

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

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIDIABÉTICO DA CASCA DO CAULE
DE *Byrsonima garcibarrigae* CUATREC. (MALPIGHIACEAE)

Bolsista: Tallita Marques Machado, FAPEAM

MANAUS

2013

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

RELATÓRIO FINAL

PIB – S/0002/2012

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIDIABÉTICO DA CASCA DO CAULE
DE *Byrsonima garcibarrigae* CUATREC. (MALPIGHIACEAE)

Bolsista: Tallita Marques Machado, FAPEAM
Orientador: Prof^a MSc Fernanda Guilhon Simplicio

MANAUS

2013

RESUMO

Byrsonima garcibarrigae é uma espécie arbórea com prevalência no estado do Amazonas, tendo potencial farmacológico e constituição química ainda muito pouco conhecidos. Nessa direção, este projeto propôs avaliar o potencial antidiabético de extratos, frações e/ou substâncias obtidas da casca do caule da *B. garcibarrigae* Cuatrec., visando identificar possíveis marcadores fitoquímicos para seu potencial antidiabético. As cascas do caule foram secas em estufa de ar circulante a 45°C, moídas em moinho de facas e em seguida realizou-se a prospecção dos metabólitos presentes. Posteriormente, foram extraídas por maceração em ultrassom com os solventes hexano, acetato de etila e metanol, sequencialmente. A partir dos extratos secos fez-se o teste de inibição da α -glucosidase obtida da cepa *Saccharomyces cerevisiae* (EC.3.2.1.20) em uma microplaca de 96 poços. O sistema contendo os extratos na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ e a enzima foram incubados a 37°C por 30 minutos em pH 6,8. O teste de inibição da lipase foi feito utilizando a lipase pancreática (Sigma L3126), onde o sistema contendo as amostras, enzima, solução *p*-nitrofenil foram incubados a temperatura de 37°C por 20 minutos em pH 8,5. Nos dois testes, a quercetina foi utilizada como controle positivo e a concentração inibitória a 50% (CI₅₀) foi calculada por meio do programa Origin®. A CI₅₀ ($X \pm s$ $\mu\text{g/mL}$) sobre a α -glucosidase dos extratos hexano, acetato de etila e metanol foi de $3,53 \pm 0,80$, $3,21 \pm 2,05$ e $1,09 \pm 0,32$, respectivamente. A quercetina apresentou o CI₅₀ de $2,89 \pm 0,18$. Todos os extratos de *B. garcibarrigae* inibiram de modo significativo a enzima α -glucosidase, entretanto, o extrato metanol foi o que apresentou menor CI₅₀, sendo este particionado originando as fases hexano, clorofórmio e o remanescente, fase hidrometanólica. Esta por apresentar maior rendimento, 25,1388 g, e menor CI₅₀ sobre a α -glucosidase, $1,02 \pm 0,49$, foi fracionada em coluna cromatográfica de poliamida eluída exaustivamente com metanol. As frações foram avaliadas quanto à inibição da α -glucosidase e da lipase, onde as frações com melhores resultados sobre a α -glucosidase foram 9, 10, 11, 13, 91, sendo suas CI₅₀ de $45 \pm 0,94$, $62,04 \pm 0,65$, $107,49 \pm 0,84$, $103,66 \pm 3,91$, respectivamente. No teste de inibição da lipase, as frações 2, 9, 10, 11 e 29 foram as que apresentaram maior porcentual de inibição e menor CI₅₀, sendo $101,25 \pm 7,01$, $84,94 \pm 2,89$, $154,38 \pm 1,25$, $118,30 \pm 2,97$, $149,67 \pm 15,80$, respectivamente. A partir dos resultados, pode-se observar que a *B. garcibarrigae* possui potencial antidiabético visto que seus extratos e frações apresentaram grande porcentual de inibição e CI₅₀ reduzido na inibição da lipase e da α -glucosidase, demonstrando que esta planta pode ser indicada como promissora fonte de substâncias biologicamente ativas, sendo necessários novos ensaios a fim de avaliar se as respostas encontradas *in vitro* são compatíveis *in vivo*.

Palavras-chaves: Inibição enzimática, α -glucosidase, lipase pancreática, *Byrsonima garcibarrigae*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 - <i>Byrsonima garcibarrigae</i> Cuatrec.	10
Figura 02 - Processo de preparação da amostra vegetal para a extração.	14
Figura 03 – Precipitado esbranquiçado.	21
Figura 04 – Valores de CI_{50} de extratos da <i>B. garcibarrigae</i> sobre a atividade da α -glucosidase.	22
Figura 05 – (A) Partição do extrato metanólico. (B) CCD fração hexânica. (C) CCD da fração clorofórmica	23
Figura 06 – <i>Screening</i> das frações da partição com o teste de inibição da α -glucosidase em comparação com o extrato metanólico.	24
Figura 07 – Coluna cromatográfica de poliamida da fase hidrometanólica do extrato metanólico	25
Figura 08 - Percentual de inibição da α -glucosidase <i>in vitro</i> pelas frações provenientes da coluna cromatográfica com a fase hidrometanólica	26
Figura 09 - Percentual de inibição da lipase pancreática <i>in vitro</i> pelas frações provenientes da coluna cromatográfica com a fase hidrometanólica	26
Figura 10 – Valores de CI_{50} frações provenientes da coluna cromatográfica com a fase hidrometanólica sobre a atividade da α -glucosidase <i>in vitro</i>	27
Figura 11 – Valores de CI_{50} frações provenientes da coluna cromatográfica com a fase hidrometanólica sobre a atividade da lipase pancreática <i>in vitro</i>	27

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVOS	8
2.1. Objetivo Geral	8
2.2. Objetivo Específico	8
3. REVISÃO DA LITERATURA	9
3.1. <i>Bysonima</i> sp.	9
3.2. Diabetes.....	10
3.2.1 α -glucosidade	12
3.2.2. Lipase	12
3.2.3. Estresse oxidativo.....	13
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
4.2. Obtenção do Extrato	14
4.3. Prospecção fitoquímica	15
4.4. Partição do extrato metanólico	15
4.5. Cromatografia em camada delgada (CCD)	16
4.6. Cromatografia em coluna (CC)	16
4.7. Inibição da α -glucosidase <i>in vitro</i>	17
4.8. Inibição da lipase <i>in vitro</i>	17
4.9. DPPH <i>in vitro</i>	18
4.10. Teor de fenóis totais <i>in vitro</i>	18
4.11. Determinação da CI_{50}	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
6. CONCLUSÃO	28
7. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

1. INTRODUÇÃO

O diabetes é uma doença multifatorial associada ao aumento do risco de complicações cardiovasculares. O estresse oxidativo pode ser responsável pelos sintomas apresentados pelos pacientes com diabetes, e é definido quando há alteração no balanço pró-oxidante e antioxidante. As alterações por ele causadas podem ocorrer na condução nervosa, na auto-oxidação da glicose sanguínea, na formação de glicosilação avançada e na atividade da enzima aldose redutase (REIS et al., 2008). Os antioxidantes possuem uma ação de grande relevância, pois impedem a ação dos radicais livres, evitando a formação de lesões nas células e podem ainda reparar as lesões causadas, removendo os danos e reconstituindo as células danificadas (SERRA e CAMPOS, 2006). Além de a atividade de sequestrar radicais livres poder estar relacionada com a inibição enzimática por meio da ligação com os radicais livres presentes no sítio ativo das enzimas.

A flora brasileira compreende cerca de um terço das espécies vegetais do planeta, além disso, é estimado que populações indígenas brasileiras utilizem cerca de 1300 espécies como medicamentos (YUNES et al., 2001). Dentre as inúmeras espécies de plantas utilizadas na medicina popular do Brasil, merecem destaque as espécies do gênero *Byrsonima*, um dos maiores da família Malpighiaceae, com cerca de 150 membros, 50% dos quais possuem ocorrência no Brasil (CARDOSO, 2006). A observação do extenso uso popular dessas espécies têm motivado diversos estudos científicos, os quais se intensificaram nos últimos anos. Esses estudos têm levado ao isolamento de várias substâncias de interesse farmacológico, além da comprovação de diversas atividades terapêuticas (GUILHON-SIMPLICIO, 2009). Apesar disso, *Byrsonima garcibarrigae*, espécie arbórea encontrada na região Norte do Brasil, é uma das milhares de espécies da região Amazônica com potencial farmacológico muito pouco conhecido.

