARD *et al.*, 2000; ABELL *et al.*, 1998) é constituída por **derivados do ácido ascórbico**, cujo grupo farmacofórico essencial para a inibição, de caráter competitivo, é a sua metade eno-diol (GERRARD *et al.*, 2000).

A substância sintética glucopiranosilideno-espiro-tioidantoína (G-TH) também mostrou atividade inibitória sobre a ASH (GYÉMÁNT *et al.*, 2003), bem como seu análogo mais longo acarviosinil-glucopiranosilideno-espiro-tioidantoína (PTS-G-T) (KANDRA *et al.*, 2005).

Por sua vez, aminochalconas e chalconas-sulfonamidas sintéticas (cujo grupo chalcona é precursor de flavonóides e isoflavonóides) mostraram efeito inibitório sobre amilases de *Bacillus licheniformis* (SEO *et al.*, 2005).

Também há relatos na literatura de extratos brutos vegetais e de metabólitos secundários isolados de diversas plantas que possuem propriedades inibitórias sobre as α -amilases:

(a) cinco 3-metoxiflavonas isoladas do extrato etanólico das partes aéreas de *Varthemia iphionoides* Boss foram ativas sobre a APP (AL- DABBAS *et al.*, 2006);

(b) taninos com núcleo de ácido quínico mostraram atividade inibitória sobre α -amilases, com destaque para um galotanino isolado da noz do carvalho, que mostrou atividade *in vitro* sobre a ASH (ZAJÁ CZ *et al.*, 2007);

(c) o óleo essencial da madeira de *Cedrus libani* A. Rich mostrou atividade *in vitro* sobre α -amilase (CI_{50} = 0,14 mg/mL), sugerindo que o composto imacalol seja o responsável por esta atividade (LOIZZO *et al.*, 2007)

(d) os extratos brutos acetônicos das plantas marinhas brasileiras *Spatoglossum schroederi* (C. Agardh) Katzing (CI_{50} = 0,58 mg/mL) e *Caulerpa racemosa* (Forsskäl) J. Agardh (CI_{50} = 0,09 mg/mL) também inibiram a α -amilase (TEIXEIRA *et al.*, 2007), dentre outros vários exemplos de inibidores de amilases descritos na literatura.

2.3 APLICABILIDADE DOS INIBIDORES DE AMILASES

Devido à ampla distribuição das amilases nos seres vivos e ao importante papel fisiológico que exercem nestes organismos, os inibidores destas enzimas são especulados para aplicações clínicas, agropecuárias e biotecnológicas.

2.3.1. Tratamento do Diabetes mellitus e da obesidade

O Diabetes mellitus (DM) é uma desordem do metabolismo de carboidratos caracterizada por hiperglicemia. É uma doença clinicamente complexa: sua natureza crônica envolve uma diminuição substancial na qualidade e na expectativa de vida, visto que a doença está associada com muitas complicações sérias incluindo falência renal, cegueira e doença cardiovascular (AYDIN, 2007).

A prevalência de diabetes aumenta com a idade (PASSOS *et al.*, 2005) e tem crescido rapidamente (AYDIN, 2007), sendo previsto um aumento de 35% entre 1995 e 2025 em pessoas de 20 anos ou mais (PASSOS *et al.*, 2005). No ano 2000,

a estimativa foi de 170 milhões de pacientes acometidos por DM no mundo (AYDIN, 2007).

Apesar da atividade da α -amilase não estar diretamente envolvida na etiologia do DM, estudos recentes tentaram avaliar a fisiopatologia desta doença investigando a composição da saliva em pacientes diabéticos e em animais experimentais. Não houve conclusão consensual, havendo relatos de concentrações de ASH em pacientes diabéticos mais elevadas, menores ou as mesmas (AYDIN, 2007) que nos grupos controle.

Apesar da discordância literária quanto à razão entre a quantidade de ASH em indivíduos diabéticos e saudáveis, um outro ponto de relação entre o DM e as amilases tem sido discutido. Esse ponto refere-se à utilização de inibidores específicos de enzimas digestivas como alternativa para o tratamento desta doença, por interromperem rapidamente a absorção de nutrientes (MURAI *et al.*, 2002).

Como exemplo disso, vários trabalhos podem ser citados. Estudos mostram que os inibidores de amilases retardam a digestão e a absorção geral de amido (LAYER *et al.*, 1986a), além de aumentarem a tolerância à glicose em pacientes diabéticos (LOIZZO *et al.*, 2007), reduzirem os picos de glicose pós-prandiais, induzindo à tolerância a carboidratos, e aumentarem a sensação de saciedade, prolongando o tempo de esvaziamento gástrico (SEO *et al.*, 2005; PAYAN, 2004; MURAI *et al.*, 2002; GERRARD *et al.*, 2000; LAYER *et al.*, 1986a; 1986b).

Para pacientes com DM não dependente de insulina (DM tipo II) um inibidor da amilase poderia retardar a absorção de carboidratos, de forma que esta coincida com a secreção retardada da insulina endógena. Assim, preveniria níveis posprandiais de glicose excessivos (LAYER *et al.*, 1986b).

Em pacientes com DM dependente de insulina (DM tipo I), o retardo posprandial da digestão e da absorção de carboidratos poderia reduzir a quantidade de insulina exógena, hoje único tratamento efetivo disponível, necessário para controlar o pico de hiperglicemia posprandial (LAYER *et al.*, 1986b).

Inibidores de amilases também poderiam ser utilizados no tratamento da obesidade (GERRARD *et al.*, 2000). Essas substâncias diminuem os níveis posprandiais de insulina e aumentam a sensação de saciedade, por meio do retardamento do esvaziamento gástrico, além de reduzirem importantes fatores adipogênicos (LAYER *et al.*, 1986a).

Os trabalhos citados, dentre outros descritos na literatura, mostram o potencial clínico da utilização de inibidores de amilases em pacientes com diabetes ou obesos. Assim, com o objetivo de se obter um melhor controle destes distúrbios, esforços extensivos são feitos desde a década passada para encontrar um inibidor de amilase clinicamente efetivo (LOIZZO *et al.*, 2007).

2.3.2 Aplicações agronômicas

O amido constitui a dieta de insetos-praga de culturas extensivas, fato que os tornam altamente dependentes de amilases para sua sobrevivência (SIVAKUMAR *et al.*, 2006). Os inibidores de alfa-amilase tornaram-se, portanto, agentes promissores no controle destes insetos (SIVAKUMAR *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2006;) e de micróbios-praga fitófagos (WANG *et al.*, 2006).

Esses inibidores poderiam ser utilizados na biotecnologia moderna de plantas, com o desenvolvimento de transgênicos geneticamente resistentes a brocas, capazes de expressar heterologicamente inibidores específicos para enzimas de patógenos. Isso protegeria as culturas contra insetos predadores (SIVAKUMAR *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2006; TITARENKO & CHRISPEELS, 2000).

Apesar de diferentes formas de α -amilases serem encontradas em uma única espécie de inseto para garantir a eficiência de seu processo digestivo (SIVAKUMAR *et al.*, 2006), alguns testes *in vitro* e *in vivo* confirmam o potencial crescente de inibidores de amilases para estes fins. O gene que codifica o inibidor α -AI-1 de *P. vulgaris* foi transferido a outros dois legumes, *Pisum sativum* L. (ervilha comum) e *Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & H. Ohashi (feijão azuki). As sementes das plantas transgênicas mostraram resistência completa às brocas *Bruchus pisorum* (broca da ervilha) (KLUH *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2001; TITARENKO & CHRISPEELS, 2000), *Callosobruchus chinensis* e *Callosobruchus maculatus* (brocas do feijão azuki) (KLUH *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2001; TITARENKO & CHRISPEELS, 2000). *In vitro*, os inibidores isolados das sementes transformadas de feijão azuki mostraram atividade sobre as amilases de *C. chinensis*, *Z. subfasciatus*, *Tenebrio molitor* e *Tribolium confusum* (YAMADA *et al.*, 2005).

Metabólitos secundários vegetais com atividade inibitória sobre α -amilases também poderiam ser utilizados para modificar geneticamente os organismos, mediante a utilização da engenharia de metabolismo. A partir da identificação dos genes e das rotas metabólicas envolvidas com a produção desses compostos, elas poderiam ser manipuladas visando aumentar a produção do metabólito de interesse ou a expressão heteróloga desses compostos em organismos geneticamente modificados (AHARONI *et al.*, 2005).

Além da aplicação dos inibidores em transgenia e em engenharia metabólica, eles ainda poderiam ser utilizados para controlar a atividade de α -amilases vegetais endógenas presentes na farinha de grãos pré-colhidos, ajudando a assegurar sua boa qualidade (SORENSEN *et al.*, 2004).

2.3.3 Outras aplicações

A ASH tem ao menos mais duas funções biológicas distintas na cavidade oral. Primeiramente, diversas linhas de evidência indicam que a ASH se liga ao esmalte dentário ou à hidroxiapatita, podendo exercer papel na formação da placa dentária. Em segundo lugar, a ASH em solução se liga com alta afinidade a *Streptococcus* que colonizam a cavidade oral. A amilase ligada à bactéria conserva a sua atividade e é capaz de hidrolisar o amido, formando produtos que podem ser usados como fonte de alimento pela bactéria e metabolizados em ácido láctico. A produção ácida localizada pode conduzir à dissolução do esmalte do dente, uma etapa crítica na progressão da cárie dentária (ZAJÁ CZ *et al.*, 2007; KANDRA *et al.*, 2005; KANDRA *et al.*, 2004). Desta forma, inibidores das amilases também têm aplicabilidade como potenciais ferramentas no controle de cáries (KANDRA *et al.*, 2004; GYÉMÁNT *et al.*, 2003; RAMASUBBU *et al.*, 2003).

