

PATRÍCIA MARQUES RODRIGUES

ESTUDO QUÍMICO DE FOLHAS DE *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk.  
(SAPOTACEAE): BIOMONITORAMENTO POR INIBIÇÃO DA ALFA-AMILASE.

BRASÍLIA, 2015

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

PATRÍCIA MARQUES RODRIGUES

ESTUDO QUÍMICO DE FOLHAS DE *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk.  
(SAPOTACEAE): BIOMONITORAMENTO POR INIBIÇÃO DA ALFA-AMILASE.

Dissertação apresentada como requisito parcial à  
obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde  
pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da  
Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Dâmaris Silveira

Co-Orientadora: Paloma Michelle de Sales

BRASÍLIA

2015

PATRÍCIA MARQUES RODRIGUES

ESTUDO QUÍMICO DE FOLHAS DE *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk.  
(SAPOTACEAE): BIOMONITORADO POR INIBIÇÃO DA ALFA-AMILASE.

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2015.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Dâmaris Silveira (presidente)

Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Yris Maria Fonseca Bazzo

Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Lucília dos Santos

Instituto de Química da Universidade de Brasília

---

Prof. Dr. Christopher William Fagg (suplente)

Universidade de Brasília

*Dedico este trabalho ao meu esposo Rodrigo pela compreensão,  
companheirismo e apoio em todos os momentos.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me presentear com a vida e as pessoas que fazem parte dela, pela sua bondade, por ser um refúgio nos momentos mais difíceis e se fazer presente intimamente nas alegrias e realizações, a Ele, minha eterna gratidão.

A professora Damaris, pela orientação e aprendizado, mas agradeço principalmente por sempre me incentivar com muita paciência e acreditar que eu seria capaz mesmo com todas as dificuldades e limitações que eu mesma me impusera.

Ao professor Christopher pela identificação botânica e ajuda na coleta com uma disposição invejável. Na coleta agradeço também a Diegue e Nathália, nos divertimos tanto quanto nos sujamos nessas empreitadas.

A Paloma e aos professores Yris, Pérola e Maurício sempre dispostos a me ajudar.

A professora Lucília pela colaboração, aprendizado, disponibilidade e também por me abrir as portas do LITMO - Laboratório de Isolamento e Transformação de Moléculas Orgânicas do Instituto de Química da UnB.

Aos colegas João, Rafael e à professora Cláudia da UFES (Universidade Federal do Espírito Santo) pela amizade e colaboração com a obtenção de espectros de RMN quando o equipamento de nossa universidade estava com problemas, vocês foram muito gentis.

Nesse sentido agradeço aos colegas do LITMO em especial ao Saulo por ter processado minhas amostras, ao Leandro pela ajuda com o preparo das amostras, ao Paulo pela ajuda com as amostras e processamento de dados do CG-EM, à Terezinha que me ajudou a me localizar dentro do laboratório, ao Charley e a Mis pelas agradáveis conversas, em fim, a todos do LITMO pelo acolhimento, foi um prazer estar entre vocês.

Aos técnicos e estagiários da Central Analítica do Instituto de Química da UnB, Luíz, Artur, Bruno e Júlia que ajudaram na obtenção dos dados de minhas amostras no CG-EM ou no RMN.

Aos pesquisadores que se dedicam aos estudos nesta área.

Aos professores Marcílio e Guilherme e aos colegas do LABTMAC (Laboratório de tecnologia de medicamentos, alimentos e cosméticos), Breno,

Thaiene, Fernando e Tamara por me receberem no laboratório e pela ajuda nas tentativas de usar o equipamento de CLAE.

Aos técnicos e estagiários do Laboratório de Ensino da Faculdade de Ciências da Saúde, especialmente a Eveline, Vanessa, Carlos pela amizade, ajuda e por abrirem as portas do laboratório nas vezes em que precisei.

A Michelle por sua ajuda, compreensão e tranquilidade.

Aos estudantes de iniciação científica Otávio, Bruna, Amanda e Laís pelos momentos de aprendizado e trabalho juntos.

Aos colegas do Laboratório de Controle de Qualidade em Medicamentos e Laboratório de Produtos Naturais onde este trabalho foi desenvolvido, e onde passei a maior parte do tempo nos últimos dois anos ou mais. Conviver com todos vocês foi um presente e um aprendizado diário.

Aos amigos Diegue, Marline e Juliana Ferreira pelo companheirismo, descontração e a incrível capacidade de tornarem o ambiente mais leve e agradável.

A minha família e amigos pelo incentivo e por compreenderem as minhas ausências.

A FAP-DF pelo apoio financeiro por meio do processo FAP-DF 193.000.484/2011 especialmente para o projeto “Levantamento etnobotânico e biomonitoramento químico de plantas e microrganismos de Cerrado e Pantanal como atividade farmacológica”, coordenado pela professora Pérola de Oliveira Magalhães.

*“A Percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o mistério passará pela vida sem ver nada”.*

*(Albert Einstein)*

## RESUMO

*Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk., espécie comumente encontrada no Cerrado é popularmente conhecida como, “curriola” (“curiola”), “brasa-viva”, “figo-do-cerrado” entre outros. Essa planta produz frutos comestíveis e é usada na medicina popular contra hiperlipidemias e para tratar vermes, disenteria, dor e inflamação. Extratos dessa espécie apresentam atividades alelopática, anti-inflamatória, antinociceptiva, antimicrobiana, antioxidante, citotóxica, mutagênica, neuroprotetora, sendo útil no controle glicêmico e de peso. *Pouteria ramiflora* apresenta ainda inibição das enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase motivo pelo qual foi escolhida para ser estudada visando a descoberta de novos inibidores da  $\alpha$ -amilase. A inibição dessa enzima está relacionada ao controle glicêmico em pacientes com *diabetes mellitus* tipo 2, uma desordem metabólica que implica em várias complicações secundárias e atinge pessoas no mundo todo. Neste trabalho foi realizado o estudo químico e o biomonitoramento da atividade inibitória da enzima  $\alpha$ -amilase por extratos de folhas de *Pouteria ramiflora*. A  $\alpha$ -amilase foi exposta aos extratos brutos, aquoso, hexânico e etanólico e a atividade da enzima foi avaliada na presença e na ausência do possível inibidor pelo método colorimétrico descrito por Bernfeld (1955), com modificações. O extrato mais ativo foi definido com a obtenção do valor de  $CI_{50}$  em comparação ao padrão acarbose. Esse extrato foi fracionado com o objetivo de isolar o composto ativo. Os compostos foram isolados e identificados por técnicas cromatográficas e espectrométricas como CCD, CC, CLAE-DAD, IV, CG-EM e RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$  e identificados. O extrato aquoso ( $CI_{50} = 9,51 \mu g/mL$ ) e a fração aquosa ( $CI_{50} = 9,71 \mu g/mL$ ) desse extrato foram os mais ativos contra a enzima avaliada com valores de  $IC_{50}$  próximos ao padrão acarbose ( $CI_{50} = 4,2 \mu g/mL$ ). Os triterpenos *epi*-friedelanol, friedelina e taraxerol foram identificados e/ou isolados a partir do extrato hexânico e o flavonoide miricitrina, marcador do gênero, foi isolado e identificado a partir do extrato aquoso de *P. ramiflora*. Até onde vai o nosso conhecimento, este é o primeiro relato da identificação de *epi*-friedelanol, friedelina, taraxerol e do isolamento miricitrina em *P. ramiflora*. A presença desses compostos pode justificar, pelo menos em parte, a atividade observada nos extratos desta planta.

Palavras-chave: *Pouteria*; friedelina; friedelanol; taraxerol; miricitrina; Cerrado.

## ABSTRACT

*Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk., a species commonly found in Cerrado and popularly known as *curriola* (*curiola*), brasa-viva, figo-do-cerrado among others. This plant produces edible fruits and is used in folk medicine as hyperlipaemic and to treat worms, dysentery, pain and inflammation. Extracts of this species exhibit allelopathic, antiinflammatory, antinociceptive, antimicrobial, antioxidant, cytotoxic, mutagenic, neuroprotective activities and also is useful in glycemic and weight control. Because *Pouteria ramiflora* extracts present  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibition, this species was chosen in this study toward the potential discovery of new  $\alpha$ -amylase inhibitors. Inhibition of this enzyme is related to glycemic control in patients with *diabetes mellitus* type 2, a metabolic disorder that involves multiple secondary complications and affects people worldwide. In this work we performed the chemical and biomonitoring studies of the *in vitro* inhibition activity of extracts from *Pouteria ramiflora* against  $\alpha$ -amylase enzyme. The aqueous, hexane and ethanol crude extracts were evaluated against  $\alpha$ -amylase; and the enzyme activity was tested in the presence and absence of possible inhibitors by the colorimetric method described by Bernfeld (1955) with modifications. The  $IC_{50}$  was obtained and the most active extract was defined and compared to acarbose standard. This extract was fractionated with the purpose of isolating the active compound. The compounds were isolated and identified for chromatographic and spectrometric techniques such as TLC, CC, HPLC-DAD, IR, GC-MS and  $^1H$  NMR and  $^{13}C$  NMR and identified. Aqueous extracts ( $IC_{50} = 9,51 \mu g/mL$ ) and its aqueous fraction ( $IC_{50} = 9,51 \mu g/mL$ ) were the most active against the  $\alpha$ -amylase with the  $IC_{50}$  value similar to the standard acarbose ( $IC_{50} = 4,2 \mu g/mL$ ). The triterpenes *epi-friedelanol*, *friedelin* and *taraxerol* were identified from the hexane extract and the myricitrin flavonoid, chemical marker of the genus *Pouteria*, was isolated and identified from the *P. ramiflora* aqueous extract. As far as know, this is the first report of the identification of *epi-friedelanol*, *friedelin*, *taraxerol* and the isolation of *myricitrin* from *P. ramiflora*. The presence of these compounds may help to clarify at least in part the reported biological activity for this species.

Keywords: *Pouteria*; *friedelin*; *friedelanol*; *taraxerol*; *myricitrin*; Cerrado.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Árvore de <i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.) Radlk. ....	27
Figura 2 – A: Flores; B: folhas; C: frutos; D: galhos de <i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.) Radlk. ....	28
Figura 3 - Estrutura dos polissacarídeos amilose e amilopectina que formam o amido (substrato da amilase). ....	37
Figura 4 – Estrutura tridimensional da $\alpha$ -amilase pancreática humana (70). ....	38
Figura 5 - Reação de redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) ....	48
Figura 6 - Acarbose. ....	48
Figura 7 - Material vegetal (folhas frescas, secas e pulverizadas) de <i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.) Radlk. para produção de extratos. ....	52
Figura 8 - Esquema para obtenção dos extratos, aquoso, hexânico e etanólico brutos de folhas de <i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.) Radlk. por infusão e maceração. ....	54
Figura 9 - Modelo esquemático para um estudo biomonitorado. ....	55
Figura 10 - Esquema de fracionamento do extrato aquoso bruto de folhas de <i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.) Radlk por partição. ....	56
Figura 11 - CCD das 16 subfrações de FA3 (fração aquosa do extrato aquoso bruto). ....	58
Figura 12 – CCD de *FA3.10 e suas frações (*FA3.10P e *FA3.10S). ....	60
Figura 13 - CCD de PH1 e suas frações. ....	61
Figura 14 - Inibição da $\alpha$ -amilase por extratos brutos de <i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.) Radlk. a 1 mg/mL em comparação ao padrão acarbose a 0,0625 mg/mL. ....	60
Figura 15 – $Cl_{50}$ em $\mu\text{g/mL}$ para os extratos brutos de <i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.) Radlk. frente à $\alpha$ -amilase em comparação ao padrão acarbose. ....	61
Figura 16 - Inibição da $\alpha$ -amilase por extrato aquoso bruto de <i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.) Radlk. e frações provenientes da partição desse extrato a 1 mg/mL. ....	62

Figura 17 - $CI_{50}$ em $\mu\text{g/mL}$ para o extrato bruto aquoso de <i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.) Radlk. e sua fração aquosa frente à enzima $\alpha$ -amilase em comparação ao padrão acarbose.....	63
Figura 18- Inibição da $\alpha$ -amilase por frações de FA3 a 0,2 mg/mL.....	64
Figura 19 - Cromatograma por CLAE-DAD a 354 nm de EAB.....	67
Figura 20 - Cromatograma por CLAE-DAD a 354 nm de EEB.....	67
Figura 21 - Espectros de UV por CLAE-DAD a 354 nm para picos de EAB e EEB ..	68
Figura 22 - Cromatograma por CLAE-DAD a 280 nm de EAB.....	69
Figura 23 - Cromatograma por CLAE-DAD a 280 nm de EEB.....	69
Figura 24 - Cromatograma por CLAE-DAD a 354 nm de FA3 .....	70
Figura 25 - Cromatograma por CLAE-DAD a 354 nm de FA2 .....	71
Figura 26 – Cromatograma por CLAE-DAD a 280 nm de FA3.....	72
Figura 27 - Cromatograma por CLAE-DAD a 280 nm de FA2 com espectro do pico no $t_R$ 4,9 min.....	72
Figura 28 – Cromatograma de FA3.10P por CLAE-DAD a 354 nm e espectro do pico $t_R = 27,43$ sobreposto ao espectro do padrão analítico miricitrina .....	74
Figura 29- Espectro de Infravermelho de FA3.10P .....	75
Figura 30- Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de FA3.10P.....	77
Figura 31- Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (600 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de FA3.10P: expansão da região entre $\delta$ 7,0 e 0,96 ppm. ....	78
Figura 32- Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de FA3.10P .....	79
Figura 33 - Cromatograma de FA3.10S por CLAE-DAD a 280 nm e espectros de UV para os picos em ( $t_R = 4,9$ min); ( $t_R = 13,86$ min) e ( $t_R = 18,4$ min.) sobrepostos aos espectros dos padrões analíticos ácido gálico, catequina e epicatequina. ....	80
Figura 34 - Espectro de Infravermelho de PH1.1 .....	83
Figura 35- Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (600 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de PH1.1 .....	84

Figura 36- Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (600 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de PH1.1: expansão da região entre $\delta$ 2,42 a 0,70 ppm e ampliação das regiões entre $\delta$ 2,42 e $\delta$ 2,24 ppm.....	85
Figura 37 – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de PH1.1 .....	86
Figura 38- Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de PH1.1: expansão da região entre $\delta$ 60,0 e 5,0 ppm.....	87
Figura 39 - Padrão de fragmentação friedelanos (132).....	88
Figura 40 - Padrão de fragmentação para friedelina (131, 134).....	89
Figura 41 – Cromatograma (CG-EM) de PH1.1 .....	90
Figura 42 – Espectro de massas de PH1.1, $t_R$ = 53,800 min.....	90
Figura 43. Espectro de Infravermelho de PH1.3 .....	93
Figura 44 - Espectro RMN de $^1\text{H}$ (600 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de PH1.3 .....	94
Figura 45 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (600 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de PH1.3: expansão da região entre $\delta$ 3,75 e 0,87 ppm, com ampliação das regiões entre $\delta$ 3,75 e 3,74; $\delta$ 1,91 e 1,73 ppm e entre $\delta$ 1,58 e 1,19 ppm.....	95
Figura 46 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de PH1.3 .....	96
Figura 47 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de PH1.3: expansão da região entre $\delta$ 72,72 e 10,0 ppm, com ampliação de picos e regiões entre $\delta$ 72,72 e 34,01 ppm .....	97
Figura 48 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de PH1.3: expansão e ampliação dos picos da região entre $\delta$ 32,00 e 10,0 ppm .....	98
Figura 49 - Espectro de RMN DEPT-135 (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de PH1.3.....	99
Figura 50 - Espectro de RMN DEPT-135 (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de PH1.3: expansão entre $\delta$ 72,00 e 10,0 ppm, com ampliação da região entre $\delta$ 35,08 e 34,19 ppm ....	100
Figura 51 – Cromatograma (CG-EM) de PH1.3 .....	101
Figura 52 - Espectro de massas de PH1.3, $t_R$ = 53,409 min. ....	101
Figura 53 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (600 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de PH1.4 .....	104

Figura 54 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (600 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de PH1.4: expansão da região entre $\delta$ 7,27 e 0,8 ppm, com ampliação dos picos entre $\delta$ 5,55 e 1,73 ppm .....	105
Figura 55 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (600 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de PH1.4: expansão da região entre $\delta$ 1,69 e 0,80 ppm.....	106
Figura 56 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de PH1.4 com ampliação dos picos entre $\delta$ 158,10 e 79,08 ppm .....	107
Figura 57 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de PH1.4: expansão da região entre $\delta$ 72,76 e 31,78 ppm, com ampliação de picos entre $\delta$ 72,76 e 53,20 ppm e regiões entre $\delta$ 49,28 e 48,77; 42,83 e 41,33; 39,67 e 35,02 e $\delta$ 33,70 e 31,78 ppm .....	108
Figura 58 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de PH1.4: expansão da região entre $\delta$ 30,63 e 11,61 ppm, com ampliação das regiões entre $\delta$ 30,63 e 25,90 e $\delta$ 18,80 e 15,42 ppm.....	109
Figura 59 - Cromatograma (CG-EM) da fração PH1.4 .....	110
Figura 60 - Espectro de massas de PH1.4: $t_R$ 51,250 min. ....	110
Figura 61 - Padrão de fragmentação de taraxerol (112) .....	108

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Gradiente de eluição para a análise por CLAE – DAD na detecção de flavonoides (97).....	45
Tabela 2 - Material botânico fresco coletado, seco pulverizado e teor de umidade ..	53
Tabela 3 - Rendimento dos extratos brutos.....	55
Tabela 4 - Rendimento das frações da partição do extrato aquoso bruto de folhas de <i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.) Radlk. ....	56
Tabela 5 - Frações obtidas no subfracionamento da fração FA3 (20g).....	58
Tabela 6 - Frações do fracionamento em coluna do precipitado do extrato hexânico bruto PH1 (0,2 g).....	61
Tabela 7 - Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ de FA3.10P (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) em comparação com dados descritos da literatura para miricitrina (118).....	76
Tabela 8 - Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ de PH1.1 (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) em comparação com dados descritos da literatura para friedelina (128). ....	82
Tabela 9 - Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ de PH1.3 (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) em comparação com dados descritos da literatura para <i>epi</i> -friedelanol (135). ....	92
Tabela 10 - Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ de PH1.4 (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) em comparação com dados descritos da literatura (135, 140).....	103

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\delta$  – deslocamento químico  
**AcOEt** - acetato de etila  
**ANOVA** - análise de variância  
**ATCC** - *American Type Culture Collection*  
**BHT** - Butil hidroxi tolueno  
**CC** - cromatografia em coluna  
**CCD** - cromatografia em camada delgada  
**CE<sub>50</sub>** - concentração efetiva mediana que causa efeito agudo (letalidade ou imobilidade) a 50% dos organismos em determinado período de exposição.  
**CG-EM** - cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas  
**CIM** – concentração inibitória mínima  
**CL** - cromatografia líquida  
**CLAE-DAD** – cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos  
**dd** – duplo duplete  
**ddd** – duplo duplete duplo  
**DEPT** – distortionless enhancement by polarization transfer  
**DM** – diabetes mellitus  
**DMSO** – dimetilsulfóxido  
**DNS** - ácido 3,5 - dinitrosalicílico  
**DPPH** - 2,2 – difenil - 1 – picril-hidrazila  
**FM** – fase móvel  
**HTS** - *high throughput screening*  
**Hz** – hertz  
**IC<sub>50</sub>** – concentração necessária para 50% da atividade máxima inibitória  
**IV** – infravermelho  
**J** – constante de acoplamento  
**LMGO** - Laboratório de Micologia de Goiás  
**[M]<sup>+</sup>** – pico íon molecular de massa par  
**MeOH** – Metanol  
**NO** – óxido nítrico  
**NP/PEG** – reagente polietilenoglicol  
**OMS** – Organização Mundial de Saúde  
**pH** – potencial hidrogeniônico  
**ppm** – parte por milhão  
**RENAME** – Relação Nacional de Medicamentos  
**f<sub>R</sub>** – fator de retenção  
**t<sub>R</sub>** – tempo de retenção  
**RMN <sup>13</sup>C** - Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13  
**RMN <sup>1</sup>H** - Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio  
**TMS** – tetrametilsilano  
**UV** – ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>21</b>
1.1 PRODUTOS NATURAIS NA TERAPÊUTICA: UM BREVE HISTÓRICO.....	22
1.2 CERRADO COMO FONTE DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS .....	23
1.3 DESCRIÇÃO BOTÂNICA DE <i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.) Radlk. ....	25
1.4 CONSTITUINTES QUÍMICOS DE <i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.) Radlk.....	29
1.5 ATIVIDADE BIOLÓGICA DE <i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.) Radlk. ....	30
1.6 ENZIMAS ALFA-AMILASES .....	36
1.7 DIABETES MELLITUS .....	39
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>42</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	42
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	42
<b>3 MÉTODOS gerais</b> .....	<b>43</b>
3.1 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD).....	43
3.1.1 Fase estacionária .....	43
3.1.2 Preparo e aplicação da amostra .....	43
3.1.3 Sistemas de Eluição.....	43
3.1.4 Reveladores (96).....	43
3.2 CROMATOGRAFIA EM COLUNA (CC).....	44
3.2.1 Fase estacionária .....	44
3.2.2 Empacotamento .....	44
3.2.3 Preparo da amostra.....	44
3.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS (CLAE-DAD).....	45
3.3.1 Condições de análise.....	45
3.4 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM).....	45
3.5 ESPECTROMETRIA DE INFRAVERMELHO (IV).....	46
3.6 ESPECTROMETRIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) .....	46

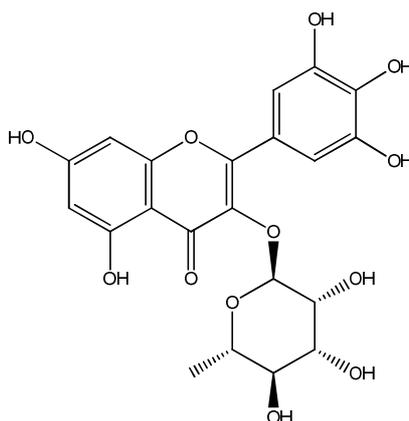
<b>3.6.1 Ensaio de atividade de inibição frente à enzima <math>\alpha</math>-amilase.....</b>	<b>47</b>
3.6.1.1 Reagentes e Soluções .....	48
3.6.1.2 Condições do ensaio.....	50
<b>4 parte experimental .....</b>	<b>52</b>
<b>4.1 IDENTIFICAÇÃO DOS EXEMPLARES E COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO.</b>	<b>52</b>
4.1.1 Preparo do material botânico, folhas secas pulverizadas.....	52
4.1.2 Obtenção dos extratos brutos, aquoso, hexânico e etanólico.....	53
4.1.3 Modelo esquemático para um estudo biomonitorado .....	55
4.1.4 Fracionamento do extrato aquoso bruto por partição.....	56
4.1.5 Subfracionamento de FA3 em coluna de poliamida.....	57
4.1.5.1 Montagem e estabilização da coluna de poliamida .....	57
4.1.5.2 Aplicação da amostra para a coluna de poliamida .....	57
4.1.5.3 Condições de análise para a coluna de poliamida .....	57
4.1.6 Purificação de FA3.10 .....	59
.....	60
4.1.7 Fracionamento de PH1.....	60
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>60</b>
5.1 INIBIÇÃO DA $\alpha$ -AMILASE PELOS EXTRATOS BRUTOS DE <i>P. ramiflora</i> .....	60
<b>5.1.1 <math>Cl_{50}</math> para os extratos brutos, aquoso e etanólico frente à <math>\alpha</math>-amilase .....</b>	<b>61</b>
5.2 INIBIÇÃO DA $\alpha$ -AMILASE PELAS FRAÇÕES OBTIDAS POR PARTIÇÃO DO EXTRATO AQUOSO BRUTO DE <i>P. ramiflora</i> .....	62
5.3 PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CLAE-DAD DE EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES .....	64
<b>5.3.1 Cromatogramas por CLAE-DAD a 354 nm de EAB e EEB .....</b>	<b>67</b>
<b>5.3.2 Cromatogramas por CLAE-DAD a 280 nm de EAB e EEB .....</b>	<b>69</b>
<b>5.3.3 Cromatogramas por CLAE-DAD a 354 nm de FA3 e FA2.....</b>	<b>70</b>
<b>5.3.4 Cromatogramas por CLAE-DAD a 280 nm de FA3 e FA2.....</b>	<b>72</b>
<b>5.3.5 Análise espectrométrica de FA3.10P.....</b>	<b>74</b>
5.4 PERFIL CROMATOGRÁFICO DE FA3.10S A 1 mg/mL POR CLAE-DAD 280 NM.....	80
5.5 ESTUDO QUÍMICO DO EHB DAS FOLHAS DE <i>P. ramiflora</i> .....	81

<b>5.5.1</b>	<b>Análise espectrométrica de PH1.1 .....</b>	<b>81</b>
<b>5.5.2</b>	<b>Análise espectrométrica de PH1.3 .....</b>	<b>91</b>
<b>5.5.3</b>	<b>Análise espectrométrica de PH1.4 .....</b>	<b>102</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>111</b>

## **INTRODUÇÃO**

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais é uma das mais antigas práticas da medicina, tanto na prevenção, tratamento e até mesmo na cura de doenças (1). Dentre as inúmeras espécies de interesse medicinal, estão plantas da família Sapotaceae, que possui cerca de 1250 espécies divididas em 58 gêneros distribuídos em regiões tropicais e subtropicais do mundo (2). No Brasil são encontrados 13 gêneros e 233 espécies (3). Dentre esses, o gênero *Pouteria*, do qual triterpenos e flavonoides são os constituintes em maior proporção. O flavonoide miricitrina (1) é considerado o marcador do gênero (4). No entanto, para a maioria das espécies desse gênero, pouca ou nenhuma informação pode ser encontrada sobre a composição micromolecular (5).



(1) Miricitrina (miricetina-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosídeo)

*Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. é facilmente encontrada no Cerrado, segundo maior bioma brasileiro abrangendo cerca de 25% do território nacional (6). Popularmente a espécie é conhecida como curriola (curiola), brasa-viva, figo-do-cerrado, fruta-de-veado entre outros (3, 7-10). A planta produz frutos comestíveis (5, 11) e na medicina popular é usada no tratamento de doenças como hiperlipidemias e obesidade, verminoses (cascas), disenteria (cascas), dor e inflamação (12, 13). O látex é usado na forma de emplastro sobre machucados que não causaram rompimento da pele (14).

Extratos dessa espécie apresentam atividade alelopática(15) anti-inflamatória (12), antinociceptiva (12), antimicrobiana (16-18), antioxidante (19), citotóxica (20, 21), mutagênica (19) e neuroprotetora (22), sendo útil também no controle glicêmico

e de peso (obesidade) (23). Apresenta ainda inibição das enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase (23-25).

A atividade enzimática da  $\alpha$ -amilase está associada com a progressão da cárie e placa dentária, com a formação do pico pós-prandial de glicose e com a velocidade do esvaziamento gástrico (24). Inibidores desta enzima podem ser aplicados no tratamento do *diabetes mellitus* (DM) e da obesidade, na prevenção de cáries dentárias e outros distúrbios odontológicos, bem como no diagnóstico e tratamento de distúrbios que envolvem condições de hiperamilasemia (26, 27).

*Diabetes mellitus* é uma desordem metabólica de etiologia múltipla, com várias complicações secundárias, caracterizada pela ocorrência de hiperglicemia crônica, causando um desequilíbrio no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos, devido a disfunções na secreção de insulina, além da ação desse hormônio sobre os tecidos alvos ou ambos os fatores. Pessoas no mundo todo são acometidas pela doença que pode levar a diminuição da qualidade e expectativa de vida por estar associada a sérias complicações como doenças vasculares, falência renal e cegueira (24, 28, 29).

A espécie *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. foi escolhida para ser estudada devido ao potencial do gênero para a descoberta de novos inibidores da  $\alpha$ -amilase e o tratamento dos distúrbios relacionados à DM no caso de pacientes não insulino-dependentes.

## 1.1 PRODUTOS NATURAIS NA TERAPÊUTICA: UM BREVE HISTÓRICO

O uso de plantas na terapêutica remonta às civilizações suméricas e acadianas por volta do terceiro milênio a. C. Ainda hoje, substâncias minerais, animais e vegetais são usadas como opções de tratamento (30).

Até o século XIX os fármacos ainda eram obtidos fundamentalmente a partir de produtos naturais (31). A descoberta dos salicilatos obtidos de *Salix alba* (salgueiro) foi marcante para o desenvolvimento dos fármacos a partir de produtos naturais (32). No século XX, até a década de 40, considerada a década dos antibióticos, os produtos naturais foram suprimidos pelos sintéticos em decorrência do desenvolvimento da química orgânica sintética (31). Com a descoberta dos antibióticos como a penicilina, de *Penicillium* spp., a química medicinal voltou-se novamente para os produtos naturais que passaram a ter espaço junto aos sintéticos

(33). Mais tarde uma nova perspectiva para o uso de produtos naturais foi sua utilização no tratamento de doenças neoplásicas, a vincristina derivado da *Vinca rosea* e o taxol da *Taxus brevifolia* são exemplos importantes, sendo que a origem de mais 60% dos medicamentos utilizados com essa finalidade está relacionada a uma fonte natural (31, 34).

A descoberta de fármacos a partir de produtos naturais tem como base dois diferentes métodos, o tradicional e o moderno. No método tradicional o isolamento é guiado por bioensaio, enquanto o método moderno aplica técnicas experimentais de triagem biológica automatizadas de alta escala com termo em inglês (HTS - *high throughput screening*), o que permite a análise de centenas de moléculas a curto tempo e com o uso de pequena quantidade de amostra (30, 35). Nesse caso, a relação entre a estrutura química de novas moléculas bioativas e uma ampla variedade de alvos moleculares é estabelecida para avaliar a atividade biológica (30, 34, 36).

Além das triagens de alta escala, técnicas modernas como a química combinatória, a catálise enzimática e a biossíntese combinatória, o estudo dos mecanismos de ação de extratos cujas substâncias ativas atuam por sinergia são aspectos que merecem destaque no envolvimento de produtos naturais na química medicinal moderna (31).

## 1.2 CERRADO COMO FONTE DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS

Detentor de 5% da biodiversidade do planeta, o Cerrado é reconhecido como a savana mais rica do mundo (37). É o segundo maior bioma da América do Sul, superado apenas pela Floresta Amazônica, com perto de 204 milhões de hectares área que corresponde a aproximadamente 25% do território nacional brasileiro (6, 37, 38).

O Brasil abriga a maior área de savana do mundo, uma vez que o Cerrado é um tipo especial de savana entremeada com florestas ripárias, decíduas e semi-decíduas, veredas e uma diversidade de campos (39). Em relação às fisionomias apresenta áreas com formações florestais com predomínio de espécies arbóreas e formação de dossel contínuo ou descontínuo; savânicas, que são áreas com árvores e arbustos espalhados sobre um estrato graminoso, sem a formação de dossel

contínuo; e campestres, que representam áreas com predomínio de espécies herbáceas e algumas arbustivas, faltando árvores na paisagem (6).

Dados divulgados em 2011 pelo MMA (Ministério do Meio Ambiente) apontam que a cobertura vegetal nativa do cerrado foi suprimida em 48,54 % até 2010, essa informação faz parte do relatório de 2011 produzido pelo Projeto de Monitoramento do Desmatamento nos Biomas Brasileiros por Satélite, um projeto de cooperação técnica entre o MMA, IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) e o PNUD (Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento), executado pelo Centro de Sensoriamento Remoto do IBAMA (40).

Segundo o Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil, lançado, em 2010, pelo Jardim Botânico do Rio de Janeiro, estão catalogadas 12.669 espécies de plantas, fungos e algas no bioma Cerrado, dentre essas 11.349 são de angiospermas (41), com aproximadamente 44% da flora endêmica (42). A biodiversidade, a concentração de espécies endêmicas associada à elevada degradação desse habitat o colocou no cenário mundial entre uma das áreas críticas para a conservação classificadas como “hotspots”, configurando uma das áreas de maior risco de extinção (43). Com as alterações no Código Florestal Brasileiro, realizadas em 2012 com relação a Reserva Legal (parcela de cada propriedade ou posse rural que deve ser preservada), estima-se uma redução de 3,7 milhões de hectares somente de Cerrado (44).

O desmatamento ocorre em grande escala em função da agricultura, pecuária e demanda por carvão vegetal para a indústria siderúrgica (37). O enfrentamento desse problema conta com iniciativas importantes como o PPCerrado (Plano de Ação para Prevenção e Controle do Desmatamento e das Queimadas no Cerrado) do MMA e instituições vinculadas: IBAMA; ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade); ANA (Agência Nacional de Águas) e SBF (Serviço Florestal Brasileiro), que é um instrumento da PNMC (Política Nacional sobre Mudança do Clima) (37).

Espécies vegetais encontradas nesse bioma, tais como o pequi (*Caryocar brasiliense*), buriti (*Mauritia flexuosa*), mangaba (*Hancornia speciosa*), cagaita (*Eugenia dysenterica*), bacupari (*Salacia crassifolia*), cajuzinho do cerrado (*Anacardium humile*), araticum (*Annona crassifolia*) são apreciadas pela população

por seus frutos (9), enquanto algumas dessas e outras são usadas na medicina tradicional e têm sido alvo de estudos etnobotânicos e etnofarmacológicos (45-48). Assim, a bioprospecção para a produção de medicamentos a partir de plantas medicinais apresenta-se como uma ferramenta para o desenvolvimento econômico e a conservação da biodiversidade (49, 50).

### 1.3 DESCRIÇÃO BOTÂNICA DE *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk.

Família: Sapotaceae Juss.

Gênero: *Pouteria* Aubl.

Sinônímia: basiônimo - *Labatia ramiflora* Mart.; heterotípicos - *Labatia chrysophylloides* Mart.; *Labatia elliptica* Pohl ex Miq.; *Lucuma chrysophylloides* (Mart.) A.DC.; *Lucuma lateriflora* Benth. ex Miq.; *Lucuma parviflora* Benth. ex Miq.; *Lucuma ramiflora* var. *lanceolata* Pierre; *Microium parviflora* (Benth. ex Miq.) Baill.; *Paralabatia parviflora* (Benth. ex Miq.) Aubrév.; *Pouteria chrysophylloides* (Mart.) Radlk.; *Pouteria lateriflora* (Benth. ex Miq.) Radlk.; *Pouteria ovata* A.C.Sm.; *Pouteria parviflora* (Benth. ex Miq.) Radlk.; *Pouteria ramiflora* var. *grandifolia* Kuntze; *Pouteria ramiflora* var. *normalis* Kuntze; *Pouteria ramiflora* var. *oblongifolia* Kuntze; *Pseudocladia lateriflora* (Benth. ex Miq.) Pierre; *Richardella parviflora* (Benth. ex Miq.) Baehni; Homotípicos - *Lucuma ramiflora* (Mart.) A.DC.; *Paralabatia ramiflora* (Mart.) Aubrév. (3, 51-53).

Nomes populares: curriola (curiola), abú do cerrado, bacupari-liso, guapeva, gujara, brasa-viva, figo-do-cerrado, fruta-de-veado (locais não especificados), pitomba de leite (Ceará e Piauí), grão de galo (Pará), fruta-do-veado e pessegueiro-do-cerrado (Minas Gerais), louco (Bahia), maçaranduba (Piauí), massaranduba (Bahia e Maranhão), massaranduba-vermelha, guajara (Maranhão), leiteiro-preto, abiu, abiu-carriola, mandapuca (Mato Grosso), abiu-cutite (Pará), ibacoixa (Ceará) (3, 7-10, 54).

Em relação à etimologia, o nome do gênero *Pouteria* – Pouteri + a, nome popular nas Guianas e *ramiflora*, nome que define a espécie, refere-se às flores aderidas aos ramos. Ocorre no cerrado (*stricto sensu*), cerradão, campo cerrado, campo sujo e em Mata de Galeria (51), vereda, savanas amazônicas e Carrasco. Está distribuída no Pará, Tocantins, Maranhão, Piauí, Ceará, Bahia, Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Rondônia,

Pernambuco e Rio de Janeiro (10). Em 10 hectares de cerrado (*stricto sensu*) amostrados foi encontrada a população média de 13 a 26 árvores por hectares (51).

*Pouteria ramiflora*, é uma árvore frutífera (Figuras 1 e 2), altamente lactescente, que pode atingir 8 metros de altura, semidecídua com folhagem de julho a setembro, flores hermafroditas que florescem de abril a setembro, polinizadas por abelhas. A frutificação ocorre de abril a fevereiro, com frutos imaturos a partir de abril com maturação de outubro a fevereiro (51, 54). Mamíferos fazem a dispersão e a propagação se dá por sementes. A copa possui ramos terminais espessos e pilosos; gemas cobertas por pilosidade ferrugínea. Tronco retilíneo com diâmetros de 40-60 cm; ritidoma de cor cinza, com fissuras e cristas descontínuas, com aspecto quadriculado. Folhas simples, alternadas, espiraladas, dispostas no final dos ramos (falsos verticilos); elípticas, oblongas ou sub-orbiculares de tamanho e forma variáveis com 5 a 20 cm de comprimento e 2 a 11 cm de largura; ápices obtusos ou arredondados e bases agudas e obtusas; margens inteiras e onduladas; nervação broquidódroma, nervuras salientes em ambas as faces; pecíolos de até 1 cm de comprimento; estípulas caducas; folhas coriáceas; discolores, mais claras na face interior; glabras e pilosas na face inferior. Flores pequenas, andróginas de até 0,3 cm de comprimento; com quatro pétalas; de cor branco-esverdeada, dispostas em racemos corimbosos axilares. Fruto drupa, lisos de até 4 cm de comprimento; carnosos; globosos, piriformes ou elipsoides; de cor verde-jade e polpa com sabor adocicado. Sementes de até 2 cm de comprimento; elípticas; de cor castanha; envoltas em polpa comestível de cor branca ou amarelada, uma por fruto (7, 51).

Possui potencial para o paisagismo e recuperação de áreas degradadas. Os frutos, comestíveis, são apreciados pela fauna e pelo homem. A madeira possui baixa resistência natural podendo ser usada, por exemplo, na construção civil em acabamentos e na fabricação de brinquedos (9, 51).



Figura 1 – Árvore de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk.

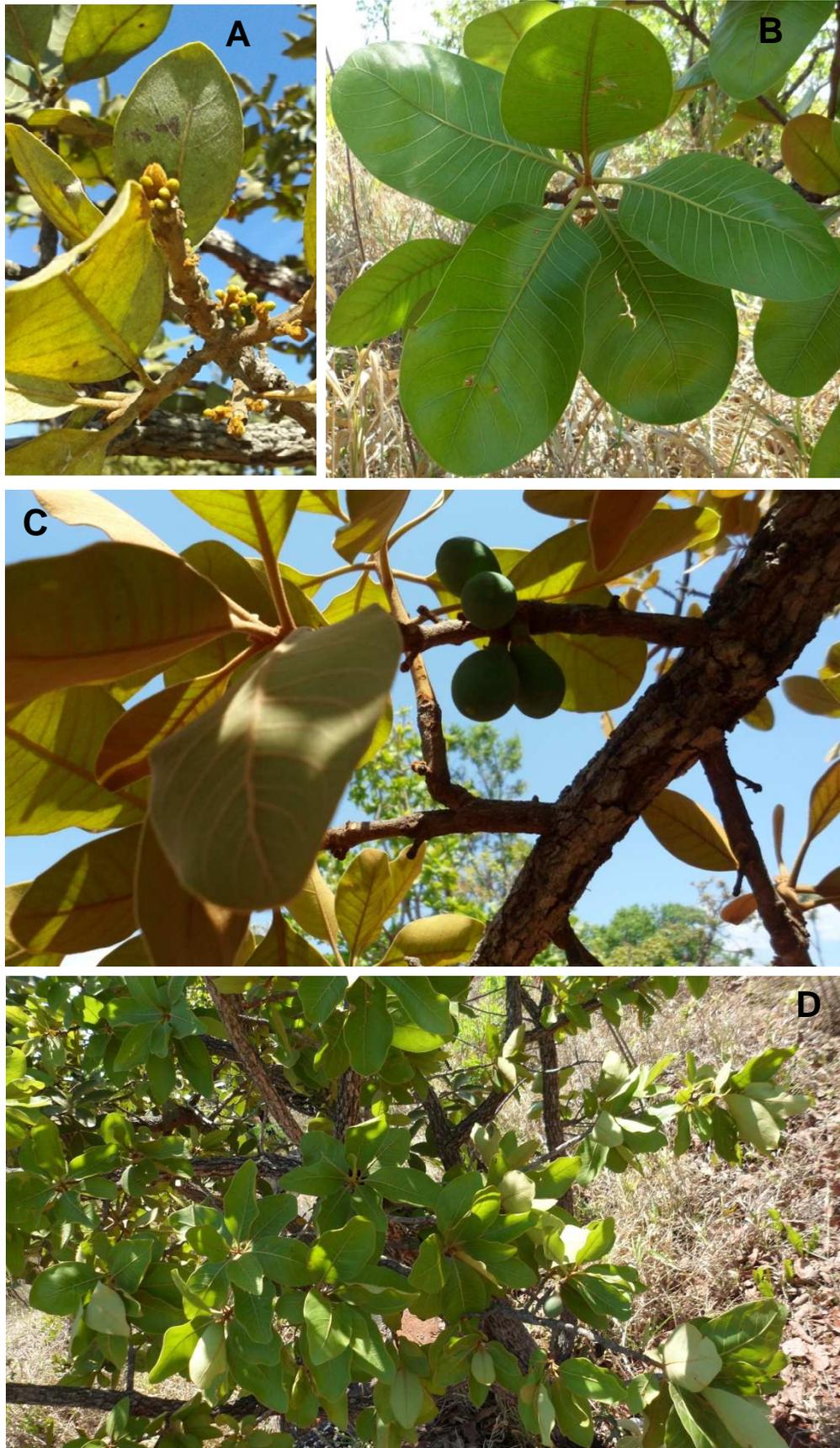
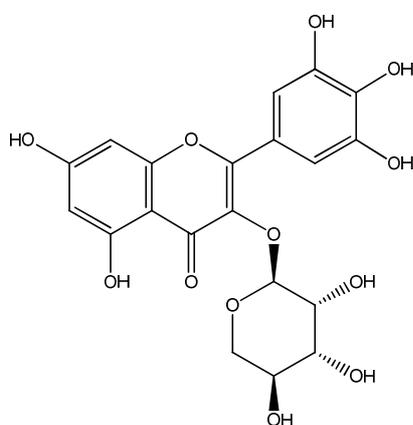


Figura 2 – A: Flores; B: folhas; C: frutos; D: galhos de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk.

