

PAULA MONTEIRO DE SOUZA

ATIVIDADE DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA POR ESPÉCIES VEGETAIS DO BIOMA
CERRADO

Brasília, 2011

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

PAULA MONTEIRO DE SOUZA

ATIVIDADE DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA POR ESPÉCIES VEGETAIS DO BIOMA
CERRADO

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

Orientadora: Profa. Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista

Brasília
2011

PAULA MONTEIRO DE SOUZA

ATIVIDADE DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA POR ESPÉCIES VEGETAIS DO BIOMA
CERRADO

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

Aprovado em 23 de fevereiro de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília – UnB
Presidente

Profa. Dâmaris Silveira
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília – UnB

Prof. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho
Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília – UnB

AGRADECIMENTOS

À Professora Pérola pela orientação, pela amizade, pela confiança e por todos os momentos de aprendizado que passamos juntas.

À minha mãe, ao meu pai e aos meus irmãos pelo incentivo, pelas preocupações e por sempre apoiarem minhas decisões. Ao Felipe pelo amor, incentivo e compreensão.

À Professora Dâmaris pela colaboração no projeto, por disponibilizar os extratos vegetais do bioma Cerrado, pelos ensinamentos, apoio e atenção.

Ao Professor Luiz Alberto Simeoni pelo conhecimento, atenção e colaboração à nossa pesquisa, e por disponibilizar espaço e estrutura do Laboratório de Farmacologia Molecular (FARMOL/UnB).

À Professora Maria de Fátima Borin pelos ensinamentos, apoio e colaboração.

Ao Professor Francisco de Assis Rocha Neves por disponibilizar espaço e estrutura do Laboratório de Farmacologia Molecular (FARMOL/UnB).

Ao Professor Antonio Teixeira do Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas por disponibilizar o uso do equipamento de leitor de microplacas.

Ao Professor Elton Clementino da Silva por disponibilizar os extratos da espécie vegetal *Eugenia dysenterica*.

Aos colegas Paloma Michelle de Sales, Thaís Almeida Pereira, Cíntia Alves de Matos Silva, Pedro Góes Mesquita, Silas Dino de Sousa e Juliana de Oliveira Pasiani pela colaboração, apoio e amizade.

À FAPDF pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa. À CAPES pela bolsa de pesquisa e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

RESUMO

A pesquisa por substâncias ativas presentes em plantas que possam inibir uma enzima chave em um determinado processo metabólico, de forma que sua ação seja a mais seletiva possível e com menores efeitos indesejáveis, tem sido o alvo das pesquisas na área de medicamentos. O Brasil está entre os países de maior biodiversidade mundial, abrigando cerca de 55 mil espécies de plantas superiores (aproximadamente 22% do total mundial). No entanto, o Cerrado que é o segundo maior bioma brasileiro com uma enorme variedade de espécies vegetais apresenta até então poucos estudos quanto a seus efeitos terapêuticos, principalmente como inibidores enzimáticos. Nessa direção, este projeto propôs avaliar espécies vegetais presentes no bioma Cerrado quanto à atividade de inibição das enzimas α -amilase, α -glicosidase, tirosinase e acetilcolinesterase. Os inibidores de α -amilase e de α -glicosidase, são utilizados no tratamento da diabetes por inibirem a hidrólise de carboidratos no trato digestivo diminuindo a absorção de glicose pelo organismo. A tirosinase está envolvida na formação da melanina, por isso seus inibidores são clinicamente importantes para o tratamento de doenças relacionadas a hiperpigmentação. O principal papel da acetilcolinesterase é hidrolisar rapidamente a acetilcolina na fenda sináptica das transmissões colinérgicas, sendo alvo para o tratamento de doenças como Alzheimer. Para atingir o objetivo proposto, foram investigados 39 extratos de 14 espécies oriundas de 9 famílias do bioma Cerrado sobre a atividade das enzimas. Os extratos com potencial atividade de inibição sobre a α -amilase foram os extratos aquosos das folhas de *Pouteria torta*, *Pouteria caimito*, *Pouteria ramiflora* e *Eugenia dysenterica*, além do extrato etanólico da casca do caule de *Stryphnodendron adstringens*. Sobre a atividade da α -glicosidase, os extratos das espécies do gênero *Pouteria*, *S. adstringens* e *E. dysenterica* demonstraram um elevado potencial de inibição. Os extratos que apresentaram potencial de inibição sobre a enzima tirosinase pertencem às espécies *Morus nigra*, *S. Adstringens*, *E. dysenterica*, *P. caimito* e *P. torta*. Porém, nenhum extrato testado, foi capaz de influenciar na atividade enzimática da acetilcolinesterase.

Palavras-chave: inibição enzimática; α -amilase; α -glicosidase; tirosinase; acetilcolinesterase; Cerrado.

ABSTRACT

The search for active in plants that inhibit a key enzyme in a particular metabolic process, so that its action is more selective as possible and with less side effects, has been the focus of research in medicine. Brazil is the one of greatest biodiversity in the world, gathering around 55.000 species of higher plants (about 22% of world total). Cerrado is the second largest biome of Brazil with a wide variety of plant species, so far has been poorly studied to evaluate the efficacy and therapeutic effects of crude extracts or isolated compounds, mainly as enzyme inhibitors. The aim of the present study was to investigate the inhibitory activity of Cerrado plant extracts against α -amylase, α -glucosidase, tyrosinase and acetylcholinesterase. α -Amylase and α -glucosidase inhibitors delay the digestion of carbohydrates, producing a reduction in the rate of glucose absorption and consequently reduction of the postprandial plasma glucose. Tyrosinase is involved in formation of melanin, so their inhibitors are clinically important for treatment of dermatological disorders related to melanin hyperpigmentation. The main role of acetylcholinesterase is rapidly hydrolyzes the neurotransmitter acetylcholine at brain cholinergic synapses as well as at neuromuscular junctions, thus acetylcholinesterase inhibitors become targets for the treatment of Alzheimer's disease. This study was designed to establish the inhibitory activity of 39 extracts prepared from 14 species from 9 families of Cerrado against α -amylase, α -glucosidase, tyrosinase and acetylcholinesterase. The plant extracts which demonstrated a significant capability to inhibit α -amylase were the leaves of *Pouteria torta*, *Pouteria caimito*, *Pouteria ramiflora* and *Eugenia dysenterica* aqueous extracts, and the stem bark of *Stryphnodendron adstringens* ethanolic extract. On the activity of α -glucosidase, the extracts of the genus *Pouteria*, *S. adstringens* and *E. dysenterica* demonstrated a high potential of inhibition. The extracts that showed potential for inhibition of tyrosinase belonging to the species *Morus nigra*, *S. adstringens*, *E. dysenterica*, *P. caimito* and *P. torta*. However no extract was able to influence the enzymatic activity of acetylcholinesterase.

Keywords: Enzymatic inhibition; α -amylase; α -glucosidase; tyrosinase; acetylcholinesterase; Cerrado.

LISTA DE FIGURAS

Figura. 1a. Estrutura da amilose (54).....	21
Figura. 1b. Estrutura da amilopectina (54).	22
Figura 2. Estrutura tridimensional da α -amilase. O domínio A está representado em vermelho, o domínio B em amarelo e o domínio C em azul. No centro catalítico, o íon cálcio está representado como uma esfera azul e o íon cloreto como esfera amarela. As estruturas verdes são ligantes da enzima na superfície do sítio ativo e na sua fenda (56).....	23
Figura 3. Estrutura tridimensional da α -amilase. O centro catalítico está representado em vermelho (Domínio A), o domínio N-terminal em amarelo (Domínio N), o domínio C-terminal proximal em azul (Domínio C), o domínio C-terminal distal em verde (Domínio D), o subdomínio B em violeta e o subdomínio B' em laranja (63).	25
Figura 4. Ligações dos átomos de Cobre no sítio ativo da enzima tirosinase (68)....	26
Figura 5. Biossíntese de melanina (67).....	26
Figura 6. Estrutura da acetilcolinesterase. O estreitamento semelhante a uma garganta (<i>gorge</i>) está representado como uma superfície rosa. A entrada para o sítio ativo está no topo do estreitamento (80).	28
Figura 7. Reação do DNS com o açúcar redutor (142).	42
Figura 8. Valores de IC_{50} sobre a atividade da α -amilase dos extratos vegetais do Cerrado. Acarbose como controle positivo. (1) <i>S. adstringens</i> CC(e); (2) <i>P.torta</i> F(a); (3) <i>P. ramiflora</i> F(a); (4) <i>P. caimito</i> F(a); (5) <i>E. dysenterica</i> F(a).....	56
Figura 9. Valores de IC_{50} sobre a α -glicosidase. (Deox) Controle positivo desoxinojirimicina; (1) <i>G. americana</i> F(e); (2) <i>P. neochilus</i> F(a); (3) <i>P. neochilus</i> F(h); (4) <i>H. speciosa</i> F(h); (5) <i>A. blanchetti</i> Fr(h); (6) <i>H. speciosa</i> F(e); (7) <i>E. dysenterica</i> F(h); (8) <i>P. caimito</i> F(e); (9) <i>P. gardneri</i> F(e); (10) <i>P. ramiflora</i> F(e); (11) <i>P. caimito</i> F(a); (12) <i>P. torta</i> CFr(e); (13) <i>E. dysenterica</i> F(e); (14) <i>S. adstringens</i> CC(e); (15) <i>E. dysenterica</i> F(a); (16) <i>P. ramiflora</i> F(a); (17) <i>P. torta</i> F(a).....	62

Figura 10. Valores de IC ₅₀ sobre a tirosinase. Ácido kójico como controle positivo; (1) <i>E. dysenterica</i> F(e); (2) <i>P. caimito</i> F(a); (3) <i>S. Adstringens</i> CC(e); (4) <i>P. torta</i> F(a); (5) <i>E. dysenterica</i> F(a); (6) <i>M. Nigra</i> F(e).....	69
Figura 11. Reações envolvidas no método de Ellman (181).	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Extratos vegetais de plantas do Cerrado avaliados quanto a inibição enzimática.....	40
Tabela 2 - Atividade de inibição dos extratos vegetais sobre a α -amilase	52
Tabela 3 - Valores de IC ₅₀ dos extratos com atividade de inibição sobre a α -amilase	55
Tabela 4 - Atividade de inibição dos extratos vegetais sobre a α -glicosidase.....	58
Tabela 5 - Valores de IC ₅₀ dos extratos com atividade de inibição sobre a α -glicosidase	61
Tabela 6 - Atividade de inibição dos extratos sobre a tirosinase.....	65
Tabela 7 - Valores de IC ₅₀ dos extratos com atividade de inibição sobre a tirosinase	68
Tabela 8 - Atividade de inibição dos extratos sobre a acetilcolinesterase.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE	Acetilcolinesterase
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNS	Ácido dinitrosalicílico
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
IC ₅₀	Concentração capaz de inibir 50% a atividade máxima
L-Dopa	L-3,4-dihidroxifenilalanina
OMS	Organização Mundial de Saúde
UB	Herbário da Universidade de Brasília
UEC	Herbário da Universidade Estadual de Campinas
UV	Ultra-Violeta
pNP	p-nitrofenol
pNPG	p-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 PATOLOGIAS.....	15
2.1.1 Diabetes	15
2.1.2 Hiperpigmentação da pele.....	16
2.1.3 Doença de Alzheimer	19
2.2 ENZIMAS ENVOLVIDAS	21
2.2.1 α –Amilase	21
2.2.2 α-Glicosidase.....	23
2.2.3 Tirosinase	25
2.2.4 Acetilcolinesterase	28
2.3. INIBIDORES ENZIMÁTICOS EXTRAÍDOS DE PLANTAS.....	29
2.3.1 Inibidores de α-amilase	29
2.3.2 Inibidores de α-glicosidase.....	31
2.3.3 Inibidores de tirosinase.....	33
2.3.4 Inibidores de acetilcolinesterase.....	34
2.4 CERRADO.....	36
3 OBJETIVOS.....	39
4 MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 EXTRATOS OBTIDOS DE PLANTAS DO BIOMA CERRADO	40
4.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE INIBIÇÃO SOBRE A A-AMILASE.....	41
4.2.1 Preparo das soluções.....	41
4.2.3 Ensaio da atividade enzimática da α-amilase.....	42
4.2.3 Controle positivo para a atividade de inibição sobre a α-amilase.....	43
4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE INIBIÇÃO SOBRE A A-GLICOSIDASE	44
4.3.1 Preparo das soluções.....	44
4.3.2 Ensaio da atividade enzimática da α-glicosidase	45
4.3.3 Controle positivo para a atividade de inibição sobre a α-glicosidase	45
4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE INIBIÇÃO SOBRE A TIROSINASE	46

4.4.1 Preparo das soluções	46
4.4.2 Ensaio da atividade enzimática da tirosinase	47
4.4.3 Controle positivo para a atividade de inibição sobre a tirosinase	47
4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE INIBIÇÃO SOBRE A ACETILCOLINESTERASE	47
4.4.1 Preparo das soluções	47
4.4.2 Ensaio da atividade enzimática da acetilcolinesterase	49
4.4.3 Controle positivo para a atividade de inibição sobre a acetilcolinesterase	49
4.5 DETERMINAÇÃO DA PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA.....	50
4.6 DETERMINAÇÃO DOS VALORES DE IC ₅₀ DOS EXTRATOS VEGETAIS	50
4.7 INFLUÊNCIA DOS SOLVENTES UTILIZADOS NA DILUIÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS	51
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ENZIMA A-AMILASE POR ESPÉCIES DO BIOMA CERRADO	52
5.2 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ENZIMA A-GLICOSIDASE POR ESPÉCIES DO BIOMA CERRADO	58
5.3 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ENZIMA TIROSINASE POR ESPÉCIES DO BIOMA CERRADO	64
5.4 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE POR ESPÉCIES DO BIOMA CERRADO	70
6 CONCLUSÃO	74
7 PERSPECTIVAS	75

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais para tratamento humano, cura e prevenção de doenças, é realizada pela humanidade há muito tempo. Certamente, a terapêutica moderna não teria atingido o grau de desenvolvimento atual se não fosse o auxílio desse recurso como fonte de substâncias ativas (1).

As plantas produzem uma variedade de substâncias bioativas importantes para a formulação de fitoterápicos, sendo assim uma importante fonte para tratamentos de doenças. Segundo a OMS, planta medicinal é qualquer planta que possui, em um ou em vários de seus órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com finalidade terapêutica e exercem algum tipo de ação farmacológica (2).

Entre as estratégias utilizadas em todo mundo para o isolamento e identificação de substâncias com potencial terapêutico, a pesquisa por substâncias presentes em fontes naturais se destaca como uma das mais importantes, sendo que as plantas e microrganismos cultiváveis são as principais fontes de moléculas biologicamente ativas e terapeuticamente úteis (3). Estima-se que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos a partir de fontes naturais, sendo as plantas responsáveis por 25% desse total (4).

Em todo o mundo, apenas 17% da biodiversidade mundial foram estudadas quanto ao seu emprego medicinal e, na maioria dos casos, sem grande aprofundamento nos aspectos fitoquímicos e farmacológicos. Esses dados apresentam o enorme potencial das plantas para a descoberta de novos fitoterápicos e fitomedicamentos (4, 5).

O Brasil está entre os países de maior biodiversidade mundial, abrigando cerca de 55 mil espécies de plantas superiores (aproximadamente 22% do total mundial). Entretanto, apenas uma pequena parcela da flora brasileira tem sido pesquisada cientificamente quanto ao seu potencial farmacológico (6).

A pesquisa e o desenvolvimento de novos fármacos constituem uma das etapas mais complexas do ponto de vista tecnológico, pois, compreende as atividades e o conjunto de conhecimentos necessários à geração de novos fármacos. A maior parte dos processos de produção resultam da síntese química de novas substâncias ou da extração de princípios ativos de fontes naturais, que passam por uma série de testes de eficácia, toxicidade, potencial teratogênico,

testes farmacológicos, estudos farmacotécnicos e ensaios clínicos, tornando essa primeira etapa a mais complexa do ponto de vista tecnológico (7).

Atualmente existe um grande número de plantas medicinais cujo potencial terapêutico tem sido estudado em uma variedade de modelos experimentais, e cujos mecanismos de ação têm sido investigados quanto à atividade de inibição enzimática. Estes estudos têm providenciado informações úteis para o desenvolvimento de novas farmacoterapias a partir dessas plantas para o tratamento de várias doenças, inclusive diabetes, doença de Alzheimer e doenças relacionadas a hiperpigmentação da pele.

Fármacos que inibem uma enzima chave em um determinado processo metabólico, de forma que sua ação seja a mais seletiva possível e com menores efeitos indesejáveis, têm sido alvo de pesquisas na área de medicamentos, tais como inibidores da α -amilase, α -glicosidase, tirosinase e acetilcolinesterase. Com este intuito, enzimas, extratos vegetais, suas frações e produtos isolados têm sido objeto de pesquisa constante.

Neste sentido, a identificação de espécies vegetais do bioma Cerrado com atividade inibitória das enzimas acetilcolinesterase, α -amilase, α -glicosidase e tirosinase, poderá contribuir para o desenvolvimento de novos medicamentos, melhorando a qualidade de vida dos pacientes com doenças como Alzheimer, diabetes e hiperpigmentação da pele, além de promover uma exploração racional e auto-sustentável do Cerrado Brasileiro.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PATOLOGIAS

2.1.1 Diabetes

Diabetes é uma desordem metabólica de etiologia múltipla caracterizada por hiperglicemia crônica e alterações no metabolismo e carboidratos, gorduras e proteínas (8), causada pela deficiência herdada ou adquirida na secreção de insulina, resultando em um aumento do nível de glicose no sangue (9).

Os efeitos em longo prazo da doença diabetes incluem alterações micro e macrovasculares que levam a disfunção, dano ou falência de vários órgãos. As complicações crônicas incluem a nefropatia, com possível evolução para insuficiência renal crônica; a retinopatia, com a possibilidade de cegueira; neuropatias, com risco de úlceras nos pés e amputações e manifestações de disfunção autonômica, incluindo disfunção sexual. Pessoas com diabetes apresentam risco maior de doença vascular arteriosclerótica, como doença coronariana, doença arterial periférica e doença vascular cerebral (10-12).

Diabetes é considerado um problema de saúde pública que afeta milhões de indivíduos no mundo. Estima-se que em 2010 a doença tenha afetado 285 milhões de adultos (20-79 anos) no mundo, aumentando para 439 milhões em 2030 (13, 14). Esse número continuará crescendo devido ao aumento e envelhecimento da população, à urbanização crescente e ao aumento da prevalência da obesidade e do sedentarismo (15). Além disso, a Federação Internacional de Diabetes (*International Diabetes Federation – IDF*) estima que 3,9 milhões de mortes tenham sido causadas pela doença diabetes em 2010, o que representa 6,8% da mortalidade mundial (13). No Brasil, estima-se a existência de mais de 7 milhões de indivíduos com diabetes. A previsão é de que o número chegue a 12 milhões em 2030 (14).

A doença diabetes é classificada de acordo com a sua etiologia, podendo existir em duas formas. O diabetes tipo 1 é uma doença auto-imune do pâncreas, caracterizada pela diminuição absoluta da secreção de insulina devido à destruição

das células β -pancreáticas (16). O desenvolvimento do diabetes tipo 1 pode ocorrer de forma rapidamente progressiva, afetando principalmente crianças e adolescentes (11). Pacientes com diabetes tipo 1 devem administrar insulina exógena para evitar o desenvolvimento de cetoacidose e reduzir o nível elevado de glicemia (16).

O diabetes tipo 2 é uma doença caracterizada pela resistência à insulina ou pela deficiência da secreção de insulina (16). O diabetes tipo 2 é prevalente em 90% dos pacientes em todo o mundo (17). As estratégias terapêuticas para o tratamento da diabetes tipo 2 incluem diferentes tipos de mecanismo: estimulação da secreção de insulina endógena, que incluem as sulfoniuréias e meglitinidas; o aumento da sensibilidade à insulina, como as biguanidas e tiazolidinodionas; e a inibição da degradação de oligossacarídeos e dissacarídeos, formado pelos inibidores das enzimas α -amilase e α -glicosidase (10, 17).

Uma das abordagens para o tratamento do diabetes tipo 2 é a inibição da captação de carboidratos pelas células intestinais, utilizando-se para isso os inibidores das enzimas α -amilase e α -glicosidase. A α -amilase é responsável pela degradação de carboidratos em oligossacarídeos e dissacarídeos. Na membrana de células intestinais, as α -glicosidases são responsáveis pela hidrólise desses oligo e dissacarídeos em monossacarídeos (18). Assim, a inibição competitiva dessas enzimas reduz a taxa de absorção de monossacarídeos, levando a redução da hiperglicemia pós-prandial (18, 19). Atualmente, os inibidores de α -amilase e α -glicosidase incluem acarbose, miglitol e voglibose (8, 19-21).

2.1.2 Hiperpigmentação da pele

Hiperpigmentação da pele ou hiperchromias são alterações patológicas na coloração da pele que deixam manchas de cor variável, causadas pelo aumento da produção de melanina ou pela distribuição anormal de melanina e estão relacionadas a fatores genéticos e ambientais (22-24). O aumento da melanina (melanodermias) tem cor variável do castanho claro ao escuro, azulado ou preto (23).

A melanina é um biopolímero heterogêneo, pigmentado, polifenólico de alto peso molecular, responsável pela cor da pele, do cabelo e dos olhos (25, 26). A

melanina é secretada pelos melanócitos na camada basal da epiderme e é produzida dentro de organelas especializadas chamadas melanossomas, as quais possuem específicas enzimas que controlam a produção de pigmentos (22, 26). Os melanócitos são células dendríticas que na epiderme agem em conjunto com queratinócitos e interagem na produção e distribuição de melanina humana durante o processo de pigmentação (27). Melanina é formada através de uma série de reações oxidativas envolvendo o aminoácido tirosina na presença da enzima tirosinase (28). As melaninas podem ser classificadas em dois diferentes grupos, as eumelaninas e as feomelaninas (29). As eumelaninas são pigmentos negros ou marrons, geralmente insolúveis, formados por seqüências de reações oxidativas, a partir da tirosina, L-Dopa, dopamina ou outras catecolaminas. As feomelaninas são pigmentos de cores mais claras como vermelho ou amarelo, e podem ser obtidas de forma semelhante às eumelaninas, mas também possuem como precursores a cisteína ou a glutatona (25).

Além da coloração da pele, a melanina protege a pele contra os raios ultravioleta. Como filtro solar, a melanina difrata ou reflete a radiação UV. Após a irradiação, os melanossomas se reagrupam em torno do núcleo protegendo o material genético da célula (30, 31). Melanina também desempenha um papel fundamental na absorção de radicais livres gerados no citoplasma (28). Apesar da melanina ser importante para proteção da pele contra raios UV, sua produção desordenada pode levar à formação de hiperpigmentações (30). Entre as hiperpigmentações adquiridas mais comuns estão, o melasma, a melanose solar, as hiperpigmentações medicamentosas, as melanodermias tóxicas, nevos melanócitos comum (conhecidos como “pintas”) e as fitofotodermatoses (23).