Ainda, devido à relação das amilases com o diagnóstico de doenças do pâncreas (como pancreatites e outros tipos de hiperamilasemia) e de doenças das glândulas salivares, esta enzima ou mesmo seus inibidores também são de interesse nesta área. Eles poderiam ser utilizados no diagnóstico destes distúrbios (KANDRA *et al.*, 2004; YOON & ROBYT, 2003; TURCOTTE *et al.*, 1994) e na investigação dos

mecanismos fisiopatológicos e das conseqüências que ocorrem durante a má-absorção de carboidratos (LAYER, 1986b). Outra aplicação para os inibidores de amilase seria no auxílio aos testes de resistência ao amido nos animais e em humanos (YOON & ROBYT, 2003).

Outro alvo é a aplicação de inibidores de amilases como agentes antivirais, pela sua interferência na formação de glicoproteínas essenciais requeridas para a sobrevivência, replicação ou infectividade do conjunto viral. Desta forma, os inibidores de amilases seriam úteis no tratamento de doenças virais e de cânceres relacionados à expressão de glicoproteínas (SEO *et al.*, 2005).

As amilases e seus inibidores exercem um papel importante nos aspectos nutricionais e toxicológicos de alimentos (IULEK *et al.*, 2000). A expressão gênica destas enzimas está relacionada com a germinação de sementes (NIELSEN *et al.*, 2004) e a presença de inibidores de amilases neste órgão está relacionada ao controle de sua germinação. Sementes comumente utilizadas na alimentação humana, como o feijão (GIBBS & ALLI, 1998) e o trigo (PAYAN, 2004), possuem inibidores de amilases, que podem exercer um papel antinutricional ou até mesmo tóxico quando ingeridos.

Além da importância fisiológica *in vivo*, as amilases e seus inibidores também têm usos industriais importantes, como, por exemplo, no processamento de alimentos e bebidas, na produção industrial de maltodextrinas, na modificação do amido em papéis, tecidos e outros produtos comerciais (SORENSEN *et al.*, 2004; YOON & ROBYT, 2003).

2.4 MÉTODOS UTILIZADOS NA VERIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DE α -AMILASES

Diferentes métodos eletroforéticos têm sido testados para a visualização, isolamento e caracterização de inibidores de enzimas. Muitos deles incluem imunofixação após eletroforese, o que requer anticorpos específicos que, em alguns casos, levam a falsos resultados devido a reação cruzada com outras moléculas relacionadas (VALENCIA-JIMÉNEZ *et al.*, 2007).

Além da imunofixação, técnicas zimográficas também são utilizadas. Esses métodos consistem na separação de inibidores proteínicos em um gel nativo de poliacrilamida 1% contendo o substrato da enzima (amido, por exemplo) copolimerizado no gel. Após a eletroforese, o gel é enxaguado e incubado com a solução da amilase alvo para permitir que o substrato seja digerido pela enzima. O substrato permanece não-digerido pela enzima nas áreas do gel onde as moléculas inibidoras estão situadas. Essas áreas podem ser reveladas usando uma solução de iodeto de potássio / iodo, que produz bandas azuis escuras quando em contato com o amido não digerido (VALENCIA-GIMENEZ *et al.*, 2007; GIRI & KACHOLE, 1998).

Zimografia reversa também pode ser utilizada. Neste método, após a corrida dos inibidores, o gel é incubado com uma solução de amido, enxaguado, mantido em contato com a solução da enzima alvo e posteriormente incubado em solução de iodeto de potássio / iodo. A utilização de gradiente de pH no gel de corrida permite uma melhor resolução e separação dos inibidores de amilases, favorecendo a detecção de inibidores com pequenas diferenças em seus pontos isoelétricos (VALENCIA-JIMÉNEZ *et al.*, 2007; SIVAKUMAR *et al.*, 2006; TITARENKO & CHRISPEELS, 2000).

Além da eletroforese para a identificação e caracterização de inibidores, vários métodos quantitativos também são usados. A maioria deles envolve a quantificação de novos grupos reduzidos formados a partir da hidrólise do amido (MURALIKRISHNA & NIRMALA, 2005).

Nesses métodos quantitativos, o potencial inibidor pode ou não ser pré-incubado com a amilase por determinado período. Posteriormente, a amilase é colocada em contato com um substrato por determinado tempo. Após este tempo de incubação com o substrato, adiciona-se um reagente cromogênico e o doseamento dos grupos reduzidos liberados pode ser realizado pela leitura direta da absorbância da solução em comprimento de onda específico.

Como substrato de α -amilases em ensaios de detecção da atividade dessas enzimas podem-se utilizar substâncias de cadeia longa como o amido (LOIZZO *et al.*, 2007; AL-DABBAS *et al.*, 2006; SIVAKUMAR *et al.*, 2006; DAYLER *et al.*, 2005; KLUH *et al.*, 2005; YAMADA *et al.*, 2005; REKHA *et al.*, 2004; GIBBS & ALLI, 1998) ou a amilose (ZAJÁ CZ *et al.*, 2007; YOON & ROBYT, 2003). Após a reação de hidrólise do substrato, utiliza-se um reagente cromogênico para a quantificação dos

grupos reduzidos liberados, como o cobre alcalino, ferrocianato alcalino ou o 3,5-dinitrossalicilato alcalino (MURALIKRISHNA & NIRMALA, 2005), também conhecido como solução de ácido dinitrossalicílico reativo (ADNS).

O cobre e o ferrocianato fornecem valores de equimolares de redução equivalentes aos valores de equimolares de redução fornecidos pelas extremidades reduzidas de maltooligossacarídeos (MURALIKRISHNA & NIRMALA, 2005).

No entanto, o ADNS é mais comumente usado como reagente de cor (LOIZZO *et al.*, 2007; SIVAKUMAR *et al.*, 2006; DAYLER *et al.*, 2005; YAMADA *et al.*, 2005; GIBBS & ALLI, 1998;) devido à sua confiabilidade e simplicidade (MURALIKRISHNA & NIRMALA, 2005).

Outro reagente cromogênico utilizado em métodos semi-quantitativos é a solução de iodeto / iodo (KI/I_2) (AL-DABBAS *et al.*, 2006; REKHA *et al.*, 2004). Este método visa medir a diminuição da cor azul produzida quando o amido se complexa com o iodeto (MURALIKRISHNA & NIRMALA, 2005).

Substratos cromogênicos de cadeia curta como o CNP-G₃ (AL-DABBAS *et al.*, 2006), o GalG₂-CNP (ZAJÁ CZ *et al.*, 2007; KANDRA *et al.*, 2005; KANDRA *et al.*, 2004; GYÉMÁNT *et al.*, 2003) e o p-NPM (HEYL *et al.*, 2005), que são derivados p-nitrofenil de oligossacarídeos, foram desenvolvidos e também podem ser utilizados para a determinação da atividade de amilases. Apesar desses substratos serem bastante específicos e precisos, eles não são muito usados como análises de rotina devido ao seu alto custo. Nesses métodos, o reagente de cor é covalentemente ligado ao amido ou a oligossacarídeos para fornecer um composto insolúvel. Quando a amilase age sobre estes substratos, fragmentos contendo o reagente de cor são solubilizados e o substrato insolúvel remanescente é removido por centrifugação. Então, a absorbância do sobrenadante é tomada como a medida da atividade da amilase (MURALIKRISHNA & NIRMALA, 2005).

Estudos mostram que a utilização de substratos oligossacarídicos diferentes leva a resultados de atividade inibitória diferentes, sendo que quando se utiliza substratos de cadeia curta como o CNP-G₃ ou GalG₂-CNP a atividade inibitória pode ser maior que quando se utiliza substratos de cadeia longa, como o amido (ZAJÁ CZ *et al.*, 2007; AL-DABBAS *et al.*, 2006).

2.5 RAZÕES PARA A BUSCA DE NOVOS INIBIDORES DE AMILASES

Clinicamente, diversas substâncias são capazes de reduzir os níveis posprandiais de glicose. Contudo, várias delas exibem características que inviabilizam sua real utilização clínica.

Os inibidores da α -glucosidase intestinal por exemplo, como a acarbose, o miglitol e a voglibose (MURAI *et al.*, 2002), diminuem efetivamente e de forma dose-dependente a absorção dos carboidratos da dieta (LAYER *et al.*, 1986a), com redução nos níveis posprandiais de glicose e na resposta insulinêmica, tendo também efeito benéfico na resistência à insulina. Entretanto, a forte ação inibitória provoca acúmulo excessivo de polímeros de carboidratos de cadeia curta, como os dissacarídeos, e da própria acarbose no intestino distal (WOLEVER *et al.*, 1995), resultando na alteração dos fluidos osmóticos e em distúrbios intestinais que podem reduzir o tempo de contato entre a mucosa e os nutrientes existentes no intestino. Diarréias e outros efeitos colaterais, como flatulência e cólica abdominal estão associados ao uso destes inibidores (MURAI *et al.*, 2002), além do desenvolvimento de tumores renais, danos hepáticos graves e hepatite aguda (CHARPENTIER *et al.*, 2000).

Diferentemente de inibidores de dissacaridases, os inibidores da α -amilase não provocam o acúmulo de dissacarídeos, já que a microbiota colônica é capaz de metabolizar grandes quantidades de amido não absorvidos presentes no lúmen intestinal sem produzir diarréia. Desta forma, a má-absorção de amido induzida por inibidor da α -amilase não aumenta a carga osmótica, não causando os efeitos adversos associados a este fato (LAYER *et al.*, 1986a).

Apesar de haver muitos inibidores protéicos de amilases descritos e bem caracterizados, sua potencial aplicação farmacológica como auxiliar no tratamento de diabetes, obesidade, cáries dentárias ou outros distúrbios pode ser questionada. A dúvida é se as proteases, abundantemente presentes no trato gastrointestinal humano, poderiam clivar as ligações peptídicas destes compostos protéicos inibidores de amilases, levando à perda de sua atividade antes que sua ação terapêutica ocorresse, como acontece em insetos (SILVA *et al.*, 2001; GIRI & KACHOLE, 1998; ISHIMOTO & CHRISPEELS, 1996).