#### 1.4 CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk.

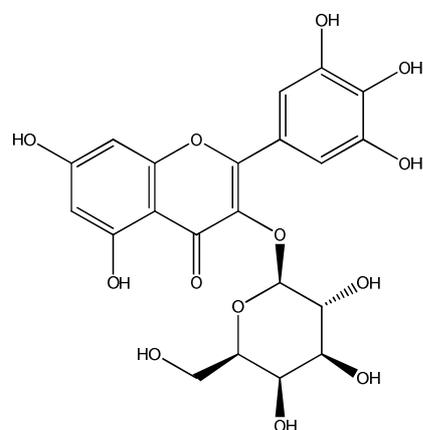
Em um estudo fitoquímico preliminar foram encontrados flavonoides em extrato hexânico da casca do caule; taninos e saponinas nos extratos etanólicos da casca da raiz; taninos foram encontrados em extrato etanólico da madeira e casca da raiz de *P. ramiflora* (23). Outro estudo avaliou os extratos aquosos e etanólicos das cascas internas e externas do caule dessa espécie, nos quais foram identificados compostos fenólicos e taninos em maior concentração nos extratos etanólico. Cumarinas também foram identificadas, com exceção do extrato etanólico da casca interna do caule. Ainda nesse estudo, antraquinonas livres, esteroides e triterpenos foram identificados nos extratos etanólicos, e nos extratos aquosos foi confirmada a presença de saponinas, glicosídeos cardiotônicos, alcaloides, flavonoides e glicosídeos cianogênicos (55).

Além do marcador do gênero, miricetina-3-O- $\alpha$ -L rhamnopyranosídeo (**1**), foram encontrados, miricetina-3-O- $\alpha$ -L-arabinopyranosídeo (**2**) e miricetina-3-O- $\beta$ -D-galactopyranosídeo (**3**) no extrato hidro alcoólico (etanol a 70%) (19).



**(2)**

miricetina-3-O- $\alpha$ -L-arabinopiranosídeo



**(3)**

miricetina-3-O- $\beta$ -D-galactopiranosídeo

### 1.5 ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk.

Apesar de essa espécie ser pouco estudada no que se refere a sua composição química, extratos foram avaliados com relação a diversas atividades biológicas, tais como:

#### Atividade alelopática:

O extrato etanólico das folhas e as frações clorofórmio e acetato de etila desse extrato apresentaram atividade alelopática, interferindo na germinação de *Lactuca sativa* var. Grand Rapids (32).

Os extratos hexânico, etanólico e aquoso das folhas de *P. ramiflora* interferiram no comprimento de radícula de alface (*Lactuca sativa* L.) e tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), bem como no tempo médio de germinação para o tomate. Os extratos etanólico e hexânico, apresentaram atividade alelopática interferindo na germinabilidade de *L. sativa* e os extratos etanólico e aquoso no tempo médio de germinação (56).

Os extratos, etanólico e aquoso de parte interna e externa da casca de *P. ramiflora* nas concentrações de 2,5; 5; 10 e 15%, não afetaram a taxa de germinação das sementes de *L. sativa*, entretanto, interferiram negativamente no crescimento das plântulas, prejudicando o desenvolvimento da raiz e da parte aérea, indicando seu efeito alelopático. Esse efeito ocorreu principalmente nas concentrações de 2,5 e 5,0% do extrato etanólico da parte interna da casca (55).

#### Ação anti-inflamatória:

O extrato etanólico das raízes de *P. ramiflora* inibiu o processo inflamatório induzido por carragenina no teste da bolsa de ar em ratos. Os animais tratados com 50 mg/kg desse extrato tiveram o número de células inflamatórias colhidas da bolsa de ar, níveis de metabólitos do óxido nítrico e da atividade de adenosina desaminase reduzidos em 65%, 77% e 68%, respectivamente. Em ratos tratados com 100 mg/kg a inibição foi mais elevada (81%, 89% e 95%) para os mesmos parâmetros analisados. Os resultados das experiências nesse estudo indicaram atividade anti-

inflamatória devido à interferência com a proliferação de linfócitos e produção de NO (12). Em outro experimento, os extratos hexânico e etanólico de diferentes partes de *P. ramiflora* não inibiram a produção de óxido nítrico a uma concentração final de 50 µg/mL *in vitro* (57).

#### Atividade antinociceptiva:

As doses de 50 ou 100 mg/kg de extrato etanólico das raízes de *P. ramiflora*, administradas em ratos inibiram contorções abdominais induzidas por ácido acético a 1%, com atividade superior a apresentada pela indometacina a 10 mg/kg. O extrato também aumentou o tempo de reação em ratos submetidos a estímulo térmico no teste da placa aquecida com efeito próximo ao da morfina a 10 mg/kg (12).

#### Atividade antimicrobiana (antifúngica e antibacteriana):

A atividade antibacteriana do extrato de hidroalcoólico (etanol a 70%) foi avaliada contra as bactérias gram positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* multi-resistente isolado de paciente hospitalizado, *Bacillus subtilis* ATCC 19659 e as gram negativas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella setubal* ATCC 19196, *Helicobacter pylori* ATCC 43504 e a atividade antifúngica contra *Candida albicans* ATCC 18804. As cepas de *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. setubal* e *C. albicans* foram sensíveis frente ao extrato hidroalcoólico (etanol a 70%) de folhas de *P. ramiflora* com concentração inibitória mínima (CIM) de 125; 250; 500; 62,5; 250 e 500 µg/mL, respectivamente. *S. aureus* multi-resistente e *H. pylori* apresentaram CIM > 1000 µg/mL. Esses resultados forneceram evidências para justificar o uso da planta na medicina tradicional contra diarreia, náuseas e vômitos (16).

Extratos hexânico e etanólico da casca do caule, casca da raiz, folhas, madeira do caule e madeira da raiz foram avaliados contra as leveduras *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e os dermatófitos *Trichophyton mentagrophytes* LMGO 09, *Trichophyton rubrum* LMGO 06. Entre esses os etanólicos da casca do caule, casca da raiz e madeira do caule foram mais ativos

com valores de CIM  $\leq 3,9 \mu\text{g/mL}$  para as duas espécies de *Candida* avaliadas, em comparação com o padrão anfotericina B (CIM =  $4,0 \mu\text{g/mL}$ ). Da mesma forma os extratos etanólicos das folhas e da madeira da raiz, apresentaram CIM de  $1,95 \mu\text{g/mL}$  para *C. parapsilosis*. Nenhum dos extratos foi ativo contra *T. mentagrophytes* e apenas os extratos etanólico da casca e madeira da raiz foram ativos contra *T. rubrum* com CIM =  $62,5$  e  $125 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente (17).

A atividade antimicrobiana foi avaliada também para os extratos, aquoso, etanólico e hexânico das folhas e extrato do caule contra as espécies, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* ATCC 25922 pelo método de difusão em disco. Dos extratos avaliados o extrato etanólico da folha e hexânico do caule apresentaram atividade de inibição apenas contra *S. aureus* a  $1000 \mu\text{g/disco}$ , com halo de inibição de  $10 \text{ mm}$  (18).

#### Atividade antioxidante:

O extrato etanólico das folhas apresentou atividade antioxidante via atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) com  $\text{CE}_{50} = 6,3 \mu\text{g/mL}$  em comparação com o padrão BHT ( $\text{CE}_{50} = 15 \mu\text{g/mL}$ ). Os extratos, aquoso e hexânico também foram avaliados e apresentaram, respectivamente, ( $\text{CE}_{50} = 37,5$  e  $291 \mu\text{g/mL}$ ) (58).

Corroborando com esses achados, outro estudo também avaliou a atividade antioxidante pelo método do DPPH para o extrato hidroalcoólico (etanol a 70%) e o infuso das folhas de *P. ramiflora*, que apresentaram atividade antirradicalar com  $\text{IC}_{50} = 0,18 \text{ mg/mL}$  e  $2,62 \text{ mg/mL}$  respectivamente, em comparação aos valores encontrados para os padrões de quercetina ( $\text{IC}_{50} = 0,03 \text{ mg/mL}$ ) e ácido gálico ( $\text{IC}_{50} = 0,01 \text{ mg/mL}$ ) (19).

Os extratos hexânico e etanólicos das folhas apresentaram atividade antioxidante pelo método do fosfomolibdênio com equivalência  $> 1,3 \text{ mg/mL}$  do padrão BHT (56).

#### Atividade antiparasitária:

Apesar de ter sido avaliada com relação a essa atividade *P. ramiflora* parece não possuir compostos antiparasitários.

Os extratos hexânico e etanólico de folhas, casca da raiz, madeira de caule, e casca do caule, além de etanólico da madeira de raiz e hexânico da raiz com casca foram avaliados e não apresentaram atividade antiplasmodial contra a cepa de *Plasmodium falciparum* resistente à cloroquina FcB1/Colômbia (59).

Os extratos hexânicos e etanólicos de folhas, casca da raiz, madeira e casca do caule, além do extrato etanólico da madeira do caule de *P. ramiflora* não foram ativos em formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagassi*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (60).

#### Atividade citotóxica:

Com relação a essa atividade, *P. ramiflora* foi avaliada e apresentou atividade em algumas linhagens celulares.

Os extratos hexânico e etanólico de diferentes partes de *P. ramiflora* não apresentaram citotoxicidade no teste de viabilidade celular (MTT) contra células 774 (macrófagos) ativadas (57). Da mesma forma, os extratos etanólico e hexânico de folha, madeira do caule, casca do caule, madeira da raiz e casca da raiz não foram considerados ativos sobre as linhagens de células de câncer humano MDA-MB-435 (melanoma), HCT-8 (cólon) e SF-295 (glioblastoma), ou seja, apresentaram inibição < 85% nas três linhagens em teste de MTT à concentração de 50 µg/mL (61).

Por outro lado, um estudo avaliou o efeito citotóxico dos extratos, aquoso, etanólico e hexânico, contra linhagens de células de câncer de cabeça e pescoço, FaDu (carcinoma de hipofaringe), SCC-25 (células de câncer bucal), SCC-9 e HaCat (queratinócitos), sozinhos e associados à radiação. Os extratos, aquoso e etanólico foram mais citotóxicos que a cisplatina contra FaDu (33,4 %; 40,5 % e 41,6 % de células viáveis, respectivamente) e contra HaCat apresentaram efeito citotóxico moderado (33,6 a 46% de células viáveis). Os extratos, aquoso e hexânico apresentaram efeito discreto (mais de 80% das células viáveis) contra SCC-25 e

(mais de 65% de células viáveis) contra SCC-9. Quando associados à radioterapia todos os extratos tiveram o efeito aumentado em todas as linhagens avaliadas (62).

Extratos, aquoso, etanólico e hexânico das folhas nas concentrações de 500 e 1000 µg/mL foram investigados quanto ao efeito citotóxico na linhagem celular de feocromocitoma PC-12 Adh, após 24 e 48 horas de tratamento. Dos extratos avaliados apenas o extrato hexânico apresentou efeito citotóxico, com capacidade de inibir a proliferação celular com intensidade próxima a 50% na concentração de 1000 µg/mL, após 48 horas de tratamento. Em relação aos extratos, aquoso e etanólico, foi observada estimulação do crescimento celular no tempo de 24 horas, com discreta redução após 48 horas (20).

A atividade citotóxica dos extratos hexânico e etanólico das folhas e hexânico do caule contra duas linhagens de adenocarcinoma de próstata humano LNCaP clone FGC (sensível a androgênios) e PC3 (resistente a androgênios) e de uma linhagem controle de queratinócitos humanos normais (HaCat), revelou a atividade citotóxica do extrato hexânico do caule sobre a linhagem de adenocarcinoma de próstata humano LNCaP (21).

#### Mutagênica

O extrato hidroalcoólico de *P. ramiflora* apresentou mutagenicidade a *Salmonella typhimurium* TA97a (19)

#### Inibição enzimática

A atividade inibitória dos extratos etanólico e hexânico de casca do caule, madeira da raiz, folha, madeira do caule e casca da raiz contra a enzima  $\alpha$ -amilase da saliva humana e amilases de larvas dos insetos *Zabrotes subfaciatus* e *Acanthoscelides obtectus* (praga de feijão). O estudo revelou que os extratos etanólico de casca do caule, madeira e casca da raiz foram ativos em mais de 94% contra as três enzimas avaliadas, com exceção do extrato etanólico da madeira da raiz em relação à enzima da saliva humana (66% de inibição). Os extratos etanólicos de folhas e de madeira do caule foram ativos contra *Z. subfaciatus* em mais de 85%, e contra *A. obtectus* em 70% e 30% respectivamente. Os extratos hexânicos apresentaram atividade somente contra a enzima de *Z. subfaciatus* e em 20% ou

menos. O extrato etanólico da madeira do caule não foi ativo contra a enzima da saliva humana (24).

*Pouteria ramiflora* apresentou atividade pronunciada contra as enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase. Os extratos, aquoso, etanólico e hexânico avaliados na concentração de 1 mg/mL apresentaram atividade de inibição contra a enzima  $\alpha$ -glicosidase (98,32, 100 e 93,49%, respectivamente) e contra a enzima  $\alpha$ -amilase (90,66, 87,83 e 31,65%, respectivamente). O extrato aquoso apresentou maior atividade, com  $IC_{50} = 0,35 \mu\text{g/mL}$  contra  $\alpha$ -glicosidase e  $IC_{50} = 7,08 \mu\text{g/mL}$  contra  $\alpha$ -amilase (25).

A concentração final de 20  $\mu\text{g/mL}$  do extrato etanólico de cascas de caule e de raiz foi capaz de diminuir em mais de 95% a  $\alpha$ -amilase da saliva humana (23).

#### Controle glicêmico e de peso:

Camundongos tiveram reduzidos os níveis de glicose sanguínea e de peso corporal quando tratados com 50 e 100 mg/Kg do extrato aquoso de casca do caule de *P. ramiflora* (23). O extrato hidroalcoólico (etanol a 50%) das folhas reduziu a glicemia em ratos diabéticos, no entanto, não interferiu no peso de ratos diabéticos tratados com 500 mg/Kg desse extrato (22).

#### Atividade inseticida

Extratos da madeira da raiz foram testados quanto à atividade larvicida contra *Aedes aegypti* (extrato hexânico a 500  $\mu\text{g/mL}$ ) e *Dipetalogaster maxi* (extrato etanólico, 50  $\mu\text{g/mL}$ ), não se mostrando ativos (8).

#### Atividade neuroprotetora

O extrato aquoso das folhas de *P. ramiflora* exerceu efeito contra danos oxidativos, expressão da miosina-Va e foi capaz de prevenir perda hipocampal neuronal nos subcampos CA3 e hilo de ratos diabéticos tratados com a dose de 500 mg/kg desse extrato (22).

## Toxicidade aguda

Camundongos Swiss tratados com doses superiores a 500 mg/kg de extrato aquoso da casca do caule de *P. ramiflora* apresentaram sinais de toxicidade, como hipnose, dispneia e contorções, com óbitos. Contudo, nos animais tratados com dose de 100 mg/kg desse extrato não foram observados efeitos de toxicidade (23).

## 1.6 ENZIMAS ALFA-AMILASES

As amilases ( $\alpha$ -1,4 glicano-4-glicano-hidrolase, E.C. 3.2.1.1.) são enzimas monoméricas que formam a família das endoamilases (63). Essas enzimas catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 de carboidratos como o amido e o glicogênio. Estão entre as mais importantes enzimas industriais, podendo ser usadas como aditivos em detergentes e nas indústrias de combustíveis, alimentos, papel, têxtil e farmacêutica (64, 65). Amilases ocorrem amplamente em animais, plantas e micro-organismos que usam carboidratos como fonte de energia (66).

O amido, polissacarídeo da D-glicose constituído de cerca de 20% de amilose e 80% de amilopectina, é a principal fonte de carboidratos na dieta da maioria dos humanos. A ligação entre os átomos de carbono das unidades de glicose da amilose são do tipo  $\alpha$ -1,4. Esse polímero não apresenta ramificações e no espaço assume conformação helicoidal, enquanto a amilopectina é uma estrutura ramificada com ligações  $\alpha$ -1,4 entre as unidades de glicose na mesma cadeia e ligações  $\alpha$ -1,6 na cadeia ramificada (67) (Figura 3).

A digestão de amido e glicogênio ingeridos na dieta tem início com as  $\alpha$ -amilases da saliva que catalisam reações de hidrólise entre as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 internas originando polissacarídeos curtos ou oligossacarídeos. Essas enzimas atuam também no rompimento de ligações  $\alpha$  1-4 da amilopectina, originando uma mistura de polissacarídeos denominados dextrinas (68).

No estômago, a  $\alpha$ -amilase salivar é inativada pelo pH baixo, mas uma segunda forma de  $\alpha$ -amilase, secretada pelo pâncreas no intestino delgado, continua o processo de degradação. A  $\alpha$ -amilase pancreática gera principalmente maltose e maltotriose (di e trissacarídeos de glicose) e oligossacarídeos chamados de dextrinas-limite, fragmentos de amilopectina contendo pontos de ramificação  $\alpha$  1-6.

A maltose e as dextrinas são degradadas à glicose por enzimas epiteliais do intestino (69).

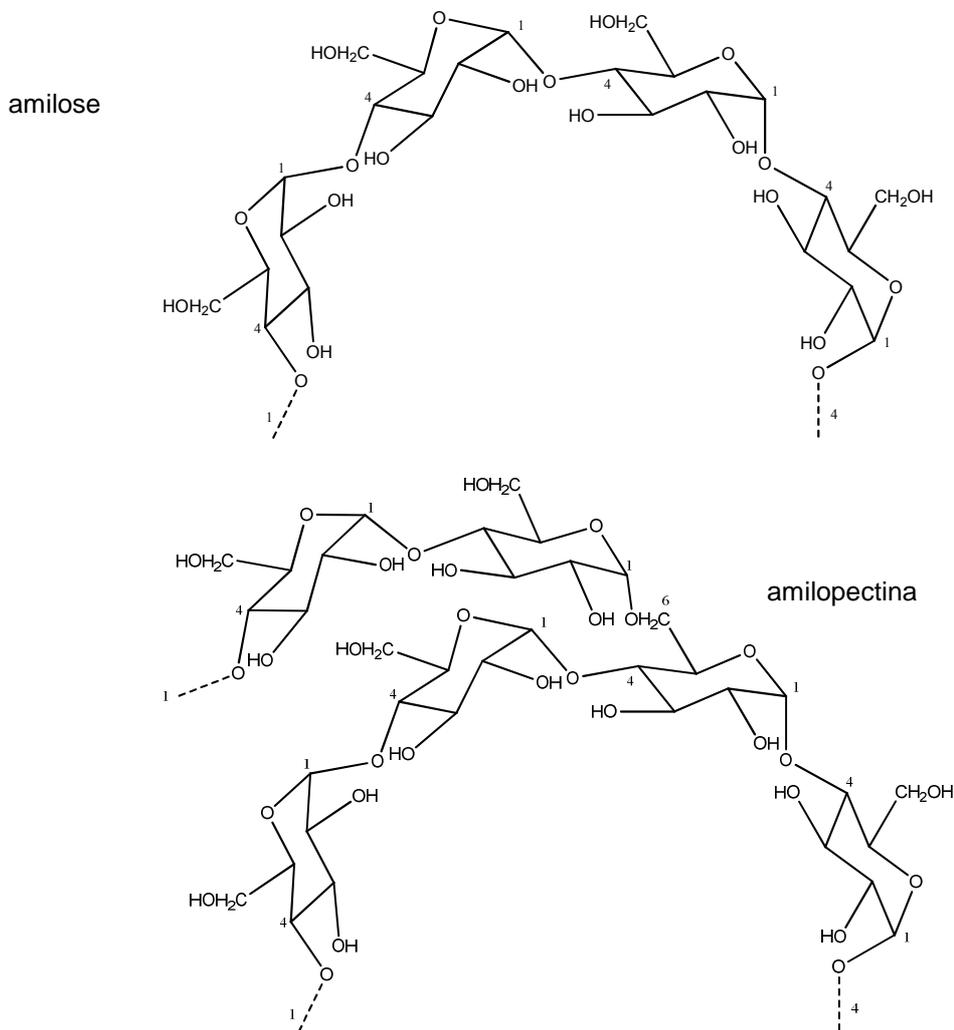


Figura 3 - Estrutura dos polissacarídeos amilose e amilopectina que formam o amido (substrato da amilase).

A amilopectina difere da amilose devido a ramificações ligadas a cadeia principal por ligações glicosídicas  $\alpha(1,6)$ , com exceção dessas ligações, todas as outras ligações glicosídicas são  $\alpha(1,4)$ , adaptado de Carey 2011 (67)

A amilase pancreática humana (Figura 4) é composta por 3 domínios estruturais (A, B e C). O domínio A é o maior e forma um barril  $\beta$  paralelo (com 3 resíduos catalíticos); nessa região também é localizado um sítio ligante de cloro. O domínio B é o menor e contém um sítio de ligação de cálcio. O domínio C é

composto de estrutura  $\beta$  antiparalela (folha  $\beta$ ) e é apenas vagamente associado com domínios A e B (70).

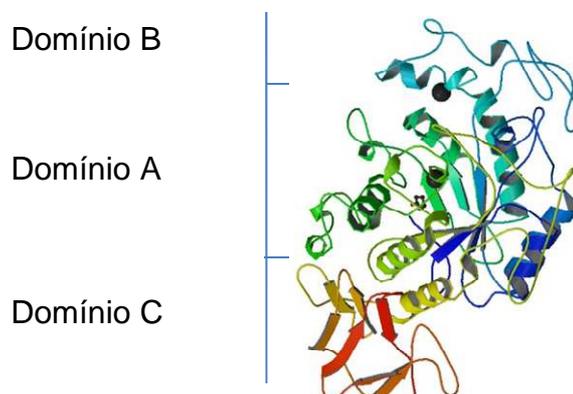


Figura 4 – Estrutura tridimensional da  $\alpha$ -amilase pancreática humana (70). São mostrados os domínios A, B e C. As duas esferas representam os íons cálcio (esfera mais próxima ao domínio B) e íon cloreto na vizinhança do centro catalítico.

Compostos orgânicos proteicos e não proteicos tem sido relatados como inibidores de amilases (71). O interesse nesses inibidores está relacionado ao controle de pragas que atacam as lavouras, nas indústrias de alimentos, papéis e tecidos, na prevenção da cárie e da placa dentária, no papel antinutricional de alimentos que contém inibidores de alfa amilase, no diagnóstico e tratamento de distúrbios que envolvem hiperamilasemia e no tratamento de doenças como diabetes e obesidade (24).

Inibidores de alfa amilases foram identificados em muitas espécies de plantas, especialmente no feijão branco (*Phaseolus vulgaris*) (72). A farinha de feijão branco é usada como auxiliar na inibição da absorção de carboidratos (73).

Dos inibidores proteicos 6 grupos são de origem vegetal e um grupo é encontrado em fungos do gênero *Streptomyces* e podem ser classificados de acordo com sua estrutura terciária em seis tipos: proteína CM, kunitz, taumatina, knotina e tionina e lectina. Proteínas CM são de origem cereal e geralmente têm atividade também sobre tripsinas, kunitz são conhecidos como inibidores de tripsina e assim como taumatina, knotina e tionina inibem as amilases de insetos, mas não as de mamíferos enquanto que inibidores do tipo lectina típicos do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), apresentam a isoforma alfa-A11 identificado como um inibidor da alfa amilase homólogo a fitohemaglutinina (PHA) que inibe a alfa amilase pancreática de mamíferos e de *C. maculatus* e *C. chinensis* (74).

Geralmente inibidores não proteicos são moléculas de baixo peso molecular (compostos fenólicos e açúcares) (24). Entre os inibidores a partir de produtos naturais destacam-se os compostos fenólicos, principalmente os flavonoides que são os compostos mais abundantes da classe dos compostos fenólicos, taninos e triterpenos do tipo oleanano (ácido oleanólico), ursano (ácido ursólico) e lupano (lupeol) (75).

A busca por inibidores de origem vegetal tem base na evolução, com o desenvolvimento de mecanismos de defesa como a produção de inibidores de alfa amilases de insetos fitófagos (76). Em contrapartida os insetos também desenvolveram resistência contra os inibidores proteicos de amilases, eles são capazes de aumentar a produção de enzimas digestivas, de produzir enzimas resistentes aos inibidores produzidos pelas plantas e ainda possuem mecanismo de desintoxicação por proteólise (77).

Proteólises também estão presentes no trato gastrointestinal de humanos e podem representar uma limitação ao uso desses inibidores na terapêutica, portanto a eficiência desses inibidores é questionada (78)

Os hipoglicemiantes disponíveis como a acarbose, miglitol e voglibose são potentes inibidores de  $\alpha$ -glicosidade. A inibição dessa enzima implica no acúmulo de dissacarídeos no intestino causando um desequilíbrio osmótico resultando em distúrbios intestinais como diarreias. O uso de hipoglicemiantes orais apresentam como efeitos indesejáveis distúrbios intestinais como diarreias, flatulências e cólicas abdominais. Dessa forma, visando a minimização desses efeitos a busca por inibidor específico da enzima  $\alpha$ -amilase a partir de metabólitos secundários é desejável. A inibição dessa enzima consiste em opção a tratamento pela diminuição da glicemia pós prandial, podendo auxiliar no controle de peso e no tratamento de DM (79).

## 1.7 DIABETES MELLITUS

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define DM como uma doença crônica de etiologia múltipla caracterizada por hiperglicemia em decorrência da deficiência na produção e ou ação da insulina (80). Complicações de longo prazo que incluem disfunção e falência de órgãos e tecidos afetando principalmente olhos, rins, coração, nervos e vasos sanguíneos, estão associadas à hiperglicemia crônica (81).

As principais complicações relacionadas à DM listadas pela OMS são (80):

- Doenças cardiovasculares
- Doença do pé diabético é uma das mais graves, ocorre devido a alterações nos vasos sanguíneos e nervos, em decorrência de doenças vasculares e neurológicas que muitas vezes, conduz a ulceração e amputação do membro posterior. O DM é a causa mais comum de amputação não traumática do membro inferior, que pode ser prevenida através de inspeção regular e bons cuidados do pé
- Neuropatia diabética é provavelmente a complicação mais comum de DM, pode levar à perda sensorial e danos para as pernas. É também uma das principais causas de impotência em homens diabéticos.
- A retinopatia diabética é a principal causa de cegueira e deficiência visual.
- DM é uma das principais causas de insuficiência renal.

De acordo com dados divulgados pela OMS, em 2012, doenças não transmissíveis foram a maior causa de morte no mundo (82). DM está entre as quatro principais doenças crônicas não transmissíveis, juntamente com câncer, e doenças cardiovasculares e pulmonares (83).

Segundo a Federação Internacional de Diabetes, no mundo, 387 milhões de pessoas (adultos) foram diagnosticados com a doença no ano de 2014 e a estimativa para 2035 é que esse número aumente em 205 milhões, na América Latina a doença atinge quase 25 milhões de pessoas sendo que 1 em cada 12 adultos tem DM (84) e no Brasil, pesquisa divulgada pelo Ministério da Saúde em meados de 2014 indicou que 9,1 milhões (6,9%) dos brasileiros são diabéticos (85). Além do alto número de mortes relacionadas à doença ela representa um custo elevado à saúde pública. Considerando apenas o Brasil, a média de custo para o tratamento de cada paciente foi estimada em USD 1.527,57 para o ano de 2014 (84).

Quanto aos principais tipos de DM, a *diabetes mellitus* tipo 1 (DM1) é caracterizada pela deficiência na produção de insulina e a *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), pela incapacidade do corpo usar a insulina adequadamente (80).

Dentre as estratégias para o controle de DM2 podem ser citadas (86):

- Conscientização (orientação aos pacientes sobre a importância da adoção de medidas para a mudança de estilo de vida);
- adoção de hábitos de vida saudáveis (prática de exercícios físicos regulares, cuidados com a alimentação, redução de peso, evitar o fumo e o excesso de álcool);
- tratamento medicamentoso (hipoglicemiantes, insulina) e
- monitoramento dos níveis glicêmicos.

A prática de exercícios físicos, mesmo em curto período, está associada à diminuição de níveis glicêmicos (87). Por outro lado, tabagismo, pressão arterial alta, colesterol sérico elevado e obesidade são fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardíacas em pessoas com DM (88).

Com exceção da insulina, os hipoglicemiantes disponíveis na Relação Nacional de Medicamentos (RENAME 2012) são da classe das biguanidas (cloridrato de metformina) e dos derivados de uréia, sulfonamidas (Glibenclamida e Glicazida) (89). Medicamentos para o tratamento de DM2 podem também apresentar impacto sobre o risco de fraturas. Por exemplo, tiazolidinodionas aceleram a perda óssea e aumentam o risco de fraturas, especialmente em mulheres idosas (90) e foram retirados espontaneamente do mercado (69). Em contraste, a metformina e sulfonilureias não parecem ter um efeito negativo sobre a saúde dos ossos e podem, na verdade, proteger contra a fratura por fragilidade, entretanto a metformina é contraindicada em pacientes com insuficiência renal (86).

Uma das estratégias de controle de DM e da obesidade é a redução da hiperglicemia pós-prandial (91-93). Nesse sentido, visando descobrir novos fármacos, enzimas digestivas, têm sido alvos de pesquisa, pois desenvolvem um papel importante no metabolismo de carboidratos (94).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver estudo fitoquímico biomonitorado por inibição de  $\alpha$ -amilase para extratos brutos de folhas de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o potencial da ação de extratos de folhas de *P. ramiflora* em teste de inibição com a enzima  $\alpha$ -amilase.

Identificar composto(s) ativo(s) ou fração (ões) ativa(s) em extrato de folhas de *P. ramiflora* frente à enzima  $\alpha$ -amilase por ensaio de inibição enzimática.

Elucidar o composto químico responsável pela atividade de inibição da  $\alpha$ -amilase.

Identificar outros compostos presentes em extratos de folhas dessa espécie.

## **PARTE EXPERIMENTAL**

### **3 MÉTODOS GERAIS**

#### **3.1 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)**

##### **3.1.1 Fase estacionária**

Neste estudo foram usadas placas analíticas de sílica gel 60 com indicador de fluorescência (GF254 -Fluka) fixadas em suporte de vidro de 10 cm por 7 cm, com espessura de 0,25 mm ativadas a 110 ° C por 1 hora e placas analíticas de sílica gel 60 de 0,2 mm (Kieselgel 60 Alugram Sil G -MACHEREY – NAGEL) fixadas em suporte de alumínio.

##### **3.1.2 Preparo e aplicação da amostra**

Para aplicação na placa cromatográfica, dos extratos brutos uma alíquota foi diluída com 1 a 2 mL de solvente apropriado, já as frações, foram concentradas logo após serem coletadas. As amostras foram aplicadas com auxílio de um capilar a cerca de 1 cm da base inferior da placa para o ponto de aplicação e cerca de 1 cm entre uma amostra e outra (95).

##### **3.1.3 Sistemas de Eluição**

Na detecção de compostos fenólicos foi usado como fase móvel o eluente constituído de acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água destilada (100: 11: 11: 26) identificado como FM1 (96) e clorofórmio como sistema de eluição geral na detecção de compostos com características mais apolares, identificado como FM2.

##### **3.1.4 Reveladores (96)**

O reagente polietilenoglicol (NP/PEG) identificado como R1 foi aplicado na detecção de flavonoides e outras substâncias fenólicas devido a sua característica de intensificação da fluorescência. Foram preparadas as soluções estoques denominadas solução A: composta da solução metanólica de difenilboriloxietilamina a 2% e solução B composta da solução etanólica de polietilenoglicol 4000 (PEG 4000) a

5%. A placa cromatográfica, seca, foi borrifada com as soluções A e B respectivamente e em seguida observada em câmara de luz ultravioleta (UV) a 365 nm.

Como Revelador geral o anisaldeído sulfúrico (R2) foi utilizado. Esse reagente pode ser aplicado na detecção de esteroides, prostaglandinas, carboidratos, fenóis, glicosídeos, terpenos de modo geral (óleos essenciais) antibióticos e micotoxinas. Foram preparadas as soluções estoques denominadas solução A: composta de solução ácida de anisaldeído a 2% em ácido acético; solução B: composta de solução etanólica de ácido sulfúrico a 20%. A placa cromatográfica foi borrifada com as soluções A e B respectivamente e em seguida foi aquecida até o surgimento das bandas com auxílio de secador serigráfico.

## 3.2 CROMATOGRAFIA EM COLUNA (CC)

### 3.2.1 Fase estacionária

Poliamida (Macherey-Nagel 6) suspensa em etanol foi utilizada para preencher a CC de fase reversa, enquanto sílica gel 60 (70-230 mesh – Merck) suspensa em hexano foi o adsorvente utilizado na CC de fase normal.

### 3.2.2 Empacotamento

Foram utilizadas colunas de vidro dotadas de placas porosas com chumaço de algodão ou fibra de vidro, preenchidas com a fase estacionária suspensa em solvente apropriado e deixadas em repouso por 24 horas.

### 3.2.3 Preparo da amostra

Para a coluna de sílica gel 60 foi realizada a incorporação da amostra à sílica com obtenção de um material (amostra + sílica) com aspecto pulverulento. A amostra foi diluída em quantidade mínima de solvente com adição de quantidade mínima de sílica, seguida da eliminação do solvente em banho-maria ou rotaevaporador até a secura.

Para a coluna de poliamida a amostra foi diluída em quantidade suficiente de solvente.

### 3.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS (CLAE-DAD)

#### 3.3.1 Condições de análise

As análises em CLAE-DAD foram realizadas em equipamento (Hitachi) com coluna (LiChroCART 150-4,6 Purospher STAR RP-18e -5  $\mu\text{m}$ ) e pré-coluna (LichroCART 4-4,6 Purospher STAR RP 18e - 5  $\mu\text{m}$ ) mantidas a 25°C com fluxo de 0,6 mL por minuto e tempo de análise de 55 minutos. Os eluentes usados foram: solução a 1% de ácido fosfórico (Tédia) na bomba A e acetonitrila (Tédia) na bomba B em sistema de eluição por gradiente (Tabela1). Com intervalo de análise de 230 a 400 nm e dados extraídos em 280 e 354 nm.

Tabela 1 - Gradiente de eluição para a análise por CLAE – DAD na detecção de flavonoides (97)

Tempo em minutos	(%) Solução de ácido fosfórico a 1%	(%) Acetonitrila	Fluxo em mL/minuto
0	90	10	0,6
40	70	30	0,6
50	50	50	0,6
51	90	10	0,6
55	90	10	0,6

### 3.4 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)

Foi usado o equipamento CGEM – QP2010 Plus - Shimadzu (IE 70 eV) do Instituto de Química da Universidade de Brasília com coluna Rtx - 5MS 30 m x 0,32 mm x 0,25  $\mu\text{m}$  (5% difenil, 95% dimetilpolisiloxano) Restek; hélio como fase móvel com fluxo da coluna de 0,6 mL/min. A temperatura do injetor a 250 °C em modo de splitless e volume de injeção de 2  $\mu\text{l}$ . O programa de temperatura foi de 100 °C a 300 °C com aumento de 5 °C/min.

### 3.5 ESPECTROMETRIA DE INFRAVERMELHO (IV)

A espectroscopia de infravermelho revela os tipos de grupos funcionais presentes em uma molécula. A técnica baseia-se na absorção de várias frequências de radiação eletromagnética na região do infravermelho do espectro eletromagnético por compostos que tenham ligações covalentes, onde, cada tipo de ligação tem sua própria frequência natural de vibração e com padrões de absorção distintos para moléculas diferentes com tipos idênticos de ligações, o que ocorre, devido a leves diferenças nos ambientes em que essas ligações se encontram (98). Os espectros de infravermelho foram obtidos com auxílio do equipamento PerkinElmer – Spectrum 100 com acessório para a medição de transmitância e reflectância total atenuada (ATR), com o auxílio desse acessório a amostra pode ser analisada diretamente, tanto para amostras líquidas ou secas, sendo assim, a amostra é facilmente recuperada sem a necessidade de produção de pastilhas ou de etapas adicionais de purificação.

### 3.6 ESPECTROMETRIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

A RMN oferece informações sobre o número de átomos magneticamente distintos do isótopo estudado. O estudo de núcleos como o hidrogênio (prótons) e o carbono que são os mais comuns, permite determinar o número de cada um dos diferentes tipos de átomos não equivalentes, assim como obter informações a respeito da natureza do ambiente imediato de cada tipo, com base, por exemplo, em efeitos de desproteção de elementos eletronegativos (98). Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz) e de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) foram gerados em espectrômetro de 600 MHz (Bruker, Ascend™ 600) do Instituto de Química da Universidade de Brasília. A diferença de frequência entre o processamento de espectros de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  ocorre porque as ressonâncias dos núcleos de carbono-13 ( $^{13}\text{C}$ ) são aproximadamente 6 mil vezes mais fracas do que as ressonâncias de prótons, principalmente, em decorrência da baixa abundância natural desse isótopo do carbono que é de 1,08% e devido a razão giromagnética de um núcleo de carbono ser menor do que a do hidrogênio, de modo que, para uma determinada intensidade de campo magnético, a frequência de ressonância de um núcleo de carbono é cerca de um quarto da frequência necessária para observar ressonâncias de prótons (98).

Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em ppm. Solventes deuterados  $\text{CDCl}_3$  (Sigma Aldrich),  $\text{CD}_3\text{OD}$  e  $\text{DMSO-D}_6$  (Cambridge Isotope Laboratories) com TMS [tetrametilsilano –  $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$ ] referência interna. O TMS é usado como referência devido aos prótons de seus grupos metila serem mais blindados do que a maioria dos outros compostos conhecidos (98). Foi realizado o experimento de intensificação sem distorção por transferência de polarização, conhecido em inglês como DEPT-135 (distortionless enhancement by polarization transfer) para a determinação do número de hidrogênios ligados ao carbono: carbonos metínicos (CH); carbonos metilênicos ( $\text{CH}_2$ ); carbonos metílicos ( $\text{CH}_3$ ), carbonos quaternários não estão ligados a hidrogênio e, portanto, não aparecem nesse espectro. Carbonos metínicos e metílicos aparecem como picos positivos, enquanto carbonos metilênicos originam picos inversos.

### 3.6.1 Ensaio de atividade de inibição frente à enzima $\alpha$ -amilase

Nos testes para avaliar a atividade de inibição sobre a enzima  $\alpha$ -amilase foi utilizado o método colorimétrico para determinação de açúcares redutores descrito por Bernfeld (99) adaptado por Sigma Aldrich (100) com modificações. O método consiste em determinar a diferença de absorvância da cor gerada pela reação de redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico a 3-amino,5-nitrosalicílico (Figura 5) pelo produto da reação enzimática a  $\alpha$ -amilase e seu substrato o amido na presença e ausência de um possível inibidor dessa enzima. Para calcular a atividade de inibição da enzima da fórmula seguinte foi utilizada:

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

onde,

C = absorvância do controle negativo – absorvância do branco do substrato

A = absorvância da amostra - absorvância do branco da amostra

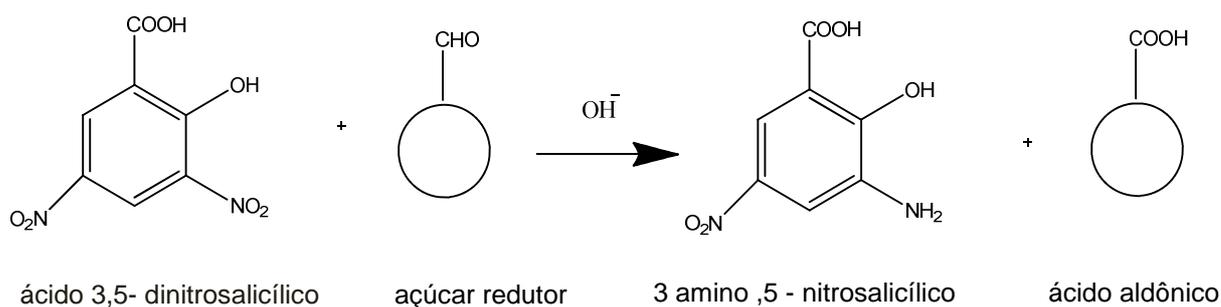


Figura 5 - Reação de redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

Adaptado de (101).

Como controle positivo para a atividade inibitória foi utilizado o pseudotetrassacarídeo de origem microbiana acarbose (Figura 6), esse hipoglicemiante é comercializado pela Bayer e tem com nome comercial Glucobay®.

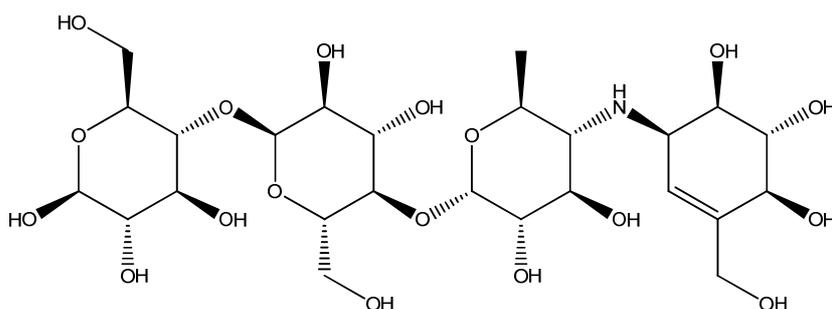


Figura 6 - Acarbose

### 3.6.1.1 Reagentes e Soluções

#### ➤ Reagente ácido 3,5 - dinitrosalicílico (DNS):

Sob agitação constante, foram dissolvidos 19,8 g de hidróxido de sódio (Vetec); 306,0 g de tartarato de sódio e potássio (Vetec); 8,3 g de bissulfito de sódio (Vetec); 10,6 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico (Sigma) e água destilada em quantidade suficiente para 1,4 L. O reagente foi acondicionado em frasco âmbar e mantido a temperatura ambiente por até 6 meses.

#### ➤ Solução tampão fosfato de sódio 0,02 M (pH 6,9) com cloreto de sódio 0,0067 M:

Preparado pela mistura de 45 mL de solução aquosa de fosfato de sódio monobásico (Vetec) 0,2 M e 55 mL de solução de fosfato de sódio dibásico (Vetec) a

0,2 M em quantidade suficiente para 1000 mL com 0,0067 M de cloreto de sódio (Vetec). O pH foi ajustado com solução de hidróxido de sódio a 1 M.

- Solução de  $\alpha$ -amilase 40 UI/mL:  
Enzima  $\alpha$ -amilase pancreática suína EC 3.2.1.1 (Sigma) dissolvida em solução tampão.
  
- Solução de amido a 1%:  
Amido solúvel (Sigma) a 1% foi dissolvido em solução tampão. Para facilitar a solubilização, a solução de amido foi mantida em banho-maria com água em ebulição por 15 minutos com agitação constante. A solução foi arrefecida a temperatura ambiente com agitação constante. O volume original da solução de amido foi ajustado com água destilada.
  
