

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA – ICET
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA

ADRIANA OLIVEIRA CASTRO

PERFIL QUÍMICO E AVALIAÇÃO INIBITÓRIA DAS ENZIMAS α -AMILASE E α -
GLICOSIDASE DOS EXTRATOS DE ESPÉCIES DE *PTHIRUSA SP.* PARASITA DE
SYZYGIUM CUMINI (JAMBOLÃO) E *CITRUS SP* (LIMOEIRO)

ITACOATIARA – AM
2019

ADRIANA OLIVEIRA CASTRO

PERFIL QUÍMICO E AVALIAÇÃO INIBITÓRIA DAS ENZIMAS α -AMILASE E - α
GLICOSIDASE DOS EXTRATOS DE ESPÉCIES DE *PTHIRUSA SP.* PARASITA DE
SYZYGIUM CUMINI (JAMBOLÃO) E *CITRUS SP* (LIMOEIRO)

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Universidade Federal do
Amazonas – UFAM como requisito parcial
para a obtenção do título de Bacharel em
Farmácia.

Orientadora: Dra. Renata Takeara Hattori

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

C355p Castro, Adriana Oliveira
Perfil químico e avaliação inibitória das enzimas -amilase e -
glicosidase dos extratos de espécies de Pthirusa sp. parasita de
Syzygium cumini (jambolão) e Citrus sp. (limoeiro) / Adriana
Oliveira Castro. 2019
53 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Renata Takeara Hattori
TCC de Graduação (Farmácia) - Universidade Federal do
Amazonas.

1. Loranthaceae. 2. Pthirusa sp. . 3. atividade antioxidante. 4.
inibidores enzimáticos. I. Hattori, Renata Takeara II. Universidade
Federal do Amazonas III. Título

Dedico este trabalho: Ao meu esposo José R^{do} Góis, meus filhos José Henrique e João Miguel minha mola propulsora. Em memória ao meu pai e a minha mãe a quem devo toda a minha inspiração de lutar pelos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Senhor **JESUS CRISTO** por ter me dado força e perseverança para me levantar e enfrentar as dificuldades a Ele toda honra e toda glória. Pois Ele guardava algo muito especial e maravilhoso para minha vida.

Ao meu esposo **José Raimundo Góis** pelo incentivo, paciência, investimento e por acreditar sempre em nossos sonhos.

À minha mãe **Léia Oliveira** que sempre apoiou em meus desafios e sempre acreditou na minha vitória e a minha irmã **Adriane** que mesmo na distancia sempre encorajou-me a continuar a lutar.

À minha orientadora **Dra. Renata Takeara**, exemplo de competência, inteligência, paciência é minha referência na pesquisa, agradecer por me apoiar nesse projeto e dispor do seu tempo para me corrigir e incentivar.

Aos meus professores de Iniciação Científica **Renata Takeara** e **Anderson Guimarães**, por ter contribuído na minha formação profissional ao compartilhar seu conhecimento nos anos de estudo.

À minha amiga parceira **Lina Rodrigues** que renunciou muitas vezes seu tempo para ajudar-me a cuidar dos meus filhos, fica minha eterna gratidão, pois sua contribuição foi fundamental na realização deste sonho.

Aos meus **amigos** que tornaram essa caminhada mais fácil, principalmente aqueles que foram como alicerces me apoiando e dando suporte na nossa parceria.

“Perseverança é ter privilegio de colher os bons frutos das sementes plantadas. Nem sempre é fácil, mas vale a pena”.

Thiago Torres

RESUMO

Os inibidores enzimáticos hidrolisantes em plantas tem sido alvo para novas drogas para o tratamento da diabetes mellitus tipo 2. Espécies da família Loranthaceae são utilizadas em tratamento para várias enfermidades inclusive a diabetes. Este trabalho teve como objetivo de caracterizar o perfil químico dos extratos e frações da *Pthirusa sp.* parasita de *Syzygium cumini* e *Citrus sp.*, determinar a atividade antioxidante, ação inibitória das enzimas α -amilase e α -glicosidase. Obteve-se os extratos hidroetanólico das folhas de *Pthirusa sp.* parasitas de *Syzygium cumini* (LPACH) e *Citrus sp.* (LPL) através do aparelho de Soxhlet e fracionou-se de ordem crescente quanto sua polaridade. O perfil químico dos extratos e frações baseou-se nas reações cromáticas em tubos e por cromatografia em camada delgada (CCD). Determinou-se a atividade antioxidante pela inibição do radical DPPH. Efetuou-se a inibição da α -amilase pelo método iodométrico e α -glicosidase pelo colorimétrico-enzimático. Os extratos LPL e LPACH apresentaram taninos condensados, terpenos, flavonas, flavanonóis, saponinas e esteróides livres e evidenciou-se em (CCD) a presença de flavonoides e compostos fenólicos nos dois extratos e as frações com perfil de compostos fenólicos. O extrato LPL apresentou capacidade antioxidante. Para a inibição da α -amilase os extratos LPACH e LPL apresentaram atividade, porém todas as frações não foram ativas. Para inibição da α -glicosidase os extratos e suas frações exibiram atividade inibitória. Os resultados obtidos estimulam a continuidade deste trabalho para fins de isolamento e identificação de substâncias antioxidantes e inibidores enzimáticos nos extratos e frações.

Palavras-chave: Loranthaceae, atividade antioxidante, *Pthirusa sp.* inibidores enzimáticos

ABSTRACT

Plant hydrolyzing enzyme inhibitors have been targeted for new drugs for the treatment of type 2 diabetes mellitus. Species of the Loranthaceae family are used to treat a variety of diseases including diabetes. This work aimed to characterize the chemical profile of extracts and fractions of *Pthirusa* sp. parasite *Syzygium cumini* and *Citrus* sp., determine the antioxidant activity, inhibitory action of the enzymes α -amylase and α -glucosidase. Hydroethanolic extracts of the leaves of *Pthirusa* sp. parasites of *Syzygium cumini* (LPACH) and *Citrus* sp. (LPL) through the Soxhlet apparatus and fractionated in increasing order as its polarity. The chemical profile of the extracts and fractions was based on the chromatic reactions in tubes and thin layer chromatography (CCD). Antioxidant activity was determined by inhibiting the DPPH radical. The inhibition of α -amylase was performed by the iodometric method and α -glucosidase by the colorimetric-enzymatic method. The LPL and LPACH extracts showed condensed tannins, terpenes, flavones, flavanonols, saponins and free steroids and (CCD) showed the presence of flavonoids and phenolic compounds in both extracts and the fractions with phenolic compounds profile. The LPL extract showed antioxidant capacity. For α -amylase inhibition the LPACH and LPL extracts showed this activity, but all fractions were not active. For α -glucosidase inhibition the extracts and their fractions exhibited inhibitory activity. The results stimulate the continuity of this work for isolation and identification of antioxidant substances and enzyme inhibitors in extracts and fractions.

Keyword: Loranthaceae, *Pthirusa* sp. antioxidant activity, enzyme inhibitors.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Rendimentos do extrato (LPACH) e frações	28
Tabela 2. Rendimentos do extrato (LPL) e frações	28
Tabela 3. Prospecção de Fenóis e taninos do extrato (LPACH) e frações	29
Tabela 4. Prospecção de Fenóis e taninos do extrato (LPL) e frações	30
Tabela 5. Resultado do teste para antocianidinas, antocianinas e flavonoides das frações	32
Tabela 6. Triagem fitoquímica dos extratos e frações.....	36
Tabela 7. Teor de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu do extrato e frações	38
Tabela 8. Teor de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu do extrato e frações	38
Tabela 9. Resultado antioxidante pelo método DPPH do extrato (LPL) e frações	39
Tabela 10. Resultado antioxidante pelo método DPPH do extrato (LPACH) e frações	40
Tabela 11. Atividade inibitória enzimática α -amilase dos extratos	42
Tabela 12. Atividade inibitória enzimática da α -glicosidase nos extratos e frações	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Prospecção fitoquímica de antocianinas, antocianidinas e outras classes de flavonoides do extrato LPACH	30
Figura 2. Prospecção fitoquímica de antocianinas, antocianidinas e outras classes de flavonoides do extrato (LPL)	31
Figura 3. A) Prospecção fitoquímica para caracterização de terpenos B) Ensaio confirmatório de (Lieberman-Burchard) dos extratos	33
Figura 4. A) Teste para caracterização de saponinas do extrato LPL B) Ensaio confirmatório de (Lieberman-Burchard)	33
Figura 5. A) Teste para caracterização de saponinas do extrato LPACH B) Ensaio confirmatório de (Lieberman-Burchard)	34
Figura 6. Avaliação cromatográfica: Cromatografia em camada Delgada (CCD) ...	37

LISTA DE SIGLAS

BAW- Butanol, Ácido Acético e Água

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

CI 50- Concentração requerida para inibição de 50%

Cu²⁺- Cobre

DMSO- Dimetilsufóxido

DPPH -2,2-difenil-1-picril-hidrazila

EtOH - Etanol

Fe²⁺ Ferro

FeCl₃ - Cloreto férrico

g-grama

GAE - Ácido gálico

GPS- Sistema de Posicionamento Global

α- ALFA

HCl- Ácido clorídrico

Kg- Quilograma

mg - miligrama

μL- Microlitro

MeOH- Metanol

Na₂CO₃ - Carbonato de Sódio

NaOH- Hidróxido de sódio

Nm- Nanômetro

NP/PEG - Natural Products/Polietileno Glicol

pH- Potencial de Hidrogênio

R_f -Fator de retenção

UV- Ultra-Violeta

Δ Aquecimento

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	16
2.1.	GERAL	16
2.2.	ESPECÍFICOS	16
3	REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1.	FAMÍLIA LORANTHACEAE	17
3.2.	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	18
3.3.	DIABETE MELLITUS (DM T2) & INIBIDORES ENZIMÁTICOS DA A-AMILASE E A-GLICOSIDASE	18
4	DESCRIÇÃO METODOLÓGICA	20
4.1.	COLETA DO VEGETAL	20
4.2.	PREPARO DO EXTRATO BRUTO	20
4.3.	FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS	20
4.3.1.	RENDIMENTOS DOS EXTRATOS E FRAÇÕES	21
4.4.	PROSPECÇÃO DE CONSTITUINTES DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS E DAS FRAÇÕES	21
4.4.1.	<i>Prospecção fitoquímica em tubos de ensaio</i>	21
4.4.2.	<i>Teste de fenóis e taninos</i>	22
4.4.4.	<i>Teste de leucoantocianidinas, catequinas e flavonas</i>	22
4.4.5.	<i>Prospecção fitoquímica para caracterização de triterpenos e esteroides (lieberman-burchard)</i>	22
4.4.6.	<i>Prospecção fitoquímica para caracterização de saponinas</i>	23
4.4.7.	<i>Prospecção fitoquímica para caracterização de alcaloides</i>	23
4.5.	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)	24
4.5.1.	<i>Preparação das soluções reveladoras: natural Products – Polyethylenglicol Reagent (NP/PEG)</i>	24
4.5.2.	<i>Preparação dos eluentes: Butanol, ácido acético e água (BAW)</i>	24
4.6.	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓIS TOTAIS	24
4.7.	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DPPH PELO MÉTODO DE INIBIÇÃO DO DPPH (2,2- DIFENIL-1-PICRIL-HIDRAZILA)	25
4.8.	ENSAIOS DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA	26
4.8.1.	<i>Ensaio de Inibição da α-amilase</i>	26
4.8.2.	<i>Ensaio de Inibição da α-glicosidase</i>	27
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1.	RENDIMENTOS DOS EXTRATOS E FRAÇÕES	28
5.2.	PERFIL QUÍMICO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES	29

5.2.1. Teste de Fenóis e Taninos	29
5.2.2. Teste de antocianinas, antocianidinas e outras classes de flavonoides ..	30
5.2.3. Teste de leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas	32
5.2.4. Teste de esteroides e triterpenoides.....	33
5.2.5. Teste para caracterização de Saponinas	33
5.2.6. Teste para Alcaloides	34
5.3. AVALIAÇÃO EM PLACAS CROMATOGRÁFICAS (CCD).....	37
5.4. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓIS TOTAIS	37
5.5. DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE INIBIÇÃO DO DPPH (2,2- DIFENIL-1-PICRIL-HIDRAZILA.....	39
5.6. ENSAIOS DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA IN VITRO.....	41
5.6.1. Ensaio de Inibição da α -amilase	41
5.6.2. Ensaio de Inibição da α -glicosidase.....	43
6 CONCLUSÃO	45
7 REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos os estudos químicos e farmacológicos de plantas teve um grande avanço científico envolvendo os estudos medicinais que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas (WINK, 2004). A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de seus constituintes, tais como flavonoides, alcaloides, triterpenos, sesquiterpenos, taninos, lignanas e outros, tem sido objeto de incessantes estudos, onde já foram comprovadas as ações farmacológicas através de testes pré-clínicos com animais (BARA et al., 2009).