Neste sentido, a identificação de espécies vegetais que possuam a capacidade de inibir alguma enzima envolvida na degradação de carboidratos ou no estresse oxidativo gerado pela doença, poderão contribuir para o desenvolvimento de novos medicamentos antidiabéticos, oferecendo alternativas terapêuticas e contribuindo para a melhoria na qualidade de vida dos pacientes. Em se tratando de plantas amazônicas, tem se ainda uma contribuição ao desenvolvimento científico, tecnológico e econômico da região, que possui uma rica, contudo, pobremente estudada flora.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o potencial antidiabético de extratos, frações e/ou substâncias obtidos da casca do caule da *Byrsonima garcibarrigae* Cuatrec.

2.2. Objetivo Específico

Avaliar a capacidade de inibição da enzima α -glucosidase por diferentes extratos e frações da casca da *Byrsonima garcibarrigae*;

Identificar possíveis marcadores fitoquímicos para a atividade antidiabética desta espécie.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 *Byrsonima* sp.

Byrsonima é um dos maiores gêneros da família Malpighiaceae, possuindo 150 espécies com distribuição marcadamente neotropical. (GUILHON-SIMPLICIO e PEREIRA, 2011). É encontrado principalmente a partir do México, difundindo-se por toda América do Sul (AGUIAR, DAVID e DAVID, 2005). O Brasil concentra cerca de 50% das espécies, sendo encontradas nas regiões Norte, Nordeste e Central, podendo ser encontradas na região Sudeste do país, em áreas de cerrado. No Brasil, suas espécies são popularmente conhecidas como “muricis”, sendo diferenciadas pela cor de suas flores e frutos, ou pelo local de ocorrência. Desse modo, recebem nomes como murici da várzea, murici da mata, murici-amarelo, entre outros. (GUILHON-SIMPLICIO e PEREIRA, 2011). São geralmente arbóreas, com galhos retorcidos e porte médio. São de fácil adaptação, desenvolvendo-se bem em solos areno-argilosos, com clima quente e boa ventilação (CARDOSO, 2006).

A madeira das espécies arbóreas é leve, sendo utilizada na construção civil para a fabricação de caibros e vigas. Algumas delas já foram bastante empregadas em curtumes e para tingir tecidos, devido à grande quantidade de taninos e matéria tintorial nas cascas. Com flores vistosas, frutos que atraem aves e rápido crescimento, tais espécies têm grande potencial como plantas ornamentais e também são úteis na recuperação de áreas degradadas. Os frutos de *B. crassifolia* e *B. verbascifolia* são bastante apreciados para consumo *in natura* e utilizados na preparação de bebidas e doces em diversas regiões do país (GUILHON-SIMPLICIO e PEREIRA, 2011).

Já foram isolados do gênero *Byrsonima* alguns derivados flavonoídicos, no entanto, são os triterpenos que representam a classe de substâncias naturais de ocorrência mais frequente no gênero. Em estudos farmacológicos, foram verificadas atividades bactericidas, antifúngicas, espamogênicas e antiprotozoárias associadas a triterpenoides como ácido betulínico e lupeol (FELÍCIO et al., 1995).

Relatos na literatura reportam a presença de triterpenos em *B. verbascifolia* e *B. microphylla* e, flavonoides e esteroides em *B. variabilis*. Vários estudos investigaram a constituição química de *B. crassifolia*, da qual foram isolados compostos voláteis dos frutos, glicolípideos, triterpenos, ácidos triterpênicos, catequinas e flavonoides das folhas e proantocianidinas e taninos do tronco. De *B. crassa*, foi isolada uma mistura de ácido gálico e

galato de metila, quercetina-3-O-alfa-L-piranosídeo e a mistura de quercetina-3-O-beta-D-glucopiranosídeo e quercetina-3-O-beta-D-galactopiranosídeo. Do tronco de *B. verbascifolia* também foram isolados vários triterpenos (ROLIM, 2009).

A *Byrsonima garcibarrigae* é uma árvoreta com cerca de 5 metros de altura possuindo o tronco bifurcado com casca marrom-avermelhado encontrada na região Amazônica, sem registros de estudos científicos indicando suas propriedades farmacológicas ou substâncias químicas presentes.



Figura 01 - *Byrsonima garcibarrigae* Cuatrec. (A) Espécie arbórea; (B) Flores; (C) Caule. (ARQUIVO PESSOAL)

3.2. Diabetes

Diabetes é considerado um problema de saúde pública que afeta milhões de indivíduos no mundo, e atualmente é considerada a doença do século 21 sendo a 4ª causa principal de mortes nos países desenvolvidos. No Brasil, estima-se que esta doença atinge quase 12 milhões de indivíduos (CAVALLI et al., 2007).

Diabetes é uma desordem metabólica de etiologia múltipla caracterizada por hiperglicemia, resultante de defeitos na secreção de insulina, na ação de insulina ou em ambas (SOUSA, 2006) e alterações no metabolismo e carboidratos, lipídios e proteínas, resultando em um aumento do nível de glicose no sangue (SOUZA, 2011).

Existem dois tipos de diabetes: o tipo 1 e o tipo 2. O diabetes tipo 1 é geralmente diagnosticado na infância ou na adolescência e sua principal característica é a necessidade diária de suplementação de insulina. Na maioria das vezes, ocorre por conta da destruição de aproximadamente 85% das células β -pancreáticas. Já o diabetes tipo 2, também chamado de diabetes mellitus não-insulinodependente, caracteriza-se por apresentar resistência à ação da insulina, que pode preceder o início do quadro clínico (MION JUNIOR e NOBRE, 1999). O diabetes tipo 2 é uma doença multifatorial, sendo resultado de uma combinação de genes e de fatores ambientais (YAMAZAKI, 2004). A obesidade, dentre as múltiplas causas para este tipo de diabetes, é observada na maior parte dos pacientes sendo que por si já causa algum grau de resistência à insulina. Este tipo de diabetes, frequentemente é diagnosticado tardiamente, porque a hiperglicemia desenvolve-se de forma gradual e, em estágios mais iniciais, não é suficientemente grave para que o paciente perceba quaisquer dos sintomas clássicos de diabetes (SOUSA, 2006).

Este tipo de diabetes também está associado com a aceleração da doença aterosclerótica de vasos de grande calibre, afetando artérias que suprem o coração, o cérebro e membros inferiores. Como resultado, pacientes com diabetes têm um risco muito elevado de sofrer infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e amputações de membros inferiores. A hiperglicemia e a resistência à insulina parecem desempenhar um importante papel na patogênese de complicações cardíacas (GOTTLIEB, 2009). A hiperglicemia leva a diversas disfunções cardiológicas, destacando-se: alterações no fluxo sanguíneo e aumento na permeabilidade vascular. Isso é reflexo da diminuição da atividade de vasodilatadores como o óxido nítrico, aumento da atividade de vasoconstritores, tais como angiotensina II e endotelina-1 (BROWNLEE, 2001).

Alterações fisiológicas provocadas pela hiperglicemia levam à diminuição da capacidade imunológica e à resposta inflamatória nesses pacientes, aumentando a susceptibilidade às infecções. Há disfunções nos leucócitos, com anormalidades na aderência, quimiotaxia, fagocitose e destruição intracelular. Há diminuição, também, da ativação espontânea e da resposta neutrofílica, quando comparados aos pacientes controles não diabéticos (BANDEIRA et al, 2003). A hiperglicemia ou a presença dos produtos finais da glicosilação levam a um estado de persistente ativação dos polimorfonucleares, o que induz a ativação espontânea de cadeia oxidativa e liberação de mieloperoxidase, elastase e outros componentes dos grânulos neutrofílicos, causando danos em duas vias. Eles podem tornar os polimorfonucleares “tolerantes”, isto é, com resposta menos efetiva quando estimulados por patógenos (BANDEIRA et al., 2003; CASTILHO e RESENDE, 1999).

3.2.1 α -glucosidade

As α -glucosidases são enzimas que catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 de dissacarídeos ou oligossacarídeos liberando unidades de glicose. As α -glucosidases 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 -glucosidase, levando a produção de glicose que será absorvida pelo organismo. A α -glucosidase cliva as unidades terminais de glicose da amilose ou amilopectina, tendo preferência por malto-oligossacarídeos menores, liberando glicose com uma configuração α (SOUZA, 2011).