- Preparo das amostras:  
As amostras foram diluídas de modo que a concentração em 20  $\mu$ L fosse suficiente para obter a concentração desejada no tubo de teste (pré-incubação) com volume final de 1 mL. Foram usados como solvente água destilada ou mistura dimetilsulfóxido – DMSO (Dinâmica): etanol (Vetec) na proporção de 1:3. A amostra diluída foi agitada mecanicamente durante 15 segundos e mantida em repouso durante 30 minutos antes do início da etapa de pré-incubação. O ensaio foi realizado com a parte solúvel das amostras no caso do extrato hexânico, enquanto que os extratos aquoso e etanólico foram totalmente solubilizados. A princípio a amostra foi preparada a 50 mg/mL para avaliar a concentração de 1 mg/mL e para a construção da curva dose x resposta com diluições seriadas a partir dessa solução. Para a construção das curvas de dose x resposta das amostras para as quais a diluição seriada não foi adequada, foi preparada solução da amostra a 10 mg/mL e a partir dessa solução foram feitas diluições para avaliar concentrações entre 1 e 60  $\mu$ g/mL.
  
- Solução de acarbose - controle positivo:  
Foi preparada solução de acarbose (Sigma) 1 mg/mL em água destilada. A partir dessa solução foram feitas diluições e construída a curva dose x resposta com as seguintes concentrações: 0,975; 1,95; 3,9; 7,81; 15,62; 31,25 e 62,5  $\mu$ g/mL.

### 3.6.1.2 Condições do ensaio

#### Etapa de pré-incubação:

A solução do extrato (20  $\mu\text{L}$ ) e 50  $\mu\text{L}$  da solução da enzima foram adicionadas a um tubo contendo 930  $\mu\text{L}$  da solução tampão fosfato de sódio 0,02 M (pH 6,9) contendo cloreto de sódio 0,0067 M, e foram mantidos a 25 °C por 30 minutos em banho-maria.

#### Etapa de incubação:

Uma alíquota de 250  $\mu\text{L}$  da mistura preparada na etapa de pré-incubação a t foi adicionada a tubo contendo 250  $\mu\text{L}$  de solução tampão e 500  $\mu\text{L}$  de solução de amido a 1%. A nova mistura foi incubada a 40 °C em banho-maria por 20 minutos. Ao término do tempo de incubação foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  do reagente DNS a todos os tubos. Em seguida os tubos foram aquecidos em água fervente por 5 minutos e arrefecidos a temperatura ambiente.

Além das amostras foram preparados o controle positivo para a atividade da enzima e os brancos para o desconto de possíveis interferentes como a coloração do substrato, atividade amiólitica ou açúcares redutores pré-existentes no extrato além de sua coloração característica e para o ajuste da linha de base do equipamento.

Controle positivo para a atividade da enzima: tubo contendo apenas tampão, substrato e enzima. Para esse controle o volume correspondente à amostra foi substituído por tampão na etapa de pré-incubação.

Branco do substrato: tubo com solução 500  $\mu\text{L}$  de solução tampão e 500  $\mu\text{L}$  de solução de amido a 1%.

Branco do extrato: tubo contendo 500  $\mu\text{L}$  da solução de amido a 1%, 545  $\mu\text{L}$  tampão e 5  $\mu\text{L}$  da solução de extrato.

Branco do aparelho: tubo contendo apenas 1000  $\mu\text{L}$  de solução tampão.

Todos os tubos da etapa de incubação foram preparados em triplicata, exceto para a mistura de calibração do aparelho (branco do aparelho) e branco do extrato.

Após arrefecerem os volumes nos tubos foram diluídos pela adição de 4,5 mL de água destilada. Para cada preparação, uma alíquota foi transferida para uma

cubeta de plástico com caminho óptico de 1 cm e realizada a leitura da absorbância a 540 nm em espectrofotômetro ( Shimadzu, UV- 1601), previamente ajustado com a solução denominada, branco do aparelho.

## 4 PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 IDENTIFICAÇÃO DOS EXEMPLARES E COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO.

Três exemplares da espécie *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. foram identificados pelo botânico e professor Dr. Christopher William Fagg no Campus Universitário Darcy Ribeiro da Universidade de Brasília – UnB. A exsicata foi depositada no herbário da UnB (UB), sob o número CW Fagg 2296. O material botânico foi coletado em 2013 nos dias 18 de julho e 14 de agosto entre 16:00 e 18:00 horas. Foram coletadas folhas de três espécimina que apresentavam frutos verdes e poucas flores como pode ser observado na (Figura 2).

#### 4.1.1 Preparo do material botânico, folhas secas pulverizadas.

Logo após a coleta, o material botânico (folhas frescas) foi submetido à lavagem rápida com água para remoção de terra, em seguida foi colocado para secar, espalhado sobre superfície plana coberta por papel pardo, a temperatura ambiente e sombra por 1 dia, a secagem foi concluída em estufa a 37°C até que o teor de umidade do material estivesse entre 5 e 10% (102), o que levou mais 5 dias. O teor de umidade foi medido em analisador de umidade por infravermelho (modelo IV2000 versão: 4.2,1- Gehaka). As folhas secas foram então pulverizadas mecanicamente em moinho de facas. A Figura 7 mostra o aspecto das folhas.



Figura 7 - Material vegetal (folhas frescas, secas e pulverizadas) de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. para produção de extratos.

Foram coletados aproximadamente 6 kg do material botânico fresco (folhas), sendo que o teor de umidade medido após a secagem foi de 5,93%. O rendimento total do material botânico seco e pulverizado foi de 2,7612 kg, conforme mostra a (Tabela 2).

Tabela 2 - Material botânico fresco coletado, seco pulverizado e teor de umidade

Material botânico	Peso do material botânico seco pulverizado	Umidade média percentual do material botânico seco
Folhas de <i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.) Radlk.	2,7612 kg	5,93 % $\pm$ 0,008

Teor de umidade expresso como a média de (n=3)  $\pm$  desvio padrão.

#### 4.1.2 Obtenção dos extratos brutos, aquoso, hexânico e etanólico.

Para a produção dos extratos brutos, foi aplicada a proporção de (1:10) das folhas secas pulverizadas em relação ao solvente. Os métodos de extração, infusão e maceração, foram realizados com base no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (103) com modificações.

O extrato aquoso bruto (EAB) foi obtido por infusão, seguido de filtração, congelamento e liofilização. O esquema para extração pode ser visualizado na (Figura 8). O material pulverizado foi submetido à extração por infusão com água destilada aquecida à ebulição e deixada arrefecer a 70 °C. O recipiente foi tampado e o infuso deixado arrefecer a 50 °C, sendo, em seguida, submetido à filtração em papel de filtro. O filtrado foi coletado em frasco de vidro, protegido da luz. O frasco contendo a solução extrativa, preenchido com aproximadamente 50% de seu volume total, foi levado ao freezer a -30 °C para congelamento na posição inclinada e posteriormente foi submetido à secagem por liofilização (liofilizador modelo Advantage Plus XL-70, SP Scientific).

Para obtenção dos extratos hexânico e etanólico, o material pulverizado foi submetido à maceração durante sete dias com hexano (Vetec). A solução extrativa foi coletada, e em seguida o material vegetal residual (torta) da extração com hexano foi submetido à extração com etanol 95% (Vetec) nas mesmas condições. Para a extração foi utilizado percolador de aço inox. Para eliminação do solvente, as

soluções extrativas foram submetidas à evaporação do solvente sob pressão reduzida à temperatura de até 40°C com auxílio de rotaevaporador (Hei-VAP Advantage, ML, G1, 115v - Heidolph), resultando nos extratos hexânico e etanólico brutos (Figura 8).

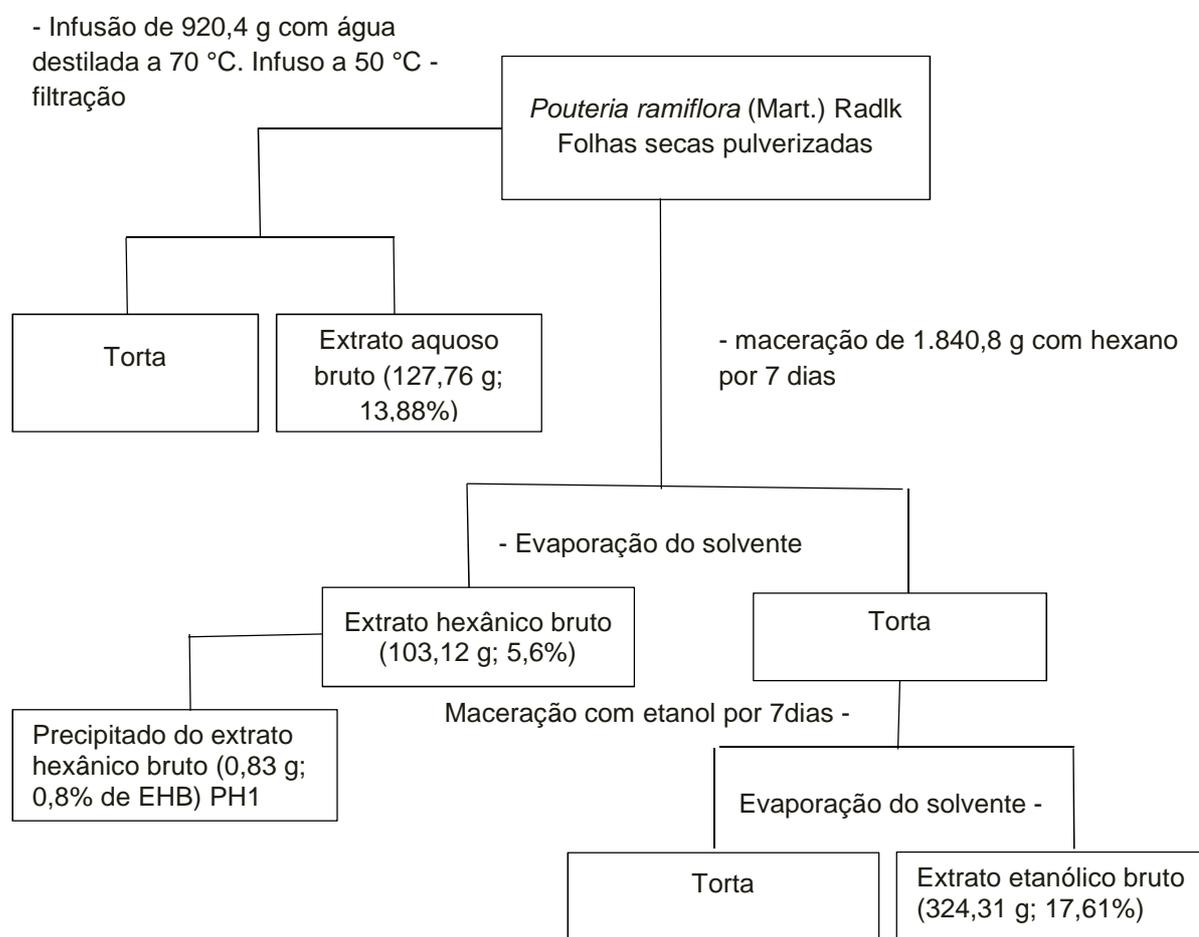


Figura 8 - Esquema para obtenção dos extratos, aquoso, hexânico e etanólico brutos de folhas de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. por infusão e maceração.

O peso total do material botânico seco pulverizado usado para a obtenção dos três extratos brutos foi de 2,7612 kg, sendo que um terço (920,4g) foi destinado ao extrato aquoso e os outros dois terços, 1.840,8 g aos extratos hexânico e etanólico. Os volumes de solventes utilizados para a extração foram de 9,2 litros de água destilada para o extrato aquoso e 18,4 litros de hexano e etanol para os extratos hexânico e etanólico respectivamente obedecendo a proporção de (1:10) do material botânico seco pulverizado em relação ao solvente. O rendimento dos extratos aquoso, hexânico e etanólico foi respectivamente, 127,76 g (13,88%), 103, 12 g (5,6%) e 324,31 (17,61%), conforme apresentado na Tabela 3.

Durante a produção do extrato bruto hexânico ocorreu formação de 0,83 g de um precipitado branco amorfo (PH1) representando 0,8% de rendimento em relação ao extrato.

Tabela 3 - Rendimento dos extratos brutos

Solvente de extração	Volume de solvente (L)	Peso do material botânico seco pulverizado (g)	Rendimento (g)	Rendimento (%)
água destilada	9,204	920,4	127,76	13,88
hexano	18,408	1.840,8	103,12	5,60
etanol	18,408	1.840,8	324,31	17,61

#### 4.1.3 Modelo esquemático para um estudo biomonitorado

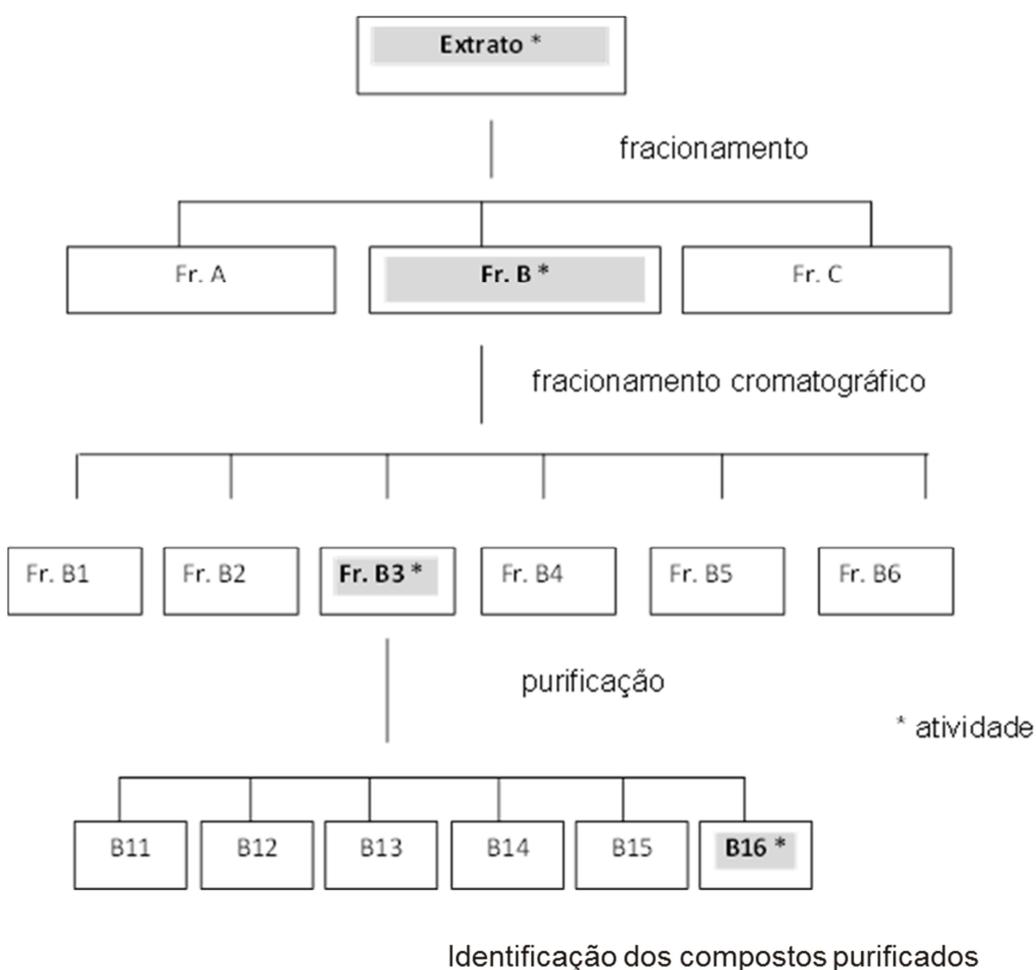


Figura 9 - Modelo esquemático para um estudo biomonitorado

#### 4.1.4 Fracionamento do extrato aquoso bruto por partição

Parte do extrato aquoso liofilizado (20 g), foi redissolvido em água na proporção 1:15 (extrato:solvente). A solução aquosa foi extraída por partição (104) primeiro com hexano (1:1), resultando na fração hexânica (FA1), e na fração aquosa intermediária, que foi extraída com acetato de etila (Vetec) (1:1) originando as frações acetato de etila (FA2) e fração aquosa (FA3), conforme mostra a (Figura 10). A fração aquosa foi liofilizada, e as frações hexânica e acetato de etila concentradas por evaporação dos respectivos solventes. Os rendimentos para as frações foram respectivamente de 0,007 g (0,035%); 0,745 g (3,7%) e 17,87 g (89,35%), conforme (Tabela 4).

Tabela 4 - Rendimento das frações da partição do extrato aquoso bruto de folhas de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk.

Nome da fração	Extrato bruto aquoso (g)	Rendimento (g)	Rendimento (%)
FA1	20	0,007	0,035
FA2	20	0,745	3,7
FA3	20	17,87	89,35

FA1 = fração hexânica; FA2 = fração acetato de etila e FA3 = fração aquosa, do extrato bruto aquoso.

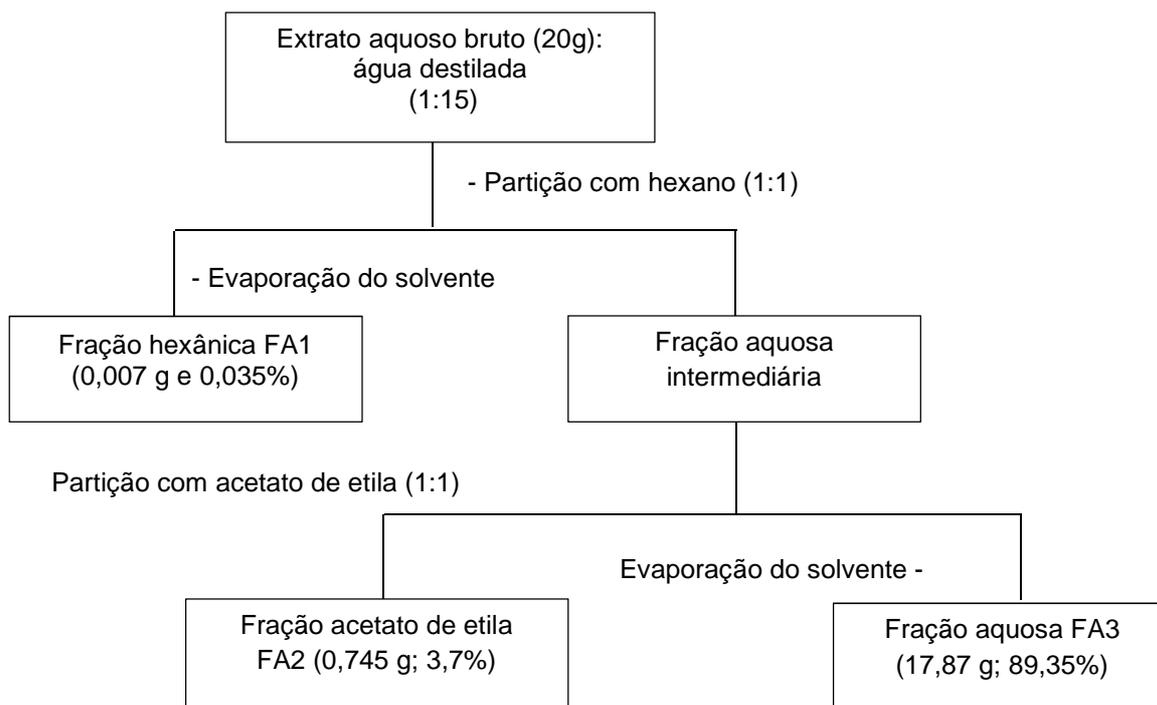


Figura 10 - Esquema de fracionamento do extrato aquoso bruto de folhas de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk por partição.

#### **4.1.5 Subfracionamento de FA3 em coluna de poliamida**

##### **4.1.5.1 Montagem e estabilização da coluna de poliamida**

Coluna de vidro com comprimento total de 1 metro e 5 cm de diâmetro, dotada de placa porosa e torneira para escoamento, preenchida com suspensão de poliamida em etanol na proporção de 5 gramas de poliamida por grama de amostra. A coluna foi preenchida e deixada em repouso por 24 horas. Um chumaço de algodão foi colocado no topo da coluna. Os solventes adicionados por gotejamento com auxílio de funil de separação acoplado ao topo da coluna. Essa foi estabilizada com a passagem exaustiva de etanol a 95% e posteriormente de água destilada. O indicativo para a conclusão dessa etapa foi a ausência de resíduos de poliamida no fundo do balão, após completa evaporação do solvente coletado. Esses solventes foram coletados em volume cinco vezes maior que o volume das frações com amostra e secos totalmente com auxílio de rotaevaporador a 60 °C. Nível de solvente sobressalente entre 10 e 30 cm.

##### **4.1.5.2 Aplicação da amostra para a coluna de poliamida**

Antes de ser adicionada à coluna, a amostra foi solubilizada em quantidade suficiente de água. Após a estabilização da coluna a amostra foi adicionada com auxílio de aparato montado no laboratório, constituído de seringa de 50 mL adaptada a tubo de vidro de 5 mm x 500 mm.

##### **4.1.5.3 Condições de análise para a coluna de poliamida**

Parte de FA3 (20 g) foi cromatografada em CC da qual foram obtidas 276 subfrações. Foi utilizado sistema de eluição por gradiente de água destilada : etanol, iniciando em água a (100%) e finalizando com etanol a (100%), com fluxo de aproximadamente 5 mL por minuto. Foram coletadas frações de 50 mL, que foram concentradas por evaporação do solvente com auxílio de rotaevaporador a 60 °C. Após concentradas, as frações foram transferidas para frasco de vidro previamente identificado e pesado. As frações coletadas foram monitoradas por CCD. Aquelas com perfis cromatográficos semelhantes foram reunidas em 16 grupos, numerados de

FA3.1 a FA3.16 (Tabela 5), e posteriormente testadas contra a enzima  $\alpha$ -amilase. Os compostos isolados e purificados foram submetidos a análises espectrométricas para identificação.

Tabela 5 - Frações obtidas no subfracionamento da fração FA3 (20g)

Grupo	Frações reunidas	Massa (g)	Rendimento %	Eluente
FA3.1	6 a 22	0,341	1,71	água
FA3.2	23 a 34	8,55	42,75	água
FA3.3	35 a 52	0,0965	0,48	água : etanol (9:1)
FA3.4	53 a 64	0,0364	0,18	água : etanol (8:2)
FA3.5	65 a 74	0,0254	0,26	água : etanol (7:3)
FA3.6	75 a 95	0,0556	0,28	água : etanol (7:3)
FA3.7	96 a 121	0,0444	0,22	água : etanol (6:4)
FA3.8	122 a 131	0,0445	0,22	água : etanol (6:4)
FA3.9	132 a 139	0,0535	0,27	água : etanol (6:4)
FA3.10	140 a 156	0,111	0,55	água : etanol (6:4)
FA3.11	157 a 223	0,2816	1,41	água : etanol (5:5)
FA3.12	224 a 234	0,029	0,15	água : etanol (4:6)
FA3.13	235 a 247	0,0513	0,26	água : etanol (4:6)
FA3.14	248 a 261	0,0178	0,09	água : etanol (3:7)
FA3.15	262 a 267	0,0238	0,12	água : etanol (2:8)
FA3.16	268 a 276	0,0781	0,39	água : etanol (9:1)

O perfil cromatográfico (FM1 e R1) para os 16 grupos das frações de FA3 (FA3.1 a FA3.16) podem ser visualizadas na Figura 11.

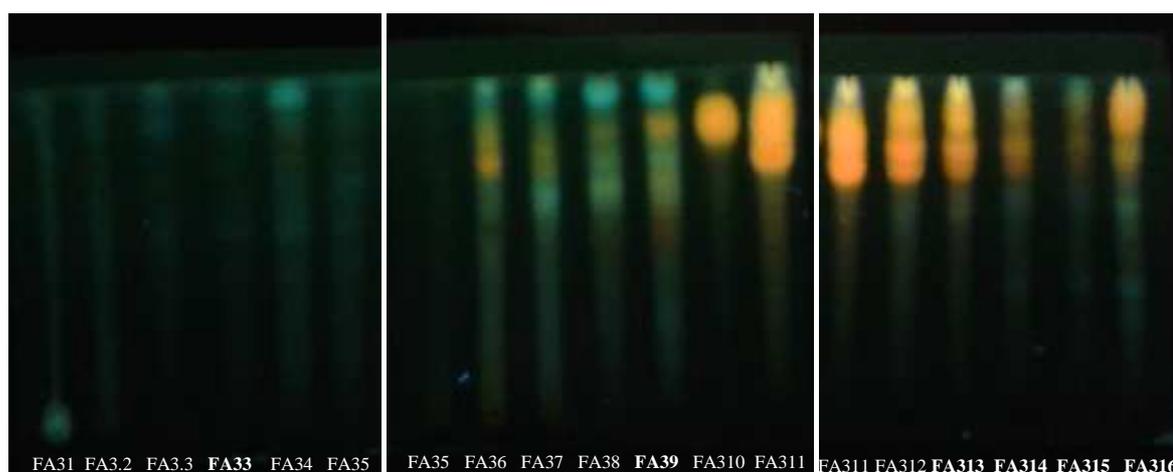


Figura 11 - CCD das 16 subfrações de FA3 (fração aquosa do extrato aquoso bruto). Revelador: NP/PEG. Fase móvel: acetato de etila:ácido acético:ácido fórmico 100:11:11; UV a 365 nm.

O perfil cromatográfico por CCD das frações de FA3 na identificação de compostos fenólicos, mostrado na Figura 11, mostra que a estratégia de separação possibilitou a obtenção de frações com grupos distintos: as primeiras frações FA3.1 a FA3.5 revelaram a presença de bandas fracas, enquanto as frações FA3.6 e FA3.9 revelaram bandas de coloração verde-azulada características da presença de ácidos fenólicos com bandas fracas de coloração alaranjada, que são características de flavonoides (96). A fração FA3.10 apresentou perfil de maior pureza em relação a outras frações no que diz respeito à presença de compostos fenólicos, pela técnica aplicada, que revelou a presença de uma única banda, enquanto as frações FA3.11 a FA3.16 mostraram a presença de mais de uma banda. Dessas, as mais evidentes características de flavonoides com bandas próximas, o que sugere um perfil semelhante para os compostos presentes nessas frações e com polaridades próximas. E ainda, bandas fracas de coloração verde-azulada que sugerem a presença de ácidos fenólicos. Pode ser que bandas de cor azul-esverdeada características de ácidos fenólicos tenham se mostrado mais fracas devido ao comprimento de onda utilizado na análise, que foi de 365 nm. A fração FA3.10 foi submetida à análise cromatográfica com outro revelador, R2, e mostrou uma segunda banda, como pode ser visualizada na Figura 12. Para a separação das substâncias presentes nessa fração foi realizada extração com acetona e as frações resultantes foram submetidas a análises cromatográficas e espectrométricas para identificação de seus componentes como descrito no item 4.1.6.

#### 4.1.6 Purificação de FA3.10

FA3.10 (111 mg), sólido amarelo amorfo. A análise por CCD de FA3.10 (FM1; R1) revelou banda alaranjada característica de flavonoides ( $f_R \sim 0,67$ ), conforme item A, placa 1 (Figura 12). A análise cromatográfica (FM1; R2), revelou banda de cor rósea ( $f_R \sim 0,82$ ), item D, placa 2 (Figura 12). FA3.10 foi então extraída com acetona e originou duas frações, fração precipitado FA3.10P (52 mg), itens B e E, placas 1 e 2 (Figura 12) e fração sobrenadante FA3.10S (53 mg), itens C e F, placas 1 e 2 (Figura 12).

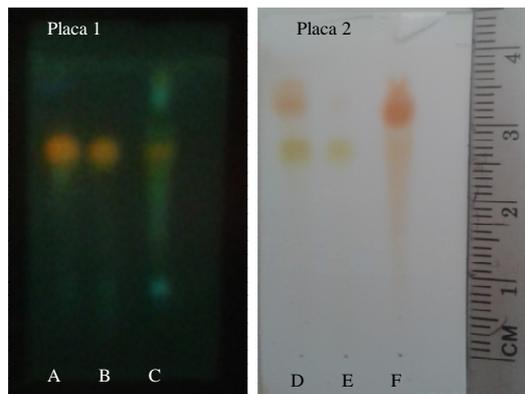


Figura 12 – CCD de \*FA3.10 e suas frações (\*FA3.10P e \*FA3.10S).

Colunas cromatográficas A e D= FA10; B e E= FA3.10P e C e F= FA3.10S. Fase móvel: acetato de etila:ácido acético: ácido fórmico 100:11:11. Placa 1 – NP/Peg + UV 365 nm. Placa 2 - anisaldeído/ $H_2SO_4$ .

FA3.10 = subfração 10 de FA3 (FA3 = fração aquosa do extrato aquoso bruto das folhas de *Pouteria ramiflora*);

FA3.10P = fração precipitado de FA3.10 em acetona;

FA3.10S = fração sobrenadante de FA3.10 em acetona.

A fração sobrenadante, FA3.10S, (item C da Figura 12) mostrou a presença de bandas azul-esverdeadas ( $f_R \sim 0,22$ ) e ( $f_R \sim 0,87$ ), além da presença banda de cor alaranjada ( $f_R \sim 0,67$ ), não antes observadas na CCD aplicada na identificação de compostos fenólicos para a fração FA3.10 (item A da Figura 12). A fração precipitado, FA3.10P, mostrou nas duas condições (itens B e E da Figura 12) a presença de uma única banda alaranjada ( $f_R \sim 0,67$ ). Essas frações foram submetidas à análise espectrométrica por CLAE-DAD a 354 e 280 nm para verificar o perfil cromatográfico por essa técnica.

#### 4.1.7 Fracionamento de PH1

O precipitado PH1 (200 mg) foi submetido à cromatografia em coluna preenchida com 24 g de sílica gel 60, na proporção de 1:120 (amostra:sílica), com sistema de eluição isocrático hexano:acetato (99:1), com fluxo de 2 mL por minuto. Foram coletadas 97 frações de 5 mL, reunidas em 5 grupos, conforme perfil cromatográfico analisado por CCD (Tabela 6).

Tabela 6 - Frações do fracionamento em coluna do precipitado do extrato hexânico bruto PH1 (0,2 g)

Grupo	Frações reunidas	Massa (g)	Rendimento (%)
1	10 a 20	0,0134	6,7
2	21 a 28	0,002	1
3	29a 56	0,1125	56,25
4	57 a 97	0,02	10

As frações (PH1.1; PH1.2; PH1.3 e PH1.4) analisadas por CCD (FM2 e revelador anisaldeído/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), conforme mostrado na (Figura 13) e os spots mostraram coloração violácea sendo que a fração PH1.1 mostrou coloração amarela antes da cor violácea. Por meio da CCD foi possível constatar que o precipitado PH1 constituiu-se de uma mistura de 3 compostos. PH1.1 (sólido branco amorfo, 13,4 mg,  $f_R \sim 0,52$ ); PH1.3 (sólido cristalino, 112,5 mg e  $f_R \sim 0,39$ ). O terceiro composto obtido como a fração PH1.4 (sólido branco amorfo, 20 mg e  $f_R \sim 0,26$ ) apresentou-se em mistura com o composto isolado na fração PH1.3.

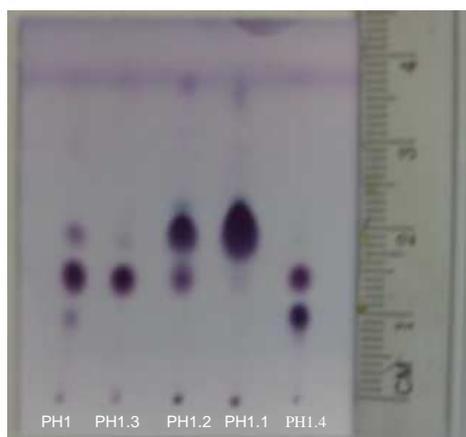


Figura 13 - CCD de PH1 e suas frações.

Eluente CHCl<sub>3</sub> e revelador anisaldeído/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

PH1 (Precipitado do extrato hexânico bruto) das folhas de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. PH1.1  $f_R \sim 0,52$ ; PH1.3  $f_R \sim 0,39$ ; PH1.4  $f_R \sim 0,39$  e  $f_R \sim 0,26$ .

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 INIBIÇÃO DA $\alpha$ -AMILASE PELOS EXTRATOS BRUTOS DE *P. ramiflora*

Os extratos brutos foram submetidos ao ensaio de atividade de inibição à enzima  $\alpha$ -amilase, conforme descrito no item 3.6.1, páginas 47 a 51. a 1mg/mL e foram comparados ao padrão acarbose a 0,0625 mg/mL (Figura 14). Os extratos que apresentaram atividade de inibição superior a 70% foram avaliados em diferentes concentrações para construção das curvas dose x resposta possibilitando a obtenção da  $CI_{50}$ .

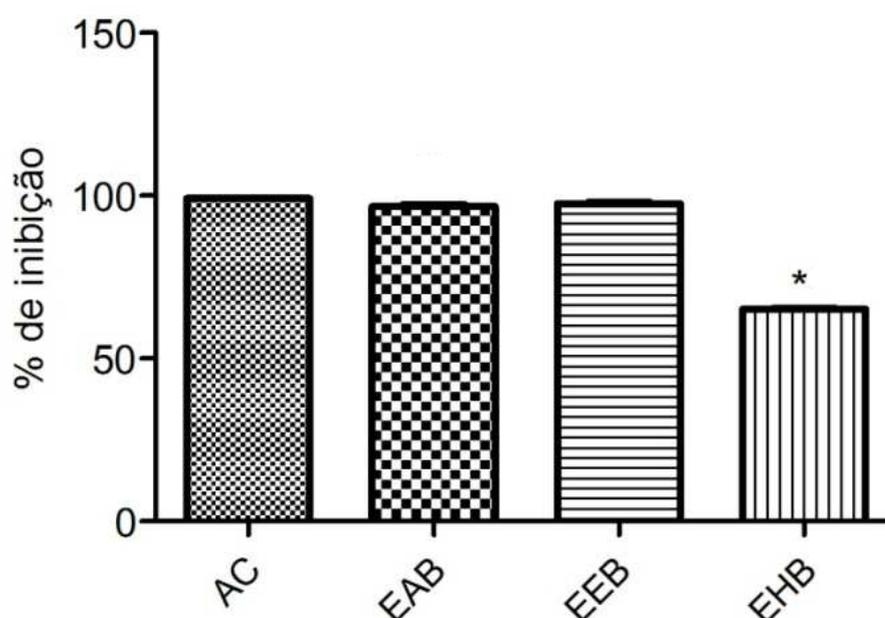


Figura 14 - Inibição da  $\alpha$ -amilase por extratos brutos de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. a 1 mg/mL em comparação ao padrão acarbose a 0,0625 mg/mL.

A atividade é expressa em %. Os resultados representam os valores da média (n=3) com erro padrão, analisados por ANOVA seguida de Tukey com  $p < 0,05$ . \* ( $p < 0,05$  x AC, EBA e EBE). AC = acarbose; EAB = extrato aquoso bruto; EEB= extrato etanólico bruto e EHB = extrato hexânico bruto.

Os três extratos avaliados inibiram a  $\alpha$ -amilase: no entanto EHB que apresentou (65,20 %  $\pm$  0,23) foi menos ativo enquanto EAB (96,72%  $\pm$  0,64) e EEB (97,55  $\pm$  0,45) apresentaram resultados significativamente semelhantes e próximos ao padrão acarbose cuja atividade foi de (99,17%  $\pm$  0,11). Para escolha do extrato mais ativo, diferentes concentrações de EAB e EEB foram avaliadas a fim de construir curva dose x resposta e definir o valor de  $CI_{50}$ .

O extrato hexânico, embora em menor porcentagem, foi ativo contra a enzima avaliada e foram identificadas substâncias que podem estar relacionadas a outras atividades biológicas como atividade antitumoral, de modo que foi realizada análise química do referido extrato na intenção de definir seu perfil fitoquímico.

### 5.1.1 $CI_{50}$ para os extratos brutos, aquoso e etanólico frente à $\alpha$ -amilase

Foram construídas curvas dose x resposta de AC, EAB e EEB (Figura 15) com as concentrações de 0,975; 1,95; 3,9; 7,81; 15,62; 31,25 e 62,5  $\mu\text{g/mL}$ , para o padrão; e de 0,975; 1,95; 3,9; 7,81; 15,62; 31,25; 62,5; 125; 250 e 500  $\mu\text{g/mL}$ , para os extratos. Foram avaliadas concentrações de forma que a concentração necessária para 50% da atividade máxima inibitória ( $CI_{50}$ ) fosse calculada. Os resultados estão representados na Figura 15.

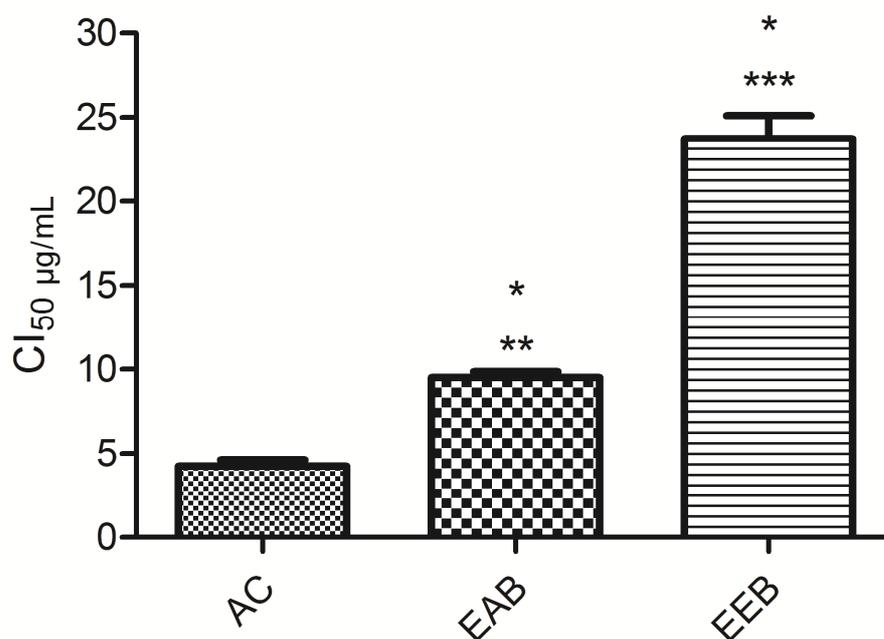


Figura 15 –  $CI_{50}$  em  $\mu\text{g/mL}$  para os extratos brutos de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. frente à  $\alpha$ -amilase em comparação ao padrão acarbose.

Os resultados expressam os valores da média ( $n=3$ ) com erro padrão, avaliados por ANOVA seguida de Tukey com  $p < 0,05$ . \* ( $p < 0,05$  x AC); \*\* ( $p < 0,05$  x EBE) e \*\*\* ( $p < 0,05$  x EBA). AC = acarbose; EAB = extrato aquoso bruto; EEB= extrato etanólico bruto.

Os extratos brutos, aquoso e etanólico foram os mais promissores em comparação ao padrão acarbose com ( $CI_{50} = 4,2 \mu\text{g/mL}$ ), corroborando achados da

literatura que mostram em estudos anteriores realizados para a espécie, a sua atividade de inibitória da  $\alpha$ -amilase sendo mais evidente em extratos com características mais polares (23-25). EAB apresentou ( $CI_{50} = 9,5 \mu\text{g/mL}$ ) significativamente menor do que EEB ( $CI_{50} = 24,2 \mu\text{g/mL}$ ), o que levou à escolha desse extrato para a condução do estudo fitoquímico biomonitorado por ensaio enzimático frente à enzima  $\alpha$ -amilase.

## 5.2 INIBIÇÃO DA $\alpha$ -AMILASE PELAS FRAÇÕES OBTIDAS POR PARTIÇÃO DO EXTRATO AQUOSO BRUTO DE *P. ramiflora*

As frações oriundas da partição de EBA (Tabela 5; Figura 11: página 58), foram avaliadas quanto à capacidade de inibir a enzima  $\alpha$ -amilase. Das frações provenientes da partição de EAB, a fração aquosa (FA3) foi a que apresentou maior porcentagem de inibição ( $96,97\% \pm 0,44$ ) em comparação as frações hexânica ( $37,78\% \pm 3,9$ ) e fração acetato de etila ( $61,8\% \pm 0,7$ ) e semelhante àquela apresentada pelo extrato bruto EAB ( $96,72\% \pm 0,64$ ) (Figura 16).

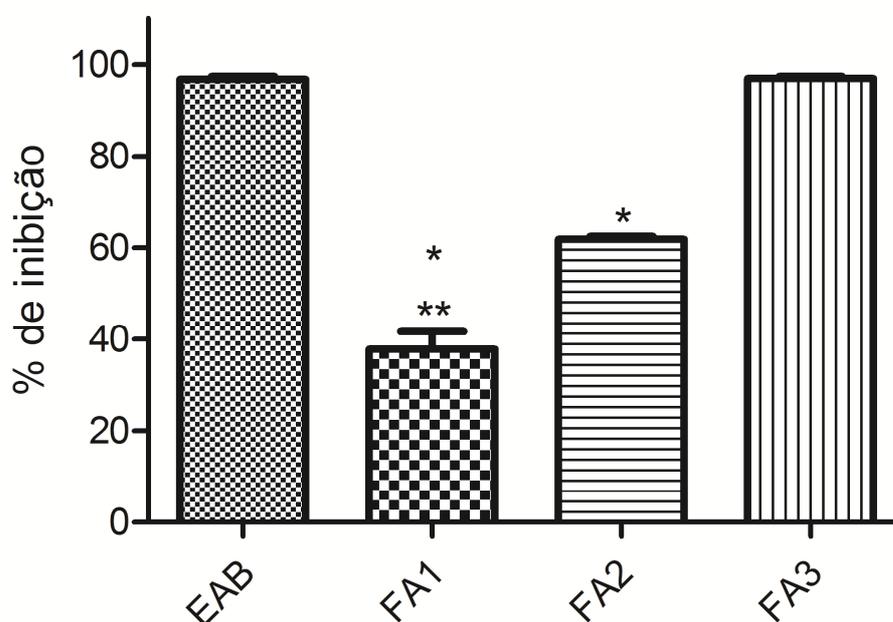


Figura 16 - Inibição da  $\alpha$ -amilase por extrato aquoso bruto de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. e frações provenientes da partição desse extrato a 1 mg/mL.

A atividade é expressa em % de inibição. Os resultados representam os valores da média (n=3) com erro padrão, avaliados por ANOVA seguida de Tukey com  $p < 0,05$ . \* ( $p < 0,05$  x EAB e FA3) e \*\* ( $p < 0,05$  x FA2). EAB= extrato aquoso bruto; FA1 = fração hexânica; FA2 = fração acetato de etila e FA3 = fração aquosa.