A química dos produtos naturais está intimamente relacionada à biodiversidade, principalmente vegetal. Neste contexto, o Brasil, que apresenta duas das maiores diversidades vegetais do planeta, a floresta amazônica e a mata atlântica, possui um valioso arsenal químico a ser estudado. Apesar de possuir essa megadiversidade, somente uma pequena parcela tem sido pesquisada cientificamente quanto ao seu potencial de produção de fármacos, extratos vegetais, inseticidas, corantes naturais e derivados (TAKAKI et al, 2007; ANDRADE et al., 2003).

A família Loranthaceae encontra-se entre as maiores famílias que possuem hemiparasitas, atacando uma grande variedade de hospedeiros (HARRIS, 1992; LEAL et al., 2006) considerada a mais importante das poucas famílias de plantas neotropicais parasitas (GENTRY, 1993). Espécies da família Loranthaceae são reconhecidas como portadoras de propriedades terapêuticas e uma variedade de compostos bioativos (VENTURELLI et al. 1981; VIEIRA et al, 2005; WONG et al, 2011). São utilizadas no mundo inteiro para tratarem diversas enfermidades, tais como: problemas respiratórios, artrites, debilidade nervosa, diabetes, inflamações, condiloma, hemorróidas e alguns tipos de câncer (CÁCERES, 1996).

De acordo com a literatura, existe uma quantidade substancial de evidências que tem indicado o papel chave dos radicais livres e outros oxidantes como grandes responsáveis pelo envelhecimento e pelas doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (ATOUI, et al., 2005).

Vários relatos indicam que o potencial antioxidante de plantas medicinais pode estar relacionado com a concentração de compostos fenólicos que

incluem os seus ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas e os taninos (OOI et al, 2006).

A Diabetes mellitus tipo 2 (DM T2) é um importante e crescente problema de saúde para todos os países, independentemente do seu grau de desenvolvimento. Em 2015, a Federação Internacional de Diabetes (International Diabetes Federation, IDF) estimou que 8,8% (intervalo de confiança [IC] de 95%: 7,2 a 11,4) da população mundial com 20 a 79 anos de idade (415 milhões de pessoas) vivia com diabetes. Se as tendências atuais persistirem, o número de pessoas com diabetes foi projetado para ser superior a 642 milhões em 2040. Cerca de 75% dos casos são de países em desenvolvimento, nos quais deverá ocorrer o maior aumento dos casos de diabetes nas próximas décadas (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015).

Diversas drogas são utilizadas para o controle dos níveis glicêmicos em portadores de Diabetes mellitus tipo 2 (DM T2), entretanto o perfeito controle é raramente alcançado (DAMASCENO et al., 2004). O Diabetes mellitus, por ser doença crônica, de tratamento contínuo, é alvo interessante para a busca de novos métodos de tratamento com a possibilidade de uso de várias espécies de plantas medicinais para o tratamento, contribuindo para triagens etnofarmacológicas e direcionamento de pesquisas que relacionem o potencial de espécies brasileiras para o tratamento desta condição patológica (TAKAKU et al., 2006).

Há uma variedade de plantas sendo pesquisadas como adjuvantes no tratamento da Diabetes mellitus atuando, tanto no tratamento da doença em si como atenuando seus sintomas e possíveis consequências e, desta forma, inúmeros estudos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de comprovar o efeito de espécies vegetais muitas vezes utilizadas apenas com base em dados empíricos (CECÍLIO, 2008).

Ensaio com inibição enzimática de extratos de plantas com compostos fenólicos presentes têm sido demonstrado em diversas literaturas. O estudo de atividade enzimática é de extrema importância devido a sua aplicabilidade nas diversas áreas da ciência. Dentre os ensaios descritos, destacam-se as atividades: inibidora de α -amilase e α -glicosidase. A capacidade inibitória de enzimas, aparentemente negativa, pode ser utilizada de forma benéfica como no tratamento da obesidade, diabetes, entre outras doenças (HARBORNE, 2000; SOUZA, 2009;

MASSARETO, 2009; PEREIRA et al, 2010).

Considerando que o estudo da composição química de plantas da família Loranthaceae tem apresentado uma ampla gama de atividades biológicas relatadas para outras espécies dessa família. Estudar essa família na região do Médio Amazonas é de grande importância, visto que diversas espécies ainda não foram submetidas a investigações químicas e/ou farmacológicas. Nesse sentido, a avaliação da composição química e o estudo de atividades biológicas dos extratos brutos e suas frações de plantas da família Loranthaceae da região poderão contribuir para investigações futuras que levem ao desenvolvimento de produtos com aplicação medicinal, nutracêuticos, cosmético entre outros.

2 OBJETIVOS

2.1. Geral

Analisar os metabólitos secundários e atividades antioxidante, inibitória frente às enzimas α -amilase, α -glicosidase nos extratos de espécies de *Pthirusa* sp. parasitas de *Syzygium cumini* (jambolão) e *Citrus sp* (limoeiro) e frações.

2.2. Específicos

Caracterizar o perfil químico dos extratos e suas frações através dos ensaios cromáticos e por CCD.

Determinar os teores fenólicos totais dos extratos e frações.

Avaliar Atividade Antioxidante pelo método de DPPH dos extratos e frações.

Analisar a atividade inibitória frente às enzimas α -amilase e α -glicosidase em ensaio in vitro dos extratos e frações.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Família Loranthaceae

Dentre as angiospermas, Loranthaceae é uma família composta de 70 gêneros e 950 espécies, e ocorrem principalmente nas regiões tropicais. É uma família de epífitas hemiparasitas, arbustivas que cresce aderida ao caule e/ou ramos das árvores, através de haustórios (um sistema de raiz), que penetram na madeira do hospedeiro de onde obtêm nutrientes e água (RIBEIRO *et al.*, 1999; ARRUDA, 2004).

De acordo com a literatura, a família Loranthaceae apresenta os principais tipos de classe como: terpenos, lignanas, flavonoides, carboidratos, ácidos graxos, ácidos aminados (YAO *et al.*, 2006); fenilpropanoides taninos, antraquinonas, saponinas (SANCHÉZ-ARREOLA *et al.*, 2004) e alcaloides (COE *et al.*, 2010).

Estudos biológicos e farmacológicos com várias espécies de Loranthaceae foram evidenciados. Segundo Ameer *et al.*, (2010) em seus estudos com a espécie *Loranthus ferrugineus* Roxb. demonstraram atividade cardiovascular e evidenciaram a presença de compostos polifenólicos. De acordo com Deeni *et al.*, (2002) relata que os extratos da espécie *Tapinanthus dodoneifolius* exibiram atividade antimicrobiana e antifúngico e nos testes fitoquímicos demonstraram a presença de antraquinonas, saponinas, taninos e alcaloides em diferentes hospedeiros.

Na Amazônia brasileira, destaca-se o estudo realizado para identificação de terpenos, fenólicos e flavonoides presentes em folhas de *Cladocolea micrantha* (Loranthaceae), uma espécie medicinal utilizada por populares no tratamento não convencional do câncer e de processos inflamatórios (GUIMARÃES, 2013). Dois flavonoides novos foram identificados na espécie: kampferol 3-O- α -L-arabinofuranosil-(1 \rightarrow 3)- α -L-raminosido e quercetina 3-O- α -L-arabinofuranosil-(1 \rightarrow 3)- α -L-raminosido (GUIMARÃES, 2005). O derivado da quercetina apresentou atividade inibidora da metástase de células de melanoma humano MV3 na concentração de 1 μ g/mL, superior ao do padrão paclitaxel (GUIMARÃES *et al.*, 2012).

3.2. Atividade Antioxidante

Antioxidantes são compostos que podem atrasar ou retardar o processo de oxidação de um composto. Isso significa que os antioxidantes podem inibir a formação de radicais livres nos estágios iniciais, ou interferir na reação de propagação das reações em cadeia dos radicais livres. (SINDHI et al., 2013). Assim, devido a diversas aplicações de antioxidantes, seus usos estão sendo extensivamente estudados em farmacologia, mais especificamente no tratamento de câncer, AVC, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas e complicações diabéticas (CRARY et al., 1984).

A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (HASLAM, 1996; SOARES, 2002; CHUN, 2005).

O grupo dos flavonóides é também conhecido como polifenólicos e geralmente ocorrem em plantas na forma de glucosídeos, sendo uma das substâncias responsáveis pela atribuição do perfil sensorial de frutas e apresentando mais de 6.000 variedades de diferentes estruturas que já foram identificadas (AHERNE et al., 2002; BOBBIO et al., 2003; CORDENUNSI et al., 2002; DEGASPARI et al., 2004; VAN DER SLUIS et al., 2001).

3.3. Diabetes Mellitus (DM T2) & Inibidores enzimáticos da α -amilase e α -glicosidase

A diabetes Mellitus (DM T2) é uma desordem crônica causada pela falta de produção de insulina pelas células beta (β)- pancreáticas ou pelo defeito nos receptores de insulina nas células-alvo, resultando em doença metabólica hiperglicêmica (OLMOS et al. 2009). A síndrome diabética está relacionada à formação de radicais livres, que são espécies reativas de oxigênio (ERO) formadas através da redução de um ou dois elétrons de oxigênio (O_2) (ERIKSSON et al., 1998; 1998; ÇIMEN, 2008). Em situações de estresse o organismo gera desequilíbrio entre

os agentes oxidantes e antioxidantes para se proteger, resulta em quadro de estresse oxidativo (HALLIWELL et al., 1999; VOLPATO et al., 2002).

A principal abordagem para o tratamento do diabetes é diminuir a hiperglicemia pós-prandial onde ocorre um retardo da absorção de glicose através da inibição de enzimas hidrolisantes de carboidratos como α -amilase e α -glucosidase no trato digestivo. Os inibidores dessas enzimas retardam o tempo de digestão dos carboidratos, causando uma redução na taxa de absorção de glicose e, conseqüentemente, atenuando o aumento de glicose plasmática pós-prandial (LEBOVITZ, 1997; CHIASSON et al., 2004).

A partir dessa visão terapêutica, muitos trabalhos foram feitos para procurar mais inibidores eficazes e seguros de α -glucosidase e α -amilase de materiais naturais para desenvolver alimentos funcionais fisiológicos para tratar diabetes (KIM et al., 2004; HIGASHI et al., 2002). Assim, os inibidores de α -glucosidase são indicados como agentes terapêuticos para o tratamento do DM (TM 2) e hiperglicemia (BARON, 1998).

A acarbose é o inibidor da glicosidase mais amplamente utilizado no tratamento da diabetes, mas também tem efeitos colaterais gastrointestinais (CONIFF et al., 1995). Relatórios etnobotânicos mostram que cerca de 800 plantas podem possuir potencial antidiabético. Portanto, os inibidores de α -glucosidase e α -amilase a partir de plantas tem atraído atenção nos últimos anos (PURANIK et al., 2010).