Os inibidores da α -glucosidase agem como antagonistas e inibem a captação de carboidratos da dieta (amido, dextrinas e dissacarídeos) (PEREIRA et al, 2009). Inibindo a quebra dos carboidratos e, assim, promovendo a sua digestão ao longo do comprimento do intestino delgado, os inibidores da α -glucosidase reduzem o aumento pós-prandial de glicose no plasma, impedindo a hiperglicemia pós-prandial e hiperinsulinemia subsequente (LEROITH, OLEFSKY e TAYLOR, 2004).

3.2.2. Lipase

É conhecido que os lipídeos não são diretamente absorvidos no intestino (HILL, 1999). A lipase pancreática é a principal enzima lipolítica sintetizada e secretada pelo pâncreas desempenha um papel fundamental na eficiência da digestão de triacilglicerol. Ela remove ácidos graxos da posição α e α' de triacilglicerol da dieta, produzindo β -monoacilglicerol e ácidos graxos de cadeia longa saturada e poli-insaturada como produto lipolítico (CURIEL, 2011).

A inibição dessa enzima provoca uma menor absorção de gordura no nível intestinal, o que leva a uma perda de peso gradual, o que no caso dos pacientes diabético que possuem obesidade, faz com que diminua a resistência à insulina (HALPEM e MANCINI, 2000).

3.2.3. Estresse oxidativo

Os radicais livres são átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons não pareados na sua camada de valência, geralmente formado pela perda ou ganho de elétrons. Em meio biológico a maioria das moléculas não se encontra na forma de radicais, permanecendo com elétrons pareados, entretanto em determinadas situações os radicais livres, também denominados de espécies reativas são formados e podem causar efeito fisiológico e patológico (REBELLO, 2005).

O estado redox das células é uma consequência de um crítico balanço entre a produção de EROS e as defesas antioxidantes. A elevação na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e/ou o prejuízo dos sistemas de defesas antioxidantes, resulta em estresse oxidativo potencialmente citotóxico. Sob esta condição pró-oxidante, radicais altamente reativos danificam indiscriminadamente proteínas, lipídios, polissacarídeos e DNA, levando a morte celular (OLIVEIRA, 2012). Assim, o estresse oxidativo desempenha um papel central no desenvolvimento de complicações do diabetes, tanto microvasculares e cardiovasculares (GIACCO e BROWNLEE, 2010).

Muitas são as fontes de EROs e a hiperglicemia tem sido descrita como mais um estímulo para a produção dessas EROs. Uma vez a glicemia aumentada, há maior metabolização da glicose pela via glicolítica aumentando ainda mais a produção de EROs. Assim, há um desvio na formação de substratos formando aldeído bifuncional metilglioxal (MGO) ou glioxal (GO), os quais modificam proteínas e lipídeos intracelulares dando origem aos produtos de glicação avançada (AGE). Esses AGEs são capazes de aumentar o estresse oxidativo através de maior geração de EROS formando-se assim um ciclo danoso ao organismo (MALAGUTI, 2012).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Coleta da matéria-prima vegetal

As cascas do caule de *Byrsonima garcibarrigae* foram coletadas no dia 13 de outubro de 2012 às 11:35 horas, na Reserva Florestal Adolpho Ducke, localizada no Km 26 da estrada AM-010 (entre os municípios de Manaus e Itacoatiara), no estado do Amazonas. A

exsicata foi encaminhada para ser depositada no Herbário da Universidade Federal do Amazonas.

4.2. Obtenção do Extrato

As cascas do caule de *Byrsonima garcibarrigae* foram submetidas à secagem em estufa de ar circulante por 5 dias a temperatura de 45° C. Em seguida as cascas foram limpas, retirando-se uma camada externa que continha impurezas. Devido à espessura e comprimento das cascas serem grandes, elas foram quebradas a fim de auxiliar a sua pulverização, que foi realizada em um moinho de facas, obtendo 822,7440 g de pó seco.

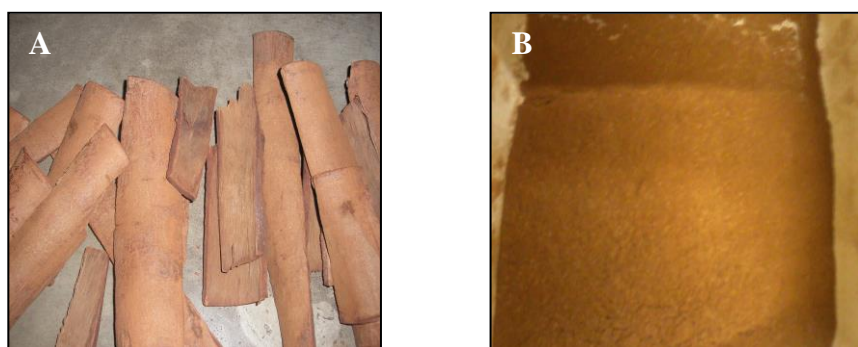


Figura 02 - Processo de preparação da amostra vegetal para a extração. (A) Cascas secas e raspadas de *Byrsonima garcibarrigae*; (B) Pó das cascas de *Byrsonima garcibarrigae* (ARQUIVO PESSOAL).

O pó seco de *Byrsonima garcibarrigae* foi submetido à extração por maceração, sendo utilizados como solventes, hexano, acetato de etila e metanol, sequencialmente (polaridade crescente).

A extração foi realizada utilizando três erlenmeyers de 2 litros com 274,2922 g, 274,2429 g e 282,6903 g do pó em cada. Para potencializar e diminuir o tempo de extração, utilizou-se o ultrassom (Ultrasonic Cleaner Unique[®]), que é um aparelho que utiliza a energia de ondas sonoras que são transmitidas em frequência superior à capacidade auditiva do ouvido humano e estas ondas criam uma vibração que causa uma variação na pressão no líquido gerando a cavitação e permitir o transporte de massa entre a fase líquida e a superfície sólida devido à turbulência e aos micromovimentos simultâneos (DA LUZ, 1998).

O erlenmeyer contendo o pó das cascas de *Byrsonima garcibarrigae* e o solvente foram colocados no ultrassom por 15 minutos. O extrato resultante foi filtrado e em seguida, o solvente foi eliminado em evaporação rotativa (Rotaevaporador IKA® RV10 basic) na temperatura de 45° C, pressão de 500 mmHg e na rotação de 180 rpm. O volume residual do solvente presente no extrato foi evaporado em temperatura ambiente em uma capela de exaustão. Os extratos secos obtidos foram armazenados em recipientes, pesados e identificados, em refrigeração (± 8 °C).

4.3. Prospecção fitoquímica

Para a realização da prospecção fitoquímica, utilizou-se 20 g do pó da casca do caule de *B. garcibarrigae* do qual foi preparada uma solução extrativa hidroetanólica e uma solução extrativa aquosa. A partir da solução hidroetanólica realizou-se a prospecção para alcaloides, ácidos orgânicos, fenóis, cumarinas, antraquinonas, esteróis e triterpenos. A partir da solução aquosa realizou-se prospecção de heterosídeos antociânicos, heterosídeos saponínicos, heterosídeos cianogénéticos, flavonoides, gomas, taninos, mucilagens, aminogrupos, ácidos voláteis e ácidos fixos. As metodologias utilizadas para a detecção dos metabólitos foram realizadas segundo as metodologias de Matos (1997) e Costa (2001).

4.4. Partição do extrato metanólico

O extrato metanólico foi fracionado por partição líquido-líquido com solventes em polaridade crescente (hexano e clorofórmio), onde 100,3261 g de extrato seco foi solubilizado em 1 litro de uma mistura de metanol e água destilada na proporção 1:1. Em seguida foi transferido para um balão de separação, e foi particionado quatro vezes com o volume de 500 mL de hexano e cinco vezes com o volume de 500 mL de clorofórmio. A fase residual foi denominada hidrometanólica. Os solventes hexano e clorofórmio foram eliminados em evaporação rotativa (Rotaevaporador IKA® RV10 basic) na temperatura de 45° C, pressão de 500 mmHg e na rotação de 180 rpm. O volume residual do solvente presente no extrato foi evaporado em temperatura ambiente em uma capela de exaustão. Enquanto que o solvente da fase hidrometanólica foi eliminado via secagem em *spray dryer*.