A  $CI_{50}$  dessa fração foi obtida com a construção da curva dose x resposta. A capacidade de inibição frente à enzima avaliada permaneceu semelhante ao avaliado para o extrato bruto (Figura 17).

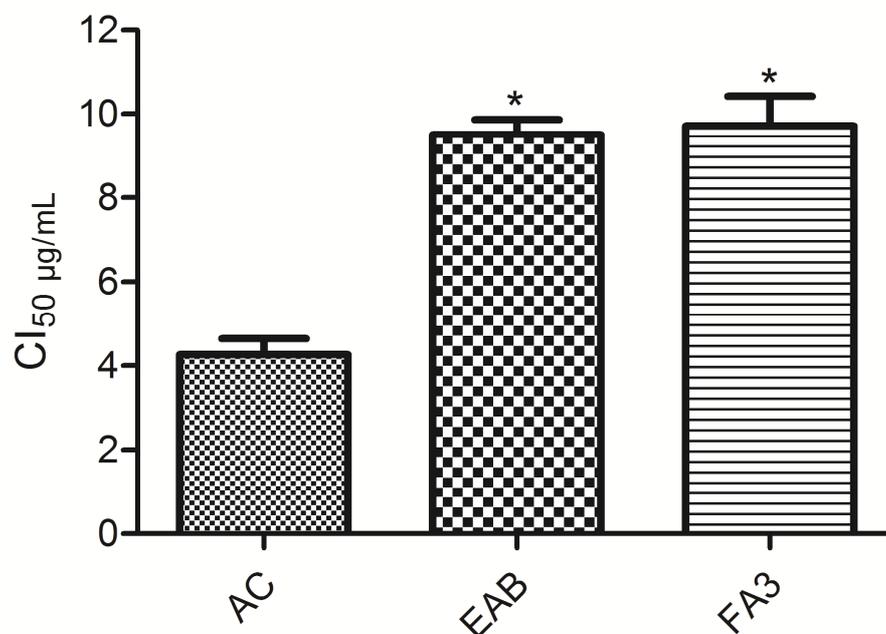


Figura 17 -  $CI_{50}$  em µg/mL para o extrato bruto aquoso de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. e sua fração aquosa frente à enzima  $\alpha$ -amilase em comparação ao padrão acarbose.

Os resultados expressam os valores da média (n=3) com erro padrão, avaliados por ANOVA seguida de Tukey com  $p < 0,05$ . \* ( $p < 0,05$  x AC). AC = acarbose; EAB = extrato aquoso BRUTO e FA3 = fração aquosa do extrato bruto aquoso.

Dessa forma FA3 foi escolhida para dar continuidade ao estudo fitoquímico biomonitorado. A fração FA3 foi submetida a CC de poliamida, da qual 276 subfrações foram coletadas e reunidas em 16 grupos. Desses, 8 grupos (FA3.8; FA3.9; FA3.10; FA3.12; FA3.13; FA3.14; FA3.15 e FA3.16) foram ativos contra a enzima avaliada em aproximadamente 40% (Figura 18). Contudo, a atividade foi menor que a fração original FA3 e o extrato bruto EBA.

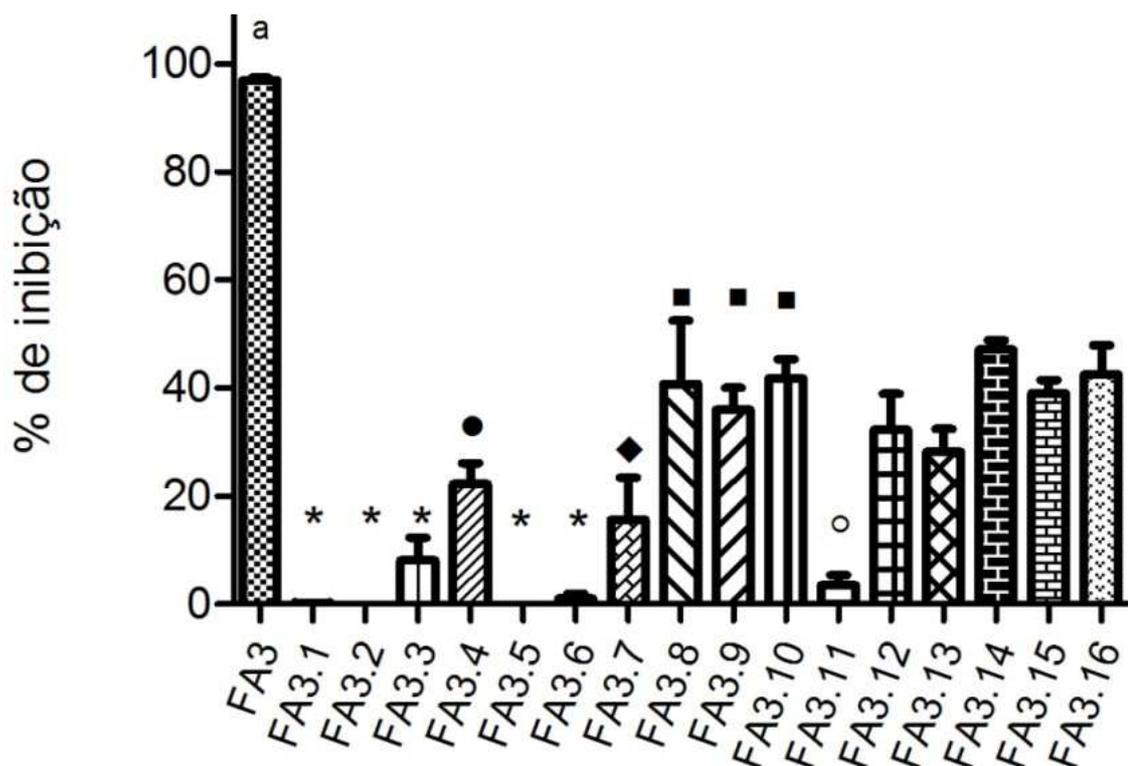


Figura 18- Inibição da  $\alpha$ -amilase por frações de FA3 a 0,2 mg/mL.

FA3 = fração aquosa do extrato aquoso bruto (EAB) de *Pouteria ramiflora*. A atividade é expressa em %. Os resultados representam os valores da média (n=3) com erro padrão, avaliados por ANOVA seguida de Tukey com  $p < 0,05$ . a ( $p < 0,05$  x FA3.1 a FA3.16); \* ( $p < 0,05$  x FA3.8 a FA3.10 e FA3.12 a FA3.16); • ( $p < 0,05$  x FA3.14) ♦ ( $p < 0,05$  x FA3.8, FA3.10, FA3.14 e FA3.16); ■ ( $p < 0,05$  x FA3.8, FA3.11) e ○ ( $p < 0,05$  x FA3.12 a FA3.16). FA3 = fração aquosa e FA3.1 a FA3.16, grupos de subfrações de FA3.

### 5.3 PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CLAE-DAD DE EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES

Os extratos brutos EAB e EEB e as frações FA3 (fração aquosa) e FA2 (fração acetato de etila) oriundas da partição do extrato bruto EAB (Figura 10: página 56) foram analisados por CLAE-DAD, utilizando o método descrito no item 3.3, página 45. Foram utilizados dois comprimentos de onda: 354 nm (Figuras 19, 20, 24 e 25) e 280 nm (Figuras 22,23,26 e 27). Em todos os espectros é possível observar a presença de um pico dominante, além de diversos outros de menor intensidade. O pico majoritário ( $t_R = 27,4$  min.) presente nos cromatogramas extraídos no comprimento de onda a 354nm de EBA, EBE, FA3 e FA2 apresentou máximos de  $\lambda$  262 e 349, com pureza de 100% e similaridade  $> 99\%$  com o flavonoide miricitrina em comparação ao padrão analítico (Sigma-Âldrich), a confirmação se deu através de análise com adição de padrão e a intensificação

desse pico, o espectro desse composto é mostrado na Figura 28. Foi construída curva de calibração com concentrações variando de 6,2 a 1000 µg/mL desse padrão, e a equação da reta obtida foi ( $y = 117662x + 244022$ ) com  $r = 0,99$ , dessa forma foi determinado o teor de miricitrina em (mg/mL) de amostra (extrato ou fração): EAB = 8,4 ( $\pm 0,55$ ) µg/mg; EEB = 7,4 ( $\pm 0,03$ ) µg/mg; FA3 = 2,09 ( $\pm 0,02$ ) µg/mg e FA2 = 84,1 ( $\pm 1,4$ ) µg/mg.

Embora todas essas amostras tenham sido ativas tenham algum teor desse flavonoide, a fração FA2 - menos ativa apresenta um teor muito superior ao da fração mais ativa - FA3, o que sugere que esse composto embora possa contribuir com a atividade, não é - sozinho - o responsável por ela. A presença desse composto também pode ajudar a esclarecer outras atividades apresentadas por essa espécie, tais como o efeito neuroprotetor contra danos oxidativos e expressão da miosina-Va e a capacidade de prevenir perda hipocampal neuronal nos subcampos CA3 e hilo de ratos diabéticos do extrato hidroalcoólico (etanol a 50%) de *P. ramiflora* (22). Esses efeitos podem estar relacionados à miricitrina, que além de ser marcador do gênero *Pouteria*, tem comprovado efeito antipsicótico (105) e antinociceptivo (106) via inibição da proteína quinase C (PKC) e óxido nítrico (NO), e apresenta ainda atividade anti-inflamatória, antioxidante e antifibrótica (107).

Esse estudo avaliou o potencial do extrato de *P. ramiflora* como agente hipoglicemiante pelo mecanismo de retardamento da absorção de carboidratos. Miricitrina foi o flavonoide em maior proporção identificado nos extratos e frações mais ativos (EAB, EEB, FA3 e FA2). E os resultados obtidos mostraram que esse composto tem uma importante contribuição, porém, não é o único responsável pela atividade avaliada. A presença de miricitrina pode ainda sugerir outro mecanismo de ação, via inibição da proteína quinase C (PKC) e óxido nítrico (NO), no tratamento de DM, promovendo a sensibilização à ação da insulina e/ ou a minimização dos efeitos causados pelo estresse oxidativo que ocorre em função da condição de hiperglicemia permanente que acomete os pacientes diabéticos, semelhante à prática de exercícios físicos e/ou da metformina.

O desequilíbrio no metabolismo de carboidratos leva a um quadro de hiperglicemia, associado ao aumento na produção de radicais livres e depleção nos sistemas fisiológicos de defesa antioxidante (estresse oxidativo), quase sempre acompanhado por alterações metabólicas como disfunções lipídicas e proteicas

(108). À hiperglicemia crônica estão associadas complicações de longo prazo que incluem disfunção e falência de órgãos e tecidos afetando principalmente olhos, rins, coração, nervos e vasos sanguíneos (81).

A prática de exercícios físicos atua na AMPK (proteína-quinase dependente de adenosina monofosfato - AMP) ativada pelo aumento de  $[AMP]/[ATP]$ , auxilia na perda de peso. A perda de peso tem ação direta no tecido adiposo, redução de triacilgliceróis, também chamados de triglicerídeos, com efeito na redução da carga lipídica, aumento da capacidade de armazenamento lipídico no tecido adiposo e restauração da sensibilidade à insulina. Metformina exerce efeito semelhante: atua na AMPK ativada e tem como efeito o aumento da captação da glicose pelo músculo e redução da produção de glicose pelo fígado.

Outros flavonoides apresentam atividade de inibição da enzima amilase. A atividade para alguns dos derivados da quercetina foi também descrita. Contudo, enquanto as agliconas (quercetina e miricetina) apresentaram atividade em torno de 80%, os derivados de quercetina, tais como rutina e quercetrina, foram menos ativos em cerca de 40% (109, 110). Esse resultado é esperado, uma vez que a porção ativa é a aglicona. A justificativa para a presença de inibidores de amilases em plantas pode ser um mecanismo de proteção contra predadores como insetos que se alimentem do amido (111).

### 5.3.1 Cromatogramas por CLAE-DAD a 354 nm de EAB e EEB

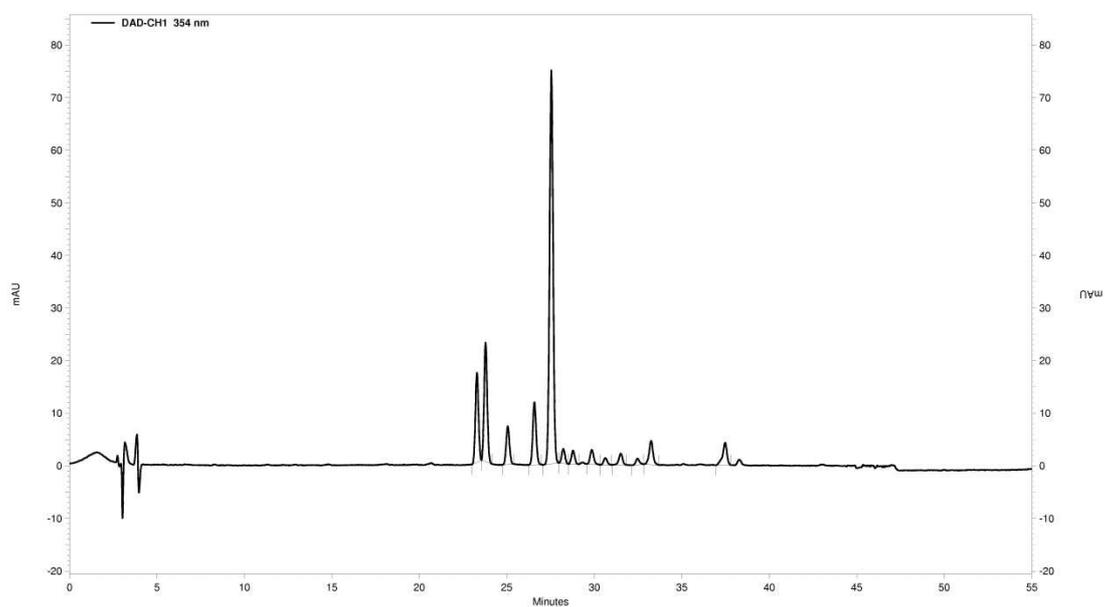


Figura 19 - Cromatograma por CLAE-DAD a 354 nm de EAB

EAB: extrato aquoso bruto de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. 2 mg/mL

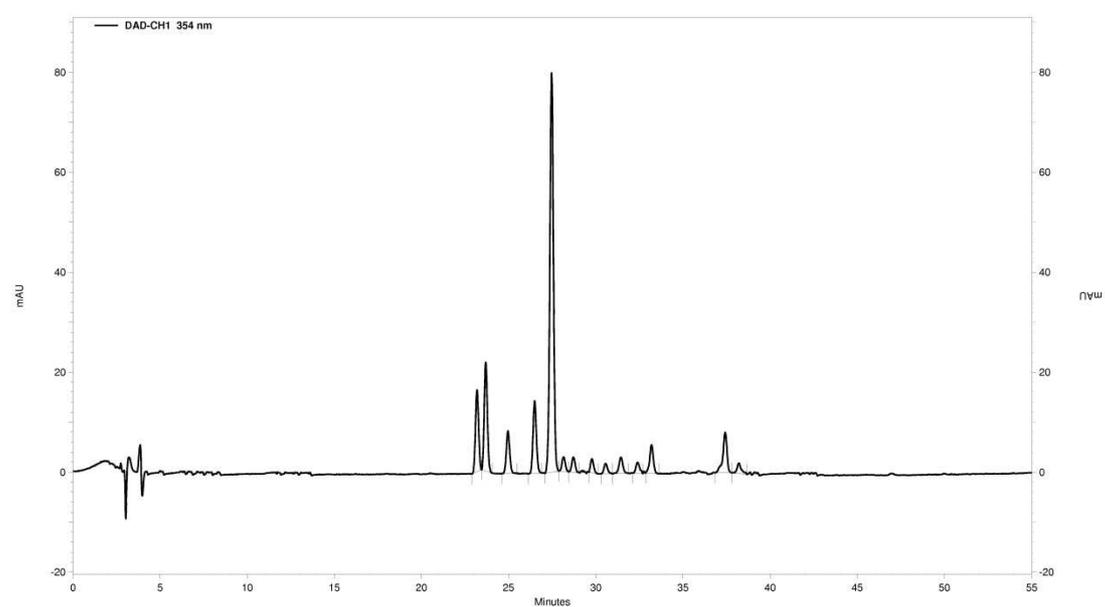


Figura 20 - Cromatograma por CLAE-DAD a 354 nm de EEB

EEB: extrato etanólico bruto de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. 2 mg/mL

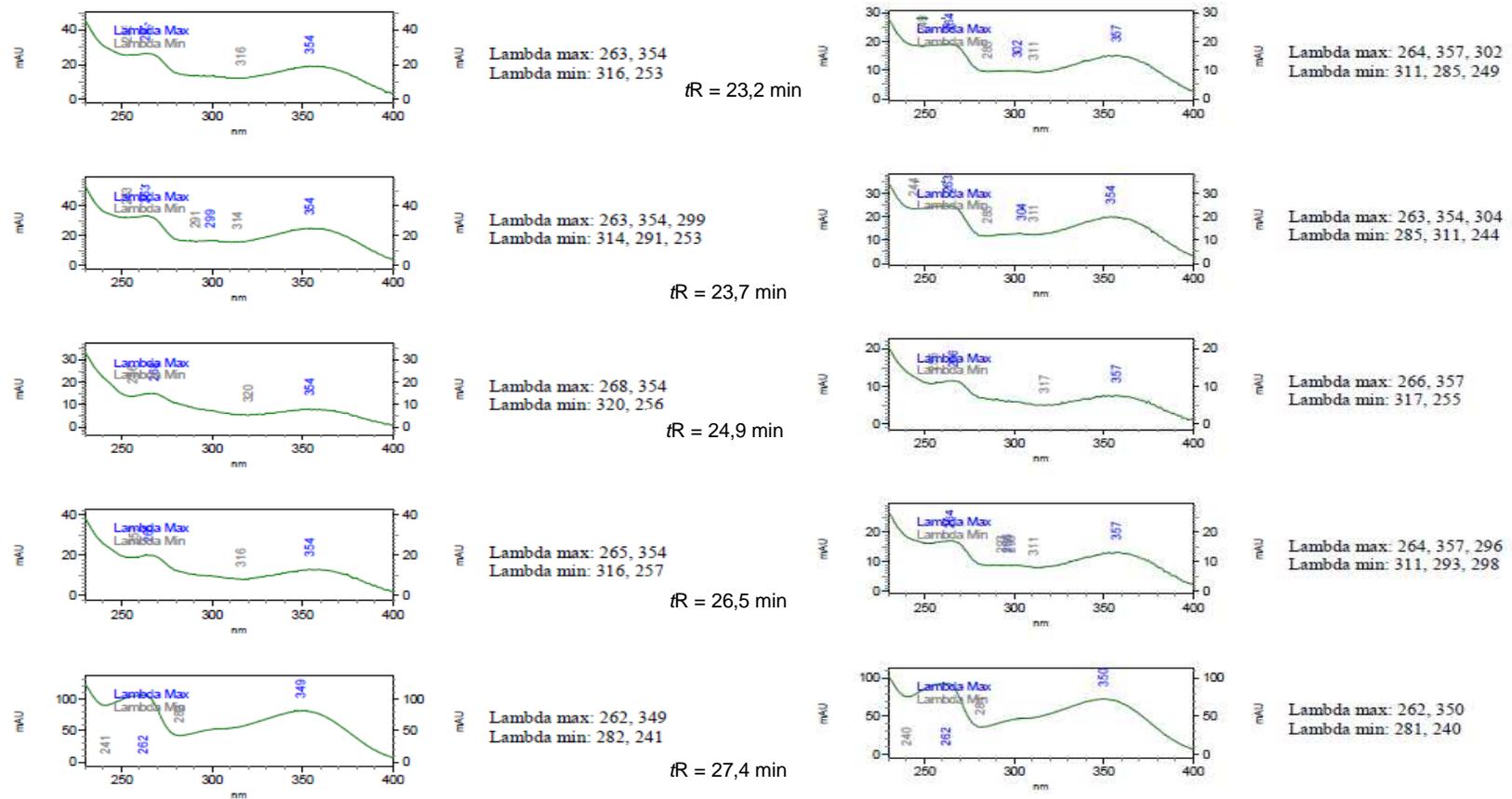


Figura 21 - Espectros de UV por CLAE-DAD a 354 nm para picos de EAB e EEB

Espectro de UV para os 5 picos de maior área e de elevado índice de pureza dos cromatogramas obtidos por CLAE – DAD a 354 nm. Coluna da esquerda: EBA (extrato aquoso bruto); coluna da direita: EEB (extrato etanólico bruto) de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk.

### 5.3.2 Cromatogramas por CLAE-DAD a 280 nm de EAB e EEB

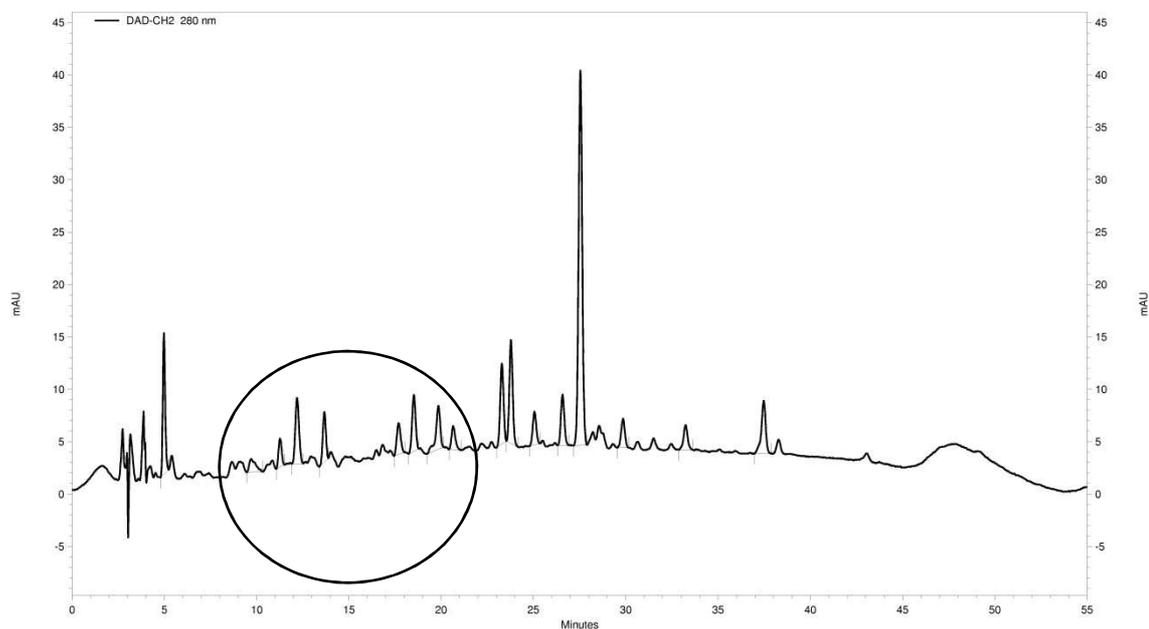


Figura 22 - Cromatograma por CLAE-DAD a 280 nm de EAB  
EAB: extrato aquoso bruto de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. 2mg/mL

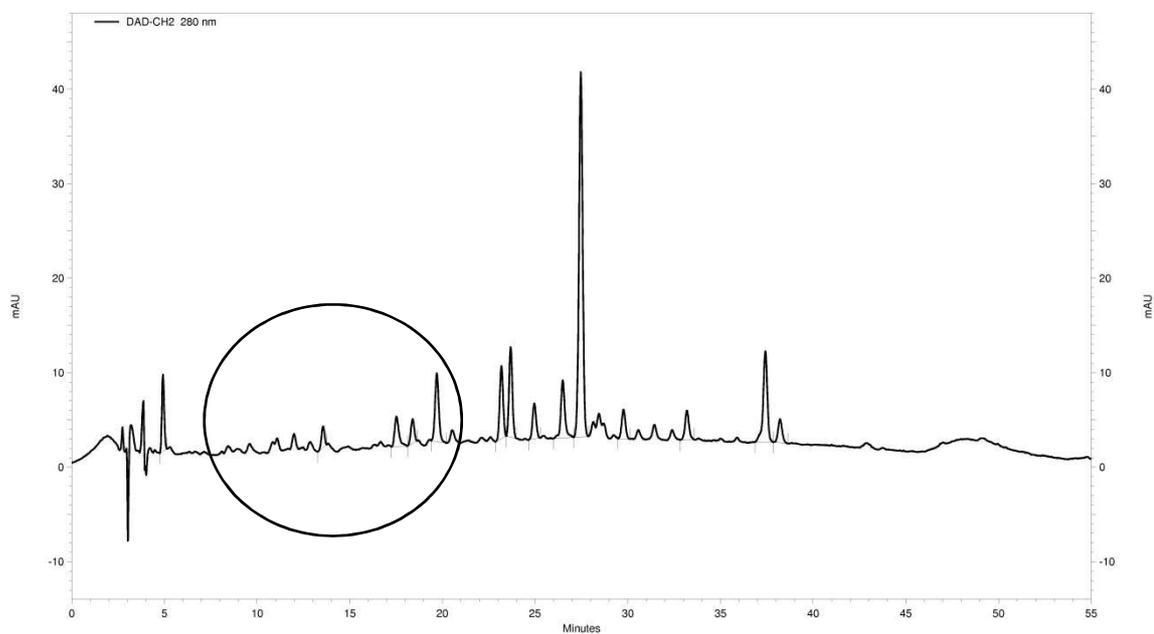


Figura 23 - Cromatograma por CLAE-DAD a 280 nm de EEB  
EEB: extrato etanólico bruto de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. 2mg/mL

O perfil cromatográfico para os extratos brutos EAB e EEB por CLAE-DAD em 354 nm são semelhantes na quantidade e intensidade de picos mostrados. No entanto, para os espectros obtidos em 280 nm, apesar de aparecem picos, na região entre 7 e 20 minutos, esses são menos intensos para EEB quando comparados aos picos dessa região para EAB. Catequinas eluem nessas condições no intervalo de tempo destacado e tem comprovada atividade inibitória da  $\alpha$ -amilase; portanto, diferenças na intensidade desses componentes podem ajudar a explicar a diferença de atividade entre esses extratos quando comparados os valores de  $CI_{50}$ .

### 5.3.3 Cromatogramas por CLAE-DAD a 354 nm de FA3 e FA2

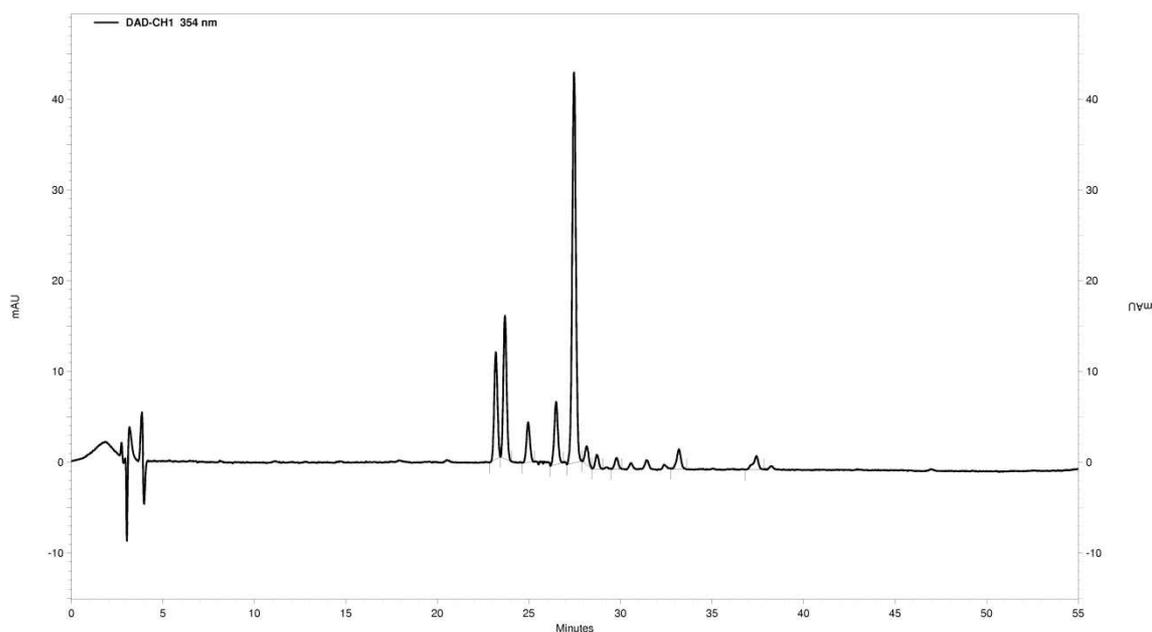


Figura 24 - Cromatograma por CLAE-DAD a 354 nm de FA3

FA3 = fração aquosa do extrato aquoso bruto de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. 2mg/mL

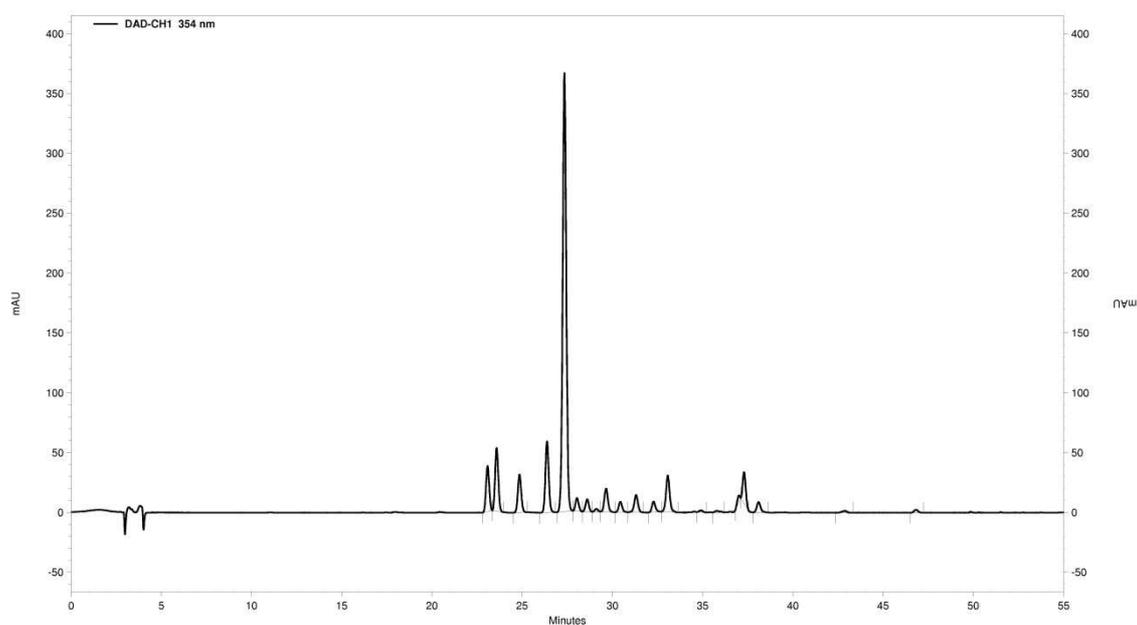


Figura 25 - Cromatograma por CLAE-DAD a 354 nm de FA2  
FA2 = fração acetato de etila do extrato aquoso bruto de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. 1mg/mL

As frações FA3 e FA2, apesar de terem apresentado uma atividade biológica muito diferente, mostraram perfis cromatográficos muito semelhantes. Contudo, a fração menos ativa FA2 apresenta maior intensidade dos picos nos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD em relação a FA3, que foi a fração que apresentou maior atividade. Apesar dos compostos visualizados por essa técnica terem comprovada atividade inibitória da  $\alpha$ -amilase, como flavonoides, ácidos fenólicos e catequinas, outros compostos que não foram identificados pelas técnicas aplicadas podem também contribuir para a atividade apresentada por FA3; ou – ainda - essa atividade pode estar relacionada a sinergismo entre componentes dessa fração.

### 5.3.4 Cromatogramas por CLAE-DAD a 280 nm de FA3 e FA2

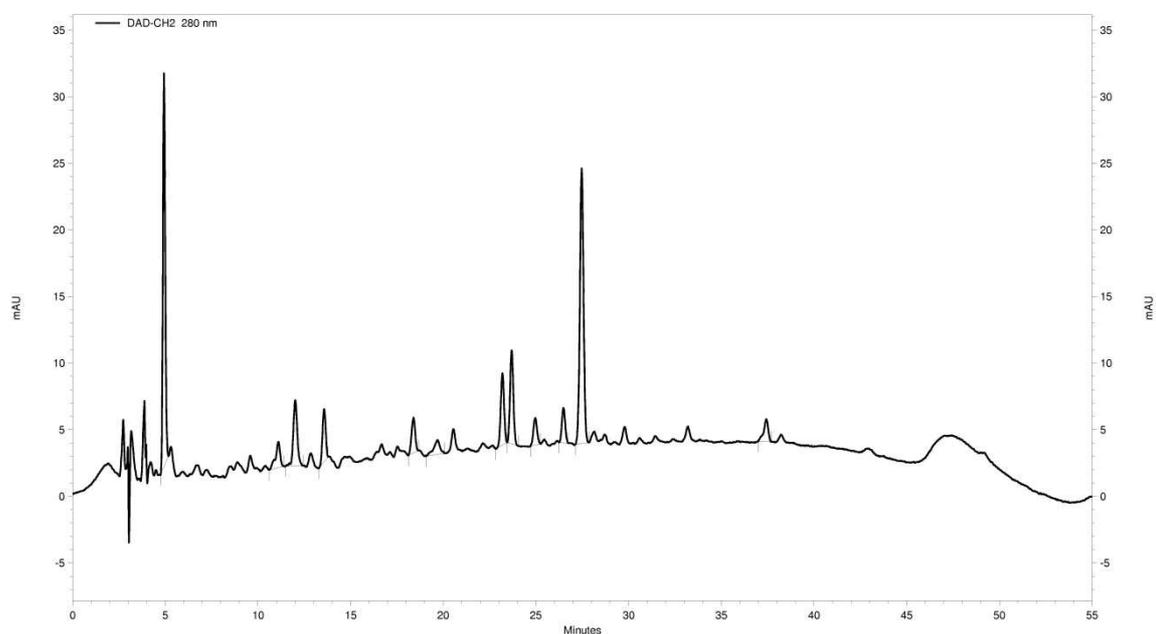


Figura 26 – Cromatograma por CLAE-DAD a 280 nm de FA3  
FA3 = fração aquosa do extrato aquoso bruto de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. 2mg/mL

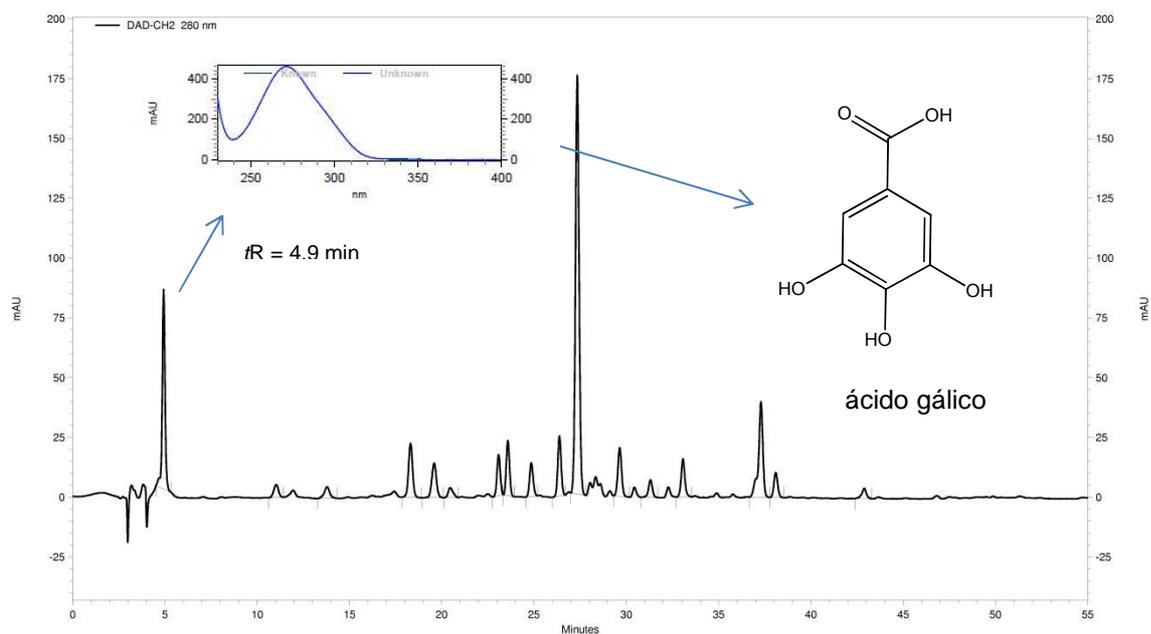


Figura 27 - Cromatograma por CLAE-DAD a 280 nm de FA2 com espectro do pico no  $t_R$  4,9 min.  
FA2 = fração acetato de etila do extrato aquoso bruto de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. 1 mg/mL

Nos cromatogramas de EBA, EBE, FA3 e FA2 extraídos no comprimento de onda 280 nm, o pico no  $t_R = 4,9$  min. apresentou máximo de  $\lambda$  271 nm, com pureza e similaridade > 99% com o ácido gálico, em comparação com o padrão analítico (Sigma-Âldrich). Foi construída curva de calibração com concentrações variando de 6,2 a 100  $\mu\text{g/mL}$  desse padrão, e a equação da reta obtida foi ( $y = 128998x - 282649$ )  $r = 0,99$ , com a qual foi determinado o teor de ácido gálico em (mg/mL) de amostra (extrato ou fração): EAB =  $4,2 (\pm 0,015)$   $\mu\text{g/mg}$ ; EEB =  $3,64 (\pm 0,02)$   $\mu\text{g/mg}$ ; FA3 =  $5,79 (\pm 0,02)$   $\mu\text{g/mg}$  e FA2 =  $30,91 (\pm 10,4)$   $\mu\text{g/mg}$ .

Ácido gálico é largamente distribuído no reino vegetal quer na forma livre, quer conjugado, formando grandes moléculas poliméricas (taninos). Apresenta várias atividades biológicas tais como hepatoprotetora (112), anti-inflamatória (113), antioxidante (114, 115) e anti-obesidade (116). Camundongos submetidos à dieta com alta taxa de gordura, quando tratados com ácido gálico, apresentaram redução do peso corporal (não associado a redução da ingestão), além de apresentarem uma melhora na homeostase lipídica e glicídica. Ácido gálico foi capaz de reduzir a esteatose hepática e atuar na resistência a insulina (116). Por outro lado, Hara e Honda (1990), avaliando a atividade de polifenóis de chá verde sobre a-amilase da saliva humana, mostraram que ácido gálico não apresentou atividade de inibição. Contudo, esse composto fenólico, quando esterificado com teaflavina, fez com que a concentração inibitória fosse reduzida de  $CI_{50}=18 \mu\text{M}$  (teaflavina), para  $CI_{50}=1 \mu\text{M}$  (monogalato de teaflavina) (117).

Assim, a presença desse composto fenólico pode justificar algumas atividades biológicas de extratos de folhas de *P. ramiflora*.

### 5.3.5 Análise espectrométrica de FA3.10P

A fração FA3.10 (fração precipitado em acetona) oriunda da purificação de FA3 (fração aquosa de EAB) conforme descrito no item 4.1.6, páginas 55 a 60, foi submetida à análise por CLAE-DAD (Figura 30) apresentando um único pico no  $t_R = 27,43$  min. O espectro de UV em MeOH, extraído no comprimento de onda 354 nm, apresentou máximos de  $\lambda$  262 e 349. A comparação com o cromatograma e o espectro de UV do padrão analítico miricitrina (Sigma- Âldrich) mostrou 100% de similaridade. Dessa forma esse resultado permitiu identificar FA3.10P como o composto miricitrina (**1**), pela primeira vez isolado de *Pouteria ramiflora*.

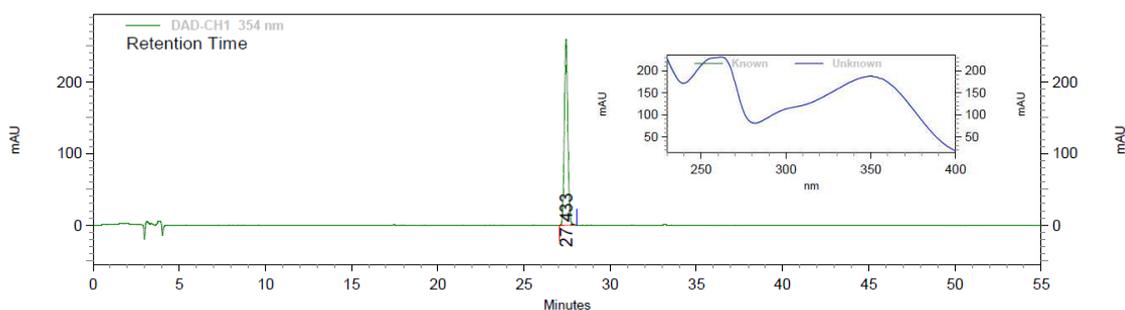


Figura 28 – Cromatograma de FA3.10P por CLAE-DAD a 354 nm e espectro do pico  $t_R = 27,43$  sobreposto ao espectro do padrão analítico miricitrina

Condições de análise: coluna LiChroCART 150-4,6 Purospher STAR RP-18e (5  $\mu$ m) com pré-coluna LichroCART 4-4,6 Purospher STAR RP 18e (5  $\mu$ m), mantida a 25°C. Fluxo de 0,6 mL /min e tempo de análise de 55 minutos. Gradiente de eluição: solução a 1% de ácido fosfórico (bomba A) e acetonitrila (bomba B). Intervalo de análise de 230 a 400 nm. Dados extraídos a 354 nm.

O espectro de infravermelho (Figura 29) de FA3.10 mostrou banda larga de absorção em torno de  $3300\text{ cm}^{-1}$  característica de estiramento de ligação O-H de grupos hidroxila, bandas em  $2943\text{ cm}^{-1}$  e  $2879\text{ cm}^{-1}$ , características de estiramento de ligação C-H. Banda em  $1651\text{ cm}^{-1}$ , atribuída a estiramento de ligação dupla C=O. Ainda, uma banda em  $1604\text{ cm}^{-1}$  característica de estiramento de ligações duplas C=C em anéis aromáticos. Banda intensa em  $1197\text{ cm}^{-1}$  característica de vibração de estiramento de ligação C-O (98).