Quanto à efetividade do uso de inibidores protéicos na agronomia, a literatura relata a possibilidade de desenvolvimento de resistência por alguns insetos a inibidores protéicos de amilases. Eles podem se adaptar à ingestão de proteínas tóxicas expressas em plantas pela sua detoxificação por proteólise (SILVA *et al.*, 2001; GIRI & KACHOLE, 1998; ISHIMOTO & CHRISPEELS, 1996;). Podem ainda promover um aumento da quantidade de enzimas secretadas para compensar a presença de um inibidor, ou induzir enzimas que são insensíveis às proteínas inibidoras (SILVA *et al.*, 2001). Por isso, há poucos relatos de controle bem sucedido de insetos usando plantas transgênicas sob condições de campo (SILVA *et al.*, 2001).

Então, considerando-se a efetividade duvidosa de inibidores protéicos disponíveis e o potencial dos metabólitos secundários de plantas ativos sobre diversos modelos biológicos, bem como a perspectiva da utilização de inibidores de amilases nas várias áreas de aplicação, decidiu-se pela prospecção de inibidores de amilases a partir de extratos de plantas do bioma Cerrado.

Outro fato que corrobora para a busca de inibidores em plantas é que todos os vegetais possuem um determinado grau de resistência aos insetos (TITARENKO & CHRISPEELS, 2000). Segundo Payan (2004), essa resistência pode ser devido à produção de substâncias que impedem a ação das enzimas intestinais dessas pragas. Essas substâncias poderiam constituir metabólitos secundários da planta, já que as substâncias químicas resultantes do metabolismo secundário das plantas com atividade inibitória sobre enzimas são importantes em muitos de seus papéis de defesa (REKHA *et al.*, 2004).

2.6 O BIOMA CERRADO

2.6.1 Características gerais

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro (KLINK & MACHADO, 2005). Estima-se que a área nuclear do Cerrado tenha aproximadamente 1,5 milhão de km²

(COUTINHO, 2008; PIVELLO, 2008). Ele ocorre desde o Amapá e Roraima até o Paraná, e de Pernambuco, Alagoas e Sergipe até o Pará e o Amazonas (Figura 8), concentrando-se na região do Planalto Central (COUTINHO, 2008).

O clima típico do Cerrado é quente, semi-úmido e notadamente sazonal, com verão chuvoso e inverno seco (PIVELLO, 2008). Os solos são ricos em íons alumínio, ferro e manganês, o que os tornam bastante ácidos, com pH que pode variar de menos de 4 a pouco mais de 5 (COUTINHO, 2008).

Sobre esses solos, podem-se distinguir de modo geral dois estratos na vegetação: o lenhoso, constituído por árvores e arbustos, e o herbáceo, formado por ervas e subarbustos (PIVELLO, 2008).

As raízes das espécies do estrato lenhoso do Cerrado são normalmente pivotantes e podem atingir até 20 m de profundidade, alcançando camadas de solo permanentemente úmidas mesmo no período de seca, o que não torna a água um fator limitante para essa vegetação (COUTINHO, 2008).

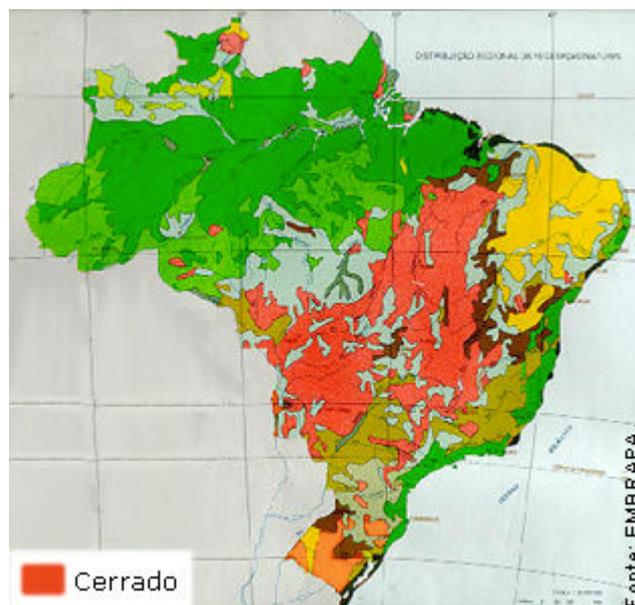


FIGURA 8 – Área de distribuição do Cerrado no Brasil. FONTE: http://eco.ib.usp.br/cerrado/aspectos_area.htm.

Já as espécies do estrato herbáceo normalmente são perenes e não-umbrófilas. Na época de seca, os seus ramos aéreos secam e morrem, formando toneladas de palha por hectare. Esse “combustível” se inflama facilmente, favorecendo a ocorrência e a propagação de queimadas, naturais (causadas por raios, por exemplo) ou antrópicas (COUTINHO, 2008). Mas grande parte das

espécies herbáceas possui órgãos subterrâneos de resistência, como bulbos, que lhes garantem sobreviver à seca e ao fogo, rebrotando posteriormente (PIVELO, 2008).

A vegetação típica do Cerrado (Figura 9) possui troncos tortuosos, de baixo porte, ramos retorcidos, cascas espessas e folhas grossas, devido a fatores edáficos (BRASIL, 2008) ou com função adaptativa às queimadas periódicas (PIVELO, 2008).

As diferentes características de fertilidade de solos e de queimadas locais (frequência, época e intensidade), aliadas à irregularidade dos regimes climáticos e à ação humana fazem com que a vegetação do Cerrado possua várias fisionomias em sua extensão (COUTINHO, 2008). Assim, há uma grande variação no balanço entre a quantidade de árvores e de espécies herbáceas, formando um gradiente estrutural que vai desde o cerrado completamente aberto - o campo limpo, até formas relativamente densas e florestais, como os cerradões, passando por formas intermediárias como os campos sujos, os campos cerrados e o cerrado *stricto sensu* (COUTINHO, 2008; PIVELLO, 2008).



FIGURA 9 – Vegetação típica do Cerrado. FONTE: <http://www.unb.br/ib/zoo/grcolli/jalapao/images/Cerrado.jpg>

A grande variabilidade de habitat nos diversos ecossistemas do Cerrado suporta uma enorme diversidade de espécies de plantas e animais (PIVELO, 2008), constituindo uma riquíssima flora, com mais de 10000 espécies de plantas e com 4400 endêmicas (BRASIL, 2008). Há registros na literatura da ocorrência de cerca de 300 espécies por hectare, várias das quais são utilizadas tradicionalmente no tratamento de doenças (MESQUITA *et al.*, 2007; NAPOLITANO *et al.*, 2005; ALVES

et al., 2000). Essas espécies, por serem submetidas a diferentes características climáticas, edáficas, de provimento de água e regimes de queimadas, reagem morfológica e bioquimicamente a estes estímulos por meio da produção de metabólitos secundários de sobrevivência.

Entretanto, a diversidade da flora do Cerrado tem sido pouco estudada para avaliar a eficácia e os efeitos terapêuticos dos seus extratos brutos e compostos isolados (MESQUITA *et al.*, 2005; NAPOLITANO *et al.*, 2005; ESPÍNDOLA *et al.*, 2004), apesar de se mostrar uma fonte promissora de novas moléculas com potencial farmacológico e biotecnológico.

Diante de todo este potencial químico-terapêutico e biotecnológico oferecido pelas plantas, foi criado pelo Laboratório de Farmacognosia da Universidade de Brasília um banco de extratos de plantas do bioma Cerrado (Processo nº 02000.002272/2006-73 / Conselho de Gestão do Patrimônio Genético do Ministério do Meio Ambiente). Plantas são coletadas, extratos vegetais produzidos e testados sobre diversos modelos de atividade biológica, inclusive sobre α -amilases.

2.6.2 *Matayba guianensis* Aublet

Uma das espécies do Cerrado de destaque neste trabalho é a *Matayba guianensis* Aublet. Essa espécie, cuja madeira é utilizada em construção (MACEDO, 1995), é comum no Cerrado (MACEDO, 1995; GUARIN NETO, 1994) e no Pantanal, estando adaptada a diferentes ambientes e apresentando forte variação fenotípica (GUARIN NETO, 1994). A Figura 10 mostra a distribuição geográfica desta planta, a partir de relatos exatos dos locais onde foi encontrada.

M. guianensis (Figura 11), popularmente conhecida como camboatá-branco (MACEDO, 1995) ou assa-leitão (GUARIN NETO, 1994), ocorre como arbustos a árvores (MACEDO, 1995; GUARIN NETO, 1994) ramificadas de até 8 a 18 m de altura (GUARIN NETO, 1994).

Segundo Guarin Neto (1994), ela apresenta córtex rugoso. Suas folhas são imparipenadas (MACEDO, 1995), pecioladas e compostas, constituídas geralmente por seis pares de folíolos de 5-15 cm de comprimento por 3-6 cm de largura, elípticos

ou oblongo-lanceolados, subcoriáceos e normalmente glabros. Suas inflorescências, axilares, possuem cerca de 2 cm de comprimento e são bracteadas. As flores, de cerca de 4 mm de comprimento, são alvas e possuem cálice de cinco sépalas denteado-lobadas e corola de cinco pétalas obovadas. Seus frutos são capsulares, verrucosos e geralmente trígonos, de até 2,5 cm de comprimento, enquanto suas sementes são elipsóides e negras (GUARIN NETO, 1994).