Obteve-se 0,0674 g e 0,2937 g da fase hexânica e da fase clorofórmica, respectivamente. Enquanto que a fase hidrometanólica obteve o peso seco de 25,1388 g. A

partir das fases geradas, foi realizada análises cromatográficas em camada delgada com placas de sílica gel ALUGRAM®Xtra SIL G/UV₂₅₄.

4.5. Cromatografia em camada delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada para avaliação analítica qualitativa dos componentes dos extratos. Foram utilizadas cromatofolhas de sílica gel 60 CCM ALUGRAM®Xtra SIL G/UV₂₅₄ com marcador de fluorescência UV₂₅₄.

Os extratos, fases e frações foram solubilizados em solventes de acordo com sua afinidade, e estes foram adicionados em cromatoplasmas com o auxílio de capilares. Uma vez secas, as placas foram acondicionadas em cubas saturadas contendo a fase móvel a ser testada. Testaram-se várias combinações de solventes, tais como hexano, diclorometano, acetato de etila, clorofórmio, acetona e metanol, para determinar a fase móvel mais adequada para a separação dos compostos, permitindo sua possível identificação.

Foram utilizados os seguintes agentes reveladores: Anisaldeído, solução de Vanilina- ácido sulfúrico e difenilboriloxietilamina/polietilenoglicol. A revelação foi realizada por aspersão das soluções reveladoras sobre a superfície das cromatofolhas, e utilizou-se lâmpadas UV 254 nm e UV 360 nm, que permitiram revelar as placas por fluorescência.

4.6. Cromatografia em coluna (CC)

A fase hidrometanólica proveniente do extrato metanólico da casca do caule de *Byrsonima garcibarrigae* foi fracionada por cromatografia em coluna, onde foi utilizada como fase estacionária a poliamida-6-DF (Riedel-de Haen AG Seelze-Hannover) que foi eluída exaustivamente com metanol. O metanol foi completamente removido por evaporação rotativa (Rotaevaporador IKA® RV10 basic) na temperatura de 45° C, pressão de 500 mmHg e na rotação de 180 rpm. O volume residual do solvente presente no extrato foi evaporado em temperatura ambiente em uma capela de exaustão.

4.7. Inibição da α -glucosidase *in vitro*

O método do teste de inibição da alfa-glucosidase baseia-se no princípio da interação entre a enzima e o reagente de cor (p-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo), a qual resultará num cromógeno medido espectofotometricamente (CARLOS et al, 2009).

O teste enzimático de inibição α -glucosidase *in vitro* foi realizado em microplacas de 96 poços, onde se utilizou 10 μ L da enzima α - glucosidase obtida de *Saccharomyces cerevisiae* (EC 3.2.1.20) a qual foi pré-incubada com 20 μ L das amostras em diferentes concentrações durante 5 minutos a 25°C. Adicionou-se 40 μ L de solução p-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (pNPG) (1mM) em tampão fosfato de sódio 50mM (pH 6,8). A microplaca foi colocada em incubadora rotativa incubada a 37°C durante 30 minutos em. Após a incubação, adicionou-se 100 μ L de solução 10% de bicarbonato de sódio e a absorbância foi lida a 405nm em um leitor de Elisa de multiplaca. Para o teste em branco foi utilizado somente o pNPG, visando eliminar variações relacionadas à coloração característica do extrato vegetal e possíveis variações relacionadas à absorbância da coloração do pNPG. Utilizou-se a quercetina como controle positivo do teste (ANDRADE-CETTO, BECERRA-JIMÉNEZ e CÁRDENAS-VÁZQUES, 2008). A inibição da α -glucosidase foi calculada por meio da fórmula: $100 - \frac{\text{Absorbância final da amostra} - \text{Absorbância inicial da amostra}}{\text{Absorbância final do controle} - \text{Absorbância inicial do controle}} * 100$.

4.8. Inibição da lipase *in vitro*

O teste enzimático de inibição lipase *in vitro* foi realizado em microplacas de 96 poços, onde se utilizou 80 μ L da enzima lipase pancreática (Sigma L3126) que foi incubada com 30 μ L das amostras em diferentes concentrações durante 5 minutos a 37°C. Adicionou-se 170 μ L de tampão tris 75 mM (pH 8,5) e 20 μ L de solução *p*-nitrofenil (pNP) em acetonitrila. Em seguida fez-se a leitura da absorbância em leitor Elisa de microplaca. A reação foi incubada a 37°C durante 20 minutos em incubadora rotativa. Após a incubação, a absorbância foi lida a 405nm em um leitor de Elisa de microplaca. Para o teste em branco foi utilizado somente o PNP visando eliminar variações relacionadas à coloração característica do extrato vegetal e possíveis variações relacionadas à absorbância da coloração do PNP. Utilizou-se a quercetina como controle positivo do teste. A inibição da lipase foi calculada por meio da fórmula: $100 - \frac{\text{Absorbância final da amostra} - \text{Absorbância inicial da amostra}}{\text{Absorbância final do controle} - \text{Absorbância inicial do controle}} * 100$

4.9. DPPH *in vitro*

O método do DPPH baseia-se na redução dos radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•) através da doação de um átomo de hidrogênio do composto em estudo, composto polifenólico, à molécula do radical (ARUOMA et al., 1997).

O teste de determinação da atividade antioxidante foi realizado segundo metodologia utilizada por Molyneux (2004), com modificações. O teste foi realizado em uma microplaca de 96 poços, onde foi adicionado 170µL de DPPH (1 mg/mL) e 30µL das soluções das amostras, com suas respectivas diluições, feitas utilizando etanol. Como controle positivo da reação foi utilizado uma solução de quecertina, na concentração de 100 µg/mL. Para o controle negativo, foram utilizados 170µL de DPPH e 30µL de etanol. A reação foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente no escuro e após a incubação, a absorbância foi lida a 517 nm em um leitor de Elisa de microplaca. O ensaio foi feito em triplicata. O potencial antioxidante foi calculado por meio da fórmula: $100 - (\text{Absorbância da amostra} / \text{Absorbância da média do controle}) * 100$.

4.10. Teor de fenóis totais *in vitro*

Para melhor discussão dos resultados, o teor de fenóis *in vitro* foi realizado segundo o método de Bonoli *et al.* (2004) com modificações. O teste foi realizado em microplacas de 96 poços, onde se utilizou 50 µL do reagente de Folin-Ciocalteu foi incubado com 10 µL das amostras em diferentes concentrações durante 8 minutos em temperatura ambiente no escuro. Adicionou-se 240µL de carbonato de sódio a 0,4% em todos os poços da microplaca que continham a amostra. A reação foi incubada a temperatura ambiente durante 3 minutos no escuro. Após a incubação, a absorbância foi lida a 750 nm em um leitor de Elisa de microplaca. Utilizou-se o ácido gálico como controle positivo do teste. O teor de fenóis totais foi calculado por meio da fórmula: $100 - (\text{Absorbância final da amostra} - \text{Absorbância inicial da amostra} / \text{Absorbância final do controle} - \text{Absorbância inicial do controle}) * 100$.

4.11. Determinação da CI_{50}

A CI_{50} , que é a concentração necessária para ocasionar a metade da capacidade máxima inibitória de um composto, mede a efetividade do mesmo em inibir uma função biológica ou bioquímica (MARTINS, 2011).

A determinação da CI_{50} foi realizada a partir dos resultados obtidos nas análises após a leitura das absorbâncias no leitor de Elisa e das fórmulas da atividade de cada análise, onde, pode-se calcular a CI_{50} por meio de uma análise de regressão linear utilizando o método gráfico do *software* Origin®, que resultou em uma equação da reta, onde se substituiu o valor de y por 50 para obtenção da concentração da amostra com capacidade de reduzir 50% da atividade enzimática. O resultado da CI_{50} e o desvio padrão foram obtidos através do valor da média obtida a partir da média de cada uma das triplicatas das análises realizadas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a metodologia empregada, a prospecção fitoquímica das soluções extrativas da casca do caule *B. garcibarrigae* analisadas sugeriram as presenças de antraquinonas, fenóis, heterosídeos flavônicos, esteróis, terpenos, heterosídeos antociânicos, heterosídeos saponínicos, taninos, mucilagens, gomas e ácidos voláteis. A sugestão da presença de flavonoides indica possíveis atividades biológicas, como atividade antitumoral, antioxidante, antiviral e anti-inflamatória, dentre outras, o que lhe confere significativa importância farmacológica (COUTINHO, MUZITANO e COSTA, 2009). O processo de extração por maceração acoplado ao ultrassom utilizando os solventes de polaridade crescente, hexano, acetato de etila e metanol obteve os seguintes rendimentos contidos na tabela 1.