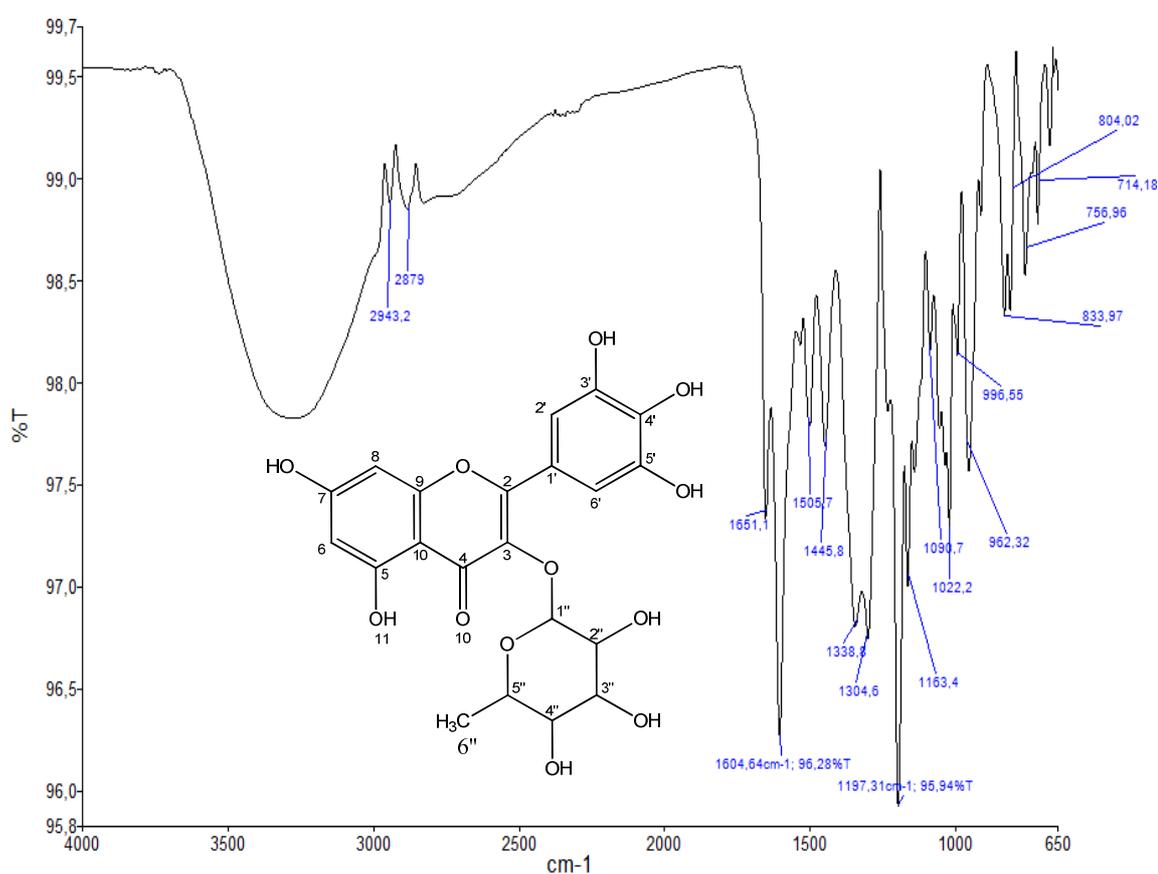


Figura 29- Espectro de Infravermelho de FA3.10P

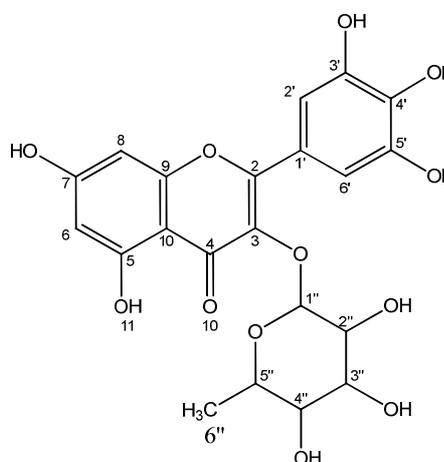
FA3.10P = fração precipitado em acetona da fração aquosa do extrato aquoso bruto das folhas de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figuras 30 e 31) apresenta forte singletto em  $\delta$  6,95, característico dos hidrogênios H2' e H6' (1H) e os dupletos em  $\delta$  6,36 e  $\delta$  6,20 de H8 ( $J = 2,2$  Hz; 1H) e H6 ( $J = 2,2$  Hz; 1H) dupletto em  $\delta$  5,32 de H1'' ( $J = 1,5$  Hz; 1H), duplo dupletto em  $\delta$  4,23 de H2'' ( $J = 3,5; 1,7$  Hz), duplo dupletto entre  $\delta$  3,78 e 3,80 H3'' ( $J = 9,5; 3,3$  Hz) e dupletto em  $\delta$  0,97 de H6'' ( $J = 6,2$  Hz; 3H) (118).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 32) apresenta perfil característico de compostos com anéis aromáticos devido aos sinais na região entre  $\delta$  175,0 e  $\delta$  100,0 (98), no entanto a carbonila em C4 foi definida pelo sinal em  $\delta$  179,7 os sinais na região em  $\delta$  99,86 e  $\delta$  94,74 são característicos dos carbonos C6, C8 da aglicona e um sinal correspondente ao C1'' do glicosídeo aparece nessa região em  $\delta$  103,65 e é característico do carbono anomérico do açúcar residual em flavonoides-O-glicosídeos (119). Além desse, os sinais entre  $\delta$  71,92 e 73,4 também estão na região do glicosídeo juntamente com C6'' que aparece como um sinal característico de carbono metílico em  $\delta$  17,7. A comparação dos deslocamentos químicos apresentados por FA3.10P com dados da literatura (118-120) mostrou sinais idênticos àqueles apresentados pelo flavonoide miricitrina já isolado em outras espécies conforme mostrado na (Tabela 07).

Tabela 7 - Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de FA3.10P (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) em comparação com dados descritos da literatura para miricitrina (118).

C	FA3,10P	Miricitrina (118)
C-2	158,53	159,4
C-3	136,35	136,3
C-4	179,7	179,6
C-5	163,21	163,1
C-6	99,86	99,8
C-7	165,88	165,9
C-8	94,74	94,7
C-9	159,49	158,4
C-10	105,92	105,8
C-1'	121,98	121,8
C-2'	109,66	109,2
C-3'	146,88	146,8
C-4'	137,93	137,8
C-5'	146,88	146,8
C-6'	109,66	109,2
C-1''	103,65	103,6
C-2''	72,08	71,8
C-3''	72,17	72,0
C-4''	73,4	73,3
C-5''	71,92	72,0
C-6''	17,7	17,6



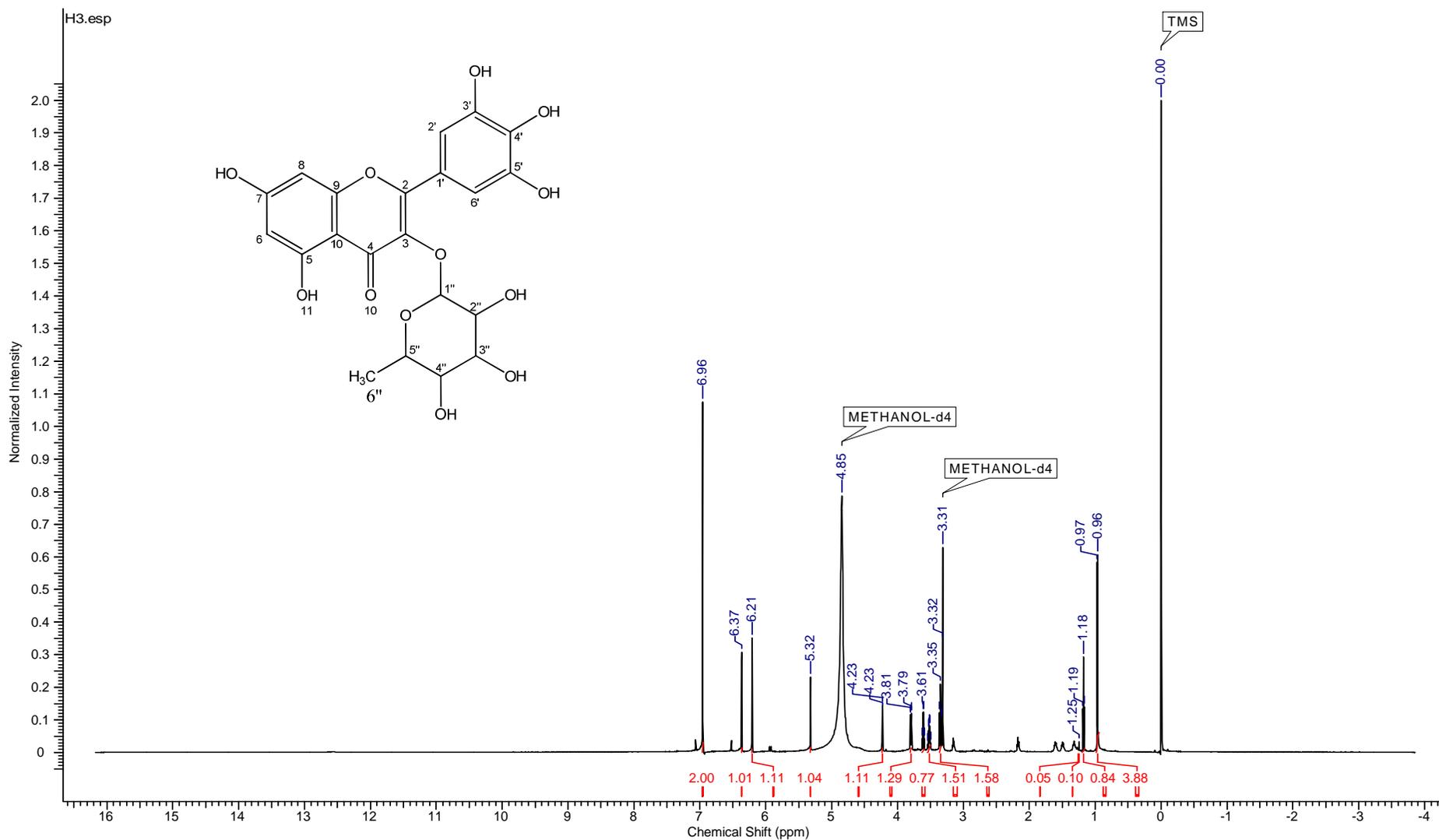


Figura 30- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de FA3.10P

FA3.10P = fração precipitado em acetona da fração aquosa do extrato aquoso bruto das folhas de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk.

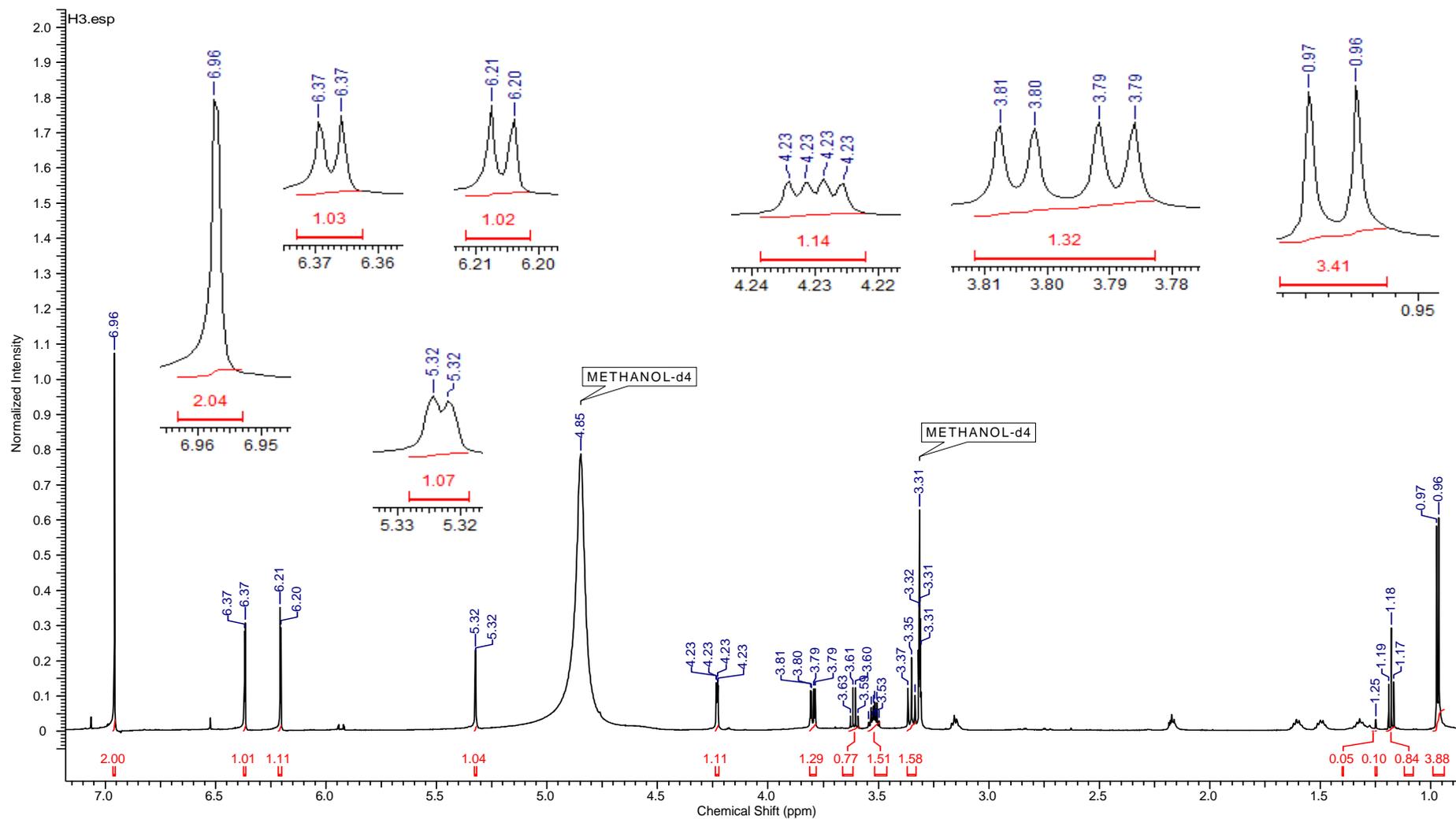


Figura 31- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de FA3.10P: expansão da região entre  $\delta$  7,0 e 0,96 ppm. FA3.10P = fração precipitado em acetona da fração aquosa do extrato aquoso bruto das folhas de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk.

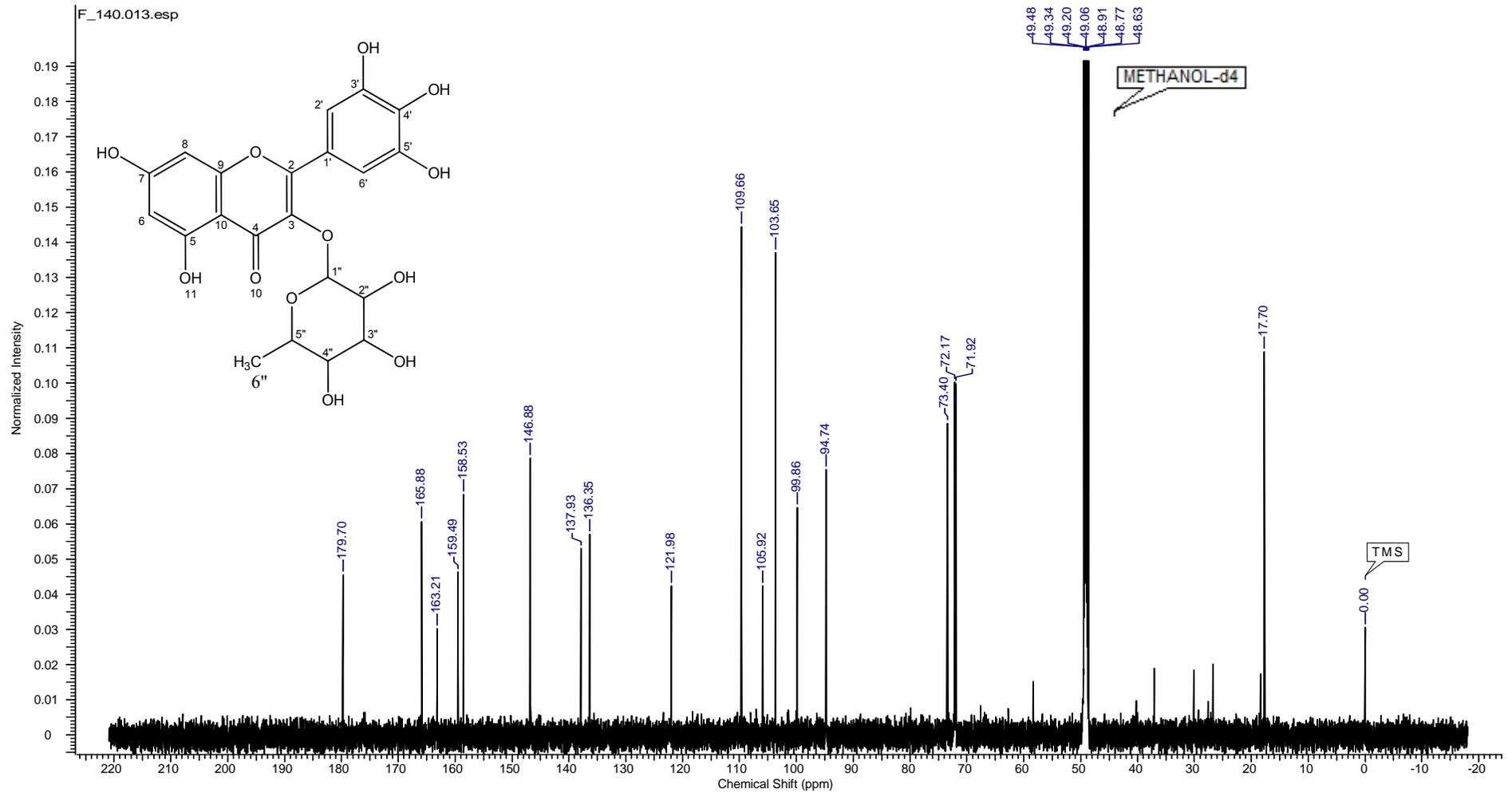


Figura 32- Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de FA3.10P

FA3.10P = fração precipitado em acetona da fração aquosa do extrato aquoso bruto das folhas de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk

## 5.4 PERFIL CROMATOGRÁFICO DE FA3.10S A 1 mg/mL POR CLAE-DAD 280 NM

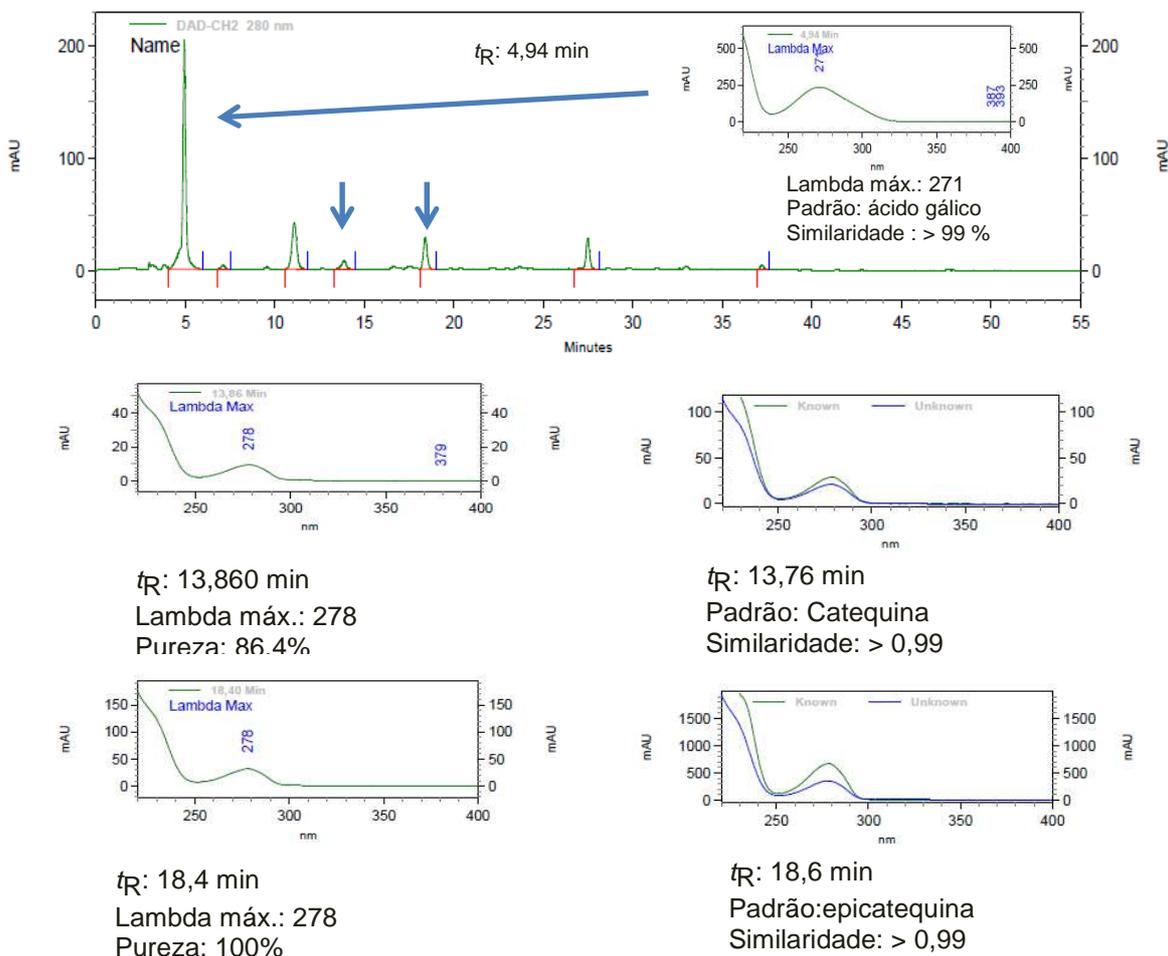


Figura 33 - Cromatograma de FA3.10S por CLAE-DAD a 280 nm e espectros de UV para os picos em ( $t_R = 4,9$  min); ( $t_R = 13,86$  min) e ( $t_R = 18,4$ min.) sobrepostos aos espectros dos padrões analíticos ácido gálico, catequina e epicatequina. Condições de análise: coluna LiChroCART 150-4,6 Purospher STAR RP-18e (5  $\mu$ m) com pré-coluna LiChroCART 4-4,6 Purospher STAR RP 18e (5  $\mu$ m), mantida a 25°C. Fluxo de 0,6 mL /min e tempo de análise de 55 minutos. Gradiente de eluição: solução a 1% de ácido fosfórico (bomba A) e acetonitrila (bomba B). Intervalo de análise de 230 a 400 nm. Dados extraídos a 354 nm.

Ácido gálico pode ser produzido na redução de taninos hidrolisáveis (121) e tem comprovada ação antioxidante (122). Taninos são classificados em hidrolisáveis ou condensados (proantocianidinas). Os hidrolisáveis geralmente são glicosídeos esterificados com ácido gálico ou elágico e podem formar complexos com proteínas

atuando como precipitadores (123). Por outro lado os taninos condensados são polímeros de flavan-3-ol (catequina) e/ ou flavan 3,4-diol (leucoantocianidina). Em meio ácido, alcoólico ou a quente, ocorre ruptura das ligações entre as unidades monoméricas das pró-antocianidinas (124). Catequinas também apresentam capacidade de inibir a enzima  $\alpha$ -amilase, galato de epicatequina inibiu em 50% a atividade dessa enzima a 1,5 mM, catequina em 13%, epicatequina em 10% e catequina hidratada também inibiu a amilase em 50% (109, 125). Ácido gálico e catequinas foram compostos encontrados na fração ativa FA3.10S (Figura 33) e parecem contribuir com a atividade inibitória da  $\alpha$ -amilase, porém a diminuição da atividade após fracionamento pode estar relacionada a taninos que podem ter ficado retidos na coluna de poliamida, ou que tenham sofrido hidrólise ou mesmo rupturas entre suas unidades durante o processo de fracionamento.

## 5.5 ESTUDO QUÍMICO DO EHB DAS FOLHAS DE *P. ramiflora*

Do precipitado oriundo do extrato hexânico bruto (item 4.1.7, páginas 60 e 61) foram isolados 3 compostos que, quando analisados por CCD, utilizando o reagente anisaldeído/ $H_2SO_4$  como revelador, mostraram cor violácea característica de terpenos.

### 5.5.1 Análise espectrométrica de PH1.1

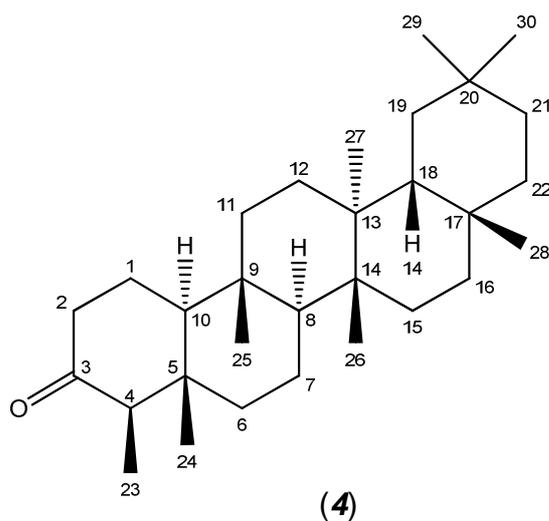
O espectro na região do infravermelho de PH1.1 (Figura 34) mostrou bandas de absorção em 2954, 2923 e 2852  $cm^{-1}$ , características de estiramento de ligação C-H; banda em 1718  $cm^{-1}$ , característica de ligação dupla C=O e bandas em 1456, 1385  $cm^{-1}$  características de deformações de ligação C-H (126).

O espectro de RMN de  $^1H$  (Figuras 35 e 36) mostrou um duplo duplete duplo em  $\delta$  2,39 (ddd,  $J = 13,8; 5,0$  e  $2,0$  Hz, H2 axial), multipletos entre  $\delta$  2,32 e 2,27 (m, H2 equatorial), em  $\delta$  2,25 (q,  $J = 6,7$  Hz, H4 axial) e em  $\delta$  1,97 (m, H1-axial), além de 8 sinais intensos entre  $\delta$  1,18 e 0,73 atribuídos a hidrogênios em grupos metila, de acordo com dados da literatura (127). O espectro de RMN de  $^{13}C$  (Figuras 37 e 38) mostra a presença de 29 átomos de carbono na região entre  $\delta$  5,0 e  $\delta$  60,0 e um

sinal em  $\delta$  212,18, que sugeriu a presença de composto triterpênico com grupo cetona. A comparação dos deslocamentos químicos apresentados por PH1.1 com dados da literatura (128) mostrou sinais idênticos àqueles apresentados pelo triterpeno friedelina (**4**), conforme mostrado na Tabela 8, já isolado em outras famílias (128-130) mas descrito pela primeira vez para *P. ramiflora*.

Tabela 8 - Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de PH1.1 (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) em comparação com dados descritos da literatura para friedelina (128).

C	PH1,1	friedelina (128)
C-1	21,27	22,6
C-2	40,52	41,9
C-3	212,18	213,4
C-4	57,23	58,6
C-5	41,14	42,5
C-6	40,3	41,7
C-7	17,23	18,6
C-8	52,11	53,5
C-9	36,45	37,8
C-10	58,49	59,9
C-11	35,02	36,0
C-12	29,5	30,9
C-13	38,7	40,1
C-14	37,3	38,7
C-15	31,78	32,8
C-16	34,63	36,4
C-17	28,99	30,4
C-18	41,81	43,2
C-19	34,35	35,7
C-20	27,16	28,5
C-21	31,42	33,1
C-22	38,25	39,6
C-23	5,8	7,1
C-24	13,65	15,0
C-25	16,93	18,3
C-26	19,25	20,6
C-27	17,65	19,0
C-28	31,09	32,4
C-29	34,01	35,4
C-30	30,77	32,1



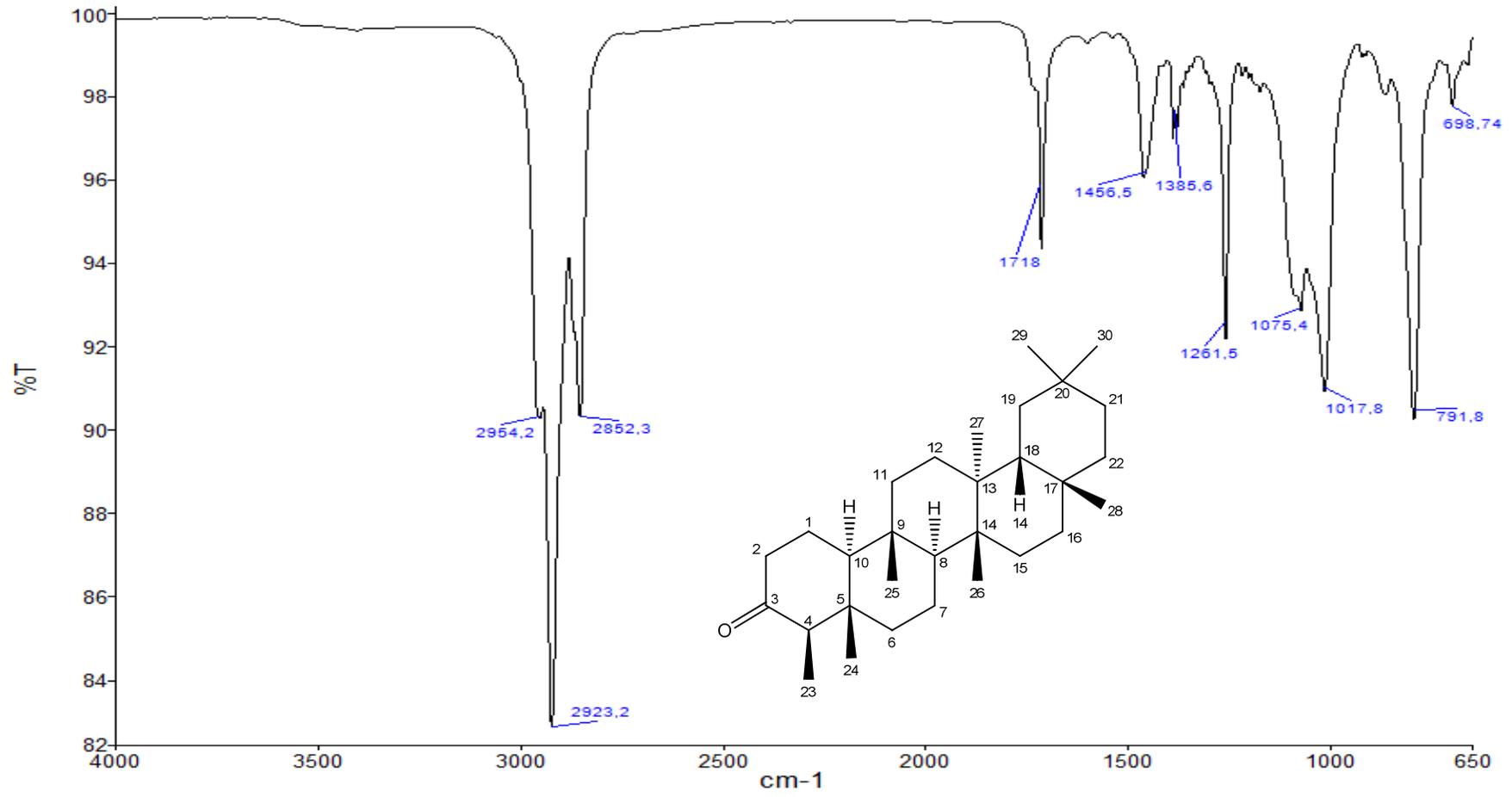


Figura 34 - Espectro de Infravermelho de PH1.1  
 PH1.1 – fração do precipitado do hexânico bruto (PH1) das folhas de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk.

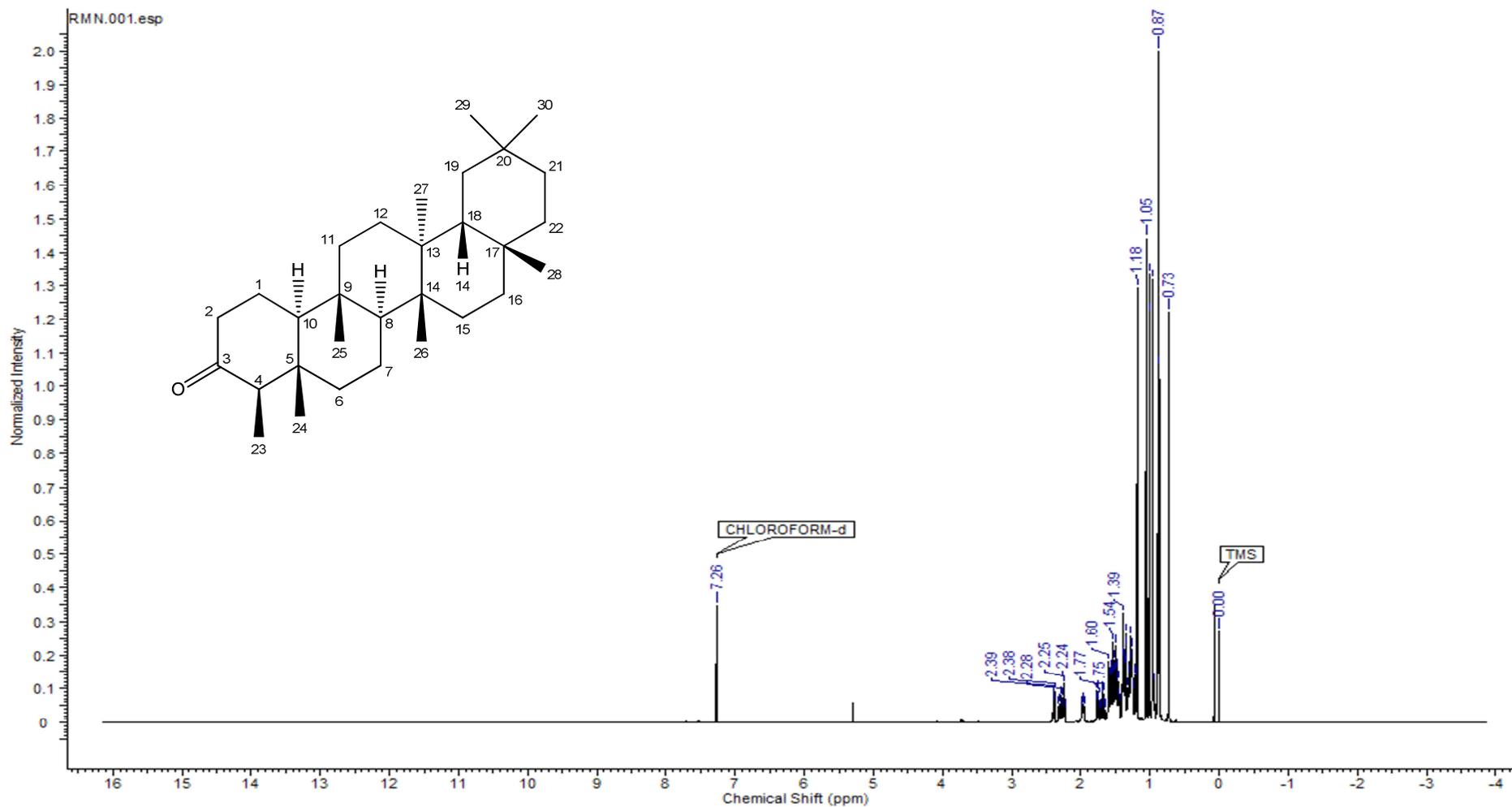


Figura 35- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de PH1.1  
PH1.1 – fração do precipitado do hexânico bruto (PH1) das folhas de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk.

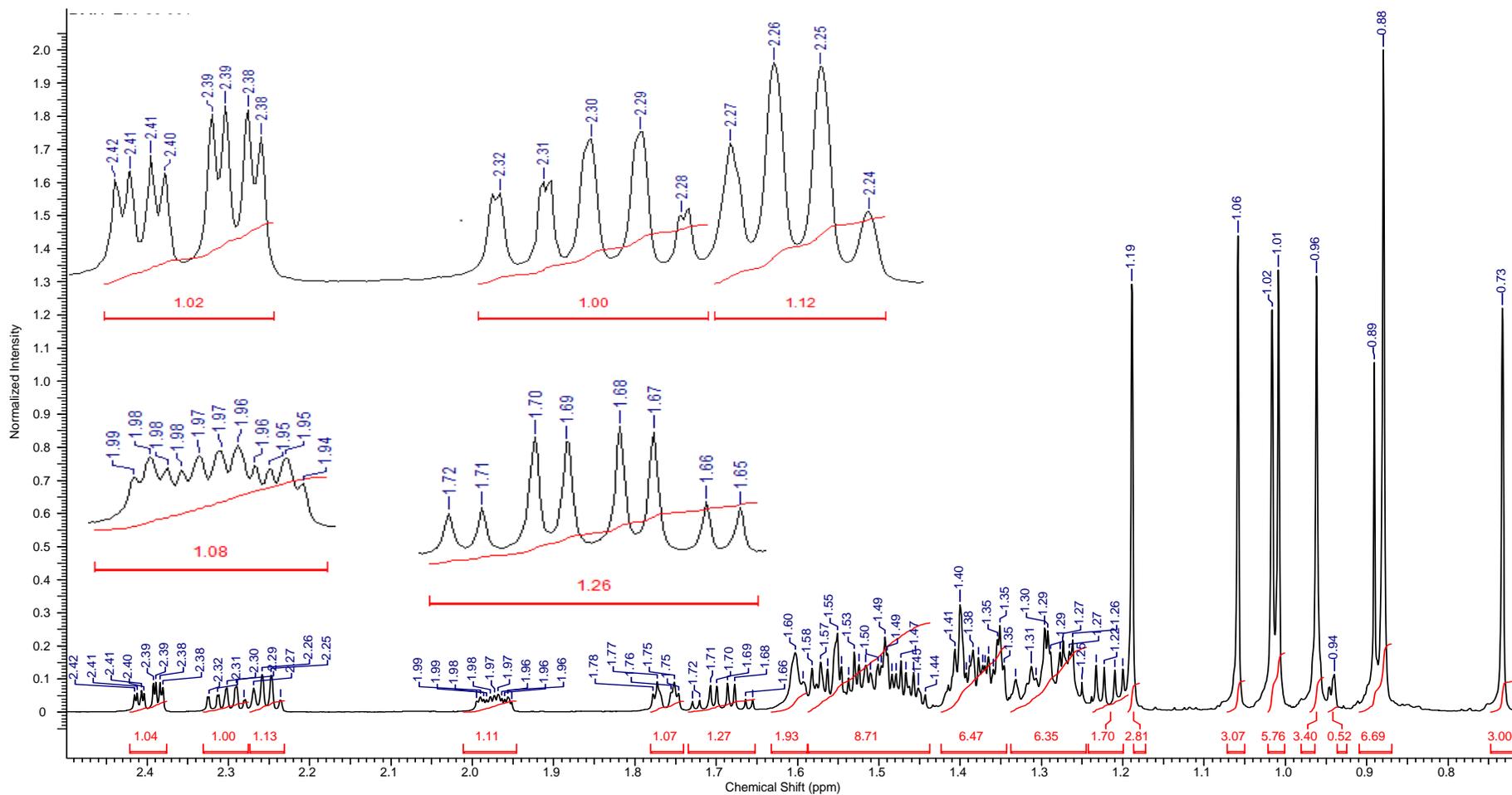


Figura 36- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de PH1.1: expansão da região entre  $\delta$  2,42 a 0,70 ppm e ampliação das regiões entre  $\delta$  2,42 e  $\delta$  2,24 ppm.

PH1.1 – fração do precipitado do hexânico bruto (PH1) das folhas de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk.

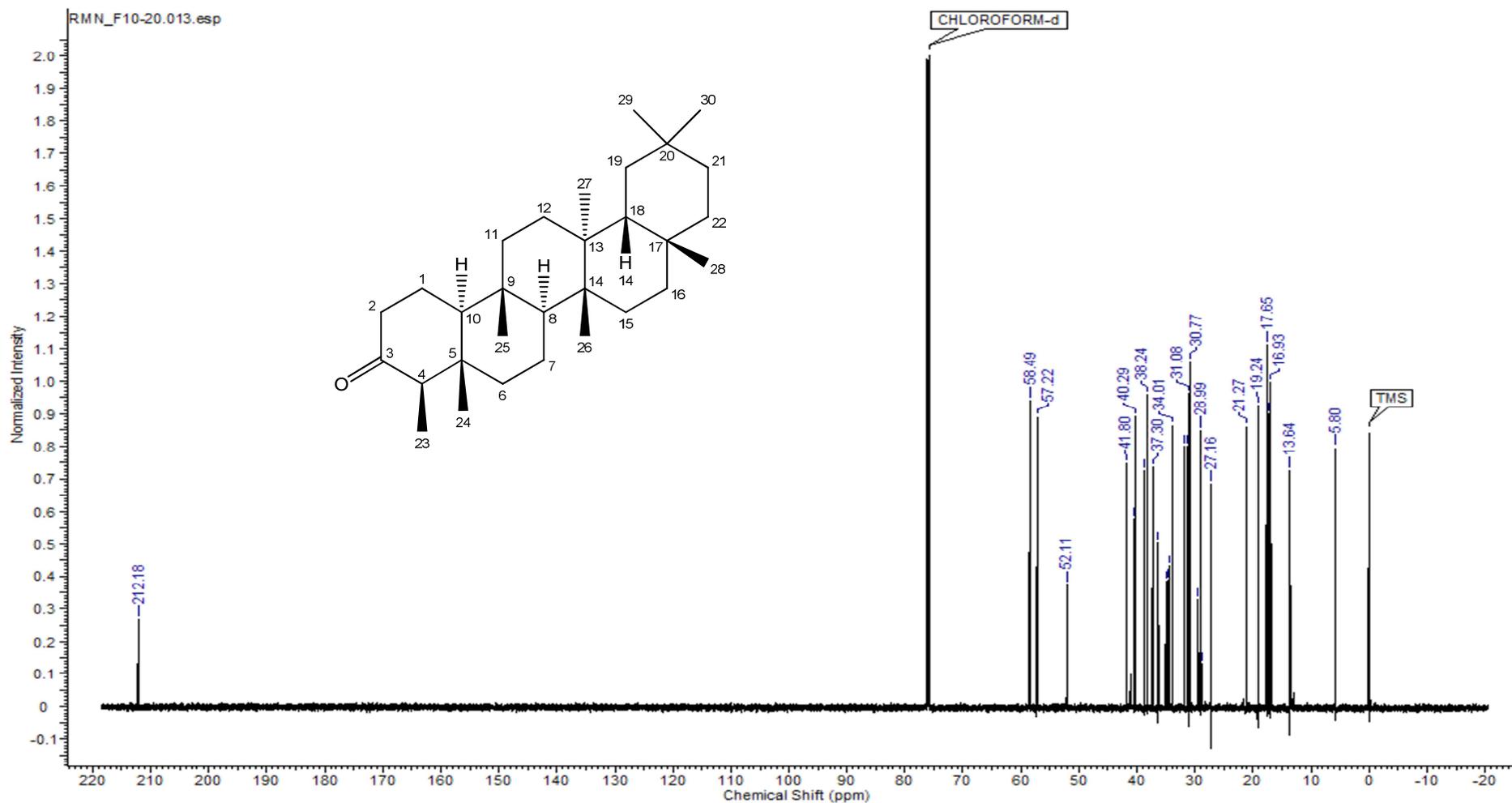


Figura 37 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de PH1.1  
 PH1.1 – fração do precipitado do hexânico bruto (PH1) das folhas de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk.