4 DESCRIÇÃO METODOLÓGICA

4.1. Coleta do vegetal

As folhas de espécies de *Pthirusa* parasitas de *Syzygium cumini* (jambolão) e *Citrus sp* (limoeiro) foram coletadas na região de Itacoatiara na estrada AM-010 do Km 27 sentido Itacoatiara- Manaus, sendo sua localização registrada por GPS, onde as espécie de *Pthirusa sp.* parasita de *Syzygium cumini* recebeu o código de identificação: Loranthaceae parasita de azeitoneira com herbivoria (LPACH) e Loranthaceae parasita do Limoeiro (LPL).

4.2. Preparo do extrato bruto

Posteriormente para o preparo de extrato bruto foram utilizados as folhas das espécies de *Pthirusa sp. parasita de Syzygium cumini e parasita de Citrus sp.* (limoeiro). Em seguida o material foi seco em estufa de ar quente circulante a 40°C por 72 horas e triturado em moinho de facas (marca SOLAB, modelo SL-031) para melhorar a área de contato da amostra com o solvente durante a extração. O material triturado foi armazenado em sacos de papel e previamente identificados, mantendo o material seco, livre de umidade.

A extração foi realizada através do aparelho de Soxhlet, utilizando-se 300 g do material botânico seco e moído, utilizando 6000 mL de etanol 70%. Para a concentração do extrato foi empregado o evaporador rotatório (marca FISATOM, modelo 801) para evaporação total do solvente. O extrato foi seco em banho Maria (marca SOLAB, modelo SL-150/6) regulado para 70°C e armazenado em frascos de vidro devidamente identificados, sendo o rendimento calculado posteriormente.

4.3. Fracionamento dos extratos

Para obter as frações utilizou-se 5 g dos extratos brutos das espécies LPACH e LPL. Posteriormente solubilizou em 150 mL de água destilada com auxílio do ultrassom para ajudar na solubilização das mesmas. Em seguida foi utilizado um funil de separação de 300 mL, onde foram utilizados 150 mL de cada solvente em ordem crescente de polaridade, tais como clorofórmio, acetato de etila e butanol.

As frações foram concentradas em evaporador rotatório e secas em banho Maria (marca SOLAB, modelo SL-150/6) regulado para 70°C e armazenado em frascos de vidro devidamente identificados, sendo o rendimento calculado

posteriormente. Desta forma foram obtidas as frações hexânica (LPL-H, LPACH-H), clorofórmica (LPL-H, LPACH- C), em acetato de etila (LPL-AE, LPACH-AE), butanólica (LPL-B, LPACH-B) e hidroetanólica (LPL-HE, LPACH-HE).

4.3.1. Rendimentos dos extratos e frações

Os rendimentos dos extratos obtidos foram calculados pela relação do peso do extrato seco obtido pelo peso total do material botânico utilizado no início do processo de extração empregando a seguinte fórmula:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{pf}{pi} * 100$$

Onde, pf = peso final e pi = peso inicial.

Para obter-se o rendimento das frações utilizou a seguinte fórmula:

$$\% \frac{Mff - Mfs}{MES} * 100$$

Onde:

MFF (massa do frasco com a fração)

MFS (massa do frasco seco)

MES (massa do extrato solubilizado)

4.4. Prospecção de constituintes dos extratos hidroalcoólicos e das frações

A prospecção fitoquímica foi realizada segundo a metodologia descrita por Matos (2009). Os extratos de LPACH e LPL foram analisados através de ensaios cromáticos usuais em tubos de ensaio, utilizando-se reagentes convencionais para a detecção de grupos fenólicos específicos e em placas cromatográficas de gel sílica utilizando-se para isso reagentes reveladores para a identificação de flavonoides.

4.4.1. Prospecção fitoquímica em tubos de ensaio

Inicialmente foi preparada uma solução-estoque usada para os testes. Pesando 1g dos extratos de LPACH e LPL e 30mg em uma balança analítica. Logo após realizou duas lavagens dos extratos com clorofórmio para a retirada da clorofila que poderia estar presente nas amostras.

Para as frações foi utilizado 30mg das frações (LPACH-AE, LPL-AE, LPACH-B, LPL-B, LPACH-HE e LPL-HE). Posteriormente, solubilizando o resíduo resultante da lavagem em aproximadamente 50 mL de metanol a 70% e completou-

se o volume em um balão volumétrico de 100 mL. Em seguida, ajustou-se pH da preparação para 4, com HCl 0,1 N.

A prospecção foi realizada em triplicata. Os resultados foram baseados na mudança de coloração após a reação, quando comparados com os brancos positivo (somente solução estoque preparada) e negativo (FeCl_3 mais água destilada). Os tubos foram enumerados de 1 a 6, sendo adicionado em cada tubo 3 mL do extratos metanólico de LPACH e LPL e das frações citadas acima, sendo realizados os seguintes testes:

4.4.2. Teste de fenóis e taninos

Foram adicionados três gotas de solução de FeCl_3 a 1% no tubo de número 1. As alterações após a reação foram observadas, comparando-se com os brancos positivo e negativo. O desenvolvimento das seguintes cores indica: azul avermelhado para a presença de fenóis, precipitado azul para taninos hidrolisáveis e precipitado verde para taninos condensados.

4.4.3. Teste de antocianinas, antocianidinas e outras classes de flavonoides

Utilizando os tubos de número 2, 3 e 4 para essa análise. Foi reajustado o pH nos três tubos, utilizando-se HCl para o tubo 2 e NaOH para os tubos 3 e 4. No tubo 2 o pH foi ajustado para 3; tubo 3 para pH 8,5 e tubo 4 para pH 11. Após alguns minutos, a coloração foi observada e comparada com o branco.

4.4.4. Teste de leucoantocianidinas, catequinas e flavonas

Para esse teste foram utilizados os tubos 5 e 6, nos quais ajustou-se o pH dos mesmos para 3, usando HCl e 11 usando NaOH, respectivamente. Após ajuste, os tubos de ensaio foram submetidos a aquecimento em bico de bunsen durante 2 minutos. Após esse período, a coloração foi observada e comparada com o branco. Nessa análise, as leucoantocianidinas, em pH 3, apresentam coloração vermelha, e as catequinas coloração pardo-amarelado. Em pH 11 as flavanonas coram-se de vermelho-laranja.

4.4.5. Prospecção fitoquímica para caracterização de triterpenos e esteroides (lieberman-burchard)

Foram utilizados 300 mg dos extratos e 30mg para as frações. Posteriormente foram lavadas com 80 mL de clorofórmio as amostras e depois foram transferidos e filtrados em papel filtro. O material insolúvel de cada amostra foi

guardado em béquer e as soluções geradas foram acondicionadas em béqueres de 50 mL. Em seguida foi retirado 4 ml de cada solução, transferindo para tubos de ensaio completamente secos. Em cada tubo foi adicionado 1 ml de anidrido acético e agitado suavemente. Em seguida, adicionou-se cuidadosamente, três gotas de H_2SO_4 concentrado a cada tubo, tornando a agitar suavemente, esse procedimento foi realizado em triplicata. O desenvolvimento de cores, que varia do azul evanescente ao verde persistente indica resultado positivo. (MATOS, 2009).

4.4.6. Prospecção fitoquímica para caracterização de saponinas

Inicialmente foram pesados os extratos LPACH e LPL (300mg) e as frações LPACH-AE, LPL-AE, LPACH-B, LPL-B, LPACH-HE e LPL-HE (30 mg), depois em um béquer foram lavados com 80 ml de clorofórmio e 50mL de água destilada. Após a filtração foram transferidos 3 mL de cada solução para tubos de ensaio os quais posteriormente foram fortemente agitados por 3 min.

A formação de espuma abundante e persistente de dois a três minutos é indicativo de resultado positivo. Esse teste foi realizado em triplicata. Para confirmação adicionou-se 2 ml de ácido clorídrico concentrado ao filtrado e levou para banho-maria por 1h. Após esfriar a temperatura ambiente a solução foi neutralizada com hidróxido de sódio 0,5 N e após filtração e agitação, observou-se a não formação de espuma e formação de precipitado, sendo resultado afirmativo para saponinas (MATOS, 2009).

4.4.7. Prospecção fitoquímica para caracterização de alcaloides

Foram utilizados 300 mg para os extratos e 30mg para as frações . Em seguida as amostras foram dissolvidas em 20 ml de ácido sulfúrico 1%. Posteriormente cada solução foi submetida à fervura por 2 minutos em placa aquecedora, após resfriamento a temperatura ambiente, cada solução foi filtrada através de funil com papel de filtro diretamente para um tubo de ensaio. Distribuiu-se o volume obtido igualmente em três tubos menores e gotejou-se 3 gotas do reagente de Mayer ou de Dragendorff. A formação de precipitado em dois dos três tubos o teste é positivo para alcaloides (MATOS, 2009).

4.5. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Na Cromatografia em Camada Delgada (CCD) foi utilizado placas de sílica gel Merck[®], base de alumínio reveladas sob luz ultravioleta 254 nm e 365 nm, eluidas com butanol, ácido acético e água (BAW) e revelou-se por nebulização com solução de NP/PEG, específico para revelar fenólicos e visualizados em ultravioleta (GUIMARÃES, 2005).

4.5.1. Preparação das soluções reveladoras: natural Products – Polyethyleneglicol Reagent (NP/PEG)

Preparou-se a solução de 1% “Natural Products” (NP) em 100 mL de metanol; a solução de PEG: 5% de polietilenoglicol 4000 (PEG) em 100 mL de etanol. A placa foi borrifada com solução de NP, e em seguida com solução PEG. Após 15 minutos, observou-se fluorescência intensa no UV 365 nm.

4.5.2. Preparação dos eluentes: Butanol, ácido acético e água (BAW)

Em uma proveta adicionou-se 64 mL de butanol, 16 mL de ácido acético e 80 mL de água para uma solução de 160 mL, ficando nesta proporção (4:1:5).

Estes eluentes foram utilizadas para determinação de compostos fenólicos na fase móvel BAW (4: 1: 5) e reveladas com a solução de 1% “Natural Products” (NP) (GUIMARÃES, 2005).

4.6. Determinação do Teor de Fenóis Totais

A determinação do teor de fenóis totais presentes nos extratos e frações em estudo foi realizada seguindo a metodologia descrita por Folin & Ciocalteu (1927). Esta análise foi realizada sob a orientação do professor Dr. Emerson Silva Lima da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, em Manaus.

Foram solubilizados 10 mg de cada extrato e frações em 1 ml de DMSO e a partir de cada solução realizou-se uma nova diluição, retirando-se 100 µL desta solução e diluindo-se em 900 µL de DMSO, ou seja, preparou-se uma nova solução na concentração de 1 mg/mL. Nesse ensaio foi utilizado ácido gálico 1 mg/mL, sendo esta solução padrão preparada nas mesmas condições que o extrato. Foi preparada também a solução de Folin-Ciocalteu (1:9) em água destilada. Posteriormente, adicionou-se na microplaca 10 µL do extrato e 50 µL da solução reagente de Folin. Adicionou-se também 10 µL da solução padrão à microplaca.

Incubando por 8 minutos e após este período foram adicionados 240 µL da solução de Na₂CO₃ 0,4% aos poços da microplaca com extrato. Posteriormente foi incubada por mais 3 minutos. O branco foi preparado adicionando-se as mesmas quantidades do extrato e do Na₂CO₃, porém, no lugar do reagente de Folin-Ciocalteu, adicionou-se 50 µL de água destilada. Após 3 minutos, realizou-se a leitura no leitor de ELISA (DTX 800 Multimode Detector, Beckman Coulter). Com a média das absorvâncias pode-se calcular o teor de fenóis totais em mg GAE/g conforme descrito McDONALD et al., (2001) com modificações.

4.7. Atividade Antioxidante DPPH pelo método de inibição do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)

A capacidade antioxidante dos extratos de LPACH, LPL e frações foram avaliadas segundo a metodologia descrita por Burits et al., (2000) com modificações utilizando o radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila). Este método baseia-se na transferência de elétrons de um composto com atividade antioxidante para um radical livre (DPPH) onde ao se reduzir perde sua coloração púrpura (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006). Este ensaio foi realizado sob orientação do professor Dr. Emerson Silva Lima da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, em Manaus.