Solvente	Massa do pó das cascas de <i>Byrsonima garcibarrigae</i> (g)	Massa do extrato seco (g)	Rendimento (%)
Hexano	822,7440	2,8768	0,35
Acetato de etila	822,7440	5,6620	0,70
Metanol	822,7440	111,4556	13,5

Tabela 1 – Rendimento dos extratos obtidos da casca do caule de *B. garcibarrigae*.

Durante a extração hexânica, houve a formação de um precipitado esbranquiçado, que pode ser observado durante a concentração da solução extrativa no evaporador rotativo. O precipitado formado foi separado da solução extrativa por meio de filtração simples, sendo recristalizado com acetona gelada, em seguida foi centrifugado, permitindo que pudesse separar a parte amarela (PA) da parte branca (PB), o precipitado.

A PA, cuja massa seca foi de 2,5539 g, e PB, cuja massa seca foi de 0,0716 g, mostraram-se substâncias de comportamento diferentes, visto que somente a PB precipitou durante a recristalização. E por meio de CCD utilizando a fase móvel diclorometano : hexano 7:3, observou-se que a PA possuía as mesmas substâncias encontradas no extrato hexânico, enquanto a PB possuía α e β -amirina de acordo com a comparação feita por CCD com o

padrão desta substância. A PB foi encaminhada ao Centro de Biotecnologia da Amazônia para confirmação de sua identificação por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, cujos espectros ainda não foram finalizados até a apresentação deste relatório.

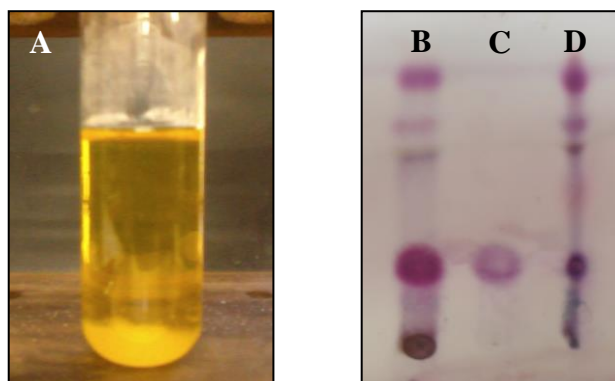


Figura 03 – Precipitado esbranquiçado. (A) Separação da parte amarela e branca do precipitado por centrifugação. Cromatografia de camada delgada comparativa entre (B) parte amarela; (C) parte branca; (D) Extrato hexano (ARQUIVO PESSOAL).

A partir dos extratos brutos, foi possível confirmar e quantificar o teor de fenóis totais nos extratos da *B. garcibarrigae* por meio da determinação do teor de fenóis totais *in vitro*, assim como seu potencial antioxidante foi comprovado pelo método do DPPH *in vitro*.

Amostra	Teor de fenóis totais (%)	DPPH CI_{50} ($\bar{X} \pm s$ $\mu\text{g/mL}$)
Hexano	20,65 \pm 1,43	13042 \pm 0,23
Acetato de etila	28,41 \pm 6,50	10,3 \pm 0,03
Metanol	61,43 \pm 0,50	9,2 \pm 0,23
Quercetina	-	3,4 \pm 0,12

Tabela 2 – Teor de fenóis totais e atividade antioxidante dos extratos dos extratos obtidos da casca do caule de *B. garcibarrigae*.

O radical estável DPPH tem sido extensivamente usado para a determinação da atividade antioxidante, que é a atividade sequestradora de compostos antioxidantes puros, extratos de plantas, frutos e alimentos (WONG, LEONG e KOH, 2006). A porcentagem de atividade antioxidante corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de

DPPH em 50% é denominada concentração inibitória (CI_{50}). Assim quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CI_{50} , portanto, maior a sua atividade antioxidante (SOUZA et al., 2007). Entre os extratos analisados, o metanólico apresentou a menor CI_{50} , tendo uma atividade antioxidante considerada significativa.

A avaliação do potencial antioxidante do radical livre DPPH está intimamente ligado com o potencial antioxidante e com a presença de compostos fenólicos, neste caso, taninos e flavonoides, que foram indicados na prospecção fitoquímica. Em relação às amostras analisadas, Todos os extratos apresentaram resultados estatisticamente diferentes do padrão quercetina ($p < 0,05$), entretanto, as atividades do extrato metanólico e acetato de etila foram equivalentes ($p > 0,05$), enquanto que o extrato hexânico não apresentou atividade. A capacidade antioxidante do extrato metanólico e acetato de etila foi compatível com os seus teores de fenóis totais, demonstrando que os mesmos atuam como bons doadores de elétrons.

Por se tratar de um estudo fitoquímico biomonitorado, a partir dos extratos secos e da substância PB, fez-se o teste enzimático de inibição da α -glucosidase *in vitro*, a fim de identificar quais extratos iriam inibir esta enzima e assim determinar qual deles seria fracionado e permitiria a continuação da pesquisa.

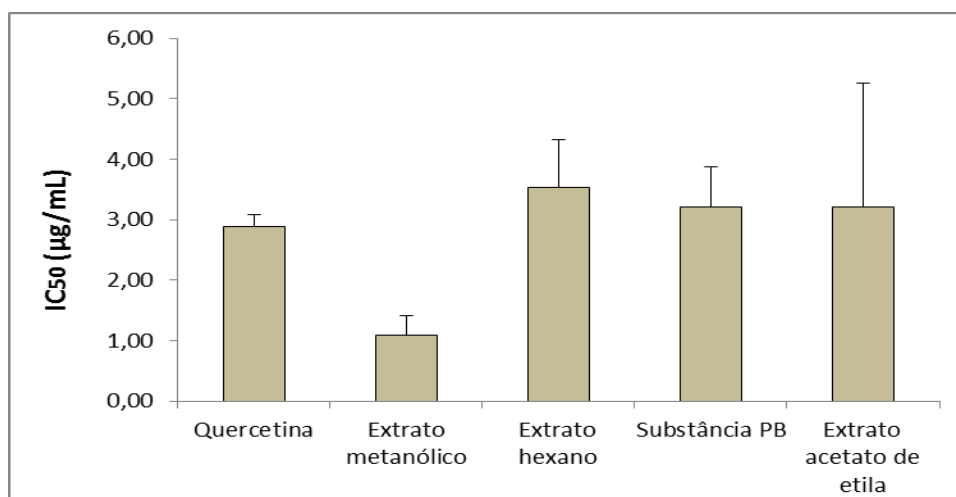


Figura 04 – Valores de CI_{50} de extratos da *B. garcibarrigae* sobre a atividade da α -glucosidase.

Todos os extratos de *B. garcibarrigae* inibiram de modo significativo a enzima α -glucosidase. Entretanto o extrato metanólico foi o que apresentou maior inibição em comparação com a quercetina, que foi o controle positivo, além de apresentar o menor CI_{50} . A inibição da α -glucosidase pode ser relacionada com a presença de compostos fenólicos, visto

que o extrato metanólico possui grande teor de compostos fenólicos, 61,43%, e uma expressiva atividade antioxidante. Devido à característica estrutural comum a todos eles que é a presença de um anel aromático hidroxilado, que interage com as proteínas causando complexação (PEREIRA et al., 2010). Considerando que os compostos fenólicos presentes são, majoritariamente, taninos e flavonoides, conforme indicado pela prospecção fitoquímica, pode-se sugerir que eles atuam formando complexos com a α -glucosidase, além do fato de atuarem como antioxidantes, sequestrando os radicais livres presentes nos receptores da α -glucosidase, com isso impede que estes se liguem ao seu substrato e, conseqüentemente, que a glicose seja clivada.

Como o extrato metanólico foi o que apresentou melhor atividade inibitória, ele foi particionado originando três frações, hexânica, clorofórmica e a remanescente, hidrometanólica. Devido o baixo peso obtido da fração hexânica, esta não foi utilizada em testes enzimáticos visto que não haveria massa suficiente para realizar fracionamento em coluna cromatográfica e assim permitir a identificação das substâncias.