A hiperpigmentação da pele ocorre devido a vários fatores, como envelhecimento, exposição ao sol, gravidez, distúrbios endócrinos e tratamento com hormônios. Estudos demonstraram que as radiações UV são as principais responsáveis pela maioria desses distúrbios de hiperpigmentação da pele, seguidas pelos hormônios e fatores externos (30).

As hiperpigmentações podem ser tratadas por diferentes técnicas como utilização de agentes despigmentantes, esfoliação da pele (*peeling*) e tratamentos com *laser*. As substâncias despigmentantes possuem diversos mecanismos de ação, como inibição da síntese da tirosinase; inibição da atividade da tirosinase, toxicidade

seletiva aos melanócitos, esfoliação, adsorção de melanina pré-formada, reação de redução e estimulação da melanina dos queratinócitos (32).

Vários inibidores de tirosinase são utilizados em cosméticos para o tratamento de clareamento e no tratamento de distúrbios dermatológicos relacionados a hiperpigmentação (33). As substâncias despigmentantes mais utilizadas na terapêutica são ácido kójico, hidroquinona e arbutina. Entre os agentes despigmentantes, a hidroquinona é um dos mais prescritos. Essa substância é um hidroxifenol de estrutura química semelhante ao precursor da melanina e atua na inibição da tirosinase reduzindo a hidroxilação da tirosina em dihidroxifenilalanina (L-Dopa) (34). Porém, essa substância possui efeito citotóxico sobre os melanócitos e potencial mutagênico sobre as células de mamíferos (31). Como resultado disso e de outros efeitos colaterais, o uso de hidroquinona tem sido proibido em diversos países (31, 34). A arbutina é um glicopiranosídeo natural derivado da hidroquinona, atua como um potente inibidor de tirosinase e é menos tóxico que a hidroquinona (31, 34). O ácido kójico é uma substância natural produzida por fungos e possui ação clareadora devido a sua propriedade quelante de íons cobre, responsável pela inativação da enzima tirosinase e conseqüente inibição na formação de melanina. O principal efeito indesejável relatado pelo uso do ácido kójico é a presença de eritema facial (31, 34). No entanto, estudos no Japão relataram um elevado potencial para causar sensibilização e dermatite irritante, e encontraram uma correlação entre o uso tópico do ácido kójico e a ocorrência de tumores hepáticos (35). O ácido kójico também está associado a efeitos mutagênicos (34). Além de causar efeitos tóxicos às células, a baixa estabilidade limita sua aplicação (31).

A descoberta e caracterização de novos inibidores da enzima tirosinase são úteis devido a seus potenciais para aplicações na prevenção de hiperpigmentações e outros problemas relacionados à saúde humana. Dessa forma, o mercado para agentes despigmentantes com ação inibidora da tirosinase é muito grande e a descoberta de novos compostos naturais com tal propriedade tem sido largamente estimulada pela indústria de cosméticos e de medicamentos dermatológicos.

2.1.3 Mal de Alzheimer

A doença de Alzheimer é uma patologia neurodegenerativa progressiva caracterizada pela perda de memória, disfunção cognitiva, distúrbios comportamentais, e dificuldade em realizar atividades diárias (36). A doença freqüentemente começa com perdas de memória de curto prazo, e continua com disfunção emocional e cognitiva mais generalizada (37).

O diagnóstico da doença de Alzheimer é baseado em características clínicas, embora deva ser confirmado pelo exame histopatológico do cérebro. Existem três estágios clínicos da doença - leve, moderada e grave - com declínio cognitivo e funcional, que se estende por 5 a 8 anos. A fase inicial dura geralmente entre 2 a 3 anos e é caracterizada pela diminuição da memória de curto prazo, muitas vezes acompanhada por sintomas de ansiedade e depressão. No estágio moderado, estes sintomas aparecem como manifestações neuropsiquiátricas, tais como alucinações visuais, falsas crenças e inversão de padrão do sono podem surgir. A grave é a fase final caracterizada por sinais motores, tais como o rigidez motora e declínio cognitivo (38).

A doença de Alzheimer é a causa mais comum de demência entre as pessoas idosas (39). Em 2006, estima-se que existiam 26,6 milhões de pessoas com Alzheimer no mundo. Para o ano 2050, a prevalência mundial da doença de Alzheimer aumentará para 106,8 milhões de casos (40, 41). A incidência da doença é alta e afeta 0,9% de pessoas com idade de 65 anos, 4,2% com 75 anos e 14,7% dos que possuem 85 anos ou mais (41). A expectativa é que o número de pacientes com Alzheimer aumente diretamente com a expectativa de vida e o crescimento da população idosa (37).

As alterações bioquímicas decorrentes da doença de Alzheimer afetam as regiões cerebrais associadas às funções mentais superiores, particularmente o córtex frontal e o hipocampo (42). As características neurodegenerativas mais evidentes da doença são as formações de placas β -amilóides e os emaranhados neurofibrilares (43). O acúmulo anormal das placas β -amilóides e dos emaranhados neurofibrilares levam a perda das conexões entre os neurônios e morte celular. Como a morte dos neurônios acontece em todo o cérebro, as regiões afetadas começam a diminuir em um processo denominado atrofia cerebral. Na fase final da

doença o dano é generalizado e o tecido cerebral se encontra significativamente diminuído (44, 45). Todo este processo resulta em perda da função neuronal e dano sináptico, com subsequente comprometimento da memória, da coordenação motora e do raciocínio, além de perda da capacidade cognitiva e demência (42).

Pacientes com doença de Alzheimer apresentam uma diminuição nos níveis de acetilcolina no processo sináptico, diminuindo a neurotransmissão colinérgica cortical (46). Observa-se que muitos relatos de déficits cerebrais ligados a doença estão associados ao sistema colinérgico, ou seja, as disfunções cognitivas, funcionais e comportamentais associadas com a doença de Alzheimer podem ser causadas por uma incapacidade de transmitir impulsos neurológicos em toda sinapse colinérgica (37). Além da acetilcolina, a doença de Alzheimer está associada à redução das taxas de outros neurotransmissores, como noradrenalina, dopamina, serotonina, glutamato e substância P em menor extensão (42).

As opções terapêuticas para o tratamento da doença de Alzheimer estão focadas em modificar os sistemas de neurotransmissores, em especial o sistema colinérgico, para maximizar a atividade dos neurônios restantes (38). Entre os diferentes tipos de drogas que podem modificar a transmissão colinérgica, os fármacos inibidores da acetilcolinesterase (AChE) são aqueles que apresentam os melhores resultados clínicos no tratamento da doença de Alzheimer. A inibição da enzima AChE parece promover o aumento da concentração da acetilcolina na sinapse, diminuindo ou retardando a progressão dos sintomas associados a doença (37).

Atualmente, os inibidores de AChE aprovados para o tratamento de pacientes com doença de Alzheimer são donepezil, rivastigmina e galantamina (47). Essa nova geração de inibidores de AChE é relativamente bem tolerada, não hepatotóxica e possui um regime de dosagem mais rigoroso (37). Entretanto, estudos clínicos relataram alguns efeitos adversos como náusea, vômito, diarreia, perda de peso, insônia, alterações no sono, espasmos musculares, bradicardia, desmaio e fadiga (47). O donepezil e a galantamina são inibidores seletivos de AChE. Os inibidores de AChE são indicados para pacientes com doença de Alzheimer leve a moderada, entretanto alguns estudos sugerem um pequeno benefício em paciente em estágios mais avançados da doença (38).

2.2 ENZIMAS ENVOLVIDAS

2.2.1 α -Amilase

A α -amilase pode ser encontrada em microrganismos, plantas e animais, e é um dos principais produtos secretados pelo pâncreas (cerca de 5-6%) e glândulas salivares, desempenhando um papel na digestão de amido e glicogênio (48, 49). α -Amilases (α -1,4-glicano-4-glicanohidrolases, E.C.3.2.1.1) são enzimas da família de endoamilases que catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 do amido, formando unidades menores de oligossacarídeos (48-52). Os produtos finais da ação da α -amilase são oligossacarídeos de diversos tamanhos em uma configuração anomérica α e dextrinas limites (53), na qual constituem uma mistura de maltose, maltotriose, e oligossacarídeos de 6-8 unidades de glicose que contém ligações α -1,4 e α -1,6 (48). Outras enzimas amilolíticas participam no processo de hidrólise do amido, porém a contribuição da α -amilase é essencial para o início do processo (51).

O amido, importante constituinte da dieta humana, é constituído por dois tipos de polímeros de glicose: amilose e amilopectina (Figuras 1a e 1b). A amilose é um polímero linear composto de até 6000 unidades de glicose com ligações glicosídicas α -1,4. A amilopectina é constituída por pequenas cadeias lineares de ligações glicosídicas α -1,4 com 10-60 unidades de glicose e cadeias laterais de ligações glicosídicas α -1,6 com 15-45 unidades de glicose. As α -amilases são capazes de clivar as ligações α -1,4 presentes na parte interna das cadeias de amilose ou amilopectina (53-55).

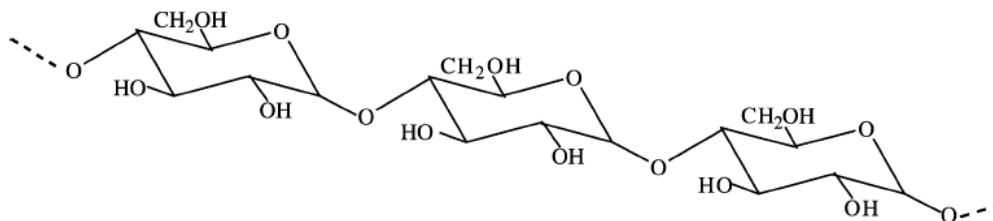


Figura. 1a. Estrutura da amilose (54).

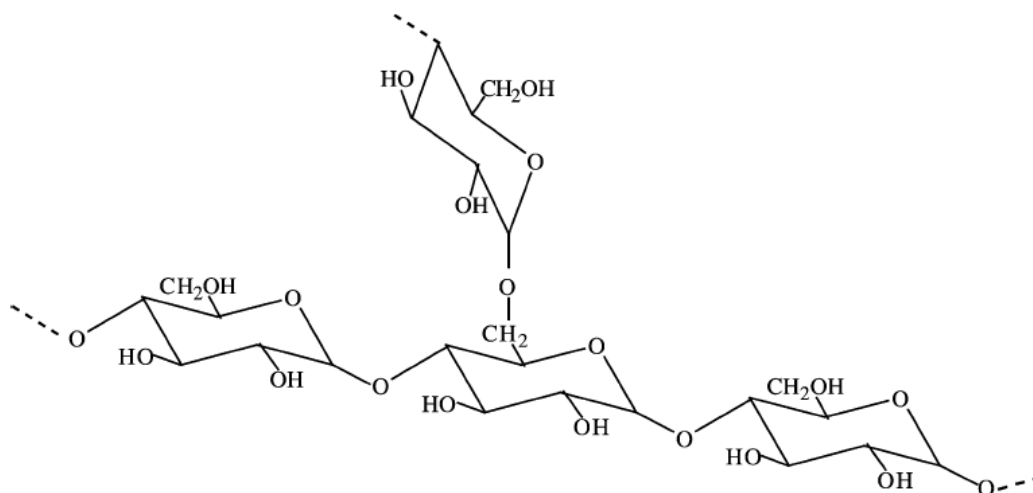


Figura. 1b. Estrutura da amilopectina (54).

A α -amilase humana é uma enzima dependente de cálcio, composta de 512 aminoácidos com peso molecular de 57,6 kDa. A enzima contém 3 domínios: A, B e C (Figura 2). O domínio B está inserido entre os domínios A e C e está ligado ao domínio A por ligação dissulfeto. O domínio C com uma estrutura de folha β está ligado ao domínio A por uma simples cadeia polipeptídica e parece ser um domínio independente, com função desconhecida. O sítio ativo da α -amilase está situado em uma fenda longa entre os domínios A e B. O cálcio (Ca^{2+}) está localizado entre os domínios A e B e pode atuar na estabilização da estrutura tridimensional e como ativador alostérico. Além da ligação com o cálcio, a enzima possui um sítio ligante de cloro no domínio A próximo ao sítio ativo. O sítio de ligação ao substrato contém 5 subsítios com o sítio catalítico posicionado no subsítio 3. A α -amilase cliva preferencialmente as ligações glicosídicas α -1,4 presentes no interior da molécula (48).



Figura 2. Estrutura tridimensional da α -amilase. O domínio A está representado em vermelho, o domínio B em amarelo e o domínio C em azul. No centro catalítico, o íon cálcio está representado como uma esfera azul e o íon cloreto como esfera amarela. As estruturas verdes são ligantes da enzima na superfície do sítio ativo e na sua fenda (56).

2.2.2 α -Glicosidase

As α -glicosidases (E.C 3.2.1.20, α -D-glicosideo glicohidrolase) são enzimas que catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 de dissacarídeos ou oligossacarídeos liberando unidades de glicose (57). Glicosidases são classificadas de acordo com a especificidade da clivagem da ligação glicosídica, dependendo do número, posição ou configuração do grupo hidroxila na molécula do açúcar (58). Assim, as α -glicosidases são um grupo de exo-glicosídeo hidrolases capazes de clivar os resíduos α -glicosila das extremidades não reduzidas de substratos α -ligados para liberar α -D-glicose (59).

As enzimas α -glicosidases estão amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em microrganismos, plantas e animais (57). A enzima α -glicosidase participa de processos bioquímicos fundamentais do metabolismo, como degradação dos polissacarídeos provenientes da alimentação, tornando disponíveis unidades de monossacarídeos para geração de glicogênio e glicoproteínas celulares, biossíntese e modificação de α -glicoproteínas, e catabolismo de peptidoglicanos e outros glicoconjugados (60). As α -glicosidases estão envolvidas no processamento de glicoproteínas e a região oligossacarídica destes

glicoconjugados desempenha funções fundamentais nos processos biológicos, como resposta imune, reconhecimento intercelular, proliferação e diferenciação celular, enovelamento, estabilidade e solubilidade das proteínas, além dos processos patológicos, como câncer e inflamação (58).

As múltiplas funções da enzima α -glicosidase no organismo justifica a procura por agentes terapêuticos como potenciais inibidores para serem utilizados no tratamento de doenças como diabetes, obesidade, infecções pelo HIV e tumores (58, 61).

As α -glicosidases estão localizadas na membrana da borda em escova de células intestinais e são enzimas essenciais para a digestão dos carboidratos. Após a hidrólise do amido pela α -amilase, a maltose e as unidades menores de oligossacarídeos são clivadas pela ação da α -glicosidase, levando a produção de glicose que será absorvida pelo organismo (62). A α -glicosidase cliva as unidades terminais de glicose da amilose ou amilopectina, tendo preferência por malto-oligossacarídeos menores, liberando glicose com uma configuração α (53).

A enzima α -glicosidase contém 4 domínios (A, C, D e N) e 2 subdomínios (B e B') (Figura 3). O domínio N-terminal interage intimamente com o domínio catalítico e pode estar envolvido diretamente na ligação com o substrato e na manutenção da arquitetura do sítio ativo. O domínio N pode conter também sítios secundários de reconhecimento de carboidratos. A capacidade de ligação da α -glicosidase ao amido pode ser atribuída a uma região do domínio D. O domínio C contribui para a compacidade da estrutura dos outros domínios e parece desempenhar um papel de proteção do domínio catalítico contra solventes. O domínio A é a região catalítica localizada próxima os subdomínios. A proximidade do subdomínio B' sugere um papel na ligação da enzima ao substrato. O sítio ativo está posicionado do lado C-terminal, importante para a catálise e ligação ao substrato. Regiões dos domínios B, N e B' contribuem para o ambiente do sítio ativo (63, 64).

α -Glicosidases são conhecidas também pelos nomes: isomaltase, maltase, maltase ácida, glicoinvertase, glicosideosacarase, α -glicosidase lisossomal e maltase-glicosidase (65).

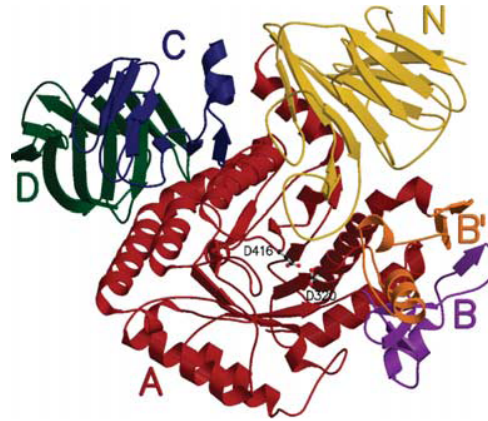


Figura 3. Estrutura tridimensional da α -amilase. O centro catalítico está representado em vermelho (Domínio A), o domínio N-terminal em amarelo (Domínio N), o domínio C-terminal proximal em azul (Domínio C), o domínio C-terminal distal em verde (Domínio D), o subdomínio B em violeta e o subdomínio B' em laranja (63).

2.2.3 Tirosinase

As tirosinases (EC 1.14.18.1; polifenol oxidase; difenol oxidase, catecolase) são enzimas bifuncionais que catalisam a conversão dos monofenóis em duas etapas consecutivas, que envolvem o oxigênio molecular. A atividade monoxigenase ou creolase envolve a o -hidroxilação de monofenóis para o -difenóis e a oxidação subsequente dos o -difenóis para o -quinonas está relacionada à atividade difenolase ou catecolase (25, 66).

Tirosinase é amplamente distribuída na natureza, estando presente em plantas, animais e microrganismos, e possuem um papel fundamental na biossíntese de melanina e em outros processos fisiológicos. As tirosinases são enzimas tetraméricas, com massa molar na ordem de 120kDa e com dois sítios ativos por molécula. Cada um destes sítios consiste em dois átomos de cobre que interagem com o oxigênio molecular (67). No sítio ativo, os átomos de cobre estão ligados a 6 moléculas de histidinas (68), conforme apresentado na Figura 4.

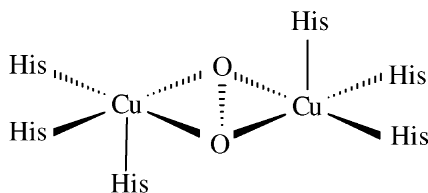


Figura 4. Ligações dos átomos de Cobre no sítio ativo da enzima tirosinase (68).

Na síntese de melanina, a tirosinase converte L-tirosina (monofenol) em L-Dopa (*o*-difenol). Em seguida, a L-Dopa é oxidada a *o*-dopaquinona (*o*-quinona), a qual é espontaneamente ciclizada na forma de leucodopacromo que é rapidamente convertido em dopacromo, o qual é polimerizado formando melanina (25, 66, 69). Essas reações estão representadas na Figura 5.

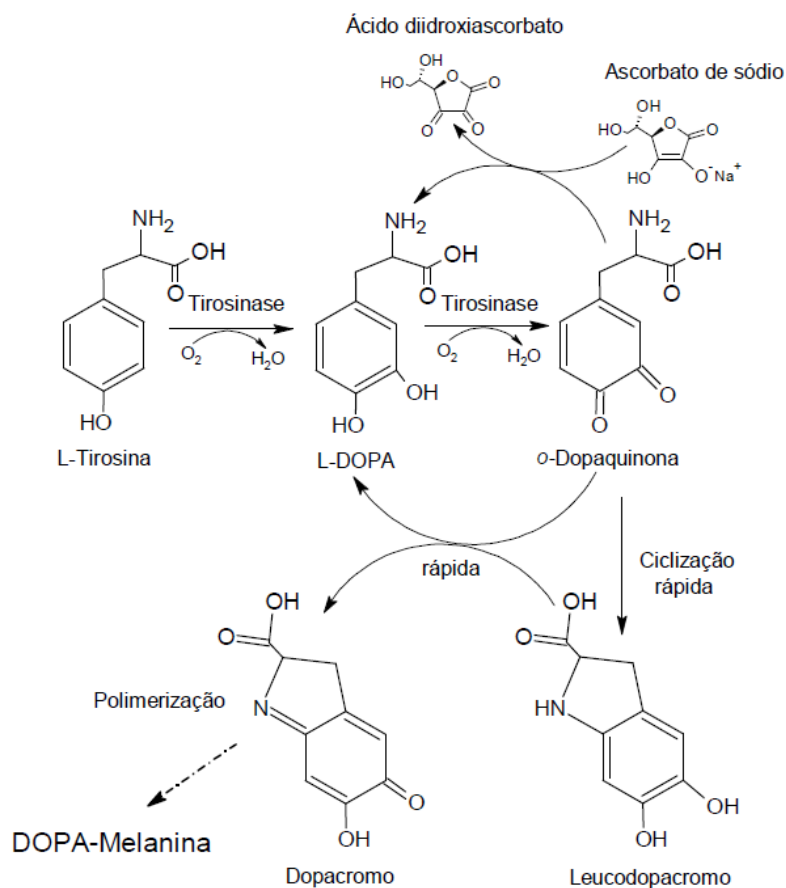


Figura 5. Biossíntese de melanina (67).

As tirosinases constituem um vasto campo para pesquisa devido à importância dessas enzimas nas indústrias farmacêuticas e de alimentos, além das

suas aplicações biotecnológicas e ambientais, pois são utilizadas tanto para descoloração quanto para remoção de fenóis presentes em efluentes (70). Para a indústria farmacêutica, os inibidores de tirosinase são importantes para o tratamento de algumas patologias dermatológicas associadas à hiperpigmentação causada pela produção anormal de melanina (71). Além disso, inibidores de tirosinase tem sido empregados na indústria cosmética para o clareamento da pele e despigmentação após queimaduras solares (72).

Um dos maiores problemas para a indústria de alimentos é o escurecimento desfavorável de frutas, verduras e bebidas, resultando numa vida útil curta e menor valor no mercado (73). A formação de melanina é considerada deletéria para a qualidade da cor desses alimentos e a prevenção desse escurecimento tem sido feita através da adição de inibidores de tirosinase nos alimentos (74). Além disso, a tirosinase é uma das principais enzimas envolvidas no processo de renovação do exoesqueleto de insetos, podendo ser importante na busca de inibidores como agentes de controle de insetos (74). Isso amplia a possibilidade de utilização de inibidores de tirosinase como aditivos alimentares, além de agentes contra insetos e agentes de clareamento.

Dentre as aplicações biotecnológicas, as tirosinases são utilizadas para a síntese de fármacos o-difenólicos, como a L-Dopa (74). No Sistema Nervoso Central a tirosinase participa da síntese de dopamina que é precursora direta de outras catecolaminas importantes como a noradrenalina e adrenalina, sendo recentemente implicada em inúmeras doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson (75). A tirosinase também tem aplicações industriais na preparação de biossensores para oxigênio e fenóis, na síntese estereoespecífica de quinonas, fenóis e polímeros, e na biorremediação de resíduos contaminados por fenóis (76).

Em função dos efeitos indesejáveis causados ou associados à ação da tirosinase, a busca por compostos que sejam inibidores dessa enzima tem sido de interesse crescente na área da pesquisa e da indústria farmacêutica, que têm interesse em agentes eficazes nos distúrbios de pigmentação.