Para preparar os extratos foram inicialmente utilizados 1mg dos extratos e frações e solubilizados em 1mL de DMSO (dimetilsulfóxido) ficando em uma concentração de 1mg/ mL. Posteriormente foi preparada uma solução etanólica de DPPH, utilizando 2 mg de DPPH e solubilizado em 12 mL de álcool etílico. Em seguida foram adicionados 100 µL de DMSO a partir do segundo poço da placa multipoços, sendo no primeiro e segundo poço adicionado apenas 100 µL da solução estoque preparada. Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas a partir do segundo poço transferindo-se 100 µL para os poços seguintes.

Dessa forma, os poços apresentaram as seguintes concentrações: 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, 31,25 µg/mL, 15,62 µg/mL e 7,81 µg/mL. Em seguida, adicionou-se aos poços a solução de DPPH e foram incubados por 30 minutos. Após a incubação foi realizada a leitura no leitor de ELISA (DTX 800 Multimode Detector, Beckman Coulter) no comprimento de onda 492 nm. Posteriormente foram efetuados os cálculos de porcentual de inibição (%)

inibição) baseado na absorbância do controle e utilizando o programa Excel. Quando a inibição foi maior que 50%, foram realizadas as 8 diluições seriadas para obter os valores de CI_{50} , onde foram calculados pelo programa de estatística GraphPad Prism, versão 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). O padrão utilizado foi o ácido gálico.

Fórmula do cálculo da inibição:

$$\% \text{ inibição} = 100 - [Abs_{a/p} / Abs_C] \times 100.$$

Onde: $Abs_{a/p}$ = (Absorbância do branco – Absorbância da Amostra)

Abs_C = (Absorbância do branco – Absorbância do Controle)

4.8. Ensaios de Inibição Enzimática

4.8.1. Ensaio de Inibição da α -amilase

A atividade inibidora de amilase foi realizada pelo método iodométrico segundo WILSON et al., (1982) com modificações. A inibição da α -amilase baseou-se no princípio da degradação de um substrato de amido e a posterior reação com o reagente de cor (iodo), que revela a inibição da atividade da amilase pelas amostras. Utilizou-se a acarbose como padrão de referência para este teste. O controle foi realizado em triplicata, onde utilizou o DMSO no lugar do extrato. Todos os testes envolveram as amostras e suas respectivas diluições também com suas triplicatas. O teste foi realizado numa microplaca de fundo chato contendo 96 poços (modelo Kartell) que foi lida no Leitor de Elisa (DTX 800, Multimode Detector, Beckman Coulter). Foram adicionados 20 μ L da amostra e 20 μ L da enzima amilase (Sigma Aldrich Chemical, Co, USA). Em outro poço adicionou-se 20 μ L de acarbose e 20 μ L da enzima amilase e no poço controle foram adicionados 40 μ L de DMSO.

Posteriormente foi incubada a placa em banho-maria a 37° C por 5 minutos. Decorrido este tempo, foram adicionados 50 μ L do substrato (LabTest, Lagoa Santa, MG, Brasil) em cada um dos poços e a placa foi novamente incubada nas mesmas condições por 7 minutos e 30 segundos. Após esse tempo foram adicionados 100 μ L do reagente de cor da amilase (LabTest, Lagoa Santa, MG, Brasil) diluído-se na proporção 1:1 em água destilada e 150 μ L de água destilada. Manteve-se a placa em temperatura ambiente durante 5 minutos para que fosse realizada a leitura da absorbância de 630 nm. Ao fim do teste, a inibição da amilase foi calculada através da fórmula:

$$\% \text{ inibição} = (\text{Abs amostra} / (\text{abs acarbose} - \text{Abs controle})) * 100$$

4.8.2. Ensaio de Inibição da α -glicosidase

O ensaio de inibição da enzima α -glicosidase foi realizado segundo a metodologia de Andrade-Cetto (2008). O teste de inibição da α -glicosidase foi utilizado microplaca de fundo chato contendo 96 poços (modelo Kartell), onde foi efetuada a leitura no leitor de Elisa (DTX 800, Multimode Detector, Beckman Coulter). Este é um teste colorimétrico-enzimático que basear-se no princípio da interação entre a enzima α -glucosidase obtida de *S. cerevisiae* e o reagente de cor 4-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo, que resultará num cromógeno medido espectrofotometricamente. Os testes foram realizados em triplicata para cada amostra, com as concentrações iniciadas em 10 mg/mL que foram diluídas em série.

O controle foi realizado em triplicata, onde o DMSO foi substituído pelo o inibidor, uma vez que as amostras foram diluídas em DMSO. Em cada poço da microplaca acrescentou-se 20 μ L da amostra e 175 μ L da enzima α -glucosidase, posteriormente foram incubadas em banho-maria numa temperatura de 37° C por 2 minutos. Decorrido este tempo, foram adicionados em cada poço 145 μ L do reagente de cor 4-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo, efetuando a primeira leitura no leitor de Elisa numa absorvância de 405 nm. Posteriormente, foram incubadas as placas mais uma vez nas mesmas condições por um período de 15 minutos. Em seguida foi efetuada a segunda leitura de absorvância no comprimento de onda de 405 nm. No final do teste foi calculada a inibição através da fórmula:

$$100 - (A2 \text{ amostra} - A1 \text{ amostra} / A2 \text{ controle} - A1 \text{ controle}) * 100$$

Nota: Onde: A1: absorvância da leitura inicial (tempo 0')

A2: absorvância da leitura final (tempo 15')

Controle: absorvância do teste utilizou-se DMSO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Rendimentos dos Extratos e Frações

O rendimento do extrato foi obtido relacionando-se a massa do extrato bruto resultante na extração (42,29 g) com a massa do material botânico utilizado para a extração. O extrato foi obtido a partir de (300 g) das folhas de *Pthirusa sp.* parasita de *Citrus sp.*, onde foram calculados os rendimentos na (tabela 2). Para calcular os rendimentos das frações utilizou a relação da diferença dos frascos secos tarados com a massa da fração obtida depois da secagem e dividido pela massa (5g) dos extratos LPACH e LPL.

Tabela 1. Rendimentos do extrato (LPACH) e frações

Amostra	Massa do extrato bruto (g)	Rendimento (%)
LPACH	42,29	9,4
LPACH-H	2,30	46
LPACH-C	0,52	10,4
LPACH-AE	1,55	22,2
LPACH-B	0,53	10,6
LPACH-HE	0,52	10,0

Fonte: Autor, (2017)

Legenda: LPACH (extrato de *Pthirusa sp.* parasita de (*Syzygium cumini*) e fração: hexânica LPACH-H), clorofórmica (LPACH-C), em acetato de etila (LPACH-AE), butanólica (LPACH-B) e hidroetanólica (LPACH-HE)

O rendimento do extrato LPACH foi 9,4% e as frações com maiores rendimentos foram fração em acetato de etila (31,0%) e na fração hexânica (37,8%). Segundo Rodrigues et al., (2011) afirma que o cálculo do rendimento de extratos é fundamental no cultivo e colheita de plantas medicinais, pois, implicará diretamente na massa fresca necessária para obter-se, por dado processo de secagem, determinado teor de extrato, com redução das estimativas de custo e menor perda na cadeia produtiva de plantas medicinais e fitoterápicos.

Tabela 2. Rendimentos do extrato (LPL) e frações

Amostra	Massa do extrato bruto (g)	Rendimento (%)
LPL	38,05	8,4
LPL- H	2,25	45
LPL-C	0,52	10,4
LPL-AE	0,90	18
LPL-B	0,73	14,6
LPL-HE	0,60	12

Fonte: Autor, (2017)

Legenda: LPL (extrato de *Citrus sp.*) e frações: hexânica (LPL-FH), clorofórmica (LPL-C), em acetato de etila (LPL-AE), butanólica (LPL-B) e hidroetanólica (LPL-HE)

O extrato LPL apresentou um rendimento de 8,4% e as frações LPL-H (45%) e LPACH-AE (18%) demonstraram maior rendimento às demais frações. De acordo com Bhat et al., (2005) relata que o uso de hexano no processo de extração permite o isolamento de moléculas apolares, como os flavonóides oxigenados e metoxilados, cumarinas, terpenóides lactonas sesquiterpênicas. Por outro lado, o uso do etanol permite o isolamento de substâncias polares e semipolares, como flavonóides, alcaloides, flavonas, polifenóis e taninos (DE MONTE et al., 2014).

5.2. Perfil químico dos extratos e frações

5.2.1. Teste de Fenóis e Taninos

A Tabela 3 demonstra resumidamente os resultados obtidos nos ensaios cromáticos em tubos de ensaio, realizados para dos extratos LPACH e LPL e frações correspondentes.

Tabela 3. Prospecção de Fenóis e taninos do extrato (LPACH) e frações

Amostras	Metabólitos secundários		
	Fenóis	Taninos hidrolisáveis	Taninos condensados
LPACH	-	-	+
LPACH-H	-	-	+
LPACH-C	-	-	+
LPACH-AE	-	-	+
LPACH-B	-	-	+
LPACH-HE	-	-	-

Fonte: Autor, (2017)

Legenda: (+) presença da classe química (-) ausência da classe

Os extratos LPACH e LPL e frações correspondentes, não apresentaram coloração azul e vermelho indicando a ausência de fenóis e compostos fenólicos, descritos na Tabela 3 e 4. Para a detecção de grupos fenólicos, após adição da solução de FeCl_3 em pH 4, porém os extratos LPL e LPACH apresentaram coloração esverdeada, com formação de precipitado, a coloração esverdeada, demonstra a presença de taninos condensados de acordo com Matos, (1999). A mudança de coloração e formação de precipitado foi atribuída em comparação com o branco negativo. Segundo Matos (2009), a coloração azulada, indica a presença de taninos hidrolisáveis.

Tabela 4. Prospecção de Fenóis e taninos do extrato (LPL) e frações

Amostras	Metabólitos secundários		
	Fenóis	Taninos hidrolisáveis	Taninos condensados
LPL	-	-	+
LPL-H	-	-	+

Todas as frações apresentaram coloração verde em pH 4, indicando a presença de taninos condensados, exceto nas frações hidroetanólica (LPACH e LPL). Segundo os estudos de Canchala et al., (2013) o perfil fitoquímico do extrato etanólico das folhas de *P. cucullaris* (Loranthaceae) foram evidenciados a presença das classes de flavonóides, cumarinas e taninos. A literatura afirma que compostos antioxidantes tais como os flavonoides, taninos condensados e outros polifenóis podem reduzir a glicação proteica tal como lutar contra a geração de radicais livres (STEFEEK, 2011).

5.2.2. Teste de antocianinas, antocianidinas e outras classes de flavonoides

Nas Figuras 1 e 2 podem ser observados os resultados obtidos dos extratos e frações nos testes em tubos cromáticos direcionado para detecção de antocianinas, antocianidinas e outras classes de flavonoides, realizados nos tubos 2, 3 e 4. A mudança de coloração nos tubos foi atribuída em comparação ao branco positivo da amostra.

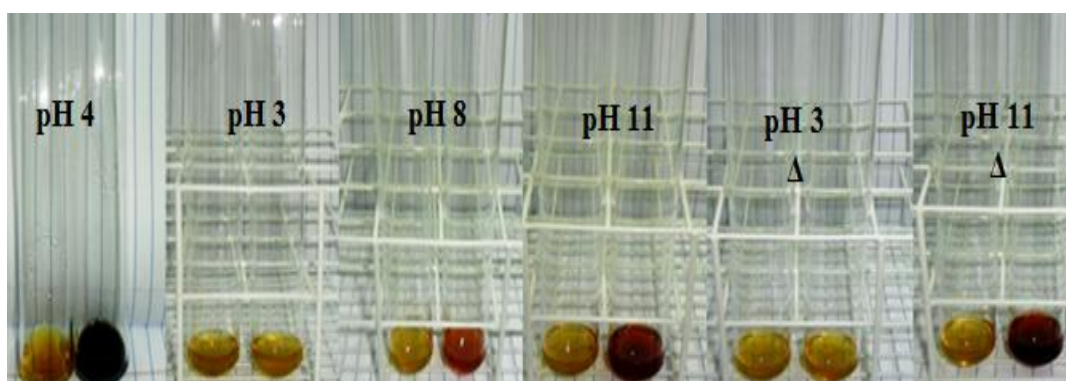


Figura 1. Prospecção fitoquímica de antocianinas, antocianidinas e outras classes de flavonoides do extrato LPACH

Fonte: Autor, (2017)

Em pH 3 (tubo 2), o extrato LPACH (figura 1) e LPL (figura 2) analisados

não apresentaram coloração vermelha e suas frações, sugestiva para a presença de chalconas, auronas, antocianinas e antocianidinas. Segundo Matos (2009) o aparecimento de cor vermelha em meio ácido, indica a presença de antocianidinas, antocianinas, chalconas e auronas.