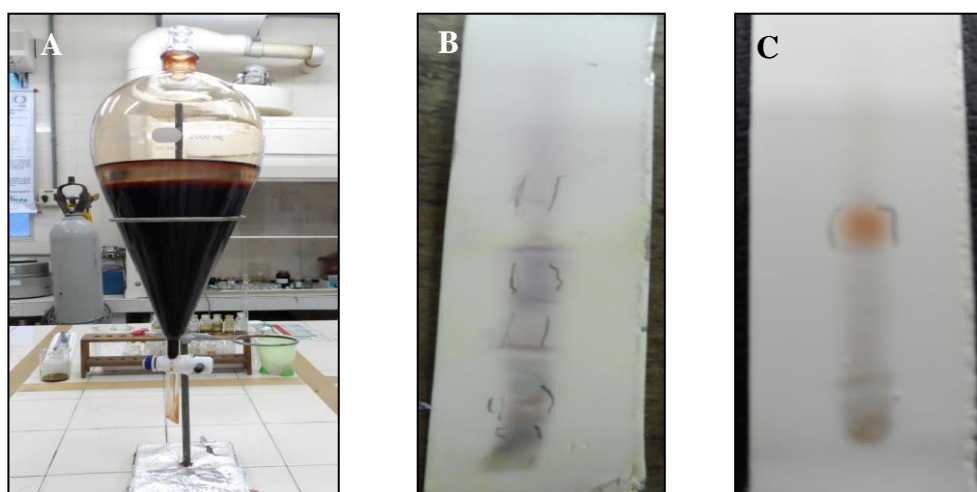


Figura 05 – (A) Partição do extrato metanólico. (B) CCD fração hexânica. (C) CCD da fração clorofórmica (ARQUIVO PESSOAL).

As frações hidrometanólica e clorofórmica foram submetidas ao teste enzimático de inibição da α -glucosidase *in vitro* a fim de verificar qual apresentaria percentual de inibição maior, e assim seria fracionado em cromatografia em coluna. Onde a fração hidrometanólica apresentou melhores resultados, tendo um percentual de inibição significativo em relação à fração clorofórmica. Quando a fração hidrometanólica foi comparada ao extrato metanólico, nota-se sua ação inibitória foi menor. Dessa forma, é possível inferir que as substâncias polares presentes no extrato metanólico atuam por

sinergismo aumentando o potencial inibitório, o qual decresce quando o mesmo é particionado já que há perdas de substâncias.

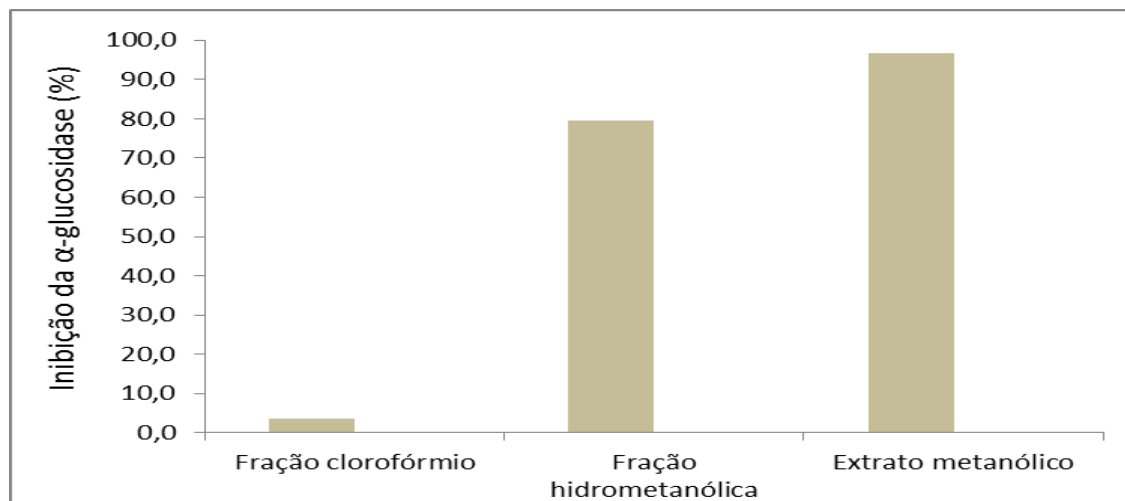


Figura 06 – *Screening* das frações da partição com o teste de inibição da α-glucosidase em comparação com o extrato metanólico.

A partir dos resultados obtidos e por apresentar um bom rendimento, a fração hidrometanólica foi selecionada para ser fracionada por cromatografia em coluna, onde se utilizou como fase estacionária a poliamida, pois ela é apropriada para separação de combinações fenólicas. A cromatografia com poliamida baseia-se na formação reversível de pontes de hidrogênio com os grupos amida do polímero. O poder aderente das combinações fenólicas depende principalmente do número e posição dos grupos hidroxilas, como a união não se efetua somente na superfície, mas também no interior da poliamida, é muito grande a capacidade de eluição (RANDERATH, 1975). A coluna cromatográfica foi eluída exaustivamente com metanol, onde se utilizou 10,0716 g de massa da fase hidrometanólica e 288,4823 g de massa de poliamida. A fase hidrometanólica foi ressuspensa em metanol, e a altura da fase estacionária na coluna foi de 40 cm e o diâmetro da coluna cromatográfica foi de 6 cm.

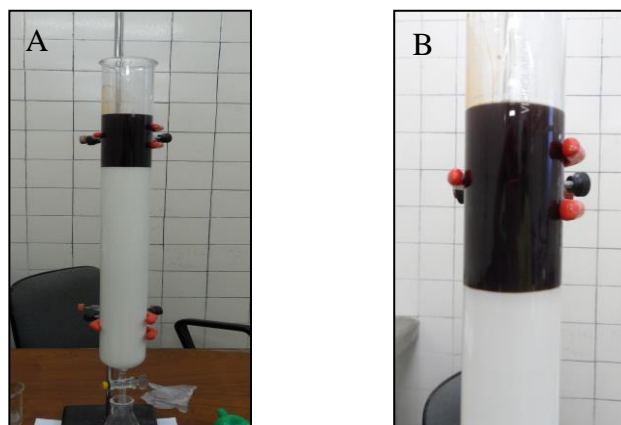


Figura 07 – Coluna cromatográfica de poliamida da fase hidrometanólica do extrato metanólico (A) e (B).

A coluna cromatográfica originou 36 frações (Tabela 2), onde as primeiras frações foram reunidas em grupos devido a similaridade observada em CCD utilizando acetato de etila: tolueno: ácido fórmico: água 4:0,5:0,5:0,5 como fase móvel.

Frações	Massa (mg)	Frações	Massa (mg)
F1-F2	0,0109	F21	0,0186
F3-F7	0,2191	F22	0,0194
F8	0,1157	F24	0,0164
F9	0,1320	F25	0,0186
F10	0,0919	F26	0,2668
F11	0,0838	F27	0,0191
F12	0,0706	F28	0,0143
F13	0,0691	F29	0,0149
F14	0,0621	F30	0,0125
F15	0,0454	F31	0,0173
F16	0,0344	F32	0,0186
F17	0,0298	F33	0,0206
F18	0,0174	F34	0,0312
F19	0,0272	F35	0,0277
F20	0,0336	F36	0,0231

Tabela 3 - Frações obtidas da coluna cromatográfica da fase hidrometanólica.

A partir das frações provenientes da coluna cromatográfica, foi realizado um *screening* enzimático de inibição *in vitro* da α -glucosidase e lipase utilizando a concentração única de 100 $\mu\text{g/mL}$. No teste de inibição da α -glucosidase, observou-se que a grande maioria das frações apresentou um razoável percentual de inibição da enzima, porém as frações 9, 10, 11 e 13 foram as que se destacaram, tendo um percentual de inibição acima de 50%. As frações grupo 2 (F3-F7), 16, 19 e 31 não inibiram a enzima α -glucosidase.