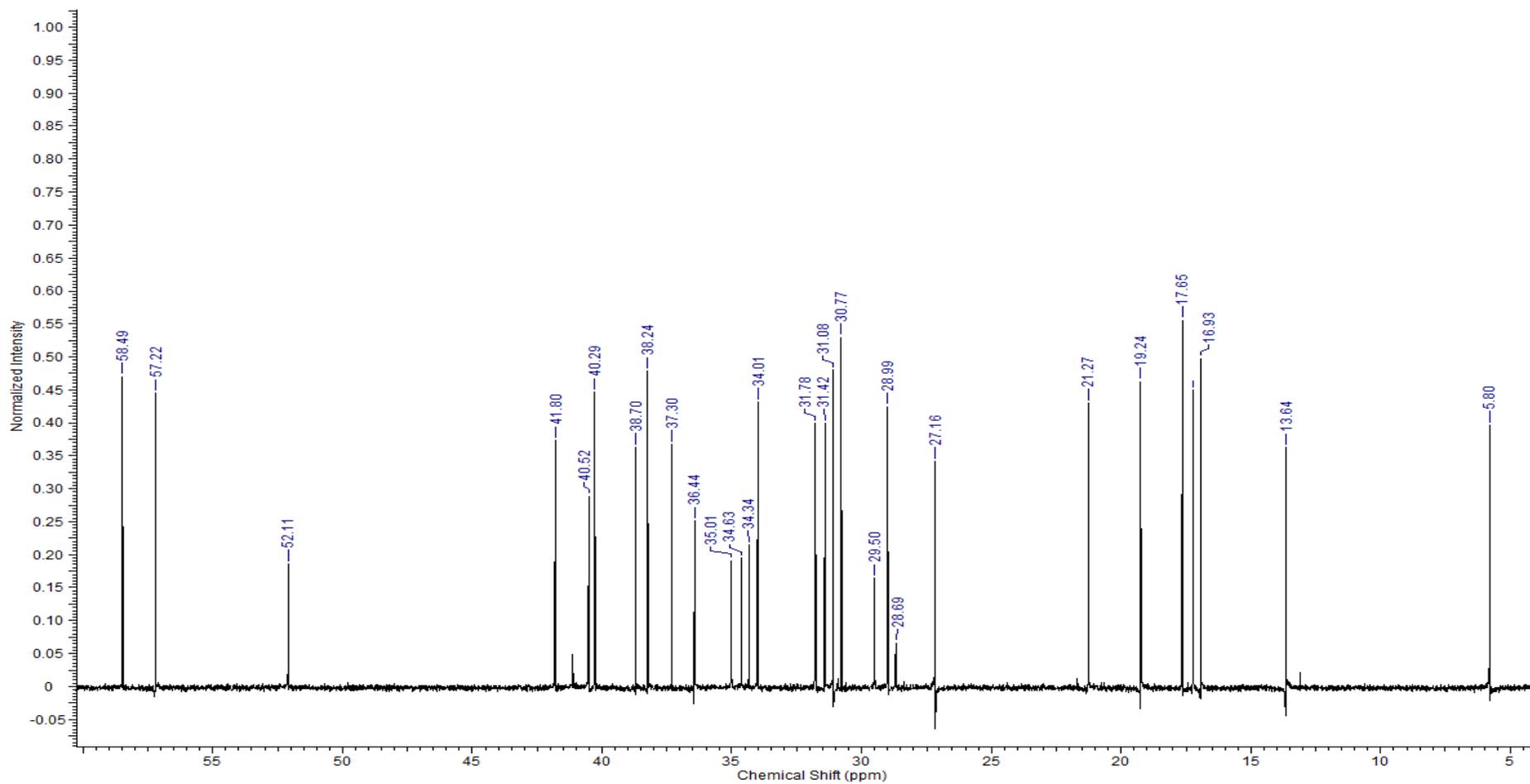


Figura 38- Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de PH1.1: expansão da região entre  $\delta$  60,0 e 5,0 ppm.

PH1.1 – fração do precipitado do hexânico bruto (PH1) das folhas de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk.

O composto PH1 foi submetido à cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). O cromatograma mostra a presença de um pico majoritário no  $t_R = 53,800$  min. que corresponde a 68,42% de PH1.1 (Figura 41). O espectro de massas desse pico mostrou padrão de fragmentação compatível com dados da literatura (131) que permitiu confirmar que PH1 corresponde a friedelina (**4**) com fragmentos de  $m/z$ : 426  $[M]^+$ , 411  $[M - CH_3]$ , 369, 355, 341, 327, 315, 302, 287, 273, 257, 246, 231, 218, 205, 191, 179, 163, 149, 137, 123, 109, 95, 81, 69 (pico base), 55 e 41, com padrão de fragmentação característicos de esqueleto de friedelanos (Figura 39) e com massa compatível à fórmula molecular  $C_{30}H_{50}O$ . Uma sugestão de esquema de fragmentação é mostrada na (Figura 40) de acordo com a literatura (132).

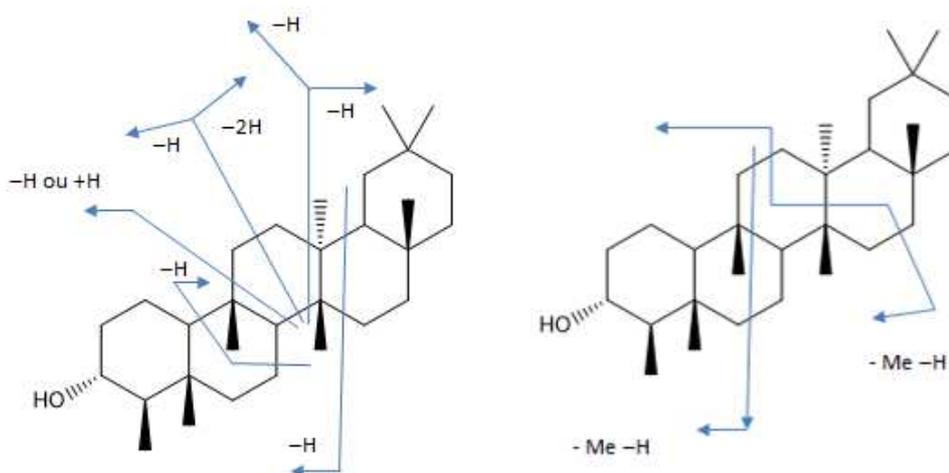


Figura 39 - Padrão de fragmentação friedelanos (132)

O pico correspondente ao íon molecular desse composto ( $m/z$  426) pode ser observado no espectro de massas (Figura 42), compatível com espectro de massas de friedelina já registrado na literatura (132, 133). A presença de um fragmento de  $m/z$  411 indicou a perda de um grupo metila. Os íons  $m/z$  341, 273, 205 e 123 são, respectivamente, característicos da fragmentação dos anéis A, B, C e D (134).

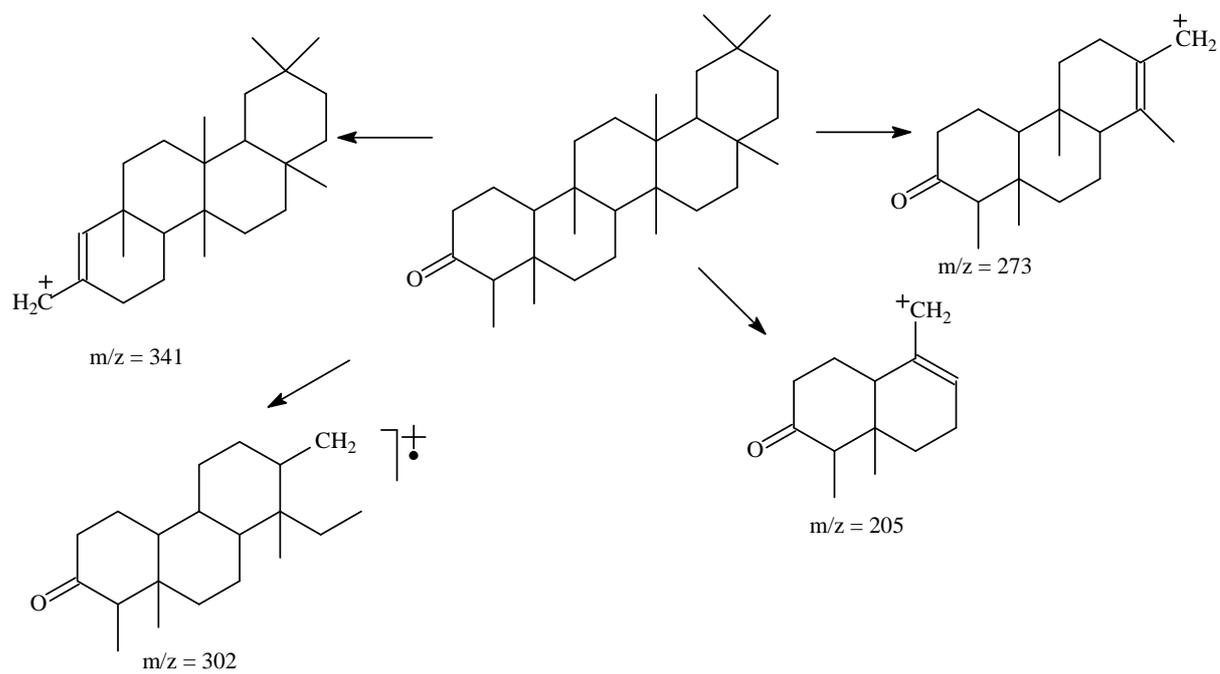


Figura 40 - Padrão de fragmentação para friedelina (131, 134)

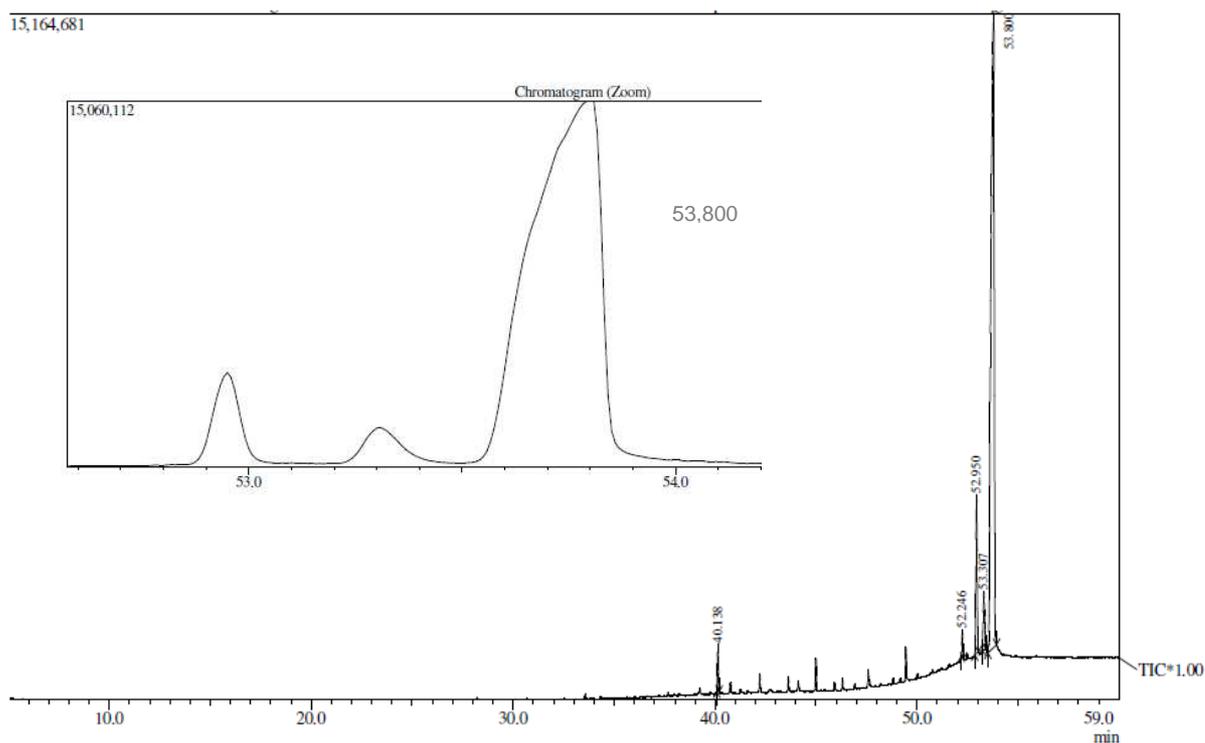


Figura 41 – Cromatograma (CG-EM) de PH1.1  
 PH1.1 – fração do precipitado do extrato hexânico bruto (PH1) das folhas de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk.

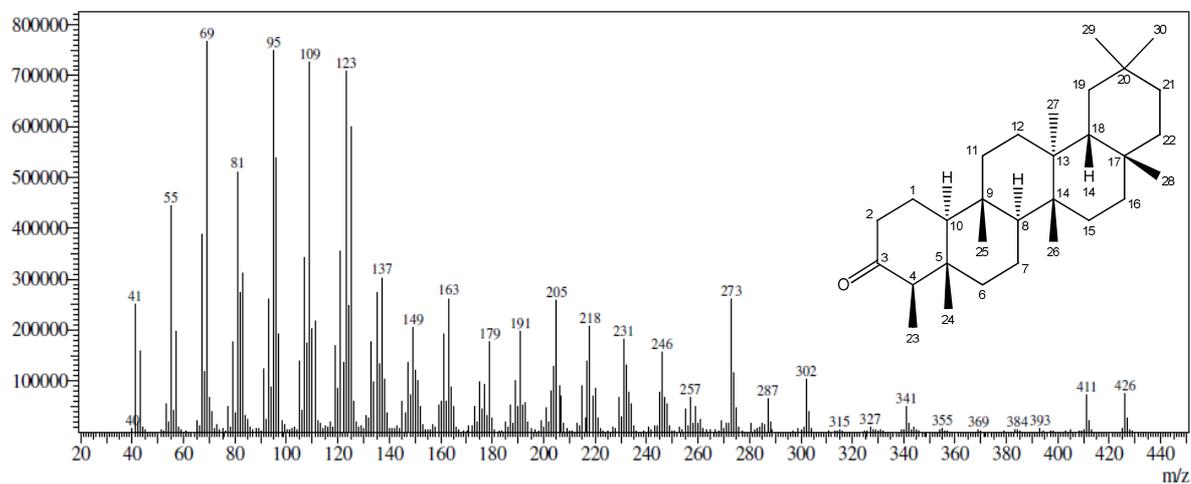


Figura 42 – Espectro de massas de PH1.1,  $t_R = 53,800$  min.  
 PH1.1 – fração do precipitado do extrato hexânico bruto (PH1) das folhas de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk.

### 5.5.2 Análise espectrométrica de PH1.3

O espectro no infravermelho (Figura 43) apresentou banda de absorção em  $3468\text{ cm}^{-1}$ , característica de ligação O-H e banda mais fraca em  $3625\text{ cm}^{-1}$  característica de estiramento de ligação O-H livre. Mostrou, bandas em  $2928\text{ cm}^{-1}$  e  $2869\text{ cm}^{-1}$ , características de estiramento de ligação C-H; bandas em 1457, 1385 e  $1355\text{ cm}^{-1}$ , características de deformações de ligação C-H em hidrocarbonetos cíclicos (126).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figuras 44 e 45) mostrou sinal em  $\delta 3,74$  ( $J= 1,96$  Hz, H-3), correspondente a um hidrogênio carbinólico desblindado devido à eletronegatividade do oxigênio próximo a ele (98) e a presença de 8 sinais intensos entre  $\delta 1,18$  e  $0,87$ , correspondentes a hidrogênios em grupos metila condizentes com dados registrados na literatura para o composto epi-friedelanol (127).

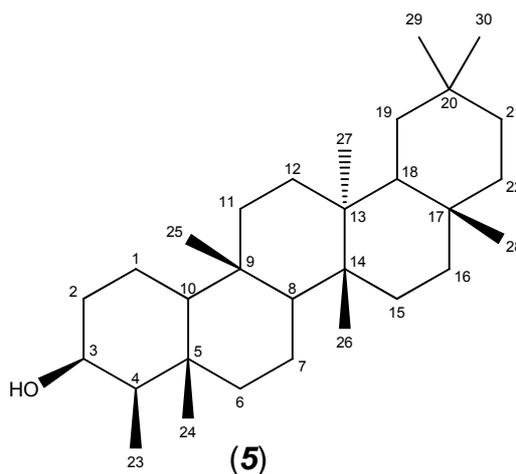
O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figuras 46 a 48) mostrou a presença de 30 átomos de carbono na região entre  $\delta 10,0$  e  $\delta 72,0$ , típico de triterpenos. Com o espectro DEPT-135 (Figuras 49 e 50) foi possível identificar 8 sinais de carbono em grupo metila, 11 sinais de carbono correspondentes a grupos metilênos e 5 sinais correspondentes a carbonos metínicos. Os outros 6 carbonos não aparecem no espectro de DEPT-135 e portanto correspondem a carbonos quaternários (98). A comparação dos deslocamentos químicos apresentados por PH1.3 com dados da literatura (135) mostrou sinais idênticos àqueles apresentados pelo triterpeno epi-friedelanol (**5**) já isolado em *Pouteria torta* e em espécies de outras famílias (136-139), conforme mostrado na Tabela 9.

Para confirmar a identificação de PH1.3, esse composto foi submetido à análise por CG-EM. O cromatograma mostrou a presença de pico majoritário ao  $t_R = 53,409$  min. correspondente a 89,13% de PH1.3 (Figura 51). O Espectro de massas referente a esse pico (Figura 52) mostrou fragmentos de  $m/z$ : 428  $[\text{M}]^+$ , 413  $[\text{M} - \text{CH}_3]$ , 395, 304, 275, 257, 248, 231, 220, 205, 191, 177, 165, 149, 135, 125, 109, 95, 81, 69, 55 e 41, com padrão de fragmentação característicos de esqueleto de

friedelanos e com massa compatível à fórmula molecular  $C_{30}H_{52}O$  que estão de acordo com os dados registrados na literatura (132) o composto *epi*-friedelanol.

Tabela 9 - Dados de RMN de  $^{13}C$  de PH1.3 (125 MHz,  $CDCl_3$ ) em comparação com dados descritos da literatura para *epi*-friedelanol (135).

C	PH1	<i>epi</i> -friedelanol (135)
C-1	14,79	15,8
C-2	34,33	35,2
C-3	71,75	72,8
C-4	48,18	49,2
C-5	36,01	37,1
C-6	40,72	41,7
C-7	16,54	17,6
C-8	52,19	53,2
C-9	36,83	38,4
C-10	60,35	61,4
C-11	34,19	35,3
C-12	29,63	30,6
C-13	37,36	37,8
C-14	38,67	39,7
C-15	31,32	32,3
C-16	35,08	36,1
C-17	29,01	30,0
C-18	41,82	42,8
C-19	34,55	35,6
C-20	27,16	28,2
C-21	31,81	32,8
C-22	38,27	39,27
C-23	10,6	11,6
C-24	15,39	16,4
C-25	17,23	18,2
C-26	17,63	18,6
C-27	19,1	20,1
C-28	31,08	31,8
C-29	34,01	35,0
C-30	30,78	32,1



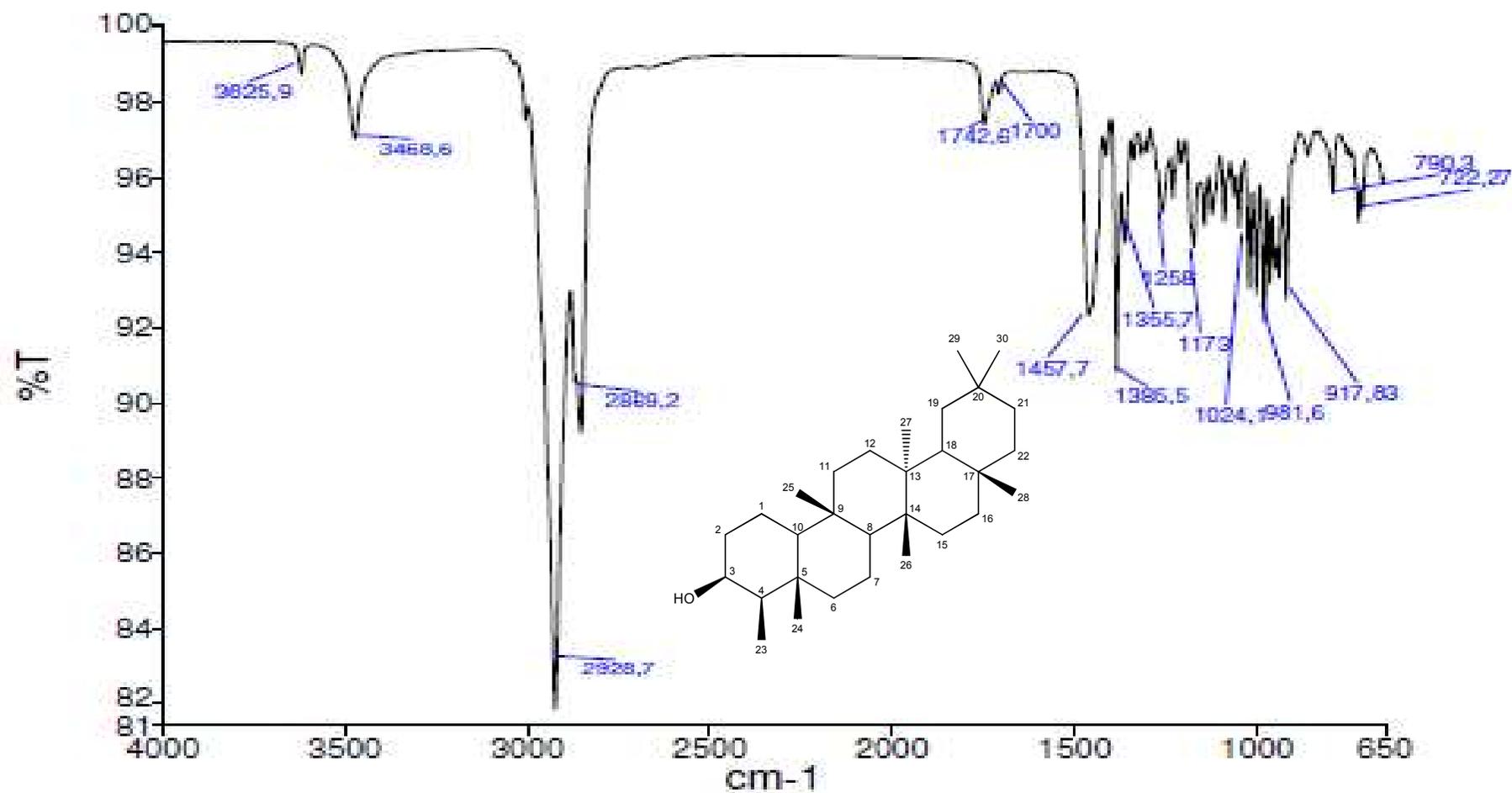


Figura 43. Espectro de Infravermelho de PH1.3  
 PH1.3 – fração do precipitado do hexânico bruto (PH1) das folhas de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk.

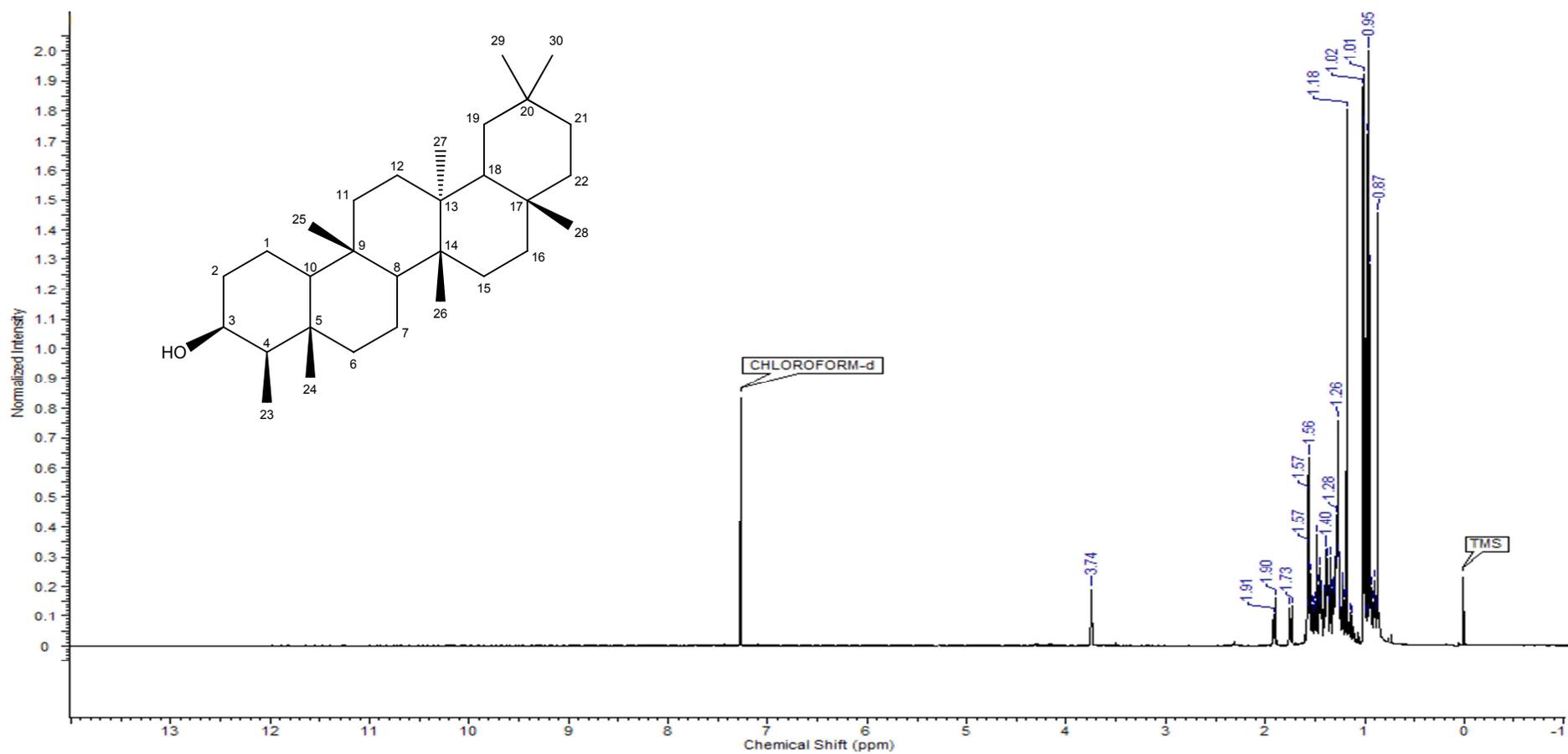


Figura 44 - Espectro RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de PH1.3  
PH1.3 – fração do precipitado do hexânico bruto (PH1) das folhas de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk.

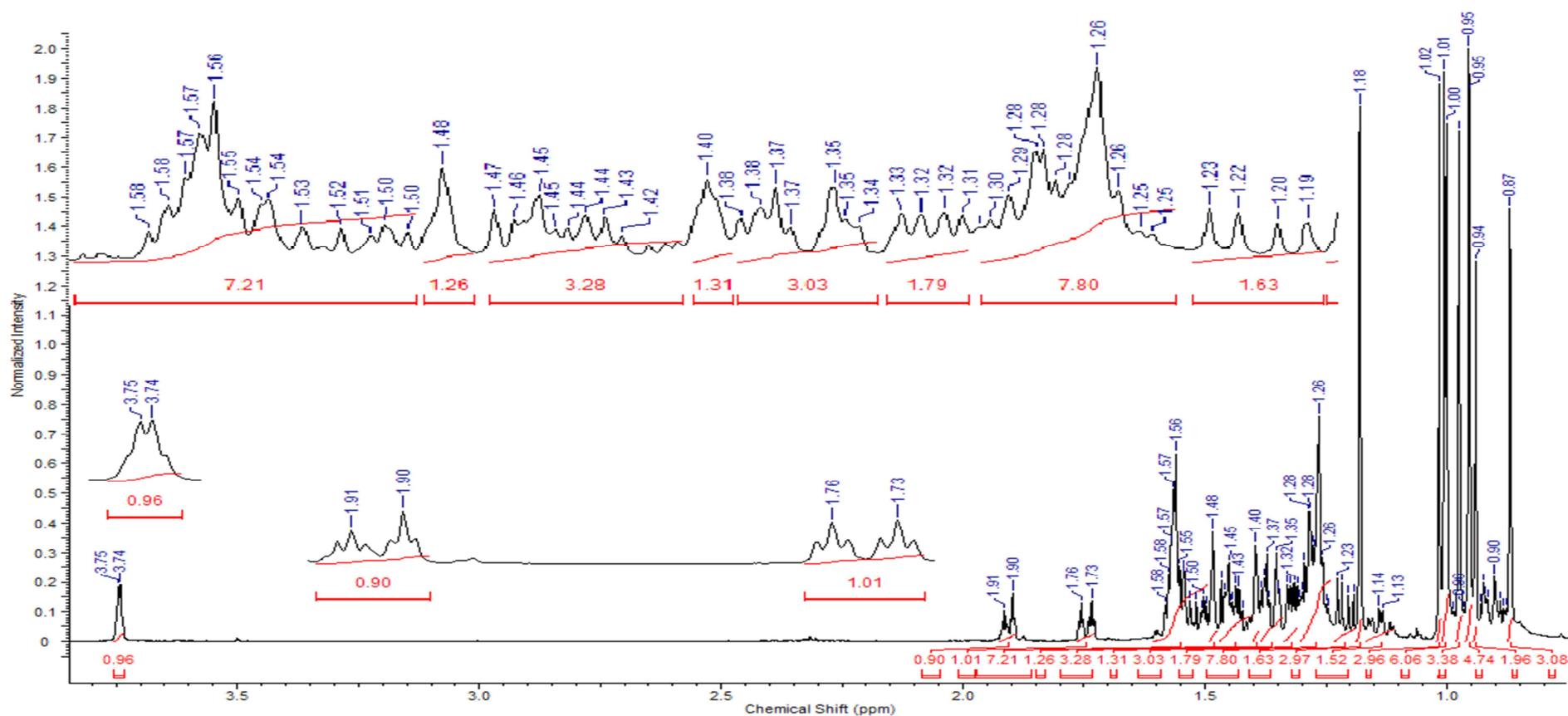


Figura 45 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de PH1.3: expansão da região entre  $\delta$  3,75 e 0,87 ppm, com ampliação das regiões entre  $\delta$  3,75 e 3,74;  $\delta$  1,91 e 1,73 ppm e entre  $\delta$  1,58 e 1,19 ppm  
 PH1.3 – fração do precipitado do hexânico bruto (PH1) das folhas de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk.

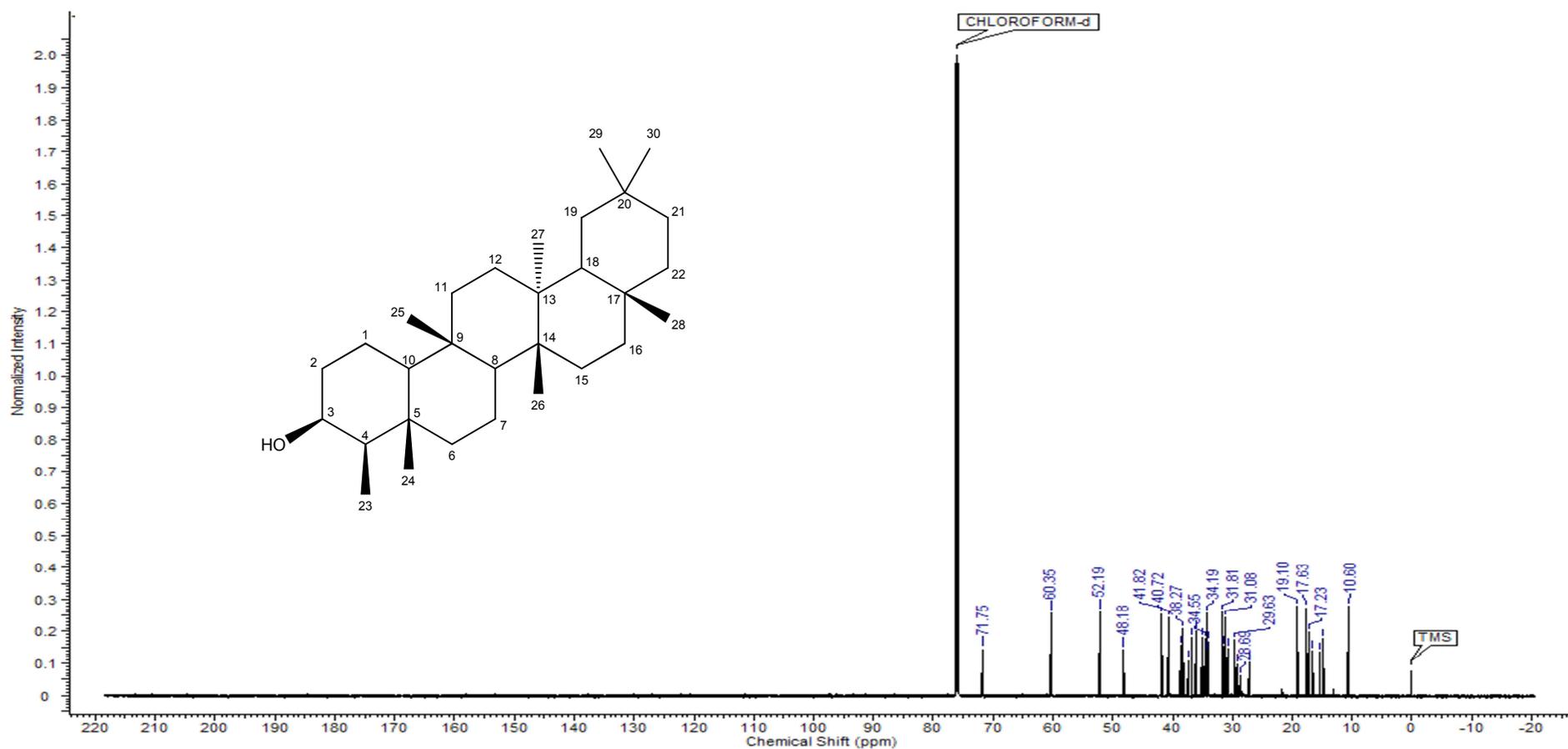


Figura 46 - Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PH1.3

PH1.3 – fração do precipitado do hexânico bruto (PH1) das folhas de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk.

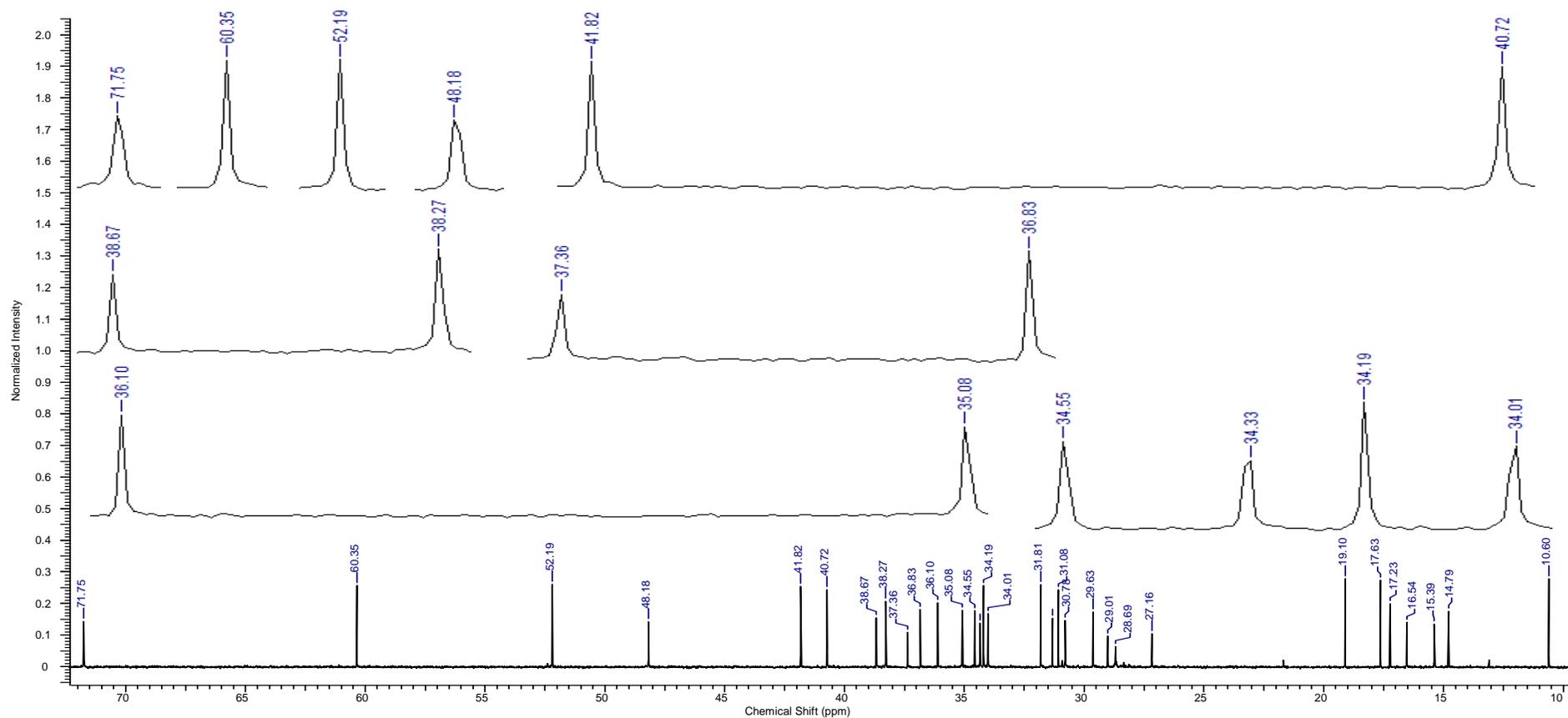


Figura 47 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de PH1.3: expansão da região entre  $\delta$  72,72 e 10,0 ppm, com ampliação de picos e regiões entre  $\delta$  72,72 e 34,01 ppm  
 PH1.3 – fração do precipitado do hexânico bruto (PH1) das folhas de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk.

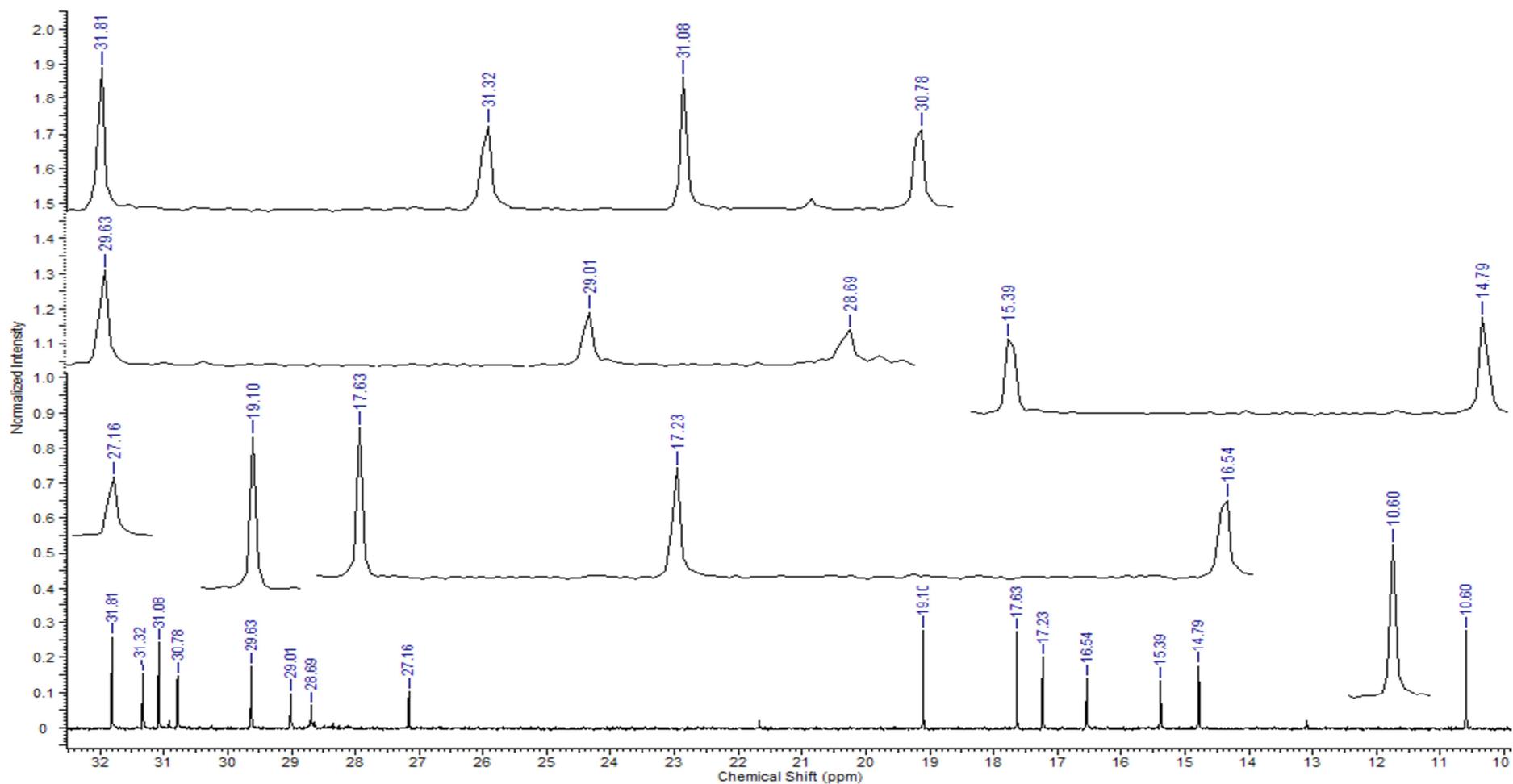


Figura 48 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de PH1.3: expansão e ampliação dos picos da região entre  $\delta$  32,00 e 10,0 ppm PH1.3 – fração do precipitado do hexânico bruto (PH1) das folhas de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk.