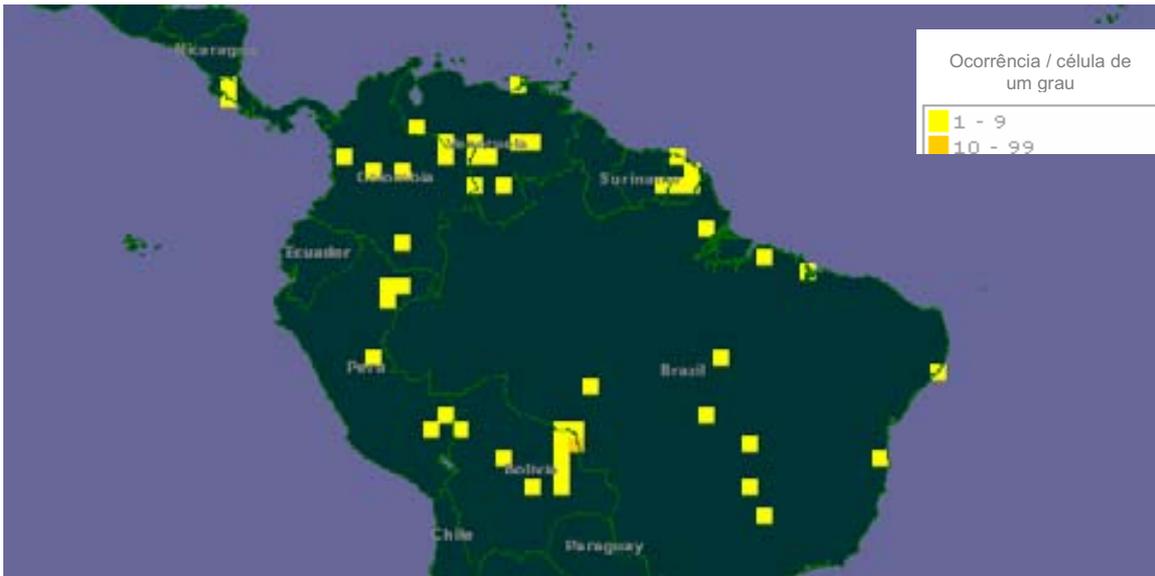


FIGURA 10 – Distribuição da espécie *Matayba guianensis*. Os pontos foram estabelecidos a partir dos relatos de ocorrência dessa espécie acompanhados da localização geográfica exata do local onde foi encontrada. FONTE: <http://data.gbif.org/species/15837209>.



FIGURA 11 – Exemplar de *M. guianensis*. FONTE: DE PAULA, J.E. (2008).

Um único relato fitoquímico foi encontrado na literatura para a espécie *M. guianensis* (Sapindaceae): quatro éteres diglicosídicos, denominados matayosídeos A a D, foram isolados do extrato hexânico da casca de sua raiz (Figura 12) (MESQUITA *et al.*, 2005). Essas substâncias (MESQUITA *et al.*, 2005), bem como o extrato bruto de onde foram extraídas, apresentaram atividade biológica *in vitro* sobre *Plasmodium falciparum* (MESQUITA *et al.*, 2005; 2007).

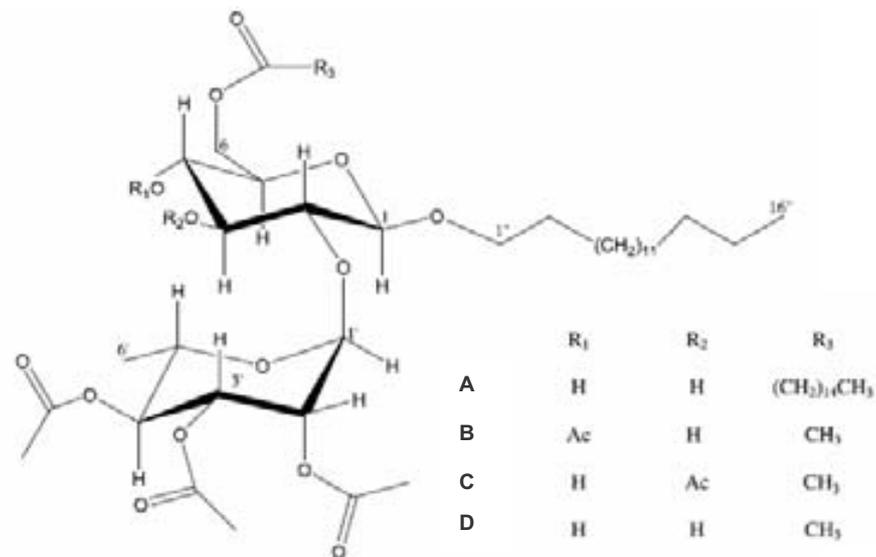


FIGURA 12 – Quatro éteres glicosídicos isolados do extrato hexânico da casca da raiz de *M. guianensis*. FONTE: MESQUITA *et al.*, 2005.

Também são poucos os relatos fitoquímicos e farmacológicos para outras espécies desse mesmo gênero. De Souza e colaboradores (2007) revelaram a atividade antinociceptiva em camundongos dos extratos metanólico e hidroalcoólico e das frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e butanólica das raízes de *Matayba elaeagnoides* Radlk. Da fração hexânica da casca dessa espécie foram isolados os triterpenos lupeol, alfa-amirina, beta-amirina e beta-sitosterol, enquanto a escopoletina, umbeliferona, 3-beta-O-D-glicopiranosil-sitosterol e betulina foram isolados da sua fração clorofórmica. Cleomiscosina A foi isolada do caule *Matayba arborescens* (Aubl.) Radlk (ARISAWA *et al.*, 1984).

Compostos fenólicos, incluindo taninos, são comuns em espécies dessa família. Relatos da literatura mostram a presença desses compostos no extrato metanólico de folhas de *Paullinia pinnata* L. (JIMOH *et al.*, 2007), extrato etanólico e aquoso das flores de *Dimocarpus longan* Lour (HO *et al.*, 2007; RANGKADILOK *et al.*, 2007), extrato aquoso das sementes de *Paullinia cupana* Kunth (YAMAGUTI-SASAKI *et al.*, 2007; FUKUMASU *et al.*, 2006), extrato de acetato de etila do pericarpo de *Litchi chinensis* Sonn. (ZHAO *et al.*, 2007; SARNI-MANCHADO *et al.*, 2000), extrato aquoso das folhas de *Allophylus cominia* Sw. (RODRIGUEZ *et al.*, 2005), extrato metanólico das folhas de *Guioa crenata* Radlk. (MAGID *et al.*, 2005) e extrato etanólico da casca do caule de *Magonia pubescens* A.St.-Hil. (SILVA *et al.*, 2004), dentre outros.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ESTUDO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DE EXTRATOS VEGETAIS SOBRE AMILASES

3.1.1 Obtenção dos extratos brutos

O material vegetal foi coletado no bioma Cerrado dos arredores de Brasília / DF juntamente com o botânico Prof. Dr. José Elias de Paula e devidamente identificado. Exsicatas foram mantidas no Herbário (UB) / UnB. Os diferentes órgãos vegetais foram separados (casca e madeira do caule e da raiz, fruto, sementes, folhas e flores), dessecados e estabilizados a temperatura ambiente e pulverizados em moinho de facas. O pó do material vegetal foi submetido a extrações exaustivas por maceração, com solventes de diferentes polaridades (hexano, diclorometano, etanol e solução hidroalcoólica 90%). Após a maceração, seguiram-se a pré-filtração e a filtração do material, obtendo-se uma solução extrativa que foi concentrada em evaporador rotativo a 40 °C sob pressão reduzida e posteriormente dessecada em soprador sob temperatura controlada, fornecendo os diferentes extratos brutos (Figura 13).

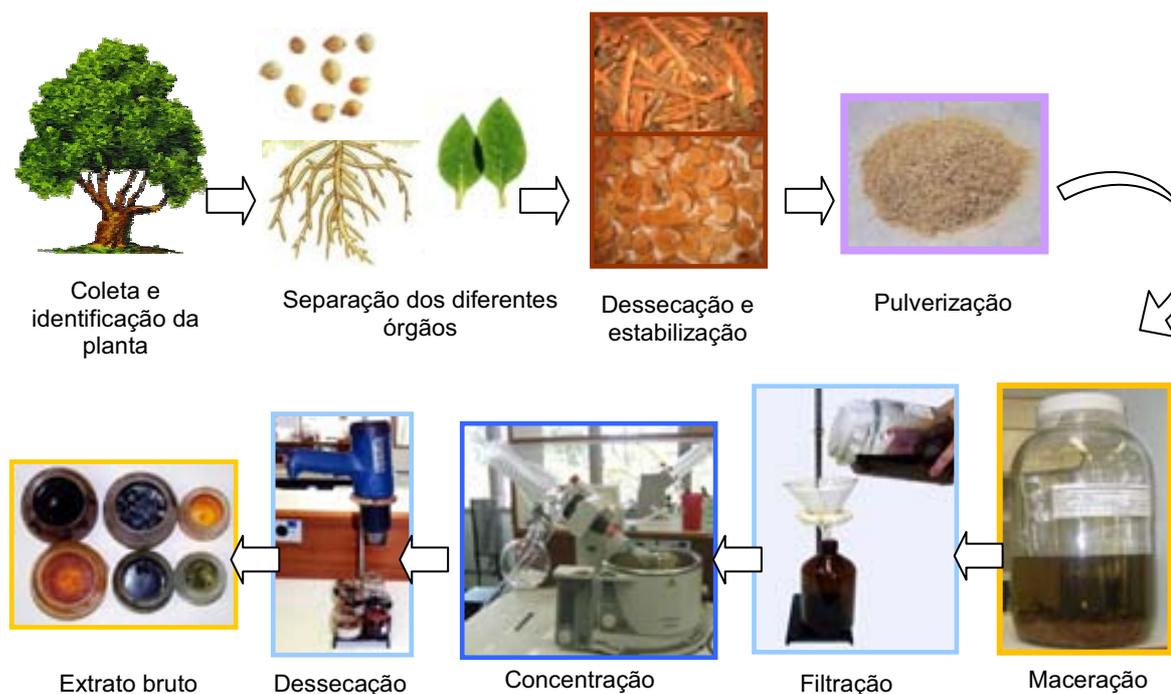


FIGURA 13 – Obtenção dos extratos brutos

3.1.2 Obtenção das enzimas

A ASH utilizada nos testes foi adquirida da Sigma Aldrich (amilase salivar humana tipo XIII-A, 10% proteína, 28,8 U/mg) e ressuspensa em tampão Tris 0,15 M pH 7.