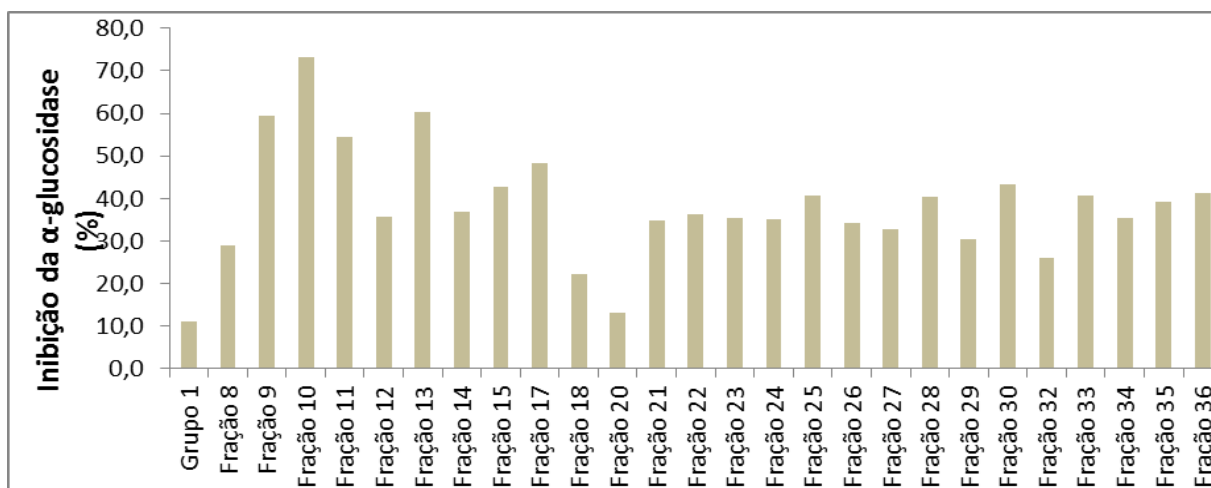


Figura 08 - Percentual de inibição da α -glucosidase *in vitro* pelas frações provenientes da coluna cromatográfica com a fase hidrometanólica.

No *screening* das frações com o teste de inibição da lipase *in vitro*, as frações que se destacaram foram o grupo 2 (F3-F7), 9, 10, 11 e 29, apresentando os melhores resultados. Enquanto que a fração 16 e 32 não inibiram a enzima.

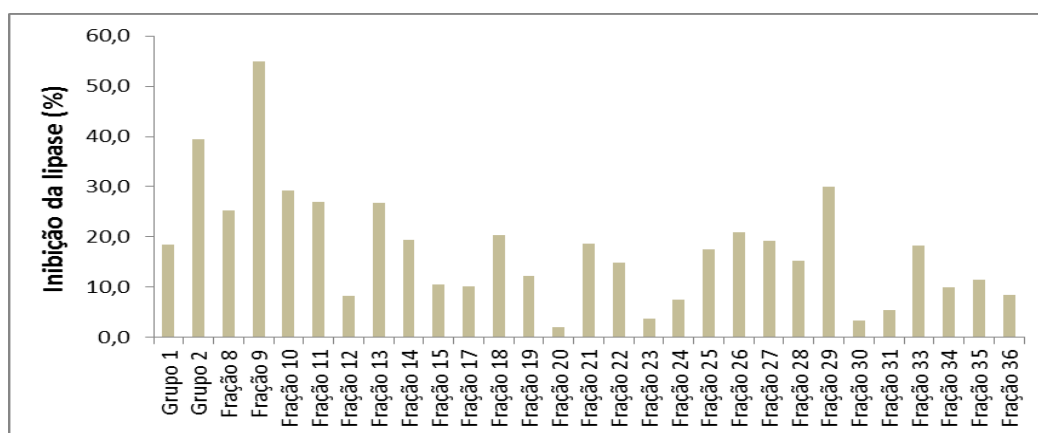


Figura 09 - Percentual de inibição da lipase pancreática *in vitro* pelas frações provenientes da coluna cromatográfica com a fase hidrometanólica.

A partir dos resultados do *screening* enzimático, foi realizado os testes enzimáticos de inibição *in vitro* da α -glucosidase e lipase em triplicata e em concentrações variadas, permitindo avaliar o perfil inibitório e determinar qual a concentração que seria capaz de inibir 50% da enzima, o CI_{50} .

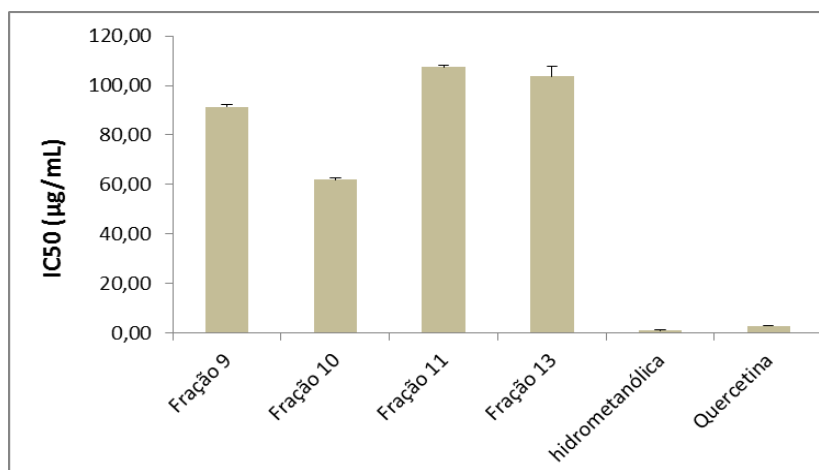


Figura 10 – Valores de CI_{50} frações provenientes da coluna cromatográfica com a fase hidrometanólica sobre a atividade da α -glucosidase *in vitro*.

Entre as frações analisadas, a fração 10 foi a que apresentou menor CI_{50} seguida pela fração 9, porém em relação ao padrão, a quercetina e a fase hidrometanólica, foi apresentada melhor resultado, possuindo assim um potencial moderado de inibição da α -glucosidase. Novamente, observou-se que as substâncias presentes apresentam maior atividade por meio de sinergismo.

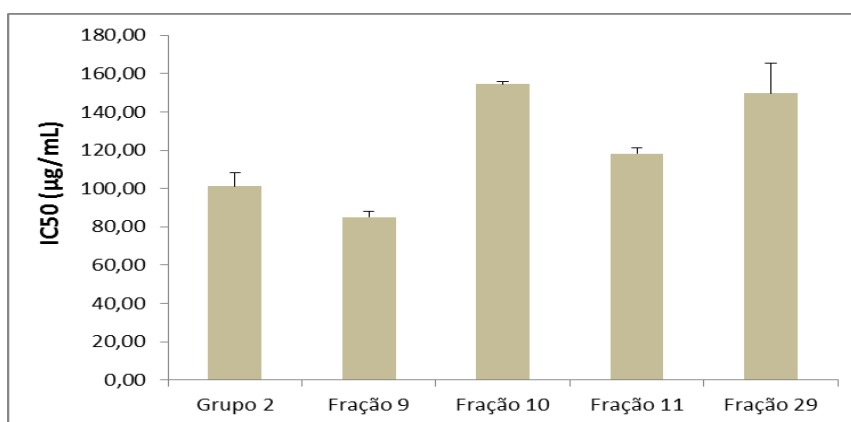


Figura 11 – Valores de CI_{50} frações provenientes da coluna cromatográfica com a fase hidrometanólica sobre a atividade da lipase pancreática *in vitro*

As frações pertencentes ao grupo 2 (F3-F7) e a 9 foram as que apresentaram menor CI_{50} , em comparação com o padrão quercetina. As frações do grupo 2 comportaram como inibidor seletivo para a lipase pancreática *in vitro*, em relação a inibição da α -glucosidase, pois estas não a inibiram. Assim como na inibição da α -glucosidase, o efeito sinérgico das substâncias apresenta-se maior na fase hidrometanólica.

As frações que apresentaram os menores CI_{50} foram encaminhadas para identificação no Centro de Biotecnologia da Amazônia, e até a apresentação deste relatório, os espectros ainda não tinham sido concluídos.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que a espécie *Byrsonima garcibarrigae* pode ser considerada como uma fonte de substâncias bioativas por apresentar efeitos sobre as enzimas α -glucosidase e lipase. Seus extratos e fases mais polares apresentaram grande capacidade de inibição destas enzimas, visto que o extrato metanólico apresentou o CI_{50} menor que o padrão utilizado, a quercetina, na inibição da α -glucosidase. Assim, esta espécie apresentou potencial antidiabético, pois o efeito destas enzimas pode ser associado ao estado hiperglicêmico e a resistência à insulina em pacientes com Diabetes.