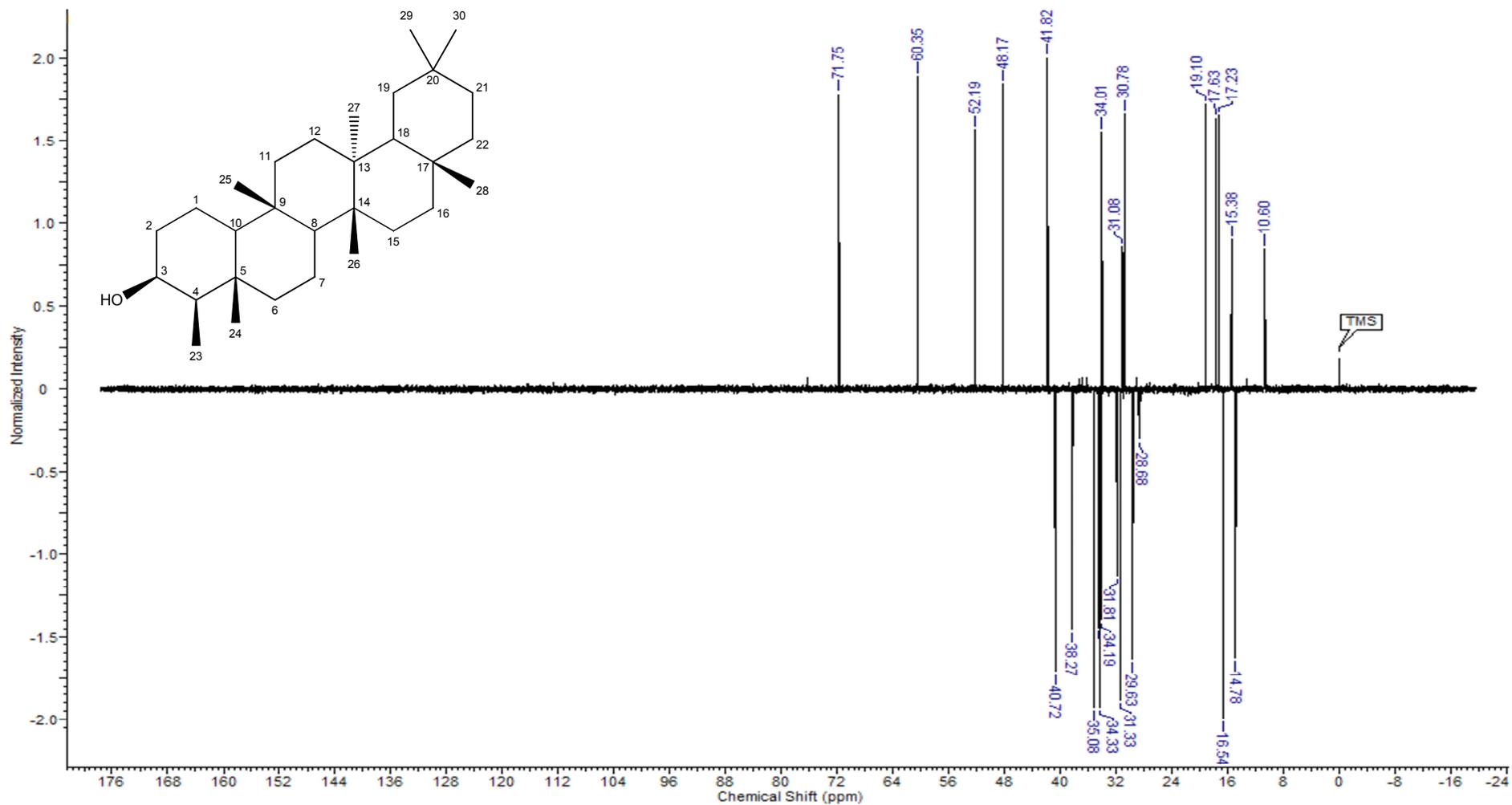


Figura 49 - Espectro de RMN DEPT-135 (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de PH1.3  
 PH1.3 – fração do precipitado do hexânico bruto (PH1) das folhas de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk.

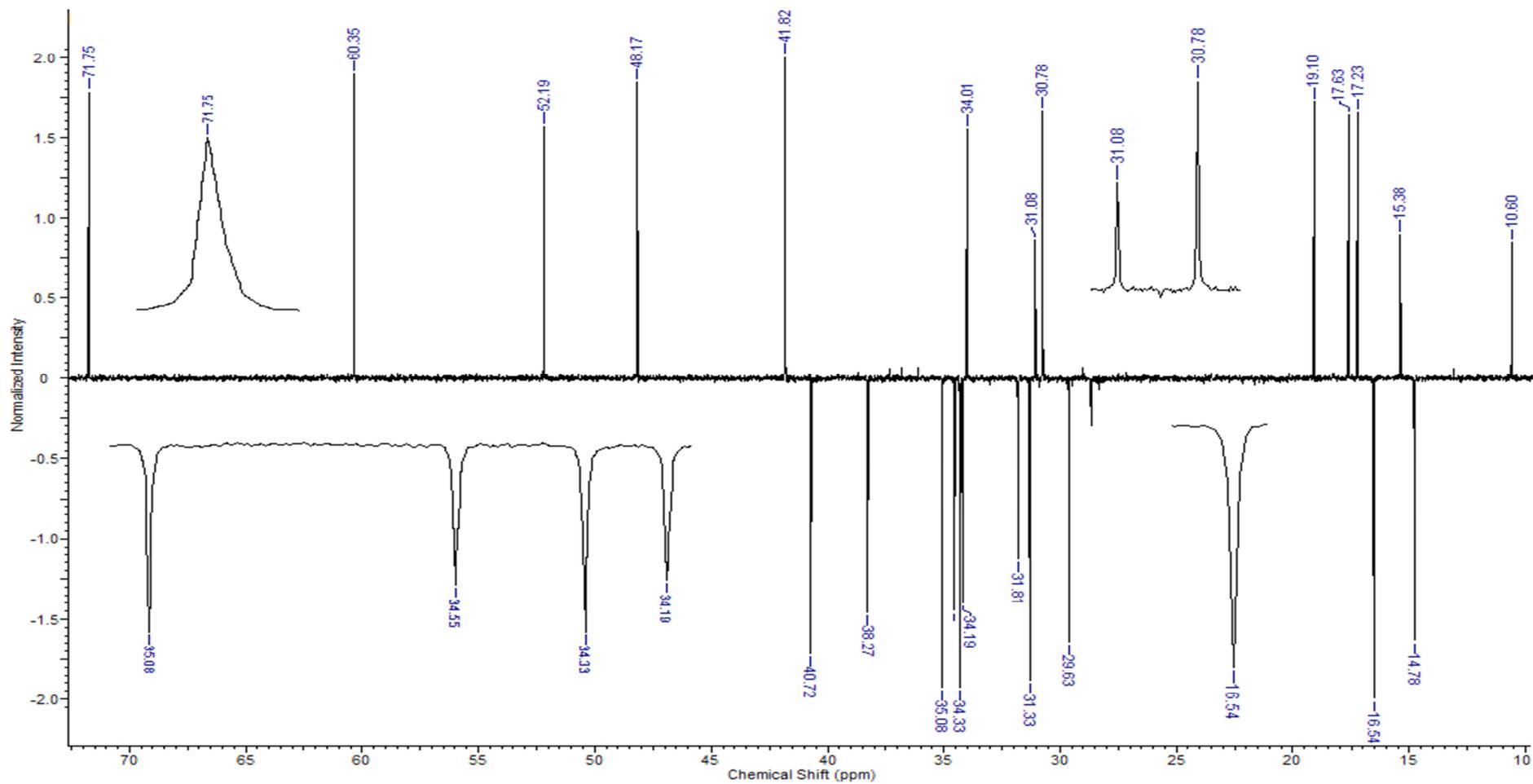


Figura 50 - Espectro de RMN DEPT-135 (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PH1.3: expansão entre  $\delta$  72,00 e 10,0 ppm, com ampliação da região entre  $\delta$  35,08 e 34,19 ppm  
 PH1.3 – fração do precipitado do hexânico bruto (PH1) das folhas de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk.

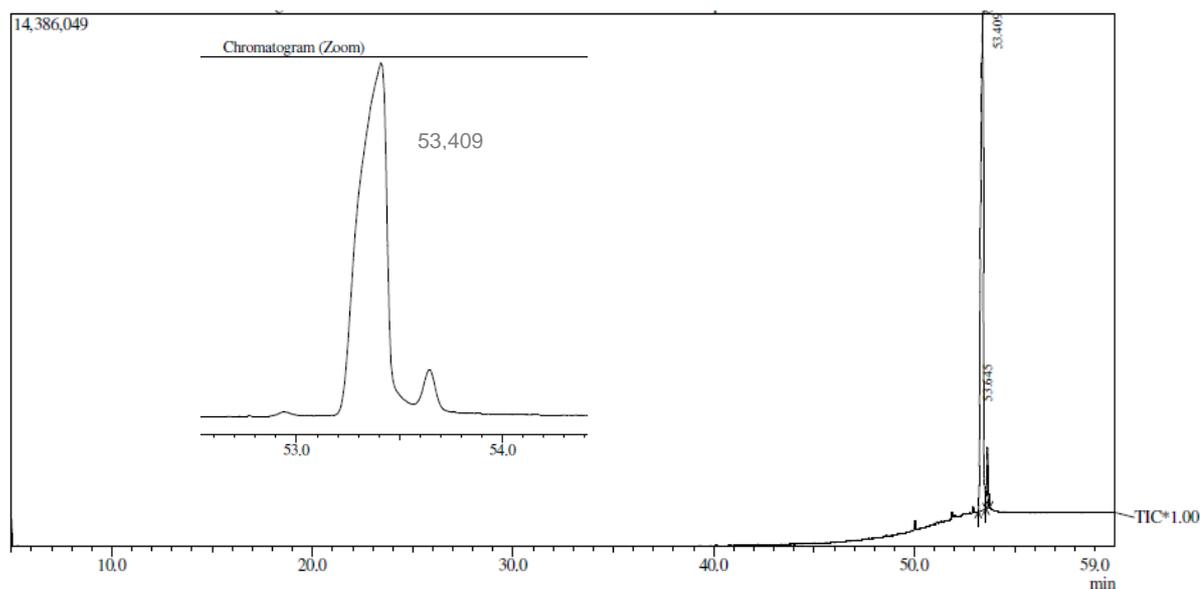


Figura 51 – Cromatograma (CG-EM) de PH1.3

PH1.3 – fração do precipitado do hexânico bruto (PH1) das folhas de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk.

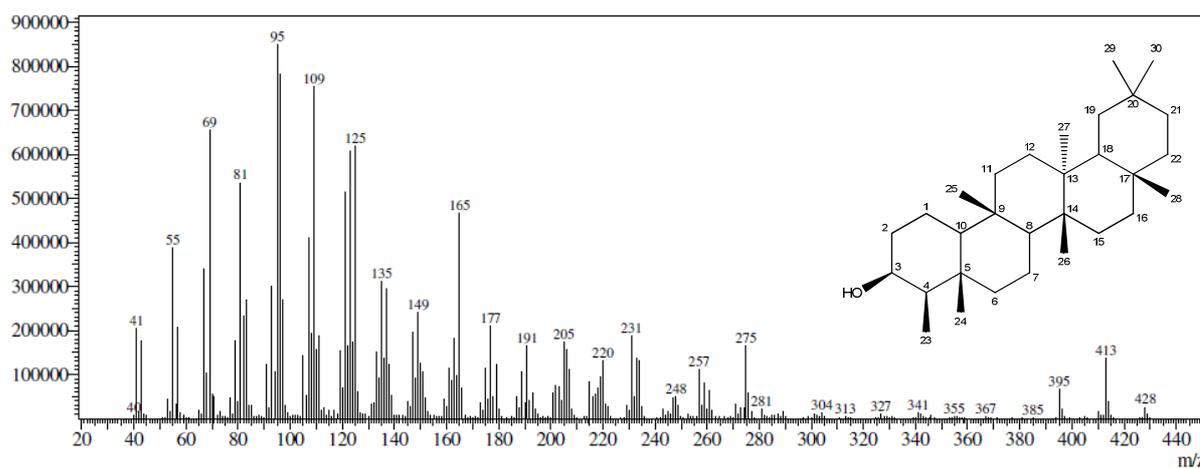


Figura 52 - Espectro de massas de PH1.3,  $t_R = 53,409$  min.

PH1.3 – fração do precipitado do hexânico bruto (PH1) das folhas de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk.

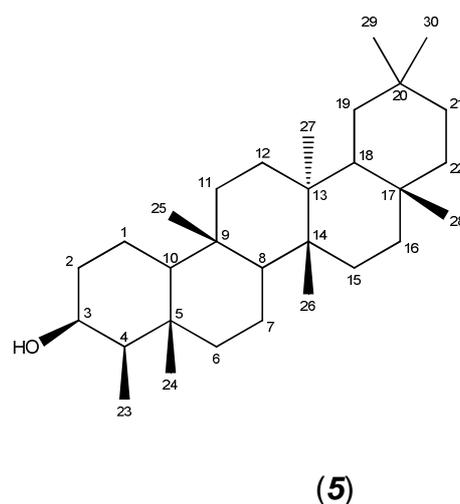
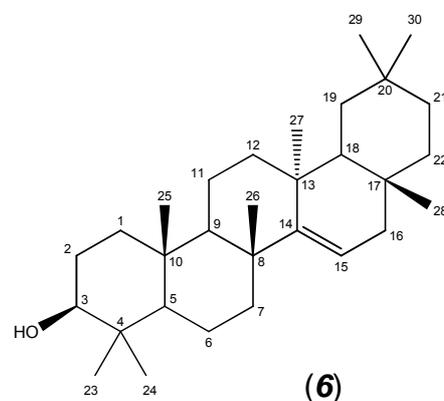
### 5.5.3 Análise espectrométrica de PH1.4

Os deslocamentos químicos apresentados por PH1.4 nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Figuras 53 a 55) e RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figuras 56 a 58) em comparação com os dados da literatura, mostraram ser idênticos àqueles apresentados para o composto taraxerol (**6**), já identificado em outras espécies do gênero *Pouteria* como *P. venosa* e espécies de outras famílias (140-142), em mistura como o composto identificado como *epi-friedelanol* (**5**) em PH1.3 no presente estudo. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  mostrou duplo duplete em  $\delta$  5,54 (dd,  $J = 8,25; 3,12$  Hz, H15) e em 3,20 (dd,  $J=11,19; 4,22$  Hz, 1 H), que junto aos sinais mais intensos em  $\delta$  1,1 e  $\delta$  0,81, característicos de hidrogênios em grupos metílicos, foram compatíveis com dados registrados na literatura (140) para o composto taraxerol (**6**). Os sinais em  $\delta$  3,74 ( $J=2,57$  Hz), correspondente a um hidrogênio carbinólico (98) e sinais intensos entre  $\delta$  1,18 e  $\delta$  0,87, característicos de hidrogênios em grupo metílicos, são condizentes com os sinais apresentados para o composto friedelanol (**5**) caracterizado na fração PH1.3. Os deslocamentos correspondentes ao espectro de  $^{13}\text{C}$  de PH1.4 estão mostrados na Tabela 10.

A mistura PH1.4 foi analisada por CG-EM. O cromatograma (Figura 59) mostrou dois picos majoritários no  $t_R = 51,250$  min. correspondente a 35,71% de PH1.4 e no  $t_R = 53,468$  correspondente a 40,21% de PH1.4. Os picos entre 35 e 49 minutos foram atribuídos à impurezas no solvente. O Espectro de massas correspondente ao  $t_R$  51,250 min (Figura 60) mostrou fragmentos de  $m/z$ : 426  $[\text{M}]^+$ , 411  $[\text{M} - \text{CH}_3]$ , 393, 365, 355, 341, 327, 311, 302, 287, 269, 257, 245, 231, 218, 204, 189, 175, 161, 147, 135, 121, 107, 95, 81, 69, 55 e 41, com padrão de fragmentação característicos do composto taraxerol (**6**) (Figura 61) e com massa compatível à fórmula molecular  $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$  (131). O espectro de PH1.4 correspondente ao  $t_R = 53,468$  mostrou fragmentos de  $m/z$ : 428  $[\text{M}]^+$ , 413  $[\text{M} - \text{CH}_3]$ , 395, 304, 275, 257, 220, 205, 191, 177, 165, 149, 135, 125, 109, 95, 81, 69, 55 e 41, que são condizentes com o perfil e os sinais apresentados para o composto friedelanol (**5**) caracterizado na fração PH1.3 e pode ser visualizado na Figura 52.

Tabela 10 - Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de PH1.4 (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) em comparação com dados descritos da literatura (135, 140)

Carbono	PH1,4	Taraxerol (140)	PH1,4	<i>epi</i> -friedelanol (135)
C1	38	37,98	15,79	15,8
C2	27,15	27,13	35,19	35,2
C3	79,08	79,06	72,76	72,8
C4	38,76	38,75	49,18	49,2
C5	55,54	55,51	37,11	37,1
C6	18,8	18,78	41,73	41,7
C7	35,12	35,10	17,5	17,6
C8	38,98	38,96	53,20	53,2
C9	48,77	48,72	38,37	38,4
C10	37,74	37,72	61,36	61,4
C11	17,54	17,49	35,34	35,3
C12	35,79	35,78	30,63	30,6
C13	37,71	37,7	37,84	37,8
C14	158,10	158,07	39,67	39,7
C15	116,88	116,87	32,33	32,3
C16	36,68	36,66	36,09	36,1
C17	37,57	37,55	30,02	30,0
C18	49,28	49,26	42,83	42,8
C19	41,33	41,30	35,56	35,6
C20	28,8	28,79	28,17	28,2
C21	33,7	33,68	32,82	32,8
C22	33,1	33,08	39,28	39,27
C23	27,99	27,99	11,61	11,6
C24	15,42	15,42	16,39	16,4
C25	15,44	15,44	18,24	18,2
C26	29,92	29,91	18,64	18,6
C27	25,9	25,90	20,11	20,1
C28	29,82	29,81	31,78	31,8
C29	33,35	33,34	35,02	35
C30	21,31	21,30	32,08	32,1



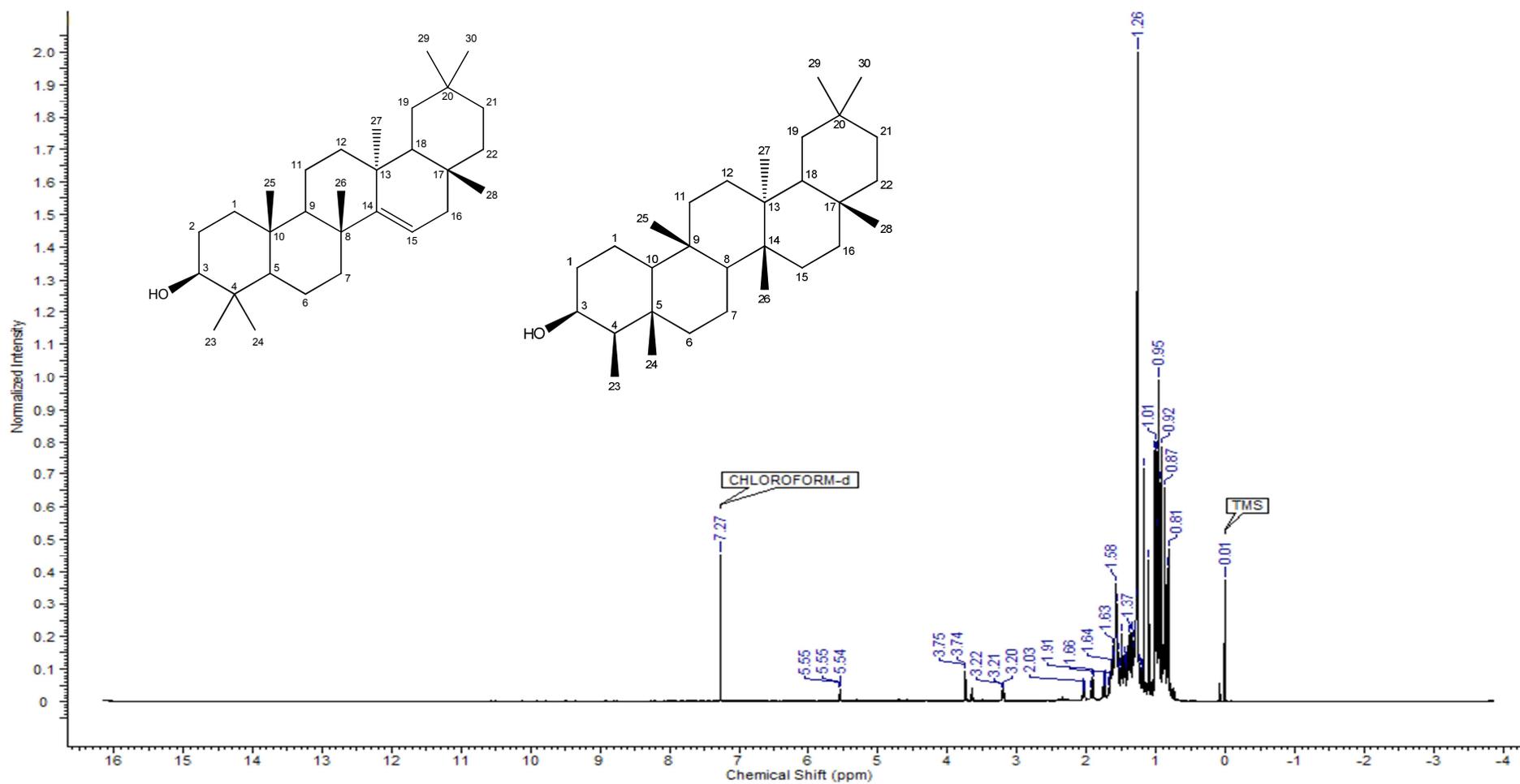


Figura 53 - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PH1.4  
 PH1.4 – fração do precipitado do hexânico bruto (PH1) das folhas de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk.

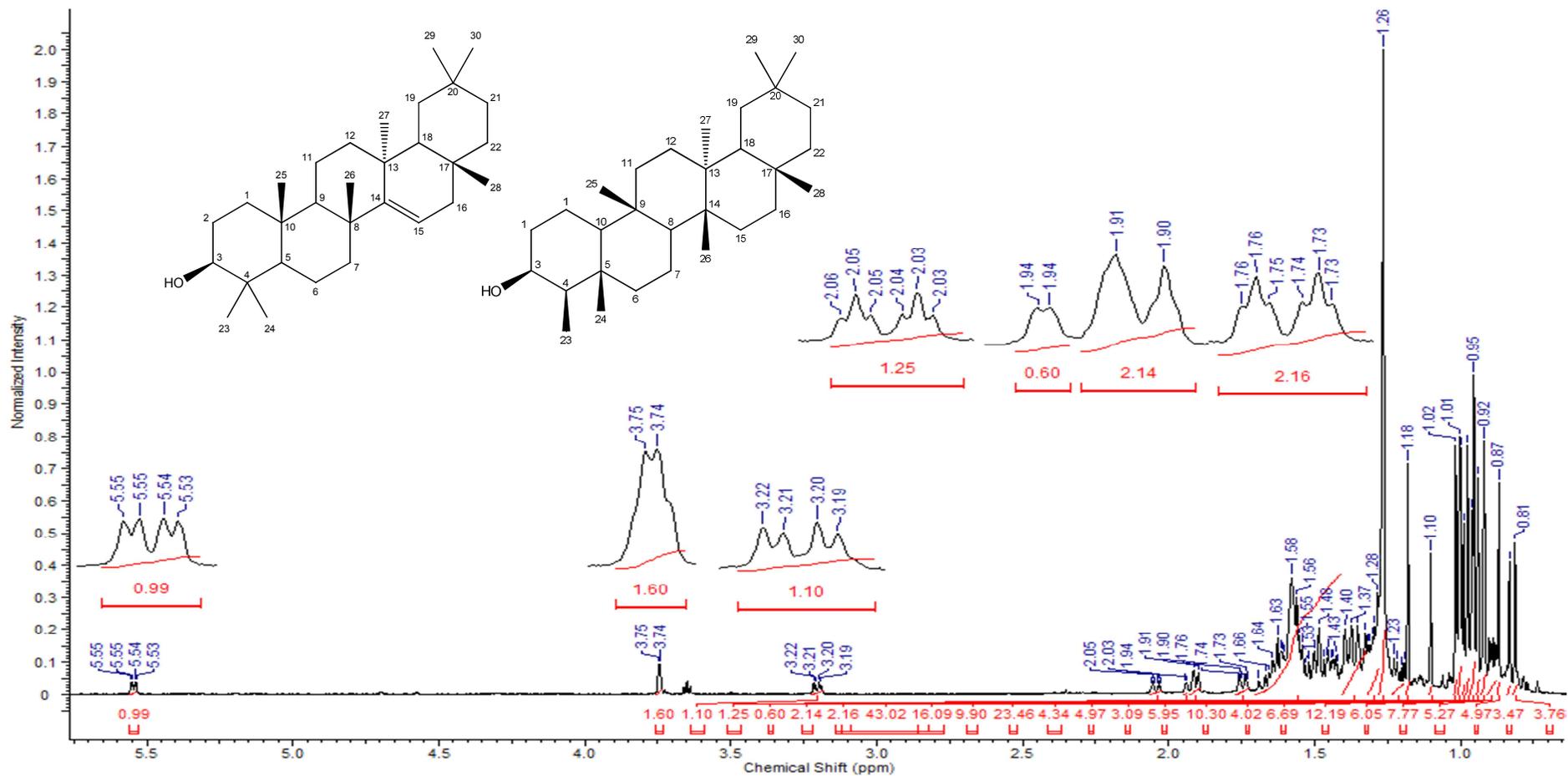


Figura 54 - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de PH1.4: expansão da região entre δ 7,27 e 0,8 ppm, com ampliação dos picos entre δ 5,55 e 1,73 ppm  
 PH1.4 – fração do precipitado do hexânico bruto (PH1) das folhas de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk.

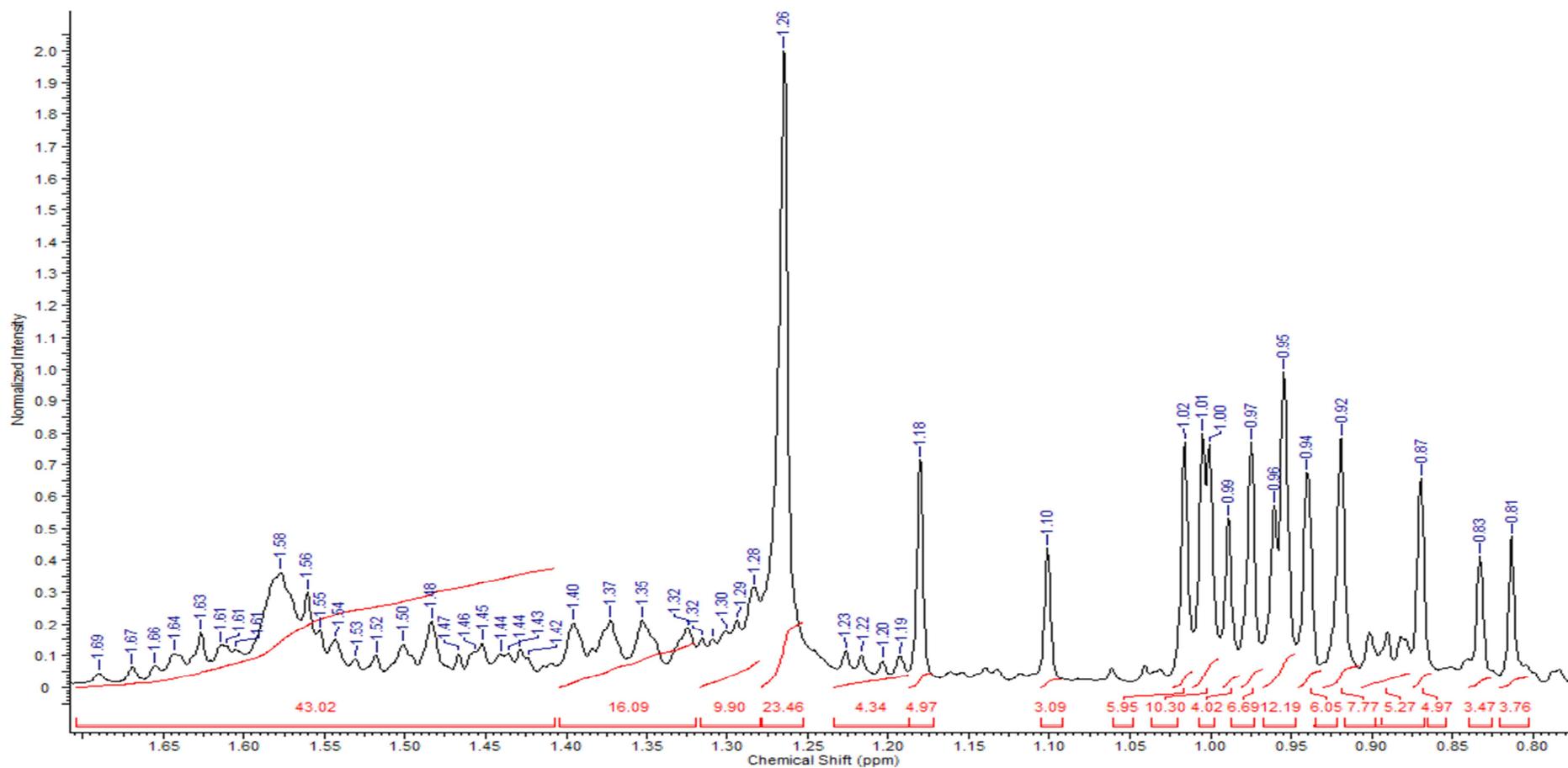


Figura 55 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de PH1.4: expansão da região entre  $\delta$  1,69 e 0,80 ppm PH1.4 – fração do precipitado do hexânico bruto (PH1) das folhas de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk.

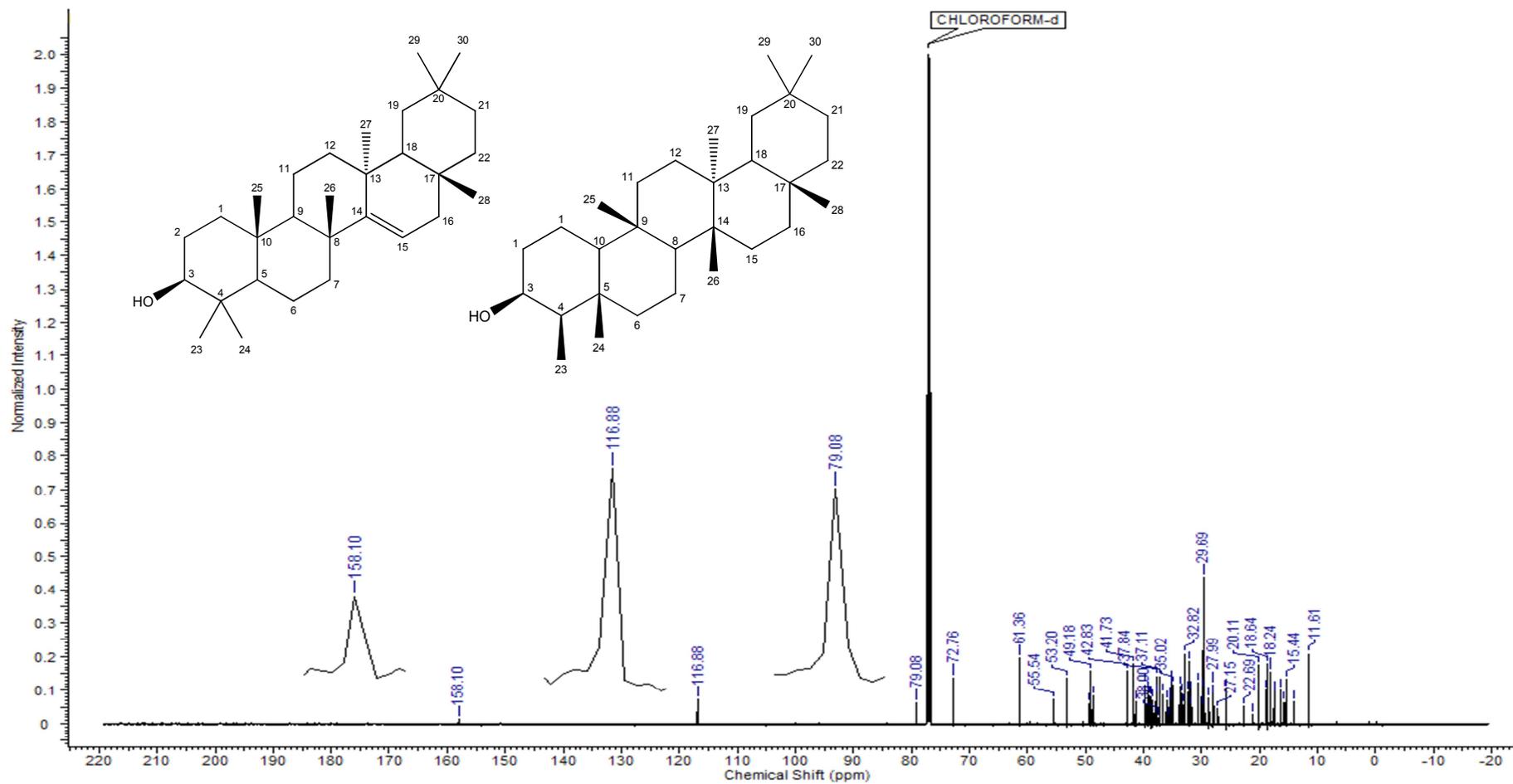


Figura 56 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de PH1.4 com ampliação dos picos entre  $\delta$  158,10 e 79,08 ppm  
 PH1.4 – fração do precipitado do hexânico bruto (PH1) das folhas de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk.

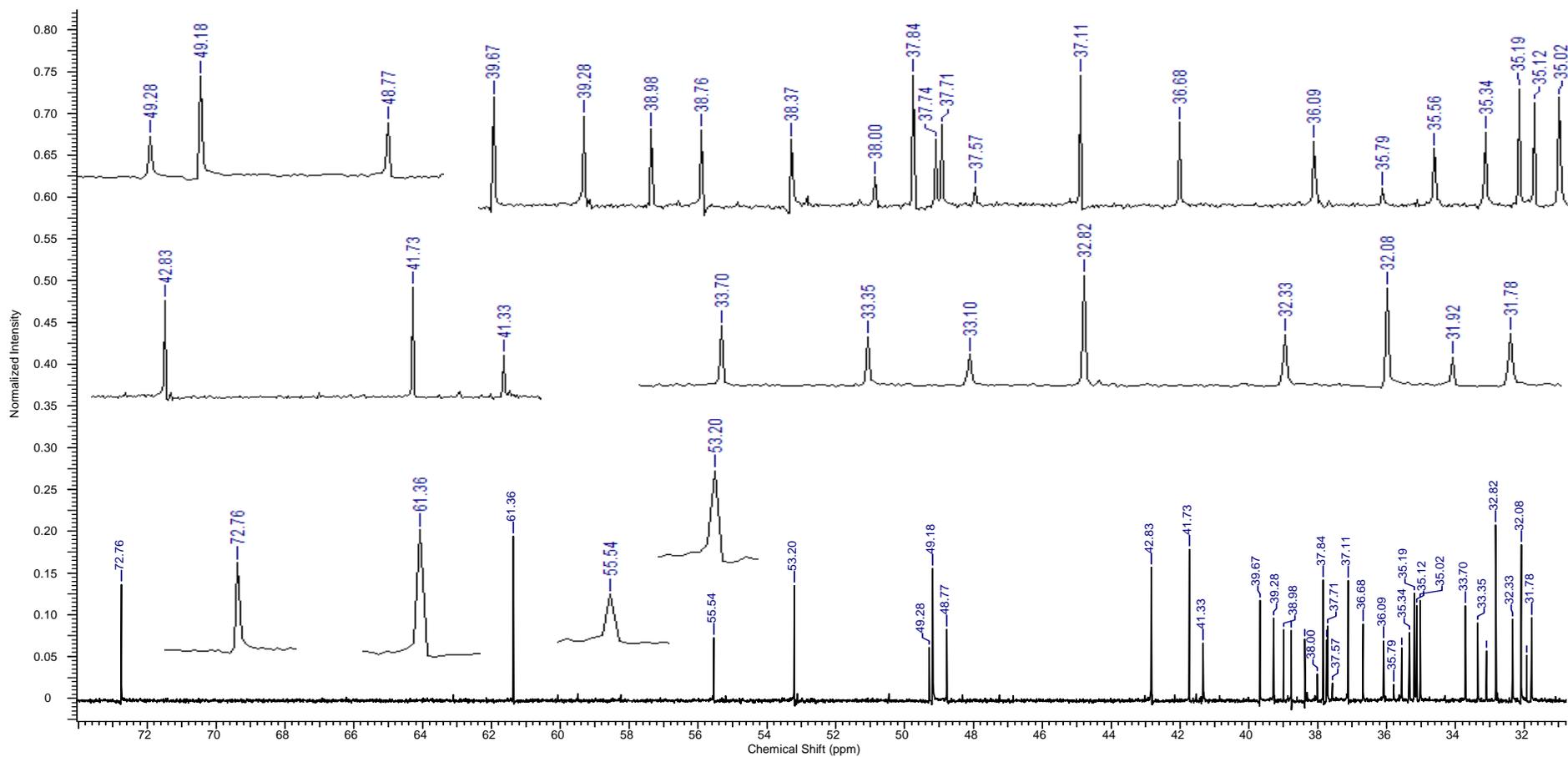


Figura 57 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de PH1.4: expansão da região entre  $\delta$  72,76 e 31,78 ppm, com ampliação de picos entre  $\delta$  72,76 e 53,20 ppm e regiões entre  $\delta$  49,28 e 48,77; 42,83 e 41,33; 39,67 e 35,02 e  $\delta$  33,70 e 31,78 ppm  
 PH1.4 – fração do precipitado do hexânico bruto (PH1) das folhas de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk.

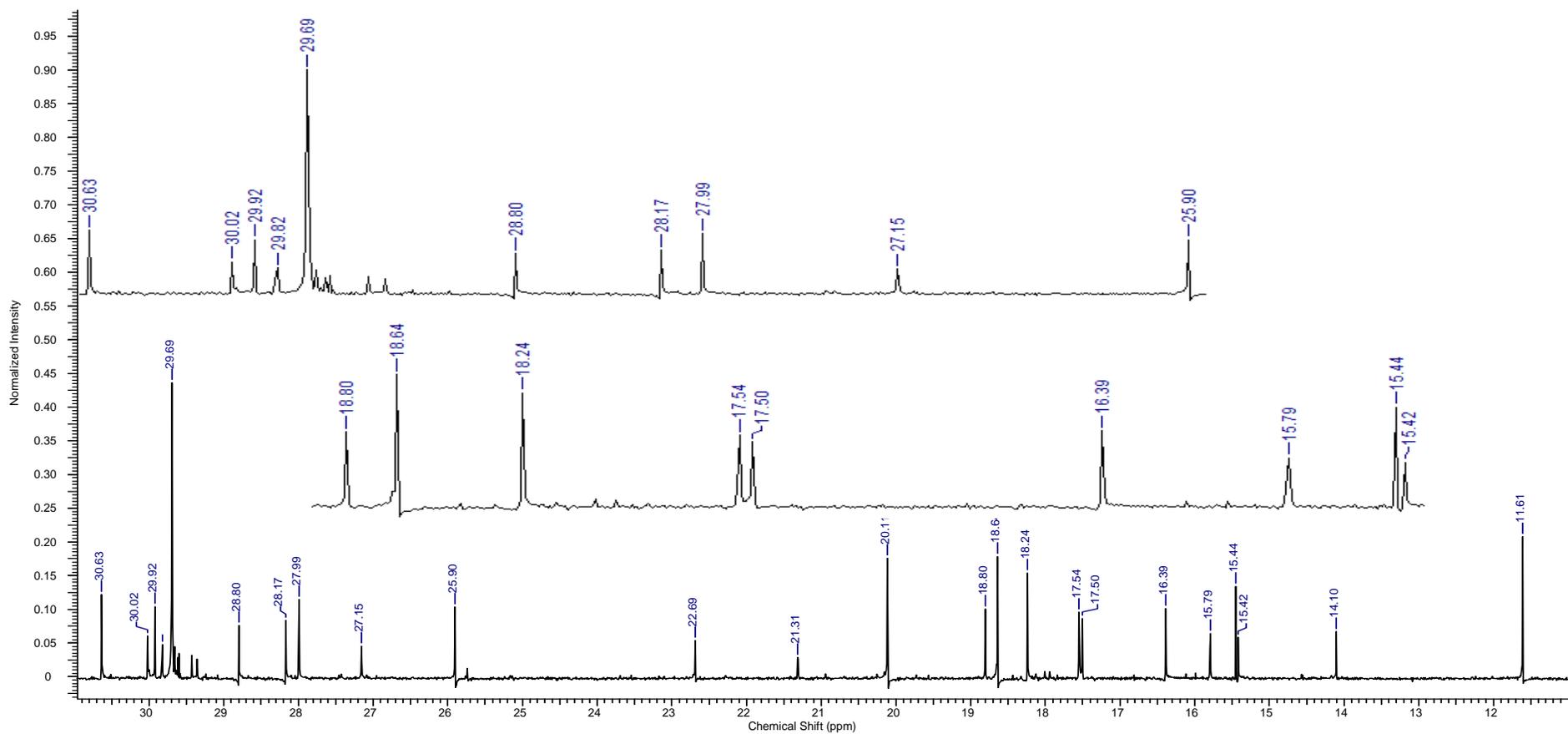


Figura 58 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de PH1.4: expansão da região entre  $\delta$  30,63 e 11,61 ppm, com ampliação das regiões entre  $\delta$  30,63 e 25,90 e  $\delta$  18,80 e 15,42 ppm  
 PH1.4 – fração do precipitado do hexânico bruto (PH1) das folhas de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk.