Para a obtenção das amilases de *Z. subfasciatus* (AZS) e de *A. obtectus* (AAO), uma linhagem destes insetos foi mantida a 28 °C ($\pm 3^\circ$ C) e 80% ($\pm 5\%$) de umidade relativa. Larvas foram extraídas dos grãos de feijão comum aproximadamente 20 dias após a infestação, com o auxílio de lente de aumento e de pinças. As larvas extraídas foram homogenizadas com solução de NaCl 0,1 M em cadinho de porcelana. Para 1 g de larvas extraídas, utilizou-se 4 mL da solução de NaCl 0,1 M. A solução extrativa obtida foi então centrifugada a 13000 rpm por 20 min. A fase intermediária (extrato enzimático bruto) foi separada da superior (gorduras) e da inferior (restos de tecido de maior densidade), e este processo foi repetido 3 vezes. A solução obtida desta forma foi diluída a 74 U/mL, dividida em alíquotas de 60 μ L e armazenada a - 8 °C por até 50 dias.

Uma unidade de atividade da amilase (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 mg de maltose durante os 30 min de incubação da enzima com seu substrato a 37 °C no teste de verificação da atividade das amilases, na ausência de potenciais inibidores. Para o ajuste da atividade enzimática, foi construída uma curva padrão de “absorbância” versus “quantidade de maltose”.

3.1.3 Teste de inibição sobre α -amilases

A atividade inibitória dos extratos vegetais sobre a α -amilase foi avaliada por meio do método de complexação com ácido dinitrossalicílico (ADNS) (BERNFELD, 1955) (Figura 14), usando amido solúvel a 1% como substrato. Dois microlitros da enzima (a 74 U/mL) foram incubados por 3 min a 37 °C com 48 μ L de tampão de atividade suplementado com 10 mM de NaCl e 20 mM de CaCl₂. Os

extratos vegetais utilizados nos testes foram ressuspensos em dimetilsulfóxido (DMSO) para atingir a concentração almejada.



FIGURA 14 – Ensaio de inibição das amilases. Ti = teste de inibição; Bi = branco de inibição; Ce = controle da enzima; Be = branco da enzima; T = tampão de atividade; En = enzima α -amilase; Ex = extrato vegetal, ADNS = ácido dinitrossalicílico.

No teste de inibição sobre as enzimas de insetos, 5 μ L do extrato vegetal a 20 mg/mL foram pré-incubados por 30 min com a enzima, enquanto no teste de atividade sobre a amilase salivar humana foram utilizados 5 μ L do extrato vegetal a 2,5 mg/mL.

Após o tempo de pré-incubação, foram adicionados 50 μ L de uma solução de amido solúvel a 1% (Sigma) em tampão de atividade para iniciar a reação de quebra do amido pela amilase. Desta forma, a concentração final do inibidor no momento de sua possível atividade foi de 1 mg/mL sobre as enzimas de insetos e de 125 μ g/mL sobre a ASH.

Após o tempo de atividade de 30 min da enzima sobre o amido, a reação foi interrompida pela adição de 100 μ L de solução de ácido dinitrossalicílico (ADNS) reativo a 1% (1% de ADNS em NaOH 1M com 25% p/p de tartarato de sódio e potássio). As amostras foram então aquecidas em banho maria no ponto de ebulição da água por 5 min. A temperatura de ebulição da água auxilia na interrupção da atividade da α -amilase e catalisa a reação entre o ADNS (amarelo intenso) e os grupos reduzidos liberados a partir da ação das amilases sobre o amido. O complexo

formado entre o ADNS e esses produtos possui uma cor marrom intensa, diferente da cor amarela vivaz atribuída ao ADNS sozinho. Após resfriamento em gelo por 5 min, foi adicionado 1 mL de água à amostra e a absorbância do complexo formado foi lida a 550 nm. Os testes foram feitos em triplicata e, caso o desvio-padrão da triplicata do teste de inibição fosse maior que 5%, os testes eram repetidos até que o desvio padrão encontrado entre as três amostras fosse menor ou igual a 5%.

O cálculo da porcentagem de inibição foi feito da seguinte forma:

$$I = 100 - \frac{(T_i - B_i) \times 100}{(C_e - B_e)}$$

onde:

I = porcentagem de inibição

T_i = média aritmética da absorbância lida no teste de inibição

B_i = média aritmética da absorbância lida no branco de inibição

C_e = média aritmética da absorbância lida no controle da enzima

B_e = média aritmética da absorbância lida no branco da enzima

Em T_i , o extrato é pré-incubado com a enzima em solução tampão por 30 min antes da adição da solução de amido; em B_i , o extrato é adicionado sozinho à solução tampão, ou seja, na ausência da enzima, para se verificar a possível presença de amilases endógenas da planta no extrato vegetal testado e a interferência da cor do extrato vegetal na leitura do resultado do teste; em C_e a enzima é adicionada sozinha ao tampão, na ausência do extrato, para se verificar a atividade máxima da enzima; em B_e , também denominado “controle de cor”, utiliza-se o tampão sozinho, ou seja, na ausência da enzima e do extrato, para se verificar possíveis interferências da cor de reagentes utilizados no teste na leitura dos resultados obtidos.

Todos os ensaios (T_i , B_i , C_e e B_e) foram feitos em triplicata e foi utilizada a média aritmética da triplicata para o cálculo da porcentagem de inibição, que foi expressa como “porcentagem média de inibição” \pm “desvio padrão dos resultados encontrados para T_i ”.

Os testes foram realizados a 37 °C devido à existência de relatos de que esta é uma boa temperatura para a atividade das enzimas de *Z. subfasciatus* (SIVAKUMAR *et al.*, 2006).

3.1.4 Seleção do tampão de atividade

O tampão utilizado em cada teste foi selecionado verificando-se o pH ótimo de cada enzima. Assim, a atividade da enzima foi avaliada em conformidade com o método descrito acima para “Ce”, em pH de 4 a 9. Para a obtenção dos tampões de pH 4, 5 e 6 foi utilizado ácido succínico 0,15 M; para obtenção dos tampões de pH 7, 8 e 9 foi utilizado Tris 0,15 M. Os pHs foram ajustados utilizando-se HCl ou NaOH e todos os tampões utilizados foram suplementados com 10 mM de NaCl e 20 mM de CaCl₂, já que, segundo Nakatani e colaboradores (1996) e Gibbs & Alli (1998), íons cloreto estimulam a atividade amilolítica das amilases e o cálcio aumenta a sua taxa de ligação ao substrato. Dessa forma, obteve-se para cada enzima a respectiva curva de “pH” *versus* “atividade”, a partir da qual foi determinado o valor inteiro de pH que levou à melhor atividade de cada enzima (pH ótimo).

3.1.5 Concentração dos extratos vegetais capaz de inibir 50% da atividade total da AZS, AAO e ASH (CI₅₀)

Para o cálculo da concentração do extrato capaz de inibir 50% da atividade da total enzima, foi feito o mesmo teste de verificação da atividade das amilases descrito, testando-se ao menos 7 concentrações diferentes do extrato vegetal que variaram de 1000 µg/mL a 15,625 µg/mL. Os dados encontrados foram utilizados para a confecção de um gráfico “concentração do extrato” *versus* “porcentagem de inibição”. Os pontos obtidos foram submetidos a regressão não-linear utilizando-se o software MS-Excel®, de forma a se estabelecer a equação da curva determinada por estes pontos e a se calcular o valor da concentração do extrato capaz de provocar a inibição de 50 % da atividade da enzima.

3.2 PRIMEIRA VIA DE PURIFICAÇÃO

3.2.1 Fracionamento em coluna cromatográfica aberta de sílica gel G60

Uma coluna de vidro de 4,1 cm de diâmetro foi empacotada com 15 g de sílica gel suspensos em hexano. Paralelamente, 1 g do extrato etanólico da casca da raiz de *M. guianensis* foi homogenizado com 5 g de sílica gel em um cadinho de porcelana e a mistura foi depositada a seco no topo da coluna empacotada com sílica.

A primeira fase móvel a arrastar as substâncias vegetais por meio da matriz de sílica foi o hexano (4 L). A fase hexânica foi coletada e concentrada até a total evaporação do solvente. Após o recolhimento da fase hexânica, 4 L de diclorometano foram usados como fase móvel. A fase diclorometânica foi coletada e concentrada até a total evaporação do solvente e acetato de etila foi utilizado como solvente de arraste (4 L). A fração acetato de etila foi recolhida e concentrada até a total evaporação do solvente. Metanol foi o último solvente utilizado como fase móvel (700 mL). A fase metanólica foi coletada e concentrada até a total evaporação do solvente.

O fluxo de coleta das frações foi livre e o arraste de substâncias foi monitorado por cromatografia em camada delgada (CCD), usando-se gradiente de hexano:clorofórmio como eluente e luz ultravioleta e vanilina sulfúrica como reveladores.

Após a secagem das frações, elas foram ressuspensas a 20 mg/mL e testadas sobre AZS (concentração final de teste 1 mg/mL).

3.3 SEGUNDA VIA DE PURIFICAÇÃO

3.3.1 Primeira cromatografia em coluna aberta de sephadex LH20

Uma coluna cromatográfica de vidro de 2,8 cm de diâmetro foi empacotada com 50 g de sephadex LH20 embebidos em metanol. Após o empacotamento da coluna, 3 g do extrato etanólico da casca da raiz de *M. guianensis* foram ressuspensos em 10 mL de metanol e adicionados na coluna empacotada. Metanol foi usado como fase móvel e coletaram-se frações de 5 mL, com fluxo de 1 gota a cada 3 segundos. Posteriormente, acetona:água (8:2) e água pura foram sucessivamente utilizados como eluentes da coluna, sob o mesmo fluxo controlado. O conteúdo das frações coletadas foi monitorado por CCD, utilizando-se como eluente um gradiente de butanol:ácido acético:água e como reveladores luz ultravioleta e vanilina sulfúrica. Após reunião das frações, os grupos obtidos foram secos até a total evaporação do solvente e testados quanto à sua atividade inibitória sobre AZS (concentração final 1 mg/mL).