2.2.4 Acetilcolinesterase

A acetilcolinesterase (acetilcolina hidrolase, EC 3.1.1.7) é uma esterase responsável pela hidrólise rápida e efetiva do neurotransmissor acetilcolina nas sinapses colinérgicas e nas junções neuromusculares, finalizando a transmissão do impulso nervoso (77).

O sítio ativo da acetilcolinesterase (AChE) humana é formado por uma tríade catalítica composta por resíduos de aminoácidos serina (Ser-203), histidina (His-447) e glutamato (Glu-334) (78). O sítio ativo da AChE situa-se na parte inferior de um estreitamento semelhante a uma garganta (*gorge*), onde existem 14 resíduos de aminoácidos, importantes na orientação do substrato ao sítio ativo (79). Uma das principais regiões do sítio ativo é um subsítio contendo o resíduo Trp86, onde a cadeia de nitrogênio quaternária da acetilcolina carregada positivamente se liga (80, 81).

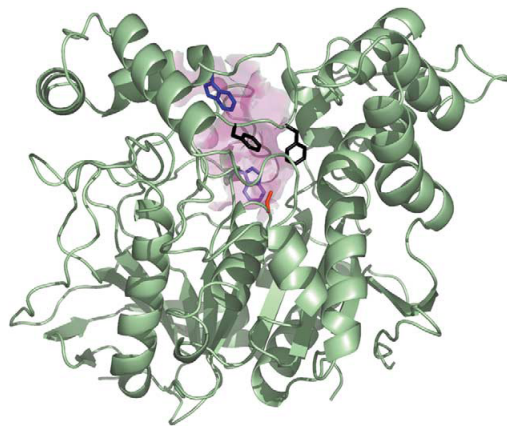


Figura 6. Estrutura da acetilcolinesterase. O estreitamento semelhante a uma garganta (*gorge*) está representado como uma superfície rosa. A entrada para o sítio ativo está no topo do estreitamento (80).

A AChE é uma serina hidrolase que desempenha um papel essencial no mecanismo colinérgico, catalisando a hidrólise natural do substrato acetilcolina em acetato e colina. O mecanismo de hidrólise da acetilcolina envolve o ataque nucleofílico da serina ao carbono carbonílico da acetilcolina, gerando um intermediário tetraédrico estabilizado por ligações de hidrogênio, o qual produz colina livre e serina acetilada. Ao final, a hidrólise do grupo acetila da serina pela água recupera o sítio catalítico da enzima (42). O processo enzimático é muito

eficiente por causa da proximidade do nucleófilo serina e a catálise da histidina, sendo que mais de 10.000 moléculas de acetilcolina são hidrolisadas por segundo por um único sítio ativo (82).

A AChE é encontrada no sistema nervoso central em regiões como hipotálamo, substância negra, estriado, hipocampo, cerebelo e também no fluido cérebro espinhal (82). Esta enzima é secretada nas terminações nervosas, sendo esta taxa de secreção modulada pela estimulação neuronal, pelo nível de neurotransmissor na fenda sináptica, bem como, pelo tratamento com drogas (83).

A acetilcolina é uma molécula orgânica, liberada nas terminações nervosas como neurotransmissor. Nos neurônios colinérgicos, a acetilcolina é produzida pela enzima colina acetiltransferase que usa acetilcoenzima-A e colina como substrato para sua formação (84). As moléculas de acetilcolina são liberadas no momento da estimulação nervosa nas junções neuromusculares, nas sinapses das fibras pré-ganglionares simpáticas e parassimpáticas, e nas sinapses das fibras nervosas pós-ganglionares parassimpáticas (82). No entanto, a redução de neurotransmissores como a acetilcolina podem levar a doenças neurodegenerativas. A inibição da enzima AChE leva ao um aumento das moléculas de acetilcolina nas sinapses, melhorando os sintomas cognitivos, comportamentais e funcionais relacionados às demências hipocolinérgicas, como a doença de Alzheimer (85).

2.3. INIBIDORES ENZIMÁTICOS EXTRAÍDOS DE PLANTAS

2.3.1 Inibidores de α -amilase

Existem diversos estudos que descrevem o potencial das plantas medicinais como inibidores de α -amilase. A disponibilidade de métodos simples e rápidos para a análise de grande número de extratos vegetais com atividade de inibição sobre a α -amilase facilita e estimula a busca por inibidores mais eficazes.

Inibidores de α -amilase são encontrados nas sementes da espécie *Phaseolus vulgaris*, conhecido como feijão comum, e em outras espécies do gênero *Phaseolus* (86). Existem três isoformas de inibidores de α -amilase, conhecidos como α -AI1, α -

AI2 e α -AI3, que são encontrados no gênero *Phaseolus*. O composto α -AI1 é a principal isoforma presente na maioria das espécies de feijão, sendo o único com atividade de inibição sobre a α -amilase de mamíferos (87). Outro estudo isolou o composto faseolamina das sementes de *P. vulgaris*, sendo identificado como um inibidor específico para α -amilase de animais (88). A faseolamina é uma proteína utilizada como ativo em suplementos alimentares para o tratamento de obesidade. Acredita-se que pela inibição da digestão dos carboidratos complexos, a faseolamina pode reduzir a absorção de calorias, promovendo a perda de peso (89).

Vários extratos da espécie *Amaranthus caudatus* (Amaranthaceae) mostraram atividade de inibição sobre a α -amilase em diferentes concentrações. Os extratos metanólico, hexânico e de acetato de etila da semente apresentaram atividades entre 20 e 90% (90). O extrato metanólico da espécie *Amaranthus spinosus* também apresentou uma significativa inibição sobre a atividade enzimática da α -amilase (91).

Frações contendo polifenóis isolados da espécie *Garcinia mangostana* (Clusiaceae) apresentaram alta atividade de inibição sobre a α -amilase comparável a da acarbose (71). A acarbose é um pseudotetrassacarídeo isolado de fungos do gênero *Actinoplanes* sp., com atividade de inibição competitiva e reversível sobre a α -amilase (92). Outra atividade semelhante a da acarbose foi observada no extrato da folha da espécie *Vaccinium uliginosum* (93).

O ácido rosmarínico encontrado em nas folhas das espécies da família Lamiaceae, como *Melissa officinalis* e *Origanum vulgare*, apresentou uma elevada inibição da atividade da enzima α -amilase (94). Dentro da mesma família, a espécie *Salvia acetabulosa* também apresentou alta atividade de inibição sobre a α -amilase quando comparada a acarbose (95). Um estudo com espécies do gênero *Salvia* demonstrou que os extratos etanólicos de *S. verticillata* e *S. virgata* inibiram significativamente a atividade da α -amilase (96).

Uma espécie da família Myrtaceae bastante estudada é a *Syzygium cumini* (*Eugenia jambolana*). Extratos das sementes e do fruto apresentaram uma redução significativa dos níveis de glicose no sangue de ratos (97, 98). Outro estudo relatou que o extrato aquoso da semente dessa espécie obteve uma alta inibição sobre a atividade da α -amilase. Os compostos identificados com atividade de inibição foram o ácido betulínico e uma flavonona (98). Outros flavonóides como quercetina,

luteolina, miricetina e eupafolina são descritos como inibidores da atividade da α -amilase (99-101).

Plantas do bioma Cerrado também mostraram inibição sobre a enzima α -amilase. Diferentes extratos das espécies *Byrsonima crassa*, *Calophyllum brasiliense*, *Kielmeyera coriacea* (Clusiaceae), *Qualea grandiflora* e *Qualea parviflora* (Vochysiaceae) apresentaram atividades maiores que 70% (102).

2.3.2 Inibidores de α -glicosidase

Diversos inibidores de α -glicosidase foram isolados, identificados, sintetizados e investigados quanto a sua atividade de inibição sobre a enzima. Atualmente, os compostos disponíveis na terapêutica como inibidores de α -glicosidases são acarbose, miglitol, voglibose e desoxinojirimicina, sendo os três primeiros indicados para tratamento de diabetes e o último para o controle da doença de Gaucher, doença relacionada ao acúmulo de glicolipídios nos lisossomos (103). A acarbose é um sacarídeo e apresenta uma inibição competitiva sobre a α -glicosidase. A voglibose é um derivado de valiolamina e possui uma maior atividade de inibição sobre a enzima, sendo 20-30 vezes mais potente que a acarbose (58, 104). Ambos compostos foram isolados de microrganismos (21).

A desoxinojirimicina, um potente inibidor de α -glicosidase foi isolado de folhas e cascas dos caules de espécies do gênero *Morus*. A espécie *Morus alba* possui uma grande quantidade de desoxinojirimicina, sendo a maior concentração encontrada nas folhas e ramos (105). O fruto da espécie *Morus nigra* também apresenta uma quantidade razoável do composto (105). A desoxinojirimicina é um alcalóide polihidroxiado e apesar de sua excelente atividade de inibição sobre a α -glicosidase, sua eficácia *in vivo* mostrou ser moderada. Por isso, há na literatura um grande número de derivados de desoxinojirimicina que estão sendo identificados e sintetizados com a finalidade de aumentar sua atividade *in vivo* (106). O miglitol é um derivado de desoxinojirimicina comercialmente disponível para o tratamento da diabetes (107). Esse composto apresenta uma forte inibição sobre a enzima α -glicosidase e é absorvido completamente pelo intestino delgado, ao contrário dos outros inibidores acarbose e voglibose. O miglitol tem maior efeito na redução dos

níveis de glicose pós-prandial, pois pode ser administrado a pacientes em concentrações relativamente elevadas apresentando baixa incidência de efeitos colaterais (104).

Estudos *in vitro* mostraram que o extrato da semente de *Eugenia jambolana* (Myrtaceae) são mais efetivos na inibição da α -glicosidase quando comparados a acarbose e desoxinojirimicina (62). Frações do extrato etanólico das folhas de *Eugenia uniflora* apresentaram atividades de inibição sobre a α -glicosidase maiores que 80% (108). O extrato da casca de *Eugenia malaccensis* também apresentou atividade de inibição sobre a α -glicosidase, sendo encontrado como composto ativo o alcalóide casuarina (107). Outros alcalóides identificados como radicaminas, isolados da espécie *Lobelia chinenses* (Campanulaceae), também mostraram inibição sobre a enzima (107).

Salacia reticulata, encontrada nas regiões do Sri Lanka e florestas da Índia, tem sido utilizada como suplemento alimentar no Japão para evitar a obesidade e diabetes. Salacinol e kotalanol foram identificados como os componentes inibidores da enzima α -glicosidase na fração solúvel em água de raízes e caules da espécie *S. reticulata* (58, 106). O salacinol é um potente inibidor competitivo da enzima α -glicosidase, sendo sua atividade maior que a da acarbose. O kotalanol, um derivado de salacinol, mostrou uma potente atividade de inibição maior que a do salacinol e da acarbose (58).

A partir do extrato metanólico das folhas de *Origanum majorana* da família Lamiaceae foram isolados 5 flavonóides com atividade de inibição sobre a α -glicosidase (107). O flavonóide baicaleina é um potente inibidor de α -glicosidase e também foi isolado das folhas de *O. majorana* (58). Espécies da mesma família também apresentam compostos com atividade de inibição sobre a enzima, como o extrato das folhas de *Hyssopus officinalis*, que possui dois compostos fenólicos ativos (107).

Atualmente, diversos inibidores de α -glicosidase de origem natural ou sintética têm sido descritos na literatura. Existem revisões detalhadas sobre a diversidade estrutural, relação estrutura-atividade e mecanismo de ação destes compostos, sendo importantes para o desenvolvimento de novos fármacos e para o planejamento de compostos análogos mais específicos. O isolamento de agentes inibidores de fontes naturais ou da síntese química fornece alternativas para o

tratamento de diversas doenças como câncer, diabetes, obesidade, doença de Gaucher e infecções pelo HIV (58, 106, 107).

2.3.3 Inibidores de tirosinase

A melanina desempenha um papel fundamental de proteção da pele contra fotocarcinogênese. No entanto, a produção anormal da melanina é um sério problema estético em seres humanos. Inibidores de tirosinase são considerados como um dos tratamentos padrões para doenças relacionadas a hiperpigmentação, além de serem importantes como agentes clareadores na indústria de cosméticos. Uma variedade de agentes inibidores de fontes naturais que inibem as atividades monofenolase e difenolase da enzima tirosinase já foram identificados (28, 31).

Alguns flavonóides com potente atividade de inibição sobre a tirosinase, tais como quercetina e kaempferol, podem ser isolados de várias plantas (28, 69). A quercetina está presente nas flores de *Heterotheca inuloides* (Asteraceae), espécie vegetal conhecida no México pelo nome arnica (109). O kaempferol foi isolado das pétalas da espécie *Crocus sativus* (açafraão), pertencente a família Iridaceae (110). O kaempferol e a quercetina inibem de forma competitiva a atividade da tirosinase pela capacidade de quelar o cobre presente no sítio ativo da enzima, levando a inativação da tirosinase (31).

Além desses flavonóides, a moracina foi isolada das folhas da espécie *Morus alba* e apresentou uma ótima atividade de inibição sobre a tirosinase de 80% na concentração de 100µg/mL (53). Outro composto isolado da espécie *M. alba* é o oxiresveratrol, um agente clareador com alta afinidade pela enzima tirosinase. O oxiresveratrol exibiu uma potente atividade de inibição sobre a tirosinase maior que o ácido kójico, um agente clareador utilizado no tratamento de hiperpigmentação. O efeito de despigmentação do oxiresveratrol ocorre devido a inibição reversível da atividade da tirosinase (62, 111).

Outro polifenol bastante estudado quanto a sua atividade de inibição sobre a enzima tirosinase é o ácido gálico. Diversos derivados do ácido gálico foram isolados das espécies *Galla rhois* e *Camellia sinensis* (chá verde), e alguns deles foram identificados como potentes inibidores de tirosinase (31, 112). Além disso, o ácido

gálico parece agir como um substrato para a enzima, sendo oxidado antes da L-Dopa (113).

A aloesina isolada da folha de *Aloe vera* age como um potente inibidor competitivo da enzima tirosinase. Atualmente, aloesina e arbutina são usadas na indústria de cosméticos como agentes clareadores (31). Tratamentos combinados de arbutina e aloesina exibiram efeitos sinérgicos por apresentarem mecanismos de inibição competitiva e não-competitiva da tirosinase, respectivamente (81, 114). A arbutina é um derivado de hidroquinona glicosilada, podendo ser encontrada em diversas espécies, como *Arctostaphylos uva-ursi* (Ericaceae), *Origanum majorana* (Lamiaceae), *Pyrus communis* (Rosaceae) e *Myrothamnus flabellifolia* (Myrothamnaceae) (115). Estruturalmente relacionada a hidroquinona, a arbutina inibe a atividade da tirosinase pela interação com o cobre no sítio ativo da enzima (69). Vários estudos demonstram a atividade de inibição da arbutina sobre a enzima tirosinase e sua efetividade no tratamento da hiperpigmentação da pele (28, 69).

2.3.4 Inibidores de acetilcolinesterase

Diversos estudos relatam a capacidade de plantas com atividade de inibição sobre a enzima AChE, demonstrando um potencial terapêutico para o tratamento de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (36, 46, 116, 117). Abordagens etnofarmacológicas e estudos fitoquímicos fornecem caminhos para a identificação de plantas e compostos isolados como inibidores de AChE, e conseqüentemente levam à descoberta de drogas relevantes para o tratamento da doença de Alzheimer (117, 118). A busca por novos compostos bioativos a partir de plantas medicinais levou ao isolamento e a elucidação de estruturas de uma grande quantidade de novos fitoconstituintes (117).

A fisostigmina é um alcalóide indólico isolado da espécie *Physostigma venenosum* (Leguminosae), utilizada como um dos primeiros inibidores de AChE na terapêutica. Devido ao seu curto tempo de meia vida, a fisostigmina não é mais utilizada clinicamente, porém sua estrutura química foi útil como modelo para o desenvolvimento de novos inibidores, como a rivastigmina, um inibidor de AChE aprovado para o tratamento de pacientes com doença de Alzheimer. Isso implica na

abertura de novos caminhos onde alcalóides isolados de plantas com atividade de inibição da AChE podem ser importantes para o desenvolvimento de drogas mais adequadas para o tratamento da doença de Alzheimer (117).

A galantamina é um alcalóide isolado primeiramente da espécie *Galanthus nivalis* (Amaryllidaceae), planta utilizada tradicionalmente na Bulgária e Turquia para o tratamento de condições neurológicas (117). Atualmente, a galantamina pode ser isolada das espécies *Narcissus confuses* e *Lycorus radiate*, também pertencentes à família Amaryllidaceae, além de ser obtida sinteticamente (37). A galantamina é um inibidor seletivo de AChE e proporciona uma biodisponibilidade completa pela administração via oral, além de ser um modulador dos receptores nicotínicos cerebrais o que mostrou valor adicional para o tratamento da doença de Alzheimer (37, 117). Em 2001, o uso da galantamina foi aprovado para o tratamento da doença de Alzheimer em diversos países (37), por ser uma droga bem tolerada e com uma significativa ação no melhoramento das funções cognitivas (117). Outros alcalóides isolados de espécies da família Amaryllidaceae, tais como assoanina, epinorgalantamina, oxoassoanina, sanguinina, 11-hidroxisgalantamina também demonstraram atividade de inibição sobre a enzima AChE (119).

Vários estudos foram realizados para avaliar o potencial de inibição de espécies da família Apocynaceae sobre a atividade da AChE. O gênero *Tabernaemontana* apresenta muitos estudos realizados com relação ao potencial de inibição. Alcalóides indólicos como coronaridina, voacangina, hidroxindolenina voacangina e rupicolina isolados do extrato de *T. australis* apresentam atividade de inibição sobre a AChE nas mesmas concentrações que a fisostigmina e galantamina. Um levantamento de plantas utilizadas tradicionalmente na Tailândia mostrou que a espécie *T. divaricata* foi capaz de inibir 93,5% a atividade da enzima AChE (116). Alcalóides obtidos das espécies *T. laeta* e *T. hytrix* (isovoacristina, olivacina, affinisina, ibogamina, affinisina, conodurina e histrixnina) demonstraram atividade de inibição sobre a enzima AChE (120).

A huperzina A, um alcalóide quinolizidínico isolado da espécie *Huperzia serrata* (Lycopodiaceae), é um potente inibidor da acetilcolinesterase e é utilizado na China para o tratamento de pacientes com doença de Alzheimer. A huperzina A é mais seletiva para a enzima AChE e menos tóxica que os inibidores sintéticos donezepil e tacrina (117).

Entre as espécies de plantas investigadas para o tratamento de doenças neurodegenerativas, as espécies do gênero *Salvia* são as mais pesquisadas da família Lamiaceae e são capazes de inibir a AChE em 60% , além de apresentarem atividade nicotínica (117). Um levantamento mostrou que espécies da família Fumariaceae, Papaveraceae e Ericaceae são potentes inibidores da enzima AChE, apresentando atividade de inibição entre 80 e 90% na concentração de 1 mg/mL (36).

As espécies pertencentes às famílias Amaryllidaceae, Apiaceae, Asteraceae, Leguminosae, Fumaraceae, Lamiaceae são as mais estudadas quanto a atividade de inibição sobre a AChE (46, 117). A alta atividade destas espécies pode estar relacionada à sua rica composição em alcalóides, pois a maioria dos inibidores de AChE apresentam nitrogênio em sua estrutura (121).

Atualmente, o alcalóide leptomerina foi isolado do extrato etanólico do caule da espécie *Esenbeckia leiocarpa* (Rutaceae), um espécie nativa do Brasil e popularmente conhecida como goiabeira. A leptomerina apresentou elevada atividade anticolinesterásica com um potencial de inibição sobre a AChE similar ao da galantamina (122).

A pesquisa de novos compostos inibidores de AChE com ação prolongada, com maior potência e com menores riscos de efeitos adversos, ainda permanece como foco de diversos pesquisadores.

2.4 CERRADO

O Brasil é considerado como um dos países de maior biodiversidade no mundo, pois se calcula que nada menos do que 10% de toda a biota terrestre encontram-se no país (123). O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro e possui uma das maiores floras vegetais do mundo, estimada em aproximadamente 7 mil espécies, compondo um cenário de exuberante diversidade biológica (124). Cobre uma área contínua de aproximadamente dois milhões de km² que corresponde a cerca de 23 % do território nacional (125, 126).

Com uma grande diversidade de espécies vegetais, as plantas do Cerrado são fontes de compostos com potencial farmacológico e biotecnológico (127). A

diversidade química presente e sua vegetação deve-se a diferentes maneiras de adaptação às condições climáticas, de solo e geográficas (123).

Muitas dessas plantas são utilizadas na medicina popular na região para o tratamento de várias patologias, como malária, leishmaniose, úlcera gástrica, diabetes, entre outras (126, 128, 129). No entanto, a rica flora do bioma Cerrado tem sido pouco estudada para avaliar os efeitos terapêuticos dos seus extratos e compostos isolados (130). Muitas espécies vegetais não são utilizadas na medicina popular e não se conhece ainda seu potencial terapêutico ou tóxico expondo a necessidade de maiores estudos que mostrem as características biológicas dessas plantas (131).

Espécies do gênero *Pouteria* (Sapotaceae) são encontradas no bioma Cerrado, correspondendo a mais de 400 espécies e são muito utilizadas na medicina popular para o tratamento de várias patologias. A espécie *P. torta* apresenta atividades biológicas antimicrobiana e antioxidante (132, 133). Além da atividade antioxidante, a espécie *P. ramiflora* também apresenta propriedades antimicrobiana, antiinflamatória e antinociceptiva. O extrato das folhas de *P. caimito* também apresentam propriedades antioxidantes (134). Atividade contra o protozoário *Trypanosoma cruzi* foi encontrada no extrato da espécie *P. gardneri* (135).

A família Apocynaceae encontra-se bem representada na vegetação do Cerrado. Existem no Brasil cerca de 850 espécies, sendo os gêneros mais conhecidos representados por *Allamanda*, *Aspidosperma*, *Plumeria*, *Rauwolfia*, *Tabernaemontana* e *Hancornia*. Vários compostos ativos isolados de espécies da família Apocynaceae apresentam diversas propriedades biológicas, como leishmanicida, antimicrobiana, anticancerígena e anti-HIV (131). Estas atividades estão relacionadas principalmente aos alcalóides produzidos por essas plantas. A espécie *Aspidosperma macrocarpon* apresentou atividade antiparasitária contra o protozoário *Trypanosoma cruzi* (135). Atividades biológicas tais como antimicrobiana, vasodilatadora e antiinflamatória são observadas na espécie *Hancornia speciosa*. Estudos realizados com os extratos de *Tabernaemontana catharinensis* mostraram que a atividade anticancerígena ocorre devido a presença dos alcalóides voacangina e coronaridina na espécie (131).

Outra família encontrada no bioma Cerrado é a Myrtaceae, possuindo cerca de 129 gêneros e 4620 espécies. Um importante membro dessa família é o gênero *Eugenia*, sendo constituído por aproximadamente 500 espécies (136). No Cerrado,

essa família é representada pelas espécies *Eugenia uniflora*, *Eugenia jambolana* e *Eugenia dysenterica*. Atividades antimicrobianas, antioxidantes, diuréticas, anti-hipoglicemiante e anti-hipertensiva são relatadas em estudos com essas espécies (126, 131, 137).