Matos (2009) afirma que em pH 8,5, o aparecimento da cor lilás e em pH 11, o aparecimento de cor azul-púrpura é indicativo de antocianidinas e antocianinas. Portanto, a ausência de mudança de coloração para lilás em tubo 3 (pH 8,5) e azul-púrpura em tubo 4 (pH 11) confirmou a ausência de antocianinas e antocianidinas observadas no tubo 2.

No tubo 4 (pH 11), o extrato metanólico de LPACH e LPL apresentaram alteração de coloração para coloração vermelho-laranja sugere a presença de flavanonóis. Nas amostras foi observada a cor amarela indicativa para flavonas, flavonóis e xantonas.

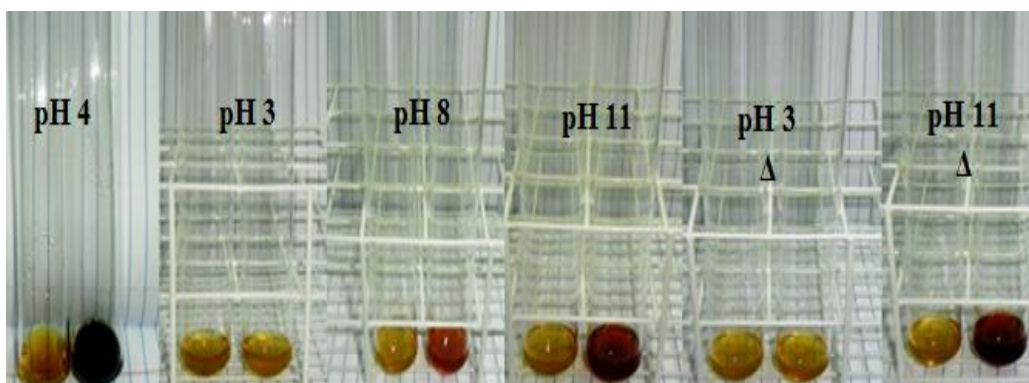


Figura 2. Prospecção fitoquímica de antocianinas, antocianidinas e outras classes de flavonoides do extrato LPL

Fonte: Autor, (2017)

Todas as frações citadas na tabela apresentaram o mesmo perfil fitoquímico para no tubo 4 (pH 11) que apresentaram alteração de coloração para vermelho-laranja, onde Matos, (2009), sugere a presença de flavanonóis, porém exceto as frações hidroetanólica apresentaram mudança de coloração em comparação ao tubo branco.

Tabela 5. Resultado do teste para antocianidinas, antocianinas e flavonoides

Amostras	Cor observada nos meios ácido e alcalino		
	Ácido ^{pH 3}	Alcalino ^{pH 8,5}	Alcalino ^{pH 11}
LPL			
LPACH	Amarelo	Vermelho	Vermelho-púrpura
LPL-AE			
LPACH- AE	-	-	Amarelo
LPL-B			
LPACH-B	Amarelo	-	Amarelo
LPL-HE			
LPACH-HE	Amarelo	-	-

Fonte: Autor, (2019)

Legenda: LPL (extrato da espécie de *Pthirusa sp.* parasita de *Citrus sp.*) e frações: (LPACH- AE, LPL-AE) em acetato de etila (LPACH-B, LPACH-B, LPL-B) butanólica e (LPACH-HE, LPL-HE) hidroetanólica (+) presença e (-) ausência da classe analisada

5.2.3. Teste de leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas

Nas figuras 1 e 2 também apresentam os resultados de cores observadas nos tubos 5 e 6 no teste para detecção de leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas. A presença de leucoantocianidinas é indicada pelo desenvolvimento de coloração vermelha em pH 3, após aquecimento (MATOS, 2009). Os resultados indicaram a ausência dessa classe de flavonoides nos extratos LPACH e LPL, pois não foi observada mudança de coloração no tubo 5. O extrato também não apresentou coloração característica para a presença de catequinas, pois desenvolveu uma coloração amarelo-clara. Segundo Matos (2009), o surgimento de cor pardo-amarelado indica a presença de catequinas na amostra.

Em pH 11 (tubo 6) e após aquecimento, o extrato apresentou coloração vermelho intenso. Segundo a literatura, a observação de coloração vermelho-laranja caracteriza a presença de flavanonas no extrato (Figuras 1 e 2). Todas as frações exibiram resultados negativos para essas classes descritas na tabela 6.

5.2.4. Teste de esteroides e triterpenoides

Para o ensaio de Lieberman-Burchard foram utilizados os extratos LPACH e LPL e as frações hexânica e clorofórmica. Conforme a metodologia de Matos (2009).

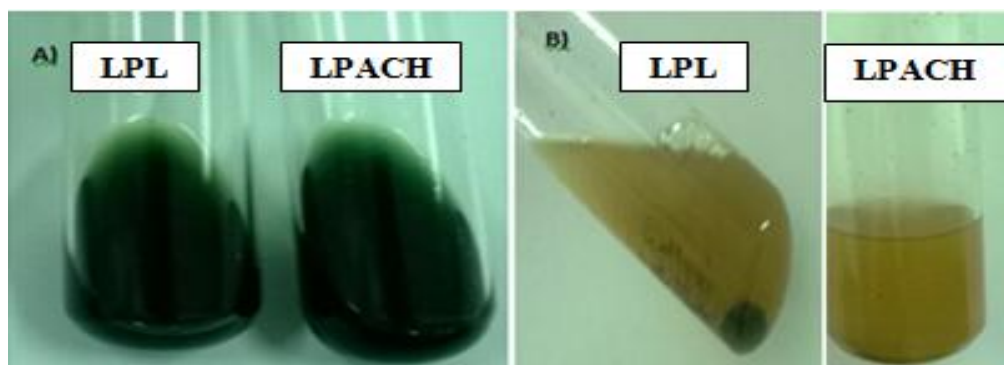


Figura 3. **A)** Prospecção fitoquímica para caracterização de terpenos (Lieberman-Burchard) **B)** Ensaio confirmatório de (Lieberman-Burchard) dos extratos
Fonte: Autor, (2017)

No ensaio realizado de Lieberman-Burchard os extratos LPACH e LPL (Figura 3) e frações LPL-H, LPACH-H, LPL-C e LPACH-C, apresentaram mudança de coloração da solução para o verde permanente descrito na Tabela 6. Esses resultados sugerem a presença de esteroides livres para a coloração verde permanente. Contrapartida as amostras testadas não apresentaram presença da coloração vermelho que indica a presença de triterpenóides pentacíclicos (MATOS, 2009).

De acordo com Leitão et al., (2013) em seus estudos de composição química do extrato hexânico de *S. marginatus* e *S. concinnus* (Loranthaceae) levou à identificação de frações ricas compostas por triterpenos pentacíclicos e esteroides.

Estudo com a espécie *Psittacanthus plagiophyllus Eichl* (Loranthaceae) apresentaram resultados positivos para terpenos (BEZERRA et al., 2017).

5.2.5. Teste para caracterização de Saponinas

Para realizar o teste de caracterização de saponinas foram utilizados os extratos LPACH, LPL e as frações LPACH-AE, LPL-AE, LPACH-B, LPL-B, LPACH-HE e LPL-HE.

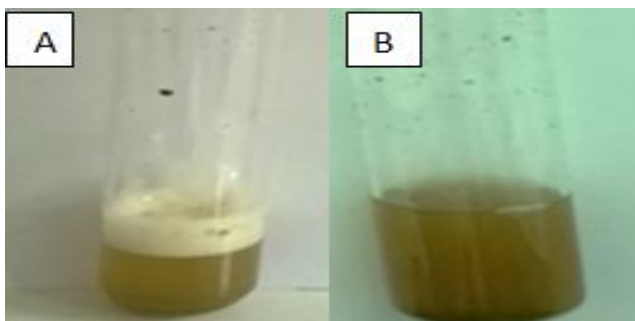


Figura 4. **A)** Teste para caracterização de saponinas do extrato LPL **B)** Ensaio confirmatório de (Lieberman-Burchard)

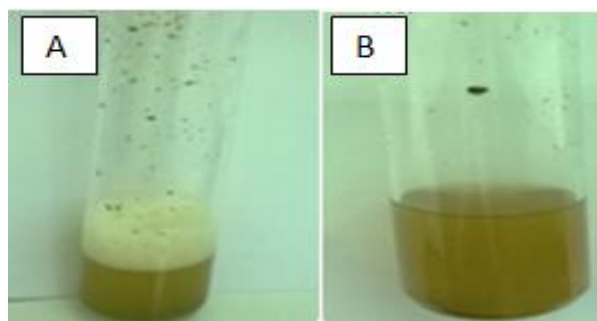


Figura 5. **A)** Teste para caracterização de saponinas do extrato LPACH **B)** Ensaio confirmatório de (Lieberman-Burchard)

O resultado do teste de saponinas foi positivo para os extratos LPL (Figura 4), LPACH (Figura 5) e as frações LPACH-AE, LPL-AE, LPACH-B, LPL-B, exceto as frações LPACH-HE e LPL-HE, descrito na Tabela 6. De acordo com Matos (2009), a formação da espuma persistente e abundante caracteriza a presença de saponinas. Durante o teste confirmatório (hidrólise ácida) não houve formação de espuma quando agitado, além disso, foi observada a presença de precipitado, devido à quebra da ligação da aglicona com a parte apolar (Matos, 2009).

Estudos de Deeni et al. (2002) relatam a presença de antraquinonas, saponinas, taninos e alcaloides em *T. dodoneifolius* (Loranthaceae) de diferentes hospedeiros pode explicar algumas das ações antimicrobianas e anti-inflamatórias .

5.2.6. Teste para Alcaloides

Os dois extratos e todas as frações em estudo não apresentaram indicativos da presença de alcaloides. De acordo com Matos, (2009) quando adiciona 3 gotas de reagente Dragendorf ocorre a formação de material floculoso pesado. Entretanto Gobbo-Neto, (2007) afirma que alguns fatores influenciam no metabolismo secundário do vegetal e devem ser considerados: desenvolvimento foliar da planta, sazonalidade, as variáveis ambientais, fatores genéticos, podem ter interferido no resultado, pois as metodologias utilizadas pelos diferentes autores também é um ponto a ser considerado.

Segundo Matos (1997), muitas vezes a mesma espécie botânica ocorre em diferentes regiões e sua composição química também pode apresentar diferenças químicas, dentre outros. Conforme Cechinel et al., (1998) o estudo químico de plantas necessita de alguns cuidados que, devem ser considerados, em alguns casos, como a falta de experiência, que leva a erros que tanto podem comprometer os resultados experimentais, como requerer maior tempo e recursos e não atingir os

objetivos almejados.

Estudos de Osadebe et al., (2004) foram encontrados constituintes moderadamente polares, tais como, terpenóides, esteróides, flavonóides e **alcaloides** no extrato hidroalcolico e frações hexânica, clorofórmica, em acetato de etila que demonstraram atividade imunomodulador na espécie *Viscum coloratum* (Loranthaceae).