3.3.2 Segunda cromatografia em coluna aberta de sephadex LH20

Uma coluna cromatográfica de vidro de 2,8 cm de diâmetro foi empacotada com 50 g de sephadex LH20 embebidos em metanol. Após o empacotamento da coluna, 700 mg de amostra (obtidos pela reunião dos grupos ativos sobre AZS purificados na etapa anterior) foram ressuspensos em 3 mL de metanol e adicionados no topo da coluna. Metanol foi usado como fase móvel e coletaram-se frações de aproximadamente 8 ml, com o fluxo de coleta controlado a 1 gota a cada 3 segundos. O conteúdo das frações coletadas foi monitorado por CCD, utilizando-se como eluente um gradiente de butanol:ácido acético:água e como reveladores luz ultravioleta e vanilina sulfúrica. Após reunião das frações, os grupos obtidos foram

secos até a total evaporação do solvente e testados quanto à sua atividade inibitória sobre AZS (concentração final 1 mg/mL).

3.4 TERCEIRA VIA DE PURIFICAÇÃO

3.4.1 Fracionamento líquido-líquido

Quatro gramas do extrato etanólico da casca da raiz de *M. guianensis* foram ressuspensos em 100 ml de metanol e a mistura obtida foi filtrada em papel de filtro. O filtrado metanólico resultante foi colocado em um funil de separação, onde também foram adicionados 100 mL de hexano. Após a dispersão dos líquidos e a separação das duas fases da mistura por decantação, a fase hexânica, levemente amarelada, foi recolhida e concentrada até a completa eliminação do solvente.

À fase metanólica que permaneceu no funil de separação, foram adicionados 100 mL de diclorometano. Após a dispersão, foram adicionados 6 mL de água para otimizar a separação das fases. A fase diclorometânica foi recolhida e, durante a sua concentração, verificou-se a formação de duas fases: um sobrenadante branco de aspecto “precipitado” e uma solução inferior esverdeada. As duas fases diclorometânicas foram separadas e concentradas até a completa eliminação do solvente.

À fase metanólica remanescente no balão, foram adicionados 100 mL de acetato de etila. Após dispersão leve, foram acrescentados 8 mL de água para otimizar a separação das fases. Então, as fases metanólica e de acetato de etila foram recolhidas e concentradas.

3.4.2 Exclusão molecular em membrana filtrante

A fase metanólica ativa obtida do fracionamento líquido-líquido foi ressuspensa em etanol 70% e submetida à ultrafiltração em um filtro CentriPrep® (Millipore) de 30 KDa. A amostra acondicionada no dispositivo foi centrifugada por 60 min a 5000 rpm, obtendo-se uma fração externa contendo substâncias de massa molecular maior que 30 KDa e outra fração interna contendo substâncias de massa molecular menor ou igual a 30 KDa, que foram concentradas até a eliminação completa do solvente.

3.4.3 Quantificação de compostos fenólicos totais

O doseamento de fenóis totais foi realizado de acordo com o método descrito por Hargerman & Butler (WATERMAN & MOLE, 1994). Dois mililitros de solução aquosa de lauril sulfato de sódio 1% / trietanolamina 5% / isopropanol 20% foram misturados a 1 mL de solução cromogênica de FeCl_3 (FeCl_3 0,021 M em HCl 1 mM). Posteriormente, foram acrescentados 500 μL da fração ativa do extrato etanólico da casca da raiz de *M. guianensis* (fração metanólica com compostos maiores que 30 KDa) a 1,5 mg/mL. Após repouso a temperatura ambiente por 15 min, a solução foi diluída em água destilada na proporção 1:5 e procedeu-se com a leitura da absorbância a 510 nm. Como branco, utilizou-se solução aquosa de lauril sulfato de sódio / trietanolamina / isopropanol e a solução cromogênica de FeCl_3 . O teste foi realizado em duplicata e o resultado obtido (média aritmética dos valores de absorbância), utilizado para cálculo da quantidade de equivalentes de ácido tânico presentes na amostra. Para isso, foi estabelecida uma curva padrão de “quantidade de ácido tânico” versus “absorbância a 510 nm”.

3.4.4 Quantificação de taninos totais

Para o doseamento de taninos, foi utilizado o método descrito por Waterman & Mole (1994). Dois mililitros de solução de albumina sérica bovina a 1 mg/mL (fração V, Sigma Aldrich, em CH₃COONa 0,2 M, pH 4,9, suplementada com NaCl 0,17 M) foram misturados a 500 µL da fração ativa do extrato etanólico da casca da raiz de *M. guianensis* (fração metanólica com compostos maiores que 30 KDa) a 1,5 mg/mL. A solução foi deixada em repouso a temperatura ambiente por 15 min e posteriormente centrifugada por 15 min a 3000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi dissolvido em 4 mL de solução aquosa de lauril sulfato de sódio 1% / trietanolamina 5% / isopropanol 20%. Em seguida, adicionou-se 1 mL de solução cromogênica de FeCl₃ (FeCl₃ 0,021 M em HCl 1 mM). Após 15 min de repouso à temperatura ambiente, procedeu-se com a leitura da absorbância a 510 nm. Como branco, utilizou-se a mistura da solução aquosa de lauril sulfato de sódio / trietanolamina / isopropanol com a solução cromogênica de FeCl₃. O teste foi realizado em duplicata e o resultado obtido (média aritmética dos valores de absorbância), utilizado para cálculo da quantidade de equivalentes de ácido tânico presentes na amostra. Para isso, foi estabelecida uma curva padrão de “quantidade de ácido tânico” versus “absorbância a 510 nm”.

3.4.5 Comprimento de onda de máxima absorbância e termoestabilidade

A fração ativa metanólica contendo substâncias maiores que 30 KDa, purificada a partir do extrato etanólico da casca da raiz de *M. guianensis*, foi ressuspensa em etanol 70% e submetida à leitura de sua absorbância em comprimentos de onda que variaram de 700 a 200 nm, para verificar qual o comprimento de onda em que havia maior absorbância pela amostra.

Para verificar a estabilidade da fração ativa a altas temperaturas, a amostra ressuspensa em etanol 70% foi aquecida em banho-maria na temperatura de ebulição da água por 30 min. Com o resfriamento da amostra após a fervura, sua atividade inibitória sobre AZS foi testada, conforme metodologia já descrita.

REFERÊNCIAS

ABELL, A. D.; RATCLIFFE, M. J.; GERRARD, J. **Ascorbic acid-based inhibitors of α -amylases**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 8, p. 1703-1706, 1998.

AHARONI, A.; JONGSMA, M. A.; BOUWMEESTER, H. J. **Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants**. *Trends in Plant Science*, Oxford, v. 10, n. 12, p. 594-602, 2005.

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

ALVES, T. M. A.; SILVA, A. S.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; JÚNIOR, A. S.; ZANI, C. L. **Biological screening of Brazilian medical plants**. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 95, p. 367-373, 2000.

ARISAWA, M.; HANDA, S.S.; MCPHERSON, D.D.; LANKIN, D.C.; CORDELL, G.A.; FONG, H.H.; FARNSWORTH, N.R. Plant anticancer agents XXIX: Cleomiscosin A from *Simaba multiflora*, *Soulamea soulameoides*, and *Matayba arborescens*. *J Nat Prod*, v. 47, n. 2, p. 300-307, 1984.

AYDIN, S. **A comparison of ghrelin, glucose, alpha-amylase and protein levels in saliva from diabetics**. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, v. 40, n. 1, p. 29-35, Jan 2007.

BERNFELD, P. **Amylases alpha and beta**. *Meth. Enzymol.*, v. 1, p. 149-158, 1955.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) [Ecosistemas brasileiros: Cerrado], [2008?]. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/cerrado.htm>>. Acesso em: 05/04/2008.

BUSCH, L.; STERIN-BORDA, L.; BORDA, E. **Differences in the regulatory mechanism of amylase release by rat parotid and submandibular glands**. *Archives of Oral Biology*, n. 47, p. 717-722, 2002.

CHARPENTIER, G.; RIVELINE, J. P.; VARROUD-VIAL, M. **Management of drugs affecting blood glucose in diabetic patients with renal failure.** *Diabetes and Metabolism*, v. 26, n. 4, p. 73-85, 2000.

CONFORTI, F.; LOIZZO, M. R.; STATTI, G. A.; MENICHINI, F. **Comparative radical scavenging and antidiabetic activities of methanolic extract and fractions from *Achillea ligustica* ALL.** *Biol Pharm Bull.*, v. 28, n. 9, p. 1791-1794, 2005.

CONFORTI, F.; LOIZZO, M. R.; STATTI, G. A.; HOUGHTON, P. J.; MENICHINI, F. **Biological properties of different extracts of two *Senecio* species.** *Int J Food Sci Nutr.*, v. 57, p. 1-8, 2006.

COUTINHO, L. M. [Cerrado]. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Ecologia. Disponível em: <http://eco.ib.usp.br/cerrado/aspectos_bioma.htm>. Acesso em 01/06/2008.

DAYLER, C. S. A.; MENDES, P. A. M.; PRATES, M. V.; BLOCH JÚNIOR, C.; FRANCO, O. L.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. **Identification of a novel bean α -amylase inhibitor with chitinolytic activity.** *FEBS Letters*, v. 579, p. 5616–5620, 2005.

DE PAULA, J. E. *M. guianensis*. 2008. 2 fotografias, color., 15 x 21 cm.

DE SOUZA, M.T; BUZZI, F. C.; CECHINEL FILHO, V.; HESS, S.; DELLA MONACHE, F.; NIERO R. **Phytochemical and antinociceptive properties of *Matayba elaeagnoides* Radlk. barks.** *Zeitschrift für Naturforschung*, v. 62, p. 550-554, 2007.