Stryphnodendron adstringens (Leguminosae), popularmente conhecido como barbatimão, está presente de forma abundante no Cerrado brasileiro. Estudos farmacológicos mostraram que o extrato aquoso da casca do barbatimão possui propriedades antiinflamatória, analgésica, gastroprotetora e antimicrobiana (126, 138). Essas atividades ocorrem principalmente pela presença de taninos na casca da espécie (139). Outro importante membro da família Leguminosae é o gênero *Bauhinia*, conhecido como pata-de-vaca, e algumas espécies são utilizadas popularmente para diabetes. Estudos realizados com as espécies *Bauhinia manca*, *Bauhinia divaricata*, *Bauhinia purpurea* e *Bauhinia variegata* demonstraram atividade hipoglicemiante em animais (140).

Dessa forma, considerando as possíveis atividades biológicas que essas espécies presentes no bioma Cerrado podem apresentar, o estudo dessas plantas torna-se relevante para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

3 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo avaliar espécies vegetais presentes no bioma Cerrado do Distrito Federal e arredores, quanto à atividade de inibição das enzimas α -amilase, α -glicosidase, tirosinase e acetilcolinesterase. Para que o objetivo proposto fosse alcançado, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

- Identificar os extratos brutos de espécies vegetais do bioma Cerrado com provável atividade de inibição enzimática;
- Estudar a interferência dos solventes utilizados no processo de extração na metodologia de quantificação enzimática;
- Determinar a concentração capaz de inibir 50% da atividade máxima (IC_{50}) dos extratos com atividade significativa;
- Avaliar a capacidade de inibição das enzimas tirosinase, acetilcolinesterase, α -amilase e α -glicosidase pelos extratos bruto de espécies do bioma Cerrado.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 EXTRATOS OBTIDOS DE PLANTAS DO BIOMA CERRADO

Os extratos das plantas do Cerrado, obtidos de folhas, caules e frutos, foram gentilmente cedidos pela Prof. Dâmaris Silveira da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília – UnB. As plantas foram coletadas no bioma Cerrado nos arredores de Brasília-DF e as exsiccatas foram depositadas no Herbário da UnB (UB) e no Herbário da Unicamp (UEC) para assegurar a autenticidade da espécie coletada. A Tabela 1 apresenta as espécies vegetais que foram usadas para a avaliação da inibição das enzimas.

Tabela 1 - Extratos vegetais de plantas do Cerrado avaliados quanto a inibição enzimática

Família Espécie	Parte usada (solvente)	Número de Herbário
Apocynaceae		
<i>Allamanda blanchetti</i> A.DC.	¹ F(e,h), ² C(e), ³ Fr(e,h)	(UEC) 142021
<i>Hancornia speciosa</i> Gomes	F(e,h)	(UEC) 142204
<i>Tabernaemontana solanifolia</i> A.DC.	F(e,h)	(UB) 487
Morácea		
<i>Morus nigra</i> L.	F(a,e,h)	(UB) 17837
Myrtaceae		
<i>Eugenia dysenterica</i> DC.	F(a,e,h)	(UB) 914
Leguminosae		
<i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville	⁴ CC(e)	(UB) 911
Lamiaceae		
<i>Plectranthus neochilus</i> Schltr.	F(a,e,h)	(UB) 913
Rubiaceae		
<i>Genipa americana</i> L. Var. <i>caruto</i> (H.B.K) K. Shum.	F(e,h), Fr(e,h), ⁵ CF(e)	(UB) 915
Sapotaceae		
<i>Pouteria gardneri</i> (Mart. & Miq.) Baehni	F(e,h)	(UB) 3672
<i>Pouteria ramiflora</i> Radlk.	F(a,e,h)	(UB) 3671
<i>Pouteria caimito</i> Radlk.	F(a,e,h)	(UB) 27284
<i>Pouteria torta</i> Radlk.	F(a,e,h), Fr(e), CF(e)	(UB) 3674
Caryocaraceae		
<i>Caryocar</i> cf. <i>villosum</i> (Aubl.) Pers.	Fr(e)	(UB) 907
Sapindaceae		
<i>Sapindus saponaria</i> L. variedade <i>inaequalis</i> (DC.) Radlk.	Fr(e)	(UB) 916

¹F: Folha, ²C: Caule, ³Fr: Fruto, ⁴CC: Casca do caule, ⁵CF: Casca do fruto.
Solventes: h: hexano, e: etanol, a: água.

4.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE INIBIÇÃO SOBRE A α -AMILASE

4.2.1 Preparo das soluções

Solução de α -amilase 40,0U/mL

α -amilase pancreática de porco (Tipo VI, Sigma Aldrich)	15,0mg
Tampão fosfato de sódio 20mM pH 6,9	10,0mL

Solução Tampão fosfato de sódio 20mM pH 6,9

Fosfato de sódio monobásico	1,25g
Fosfato de sódio dibásico	2,95g
NaCl	0,388g
Água destilada q.s.p.	1000mL

Solução de amido 1,0%

Amido (Sigma Aldrich)	0,2g
Tampão fosfato de sódio 20mM pH 6.9 q.s.p.	20,0mL

Solução reagente de ácido dinitrosalicílico (DNS)

Ácido 3,5-dinitrosalicílico (Sigma Aldrich)	10,6g
Tartarato de potássio de sódio	306,0g
NaOH	19,8g
Bissulfito de sódio	8,3g
Água destilada q.s.p	1000mL

Solução de acarbose 1mg/mL – Controle positivo

Acarbose (Sigma Aldrich)	10,0mg
Tampão fosfato de sódio 20mM pH 6,9 q.s.p.	10,0mL

Solução de *Triticum aestivum* 1mg/mL – Controle positivo

<i>Triticum aestivum</i> (Tipo I, Sigma Aldrich)	10,0mg
Água destilada q.s.p.	10,0mL

Solução de extrato vegetal

Os extratos etanólicos e hexânicos foram diluídos em etanol e DMSO (3:1), e os extratos aquosos foram preparados em água destilada. A concentração da solução mãe de cada extrato foi ajustada para uma concentração final no ensaio de 1mg/mL.

4.2.3 Ensaio da atividade enzimática da α -amilase

Várias técnicas de análise estão disponíveis na literatura para a determinação da atividade da α -amilase. A maioria dos procedimentos quantitativos geralmente utilizados envolve a medição de açúcares redutores formados a partir da hidrólise amilolítica do amido. Dentre esses métodos, o método que utiliza o DNS é o mais comumente usado devido à sua confiabilidade e simplicidade (54). Neste ensaio, a atividade da α -amilase é avaliada através da formação de maltose resultante da ação desta enzima sobre o amido presente no meio. A maltose, um dissacarídeo formado por duas moléculas de glicose, reduz o DNS formando um produto de cor alaranjada característica cuja absorbância é determinada a 540nm. A reação envolvida no ensaio é a redução do DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico) para ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, enquanto que os grupos aldeídos da maltose são oxidados para grupos carboxílicos (Figura 7) (141). Assim, para a verificação da atividade da enzima α -amilase, optou-se por utilizar amido solúvel como substrato e o DNS como reagente cromogênico.

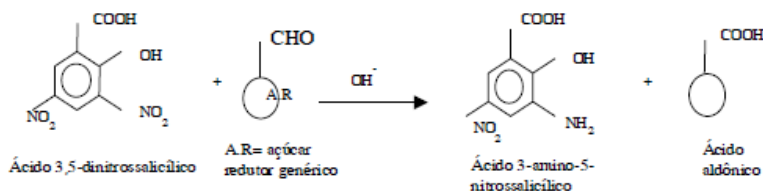


Figura 7. Reação do DNS com o açúcar redutor (142).

A atividade de inibição da α -amilase foi determinada segundo o método descrito por Bernfeld (1955), com adaptações (143). A α -amilase pancreática suína (EC 3.2.1.1, tipo VI, Sigma) foi dissolvida em tampão fosfato de sódio 20mM (pH 6,9) contendo cloreto de sódio 6,7mM para obter uma solução com concentração de

40U/mL. Um total de 40µL de solução do extrato em solvente apropriado e 100µL da solução da enzima foram incubados em banho-maria por 30 min a 25°C. Após a pré-incubação, 500µL do pré-incubado foram misturados com 1mL de amido 1% em tampão fosfato de sódio 20mM (pH 6,9). A mistura de reação foi então incubada por 20 min a 40°C em banho-maria. A reação foi interrompida com a adição de 1mL de solução do reagente DNS. As amostras foram então aquecidas em ebulição por 5 min e resfriadas a temperatura ambiente. A mistura de reação foi diluída adicionando 9mL de água destilada. A atividade da amilase foi determinada pela absorbância em espectrofotômetro a 540nm (Shimadzu, UV-1601).

Foram preparadas soluções denominadas branco do extrato, contendo solução de amido, extrato vegetal e DNS, visando eliminar variações relacionadas à coloração característica do extrato vegetal, além da possibilidade de atividade amilolítica do mesmo ou o teor de maltose e açúcares redutores presentes no extrato antes do experimento. Soluções contendo DNS e tampão foram utilizadas para zerar o aparelho antes da leitura da absorbância das amostras.

4.2.3 Controle positivo para a atividade de inibição sobre a α -amilase

Como controles positivos de inibição da α -amilase foram utilizados os inibidores acarbose e o *Triticum aestivum*. A acarbose é um inibidor desta enzima atualmente comercializado como medicamento em diferentes concentrações e o *Triticum aestivum* um inibidor da atividade de α -amilase, recomendado como padrão de inibição pela Sigma Aldrich. A curva dose-resposta para acarbose foi construída com concentrações variando entre 1 e 80µg/mL. A curva dose-resposta para o *Triticum aestivum* foi construída com concentrações variando entre 20 e 140µg/mL. A solução denominada branco do controle foi preparada substituindo a enzima por tampão fosfato de sódio 20mM (pH 6,9 com 6,7 mM cloreto de sódio).

4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE INIBIÇÃO SOBRE A α -GLICOSIDASE

4.3.1 Preparo das soluções

Solução de α -glicosidase 1,0U/mL

α -glicosidase de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (100U/mL, Sigma Aldrich)	100 μ L
Tampão fosfato e sódio 50 mM pH 6,8 q.s.p.	10mL

Solução de tampão fosfato de sódio 50mM pH 6,8

Fosfato de sódio monobásico	1,77g
Fosfato de sódio dibásico	3,28g
Água destilada q.s.p.	1000mL

Solução de *p*-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (*p*NPG) 1mM

<i>p</i> -nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (Sigma Aldrich)	57,25mg
Tampão fosfato e sódio 50mM pH 6,8 q.s.p.	250mL

Solução de bicarbonato de sódio 10,0%

Bicarbonato de sódio	50,0g
Água destilada q.s.p.	500mL

Solução de desoxinojirimicina 5mg/mL – Controle positivo

Cloridrato de 1-Desoxinojirimicina (Sigma Aldrich)	5,0mg
Água destilada	1,0mL

Solução de extrato vegetal

Os extratos etanólicos e hexânicos foram primeiramente diluídos em DMSO e em seguida diluídos em água destilada, obtendo uma solução de DMSO a 5%. Os extratos aquosos foram preparados em água destilada. A concentração da solução mãe de cada extrato foi ajustada para uma concentração final no ensaio de 1mg/mL.

4.3.2 Ensaio da atividade enzimática da α -glicosidase

A atividade enzimática de α -glicosidase foi determinada segundo Shinde (2008) (62), através da estimativa do *p*-nitrofenol (p NP) liberado a partir do *p*-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (p NPG). Este ensaio é baseado na determinação da hidrólise contínua do p NPG em p NP. A formação do p NP produz uma coloração amarela dependente de Na_2CO_3 , que é medida em espectrofotômetro a 405nm. O p NPG é utilizado como substrato para uma maior especificidade do método de determinação da atividade da α -glicosidase (144).

Em microplacas de 96 poços, a enzima α -glicosidase (10 μ L) foi pré-incubada com 20 μ L de extrato vegetal durante 5 min a 25°C. Foram adicionados 40 μ L de solução de p NPG (1mM) em tampão fosfato de sódio 50mM (pH 6,8). A reação foi incubada a 37°C durante 30 min em banho-maria. Após incubação, a reação foi interrompida pela adição de 100 μ L de solução 10% de bicarbonato de sódio e a absorbância lida a 405nm (Leitor de microplacas - DTX 800 Multimode Detector Beckman Coulter).

Para o branco do extrato, foram utilizadas amostras contendo o extrato vegetal e p NPG, visando eliminar variações relacionadas à coloração característica do extrato vegetal e possíveis variações relacionadas à absorbância da coloração do p NPG.

4.3.3 Controle positivo para a atividade de inibição sobre a α -glicosidase

Como controle positivo de inibição da α -glicosidase foi utilizado o inibidor desoxinojirimicina. A curva dose-resposta para desoxinojirimicina foi construída com concentrações variando entre 1,95 e 4000 μ g/mL. A solução denominada branco do controle foi preparada substituindo a enzima por tampão fosfato de sódio 50mM (pH 6,8).

4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE INIBIÇÃO SOBRE A TIROSINASE

4.4.1 Preparo das soluções

Solução de tirosinase 25U/mL

Tirosinase de cogumelo (25KU/mL, Sigma Aldrich)	100µL
Tampão fosfato de sódio 50mM pH 6,5 q.s.p.	10mL

Tampão fosfato de sódio 50mM pH 6,5

Fosfato de sódio monobásico	2,38g
Fosfato de sódio dibásico	2,11g
Água destilada q.s.p.	1000mL

Solução de L-Tirosina 2mM

L-Tirosina (Sigma)	9,0mg
Tampão fosfato de sódio 50mM pH 6,5 q.s.p.	25,0mL

Solução de ácido kójico – Controle positivo

Ácido kójico (Sigma Aldrich)	20,0mg
Água destilada q.s.p	1,0mL

Solução de extrato vegetal

Os extratos etanólicos e hexânicos foram diluídos em DMSO e depois foram novamente diluídos em água destilada, obtendo uma solução de DMSO a 5%. Os extratos aquosos foram preparados em água destilada. A concentração da solução mãe de cada extrato foi ajustada para uma concentração final no ensaio de 1mg/mL.

4.4.2 Ensaio da atividade enzimática da tirosinase

Os ensaios da atividade enzimática da tirosinase foram realizados segundo o método utilizado por Khatib (2005), com algumas modificações (145). Em microplacas de 96 poços foram adicionados 30µL de solução de tirosinase 25U/mL, 60 µL de solução tampão fosfato de sódio 50mM pH 6,5 e 10µL da solução de extrato. Essa mistura foi incubada por 5 min a 25°C. Então foram adicionados 100µL de solução de L-tirosina para reação a 25°C. Após 20 min, a absorbância foi medida a 475nm (Leitor de microplacas – BioTeK Synergy HT). Para o branco do extrato, foram utilizadas amostras contendo o extrato vegetal e L-tirosina, visando eliminar variações relacionadas à coloração característica do extrato vegetal e variações relacionadas à absorbância da coloração de L-tirosina.

4.4.3 Controle positivo para a atividade de inibição sobre a tirosinase

Como controle positivo de inibição da tirosinase foi utilizado o inibidor ácido kójico. A curva dose-resposta para ácido kójico foi construída com concentrações variando entre 0,24 e 1000µg/mL. A solução denominada branco do controle foi preparada substituindo a enzima por tampão fosfato de sódio 50mM (pH 6,5).

4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE INIBIÇÃO SOBRE A ACETILCOLINESTERASE

4.4.1 Preparo das soluções

Solução de acetilcolinesterase

A acetilcolinesterase de *Electrophorus electricus* (500U, Sigma Aldrich) foi diluída em 10mL de tampão base-Tris 50mM pH 8,0, aliqüotada em microtubos e

armazenadas a -80°C . Para o ensaio, $100\mu\text{l}$ da solução estoque foram diluídos em 25mL de solução de albumina de soro bovino a $0,1\%$.

Solução de Tampão A - Base-Tris 50 mM pH 8,0

Base-Tris	6,0g
Água destilada q.s.p.	1000mL
HCl (ajuste pH)	

Solução de acetiltiocolina 15mM

Iodeto de acetiltiocolina (Sigma Aldrich)	21,7mg
Água destilada q.s.p.	5,0mL

Solução de Tampão C

NaCl	2,92g
MgCl_2	20,33g
Água destilada q.s.p.	500mL

Solução de DTNB 3mM

Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (Sigma Aldrich)	29,72mg
Tampão A q.s.p.	250mL

Solução de Tampão B - albumina 0,1 %

Albumina de soro bovino (Sigma Aldrich)	0,5g
Tampão base-tris 50 mM pH 8,0 q.s.p.	500mL

Solução de eserina – Controle positivo

Eserina (Sigma Aldrich)	20mg
Tampão A	1mL

Solução de extrato vegetal

Os extratos etanólicos e hexânicos foram diluídos em etanol na concentração de 10mg/mL e depois foram diluídos mais 10 vezes em Tampão A até a concentração de 1mg/mL . Os extratos aquosos foram preparados em Tampão A na concentração de 10mg/mL .

4.4.2 Ensaio da atividade enzimática da acetilcolinesterase

O ensaio *in vitro* da atividade da acetilcolinesterase foi realizado em microplacas de 96 poços a partir do método desenvolvido por Ellman (1961) (146). A enzima hidroliza o substrato acetiltiocolina resultando na produção de tiocolina, que reage com o DTNB para produzir 2-nitrobenzoato-5-mercaptotiocolina e 5-tio-2-nitrobenzoato, o qual pode ser detectado a 405nm. Em microplacas de 96 poços, 25µL de solução de acetilcolinesterase, 125µL de solução de DTNB, 50µL de Tampão B foram adicionados a 25µL de cada amostra e a absorbância foi medida a 405nm a cada 13 segundos por cinco vezes (Leitor de microplacas - DTX 800 Multimode Detector Beckman Coulter). Em seguida, foram adicionados 25µL de solução de iodeto de acetiltiocolina e absorbância novamente determinada a cada 13 segundos por oito vezes. Um possível aumento na absorbância devido à hidrólise espontânea do substrato foi corrigido pela subtração da absorbância antes da adição da enzima pela absorbância depois da adição da enzima.

4.4.3 Controle positivo para a atividade de inibição sobre a acetilcolinesterase

Como controle positivo de inibição da acetilcolinesterase foi utilizado o inibidor eserina, também chamado de fisostigmina. A curva dose-resposta para eserina foi construída com concentrações variando entre 0,007 e 2000µg/mL. A curva de inibição foi obtida plotando a % de inibição versus o logaritmo da concentração de eserina. Os parâmetros de regressão não-linear foram traçados para cada curva e os valores de IC₅₀ foram obtidos utilizando o software GraphPad Prism 5.0.

4.5 DETERMINAÇÃO DA PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA

As porcentagens de inibição sobre as enzimas foram calculadas comparando-se a absorbância das amostras (ensaio contendo extrato + enzima + substrato) com a do controle da enzima (ensaio contendo tampão + enzima + substrato). Os valores correspondentes à absorbância do controle da enzima forneceram o referencial da atividade máxima da enzima utilizada para a realização dos experimentos, ou seja, refere-se à capacidade máxima da enzima para a formação dos produtos a partir dos seus substratos, tendo sido considerada a atividade da enzima igual a 100%. Dessa forma as porcentagens de inibição das amostras foram calculadas de acordo com a seguinte equação: % Inibição = $[(C-A) \times 100]/C$, onde: C representa a absorbância do controle da enzima, subtraída do branco do substrato e A representa a absorbância da amostra subtraída do branco do extrato (extrato vegetal + substrato + tampão).

4.6 DETERMINAÇÃO DOS VALORES DE IC₅₀ DOS EXTRATOS VEGETAIS

Os extratos que apresentaram atividade de inibição foram selecionados para a avaliação do potencial de inibição em diluições seriadas. Foram construídas curvas dose-resposta para cada extrato selecionado determinando-se o valor do IC₅₀. A concentração capaz de inibir a metade da inibição máxima (IC₅₀) é a medida da eficácia de um composto na função biológica ou bioquímica de inibição. As soluções para o ensaio foram preparadas diluindo a solução mãe nos solventes. Cada diluição foi analisada em triplicata e a porcentagem de inibição foi calculada.

A curva de inibição foi obtida construindo um gráfico com a % de inibição versus o logaritmo da concentração do inibidor (extrato vegetal ou controle positivo). Os parâmetros de regressão não-linear foram traçados para cada curva e os valores de IC₅₀ foram obtidos utilizando o software GraphPad Prism 5.0.

4.7 INFLUÊNCIA DOS SOLVENTES UTILIZADOS NA DILUIÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS

Para o estudo da atividade de inibição de extratos de plantas com diferentes polaridades foram escolhidos solventes inertes. A quantidade de solvente utilizada para solubilizar as amostras de extratos vegetais foi avaliada frente à atividade das respectivas enzimas nas mesmas condições dos experimentos para a determinação da atividade enzimática. Foram testados os solventes DMSO e etanol em diferentes concentrações.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Cada concentração de cada amostra foi analisada em triplicata e os resultados obtidos foram apresentados na forma de média ponderada, com os respectivos desvios padrão. Os valores encontrados foram comparados ao controle com o uso de um teste paramétrico t de Student bicaudal, utilizando como hipótese nula a diferença entre as médias. Ou seja, o teste busca identificar se as médias encontradas para a amostra e para o controle são significativamente diferentes. O limite de significância para todas as análises estatísticas foi de $p < 0,05$, resultando, portanto em um intervalo de confiança de 95%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ENZIMA α -AMILASE POR ESPÉCIES DO BIOMA CERRADO

A atividade de inibição de 39 extratos de plantas do Cerrado foi avaliada sobre a enzima α -amilase. Os resultados mostraram que várias plantas foram capazes de influenciar na atividade da enzima, sendo que 14 extratos apresentaram uma inibição relevante sobre a α -amilase, maior que 50%. Os extratos de plantas das famílias Apocynaceae, Myrtaceae, Leguminosae e Sapotaceae foram os que apresentaram maior taxa de inibição, representadas pelas espécies *Hancornia speciosa*, *Eugenia dysenterica*, *Stryphnodendron adstringens* e as espécies do gênero *Pouteria*. As porcentagens de inibição de cada extrato vegetal e do controle positivo acarbose estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Atividade de inibição dos extratos vegetais sobre a α -amilase (*Continua*)

Família Espécie	Parte usada (solvente)	Inibição (%)
Apocynaceae		
<i>Allamanda blanchetti</i> A.DC.	¹ F(e)	NI
	F(h)	NI
	² C(e)	NI
	³ Fr(e)	NI
	Fr(h)	NI
<i>Hancornia speciosa</i> Gomes	F(e)	57,32 ± 0,010
	F(h)	74,29 ± 0,037
<i>Tabernaemontana solanifolia</i> A.DC.	F(e)	NI
	F(h)	NI
Moraceae		
<i>Morus nigra</i> L.	F(a)	NI
	F(e)	NI
	F(h)	22,41 ± 0,005
Myrtaceae		
<i>Eugenia dysenterica</i> DC.	F(a)	93,08 ± 0,006
	F(e)	98,95 ± 0,008
	F(h)	78,01 ± 0,012
Leguminosae		
<i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville	⁴ CC(e)	86,62 ± 0,016

(Conclusão)

Família Espécie	Parte usada (solvente)	Inibição (%)
Lamiaceae		
<i>Plectranthus neochilus</i> Schltr.	F(a)	4,15 ± 0,007
	F(e)	NI
	F(h)	NI
Rubiaceae		
<i>Genipa americana</i> L. Var. <i>caruto</i> (H.B.K) K. Shum.	F(e)	0,29 ± 0,049
	F(h)	NI
	Fr(e)	NI
	Fr(h)	NI
	⁵ CF(e)	NI
Sapotaceae		
<i>Pouteria gardneri</i> (Mart. & Miq.) Baehni	F(e)	71,10 ± 0,004
	F(h)	31,65 ± 0,028
<i>Pouteria ramiflora</i> Radlk.	F(a)	90,66 ± 0,011
	F(e)	87,83 ± 0,006
	F(h)	31,65 ± 0,028
<i>Pouteria caimito</i> Radlk.	F(a)	81,96 ± 0,017
	F(e)	53,43 ± 0,019
	F(h)	NI
<i>Pouteria torta</i> Radlk.	F(a)	93,67 ± 0,009
	F(e)	91,10 ± 0,012
	F(h)	9,95 ± 0,009
	Fr(e)	NI
	CF(e)	80,12 ± 0,019
Caryocaraceae		
<i>Caryocar cf. villosum</i> (Aubl.) Pers.	Fr(e)	NI
Sapindaceae		
<i>Sapindus saponaria</i> L. variedade <i>inaequalis</i> (DC.) Radlk.	Fr(e)	NI
Acarbose ^a		87,44 ± 0,009

¹F: Folha, ²C: Caule, ³Fr: Fruto, ⁴CC: Casca do caule, ⁵CF: Casca do fruto.