Tabela 6. Triagem fitoquímica dos extratos e frações

CONSTITUENTES QUÍMICOS	LPAC H	LPACH-H	LPACH-C	LPACH-AE	LPACH-B	LPACH-HE	LPL	LPL-H	LPL-C	LPL-AE	LPL-B	LPL-HE
Leucoantocianidinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catequinas (Taninos catéquicos)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavanonas	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Flavonas, Flavonóis e Xantonas		-	-					-	-			
Chalconas e Auronas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavanonol	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-
Antocianinas e Antocianidinas		-	-					-	-			
Taninos Condensados	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-
Taninos Hidrolisáveis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esteroides Livres	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Triterpenos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saponinas	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-
Alcaloides	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: Autor (2017)

Legenda: Extratos de espécies de *Pthirusa sp.* parasita de *Syzygium cumini* (LPACH) e *Citrus sp.* (LPL); Frações: LPACH-H, LPL-H (hexânica); LPACH-C, LPL-C (clorofórmica); LPACH-AE, LPL-AE (fração em acetato de etila), LPACH-B, LPL-B (butanólica), LPACH-HE e LPL-HE (hidroetanólica) (+) presença da classe química (-) ausência da classe química

5.3. Avaliação em placas Cromatográficas (CCD)

O extrato bruto das folhas de *Pthirusa sp.* e suas frações foram analisados quanto à presença de polifenóis, principalmente flavonoides.

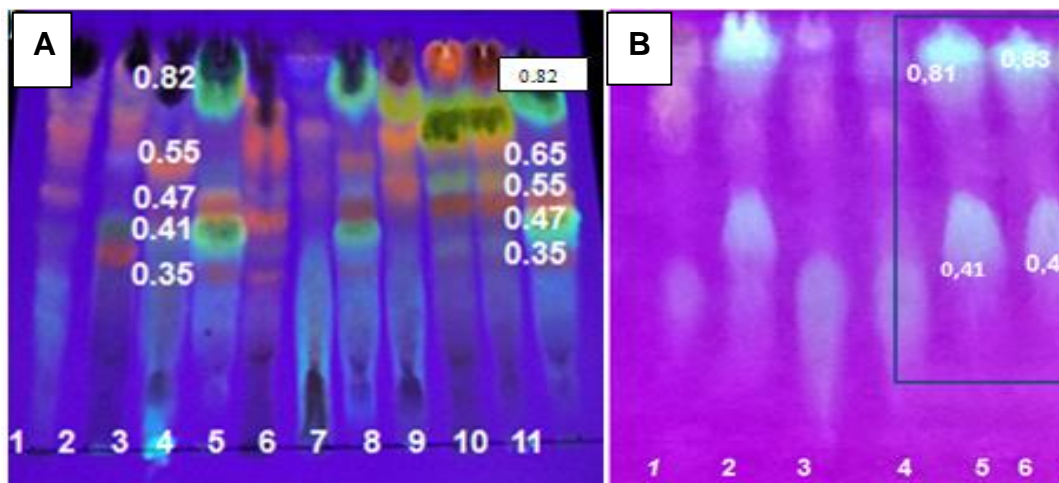


Figura 6. Avaliação cromatográfica: Cromatografia em camada Delgada (CCD); **(A)** extratos: 4- (LPL), 11- (LPACH); **(B)** frações: 1- (LPACH-AE), 2- (LPL-AE); 3- LPACH-B; 4- (LPL-B); 5- (LPACH-HE) e 6- (LPACH-HE)
 Legenda: Sistema- Butanol, água e ácido acético (4:5:1) revelador: NP/PEG UV 365 nm;
 Fonte: Autor, (2017)

O extrato bruto das folhas de *Pthirusa sp.* e suas frações foram analisados quanto à presença de polifenóis, principalmente flavonoides. O perfil cromatográfico (CCD) dos extratos hidroetanólico LPL (aplicação 4) e LPACH (aplicação 11) apresentaram duas manchas fluorescentes azuis intensas com valores de Rf semelhantes, 0,47 e 0,82. (figura 6-A). Em relação à presença de flavonoides observou-se a presença de manchas laranja característico de flavonóide nos Rfs (0,55), entretanto as frações demonstraram somente perfil para fenólico (figura 6 B).

Segundo Leitão et al., (2013) em seus estudos com espécies *Struthanthus marginatus* e *Struthanthus concinnus* (Loranthaceae) foi evidenciado em CCD a presença dos metabólitos secundários como flavonoides, terpenos e taninos.

5.4. Determinação do teor de fenóis totais

Os resultados obtidos na determinação dos fenóis totais (FT) pelo método Folin– Ciocalteu foram expressos como equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de extrato bruto e por g de material vegetal seco.

Tabela 7. Teor de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu do extrato e frações

Amostras	Fenólicos Totais (%)
LPL	17,27 ± 0,33
LPL-H	13,48± 0,576
LPL-C	11,05±0,606
LPL-AE	36,70±1,754
LPL-B	22,64±0,424
LPL-HE	9,04±0,782
Ácido gálico ^a	3,2 ± 0,56

Fonte: Laboratório de Ensaio Biológicos da Faculdade de Farmácia (UFAM)
(a) controle positivo

O extrato LPL apresentou na Tabela 7 (FT) fenóis totais de (17,27 ± 0,33), sendo que as frações LPL-C (11,04± 0,60), LPL-AE (36,70±1,75), LPL-B (22,64±0,42) apresentaram maiores teores de fenólicos totais.

Tabela 8. Teor de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu do extrato e frações

Amostras	Fenólicos Totais (%)
LPACH	14,46 ± 0,91
LPACH-H	13,06±0,292
LPACH-C	17,99±0,754
LPACH-AE	44,49±8,685
LPACH-B	24,88±1,166
LPACH-HE	6,11±0,460
Ácido gálico ^a	3,2 ± 0,56

Fonte: Laboratório de Ensaio Biológicos da Faculdade de Farmácia (UFAM)
Legenda: (a) controle positivo

O extrato LPCH apresentou (14,46 ± 0,91) e as frações LPACH-C (17,98 ± 0,75), LPACH-AE (44,49±8,685), LPACH-B (24,88±1,166), destacando as frações de acetato de etila e butanólica com maiores teores de compostos fenólicos. O menor teor de FT foi registrado na fração LPCH-E descrito na Tabela 8.

De acordo com prospecção química analisada através do CCD os extratos LPL e LPACH descrita na (figura 5-A) verificou-se manchas laranja sugerindo presença de flavonoides e as frações LPL-AE, LPL-B, LPL-HE, LPACH-AE, LPACH-B, LPACH-HE demonstraram fluorescência azul indicativo de outro perfil para fenólico (figura 5 B). Na triagem fitoquímica em tubos os extratos e frações Tabela 6,

evidenciaram as classes de flavanonol, flavonas e flavonois, onde a fração LPL-AE com maior teor de fenólicos apresenta a classe flavanonol e a fração LPACH-AE apresenta a classe flavanonol, flavonas e flavonois.

Desta forma sugere-se que os teores de fenóis totais estão relacionados com essas classes de metabólitos secundários. Segundo SILVA et al., (2010) em seus estudos com extrato hidroalcolico da espécie *Struthanthus flexicaulis* (Loranthaceae) evidenciaram em CCD a presença de flavonoides. CORDERO et al., (2003), demonstrou em seus estudos isolamento e identificação de flavonoide (rutina), isolado de *Struthanthus subtilis* (Loranthaceae). Outros trabalhos referem-se à prospecção fitoquímica de diferentes classes de metabólitos secundários e relatam reações positivas em várias partes de plantas de *Struthanthus marginatus* onde mencionam a presença de flavonóides (PISSINATE, 2006; FREIRE et al, 2011).

5.5. Determinação de atividade antioxidante pelo método de inibição do DPPH (2,2- difenil-1-picril-hidrazila

Os resultados da avaliação quantitativa da atividade antioxidante dos extratos e frações estão descritos nas Tabelas 9 e 10.

Tabela 9. Resultado antioxidante pelo método DPPH

Amostras	IC ₅₀ (µg/mL)	Média (%)	Desvio padrão
LPL	11,43	73,83	±1,83
LPL-H	*	23,0	±1,60
LPL-C	91,87	57,25	±4,05
LPL-AE	10,9	84,04	±0,21
LPL-B	22,0	83,55	±0,38
LPL-HE	97,9	53,30	±1,40
Ácido gálico ^a	3,2	93,45	±0,56

Fonte: Laboratório de Ensaios Biológicos da Faculdade de Farmácia (UFAM)

Legenda: extrato LPL de espécies de *Pthirusa sp.* parasita de *Citrus sp* e frações : LPL-H (hexânica) LPL-C (clorofórmica), LPL-AE (em acetato de etila), LPL-B(butanólica) e LPL-HE (hidroetanólica)

(*) não houve atividade antioxidante (a) controle positivo

O resultado da avaliação quantitativa da atividade antioxidante do extrato LPL foi (11,43 µg/mL) e as frações LPL-C, LPL-AE, LPL-B e LPL-HE foram (91,87; 10,97; 22,0; 97,95 µg/mL) respectivamente, destacando a fração LPL-AE (10,9 µg/mL) com atividade mais próxima do ácido gálico IC₅₀ (3,2 µg/mL) do controle positivo, descrito na Tabela 9. De acordo com Sousa et al., (2007) afirma que quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua IC₅₀, e maior será sua atividade sequestradora.

Tabela 10. Resultado antioxidante pelo método DPPH do extrato e frações

Amostra	IC ₅₀ (µg/mL)	Média (%)	Desvio Padrão
LPACH	*	27,17	±4,73
LPACH-H	*	23,67	±3,5
LPACH-C	28,8	80,77	±0,58
LPACH-AE	11,3	82,88	±0,11
LPACH-B	17,4	80,40	±1,53
Ácido gálico ^a	3,2	93,45	±1,40

Fonte: Laboratório de Ensaios Biológicos da Faculdade de Farmácia (UFAM)

Legenda: LPACH (extrato de *Pthirusa sp.* parasitas de *Syzygium cumini*) e frações: LPACH-H (hexânica), LPACH-C (clorofórmica), LPACH-AE (em acetato de etila) e LPACH-B (butanólica)

(a) controle positivo (*) não houve atividade antioxidante

O extrato LPACH não foi ativo para essa atividade. Em contrapartida as frações LPACH-C (28,8 µg/mL) LPACH-AE (97,95µg/mL) e LPL-B (22,0µg/mL) foram ativas de acordo com a Tabela 10. Comparando com o controle positivo ácido gálico (3,20 µg/mL) a fração mais próxima do controle padrão foi à fração LPL-B. Contudo podemos comparar com o extrato padronizado da espécie *Ginkgo biloba* (40 µg/mL) com os resultados deste referido trabalho, sendo que o extrato LPL (11,43 µg/mL) e LPL-AE (10,9 µg/mL), LPL-B (22,0 µg/mL), LPACH-C (28,8 µg/mL), LPACH-AE (11,3 µg/mL) e LPACH-B (17,4 µg/mL) em comparação com *Ginkgo biloba* (40 µg/mL) todas as amostras citadas acima apresentaram uma atividade superior quanto ao extrato padrão citado (MENSOR et al., 2001).

De acordo com a Tabela 7 e 8, podemos sugerir uma correlação dos teores de fenóis totais (FT) e atividade antioxidante (tabelas 9 e 10) das amostras em estudo. Sendo que o extrato LPL apresentou FT (17,27 %) e atividade antioxidante (11,43 µg/mL) e as frações LPL-AE (FT= 36,70% ; 10,9 µg/mL), LPACH-AE (44,49%

;11,3 µg/mL) , LPL-B (22,63% ; 22,0 µg/mL), e LPACH-B(24,88%; 17,4 µg/mL) respectivamente. Portanto as amostras analisadas que apresentaram maiores valores de FT e atividade antioxidante foi o extrato LPL e às frações em acetato de etila e butanólica que são frações de caráter polar.

Segundo Haslam et al., (1996) afirma que há uma correlação dos conteúdos de fenólicos com a atividade antioxidante, pois a atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Na tabela 6 são demonstradas a presença de flavonas, flavonóis e xantona que são classes de flavonoides que apresentam em sua estrutura química a presença de anel aromático, sendo uma característica que desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres que pode ser os compostos responsáveis pela a atividade antioxidante, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (CHUN et al., 2005).