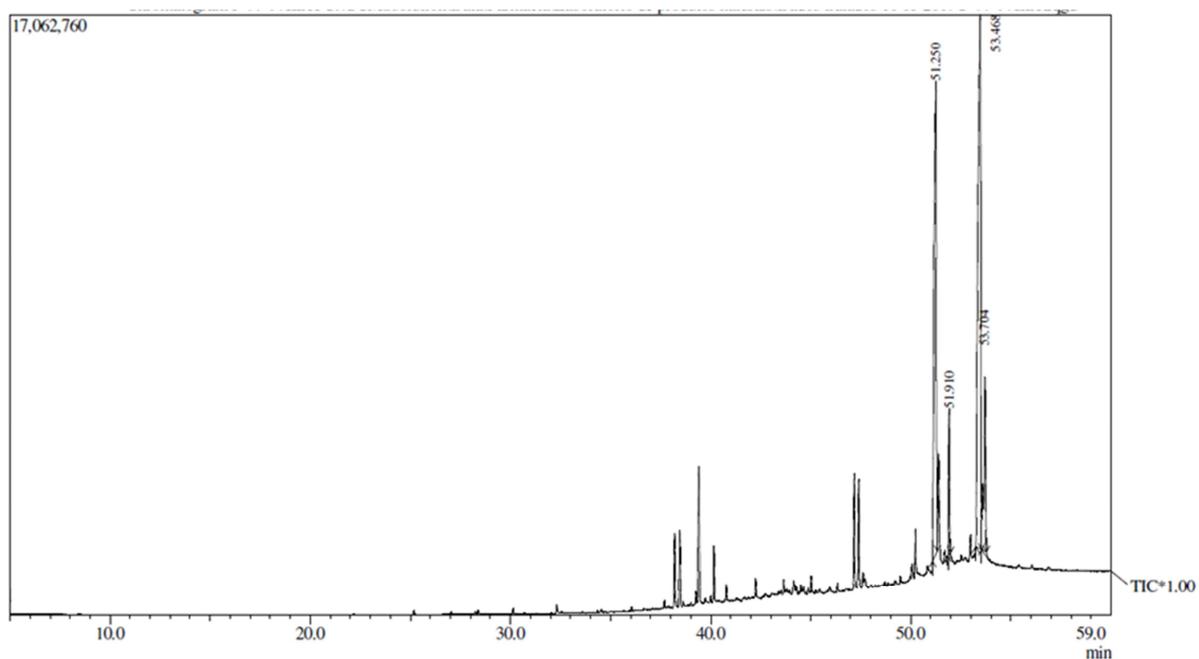


Figura 59 - Cromatograma (CG-EM) da fração PH1.4  
 PH1.4 – fração do precipitado do hexânico bruto (PH1) das folhas de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk.

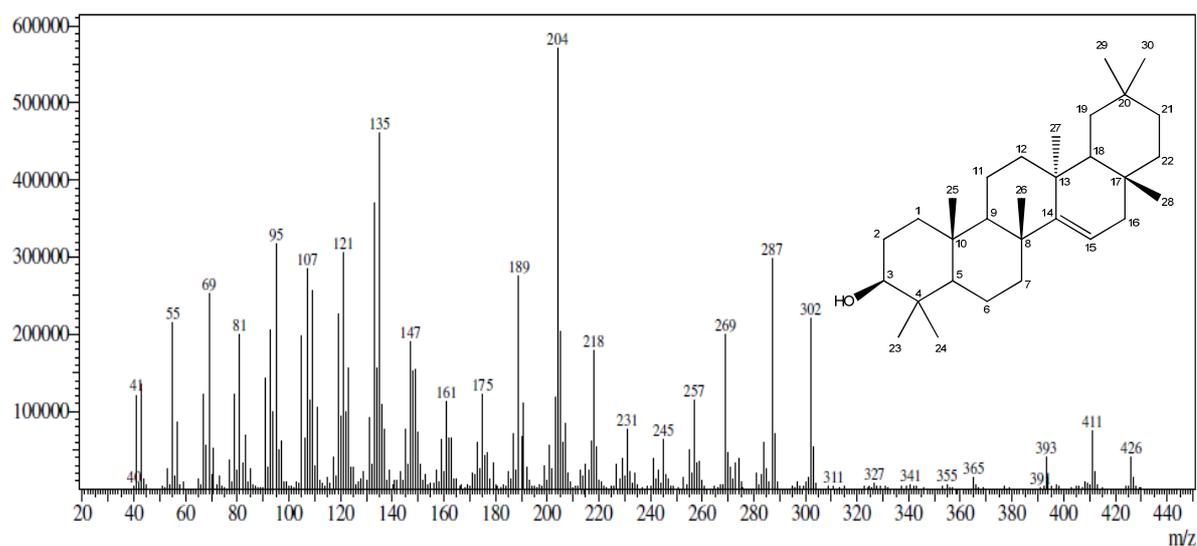


Figura 60 - Espectro de massas de PH1.4: tR 51,250 min.  
 PH1.4 – fração do precipitado do hexânico bruto (PH1) das folhas de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk.

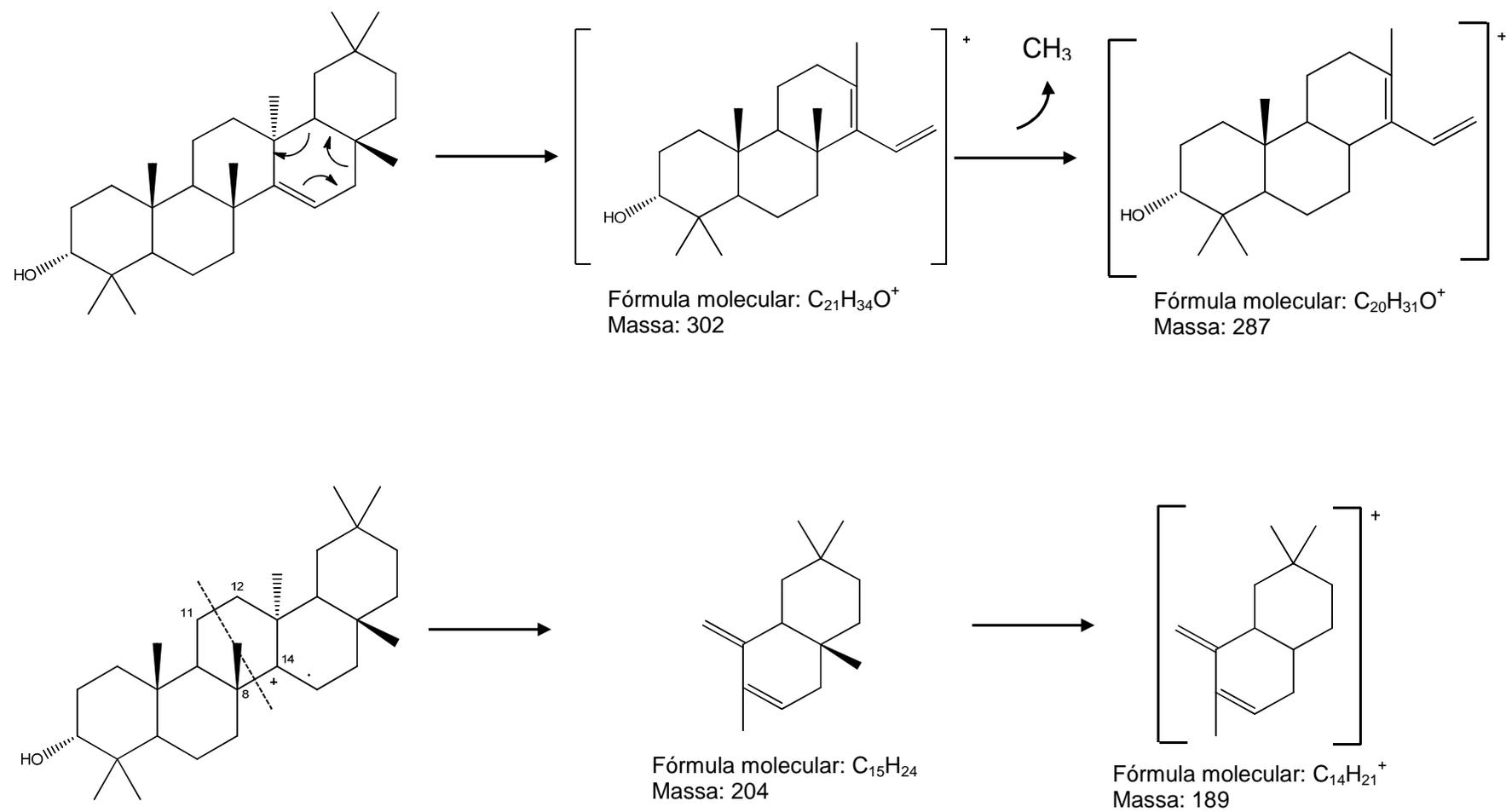


Figura 61 - Padrão de fragmentação de taraxerol (112)

## **CONCLUSÃO**

## 6 CONCLUSÃO

Apesar de vários registros sobre a atividade biológica de extratos de *P. ramiflora* serem encontrados, há uma ausência de dados publicados sobre a composição micromolecular, bem como sobre os fatores de interferência no metabolismo, tais como sazonalidade, altitude, ritmo circadiano, condições climáticas (temperatura, precipitação, radiação UV), composição atmosférica, herbivoria e ataque de patógenos, disponibilidade de água, macro e micronutrientes e idade da planta, que podem influenciar a produção de seus metabólitos secundários (63), o que representa um grande campo de trabalho.

Os extratos brutos de folhas de *Pouteria ramiflora* (hexânico, etanólico e aquoso) foram avaliados quanto à atividade de inibição frente à enzima  $\alpha$ -amilase e apresentaram-se ativos. O biomonitoramento prosseguiu com os extratos, aquoso e etanólico que apresentaram atividade superior a 90% no que se refere à inibição da atividade da  $\alpha$ -amilase. O extrato aquoso bruto e sua fração ativa apresentaram valores de  $CI_{50}$  próximas ao padrão acarbose.

O estudo mostrou que o maior potencial para a atividade avaliada está relacionado aos extratos e frações mais polares, corroborando com estudos anteriores realizados para a espécie que relacionam sua atividade inibidora da  $\alpha$ -amilase aos extratos com características mais polares. Entretanto, com o processo de fracionamento, foi observada uma redução da atividade biológica. De modo geral as plantas apresentam vários compostos com efeitos similares. Os resultados sugerem que a atividade biológica comprovada pode ocorrer em decorrência de sinergismo entre os componentes dos extratos e frações mais ativos.

Embora o extrato bruto etanólico tenha apresentado  $CI_{50}$  maior que o extrato bruto aquoso esse extrato é também promissor na busca por agente inibidor da enzima em estudo e está sendo investigado por nosso grupo de pesquisa.

Com relação à composição química, as análises cromatográficas e espectrométricas revelaram a presença de compostos fenólicos como flavonoides, catequinas e ácidos fenólicos, que podem estar associados à inibição da enzima  $\alpha$ -amilase. O perfil cromatográfico pode ajudar na identificação de amostras vegetais

autênticas, na identificação de compostos utilizados em uma adulteração ou mesmo na identificação de produtos de degradação (143). A estratégia de purificação do extrato bruto aquoso para o estudo biomonitorado permitiu ainda o isolamento e caracterização do flavonoide miricitrina, já isolado de outras espécies do gênero *Pouteria* como a *P. viridis* (Pittier) Cronquist e *P. sapota* (Jacq.) H. E. Moore & Steam, assim como em espécies de outros gêneros (144-146), e caracterizado, por cromatografia, em *P. ramiflora* (19).

Miricitrina, composto fenólico majoritário de *P. ramiflora*, apresentou atividade de inibição da  $\alpha$ -amilase menor que 50%. Contudo, é um composto bioativo com comprovada ação antinociceptiva, anti-inflamatória e antioxidante (106, 107, 147) o que pode justificar outras atividades já observadas para extratos de *Pouteria ramiflora*.

O estudo fitoquímico do extrato hexânico resultou no isolamento e identificação de 3 triterpenos: friedelina, *epi*-friedelanol e taraxerol.

O extrato hexânico, que foi o menos ativo contra a enzima avaliada, revelou-se promissor para outros estudos devido às substâncias encontradas nesse extrato estarem relacionadas a atividades biológicas importantes, como antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante. Friedelanos (friedelanol e friedelina) têm potencial para aplicações biotecnológicas, podendo ser utilizados como precursores para a obtenção triterpenos quinonametídeos bioativos (148). Friedelina apresenta ação antioxidante (149) anti-inflamatória, analgésica, antipirética (150) e antiploriferativa contra linhagens de células humanas leucêmicas (NB4 e HT93A) (151). Taraxerol também apresenta atividade antitumoral (152).

Assim, a presença desses compostos pode justificar, pelo menos em parte, a atividade observada nos extratos dessa planta.

Até onde sabemos, este é o primeiro relato da presença e isolamento de, friedelina, *epi*-friedelanol e taraxerol e do isolamento miricitrina a partir de *Pouteria ramiflora*. Considerando *epi*-friedelanol está presente em quantidades significativas nas folhas de *P. ramiflora*, esse composto pode ser um candidato a marcador dessa espécie. Os resultados apontam para a necessidade de que mais estudos sejam conduzidos com essa espécie, devido o seu potencial medicinal.

## REFERÊNCIAS

1. Veiga Junior VF, Pinto AC, Maciel MAM. Plantas medicinais: cura segura. *Quím Nova*. 2005;28(3):519-28.
2. Pennington TD, Gardens RB, Gardens K. The genera of Sapotaceae: Royal Botanic Gardens, Kew New York Botanical Garden, Bronx; 1991.
3. Carneiro CE AAA, Almeida Júnior EB, Terra Araújo MH. Sapotaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil: Jardim Botânico do Rio de Janeiro; 2014 [Acessado em 2014 26 02]. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB21020>.
4. Montenegro LHM, Oliveira PES, Conserva LM, Rocha EMM, Brito AC, Araújo RM, et al. Terpenóides e avaliação do potencial antimalárico, larvicida, anti-radicalar e anticolinesterásico de *Pouteria venosa* (Sapotaceae). *Rev Bras Farmacogn*. 2006;16(Supl):611-7.
5. Silva CAM, Simeoni LA, Silveira D. Genus *Pouteria*: chemistry and biological activity. *Rev Bras Farmacogn*. 2009;19(2A):501-9.
6. Sano SM, Almeida SP. Cerrado: ambiente e flora. Planaltina (DF): EMBRAPA-CPAC; 1998.
7. Lorenzi H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4 ed. Nova Odessa. 2002.
8. Coelho AAM, Paula JE, Espíndola LS. Efeito de extratos de plantas do Cerrado em *Dipetalogaster máxima* (Uhler)(Hemiptera, Reduviidae). *Rev Bras Entomol*. 2009;53:444-51.
9. Almeida SP, Proença CEB, Sano SM, Ribeiro JF. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: Embrapa-CPAC;1998.
10. Medeiros JD. Guia de Campo: vegetação do Cerrado 500 espécies. Brasília: MMA/SBF;2011.
11. Morzelle MC, Bachiega P, Souza EC, Boas EVdBV, Lamounier ML. Caracterização química e física de frutos de Curriola, Gabiroba e Murici provenientes do Cerrado brasileiro. *Rev Bras Frut*. 2015 mar;37(1):96-103.
12. Fontes Júnior EA, Souza PJ, Nascimento JL, Santos SN, Espindola LS, Ferreira VM. Antinociceptive and antiinflammatory properties of the ethanolic extract of *Pouteria ramiflora* roots. *Lat Am J Pharm*. 2009;28(6):812-8.

13. Silva MAB, Melo LVL, Ribeiro RV, de Souza JPM, Lima JCS, Martins DT, et al. Levantamento etnobotânico de plantas utilizadas como anti-hiperlipidêmicas e anorexígenas pela população de Nova Xavantina-MT, Brasil. *Rev Bras Farmacogn.* 2010;20(4):549-62.
14. Chaves EMF, Barros RFM. Diversidade e uso de recursos medicinais do carrasco na APA da Serra da Ibiapaba, Piauí, Nordeste do Brasil. *Rev Bras Plant Med.* 2012;14(3):476-86.
15. Silva GB, Martim L, Silva CL, Young MCM, Ladeira AM. Potencial alelopático de espécies arbóreas nativas do Cerrado. *Hoehnea.* 2006;33(3):331-8.
16. Nogueira LG. Avaliação do potencial antimicrobiano de *Pouteria* spp. e de triterpenos quinonametídeos com enfoque no *Helicobacter pylori* [Tese]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista; 2012.
17. Assis PA. Atividade antifúngica de extratos depositados no banco de extratos de plantas do Bioma Cerrado e de substâncias isoladas de *Matayba Guianensis* [Dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília; 2013.
18. Silva SMM. Avaliação da atividade antimicrobiana de espécies vegetais do bioma Cerrado [Dissertação]. Brasília: universidade de Brasília; 2014.
19. Costa DLMG. Estudo químico e avaliação da atividade mutagênica dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Pouteria torta* e *Pouteria ramiflora* (Sapotaceae) [Tese]: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 2014.
20. Santos BTA. Estudo da atividade dos extratos de plantas e fungos endofíticos isolados do cerrado brasileiro em linhagem celular de feocromocitoma [Dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília; 2014.
21. Cardoso SC. Estudo da atividade antitumoral de extratos de plantas e de fluidos de cultivo de fungos em linhagens de células de adenocarcinoma de próstata humano [Dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília; 2014.
22. Costa AV, Calábria LK, Furtado FB, Gouveia NM, Silva Oliveira RJ, Oliveira VN, et al. Neuroprotective effects of *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk (Sapotaceae) extract on the brains of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Metab Brain Dis.* 2013;28(3):411-9.
23. Gouveia NM, Albuquerque CL, Espindola LS, Espindola FS. *Pouteria ramiflora* extract inhibits salivary amylolytic activity and decreases glycemic level in mice. *An Acad Bras Cienc.* 2013 Sept;85(3):1141-8.
24. Antunes AF. Atividade inibitória de extratos vegetais do cerrado sobre  $\alpha$ -amilases [Dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília; 2008.

25. Souza PM, Sales PM, Simeoni LA, Silva EC, Silveira D, Magalhães P. Inhibitory activity of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase by plant extracts from the Brazilian cerrado. *Planta Med.* 2012;78(4):393-9.
26. Silva EM. Ação inibitória de extratos de plantas do Cerrado sobre  $\alpha$ -amilases com ênfase em *Kielmeyera coriacea* [Dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília; 2008.
27. Souza PM. Atividade de inibição enzimática por espécies vegetais do bioma cerrado [Dissertação]: Unibersidade de Brasília; 2011.
28. Souza PM, Mgalhães PO. Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry-A review. *Braz J Microbiol.* 2010;41(4):850-61.
29. Sales PM, Souza PM, Simeoni LA, Magalhães PO, Silveira D.  $\alpha$ -Amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. *J Pharm Pharm Sci.* 2012;15(1):141-83.
30. Sarker Satyajit D. , Nahar L. Química para estudantes de farmácia. Química Geral, Orgânica e de Produtos Naturais. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2011.
31. Yunes RA, Cechinel Filho V. Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. Itajaí: UNIVALE; 2014.
32. Viegas Jr C, Bolzani VS, Barreiro EJ. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Quím Nova.* 2006;29(2):326-37.
33. Guimarães DO, Momesso LS, Pupo MT. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Quim Nova.* 2010;33(3):667-79.
34. Costa-Lotufo LV, Montenegro RC, Alves APNN, Madeira SVF, Pessoa C, Moraes MEA, et al. A Contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará 2010 [Acessado em 2 08 06 2015]. 47-58]. Disponível em: <http://www.uff.br/RVQ/index.php/rvq/article/viewArticle/65>.
35. Guido RV, Andricopulo AD, Oliva G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. *Estud av.* 2010;24(70):81-98.
36. Ferreira RS, Oliva G, Andricopulo AD. Integração das técnicas de triagem virtual e triagem biológica automatizada em alta escala: oportunidades e desafios em P&D de fármacos. *Quim Nova.* 2011;34(10):1770-8.

37. MMA. Plano de ação para prevenção e controle do desmatamento e das queimadas: cerrado. . In: Ambiente MdM, editor. Brasília2011. p. 200.
38. MMA. O Bioma Cerrado: Ministério do Meio Ambiente; [s.d.] [08 06 2015]. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>.
39. Ribeiro ML. Reserva ecológica do IBGE - biodiversidade terrestre. Rio de Janeiro: Coordenação de Recursos Naturais e Estudos Ambientais 2011. Disponível em: [http://www.recor.org.br/old/images/textos/v1t2\\_Biodiversidade%20terrestre.pdf](http://www.recor.org.br/old/images/textos/v1t2_Biodiversidade%20terrestre.pdf).
40. MMA-IBAMA. Monitoramento do desmatamento nos biomas brasileiros por satélite - Acordo de cooperação técnica MMA/IBAMA. Monitoramento do bioma Cerrado 2009-2010 2011. Disponível em: [http://www.mma.gov.br/estruturas/sbf\\_chm\\_rbbio/\\_arquivos/relatoriofinal\\_cerrado\\_2010\\_final\\_72\\_1.pdf](http://www.mma.gov.br/estruturas/sbf_chm_rbbio/_arquivos/relatoriofinal_cerrado_2010_final_72_1.pdf).
41. Forzza RC, Leitman PM, Costa Júnior AC, de AA, Peixoto AL, Walter BMT, et al. Catálogo de plantas e fungos do Brasil: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro; 2010. Disponível em: <http://static.scielo.org/scielobooks/x5x7v/pdf/forzza-9788560035090.pdf>.
42. Klink CA, Machado RB. Conservation of the brazilian Cerrado. *Conserv Biol.* 2005;19(3):707-13.
43. Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Da Fonseca GAB, Kent J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 2000;403(6772):853-8.
44. Soares-Filho B, Rajão R, Macedo M, Carneiro A, Costa W, Coe M, et al. Cracking Brazil's forest code. *Science.* 2014;344(6182):363-4.
45. Maroni BC, Di Stasi LC, Machado SR. Plantas medicinais do cerrado de Botucatu: guia ilustrado: UNESP; 2006.
46. Lima ILP, Scariot A, Medeiros Md, Sevilha AC. Diversidade e uso de plantas do Cerrado em comunidade de Geraizeiros no norte do estado de Minas Gerais, Brasil. *Acta Bot Brasilica.* 2012;26:675-84.
47. Ferrão BH, de Oliveira HB, Molinari R, Teixeira MB, Fontes GG, Amaro MdOF. Importância do conhecimento tradicional no uso de plantas medicinais em Buritis, MG, Brasil. *Ciênc Nat.* 2014;36:321-34.
48. Bessa N, Borges J, Beserra F, Carvalho R, Pereira M, Fagundes R, et al. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde-Tocantins. *Rev Bras Plantas Med.* 2013;15(4, supl. 1):692-707.

49. Marques LG, Santos MR, Raffo J, Pessoa C. Redes de bioprospecção no Brasil: cooperação para o desenvolvimento tecnológico. *Revista de Desenvolvimento Econômico*. 2014;15(28).
50. Rodrigues W, Barbosa GF. Plantas Medicinais: Uma Alternativa Econômica Para Conservação Do Cerrado Brasileiro? *GEPEC*. 2012;16(1).
51. Silva Júnior MC, dos Santos GC. 100 árvores do cerrado: guia de campo. Brasília: Rede de sementes do Cerrado; 2005.
52. Lorenzi H. Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: de consumo in natura: Instituto Plantarum de Estudos da Flora; 2006.
53. Tropicos.org. Missouri Botanical Garden [on line]. Saint Louis, USA;2014 [Acessado em 2014. 16 nov. 2014]. Disponível em: <http://www.tropicos.org/NameSearch.aspx?name=Pouteria+ramiflora&commonname=>.
54. Almeida S, Proença CEB, Sano SM, Ribeiro JF. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: Embrapa-CPAC. 1998;464.
55. Oliveira AK, Pereira KC, Muller JA, Matias R. Análise fitoquímica e potencial alelopático das cascas de *Pouteria ramiflora* na germinação de alface. *Hortic bras*. 2014;32(1):41-7.
56. Condessa MB. Avaliação da atividade antioxidante e alelopática de plantas medicinais [Dissertação]: Universidade de Brasília; 2011.
57. Napolitano DR, Mineo JR, Souza MA, Paula JE, Espindola LS, Espindola FS. Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the Brazilian Cerrado. *J Ethnopharmacol*. 2005;99(1):37-41.
58. Castro CFS, Silva CAM, Perfeito JP, Santos ML, Resck IS, Paula JE, et al. Avaliação da atividade antioxidante de algumas espécies de *Pouteria*. [Apresentação na 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química; 2006; Águas de Lindóia, Brasil].
59. Mesquita ML, Grellier P, Mambu L, Paula JE, Espindola LS. In vitro antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. *J Ethnopharmacol*. 2007;110(1):165-70.
60. Rangel ET. Atividade antiprotozoária, antifúngica e citotóxica de extratos de plantas do bioma Cerrado, com ênfase em *Leishmania (Leishmania) chagasi* [Tese]: Universidade de Brasília; 2010.

61. Mesquita ML. Potencial antitumoral de substâncias isoladas de plantas do Cerrado brasileiro: estudos preliminares do mecanismo de ação da atividade citotóxica [Tese]: Universidade de Brasília; 2010.
62. Elias ST, Borges GA, Amorim DA, Rêgo DF, Simeoni LA, Silveira D, et al. Radiation induced a supra-additive cytotoxic effect in head and neck carcinoma cell lines when combined with plant extracts from Brazilian Cerrado biome. *Clin Oral Invest.* 2014;1-10.
63. Gobbo-Neto L, Lopes NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quím Nova.* 2007;30(2):374.
64. Delatorre AB, Ladeira SA, Andrade MVV, Barbosa JB, Martins MLL. Microrganismos termofílicos e enzimas termoestáveis de importância comercial. *PerspectivasOnLine 2007-2010.* 2014;4(16).
65. Marques SJP, da Cunha MET. Produção de álcool combustível utilizando milho. *Cient Exatas Technol.* 2008;7(1):45-51.
66. Freitas LS, da Silva Martins E, Ferreira OE. Produção e caracterização parcial de  $\alpha$ -amilase de *Syncephalastrum racemosum*. *Rev Bras Biociênc.* 2014;12(4):226-32.
67. Carey FA. *Química Orgânica.* 7ª ed 2011.
68. Coelho MAZ, Alice M, Salgado AM, Ribeiro BD. *Tecnologia enzimática:* Editora EPUB; 2008.
69. Nelson DL, Cox MM. *Princípios de bioquímica de Lehninger.* (5ª). Porto Alegre: Artmed; 2011.
70. Brayer GD, Luo Y, Withers SG. The structure of human pancreatic alpha-amylase at 1.8 Å resolution and comparisons with related enzymes. *Protein science : a publication of the Protein Society.* 1995 Sep;4(9):1730-42. PubMed PMID: 8528071. Pubmed Central PMCID: PMC2143216. Epub 1995/09/01. eng.
71. Alagesan K, Raghupathi PK, Sankarnarayanan S. Amylase inhibitors: Potential source of anti-diabetic drug discovery from medicinal plants. *Int j pharm life sci.* 2012;3(2).
72. Marshall JJ, Lauda CM. Purification and properties of phaseolamin, an inhibitor of alpha-amylase, from the kidney bean, *Phaseolus vulgaris*. *J Biol Chem* 1975;250(20):8030-7.
73. Udani JK, Singh BB, Barrett ML, Preuss HG. Lowering the glycemic index of white bread using a white bean extract. *Nutr J.* 2009;8(52):1-5.

74. Pereira LLS. Inibidores de enzimas digestivas do feijão branco: isolamento, atividade biológica e perspectivas para o tratamento da obesidade e do diabetes mellitus [Tese]: Universidade Federal de Lavras; 2014.
75. Ali H, Houghton PJ, Soumyanath A.  $\alpha$ -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. J Ethnopharmacol. 2006;107(3):449-55.
76. Tagliarii MS, Knaak N, Fiuza LM. Plantas inseticidas: interações e compostos. Pesq Agropec Gau. 2004;10:101-11.
77. Silva-Filho MC, Falco MC. Interação planta-inseto: adaptação dos insetos aos inibidores de proteinase produzidos pelas plantas. Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento. 2000;2:38-42.
78. Santos Murra Md, Pessato TB, Tavano OL. Presença de inibidores de proteases em amostras comerciais de “faseolaminas” utilizadas como bloqueadores de carboidratos e os riscos à saúde. Rev Inst Adolfo Lutz. 2013;72(3):218-25.
79. Mazur CE. Efeito do Feijão Branco (*Phaseolus vulgaris* L.) na perda de peso. Rev Bras Nutr Esportiva 2015;8(48):404-11.
80. WHO. Diabetes: World Health Organization; 2015 [04 06 2015]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>.
81. ADA. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care. 2014;37(Supplement 1):S81-S90.
82. WHO. Global status report on noncommunicable diseases 2014: World Health Organization; 2014 [17 06 2015]. Disponível em: <http://www.who.int/nmh/publications/ncd-status-report-2014/en/>.
83. WHO. The top 10 causes of death: World Health Organization; 2014 [04 06 2015]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>.
84. IDF. Diabetes Atlas: International Diabetes Federation; 2014 [08 06 2015]. 6:[Disponível em: <http://www.idf.org/diabetesatlas>].
85. BRASIL. Vigitel Brasil 2013: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Secretaria de Vigilância em Saúde. In: Saúde SdVe, editor. Brasília: Ministério da Saúde; 2014. p. 120.
86. Duncan BB, Schmidt MI, Giugliani ER, Duncan MS, Giugliani C. Medicina Ambulatorial: Conduas de Atenção Primária Baseadas em Evidências: Artmed Editora; 2014.

87. Silva CAd, Lima WCd. Efeito benéfico do exercício físico no controle metabólico do diabetes mellitus tipo 2 a curto prazo. *Arq bras endocrinol metab.* 2002;46(5):550-6.
88. Viana MR, Rodriguez TT. Complicações cardiovasculares e renais no diabetes mellitus. *Rev Ciên Méd Biol.* 2012;10(3):290-6.
89. BRASIL. Relação nacional de medicamentos essenciais RENAME-2013. In: Saúde Md, editor. Relação nacional de medicamentos essenciais RENAME-2013. 8ª ed2012.
90. Kahn SE, Zinman B, Lachin JM, Haffner SM, Herman WH, Holman RR, et al. Rosiglitazone-associated fractures in type 2 diabetes an analysis from a diabetes outcome progression trial (ADOPT). *Diabetes Care.* 2008;31(5):845-51.
91. Banu S, Jabir NR, Manjunath NC, Khan MS, Ashraf GM, Kamal MA, et al. Reduction of post-prandial hyperglycemia by mulberry tea in type-2 diabetes patients. *Saudi J Biol Sci.* 2014;22(1):32-6.
92. Geloneze B, Lamounier RN, Coelho OR. Postprandial hyperglycemia: treating its atherogenic potential. *Arq Bras Cardiol.* 2006;87(5):660-70.
93. Carroll MF, Izard A, Riboni K, Burge MR, Schade DS. Control of Postprandial Hyperglycemia Optimal use of short-acting insulin secretagogues. *Diabetes Care.* 2002;25(12):2147-52.
94. Lemos EGM, Stradiotto NRO. Bioenergia: desenvolvimento, pesquisa e inovação. São Paulo2012. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/123648>.
95. Marques JA, Borges CPF. Práticas de Química Orgânica. 2, editor: Átomo; 2012.
96. Wagner H, Bladt S. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas: Springer; 1996.
97. Fonseca YM, Fernandes C, Monteiro B, de Carvalho IM, Gomes S, Fagg C, et al. Determinación de rutina en el extracto *Erythroxylum suberosum* por cromatografía líquida: aplicación de la normalización de las hierbas y los estudios de estabilidad. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.* 2014;13(2).
98. Pavia DL, Lampman G, Kriz G, Vyvyan J. Introdução à espectroscopia. Cengage Learning. 2010.
99. Bernfeld P. Amylases,  $\alpha$  and  $\beta$ . *Methods Enzymol.* 1955;1:149-58.

100. SIGMA-ALDRICH. Enzymatic assay of  $\alpha$ -amylase (EC 3.2.1.1) [s.d.] [08 06 2015]. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-a-amylase.html>.
101. Silva RN, Monteiro VN, Alcanfor JDAX, Assis EM, Asquieri ER. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2003;23(3):337-41.
102. Azevedo CD, Moura MA. Cultivo de plantas medicinais: guia prático. Niterói: Programa Rio Rural. 2010.
103. BRASIL. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira. 1 ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.Anvisa; 2011. p. 126.
104. Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis2000.
105. Pereira M, Siba IP, Chioca LR, Correia D, Vital MABF, Pizzolatti MG, et al. Myricitrin, a nitric oxide and protein kinase C inhibitor, exerts antipsychotic-like effects in animal models. *Prog in Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry*. 2011;35(7):1636-44.
106. Meotti FC, Luiz AP, Pizzolatti MG, Kassuya CA, Calixto JB, Santos AR. Analysis of the antinociceptive effect of the flavonoid myricitrin: evidence for a role of the L-arginine-nitric oxide and protein kinase C pathways. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;316(2):789-96.
107. Domitrović R, Rashed K, Cvijanović O, Vladimir-Knežević S, Škoda M, Višnić A. Myricitrin exhibits antioxidant, anti-inflammatory and antifibrotic activity in carbon tetrachloride-intoxicated mice. *Chem Biol Interact*. 2015;230:21-9.
108. Ferreira LT, Saviolli IH, Valenti VE, Abreu LC. Diabetes Melito: hiperglicemia crônica e suas complicações. *Arq Bras Ciênc Saúde [Internet]*. 2011[Acessado em 2014 May 18]; 36 (3): 182-8.
109. Lo Piparo E, Scheib H, Frei N, Williamson G, Grigorov M, Chou CJ. Flavonoids for controlling starch digestion: structural requirements for inhibiting human  $\alpha$ -amylase. *J Med Chem*. 2008;51(12):3555-61.
110. Kim J-S, Kwon C-S, Son KH. Inhibition of alpha-glucosidase and amylase by luteolin, a flavonoid. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2000;64(11):2458-61.
111. Corrêa JCR, Salgado HRN. Insecticidal activities of plants and applications: a review. *Rev Bras Plant Med*. 2011;13(4):500-6.

112. Nabavi SF, Nabavi SM, Habtemariam S, Moghaddam AH, Sureeda A, Jafari M, et al. Hepatoprotective effect of gallic acid isolated from *Peltiphyllum peltatum* against sodium fluoride-induced oxidative stress. *Industrial Crops and Products*. 2013;44:50-5.
113. Kim S-H, Jun C-D, Suk K, Choi B-J, Lim H, Park S, et al. Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells. *Toxicol Sci*. 2006;91(1):123-31.
114. Kroes BH, Van den Berg AJ, Quarles vUHC, Van Dijk H, Labadie RP. Anti-inflammatory activity of gallic acid. *Planta medica*. 1992;58(6):499-504.
115. Aruoma OI, Murcia A, Butler J, Halliwell B. Evaluation of the antioxidant and prooxidant actions of gallic acid and its derivatives. *J Agric Food Chem*. 1993;41(11):1880-5.
116. Chao J, Huo T-I, Cheng H-Y, Tsai J-C, Liao J-W, Lee M-S, et al. Gallic acid ameliorated impaired glucose and lipid homeostasis in high fat diet-induced NAFLD mice. *PloS one*. 2014;9(6):e96969.
117. Hara Y, Honda M. The inhibition of  $\alpha$ -amylase by tea polyphenols. *Agric Biol Chem*. 1990;54(8):1939-45.
118. Shen CJ, Chen CK, Lee SS. Polar Constituents from *Sageretia Thea* Leaf Characterized by HPLC-SPE-NMR Assisted Approaches. *J Chin Chem Soc*. 2009;56(5):1002-9.
119. Agrawal PK, Bansal MC. Flavonoid glycosides. In: B.V. ESP, editor. *Carbon-13 NMR of flavonoids. Studies in Organic Chemistry* 39. 39. Amsterdam-Oxford-New York - Tokyo 1989. p. 283-364.
120. Zhong X-N, Otsuka H, Ide T, Hirata E, Takushi A, Takeda Y. Three flavonol glycosides from leaves of *Myrsine seguinii*. *Phytochemistry*. 1997;46(5):943-6.
121. Marques TR, Pereira L, Simão A, Ramos V, Braga M, Corrêa A, et al. Inibição de enzimas digestivas por pellets de lúpulo (*Humulus lupulus* L.). *Revista Bras Biociênc*. 2014;12(4).
122. Soares SE. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Rev Nutr*. 2002;15(1):71-81.
123. Monteiro JM, de Albuquerque UP, de LAraujo E, de Amorim ELC. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Quím Nova*. 2005;28(5):892.
124. Lage FF. Casca de jaboticaba: inibição de enzimas digestivas, antioxidante, efeitos biológicos sobre o fígado e perfil lipídico [Tese]. Lavras: Universidade Federal de Lavras; 2014.

125. Koh LW, Wong LL, Loo YY, Kasapis S, Huang D. Evaluation of different teas against starch digestibility by mammalian glycosidases. *J Agric Food Chem.* 2009;58(1):148-54.
126. Silverstein RMB, G. Clayton. Morrill, Terence C. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 3 ed: Guanabara; 1987.
127. Almeida MFO, Melo ACR, Pinheiro MLB, Silva JRA, Souza ADL, Barison A, et al. Constituintes químicos e atividade leishmanicida de *Gustavia elliptica* (Icelythidaceae). *Quim Nova.* 2011;34(7):1182-7.
128. Van Chau M, Le MH, Phan VK. Chemical investigations and biological studies of *Mallotus apelta*. *J Chem.* 2005;43:5-6.
129. Quintans JSS, Costa EV, Tavares JF, Souza TT, Araújo SS, Estevam CS, et al. Phytochemical study and antinociceptive effect of the hexanic extract of leaves from *Combretum duarteanum* and friedelin, a triterpene isolated from the hexanic extract, in orofacial nociceptive protocols. *Rev Bras Farmacogn.* 2014;24(1):60-6.
130. Trevisan RR, Lima CP, Miyazaki CMS, Pesci FA, Silva CB, Hirota BCK, et al. Avaliação da atividade fitotóxica com enfoque alelopático do extrato das cascas de *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent Ulmaceae e purificação de dois triterpenos. *Rev Bras Plantas Med.* 2012;14(3):494-9.
131. Budzikiewicz H, Wilson JM, Djerassi C. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXII. 1 Pentacyclic triterpenes. *J Am Chem Soc.* 1963;85(22):3688-99.
132. Hirota H, Moriyama Y, Tsuyuki T, Tanahashi Y, Takahashi T, Katoh Y, et al. The high resolution mass spectra of shionane and friedelane derivatives. *Bull Chem Soc Jpn.* 1975;48(6):1884-8.
133. Céu Costa M, Duarte P, Neng NR, Nogueira JMF, Costa F, Rosado C. Novel insights for permeant lead structures through in vitro skin diffusion assays of *Prunus lusitanica* L., the Portugal Laurel. *J Mol Struct.* 2015;1079:327-36.
134. Susidarti RA, Rahmani M, Ali AM, Sukari MA, Smail HBM. Friedelin from kelat merah (*Eugenia chlorantha* Duthie). [s.d].
135. Kundu JK, Rouf ASS, Nazmul Hossain M, Hasan CM, Rashid MA. Antitumor activity of epifriedelanol from *Vitis trifolia*. *Fitoterapia.* 2000;71:577-9.
136. Rudrapaula P, Grunerb M, Knölkerb H-J, Dinda B. Flavones and triterpenes from the leaves of *Vitex peduncularis*. *Indian J Chem.* 2015;54:279-82.

137. Sousa GF, Duarte LP, Alcântara AFC, Silva GDF, Vieira-Filho SA, Silva RR, et al. New triterpenes from *Maytenus robusta*: structural elucidation based on NMR experimental data and theoretical calculations. *Molecules*. 2012;17(11):13439-56.
138. Ng'ang'a MM, Hussain H, Chhabra S, Langat-Thoruwa C, Irungu BN, Al-Harrasi A, et al. Antiplasmodial activity of compounds from *Drypetes gerrardii*. *Chem Nat Compd*. 2012;48(2):339-40.
139. Lopez KSE. Estudo químico e atividades biológicas de *Pouteria torta* (Mart.) Raldk. (Sapotaceae) [Dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília; 2005.
140. Swain SS, Rout KK, Chand PK. Production of triterpenoid anti-cancer compound taraxerol in *Agrobacterium*-transformed root cultures of butterfly pea (*Clitoria ternatea* L.). *Appl Biochem Biotechnol*. 2012;168(3):487-503.
141. Oladoye SO, Ayodele ET, Abdul-Hammed M, Idowu OT. Characterisation and Identification of Taraxerol and Taraxer-14-en-3-one from *Jatropha tanjorensis* (Ellis and Saroja) Leaves. *Pak J Sci Ind Res Ser A: Phys Sci*. 2015;58(1):1-7.
142. Montenegro LHM, Oliveira PES, Conserva LM, Rocha EMM, Brito AC, Araújo RM, et al. Terpenóides e avaliação do potencial antimalárico, larvicida, anti-radicalar e anticolinesterásico de *Pouteria venosa* (Sapotaceae). *Rev Bras Farmacogn*. 2006;16(sSupl).
143. Wolfender J-L, Ndjoko K, Hostettmann K. Liquid chromatography with ultraviolet absorbance–mass spectrometric detection and with nuclear magnetic resonance spectrometry: a powerful combination for the on-line structural investigation of plant metabolites. *J Chromatogr A*. 2003;1000(1):437-55.
144. Ma J, Yang H, Basile MJ, Kennelly EJ. Analysis of polyphenolic antioxidants from the fruits of three *Pouteria* species by selected ion monitoring liquid chromatography-mass spectrometry. *J Agric Food Chem*. 2004;52(19):5873-8.
145. Souza PM, Elias ST, Simeoni LA, de Paula JE, Gomes SM, Guerra ENS, et al. Plants from Brazilian Cerrado with potent tyrosinase inhibitory activity. *PLoS One*. 2012;7(11).
146. Borges LL, Conceição EC, Silveira D. Active compounds and medicinal properties of *Myrciaria* genus. *Food Chem*. 2014;153:224-33.
147. Meotti FC, Fachinetto R, Maffi LC, Missau FC, Pizzolatti MG, Rocha JB, et al. Antinociceptive action of myricitrin: involvement of the K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> channels. *Eur J Pharmacol*. 2007;567(3):198-205.
148. Paz TA. Aplicação da biotecnologia na obtenção de triterpenos quinonametídeos bioativos utilizando *Salacia campestris* (Cambess.)

Walp.(Celastraceae) como modelo [Dissertação]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista; 2011.

149. Sunil C, Duraipandiyan V, Ignacimuthu S, Al-Dhabi NA. Antioxidant, free radical scavenging and liver protective effects of friedelin isolated from *Azima tetracantha* Lam. leaves. Food Chem. 2013;139(1):860-5.

150. Antonisamy P, Duraipandiyan V, Ignacimuthu S. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of friedelin isolated from *Azima tetracantha* Lam. in mouse and rat models. J Pharm Pharmacol. 2011;63(8):1070-7.

151. Sangsuwon C, Jiratchariyakul W, U-pratya Y, Kummalue T. Antiproliferative effect and the isolated compounds of *Pouzolzia indica*. Evid Based Complement Alternat Med. 2013;2013:8.

152. Sharma K, Zafar R. Occurrence of taraxerol and taraxasterol in medicinal plants. Pharmacogn Rev. 2015;9(17):19.