Solventes: h: hexano, e: etanol, a: água.

^aControle positivo; NI: não houve inibição enzimática.

Os extratos com grande atividade de inibição sobre a α -amilase (entre 80 e 100%) foram os aquosos e etanólicos das folhas de *P. torta*, *P. caimito*, *P. ramiflora* e *E. dysenterica*, além dos extratos etanólicos da casca do fruto de *P. torta* e da casca do caule de *S. adstringens*.

Entre os extratos das espécies do gênero *Pouteria* com potencial de inibição sobre a α -amilase maior que 80% destacaram-se os extratos aquosos e etanólicos das folhas de *P. torta* (93,67% e 91,10%, respectivamente) e *P. ramiflora* (90,66% e 87,83%, respectivamente), o extrato etanólico da casca do fruto de *P. torta* (80,12%) e o extrato aquoso da folha de *P. caimito* (81,96%). Os extratos etanólicos das folhas de *P. gardneri* e *P. caimito* apresentaram uma inibição de 71,10% e 53,43%,

respectivamente. Os extratos hexânicos obtidos das espécies do gênero *Pouteria* não exibiram atividade significativa sobre a enzima α -amilase. Relatados na literatura, triterpenos e flavonóides são os principais constituintes das espécies do gênero *Pouteria* (134). Vale ressaltar, que a literatura relata vários flavonóides capazes de inibirem a atividade da enzima α -amilase, permitindo-nos correlacionar a atividade de inibição dos extratos do gênero *Pouteria* com algum desses compostos acima citados (100). No entanto, ainda não existem estudos sobre a atividade das espécies do gênero *Pouteria* quanto à inibição sobre a α -amilase.

Os extratos aquoso, etanólico e hexânico das folhas da espécie *E. dysenterica* tiveram uma porcentagem de inibição de 93,08%, 98,95% e 78,01% sobre a atividade da enzima α -amilase, respectivamente. Estudos anteriores mostraram que o extrato aquoso da semente da espécie *Eugenia jambolana* possui uma alta atividade de inibição sobre a α -amilase (98%), sendo identificados como compostos ativos o ácido betulínico e a 3,4',5,7-tetraidroxiflavanona (98).

O extrato etanólico da casca do caule da espécie *S. adstringens* apresentou uma alta atividade de inibição sobre a atividade da α -amilase de 86,62%. A composição química da espécie *S. adstringens* já foi bastante investigada e a atividade farmacológica desta planta deve-se principalmente ao teor de tanino presente na casca (139). Os taninos são substâncias capazes de precipitar proteínas, pois ao se ligarem fortemente às proteínas formam complexos insolúveis. Dessa forma, os taninos são capazes de ligarem-se as enzimas digestivas, como a α -amilase, inibindo o seu efeito no processo de hidrólise do amido (147, 148). Assim, a inibição do extrato da casca de *S. adstringens* sobre a enzima α -amilase deve ser, ao menos em parte, ao teor de tanino presente na planta.

Os extratos de plantas da família Apocynaceae apresentaram menor atividade de inibição. O extrato etanólico da folha da espécie *Hancornia speciosa* mostrou uma atividade de inibição de 57,32% sobre a enzima. E o extrato hexânico da folha de *H. speciosa* foi o único extrato ativo nessa polaridade que apresentou atividade de inibição sobre a α -amilase (74,29%). A literatura revela a presença de esteróides, triterpenos e taninos nas folhas de *H. speciosa* (149), podendo sua atividade de inibição está relacionada a esses compostos. Um estudo químico realizado com extratos polares das folhas de *H. speciosa* resultou na identificação do flavonóide rutina (150). Em outro estudo, a rutina isolada de *Sophora japonica* mostrou uma inibição de aproximadamente 40% sobre a enzima α -amilase (101).

Com exceção do extrato hexânico de *H. speciosa*, todos os extratos testados com atividade de inibição sobre a α -amilase são aquosos ou etanólicos. Esses resultados podem ser justificados pelo fato de que a α -amilase atua sobre o seu substrato em meio polar, e pelo fato dos solventes água e etanol extraírem preferencialmente compostos mais polares da planta, como taninos, triterpenos e flavonóides. Existem vários estudos que relatam inibição da α -amilase por extratos polares de plantas e em muitos, essa atividade está relacionada a compostos fenólicos (99-101, 151-154).

Para os extratos que apresentaram uma inibição sobre a α -amilase superior a 50%, foram feitas curvas com concentrações dos extratos entre 0 a 1500 μ g/mL, para determinar o valor do IC₅₀ sobre a enzima α -amilase (Tabela 3).

Tabela 3 - Valores de IC₅₀ dos extratos com atividade de inibição sobre a α -amilase

Família Espécie	Parte usada (solvente)	IC ₅₀
Apocynaceae		
<i>Hancornia speciosa</i> Gomes	¹ F(e)	271,6 ± 23,13*
	F(h)	228,07 ± 34,31*
Myrtaceae		
<i>Eugenia dysenterica</i> DC.	F(a)	14,93 ± 0,95*
	F(e)	20,80 ± 0,67*
	F(h)	493,23 ± 163,93*
Leguminosae		
<i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville	² CC(e)	1,86 ± 0,29*
Sapotaceae		
<i>Pouteria gardneri</i> (Mart. & Miq.) Baehni	F(e)	70,15 ± 17,15*
<i>Pouteria ramiflora</i> Radlk.	F(a)	7,08 ± 0,24*
	F(e)	40,35 ± 3,18*
<i>Pouteria caimito</i> Radlk.	F(a)	13,60 ± 0,39*
	F(e)	545,27 ± 148,89*
<i>Pouteria torta</i> Radlk.	F(a)	5,67 ± 1,81
	F(e)	105,88 ± 10,98*
	³ CF(e)	165,30 ± 4,18*
Acarbose ^a		5,58 ± 0,745

¹F: Folha, ²CC: Casca do caule, ³CF: Casca do fruto.

Solventes: h: hexano, e: etanol, a: água.

^aControle positivo.

* $p = 0,05$

A acarbose foi o inibidor da atividade de α -amilase, utilizado como controle positivo nos ensaios de inibição da enzima. Uma curva dose-resposta foi construída com as concentrações de acarbose entre 1 e 80 μ g/mL, sendo obtida uma atividade de inibição de 87,44% e um IC₅₀ de 5,58 μ g/mL. A curva dose-resposta do inibidor

Triticum aestivum foi construída com as concentrações entre 20 e 140µg/mL. O intervalo da porcentagem de inibição sobre a α -amilase foi de 20-70% e o IC₅₀ igual a 30,8µg/mL.

Dos 14 extratos testados, 5 apresentaram uma forte atividade de inibição sobre a enzima α -amilase, com valores de IC₅₀ entre 1,86 a 14,93µg/mL, comparados ao controle positivo acarbose (Figura 8). O extrato etanólico da casca do caule de *S. adstringens* apresentou inibição significativamente diferente da calculada para a acarbose, sendo que o valor absoluto da média calculada para este extrato foi aproximadamente 3 vezes menor do que a média calculada para o controle. Assim, o potencial de inibição é superior ao da acarbose. A inibição calculada para o extrato aquoso da folha de *P. torta* não apresentou diferença significativa à do controle. Os extratos aquosos das folhas de *P. ramiflora*, *P. caimito* e *E. dysenterica* apresentam inibição significativamente diferente da do controle, apesar do valor absoluto da média calculada para a *P. Ramiflora* ser próximo ao do controle (a diferença estatística deve-se ao pequeno desvio padrão dos resultados desta amostra). Os valores absolutos das médias calculadas para *P. caimito* e *E. dysenterica* são quase três vezes menores do que o valor da média calculada para o controle.

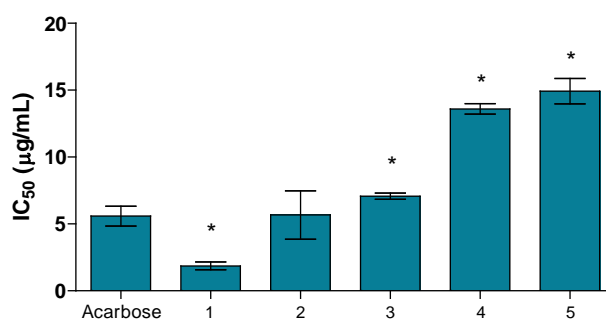


Figura 8. Valores de IC₅₀ sobre a atividade da α -amilase dos extratos vegetais do Cerrado. Acarbose como controle positivo. (1) *S. adstringens* CC(e); (2) *P. torta* F(a); (3) *P. ramiflora* F(a); (4) *P. caimito* F(a); (5) *E. dysenterica* F(a).

O extrato aquoso e etanólico das folhas de *E. dysenterica* apresentaram uma forte inibição da atividade da α -amilase, com valores de IC₅₀ de 14,93 e 20,8µg/mL, respectivamente. O extrato hexânico obtido da mesma planta exibiu uma menor atividade de inibição sobre a enzima, com IC₅₀ de 493,23µg/mL. A atividade de

inibição dessas espécies sobre a α -amilase pode estar relacionada com a presença de compostos como monoterpenos e sesquiterpenos (155, 156).

Os extratos do gênero *Pouteria* mostraram altas atividades de inibição sobre α -amilase. O extrato aquoso das folhas de *P. torta* revelou uma forte inibição com IC_{50} de 5,67 μ g/mL quando comparado ao controle acarbose. As atividades dos extratos etanólicos da folha e da casca do fruto foram menores, com valor de IC_{50} de 105,88 μ g/mL e 165,3 μ g/mL, respectivamente. Os extratos etanólicos das folhas de *P. caimito*, *P. gardneri* e *P. ramiflora* tiveram uma baixa atividade de inibição sobre a α -amilase, com valores de IC_{50} de 545,27, 70,15 e 40.35 μ g/mL, respectivamente. As espécies do gênero *Pouteria* têm em sua composição triterpenos, possuindo várias características biológicas, como antiinflamatória, antitumoral e antihelmíntica, assim como os flavonóides, onde a miricitrina é considerado um marcador do gênero (134). A inibição da α -amilase por extratos de plantas está associada geralmente a presença de compostos fenólicos, taninos e triterpenóides (8, 152). Ainda não se conhece os compostos ativos presentes nos extratos das espécies do gênero *Pouteria* relacionados à inibição da α -amilase, porém pode-se considerar a hipótese dessa atividade estar relacionada com a presença de algum desses compostos. Ali *et al* (2006) relataram uma potente atividade de inibição sobre a α -amilase de três triterpenóides, ácido ursólico, ácido oleanólico e lupeol (8). Esses compostos foram isolados das espécies *P. torta*, *P. caimito* e *P. gardneri* (134).

O extrato etanólico da casca do caule de *S. adstringens* apresentou a maior potência de inibição sobre a atividade da α -amilase com valor de IC_{50} igual a 1,86 μ g/mL. A presença de compostos fenólicos na espécie *S. adstringens*, especialmente flavonóides e taninos, podem justificar a atividade observada (157). Kandra *et al* (2004) relataram que taninos inibem a atividade da enzima α -amilase do mesmo modo que a acarbose (152).

Os extratos etanólicos e hexânicos das folhas de *H. speciosa* apresentaram uma atividade fraca sobre a α -amilase com valores de IC_{50} de 271.6 and 228.07 μ g/mL, respectivamente.

A compreensão dos mecanismos de inibição da atividade da enzima α -amilase pode ser considerada importante para o desenvolvimento de inibidores de alta afinidade e especificidade, com aplicação inclusive no tratamento da diabetes. Os resultados apresentados nesse trabalho sobre a atividade de inibição de extratos brutos de plantas do Cerrado sobre a α -amilase podem contribuir com a busca de

novas estratégias para o tratamento da diabetes. O futuro isolamento dos compostos responsáveis pela inibição da enzima através de estudos de fracionamento químico biomonitorado, associado a estudos de interação do inibidor com a enzima, poderá fornecer maiores dados que permitirão o conhecimento de novos compostos para o tratamento da diabetes.

5.2 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ENZIMA α -GLICOSIDASE POR ESPÉCIES DO BIOMA CERRADO

Os 39 extratos obtidos de 12 espécies do Cerrado foram testados sobre a α -glicosidase na concentração final de 1mg/mL. Os resultados demonstraram que 34 extratos foram capazes de influenciar na atividade enzimática da α -glicosidase, com atividade de inibição maior que 50%. Destes 34 extratos, 29 extratos apresentaram atividade de inibição maior que 80% sobre a enzima. As porcentagens de inibição de cada extrato vegetal e do controle positivo desoxinojirimicina estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Atividade de inibição dos extratos vegetais sobre a α -glicosidase (*Continua*)

Família Espécie	Parte usada (solvente)	% Inibição
Apocynaceae		
<i>Allamanda blanchetti</i> A.DC.	¹ F(e)	18,11 \pm 0,051
	F(h)	100 \pm 0,003
	² C(e)	33,57 \pm 0,065
	³ Fr(e)	36,28 \pm 0,038
	Fr(h)	100 \pm 0,008
<i>Hancornia speciosa</i> Gomes	F(e)	98,61 \pm 0,013
	F(h)	98,15 \pm 0,003
<i>Tabernaemontana solanifolia</i> A.DC.	F(e)	62,02 \pm 0,090
	F(h)	88,74 \pm 0,050
Moraceae		
<i>Morus nigra</i> L.	F(a)	76,97 \pm 0,038
	F(e)	87,36 \pm 0,015
	F(h)	91,12 \pm 0,05
Myrtaceae		
<i>Eugenia dysenterica</i> DC.	F(a)	100 \pm 0,005
	F(e)	100 \pm 0,009
	F(h)	100 \pm 0,013

(Conclusão)

Família Espécie	Parte usada (solvente)	% Inibição
Leguminosae		
<i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville	⁴ CC(e)	99,12 ± 0,001
Lamiaceae		
<i>Plectranthus neochilus</i> Schltr.	F(a) F(e) F(h)	95,05 ± 0,037 68,60 ± 0,024 100 ± 0,008
Rubiaceae		
<i>Genipa americana</i> L. Var. <i>caruto</i> (H.B.K) K. Shum.	F(e) F(h) Fr(e) Fr(h) ⁵ CF(e)	80,14 ± 0,035 98,27 ± 0,004 64,36 ± 0,021 88,02 ± 0,013 55,22 ± 0,128
Sapotaceae		
<i>Pouteria gardneri</i> (Mart. & Miq.) Baehni	F(e) F(h)	100 ± 0,034 94,78 ± 0,008
<i>Pouteria ramiflora</i> Radlk.	F(a) F(e) F(h)	98,32 ± 0,026 100 ± 0,005 93,49 ± 0,003
<i>Pouteria caimito</i> Radlk.	F(a) F(e) F(h)	99,77 ± 0,009 100 ± 0,084 100 ± 0,000
<i>Pouteria torta</i> Radlk.	F(a) F(e) F(h) Fr(e) CF(e)	100 ± 0,016 91,49 ± 0,001 91,50 ± 0,033 72,97 ± 0,062 98,29 ± 0,009
Caryocaraceae		
<i>Caryocar</i> cf. <i>villosum</i> (Aubl.) Pers.	Fr(e)	27,15 ± 0,032
Sapindaceae		
<i>Sapindus saponaria</i> L. variedade <i>inaequalis</i> (DC.) Radlk.	Fr(e)	25,36 ± 0,063
Desoxinojirimicina ^a		94,85 ± 0,003

¹F: Folha, ²C: Caule, ³Fr: Fruto, ⁴CC: Casca do caule, ⁵CF: Casca do fruto.

Solventes: h: hexano, e: etanol, a: água.

^aControle positivo

Existe uma grande procura por compostos com alta atividade de inibição sobre a enzima α -glicosidase e com efeito moderado sobre a α -amilase (158, 159). Por exemplo, há relato que extratos da família Lamiaceae, ricos em ácido rosmarínico, caféico, protocatéquico e quercetina, apresentam uma elevada atividade de inibição da α -glicosidase e baixa ação sobre a α -amilase, o que reduziria os efeitos colaterais causados pela fermentação de carboidratos não digeridos no intestino (153, 159).

As espécies do gênero *Pouteria* mostraram um grande potencial de inibição sobre a α -glicosidase. Com exceção do extrato etanólico do fruto de *P. torta*, todos os extratos exibiram atividade de inibição maior que 90%. Os extratos hexânicos das folhas das espécies *P. torta*, *P. caimito*, *P. ramiflora* e *P. gardneri* apresentaram uma inibição sobre a α -glicosidase de 91,50%, 100%, 93,49% e 94,78%, respectivamente. O fato interessante é que esses mesmos extratos não apresentaram qualquer atividade de inibição sobre a enzima α -amilase, sendo seletivos para a α -glicosidase. Alguns compostos foram isolados de extratos hexânicos das folhas das espécies do gênero *Pouteria*, como o acetato de lupeol de *P. torta*, spinasterol de *P. caimito*, α e β -amirina e seus acetatos, ácido ursólico, acetato de lupeol e ácido oleanólico da espécie *P. gardneri* (134).

As espécies da família Apocynaceae mostraram-se melhores inibidores da α -glicosidase, comparando-se com a atividade sobre a α -amilase. Os extratos etanólicos e hexânicos das folhas de *H. speciosa* exibiram alta atividade sobre a α -glicosidase, com porcentagem de inibição de 98,61% e 98,15%, respectivamente. Apesar dos extratos etanólicos da espécie *A. blanchetti* apresentarem uma atividade de inibição fraca sobre a α -glicosidase, os extratos hexânicos da folha e do fruto da espécie tiveram uma de inibição de 100%. O extrato hexânico da folha de *T. solanifolia* também mostrou uma boa inibição sobre a enzima de 88,74%. Esses extratos não exibiram nenhuma inibição sobre a enzima α -amilase, revelando uma outra fonte de compostos seletivos para inibição da α -glicosidase.

Os outros extratos que apresentaram inibição seletiva sobre a α -glicosidase e nenhuma inibição sobre a α -amilase são representados pelas espécies *M. nigra*, *P. neochilus* e *G. americana*, que mostraram atividade de inibição maior que 80%.

Para os 29 extratos que apresentaram uma inibição sobre a α -glicosidase superior a 80%, foram feitas curvas com concentrações dos extratos entre 0,007 a 1000 μ g/mL, para determinar os valores de IC₅₀ sobre a atividade da α -glicosidase (Tabela 5).

O composto desoxinojirimicina foi utilizado como controle positivo nos ensaios de inibição da α -glicosidase. Uma curva dose-resposta foi construída com as concentrações de desoxinojirimicina entre 1,95 e 1000 μ g/mL, sendo obtida uma atividade de inibição de 94,85% e valor de IC₅₀ igual a 37,30 μ g/mL.

Tabela 5 - Valores de IC₅₀ dos extratos com atividade de inibição sobre a α-glicosidase

Família Espécie	Parte usada (solvente)	IC ₅₀
Apocynaceae		
<i>Allamanda blanchetti</i> A.DC.	¹ F(h)	104,01 ± 6,61*
	² Fr(h)	12,84 ± 2,57*
<i>Hancornia speciosa</i> Gomes	F(e)	10,78 ± 3,77*
	F(h)	15,79 ± 3,07*
<i>Tabernaemontana solanifolia</i> A.DC.	F(h)	293,13 ± 23,80*
Moraceae		
<i>Morus nigra</i> L.	F(a)	188,40 ± 11,0*
	F(e)	171,60 ± 72,22*
	F(h)	446,13 ± 89,50*
Myrtaceae		
<i>Eugenia dysenterica</i> DC.	F(a)	0,47 ± 0,10*
	F(e)	0,78 ± 0,29*
	F(h)	8,32 ± 0,736*
Leguminosae		
<i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville	³ CC(e)	0,63 ± 0,084*
Lamiaceae		
<i>Plectranthus neochilus</i> Schltr.	F(a)	43,16 ± 8,65
	F(h)	29,39 ± 7,20
Rubiaceae		
<i>Genipa americana</i> L. Var. <i>caruto</i> (H.B.K) K. Shum.	F(e)	43,65 ± 6,38
	F(h)	166,50 ± 20,10*
	Fr(h)	82,96 ± 11,96*
Sapotaceae		
<i>Pouteria gardneri</i> (Mart. & Miq.) Baehni	F(e)	3,94 ± 1,06*
	F(h)	89,21 ± 9,70*
<i>Pouteria ramiflora</i> Radlk.	F(a)	0,35 ± 0,028*
	F(e)	2,62 ± 0,434*
	F(h)	163,23 ± 9,70*
<i>Pouteria caimito</i> Radlk.	F(a)	2,58 ± 0,21*
	F(e)	6,23 ± 0,97*
<i>Pouteria caimito</i> Radlk.	F(h)	109,58 ± 14,62*
<i>Pouteria torta</i> Radlk.	F(a)	0,24 ± 0,10*
	F(e)	235,77 ± 25,35*
	F(h)	640,50 ± 136,84*
	⁴ CF(e)	1,82 ± 0,22*
Desoxinojirimicina ^a		37,30 ± 4,41

¹F: Folha, ²Fr: Fruto, ³CC: Casca do caule, ⁴CF: Casca do fruto.

Solventes: h: hexano, e: etanol, a: água.

^aControle positivo. * p = 0,05

Ao comparar os valores de IC₅₀ obtidos sobre a α-glicosidase com o controle positivo desoxinojirimicina, observa-se que os valores dos extratos das espécies *P. neochilus* e *G. americana* não apresentaram diferença significativa ao do controle positivo. E as espécies *A. blanchetti*, *H. speciosa*, *E. dysenterica*, *S. adstringens* e do

gênero *Pouteria* apresentaram inibição significativamente diferente da calculada para a desoxinojirimicina (Figura 9).