Mothana et al., (2012) em seus estudos com extrato da espécie *Loranthus regularis* (Loranthaceae) foram isolados da fração de acetato de etila os compostos (quercetina 3-O-b-D-galactopiranosídeo, quercetina 3-O-b-Larabinopiranosídeo e quercetina 3-O-a-L-ramnopiranosídeo) demonstrando atividade anti-inflamatória, antinociceptiva, antipirética e antioxidante, mostrar-se o possível papel flavonóides em tais efeitos.

O estudo de Bezerra et al., (2017) com extrato de *Psittacanthus plagiophyllus* Eichl (Loranthaceae) correlacionou os conteúdos fenólicos ($12,62 \pm 0,18\%$) com as atividade antioxidante IC50 (75 µg / mL) realizadas pelo método de DPPH e demonstrou atividade anti-inflamatória nos ensaios in vitro e in vivo.

Estudos fitoquímico de Noman et al., (2019) com espécie de *Loranthus acaciae* (Loranthaceae) demonstraram no extrato bruto e na fração clorofórmica que levou ao isolamento dos quatro compostos, nomeadamente quercetina 3-O-b-Dglucopiranosídeo, quercetina 3-O-b- (6-O-galoil) -glucopiranosídeo, (-) catequina e catequina 7-O-galato demonstraram efeitos hipoglicemiante e antioxidante (85,4 µg / mL).

5.6. Ensaios de Inibição Enzimática in vitro

5.6.1. Ensaio de Inibição da α -amilase

De acordo com a Tabela 11 os extratos LPL e LPACH foram capazes de

inibir a atividade da enzima α -amilase apresentando o IC_{50} (65,0 e 34,5 $\mu\text{g/mL}$) respectivamente, apresentou uma inibição superior a do controle positivo acarbose (98,75 $\mu\text{g/mL}$).

Tabela 11. Atividade inibitória enzimática da α -amilase dos extratos

Amostra	Ensaio enzimático
	α -amilase IC_{50} ($\mu\text{g} / \text{mL}$)
LPL	65,0
LPACH	34,5

Fonte: Laboratório de Ensaios Biológicos da Faculdade de Farmácia (UFAM)
 Legenda: extratos: (LPL) de espécies de *Pthirusa sp.* parasita de *Citrus sp.* e (LPACH) parasita de *Syzygium cumini*

Nos ensaios fitoquímicos os extratos LPL e LPACH evidenciaram a presença de taninos, terpenos, esteroides livres e flavonoides descrito na (tabela 6) podendo sugerir que essa atividade inibitória da enzima α -amilase pode estar associados a esses constituintes químicos, visto que estudo in vitro com extrato aquoso da folha de *Eugenia dysenterica* demonstrou que as estruturas dos inibidores α -amilase incluem estruturas terpênicas, alcalóides, quinonas, flavonoides, fenólicos, fenilpropanoides, esteroides, xantonas (ZORZIN et al., 2014).

Tadera et al., (2006) relata em seus estudos que os polifenóis, incluindo os flavonoides, têm um efeito inibitório das enzimas α -amilase e α -glicosidase, dependendo do número e da posição dos grupos OH. Segundo Vadivelan et al., (2019) confirma em seus estudos in vivo com extratos de *Aspargo racemosus Willd* que o potencial antidiabético está relacionado com os constituintes de flavonoides e terpenos (Piero et al., 2011). Os flavonoides são antioxidantes que podem impedir o progressivo comprometimento da função das células beta pancreáticas, devido ao estresse oxidativo e pode, assim, reduzir a ocorrência de diabetes (DM2). A inibição da α -amilase, no trato digestivo dos seres humanos, é considerada eficaz no controle do diabetes, diminuindo a absorção de glicose decomposta pelo amido por esta enzima.

Todas as frações em estudo não foram ativas para esta atividade. Entretanto sugere que seus constituintes químicos presentes nas amostras poderiam ligam-se a outro sítio (sítio alostérico) em vez de o local ativo da enzima. Isso resulta em mudança conformacional da estrutura da enzima, diminuindo assim a hidrólise do

amido a glicose ou o grupo diversificado de fitoquímicos presentes nos extratos poderia ter atuado sinergicamente para produzir o potencial efeito hipoglicemiante (ALIMI et al., 2017) .

5.6.2. Ensaio de Inibição da α -glicosidase

Os extratos LPL e LPACH apresentaram atividade inibitória frente à α -glicosidase com IC₅₀ (21,4 e 6,2 $\mu\text{g/mL}$) respectivamente, evidenciaram a inibição enzimática superior a acarbose (27,9 $\mu\text{g/mL}$).

Tabela 12. Atividade inibitória enzimática da α - glicosidase dos extratos e frações

Amostra	Ensaio enzimático
	α - glicosidase IC ₅₀ ($\mu\text{g} / \text{mL}$)
LPL	21,4
LPACH	27,9
LPACH-H	*
LPACH-C	*
LPACH-AE	59,6
LPACH-B	56,3
LPACH-HE	18,16
Acarbose ^a	3,2

Fonte: Laboratório de Ensaios Biológicos da Faculdade de Farmácia (UFAM)

Legenda: (a) controle positivo (*) não foi ativo para atividade

O ensaio fitoquímico dos extratos LPL e LPACH demonstraram os constituintes químicos como flavonoides, saponinas, terpenos, esteroides livres, descrito na tabela 6 e os extratos LPL, LPACH apresentaram teores de fenóis totais de ($17,27 \pm 0,33$; $14,46 \pm 0,91$) respectivamente, onde a atividade inibitória pode estar correlacionada com a presença desses constituintes químicos citados.

Estudos relacionam atividade antidiabética com a presença de flavonóides, flavonas, flavonóis, terpenóides e antraquinonas (NEGRI, 2005) e saponinas e taninos evidenciados nos extratos aquosos de *Byrsocarpus coccineus* e *Rhoicissus tridentata* in vivo (DADA et al., 2013).

As frações LPACH-AE, LPACH-B e LPACH-HE exibiram o IC₅₀ (59,6; 56, 3 e 18,6 $\mu\text{g/mL}$) respectivamente apresentaram atividade inibitória para α -glicosidase. Entretanto, a fração LPACH-HE que demonstrou uma inibição superior a acarbose (27,9 $\mu\text{g/mL}$). Na Tabela 6 descreve a presença de flavonoides, taninos

condensados, esteroides livres e saponinas, sendo que as frações LPACH-AE, LPACH-B e LPACH-HE foram às mesmas que apresentaram maiores teores de fenóis totais (44, 48; 24,88 e 6,11 %) respectivamente. Baseado nos resultados fitoquímicos obtidos e o teor de fenóis totais pode-se sugerir que a presença desses metabólitos secundários descritos na Tabela 6 pode ser responsável pela a inibição enzimática α - glicosidase. Trabalhos in vivo com fração de saponina do extrato aquoso das folhas de *A. articulata* apresentaram inibição para α - glicosidase (KAMBOUCHE et al.,2009), diterpenos foram isolados do extrato *Plectranthus madagascariensis* exibiram atividade inibidora da glicosidase (JABEEN et al., 2013).

Esses achados corroboram com estudos prévios que relataram extratos com forte potencial inibitório contra a glicosidase como agente antidiabético.

6 CONCLUSÃO

Os extratos LPL e LPACH apresentaram taninos condensados, terpenos, flavonas, flavanonóis, saponina e esteroides livres.

Evidenciou em CCD a presença de flavonoides e compostos fenólicos nos dois extratos e nas suas frações.

O Extrato LPL demonstrou capacidade antioxidante e a fração LPL-AE com maior atividade antioxidante.

Atividade inibitória para α -amilase os dois extratos foram ativos porém nenhuma das frações foram ativas para essa enzima.

Atividade inibitória para α - glicosidase os extrato LPACH apresentou IC50 (6,2 $\mu\text{g/mL}$) e a fração LPACH-HE IC50 (18,16 $\mu\text{g/mL}$) destacando-se com maior inibição em comparação ao controle positivo (acarbose).

Desta forma este trabalho contribui com os seus resultados para uma triagem etnofarmacologica do gênero *Pthirusa sp.* da família Loranthaceae podendo acrescentar novas possibilidades para avaliar o amplo potencial antidiabético.

7 REFERÊNCIAS

1. AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. **Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 75-81, 2002.
2. ALIM, A. A.; ASHAF, A. O.T. An in vitro evaluation of the antioxidant and antidiabetic potential of *Sutherlandia montana* E. Phillips & RA Dyer leaf extracts. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 9, p. 765-772, 2017.
3. AMEER, O.Z. Pharmacological mechanisms underlying the vascular activities of *Loranthus ferrugineus* Roxb. in rat thoracic aorta. **Journal of ethnopharmacology**, v. 127, n. 1, p. 19-25, 2010.
4. ANDRADE-CETTO, A.; BECERRA-JIMÉNEZ, J.; CÁRDENAS-VÁZQUEZ, R. Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. **Journal of ethnopharmacology**, v. 116, n. 1, p. 27-32, 2008.
5. ANDRADE-NETO, V. F. Antimalarial activity of Cinchona-like plants used to treat fever and malaria in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, n. 2-3, p. 253-256, 2003.
6. ARRUDA, R. S. Especificidade de hospedeiros por *Struthanthus* aff. *polyanthus* (Loranthaceae) em uma área de cerrado, Uberlândia, Minas Gerais. 2004.
7. ATLAS, Diabetes. International diabetes federation. **IDF Diabetes Atlas, 7th edn. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation**, 2015.
8. ATOUI, A. K. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food chemistry**, v. 89, n. 1, p. 27-36, 2005.
9. BARA, M. T. F. et al./**Revista Eletrônica de Farmácia** Vol 6(3), 59-69, 2009.
10. BARON, A. D. Postprandial hyperglycaemia and α -glucosidase inhibitors. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 40, p. S51-S55, 1998.
11. BEZERRA, A. N. S. Standardization and anti-inflammatory activity of aqueous extract of *Psittacanthus plagiophyllus* Eichl.(Loranthaceae). **Journal of ethnopharmacology**, v. 202, p. 234-240, 2017.
12. BHAT, S. V.; NAGASAMPAGI, B. A.; SIVAKUMAR, M. **Chemistry of natural**

- products.** Alpha Science Int'l Ltd., 2005.
13. BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos.** São Paulo: Livraria Varela, 2003.
 14. BURITS, M.; BUCAR, F. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 5, p. 323-8, Aug 2000.
 15. CÁCERES, A. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Editorial universitaria. **Colección Monografías. Vol**, n. 1, 1996.
 16. CANCHALA, D. I. M; VANEGAS, J. B.; GARCÍA, P. G. Caracterización química, evaluación de la actividad antioxidante y antibacterial del extracto crudo de *Psittacanthus cucullaris*. **Momentos de Ciencia**, v. 10, n. 1, 2013.
 17. CECHINEL F. V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.
 18. CECÍLIO, A. B. Espécies vegetais indicadas no tratamento do diabetes. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 5, n. 3, 2008.
 19. CHIASSON, J.-L.; RABASA-LHORET, R. Prevention of type 2 diabetes: insulin resistance and beta-cell function. **Diabetes**, v. 53, n. suppl 3, p. S34-S38, 2004.
 20. CHUN, S.S. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 809-816, 2005.
 21. ÇIMEN, MY B. Free radical metabolism in human erythrocytes. **Clinica chimica acta**, v. 390, n. 1-2, p. 1-11, 2008.
 22. COE, F. G.; PARIKH, D. M.; JOHNSON, C. A. Alkaloid presence and brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay of medicinal species of eastern Nicaragua. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 4, p. 439-445, 2010.
 23. CONIFF, R. F. Multicenter, placebo-controlled trial comparing acarbose (BAY g 5421) with placebo, tolbutamide, and tolbutamide-plus-acarbose in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **The American journal of medicine**, v. 98, n. 5, p. 443-451, 1995.
 24. CORDENUNSI, B. R. Influence of cultivar on quality parameters and chemical composition of strawberry fruits grown in Brazil. **Journal of Agricultural and**