A partir dos estudos fitoquímicos, pode-se observar que esta espécie apresenta triterpenos, flavonoides e taninos, o que é compatível com outras espécies do mesmo gênero, sendo os possíveis responsáveis pelo seu potencial antidiabético. Como até o presente momento não havia relatos na literatura sobre esta espécie, este estudo tratou-se de uma investigação do potencial desta espécie ainda desconhecida no meio científico, visando contribuir nos estudos para novos fitoterápicos e/ou medicamento contra a Diabetes Mellitus. Com isso, espera-se que este estudo possa incentivar outros estudos farmacológicos e fitoquímicos acerca desta espécie e de outras espécies da Amazônia.

7. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Nº	Descrição	Ago 2012	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2013	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
1	Levantamento Bibliográfico	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
2	Coleta, Identificação e preparação da amostra vegetal			X									
3	Caracterização fitoquímica							X	X				
4	Obtenção dos extratos brutos				X	X	X						
5	Teste de inibição da α -glucosidase <i>in vitro</i>							X	X				X
6	Partição do extrato metanólico							X	X				
7	Fracionamento do extrato metanólico									X	X	X	
8	Reunião das frações por CCD										X	X	
9	Teste da inibição da lipase <i>in vitro</i>												X
10	Análise dos Resultados											X	X
11	Elaboração do Relatório Parcial						X						
12	Elaboração do Resumo e Relatório final											X	X
13	Preparação da Apresentação Final para o Congresso de Iniciação Científica											X	X

X – Atividades realizadas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, R. M.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M.. Unusual naphthoquinones, catechin and triterpene from *Byrsonima microphylla*. **Phytochemistry**, v. 19, n. 66, October, p. 2388-2392, 2005.

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

ARUOMA, O. I. et al.. Characterization of food antioxidants, illustrated using commercial garlic and ginger preparations. **Food Chemistry**, v. 60, n. 2, p. 49–156, 1997.

BANDEIRA, F. et al. **Endocrinologia e diabetes**. Rio de Janeiro: Medsi, 2003.

BONOLI, M.; VERARDO, V.; MARCONI, E.; CABONI, M. F.; J. Antioxidant phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 52, p. 5195, 2004.

BROWNLEE, M.. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, London, v. 414, n. 13, p. 813-820, 2001.

CARDOSO, C. R. P.. **Atividade mutagênica e ativadora da resposta imune celular induzidas por *Byrsonima crassa* Niedenzu e *Byrsonima intermedia* A. Juss. (Malpighiaceae)**. 2006. 99f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

CARLOS, E. C. L. et al.. **Atividade inibitória dos extratos vegetais de *Cecropia purpurascens* sobre as enzimas α -glucosidase e a α -amilase**. In: Reunião Anual da SBPC, Manaus. Anais de resumos da 61ª Reunião Anual da SBPC. 2009.

CASTILHO, L. S.; RESENDE, V. L. S. Profilaxia antibiótica: quem necessita?. **Revista do Conselho Regional de Odontologia de Minas Gerais**, Belo Horizonte, v. 5, n. 3, p. 146-150, set./dez. 1999.

CAVALLI, V. L. L. O. et al. Avaliação in vivo do efeito hipoglicemiante de extratos obtidos da raiz e folha de bardana *Arctium minus* (Hill.) Bernh. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba v. 17, n. 1, 64-70, 2007.

COSTA, A. F. **Farmacognosia: Farmacognosia experimental**. 3. ed., v. 3. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S.. Flavonoides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.

CURIEL, A. A.. **Caracterização do efeito inibitório de *Ilex paraguariensis* e *Camellia sinensis* na atividade de lipase pancreática**. 2011. 77f. Dissertação (Mestre em Ciência da Saúde) – Universidade São Francisco, Bragança Paulista.

DA LUZ, L. P.. **Estudo do ultrassom como técnica de extração de carvões e caracterização dos hidrocarbonetos poliaromáticos**. 1998. 108f. Dissertação (Mestre em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

FELÍCIO, J. D. et al.. Triterpenos isolados das folhas de três espécies de *Byrsonima*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.62, n. 1,2, p.91-92, 1995.

GIACCO, F.; BROWNLEE, M.. Oxidative Stress and Diabetic Complications. **Circulation Research**, n. 107, p. 1058-1070, 2010.

GOTTLIEB, M. G. V. et al. Status antioxidante, Diabetes Mellitus II e Aterosclerose. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 2,n. 1, p. 99-106, 2009.

GUILHON-SIMPLICIO, F., PEREIRA, M. M. Aspectos químicos e farmacológicos de *Byrsonima* (Malpighiaceae). **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1032–41, 2011.

GUILHON-SIMPLICIO, F.. **Estudo farmacognóstico e de atividade farmacológica de *Byrsonima japurensis* A. Juss. (Malpighiaceae)**. 2009. 160f. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

HALPEM, A.; MANCINI, M. C.. O tratamento da obesidade no paciente portador de hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 7, n. 2, 2000.

HILL, J. O. Orlistat, a lipase inhibition, for weight maintenance after conventional dieting: A 1-y study. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 69, p. 1108 – 1116, 1999.

LEROITH, D.; OLEFSKY, J. M.; TAYLOR, S. I.. **Diabetes Mellitus; a fundamental and clinical text**. 3 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004.

MALAGUTI, C.. **Estresse oxidativo e susceptibilidade à transição de permeabilidade mitocondrial precedem o aparecimento do diabetes autoimune em camundongos NOD**. 2012. 100f. Tese (Doutora em Fisiopatologia Médica) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MARTNS, P. G. A.. **Caracterização de uma arsenato redutase de *Trypanosoma cruzi* e inibição de uma fosfotirosina fosfatase de *Yersinia enterocolitica* por chalconas sintéticas**. 2011. 99f. Dissertação (Mestre em Bioquímica) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MATOS, F. J. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2. ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997.

MION JÚNIOR, D.; NOBRE, F. **Risco Cardiovascular Global**. São Paulo: Lemos Editorial, 1999.

MOLYNEUX, P.. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Journal of Science and Technology**, v. 26, p. 211–219, 2004.

OLIVEIRA, J.. **Efeito da hipercolesterolemia sobre a função Cognitiva e a relação com a função mitocondrial e estresse oxidativo em córtex cerebral de camundongos deficientes**

para o receptor de LDL. 2012. 91f. Dissertação (Mestre em Bioquímica) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

PEREIRA, L. L. S. et al.. Atividade das glicosidases na presença de chá verde e de chá preto. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 4, 2010.

PEREIRA, L. L. S. et al.. **Investigação da ação do extrato de lúpulo sobre as enzimas alfa amilase, alfa glicosidase, lipase e tripsina.** In: XVIII Congresso de Pós-Graduação da UFLA, 2009, Lavras. XVIII Congresso de Pós-Graduação da UFLA, 2009.

RANDERATH, K.. **Cromatografia de capa fina.** 1 ed. Espanha: Ediciones Urmo, 1975.

REBELO, J. M.. **Avaliação da atividade antioxidante e antifúngica de análogos sintéticos da acetofenona e pró-oxidante e antitumoral de chalconas sintéticas.** 2005. 130f. Dissertação (Mestre em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

REIS, J. S. et al. Estresse oxidativo: revisão da sinalização metabólica no Diabetes tipo 1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabólica**, v. 52, n.7, p. 1096-1105, 2008.

ROLIM, T. L.. **Estudo fitoquímico de *Byrsonima gardneriana* A. Juss (Malpighiaceae).** 2009. 128f. Dissertação (Mestre em produtos naturais e sintéticos bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, Paraíba.

SERRA, S. R.; CAMPOS, R. G.. Efeito protetor do licopeno. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 4, n. 21, p.326-332, 2006.

SOUSA, C. M. M. et al.. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, 2007.

SOUSA, G.. **Uso de adoçantes e alimentos dietéticos por pessoas diabéticas.** 2006. 74f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem Geral e Especializada) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

SOUZA, P. M.. **Atividade de inibição enzimática por espécies vegetais do bioma cerrado**. 2011. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília.

WONG, S. P.; LEONG, L. P.; KOH, J. H. W.. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. **Food Chemistry**, v. 99, n. 4, p. 775-783, 2006.

YAMAGISHI, S. I. et al. Hyperglycemia potentiates collagen induced platelet activation through mitochondrial superoxide overproduction. **Diabetes**, v.6 n. 50, p. 1491-1494, 2001.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CACHINEL-FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n. 1, 147-52, 2001.