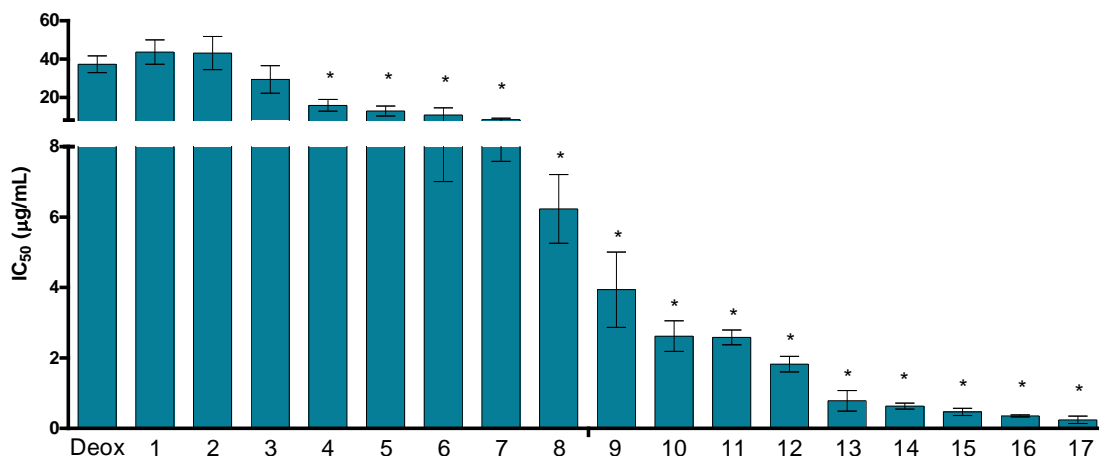


Figura 9. Valores de IC₅₀ sobre a α -glicosidase. (Deox) Controle positivo desoxinojirimicina; (1) *G. americana* F(e); (2) *P. neochilus* F(a); (3) *P. neochilus* F(h); (4) *H. speciosa* F(h); (5) *A. blanchetti* Fr(h); (6) *H. speciosa* F(e); (7) *E. dysenterica* F(h); (8) *P. caimito* F(e); (9) *P. gardneri* F(e); (10) *P. ramiflora* F(e); (11) *P. caimito* F(a); (12) *P. torta* CFr(e); (13) *E. dysenterica* F(e); (14) *S. adstringens* CC(e); (15) *E. dysenterica* F(a); (16) *P. ramiflora* F(a); (17) *P. torta* F(a).

A espécie *Eugenia dysenterica* apresentou uma das maiores potências na inibição da atividade da enzima α -glicosidase. Os extratos aquoso, etanólico e hexânico tiveram um IC₅₀ de 0,47 μ g/mL, 0,78 μ g/mL e 8,32 μ g/mL, respectivamente. As curvas dose-resposta dos extratos aquoso e etanólico mostraram que mesmo em concentração de 4 μ g/mL a porcentagem de inibição sobre a α -glicosidase foi de 100%. Na literatura, frações polares da folha da espécie *Eugenia uniflora* exibiram atividades sobre a α -glicosidase com porcentagens de inibição entre 85 e 95%. Análises fitoquímicas das folhas da espécie *E. uniflora* mostraram a presença de monoterpenos, sesquiterpenos, flavonóides e taninos (108, 160). Outra espécie da mesma família também apresentou inibição sobre a enzima α -glicosidase, o extrato etanólico da semente de *E. jambolana* obteve um potencial de inibição com valor de IC₅₀ igual a 120,9 μ g/mL (62). E o extrato metanólico da casca de *E. malaccensis* inibiu a α -glicosidase com IC₅₀ de 5,7 μ g/mL (107).

A espécie *Stryphnodendron adstringens* apresentou uma das maiores atividade de inibição sobre a atividade da α -glicosidase: o extrato etanólico da casca

do caule apresentou um valor de IC_{50} igual a 0,63 $\mu\text{g/mL}$. A presença de taninos no extrato avaliado provavelmente está associada a atividade de inibição, pois diversos estudos relatam a inibição de taninos sobre a enzima α -glicosidase (161-164).

Os extratos das espécies do gênero *Pouteria* mostraram uma alta atividade de inibição sobre a α -glicosidase. Os extratos aquosos das folhas e das espécies *P. torta* e *P. ramiflora* apresentaram as maiores potências de inibição entre os extratos das plantas do gênero *Pouteria*, com IC_{50} de 0,24 $\mu\text{g/mL}$ e 0,35 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Os extratos etanólicos das folhas de *P. gardneri*, *P. ramiflora* e *P. caimito* também apresentaram uma grande inibição sobre a α -glicosidase com valores de IC_{50} de 3,94 $\mu\text{g/mL}$, 2,62 $\mu\text{g/mL}$ e 6,23 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O extrato etanólico da casca do fruto de *P. torta* exibiu um potencial de inibição sobre a enzima com IC_{50} de 1,82 $\mu\text{g/mL}$. Não há estudos sobre a atividade de inibição dessas espécies, porém a presença de flavonóides e triterpenos nas espécies devem provavelmente inibir a enzima α -glicosidase. O triterpeno ácido oleanólico e seus derivados apresentaram uma potente atividade de inibição sobre a α -glicosidase quando comparados ao controle desoxinojirimicina (165). O estudo fitoquímico do extrato hexânico da folha de *P. gardneri* resultou no isolamento de alguns triterpenos, entre eles o ácido oleanólico (134).

Os extratos das espécies da família Apocynaceae que demonstraram inibição comparável a desoxinojirimicina foram os extratos hexânico do fruto de *A. blanchetti* (IC_{50} de 12,8 $\mu\text{g/mL}$), etanólico e hexânico das folhas de *H. speciosa* (IC_{50} de 10,78 $\mu\text{g/mL}$ e 15,79 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). O extrato hexânico da folha da espécie *T. solanifolia* apresentou uma moderada atividade de inibição sobre a enzima α -glicosidase, sendo o IC_{50} do extrato hexânico de 293,13 $\mu\text{g/mL}$, comparado a desoxinojirimicina. Na literatura relata-se a presença de uma lignana isolada da espécie *Tabernaemontana cymosa* que exibiu uma atividade de inibição sobre a α -glicosidase com IC_{50} de 1,13 mg/mL (166).

Os extratos aquosos e etanólicos das folhas da espécie *Morus nigra* apresentaram um leve potencial de inibição sobre a atividade da α -glicosidase com IC_{50} de 188,40 $\mu\text{g/mL}$ e 171,60 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Esses extratos também são inibidores seletivos da α -glicosidase, pois não inibiram a atividade da α -amilase. As espécies do gênero *Morus* são utilizadas como fontes naturais para a obtenção da substância desoxinojirimicina (105), utilizada como controle positivo neste estudo. A desoxinojirimicina foi isolado das folhas da espécie *Morus alba*, utilizada

popularmente para o tratamento da diabetes (27, 167). Além das folhas de *M. alba*, um estudo demonstrou que existem pequenas quantidades de desoxinojirimicina nas folhas da espécie *M. nigra* (105). Provavelmente, a atividade de inibição apresentada pelos extratos das folhas da espécie *M. nigra* sobre a α -glicosidase deve-se a presença da substância desoxinojirimicina, pois essa substância não apresenta inibição sobre a enzima α -amilase (168).

Para a espécie *G. americana*, o extrato que apresentou uma melhor inibição sobre a enzima α -glicosidase comparado ao controle foi o extrato etanólico da folha com IC_{50} de 43,65 μ g/mL. A espécie *P. neochilus* apresentou inibição sobre a atividade da α -glicosidase semelhante a desoxinojirimicina. Os extratos aquosos e hexânicos das folhas exibiram valores de IC_{50} iguais a 43,16 μ g/mL e 29,39 μ g/mL, respectivamente. Compostos fenólicos e flavonóides isolados de extratos metanólicos das espécies *Hyssopus officinalis* e *Origanum majorana*, da mesma família de *P. neochilus*, demonstraram atividade de inibição sobre a α -glicosidase (107).

É interessante ressaltar que os extratos brutos das espécies testadas são extratos vegetais complexos. Com a purificação desses extratos, as substâncias ativas possivelmente exibiram valores de IC_{50} ainda menores que o dos extratos brutos. Assim, os extratos que apresentaram valores de IC_{50} bem menores que o da substância desoxinojirimicina provavelmente serão potentes inibidores da enzima α -glicosidase.

5.3 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ENZIMA TIROSINASE POR ESPÉCIES DO BIOMA CERRADO

O método utilizado para avaliar a atividade da enzima tirosinase consiste em um método contínuo, onde é determinada a atividade difenolase da tirosinase. Nesse método, a oxidação da L-Dopa pela tirosinase produz dopaquinona, que sofre rápida auto-oxidação originando um pigmento de cor laranja, o dopacromo, cuja formação é medida em espectrofotômetro a 475nm (169).

Para avaliar o potencial de inibidores de plantas do bioma Cerrado sobre a enzima tirosinase, 39 extratos diferentes, preparados de 12 espécies do Cerrado

foram testados na atividade de inibição da tirosinase na concentração final de 1mg/mL. Os dados demonstraram que 12 extratos foram capazes de influenciar na atividade enzimática da tirosinase, apresentando uma inibição significativa entre 65 e 100%. Esses extratos foram obtidos a partir das espécies *S. adstringens*, *P. torta*, *P. ramiflora*, *P. caimito*, *M. nigra*, *E. dysenterica*, *G. americana* e *H. speciosa*. As porcentagens de inibição de cada extrato vegetal e do controle positivo ácido kójico estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Atividade de inibição dos extratos sobre a tirosinase (Continua)

Família Espécie	Parte usada (solvente)	% Inibição
Apocynaceae		
<i>Allamanda blanchetti</i> A.DC.	¹ F(e)	19,48 ± 0,030
	F(h)	24,10 ± 0,025
	² C(e)	NI
	³ Fr(e)	9,30 ± 0,087
	Fr(h)	10,24 ± 0,045
<i>Hancornia speciosa</i> Gomes	F(e)	36,91 ± 0,050
	F(h)	79,92 ± 0,017
<i>Tabernaemontana solanifolia</i> A.DC.	F(e)	22,50 ± 0,007
	F(h)	18,53 ± 0,050
Moraceae		
<i>Morus nigra</i> L.	F(a)	NI
	F(e)	96,01 ± 0,204
	F(h)	21,16 ± 0,021
Myrtaceae		
<i>Eugenia dysenterica</i> DC.	F(a)	90,47 ± 0,098
	F(e)	100 ± 0,083
	F(h)	100 ± 0,081
Leguminosae		
<i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville	⁴ CC(e)	95,00 ± 0,039
Lamiaceae		
<i>Plectranthus neochilus</i> Schltr.	F(a)	NI
	F(e)	46,37 ± 0,022
	F(h)	11,20 ± 0,023
Rubiaceae		
<i>Genipa americana</i> L. Var. <i>caruto</i> (H.B.K) K. Shum.	F(e)	30,44 ± 0,108
	F(h)	12,44 ± 0,021
	Fr(e)	73,16 ± 0,038
	Fr(h)	29,88 ± 0,020
	⁵ CF(e)	30,44 ± 0,108
Sapotaceae		
<i>Pouteria gardneri</i> (Mart. & Miq.) Baehni	F(e)	26,67 ± 0,088
	F(h)	15,58 ± 0,022
<i>Pouteria ramiflora</i> Radlk.	F(a)	28,37 ± 0,3231
	F(e)	79,77 ± 0,055

(Conclusão)

Família Espécie	Parte usada (solvente)	% Inibição
<i>Pouteria ramiflora</i> Radlk.	F(h)	19,80 ± 0,022
<i>Pouteria caimito</i> Radlk.	F(a)	87,60 ± 0,059
	F(e)	NI
	F(h)	27,95 ± 0,018
<i>Pouteria torta</i> Radlk.	F(a)	100 ± 0,076
	F(e)	95,39 ± 0,058
	F(h)	14,65 ± 0,024
	Fr(e)	29,32 ± 0,074
	CF(e)	63,46 ± 0,117
Caryocaraceae		
<i>Caryocar</i> cf. <i>villosum</i> (Aubl.) Pers.	Fr(e)	32,32 ± 0,083
Sapindaceae		
<i>Sapindus saponaria</i> L. variedade <i>inaequalis</i> (DC.) Radlk.	Fr(e)	25,00 ± 0,037
Ácido kójico ^a		81,31 ± 0,016

¹F: Folha, ²C: Caule, ³Fr: Fruto, ⁴CC: Casca do caule, ⁵CF: Casca do fruto.

Solventes: h: hexano, e: etanol, a: água.

^aControle positivo. NI: não houve inibição enzimática.

A espécie *Stryphnodendron adstringens* da família Leguminosae teve uma atividade de inibição sobre a atividade da tirosinase de 95%. Baurin et. Al. (2002), verificaram que os extratos aquosos das sementes e das cascas de *S. adstringens* inibem cerca 52% e 90% a atividade da enzima tirosinase, respectivamente. Essa espécie pode representar um potencial recurso de novos compostos inibidores da tirosinase (170).

Os extratos das espécies do gênero *Pouteria* apresentaram alta atividade de inibição sobre a tirosinase. Os extratos aquoso e etanólico das folhas de *P. torta* apresentaram as maiores potências de inibição entre os extratos, com inibição de 100% e 95,39 %, respectivamente. Entretanto, o extrato etanólico da casca do fruto dessa espécie apresentou uma atividade de inibição de 63,46%. O extrato hexânico da folha não mostrou atividade significativa. O extrato etanólico da folha de *P. ramiflora* e o extrato aquoso da folha de *P. caimito* também apresentaram uma grande inibição sobre a tirosinase de 79,77% e 87,60%, respectivamente.

Estudos anteriores relataram a capacidade de algumas espécies da família Sapotaceae em inibir a atividade da enzima tirosinase. Momtaz et al (2008) relataram que os extratos metanólico e acetônico da casca do caule de *Sideroxylon inerme* apresentaram uma forte inibição sobre a enzima, com valores de IC₅₀ de 63 µg/ml e 82 µg/ml, respectivamente. Dois compostos ativos foram isolados dos extratos dessa espécie, galato de epigalocatequina e procianidina B1 (171). Outra

espécie da família Sapotaceae com atividade de inibição sobre a tirosinase é a *Synsepalum dulcificum* Daniell, onde sete compostos ativos foram isolados do extrato metanólico do caule (siringaresinol; 4-acetonil-3,5-dimetoxi-p-quinol; ácido *cis*-p-cumaríco; ácido *trans*-p-cumaríco; ácido p-hidroxibenzóico; ácido vanílico e N-*cis*-feruloiltiramina) (172). O mesmo efeito não foi observado em estudos com o extrato da casca do caule da espécie *Glycoxylon huberi*, que pertence a mesma família Sapotaceae, apresentando uma inibição de 40% sobre a enzima (170).

Nenhuma atividade de inibição significativa foi mostrada pelos outros extratos das espécies *P. caimito*, *P. ramiflora* e *P. gardneri*. Não há estudos sobre a atividade de espécies do gênero *Pouteria* sobre a enzima tirosinase, podendo ser uma nova fonte de inibidores da atividade da tirosinase.

A atividade do extrato etanólico da folha de *Morus nigra* sobre a tirosinase foi uma das mais expressivas com inibição de 96,01%. Resultados semelhantes são encontrados com o extrato das folhas da espécie *Morus lba* (97%), sendo utilizada em alguns estudos como controle positivo para a avaliação da inibição da tirosinase (170). O oxiresveratrol isolado da espécie *M. Alba* exibiu uma inibição de 84% e 97% sobre a atividade da tirosinase (62, 111). Outro estudo revelou que a atividade de inibição da espécie *M. lba* está relacionada com antocianinas presentes em sua composição (173). Estudos mostraram que o flavonóide morina inibiu de forma competitiva a atividade da tirosinase (109, 174). Esse flavonóide é encontrado em espécies da família Moraceae (175), como a espécie *Artocarpus dadah* que também possui em sua composição o composto oxiresveratrol (176).

A espécie *Eugenia dysenterica* apresentou uma das maiores atividades sobre a enzima tirosinase, capaz de inibir entre 90 e 100%. Os extratos aquoso, etanólico e hexânico inibiram 90,47%, 100% e 100% a atividade da enzima, respectivamente. Porém, um estudo com a espécie *Myrcia sphaerocarpa* da mesma família da espécie *E. dysenterica* relatou uma inibição muito baixa de 2% sobre a atividade da tirosinase (170). Outro estudo com a flor da espécie *Eugenia caryophyllata* também mostrou uma baixa atividade de inibição sobre a enzima de 12% (177). Não foram encontrados relatos na literatura sobre a atividade de inibição de extratos de *E. dysenterica* sobre a tirosinase.

O extrato etanólico do fruto da espécie *Genipa americana* exibiu uma atividade de inibição de 79,77% sobre a tirosinase. Um estudo relatou que o extrato da casca do caule da mesma espécie exibiu uma fraca atividade de inibição sobre a

tirosinase de 23% (170). Os extratos da folha e da casca do fruto não apresentaram inibição significativa sobre a atividade da tirosinase.

A única espécie da família Apocynaceae que apresentou inibição foi a *H. speciosa*, onde o extrato hexânico da folha inibiu em 79,92% a atividade da enzima tirosinase. Apesar dos extratos etanólico e hexânico da espécie *Tabernaemontana solanifolia* não apresentarem inibição sobre a enzima, existem estudos que mostraram que o extrato aquoso do fruto da espécie *Tabernaemontana nítida* (sinonímia *Picralima lba a*) teve uma atividade de inibição de 61% sobre a tirosinase (178).

Com a finalidade de estudar o perfil de inibição dos extratos, foi determinado os valores de IC₅₀ dos extratos sobre a atividade da enzima tirosinase. Para os extratos que apresentaram uma inibição sobre a tirosinase entre 60 e 100%, foram construídas curvas com concentrações diferentes de 0,24µg/mL a 1000µg/mL de extrato para se obter assim, os respectivos valores de IC₅₀ (Tabela 7).

Tabela 7 – Valores de IC₅₀ dos extratos com atividade de inibição sobre a tirosinase

Família Espécie	Parte usada (solvente)	IC ₅₀
Apocynaceae		
<i>Hancornia speciosa</i> Gomes	¹ F(h)	146,60 ± 4,78*
Moracea		
<i>Morus nigra</i> L.	F(e)	4,38 ± 0,93*
Myrtaceae		
<i>Eugenia dysenterica</i> DC.	F(a) F(e) F(h)	11,88 ± 3,18 51,54 ± 12,20* 151,37 ± 8,82*
Leguminosae		
<i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville	² CC(e)	48,45 ± 10,40*
Rubiaceae		
<i>Genipa americana</i> L. Var. <i>caruto</i> (H.B.K) K. Shum.	³ Fr(e)	361,23 ± 19,17*
Sapotaceae		
<i>Pouteria ramiflora</i> Radlk.	F(e)	249,83 ± 63,81*
<i>Pouteria caimito</i> Radlk.	F(a)	50,01 ± 6,47*
<i>Pouteria torta</i> Radlk.	F(a) F(e) ⁴ CF(e)	30,01 ± 5,75* 258,53 ± 42,36* 104,34 ± 12,43*
Ácido kójico ^a		13,14 ± 0,685

¹F: Folha, ²CC: casca do caule, ³Fr: Fruto, ⁴CF: Casca do fruto.

Solventes: h: hexano, e: etanol, a: água.

^aControle positivo.

* p = 0,05

Para a atividade da tirosinase, o inibidor utilizado como controle positivo foi o ácido kójico. Essa substância é um agente natural obtida a partir do fungo *Aspergillus oryzae*. O ácido kójico age inibindo a atividade da enzima tirosinase, sendo utilizado como agente despigmentante, pois inibiu a formação da melanina (179). Uma curva dose-resposta foi construída com concentrações diferentes de ácido kójico entre 0,24 e 1000µg/mL, obtendo-se uma inibição de 81,31% e um IC₅₀ de 13,14µg/mL.

O extrato etanólico da folha de *M. nigra* apresentou inibição significativamente diferente da calculada para o ácido kójico, sendo que o valor absoluto da média calculada para este extrato foi aproximadamente 3 vezes menor do que a média calculada para o controle positivo. A inibição calculada para o extrato aquoso da folha de *E. dysenterica* não apresentou diferença significativa à do controle. Os extratos aquosos das folhas de *P. torta* e *P. caimito* e os etanólicos da folha de *E. dysenterica* e da casca do caule de *S. adstringens* apresentaram inibição significativamente diferente da do controle. Foi observado também que essa diferença significativa está relacionada a potenciais de inibição menores ao do ácido kójico (Figura 10).

A atividade de inibição do extrato etanólico das folhas de *Morus nigra* sobre a tirosinase foi significativamente mais potente que a do controle ácido kójico, com valor de IC₅₀ igual a 4,38µg/mL. Pela curva dose-resposta pode ser observado que mesmo na concentração de 15µg/mL, o extrato de *M. nigra* continuou apresentando uma inibição maior que 90%. Um estudo demonstrou que o composto oxiresveratrol isolado da espécie *M. lba* exibiu valor de IC₅₀ igual a 0,29µg/mL, sendo sua atividade de inibição mais potente que a do ácido kójico (111).

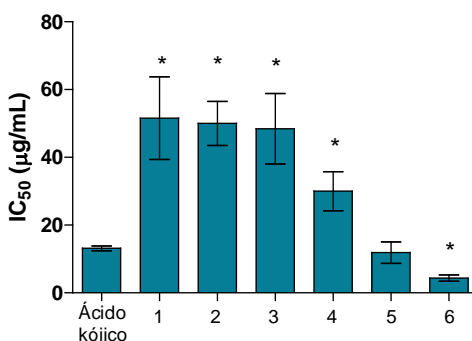


Figura 10. Valores de IC₅₀ sobre a tirosinase. Ácido kójico como controle positivo; (1) *E. dysenterica* F(e); (2) *P. caimito* F(a); (3) *S. Adstringens* CC(e); (4) *P. torta* F(a); (5) *E. dysenterica* F(a); (6) *M. Nigra* F(e).

O extrato aquoso das folhas de *E. dysenterica* apresentou um valor de IC₅₀ igual a 11,88µg/mL. Porém, o extrato etanólico exibiu uma menor força de inibição com IC₅₀ de 51,54µg/mL. O estudo fitoquímico com a espécie *E. dysenterica* revelou a presença do composto linalool no óleo essencial das folhas da planta (155). Esse terpeno apresentou uma atividade de inibição de 50,5% sobre a tirosinase (180).

Os outros extratos aquosos das folhas *P. torta* e *P. caimito*, e o extrato etanólico da casca do caule de *S. adstringens* também demonstraram um potencial de inibição menor que ao do ácido kójico, com valores de IC₅₀ iguais a 50,01, 30,01 e 48,4µg/mL, respectivamente.