ECKLEY, C. A.; COSTA, H. O. **Estudo comparativo do pH e do volume salivar em indivíduos com laringofaringite crônica por doença do refluxo gastroesofágica antes e após o tratamento.** *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, v. 72, n. 1, p. 55-60, 2006.

ENGLYST, K. N.; ENGLYST, H. N. **Carbohydrate bioavailability.** *British Journal of Nutrition*, v. 94, p. 1-11, 2005.

ESPINDOLA, L. S.; VASCONCELOS JUNIOR, J. R.; DE MESQUITA, M. L.; MARQUIÉ, P.; DE PAULA, J. E.; MAMBU, L.; SANTANA, J. M. **Trypanocidal activity of a new diterpene from *Casearia sylvestris* var. *lingua*.** *Planta Med.* v. 70, p. 1093-1095, 2004.

FUKUMASU, H.; AVANZO, J.L.; HEIDOR, R.; SILVA, T.C.; ATROCH, A.; MORENO, F.S.; DAGLI, M.L. **Protective effects of guarana (*Paullinia cupana* Mart. var. *Sorbilis*) against DEN-induced DNA damage on mouse liver.** Food Chem Toxicol., v. 44, n. 6, p. 862-867, 2006.

GERRARD, J. A.; PRINCE, M. J.; ABELL, A. D. **Kinetic characterisation of ene-diol-based inhibitors of α -amylase.** Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v. 10, p. 1575-1576, 2000.

GIBBS, B. F.; ALLI, I. **Characterization of a purified α -amylase inhibitor from white kidney beans (*Phaseolus vulgaris*).** Food Research International, v. 31, n. 3, p. 217-225, 1998.

GIRI, A. P.; KACHOLE, M. S. **Amylase inhibitors of pigeonpea (*Cajanus cajan*) seeds.** Phytochemistry, V. 47, N. 2, p. 197-202, 1998.

GUARIN NETO. **Sapindaceae – *Matayba guianensis* Aublet.** In: COLEÇÃO Rizzo: Flora dos estados de Goiás e Tocantins. [S.l.: s.n.], 1994. V. 16, p. 40-41.

GUYTON, A. C. **Tratado de Fisiologia Médica.** Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 9^a ed., 1997.

GYÉMÁNT, G.; KANDRA, L.; NAGY, V.; SOMSÁK, L. **Inhibition of human salivary α -amylase by glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin.** Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 312, p. 334–339, 2003.

GROSSI DE SÁ, M. F.; CHRISPEELS, M. J. **Molecular cloning of bruchid (*Zabrotes subfasciatus*) α -amylase cDNA and interactions of the expressed enzyme with bean amylase inhibitors.** Insect Biochem. Molec. Biol, v. 27, n. 4, p. 271-281, 1997.

HASLAM, E. **Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs and medicines: possible modes of action.** Journal of Natural Products, v. 59, p. 205-215, 1996.

HASLAM, E. **Vegetable tannins – lessons of a phytochemical lifetime.** Phytochemistry, v. 68, p. 2713-27-21, 2007.

HEYL, D. L.; FERNANDES, S.; KHULLAR, L.; STEPHENS, J.; BLANEY, E.; OPANG-OWUSU, H.; STAHELIN, B.; PASKO, T.; JACOBS, J.; BAILEY, D.; BROWN, D.; MILLETTI, M. C. **Correlation of LUMO localization with the α -amylase inhibition constant in a Tendamistat-based series of linear and cyclic peptides.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, n. 13, p. 4262–4268, 2005.

HILL, R. D.; MCGREGOR, A. W. **Advances in cereal science and technology**, v. 9. St Paul, USA: AACC, p. 217-261, 1988.

HO, S.C.; HWANG, L.S.; SHEN, Y.J.; LIN, C.C. **Suppressive effect of a proanthocyanidin-rich extract from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) flowers on nitric oxide production in LPS-stimulated macrophage cells.** *J Agric Food Chem.*, v. 55, n. 26, p. 10664-10670, 2007.

IULEK, J.; FRANCO, O.L.; SILVA, M.; SLIVINSKI, C.T.; BLOCH JR, C.; RIGDEN, D.J.; GROSSI DE SÁ, M..F. **Purification, biochemical characterisation and partial primary structure of a new α -amylase inhibitor from *Secale cereale* (rye).** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 32, p. 1195-1204, 2000.

ISHIMOTO, M.; CHRISPEELS, M. J. **Protective mechanism of the Mexican bean weevil against high levels of alpha-amylase inhibitor in the common bean.** *Plant Physiology*, v. 111, n. 2, p. 393-401, 1996.

JIMOH, F.O.; SOFIDIYA, M.O.; AFOLAYAN, A.J. **Antioxidant properties of the methanol extracts from the leaves of *Paullinia pinnata*.** *J Med Food*, v. 10, n. 4, p. 707-711, 2007.

KANDRA, L. ; GYÉMÁNT, G. ; ZAJÁ CZ, Á. ; BATT A, G. **Inhibitory effects of tannin on human salivary α -amylase.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 319, p. 1265-1271, 2004.

KANDRA, L.; ZAJÁ CZ, J.; REMENYIK, J.; GYEMÁ NT, G. **Kinetic investigation of a new inhibitor for human salivary α -amylase.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 334, p. 824–828, 2005.

KAWAMOTO, H.; NAKATSUBO, F.; MURAKAMI, K. **Stechiometric studies of tannin-protein co-precipitation.** *Phytochemistry*, v. 41, p. 1427-1431, 1996.

KÉKI, S.; BATT A, G.; BERECZKI, I.; FEJES, Z.; NAGY, L.; ZAJÁ CZ, A.; KANDRA, L.; KIRICSI, I.; DEÁ K, G.; ZSUGA, M.; HERCZEGH, P. **New types of α -amylase enzyme-inhibitory polysaccharides from D-glucal.** *Carbohydrate Polymers*, v. 63, p. 136–140, 2006.

KIM, Y. M.; JEONG, Y. K.; WANG, M. H.; LEE, W. Y.; RHEE, H. I. **Inhibitory effect of pine extract on α -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia.** *Nutrition*, v. 21, p. 756–761, 2005.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. **A conservação do Cerrado brasileiro.** *Megadiversidade*, v. 1, p. 147-155, 2005.

KLUH, I.; HORN, M.; HYBLOVA, J.; HUBERT, J.; DOLECKOVA-MARESOVA, L.; VOBURKA, Z.; KUDLIKOVA, I.; KOCOUREK, F.; MARES, M. **Inhibitory specificity and insecticidal selectivity of α -amylase inhibitor from *Phaseolus vulgaris*.** *Phytochemistry*, v. 66, p. 31–39, 2005.

KOTOWAROO, M. I.; MAHOMOODALLY, M.F.; GURIB-FAKIM, A.; SUBRATTY, A.H. **Screening of traditional antidiabetic medicinal plants of Mauritius for possible alpha-amylase inhibitory effects in vitro.** *Phytother Res.*, v. 20, n. 3, p. 228-231, 2006.

KWON, Y. I.; JANG, H. D.; SHETTY, K. **Evaluation of *Rhodiola crenulata* and *Rhodiola rosea* for management of type II diabetes and hypertension.** *Asia Pac J Clin Nutr.*, v. 15, n. 3, p. 425-32, 2006.

LAYER, P.; RIZZA, R.A.; ZINSMEISTER, A.R.; CARLSON, G.L.; DIMAGNO, E.P. **Effect of a purified amylase inhibitor on carbohydrate tolerance in normal subjects and patients with diabetes mellitus.** *Mayo Clin. Proc.*, v. 61, p. 447, 1986 a.

LAYER, P.; ZINSMEISTER, A. R.; DIMAGNO, E.P. **Effects of decreasing intraluminal amylase activity on starch digestion and posprandial gastrointestinal funcion in humans.** *Gastroenterology*, v. 91, p. 41-48, 1986 b

LEONEL, M. **Análise da forma e tamanho de grânulos de amidos de diferentes fontes botânicas.** *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 27, n. 3, p. 579-588, 2007.

LOIZZO, M. R.; SAAB, A. M.; STATTI, G. A. ; MENICHINI, F. **Composition and α -amylase inhibitory effect of essential oils from *Cedrus libani*.** *Fitoterapia*, v. 78, p. 323–326, 2007.

MACEDO, M. **Contribuição ao estudo de plantas econômicas no estado de Mato Grosso.** Cuiabá: UFMT, 1995. 70 p.

MAGID, A.A.; VOUTQUENNE-NAZABADIOKO, L.; LITAUDON, M.; LAVAUD, C. **Acylated farnesyl diglycosides from *Guioa crenulata***. *Phytochemistry*, v. 66, n. 23, p. 2714-2718, 2005.

MESQUITA, M. L.; DESRIVOT, J.; BORIES, C.; FORNET, A.; DE PAULA, J. E.; GRELLIER, P.; ESPINDOLA, L. S. **Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants**. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 7, p. 783-787, 2005.

MESQUITA, M. L. DE; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; DE PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S. **In vitro antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies**. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 110, n. 1, p. 165-70, 2007.

MURAI, A.; IWAMURA, K.; TAKADA, M.; OGAWA, K.; USUI, T.; OKUMURA, J. **Control of postprandial hyperglycaemia by galactosyl maltobionolactone and its novel anti-amylase effect in mice**. *Life Sciences*, v. 71, p. 1405-1415, 2002.

MURALIKRISHNA, G.; NIRMALA, M. **Cereal α -amylases – an overview**. *Carbohydrate Polymers*, v. 60, p. 163-173, 2005.

NAGAMINE, Y.; OMICHI, K.; IKENAKA, T. **A comparison of the modes of actions of human salivary and pancreatic alpha-amylases on modified maltooligosaccharides**. *J. Biochem.*, v. 104, n. 409, p. 667-670, 1988.

NAKATANI, H.; KOBAYASHI, I.; MIYAUCHI, T. **Functional similarity of sea urchin and mammalian α -amylases**. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 115B, n. 3, p. 389-392, 1996.