- Food Chemistry**, v. 50, n. 9, p. 2581-2586, 2002.
25. CORDERO, C. P.; PINZÓN, R.; ARÍSTIZÁBAL, F. A. Citotoxicidad de Bixina, Rutina, Pinitol B y ácido ent-16-kauren-19-oico aislados de especies Vegetales colombianas. 2003.
 26. CORTEZ, D. A. G. Contribuição ao estudo fitoquímico do *Phoradendron latifolium* (SW) Griseb.(Erva-de-passarinho). **Acta Amazonica**, v. 18, p. 433-438, 1988.
 27. COUTO, R. O. Caracterização físico-química do pó das folhas de *eugenia dysenterica* dc.(myrtaceae). 2009.
 28. CRARY, E. J.; MCCARTY, M. F. Potential clinical applications for high-dose nutritional antioxidants. **Medical Hypotheses**, v. 13, n. 1, p. 77-98, 1984.
 29. DADA, O. K. Hypoglycemic and antioxidant activities of the hydroethanolic leaf extract of *Byrsocarpus coccineus* Schumach. & Thonn.(Connaraceae). **Chinese journal of natural medicines**, v. 11, n. 6, p. 628-637, 2013.
 30. DAMASCENO, D. C. Effect of *Bauhinia forficata* extract in diabetic pregnant rats: maternal repercussions. **Phytomedicine**, v. 11, n. 2-3, p. 196-201, 2004.
 31. DE MONTE, C. Modern extraction techniques and their impact on the pharmacological profile of *Serenoa repens* extracts for the treatment of lower urinary tract symptoms. **BMC urology**, v. 14, n. 1, p. 63, 2014.
 32. DEENI, Y. Y.; SADIQ, N. M. Antimicrobial properties and phytochemical constituents of the leaves of African mistletoe (*Tapinanthus dodoneifolius* (DC) Danser) (Loranthaceae): an ethnomedicinal plant of Hausaland, Northern Nigeria. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, n. 3, p. 235-240, 2002.
 33. DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão acadêmica**, v. 5, n. 1, 2004.
 34. DUARTE- ALMEIDA, J. M.; DOS SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M.
Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 26 (2): 446-452, 2006.
 35. ERIKSSON, O.; EHRLÉ, J. Secondary metabolites in fleshy fruits: are adaptive explanations needed?. **The American Naturalist**, v. 152, n. 6, p.

- 905-907, 1998.
36. FOLIN, O. C. V. 1927. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **J. biol. chem**, v. 73, p. 627.
 37. FREIRE, S. M. de F. Antiulcerogenic activity of the extracts of *Struthanthus marginatus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 6, p. 1089-1095, 2011.
 38. GENTRY, A. H.; VASQUEZ, R. A field guide to the families and genera of woody plants of northwest South America (Colombia, Ecuador, Peru): with supplementary notes on herbaceous taxa. 1993.
 39. GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 374, 2007.
 40. GUIMARÃES, A. C. Flavonoids bearing an O-arabinofuranosyl-(1→ 3)-rhamnoside moiety from *Cladocolea micrantha*: inhibitory effect on human melanoma cells. **Natural product communications**, v. 7, n. 10, p. 1934578X1200701014, 2012.
 41. GUIMARÃES, A. C.; SILVA, C. De J.; SIANI, A. C. Etnobotânica de espécies de erva-de-passarinho ou visco (famílias Loranthaceae e Viscaceae). **Revista de fitoterapia**, v. 13, n. 2, p. 137-152, 2013.
 42. GUIMARÃES, A.C. Estudo químico e biológico de *Cladocolea micrantha* (Loranthaceae), uma planta medicinal da região Amazônica. 2005, 305p. Tese de Doutorado em Ciências. Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.
 43. HALLIWELL, B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). **Free radical research**, v. 31, n. 4, p. 261-272, 1999.
 44. HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 481-504, 2000.
 45. HARRIS, M. I. Classification of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. **International textbook of diabetes mellitus**, p. 3-18, 1992.
 46. HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **Journal of natural products**, v. 59, n. 2, p. 205-215, 1996.
 47. HIGASHI, Y. Endothelial function and oxidative stress in renovascular

- hypertension. **New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 25, p. 1954-1962, 2002.
48. HOSTANSKA, K. A plant lectin derived from *Viscum album* induces cytokine gene expression and protein production in cultures of human peripheral blood mononuclear cells. **Natural immunity**, v. 14, n. 5-6, p. 295-304, 1995.
49. JABEEN, B. Isolation of natural compounds from *Phlomis stewartii* showing α -glucosidase inhibitory activity. **Phytochemistry**, v. 96, p. 443-448, 2013.
50. KAMBOUCHE, N. Hypoglycemic and antihyperglycemic effects of *Anabasis articulata* (Forssk) Moq (Chenopodiaceae), an Algerian medicinal plant. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 20, 2009.
51. KIM, Y.K. Isolation of flavonol rhamnosides from *Loranthus tanakae* and cytotoxic effect of them on human tumor cell lines. **Archives of pharmacal research**, v. 27, n. 1, p. 44-47, 2004.
52. LEAL, L.; BUJOKAS, W. M.; BIONDI, D. Análise da infestação de erva-de-passarinho na arborização de ruas de Curitiba, PR. **Floresta**, v. 36, n. 3, 2006.
53. LEOVITZ, H. E. Alpha-glucosidase inhibitors. **Endocrinology and metabolism clinics of North America**, v. 26, n. 3, p. 539-551, 1997.
54. LEITÃO, F. Secondary metabolites from the mistletoes *Struthanthus marginatus* and *Struthanthus concinnus* (Loranthaceae). 2013.
55. MASSARETTO, I. L. **Efeito do cozimento e ação dos compostos fenólicos de arroz integral na inibição da enzima conversora de angiotensina I e da alfa-amilase**. 2009. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
56. MATOS, F. J. de A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 3. ed./ Fortaleza: Edições UFC, p.15. 2009.
57. MATOS, FJ de A. **Introdução à fitoquímica experimental**. edições UFC, 1997.
58. MCDONALD, S.; PRENZLER, D. P.; ANTOLOVICH, M.; ROBARDS, K. Phenolic content and antioxidant of olive extracts. *Food Chem.* v. 73, p. 73-84, (2001).
59. MENSOR, L. L.; MENEZER, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 127-130, 2001.

60. MOTHANA, R. A. A et al. Anti-inflammatory, antinociceptive, antipyretic and antioxidant activities and phenolic constituents from *Loranthus regularis* Steud. ex Sprague. **Food chemistry**, v. 130, n. 2, p. 344-349, 2012.
61. NEGRI, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 121-142, 2005.
62. NOMAN, O. M. et al. Phytochemical analysis and anti-diabetic, anti-inflammatory and antioxidant activities of *Loranthus acaciae* Zucc. Grown in Saudi Arabia. **Saudi Pharmaceutical Journal**, 2019.
63. OOI, A. et al. An antioxidant response phenotype shared between hereditary and sporadic type 2 papillary renal cell carcinoma. **Cancer cell**, v. 20, n. 4, p. 511-523, 2011.
64. OLMOS, P. et al. Treatment of diabetic ketoacidosis using 2009 American Diabetes Association guidelines. **Revista medica de Chile**, v. 142, n. 10, p. 1267-1274, 2014.
65. OSADEBE, P. O.; OKIDE, G. B.; AKABOGU, I. C. Study on anti-diabetic activities of crude methanolic extracts of *Loranthus micranthus* (Linn.) sourced from five different host trees. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, n. 2-3, p. 133-138, 2004.
66. PEREIRA, L. L. Atividade das glicosidases na presença de chá verde e de chá preto. **Rev. bras. plantas med**, v. 12, n. 4, p. 516-518, 2010.
67. PIERO, N. M. Hypoglycemic activity of some kenyan plants traditionally used to manage diabetes mellitus in Eastern Province. 2011.
68. PISSINATE, K. Atividade citotóxica de *Piper nigrum* e *Struthanthus marginatus*. Estudo preliminar da correlação entre a citotoxicidade e hidrofobicidade da piperina e derivados sintéticos. 2006.
69. PURANIK, N. K. K.F.; DEVI, S. Anti-diabetic activity of *Tinospora cordifolia* (Willd.) in streptozotocin diabetic rats; does it act like sulfonylurea? *Turk J Med Sci* 2010; 40:265–270
70. RIBEIRO, J. E. L. S. Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. **Flora da Reserva Ducke Manaus-AM INPA-DFID**, 1999.
71. RODRIGUES, T. S. Métodos de secagem e rendimento dos extratos de folhas

- de *Plectranthus barbatus* (boldo-da-terra) e *P. ornatus* (boldomiúdo). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, p. 587-590, 2011.
72. SÁNCHEZ-ARREOLA, E.; MAITI, R. K.; TRUJILLO-PÉREZ, B. Morpho-anatomical characters and secondary metabolites from *Psittacanthus calyculatus* (Loranthaceae). **Phyton (Buenos Aires)**, 2004.
73. SINDHI, V. Potential applications of antioxidants—A review. **Journal of Pharmacy Research**, v. 7, n. 9, p. 828-835, 2013.
74. SOUSA, B. A. de A. **Funcionalidade dos extratos fenólicos obtidos pelo cultivo semi-sólido de resíduos de abacaxi (*Ananas comusus L.*) e goiaba (*Psidium guajava L.*)**. 2009. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
75. SOUSA, C.M.M. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.
76. STEFEK, M. Natural flavonoids as potential multifunctional agents in prevention of diabetic cataract. **Interdisciplinary toxicology**, v. 4, n. 2, p. 69-77, 2011.
77. TADERA, K. Inhibition of α -glucosidase and α -amylase by flavonoids. **Journal of nutritional science and vitaminology**, v. 52, n. 2, p. 149-153, 2006.
78. TAKAKU, M. Tipos de diabete. **Femina**, v. 34, n. 11, p. 763-766, 2006.
79. VADIVELAN, R.; KRISHNAN, R. G.; KANNAN, R. Antidiabetic potential of *Asparagus racemosus* Willd leaf extracts through inhibition of α -amylase and α -glucosidase. **Journal of traditional and complementary medicine**, v. 9, n. 1, p. 1-4, 2019.
80. VAN DER SLUIS, A. A. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 8, p. 3606-3613, 2001.
81. VARELA, B. G. El "muérdago criollo", *Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh-Loranthaceae-. Desde el uso popular hacia el estudio de los efectos farmacológicos. **Dominguezia**, v. 17, n. 1, p. 31-50, 2001.
82. VENTURELLI, M. Estudos sobre *Struthanthus vulgaris* Mart.: anatomia do fruto e semente e aspectos de germinação, crescimento e desenvolvimento. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 4, p. 131-147, 1981.
83. VIEIRA, O. M. C. Antimicrobial activity of *Struthanthus vulgaris* (erva-de-

- passarinho). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 149-154, 2005.
84. VOLPATO, G. T. et al. Revisão de plantas brasileiras com comprovado efeito hipoglicemiante no controle do Diabetes mellitus. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, p. 35-45, 2002.
85. WILSON, J. J.; INGLEDEW, W. M. Isolation and characterization of *Schwanniomyces alluvius* amyolytic enzymes. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 44, n. 2, p. 301-307, 1982.
86. WINK, M. Phytochemical diversity of secondary metabolites. **Encyclopedia of plant and Crop Science**, New York, p. 915-919, 2004.
87. WONG, D.Z.H.; KADIR, H.A.; LING, S.K. Bioassay-guided isolation of neuroprotective compounds from *Loranthus parasiticus* against H₂O₂-induced oxidative damage in NG108-15 cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 256-264, nov. 2011.
88. YAO, H. Antioxidative flavanone glycosides from the branches and leaves of *Viscum coloratum*. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 54, n. 1, p. 133-135, 2006.
89. ZEE-CHENG, R.K.Y. Anticancer research on Loranthaceae plants. **Drugs of the Future**, v. 22, n. 5, p. 519-530, 1997.
90. ZORZIN, F. M. Avaliação da atividade de inibição de alfa-amilase e padronização do extrato aquoso da folha de *Eugenia dysenterica*. 2014