Os extratos que exibiram o potencial de inibição muito menor que ao do ácido kójico foram os extratos hexânicos das folhas das espécies *H. speciosa* (129,1µg/mL) e *E. dysenterica* (151,37µg/mL), e os extratos etanólicos do fruto de *G. americana* (361,2µg/mL), das folhas de *P. ramiflora* (249,83µg/mL) e *P. torta* (258,53µg/mL), e da casca do fruto de *P. torta* (104,3µg/mL).

5.4 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE POR ESPÉCIES DO BIOMA CERRADO

A avaliação quantitativa da inibição da acetilcolinesterase foi realizada pelo método de Ellman. Este método é baseado na hidrólise da acetilcolina pela acetilcolinesterase, produzindo tiocolina que reage com o DTNB, originando o composto 5-tio-2-nitro-benzoato, que apresenta coloração amarela. As reações químicas envolvidas neste ensaio estão apresentadas na Figura 11.

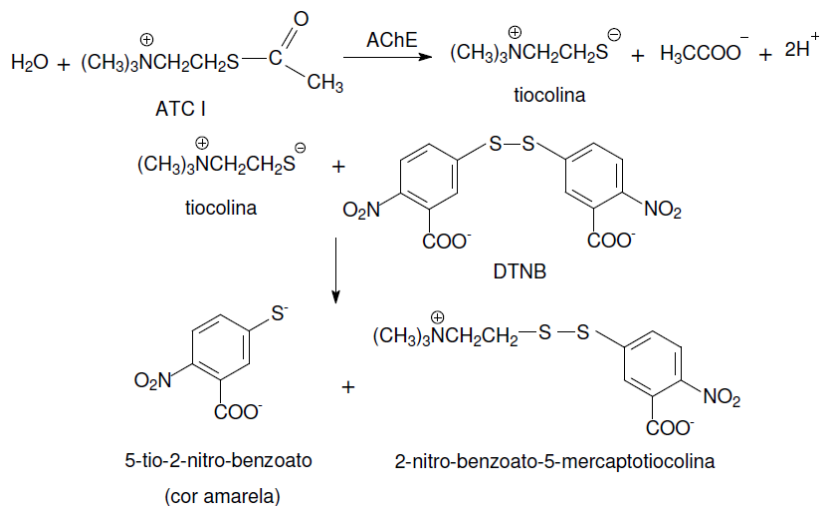


Figura 11. Reações envolvidas no método de Ellman (181).

Trinta e nove extratos diferentes, preparados de 12 plantas do Cerrado foram testados na atividade de inibição da acetilcolinesterase. Os dados mostraram que todos os extratos não foram capazes de influenciar na atividade enzimática da acetilcolinesterase de forma importante na concentração de 1mg/mL. Os valores de porcentagem de inibição ficaram menores que 30%, como mostra a Tabela 8.

Extratos vegetais que apresentam atividades de inibição maiores do que 50% são descritos como potentes inibidores da enzima acetilcolinesterase, e extratos com atividades de inibição entre 15 e 50% são descritos como de atividade baixa a moderada. Entretanto, atividades com inibição de até 15% são consideradas como resultados falso-positivos (36, 46, 116, 182).

Eserina (ou fisostigmina) é um inibidor reversível de curta-duração da atividade da acetilcolinesterase, utilizado como controle positivo nos ensaios de inibição da enzima. A eserina é um alcalóide indólico obtido da planta *Physostigma venenosum* (43). Uma curva dose-resposta foi construída com as concentrações de eserina entre 0,12 e 2000µg/mL, sendo obtido um intervalo de inibição entre 0-95%. Na concentração de 1mg/mL a eserina inibiu a atividade da enzima acetilcolinesterase em 94,66%, com valor de IC₅₀ igual a 4,40µg/mL.

Os extratos etanólicos e hexânicos das folhas de *Tabernaemontana solanifolia* apresentaram atividades de inibição baixa sobre a enzima acetilcolinesterase (13,09% e 15,06%, respectivamente). Entretanto, estudos relataram que as espécies *Tabernaemonta divaricata* e *Tabernaemontana australis*

são potentes inibidores da acetilcolinesterase. O extrato metanólico da raiz de *T. divaricata* apresentou uma inibição de 93,50% sobre a acetilcolinesterase, na concentração de 0,1 mg/mL (116). Alcalóides indólicos isolados do extrato clorofórmico do caule de *T. australis* exibiram uma inibição na mesma concentração que os compostos eserina e galantamina, utilizados como controle positivo (183).

Apesar de todas as espécies da Tabela 8 não apresentaram resultados de inibição sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase, não foi descartada a possibilidade de outros estudos com diferentes métodos para determinação da inibição dos extratos vegetais sobre a acetilcolinesterase.

Tabela 8 – Atividade de inibição dos extratos sobre a acetilcolinesterase (*Continua*)

Família Espécie	Parte usada (solvente)	% Inibição
Apocynaceae		
<i>Allamanda blanchetti</i> A.DC.	F(e)	12,48 ± 0,058
	F(h)	3,55 ± 0,131
	C(e)	16,08 ± 0,082
<i>Allamanda blanchetti</i>	Fr(e)	24,03 ± 0,030
	Fr(h)	NI
<i>Hancornia speciosa</i> Gomes	F(e)	18,97 ± 0,016
	F(h)	19,39 ± 0,072
<i>Tabernaemontana solanifolia</i> A.DC.	F(e)	13,09 ± 0,044
	F(h)	15,06 ± 0,076
Moraceae		
<i>Morus nigra</i> L.	F(a)	9,48 ± 0,071
	F(e)	20,01 ± 0,054
	F(h)	11,33 ± 0,249
Myrtaceae		
<i>Eugenia dysenterica</i> DC.	F(a)	NI
	F(e)	8,69 ± 0,154
	F(h)	NI
Leguminosae		
<i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville	CC(e)	19,62 ± 0,040
Lamiaceae		
<i>Plectranthus neochilus</i> Schltr.	F(a)	0,38 ± 0,062
	F(e)	15,69 ± 0,017
	F(h)	23,38 ± 0,232
Rubiaceae		
<i>Genipa americana</i> L. Var. <i>caruto</i> (H.B.K) K. Shum.	F(e)	0,73 ± 0,053
	F(h)	13,23 ± 0,037
	Fr(e)	16,37 ± 0,061
	Fr(h)	16,15 ± 0,040
	CF(e)	10,97 ± 0,023
Sapotaceae		
<i>Pouteria gardneri</i> (Mart. & Miq.) Baehni	F(e)	15,89 ± 0,034

(Conclusão)

Família Espécie	Parte usada (solvente)	% Inibição
<i>Pouteria gardneri</i> (Mart. & Miq.) Baehni	F(h)	13,45 ± 0,066
<i>Pouteria ramiflora</i> Radlk.	F(a)	11,72 ± 0,245
	F(e)	2,27 ± 0,046
	F(h)	16,21 ± 0,029
<i>Pouteria caimito</i> Radlk.	F(a)	NI
	F(e)	NI
	F(h)	2,27 ± 0,058
<i>Pouteria torta</i> Radlk.	F(a)	28,75 ± 0,063
	F(e)	19,73 ± 0,150
	F(h)	NI
	Fr(e)	NI
	CF(e)	NI
Caryocaraceae		
<i>Caryocar cf. villosum</i> (Aubl.) Pers.	Fr(e)	10,36 ± 0,081
Sapindaceae		
<i>Sapindus saponaria</i> L. variedade <i>inaequalis</i> (DC.) Radlk.	Fr(e)	32,04 ± 0,022
Eserina ^a		94,66 ± 0,005

¹F: Folha, ²C: Caule, ³Fr: Fruto, ⁴CC: Casca do caule, ⁵CF: Casca do fruto.

Solventes: h: hexano, e: etanol, a: água.

^aControle positivo. NI: não houve inibição enzimática.

6 CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou que espécies vegetais do bioma Cerrado podem ser consideradas promissoras fontes de compostos bioativos por apresentar potenciais efeitos sobre a atividade das enzimas α -amilase, α -glicosidase, tirosinase e acetilcolinesterase. Os extratos das espécies *S. adstringens*, *E. dysenterica* e as espécies do gênero *Pouteria* apresentaram potentes atividades de inibição sobre a α -amilase e α -glicosidase, enzimas envolvidas na doença diabetes. Os extratos das espécies *M. nigra* e *E. dysenterica* demonstraram uma significativa inibição sobre a atividade da tirosinase. Com relação à atividade da enzima acetilcolinesterase, nenhum extrato testado exibiu inibição relevante. Para as espécies *E. dysenterica*, *M. nigra* e as espécies do gênero *Pouteria*, até o presente momento, não foi encontrado na literatura relatos sobre a atividade de inibição das respectivas enzimas. Além disso, este trabalho comparou os fármacos utilizados na terapêutica com a atividade de extratos, os quais apresentaram potenciais de inibição maiores que os padrões testados.

O trabalho também contribuiu para o conhecimento das espécies presentes no bioma Cerrado. Muitas dessas espécies são árvores frutíferas, utilizadas na alimentação. A contribuição para a elaboração de alimentos funcionais não deve ser descartada.

Dessa forma, acredita-se que esses resultados demonstraram a importância da busca por substâncias ativas a partir de plantas para o tratamento de doenças como diabetes, mal de Alzheimer e doenças relacionadas a hiperpigmentação.

7 PERSPECTIVAS

Este estudo investigou o potencial de inibição sobre a atividade das enzimas α -amilase, α -glicosidase, tirosinase e acetilcolinesterase de algumas plantas do Cerrado. Alguns extratos mostraram significativas atividades de inibição sobre as enzimas. Portanto, os resultados mostrados nesse trabalho podem servir como base para o desenvolvimento de novos estudos com espécies de plantas do Cerrado.

Neste sentido, trabalhos ainda estão sendo realizados sobre a identificação de novos princípios ativos oriundos destas plantas do Cerrado, com atividade de inibição sobre a α -amilase e α -glicosidase, potencialmente úteis no controle da diabetes; sobre a tirosinase, como agente despigmentantes; e sobre a acetilcolinesterase, importante no tratamento da Doença de Alzheimer. O biomonitoramento das frações isoladas do extrato da espécie *Pouteria torta* está sendo feito sobre a atividade da enzima α -amilase, onde os resultados já mostram a identificação de alguns compostos ativos. Com relação à inibição sobre a tirosinase, o fracionamento de extrato etanólico da espécie *M. nigra* está sendo realizado. Apesar de nenhum extrato apresentar inibição sobre a acetilcolinesterase, existe ainda a possibilidade de uma nova avaliação utilizando outro método para a determinação da atividade de inibição dos extratos aqui estudados.

REFERÊNCIAS

1. Viegas Jr. C, Bolzani VS, Barreiro EJ. OS PRODUTOS NATURAIS E A QUÍMICA MEDICINAL MODERNA. *Química Nova*. 2006;29(2):326-37.
2. Veiga Jr VF, Pinto AC, Maciel MAM. Medicinal plants: safe cure? *Química Nova*. 2005;28(3):519-28.
3. Pupo MT, Gallo MBC, Vieira PC. Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. *Química Nova*. 2007;30(6):1446-55.
4. Calixto JB. Biodiversidade como fonte de medicamentos. *Ciência e Cultura*. 2003;55(3):37-9.
5. Foglio MA, Queiroga CL, Sousa IMO, Rodrigues RAF. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. *MultiCiência: Construindo a História dos Produtos Naturais*. 2006;7.
6. Ministério do Meio Ambiente SBF. Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros. *Biodiversidade Brasileira*. 2002.
7. Gavlik FI, Gomes PA. Decisões estratégicas: Medicamentos de referência x genéricos. *Revista Eletrônica Lato Sensu*. 2007;Ano 2(1):1-24.
8. 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 Oct 11;107(3):449-55.
9. Bhandari MR, Jong-Anurakkun N, Hong G, Kawabata J. α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activities of Nepalese medicinal herb Pakhanbhed (*Bergenia ciliata*, Haw.). *Food Chemistry*. 2008;106:247-52.
10. Cheng AY, Fantus IG. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Cmaj*. 2005 Jan 18;172(2):213-26.
11. Arkkila PE, Gautier JF. Musculoskeletal disorders in diabetes mellitus: an update. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2003 Dec;17(6):945-70.
12. Aguiar LG, Villela NR, Bouskela E. [Microcirculation in diabetes: implications for chronic complications and treatment of the disease]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2007 Mar;51(2):204-11.

13. Egede LE, Ellis C. Diabetes and depression: global perspectives. *Diabetes Res Clin Pract.* 2010 Mar;87(3):302-12.
14. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract.* 2010 Jan;87(1):4-14.
15. Zhang P, Zhang X, Brown J, Vistisen D, Sicree R, Shaw J, et al. Global healthcare expenditure on diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract.* 2010 Mar;87(3):293-301.
16. Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature.* 2001 Dec 13;414(6865):782-7.
17. Chakrabarti R, Rajagopalan R. Diabetes and insulin resistance associated disorders: Disease and the therapy. *Current Science.* 2002;83:1533-8.
18. Perfetti R, Barnett PS, Mathur R, Egan JM. Novel therapeutic strategies for the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Metab Rev.* 1998 Sep;14(3):207-25.
19. Inzucchi SE. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes: scientific review. *Jama.* 2002 Jan 16;287(3):360-72.
20. Goke B, Herrmann-Rinke C. The evolving role of alpha-glucosidase inhibitors. *Diabetes Metab Rev.* 1998 Sep;14 Suppl 1:S31-8.
21. Lebovitz HE. Alpha-Glucosidase inhibitors. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1997 Sep;26(3):539-51.
22. Petit L, Pierard GE. Skin-lightening products revisited. *Int J Cosmet Sci.* 2003 Aug;25(4):169-81.
23. Sampaio SAP, Castro RM, Rivitti EA. *Dermatologia Básica.* 3 ed. São Paulo: Artes Médicas; 1989.
24. Ortonne JP, Passeron T. Melanin pigmentary disorders: treatment update. *Dermatol Clin.* 2005 Apr;23(2):209-26.
25. Sanchez-Ferrer A, Rodriguez-Lopez JN, Garcia-Canovas F, Garcia-Carmona F. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochim Biophys Acta.* 1995 Feb 22;1247(1):1-11.
26. Passeron T, Mantoux F, Ortonne JP. Genetic disorders of pigmentation. *Clin Dermatol.* 2005 Jan-Feb;23(1):56-67.
27. Kim JW, Kim SU, Lee HS, Kim I, Ahn MY, Ryu KS. Determination of 1-deoxynojirimycin in *Morus alba* L. leaves by derivatization with 9-fluorenylmethyl

chloroformate followed by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2003 Jun 20;1002(1-2):93-9.

28. Parvez S, Kang M, Chung HS, Bae H. Naturally occurring tyrosinase inhibitors: mechanism and applications in skin health, cosmetics and agriculture industries. *Phytother Res*. 2007 Sep;21(9):805-16.

29. Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature*. 2007 Feb 22;445(7130):843-50.

30. Nicoletti MA, Orsine EMA, Duarte ACN, Bueno GA. Hiperpigmentação: Aspectos Gerais e Uso de Despigmentantes Cutâneos. *Cosmetics e Toiletries*. 2002;14:46-51.

31. Kim YJ, Uyama H. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell Mol Life Sci*. 2005 Aug;62(15):1707-23.

32. Macrini DJ. Avaliação de extratos de plantas da região amazônica quanto a atividade inibitória da tirosinase [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo - USP; 2004.

33. Karioti A, Protopappa A, Megoulas N, Skaltsa H. Identification of tyrosinase inhibitors from *Marrubium velutinum* and *Marrubium cylleneum*. *Bioorg Med Chem*. 2007 Apr 1;15(7):2708-14.

34. Picardo M, Carrera M. New and experimental treatments of cloasma and other hypermelanoses. *Dermatol Clin*. 2007 Jul;25(3):353-62, ix.

35. Takizawa T, Mitsumori K, Tamura T, Nasu M, Ueda M, Imai T, et al. Hepatocellular tumor induction in heterozygous p53-deficient CBA mice by a 26-week dietary administration of kojic acid. *Toxicol Sci*. 2003 Jun;73(2):287-93.

36. Orhan I, Sener B, Choudhary MI, Khalid A. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 2004 Mar;91(1):57-60.

37. Heinrich M, Lee Teoh H. Galanthamine from snowdrop--the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. *J Ethnopharmacol*. 2004 Jun;92(2-3):147-62.

38. Silvestrelli G, Lanari A, Parnetti L, Tomassoni D, Amenta F. Treatment of Alzheimer's disease: from pharmacology to a better understanding of disease pathophysiology. *Mech Ageing Dev*. 2006 Feb;127(2):148-57.

39. Jung M, Park M. Acetylcholinesterase inhibition by flavonoids from *Agrimonia pilosa*. *Molecules*. 2007;12(9):2130-9.

40. Small G, Bullock R. Defining optimal treatment with cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2010 Nov 3:1-8.
41. Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K, Arrighi HM. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2007 Jul;3(3):186-91.
42. Viegas Jr. C, Bolzani VS, Furlan M. PRODUTOS NATURAIS COMO CANDIDATOS A FÁRMACOS ÚTEIS NO TRATAMENTO DO MAL DE ALZHEIMER. *Química Nova*. 2004;27(4):655-60.
43. Mukherjee PK, Kumar V, Houghton PJ. Screening of Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Phytother Res*. 2007 Dec;21(12):1142-5.
44. Selkoe DJ. Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies. *Ann Intern Med*. 2004 Apr 20;140(8):627-38.
45. Kim J, Lee HJ, Lee KW. Naturally occurring phytochemicals for the prevention of Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2010 Mar;112(6):1415-30.
46. Adersen A, Gauguin B, Gudixsen L, Jager AK. Screening of plants used in Danish folk medicine to treat memory dysfunction for acetylcholinesterase inhibitory activity. *J Ethnopharmacol*. 2006 Apr 6;104(3):418-22.
47. Cummings JL. Alzheimer's Disease. *The New England Journal of Medicine*. 2004;351:56-67.
48. Whitcomb DC, Lowe ME. Human pancreatic digestive enzymes. *Dig Dis Sci*. 2007 Jan;52(1):1-17.
49. Kandra L. α -Amylases of medical and industrial importance. *Journal of Molecular Structure (Theochem)*. 2003;666-667:487-98.
50. Iulek J, Franco OL, Silva M, Slivinski CT, Bloch C, Jr., Rigden DJ, et al. Purification, biochemical characterisation and partial primary structure of a new alpha-amylase inhibitor from *Secale cereale* (rye). *Int J Biochem Cell Biol*. 2000 Nov-Dec;32(11-12):1195-204.
51. Tangphatsornruang S, Naconsie M, Thammarongtham C, Narangajavana J. Isolation and characterization of an alpha-amylase gene in cassava (*Manihot esculenta*). *Plant Physiol Biochem*. 2005 Sep;43(9):821-7.
52. Brayer GD, Luo Y, Withers SG. The structure of human pancreatic alpha-amylase at 1.8 Å resolution and comparisons with related enzymes. *Protein Sci*. 1995 Sep;4(9):1730-42.

53. van der Maarel MJ, van der Veen B, Uitdehaag JC, Leemhuis H, Dijkhuizen L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family. *J Biotechnol.* 2002 Mar 28;94(2):137-55.
54. Muralikrishna G, Nirmala M. Cereal α -amylases – an overview. *Carbohydrate Polymers.* 2005;60:163-73.
55. Sorensen JF, Kragh KM, Sibbesen O, Delcour J, Goesaert H, Svensson B, et al. Potential role of glycosidase inhibitors in industrial biotechnological applications. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Feb 12;1696(2):275-87.
56. Payan F. Structural basis for the inhibition of mammalian and insect alpha-amylases by plant protein inhibitors. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Feb 12;1696(2):171-80.
57. Ota M, Okamoto T, Hoshino W, Wakabayashi H. Action of α -D-glucosidase from *Aspergillus niger* towards dextrin and starch. *Carbohydrate Polymers.* 2009;78:287–91.
58. Melo EB, Gomes AS, Carvalho I. α - and β -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. *Tetrahedron.* 2006;62:10277–302.
59. Chiba S. Molecular mechanism in alpha-glucosidase and glucoamylase. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1997 Aug;61(8):1233-9.
60. Ganem B. Inhibitors of Carbohydrate-Processing Enzymes: Design and Synthesis of Sugar-Shaped Heterocycles. *Acc Chem Res.* 1996;29:340-7.
61. Lee DS, Lee SH. Genistein, a soy isoflavone, is a potent alpha-glucosidase inhibitor. *FEBS Lett.* 2001 Jul 13;501(1):84-6.
62. Shinde J, Taldone T, Barletta M, Kunaparaju N, Hu B, Kumar S, et al. Alpha-glucosidase inhibitory activity of *Syzygium cumini* (Linn.) Skeels seed kernel in vitro and in Goto-Kakizaki (GK) rats. *Carbohydr Res.* 2008 May 19;343(7):1278-81.
63. Ernst HA, Lo Leggio L, Willemoes M, Leonard G, Blum P, Larsen S. Structure of the *Sulfolobus solfataricus* alpha-glucosidase: implications for domain conservation and substrate recognition in GH31. *J Mol Biol.* 2006 May 12;358(4):1106-24.
64. Sim L, Quezada-Calvillo R, Sterchi EE, Nichols BL, Rose DR. Human intestinal maltase-glucoamylase: crystal structure of the N-terminal catalytic subunit and basis of inhibition and substrate specificity. *J Mol Biol.* 2008 Jan 18;375(3):782-92.

65. Hakamata W, Kurihara M, Okuda H, Nishio T, Oku T. Design and Screening Strategies for α -Glucosidase Inhibitors Based on Enzymological Information. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2009;9:3-12.
66. Falguera V, Ibarz JPA. A kinetic model describing melanin formation by means of mushroom tyrosinase. *Food Research International*. 2010;43:66–9.
67. Faria RO, Moure VR, Amazonas MALA, Krieger N, Mitchell DA. The Biotechnological Potential of Mushroom Tyrosinases. *Food Technol Biotechnol*. 2007;45(3):287–94.
68. Durán N, Rosa MA, D'Annibale A, Gianfreda L. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme and Microbial Technology*. 2002;31:907–31.
69. Lin J, Chiang H, Lin Y, Wen K. Natural Products with Skin – Whitening Effects. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2008;16(2):1-10.
70. Halaouli S, Asther M, Kruus K, Guo L, Hamdi M, Sigoillot JC, et al. Characterization of a new tyrosinase from *Pycnoporus* species with high potential for food technological applications. *J Appl Microbiol*. 2005;98(2):332-43.
71. Loo AE, Huang D. Assay-guided fractionation study of alpha-amylase inhibitors from *Garcinia mangostana* pericarp. *J Agric Food Chem*. 2007 Nov 28;55(24):9805-10.
72. Khan SB, Azhar UI H, Afza N, Malik A, Khan MT, Shah MR, et al. Tyrosinase-inhibitory long-chain esters from *Amberboa ramosa*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2005 Jan;53(1):86-9.
73. Jimenez M, Chazarra S, Escribano J, Cabanes J, Garcia-Carmona F. Competitive inhibition of mushroom tyrosinase by 4-substituted benzaldehydes. *J Agric Food Chem*. 2001 Aug;49(8):4060-3.
74. Shimizu K, Yasutake S, Kondo R. A new stilbene with tyrosinase inhibitory activity from *Chlorophora excelsa*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2003 Mar;51(3):318-9.
75. Asanuma M, Miyazaki I, Ogawa N. Dopamine- or L-DOPA-induced neurotoxicity: the role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease. *Neurotox Res*. 2003;5(3):165-76.
76. Fenoll LG, Penalver MJ, Rodriguez-Lopez JN, Varon R, Garcia-Canovas F, Tudela J. Tyrosinase kinetics: discrimination between two models to explain the oxidation mechanism of monophenol and diphenol substrates. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Feb;36(2):235-46.