NAPOLITANO, D. R.; MINEO, J. R.; DE SOUZA, M. A.; DE PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S.; ESPINDOLA, F. S. **Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the Brazilian Cerrado**. *J. Ethnopharmacol.*, v. 99, n. 1, p. 37-41, 2005.

NIELSEN, P.K.; BONSAGER, B.C.; FUKUDA, K.; SVENSSON, B. **Barley α -amylase / subtilisin inhibitor: structure, biophysics and protein engineering**. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1696, p. 157– 164, 2004.

NIEMETZ, R.; GROSS, G. G. **Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis**. *Phytochemistry*, n. 66, p. 2001-2011, 2005.

ONO, Y.; HATTORI, E.; FUKAYA, Y.; IMAI, S.; OHIZUMI, Y. **Anti-obesity effect of *Nelumbo nucifera* leaves extract in mice and rats**. Journal of Ethnopharmacology, v. 106, p. 238–244, 2006.

PASSOS, V. M. A; BARRETO, S. M.; DINIZ, L. M.; LIMA, M. F. **Type 2 diabetes: prevalence and associated factors in a Brazilian community – the Bambuí health and aging study**. Sao Paulo Med. J., v.123, n. 2, p. 66-71, 2005.

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

PIVELO, V. R. [**Cerrado**]. Brasil. Ministério das Relações Exteriores. Disponível em: <<http://www.mre.gov.br/cdbrasil/itamaraty/web/port/meioamb/ecossist/cerrado/index.htm>>. Acesso em 01/06/2008.

RAMASUBBU, N.; RAGUNATH, C.; MISHRA, P.J. **Probing the role of a mobile loop in substrate binding and anzyme activity of human salivary amylase**. *J. Mol. Biol.*, v. 325, p. 1061-1076, 2003.

RANGKADILOK, N.; SITTHIMONCHAI, S.; WORASUTTAYANGKURN, L.; MAHIDOL, C.; RUCHIRAWAT, M.; SATAYAVIVAD, J. **Evaluation of free radical scavenging and antityrosinase activities of standardized longan fruit extract**. Food Chem Toxicol., v. 45, n. 2, p. 328-36, 2007.

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

RODRIGUEZ, T.V.; GONZALES, J.V.; SANCHEZ, L.M.; PEREZ, M.N.; FAZ, E.M. **Detection and determination of chemical groups in an extract of *Allophylus cominia* (L.)**. J Herb Pharmacother., v. 5, n. 4, p. 31-38, 2005.

SANTOS, S. C.; DE MELLO, J. C. P. **Taninos**. In: SANTOS & DE MELLO, C. M. O. S.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. rev. e amp. Florianópolis: Ed. da UFSC; Porto Alegre: UFRGS, 2003. p. 615-656.

SARNI-MANCHADO, P.; LE ROUX, E.; LE GUERNEVÉ, C.; LOZANO, Y.; CHEYNIER, V. **Phenolic composition of litchi fruit pericarp**. J Agric Food Chem., v. 48, n. 12, p. 5995-6002, 2000.

SEO, W. D.; KIM, J. H.; KANG, J. E.; RYU, H. W.; CURTIS-LONG, M. J.; LEE, H. S.; YANGA, M. S.; PARKA, K. H. **Sulfonamide chalcone as a new class of α -glucosidase inhibitors.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 15, p. 5514–5516, 2005.

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

SILVA, H.H.; SILVA, I.G.; DOS SANTOS, R.M.; RODRIGUES FILHO, E.; ELIAS, C.N. **Larvicidal activity of tannins isolated of *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae).** *Rev Soc Bras Med Trop.*, v. 37, n. 5, p. 396-399, 2004.

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

SOLOMON, M.; BELENGHI, B.; DELLEDONNE, M.; MENACHEN, E.; LEVINE, A. **The involvement of cysteine protease and protease inhibitors genes in the regulation of programmed cell death in plants.** *Plant Cell*, v. 11, p. 431-444, 1999.

SORENSEN, J.F.; KRAGH, K. M.; SIBBESSEN, O.; DELCOUR, J.; GOESAERT, H.; SVENSSON, B.; TAHIR, T. A.; BRUFAU, J.; PEREZ-VENDRELL, A. M.; BELLINCAMPI, D.; D'OVIDIO, R.; CAMARDELLA, L.; GIOVANE, A.; BONNIN, E.; JUGE, N. **Potential role of glycosidase inhibitors in industrial biotechnological applications.** *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1696, p. 275–287, 2004.

STROBL, S.; MASKOS, K.; WIEGAND, G.; HUBER, R.; GOMIS-RÜTH, F. X.; GLOCKSHUBER, R. **A novel strategy for inhibition of α -amylases: yellow meal worm α -amylase in complex with the Ragi bifunctional inhibitor at 2.5 Å resolution.** *Structure*, v. 6, n. 7, p. 911-921, 1998.

SUBRAMANIAN, R.; ASMAWI, M. Z.; SADIKUN, A. ***In vitro* alpha glucosidase and alpha amylase enzyme inhibitory effects of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide.** *Acta Bichimica Polonica.*, v. 55, n. 1, 2008.

SUMITANI, J.; TSUJIMOTO, Y.; KAWAGUCHI, T.; ARAI, M. **Cloning and secretive expression of the gene encoding the proteinaceous α -amylase inhibitor Paim from *Streptomyces corchorusii*.** *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 90, n. 2, p. 214-216, 2000.

SVENSSON, B.; FUKUDA, K.; NIELSEN, P. K.; BONSAGER, B. C. **Proteinaceous α -amylase inhibitors**. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1696, p. 145-156, 2004.

TEIXEIRA, V. L.; ROCHA, F. D.; HOUGHTON, P. J.; KAPLAN, M. A. C.; PEREIRA, R. C. **Amylase inhibitors of Brazilian seaweeds and their hypoglycemic potential**. *Fitoterapia*, v. 78, p. 35–36, 2007.

TITARENKO, E.; CHRISPEELS, M. J. **cDNA cloning, biochemical characterization and inhibition by plant inhibitors of the α -amylases of the Western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera***. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 30, p. 979–990, 2000.

TURCOTTE, G. E.; NADEAU, L.; FOREST, J. C.; DOUVILLE, P.; LECLERC, P.; BERGERON, J.; LACLOS, B. F. **A new rapid immunoinhibition pancreatic amylase assay: diagnostic value for pancreatitis**. *Clin. Biochem.*, v. 27, n. 2, p. 133-139, 1994.

VALENCIA-JIMÉNEZ, A.; ARBOLEDA, J. W.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. **Detection of α -amylase inhibitors by a zymography method, performed in isoelectric focusing electrophoretic PhastGels**. *Analytical Biochemistry*, v. 366, p. 113–115, 2007.

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

YAMAGUTI-SASAKI, E.; ITO, L.A.; CANTELI, V.C.; USHIROBIRA, T.M.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, C.V.; DE MELLO, J.C. **Antioxidant capacity and in vitro prevention of dental plaque formation by extracts and condensed tannins of *Paullinia cupana***. *Molecules*, v. 12, n. 8, p. 1950-1963, 2007.

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

WANG, J. R.; YAN, Z. R.; WEI, Y. M.; NEVO, E.; BAUM, B. R.; ZHENG, Y. L. **Molecular characterization of dimeric alpha-amylase inhibitor genes in wheat and development of genome allele-specific primers for the genes located on chromosome 3BS and 3DS**. *Journal of Cereal Science*, p. 1-9, 2006. *Article in press*.

WATERMAN, P.G.; MOLE, S. **Analysis of phenolic plant metabolites**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, p. 6-103, 1994.

WHITCOMB, D.C.; LOWE, M. E. **Human pancreatic digestive enzymes**. *Dig Dis Sci*, v. 52, p. 1-17, 2007.

WOLEVER T. M.; RADMARD, R.; CHIASSON, J. L.; HUNT, J. A.; JOSSE, R. G.; PALMASON, C.; RODGER, N. W.; ROSS, S. A.; RYAN, E. A.; TAN, M. H. **One year acarbose treatment raises fasting serum acetate in diabetic patients**. *Diabetic Medicine*, v. 12, p. 164-172, 1995.

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

ZHAO, M.; YANG, B.; WANG, J.; LIU, Y.; YU, L.; JIANG, Y. **Immunomodulatory and anticancer activities of flavonoids extracted from litchi (*Litchi chinensis* Sonn) pericarp**. *Int Immunopharmacol.*, v. 7, n. 2, p. 162-166, 2007.

Acarbose. Disponível em: <http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Acarbose.svg>. Acesso em 28/05/2008.

Área de distribuição do Cerrado. Disponível em: http://eco.ib.usp.br/cerrado/aspectos_area.htm. Acesso em 28/05/2008.

Cerrado. Disponível em: <http://www.unb.br/ib/zoo/grcolli/jalapao/images/Cerrado.jpg>. Acesso em 28/05/2008.

Digestive system diagram. Disponível em: http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Digestive_system_diagram_en.svg. Acesso em 28/05/2008.

Enzymes for Carbohydrate Analysis and Digestion. Disponível em: www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Biochemicals/Enzyme_Explorer/Key_Resources/Carbohydrate_Analysis.html. Acesso em 28/05/2008.

Intestino. Disponível em: www.juntadeandalucia.es/averroes/~29701428/salud/intestino.gif. Acesso em 28/05/2008.

Mapa de distribuição de *Matayba guianensis Aublet*. Disponível em: <http://data.gbif.org/species/15837209>. Acesso em 28/05/2008.

Zabrotes subfasciatus. Disponível em: <http://www.mard.gov.vn/PPDHCMC/html/KDTV/imageKDTV/contrungmotdaumexico-truongthanh.gif>>. Acesso em 28/05/2008.

Zabrotes subfasciatus. Disponível em: <http://www.mard.gov.vn/PPDHCMC/html/KDTV/imageKDTV/contrungmotdaumexico-trieuchung.gif>>. Acesso em 28/05/2008.