77. Grisaru D, Sternfeld M, Eldor A, Glick D, Soreq H. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *Eur J Biochem.* 1999 Sep;264(3):672-86.
78. Jin Z, Yang L, Liu SJ, Wang J, Li S, Lin HQ, et al. Synthesis and biological evaluation of 3,6-diaryl-7H-thiazolo[3,2-b] [1,2,4]triazin-7-one derivatives as acetylcholinesterase inhibitors. *Arch Pharm Res.* 2010 Oct;33(10):1641-9.
79. Sussman JL, Harel M, Frolow F, Oefner C, Goldman A, Toker L, et al. Atomic Structure of Acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: A Prototypic Acetylcholine-Binding Protein. *Science.* 1991;253:872-9.
80. Silman I, Sussman JL. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. *Current Opinion in Pharmacology.* 2005;5:293-302.
81. Jin B, van Leeuwen HJ, Patel B, Yu Q. Utilisation of starch processing wastewater for production of microbial biomass protein and fungal α -amylase by *Aspergillus oryzae*. *Bioresource Technology.* 1998;66:201-6.
82. Rang H, Dale M, Ritter J, Moore P. *Farmacologia.* 5 ed.: Elsevier; 2004.
83. Descarries L, Gisiger V, Steriade M. Diffuse transmission by acetylcholine in the CNS. *Prog Neurobiol.* 1997 Dec;53(5):603-25.
84. Eldeen IM, Elgorashi EE, van Staden J. Antibacterial, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and mutagenic effects of extracts obtained from some trees used in South African traditional medicine. *J Ethnopharmacol.* 2005 Dec 1;102(3):457-64.
85. Gomes AM, Koszuoski R. Evidências atuais do impacto terapêutico dos inibidores da acetilcolinesterase no transtorno cognitivo leve e na demência vascular. *Rev Psiquiatr RS.* 2005;27(2):197-205.
86. Kluh I, Horn M, Hyblova J, Hubert J, Doleckova-Maresova L, Voburka Z, et al. Inhibitory specificity and insecticidal selectivity of alpha-amylase inhibitor from *Phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry.* 2005 Jan;66(1):31-9.
87. Santimone M, Koukiekolo R, Moreau Y, Le Berre V, Rouge P, Marchis-Mouren G, et al. Porcine pancreatic alpha-amylase inhibition by the kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) inhibitor (alpha-AI1) and structural changes in the alpha-amylase inhibitor complex. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Feb 12;1696(2):181-90.
88. Marshall JJ, Lauda CM. Purification and properties of phaseolamin, an inhibitor of alpha-amylase, from the kidney bean, *Phaseolus vulgaris*. *J Biol Chem.* 1975 Oct 25;250(20):8030-7.
89. Mosca M, Boniglia C, Carratu B, Giammarioli S, Nera V, Sanzini E. Determination of alpha-amylase inhibitor activity of phaseolamin from kidney bean

(Phaseolus vulgaris) in dietary supplements by HPAEC-PAD. Anal Chim Acta. 2008 Jun 9;617(1-2):192-5.

90. Conforti F, Statti G, Loizzo MR, Sacchetti G, Poli F, Menichini F. In Vitro antioxidant effect and inhibition of alpha-amylase of two varieties of *Amaranthus caudatus* seeds. Biol Pharm Bull. 2005 Jun;28(6):1098-102.

91. Kumar BSA, Lakshman K, Nandeesh R, Kumar PAA, Manoj B, Kumar V, et al. *In vitro* alpha-amylase inhibition and *in vivo* antioxidant potential of *Amaranthus spinosus* in alloxan-induced oxidative stress in diabetic rats. Saudi Journal of Biological Sciences. 2011;18:1-5.

92. Gyemant G, Kandra L, Nagy V, Somsak L. Inhibition of human salivary alpha-amylase by glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin. Biochem Biophys Res Commun. 2003 Dec 12;312(2):334-9.

93. Kobayashi K, Baba E, Fushiya S, Takano F, Batkhuu J, Dash T, et al. Screening of Mongolian plants for influence on amylase activity in mouse plasma and gastrointestinal tube. Biol Pharm Bull. 2003 Jul;26(7):1045-8.

94. McCue PP, Shetty K. Inhibitory effects of rosmarinic acid extracts on porcine pancreatic amylase in vitro. Asia Pac J Clin Nutr. 2004;13(1):101-6.

95. Loizzo MR, Saab AM, Tundis R, Menichini F, Bonesi M, Piccolo V, et al. In vitro inhibitory activities of plants used in Lebanon traditional medicine against angiotensin converting enzyme (ACE) and digestive enzymes related to diabetes. J Ethnopharmacol. 2008 Sep 2;119(1):109-16.

96. Nickavar B, Abolhasani L, Izadpanah H. α -Amylase Inhibitory Activities of Six *Salvia* Species. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 2008;7(4):297-303.

97. Kumar A, Ilavarasan R, Jayachandran T, Deecaraman M, Aravindan P, Padmanabhan N, et al. Anti-diabetic activity of *Syzygium cumini* and its isolated compound against streptozotocin-induced diabetic rats. Journal of Medicinal Plants Research. 2008;2(9):246-9.

98. Karthic K, Kirthiram KS, Sadasivam S, Thayumanavan B. Identification of alpha amylase inhibitors from *Syzygium cumini* Linn seeds. Indian J Exp Biol. 2008 Sep;46(9):677-80.

99. Lo Piparo E, Scheib H, Frei N, Williamson G, Grigorov M, Chou CJ. Flavonoids for Controlling Starch Digestion: Structural Requirements for Inhibiting Human α -Amylase. Journal of Medicinal Chemistry 2008;51:3555-61.

100. Tadera K, Minami Y, Takamatsu K, Matsuoka T. Inhibition of alpha-glucosidase and alpha-amylase by flavonoids. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 2006 Apr;52(2):149-53.

101. Kim JS, Kwon CS, Son KH. Inhibition of alpha-glucosidase and amylase by luteolin, a flavonoid. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2000 Nov;64(11):2458-61.
102. Silva EM, Valencia A, Grossi-de-Sá MF, Rocha TL, Freire É, Paula JEd, et al. Inhibitory action of Cerrado plants against mammalian and insect α -amylases. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2009;95:141–6.
103. Melo EB, Carvalho I. α e β -glucosidases como alvos moleculares para desenvolvimento de fármacos. *Química Nova*. 2006;29(4):840-3.
104. Fukaya N, Mochizuki K, Shimada M, Goda T. The alpha-glucosidase inhibitor miglitol decreases glucose fluctuations and gene expression of inflammatory cytokines induced by hyperglycemia in peripheral leukocytes. *Nutrition*. 2009 Jun;25(6):657-67.
105. Rodríguez-Sánchez S, Hernández-Hernández O, Ruiz-Matute AI, Sanz ML. A derivatization procedure for the simultaneous analysis of iminosugars and other low molecular weight carbohydrates by GC–MS in mulberry (*Morus* sp.). *Food Chemistry*. 2011;123:353–9.
106. Asano N. Glycosidase inhibitors: update and perspectives on practical use. *Glycobiology*. 2003 Oct;13(10):93R-104R.
107. Jung M, Park M, Lee HC, Kang Y-H, Kang ES, Kim SK. Antidiabetic Agents from Medicinal Plants. *Current Medicinal Chemistry*. 2006;13:1203-18.
108. Arai I, Amagaya S, Komatsu Y, Okada M, Hayashi T, Kasai M, et al. Improving effects of the extracts from *Eugenia uniflora* on hyperglycemia and hypertriglyceridemia in mice. *J Ethnopharmacol*. 1999 Dec 15;68(1-3):307-14.
109. Kubo I, Kinst-Hori I, Chaudhuri SK, Kubo Y, Sanchez Y, Ogura T. Flavonols from *Heterotheca inuloides*: tyrosinase inhibitory activity and structural criteria. *Bioorg Med Chem*. 2000 Jul;8(7):1749-55.
110. Kubo I, Kinst-Hori I. Flavonols from saffron flower: tyrosinase inhibitory activity and inhibition mechanism. *J Agric Food Chem*. 1999 Oct;47(10):4121-5.
111. Kim YM, Yun J, Lee CK, Lee H, Min KR, Kim Y. Oxyresveratrol and hydroxystilbene compounds. Inhibitory effect on tyrosinase and mechanism of action. *J Biol Chem*. 2002 May 3;277(18):16340-4.
112. No JK, Soung DY, Kim YJ, Shim KH, Jun YS, Rhee SH, et al. Inhibition of tyrosinase by green tea components. *Life Sci*. 1999;65(21):PL241-6.
113. Kubo I, Chen Q-X, Nihei K-i. Molecular design of antibrowning agents: antioxidative tyrosinase inhibitors. *Food Chemistry*. 2003;81:241–7.

114. Choi S, Lee SK, Kim JE, Chung MH, Park YI. Aloesin inhibits hyperpigmentation induced by UV radiation. *Clin Exp Dermatol*. 2002 Sep;27(6):513-5.
115. Lukas B, Schmiderer C, Mitteregger U, Novak J. Arbutin in marjoram and oregano. *Food Chemistry*. 2010;121(1):185-90.
116. Ingkaninan K, Temkitthawon P, Chuenchom K, Yuyaem T, Thongnoi W. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. *J Ethnopharmacol*. 2003 Dec;89(2-3):261-4.
117. Mukherjee PK, Kumar V, Mal M, Houghton PJ. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*. 2007 Apr;14(4):289-300.
118. Howes MJ, Houghton PJ. Plants used in Chinese and Indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function. *Pharmacol Biochem Behav*. 2003 Jun;75(3):513-27.
119. Lopez S, Bastida J, Viladomat F, Codina C. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and Narcissus extracts. *Life Sci*. 2002 Oct 11;71(21):2521-9.
120. Vieira IJ, Medeiros WL, Monnerat CS, Souza JJ, Mathias L, Braz-Filho R, et al. Two fast screening methods (GC-MS and TLC-ChEI assay) for rapid evaluation of potential anticholinesterasic indole alkaloids in complex mixtures. *An Acad Bras Cienc*. 2008 Sep;80(3):419-26.
121. Filho JMB, Medeiros KCP, Diniz MdFFM, Batista LM, Athayde-Filho PF, Silva MS, et al. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2006;16(2):258-85.
122. Cardoso-Lopes EM, Maier JA, da Silva MR, Regasini LO, Simote SY, Lopes NP, et al. Alkaloids from stems of *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Rutaceae) as potential treatment for Alzheimer disease. *Molecules*. 2010;15(12):9205-13.
123. Machado RB, Neto MBR, Pereira PGP, Caldas EF, Gonçalves DA, Santos NS, et al. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. *Relatório Conservação Internacional*. 2004:1-23.
124. Caramori SS, Lima SC, Fernandes KF. Biochemical characterization of selected plant species from Brazilian Savannas. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2004;47:253-9.
125. Klink CA, Machado RB. A conservação do Cerrado brasileiro. *Megadiversidade*. 2005;1(147-155).

126. Alves TM, Silva AF, Brandao M, Grandi TS, Smania E, Smania Junior A, et al. Biological screening of Brazilian medicinal plants. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000 May-Jun;95(3):367-73.
127. Albernaz LC, de Paula JE, Romero GA, Silva Mdo R, Grellier P, Mambu L, et al. Investigation of plant extracts in traditional medicine of the Brazilian Cerrado against protozoans and yeasts. J Ethnopharmacol. 2010 Aug 19;131(1):116-21.
128. Hiruma-Lima CA, Santos LC, Kushima H, Pellizzon CH, Silveira GG, Vasconcelos PC, et al. *Qualea grandiflora*, a Brazilian "Cerrado" medicinal plant presents an important antiulcer activity. J Ethnopharmacol. 2006 Mar 8;104(1-2):207-14.
129. Gaspi FO, Foglio MA, Carvalho JE, Moreno RA. Pharmacological activities investigation of crude extracts and fractions from *Qualea grandiflora* Mart. J Ethnopharmacol. 2006 Aug 11;107(1):19-24.
130. Napolitano DR, Mineo JR, de Souza MA, de 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 May 13;99(1):37-41.
131. Barros IMC. Contribuição ao estudo químico e biológico de *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae) [Dissertação]. Brasília-DF: Universidade de Brasília-UnB; 2008.
132. Boleti AP, Freire MG, Coelho MB, Silva W, Baldasso PA, Gomes VM, et al. Insecticidal and antifungal activity of a protein from *Pouteria torta* seeds with lectin-like properties. J Agric Food Chem. 2007 Apr 4;55(7):2653-8.
133. Perfeito JP, Santos ML, López KSE, Paula JE, Silveira D. Characterization and biological properties of *Pouteria torta* extracts: a preliminary study. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2005;15(3):183-6.
134. Silva CAM, Simeoni LA, Silveira D. Genus *Pouteria*: Chemistry and biological activity. Brazilian Journal of Pharmacognosy. 2009;19:501-9.
135. Mesquita ML, Desrivot J, Bories C, Fournet A, Paula JE, Grellier P, et al. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005 Nov;100(7):783-7.
136. Cole RA, Haber WA, Setzer WN. Chemical composition of essential oils of seven species of *Eugenia* from Monteverde, Costa Rica. Biochemical Systematics and Ecology. 2007;35:877-86.

137. de Souza GC, Haas AP, von Poser GL, Schapoval EE, Elisabetsky E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *J Ethnopharmacol.* 2004 Jan;90(1):135-43.
138. Rebecca MA, Ishii-Iwamoto EL, Grespan R, Cuman RKN, Caparroz-Assef SM, De Mello JCP, et al. Toxicological studies on *Stryphnodendron adstringens*. *Journal of Ethnopharmacology.* 2002;83:101-4.
139. Santos SC, Costa WF, Ribeiro JP, Guimaraes DO, Ferri PH, Ferreira HD, et al. Tannin composition of barbatimao species. *Fitoterapia.* 2002 Jul;73(4):292-9.
140. Pepato MT, Keller EH, Baviera AM, Kettelhut IC, Vendramini RC, Brunetti IL. Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats. *J Ethnopharmacol.* 2002 Jul;81(2):191-7.
141. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry.* 1959;31(3):426-8.
142. Silva RN, Monteiro VN, Alcanfor JDX. Comparação de métodos para determinação de açúcares redutores e totais em mel. *Ciência Tecnol Aliment.* 2003;23(3):337-41.
143. Bernfeld P. Amylases, α and β . *Methods in Enzymology.* 1955;1:149-58.
144. Chapdelaine P, Tremblay RR, Dube JY. P-Nitrophenol-alpha-D-glucopyranoside as substrate for measurement of maltase activity in human semen. *Clin Chem.* 1978 Feb;24(2):208-11.
145. Khatib S, Nerya O, Musa R, Shmuel M, Tamir S, Vaya J. Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: the importance of a 2,4-substituted resorcinol moiety. *Bioorg Med Chem.* 2005 Jan 17;13(2):433-41.
146. Rhee IK, van de Meent M, Ingkaninan K, Verpoorte R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *J Chromatogr A.* 2001 Apr 27;915(1-2):217-23.
147. Zajacz A, Gyemant G, Vittori N, Kandra L. Aleppo tannin: structural analysis and salivary amylase inhibition. *Carbohydr Res.* 2007 Apr 9;342(5):717-23.
148. McDougall GJ, Stewart D. The inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes. *Biofactors.* 2005;23(4):189-95.
149. Moraes M, Rodrigues CM, Kushima H, Bauab TM, Villegas W, Pellizzon CH, et al. *Hancornia speciosa*: indications of gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* actions. *J Ethnopharmacol.* 2008 Nov 20;120(2):161-8.

150. Ferreira HC, Serra CP, Endringer DC, Lemos VS, Braga FC, Cortes SF. Endothelium-dependent vasodilation induced by *Hancornia speciosa* in rat superior mesenteric artery. *Phytomedicine*. 2007 Aug;14(7-8):473-8.
151. Funke I, Melzig MF. Traditionally used in diabetes therapy – phytotherapeutics as inhibitors of α -amylase activity. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2006;16:1-5.
152. Kandra L, Gyemant G, Zajacz A, Batta G. Inhibitory effects of tannin on human salivary alpha-amylase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Jul 9;319(4):1265-71.
153. Kwon YI, Vatter DA, Shetty K. Evaluation of clonal herbs of Lamiaceae species for management of diabetes and hypertension. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2006;15(1):107-18.
154. Rohn S, Rawel HM, Kroll J. Inhibitory effects of plant phenols on the activity of selected enzymes. *J Agric Food Chem*. 2002 Jun 5;50(12):3566-71.
155. Costa TR, Fernandes OF, Santos SC, Oliveira CM, Liao LM, Ferri PH, et al. Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. *J Ethnopharmacol*. 2000 Sep;72(1-2):111-7.
156. Bezerra JC, Silva IA, Ferreira HD, Ferri PH, Santos SC. Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian Cerrado medicinal plants. *Fitoterapia*. 2002 Aug;73(5):428-30.
157. Macedo FM, Martins GT, Mendes CSO, Silva CM, E RCG, Oliveira DA. Determinação de compostos fenólicos totais em Barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart) Coville]. *Revista Brasileira de Biociências*. 2007;5:1164-5.
158. Kwon YI, Apostolidis E, Kim YC, Shetty K. Health benefits of traditional corn, beans, and pumpkin: in vitro studies for hyperglycemia and hypertension management. *J Med Food*. 2007 Jun;10(2):266-75.
159. Apostolidis E, Kwon YI, Shetty K. Inhibitory potential of herb, fruit, and fungal-enriched cheese against key enzymes linked to type 2 diabetes and hypertension. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2007;8:46-54.
160. Ogunwande IA, Olawore NO, Ekundayo O, Walker TM, Schmidt JM, Setzer WN. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. *The International Journal of Aromatherapy*. 2005;15:147–52.
161. Gunawan-Puteri MDPT, Kawabata J. Novel α -glucosidase inhibitors from *Macaranga tanarius* leaves. *Food Chemistry*. 2010;123:384–9.
162. Gao H, Huang Y-N, Xu P-Y, Kawabata J. Inhibitory effect on α -glucosidase by the fruits of *Terminalia chebula* Retz. *Food Chemistry*. 2007;105:628–34.

163. Maa C-M, Sato N, Li X-Y, Nakamura N, Hattori M. Flavan-3-ol contents, anti-oxidative and α -glucosidase inhibitory activities of *Cynomorium songaricum*. Food Chemistry. 2010;118:116–9
164. Lee SH, Park MH, Heo SJ, Kang SM, Ko SC, Han JS, et al. Dieckol isolated from *Ecklonia cava* inhibits α -glucosidase and α -amylase in vitro and alleviates postprandial hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. Food Chem Toxicol. 2010 Oct;48(10):2633-7.
165. Ali MS, Jahangir M, Hussan SS, Choudhary MI. Inhibition of α -glucosidase by oleanolic acid and its synthetic derivatives. Phytochemistry. 2002 Jun;60(3):295-9.
166. Jong-Anurakkun N, Bhandari MR, Kawabata J. α -Glucosidase inhibitors from Devil tree (*Alstonia scholaris*). Food Chemistry. 2007;103:1319–23.
167. Butt MS, Nazir A, Sultan MT, Schroen K. *Morus alba* L. nature's functional tonic. Trends in Food Science & Technology. 2008;19:505-12.
168. Hughes AB, Rudge AJ. Deoxynojirimycin: synthesis and biological activity. Nat Prod Rep. 1994 Apr;11(2):135-62.
169. Espin JC, Morales M, Varon R, Tudela J, Garcia-Canovas F. A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase. Anal Biochem. 1995 Oct 10;231(1):237-46.
170. Baurin N, Arnoult E, Scior T, Do QT, Bernard P. Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. J Ethnopharmacol. 2002 Oct;82(2-3):155-8.
171. Momtaz S, Mapunya BM, Houghton PJ, Edgerly C, Hussein A, Naidoo S, et al. Tyrosinase inhibition by extracts and constituents of *Sideroxylon inerme* L. stem bark, used in South Africa for skin lightening. J Ethnopharmacol. 2008 Oct 28;119(3):507-12.
172. Wanga H, Chou Y, Hong Z, Chen H, Chang Y, Yang W, et al. Bioconstituents from stems of *Synsepalum dulcificum* Daniell (Sapotaceae) inhibit human melanoma proliferation, reduce mushroom tyrosinase activity and have antioxidant properties. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers. 2010.
173. Aramwit P, Bang N, Srichana T. The properties and stability of anthocyanins in mulberry fruits. Food Research International. 2010;43:1093–7.
174. Xie LP, Chen QX, Huang H, Wang HZ, Zhang RQ. Inhibitory effects of some flavonoids on the activity of mushroom tyrosinase. Biochemistry (Mosc). 2003 Apr;68(4):487-91.

175. Kim JW, Lee JH, Hwang BY, Mun SH, Ko NY, Kim do K, et al. Morin inhibits Fyn kinase in mast cells and IgE-mediated type I hypersensitivity response in vivo. *Biochem Pharmacol.* 2009 May 1;77(9):1506-12.
176. Suhartati T, S YA, Hadi S, S JF. Morusin, a Bioactive Compound from the Root Bark of *Artocarpus dadah*. *European Journal of Scientific Research.* 2009;38(4):643-8.
177. Lee KT, Kim BJ, Kim JH, Heo MY, Kim HP. Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (I): inhibitory activities of tyrosinase and DOPA auto-oxidation. *Int J Cosmet Sci.* 1997 Dec;19(6):291-8.
178. Okunji C, Komarnytsky S, Fear G, Poulev A, Ribnicky DM, Awachie PI, et al. Preparative isolation and identification of tyrosinase inhibitors from the seeds of *Garcinia kola* by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A.* 2007 Jun 1;1151(1-2):45-50.
179. Cabanes J, Chazarra S, Garcia-Carmona F. Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *J Pharm Pharmacol.* 1994 Dec;46(12):982-5.
180. Nakatsu T, Lupo AT, Chinn JW, Kang RKL. Biological activity of essential oils and their constituents. *Studies in Natural Products Chemistry.* 2000;21:571-631.
181. Silva MSS. Alcalóides de Plantas da Família Amaryllidaceae: Isolamento Caracterização e Testes de Inibição de Acetilcolinesterase. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2009.
182. Trevisan MTS, Macedo FVV. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. *Química Nova.* 2003;26(3):301-4.
183. Andrade MT, Lima JA, Pinto AC, Rezende CM, Carvalho MP, Epifanio RA. Indole alkaloids from *Tabernaemontana australis* (Muell. Arg) Miers that inhibit acetylcholinesterase enzyme. *Bioorg Med Chem.* 2005 Jun 2;13(12):4092-5.