



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
PROGRAMA INTERDISCIPLINAR EM BIOCÊNCIAS APLICADAS – PIBA



Tuanny Cavatão de Freitas

***Syzygium sp:* compostos bioativos e ação sobre as enzimas digestivas**

Uberaba (MG)

2017



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
PROGRAMA INTERDISCIPLINAR EM BIOCÊNCIAS APLICADAS – PIBA



Tuanny Cavatão de Freitas

***Syzygium sp*: compostos bioativos e ação sobre as enzimas digestivas**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Interdisciplinar em Biociências Aplicadas, área de concentração em produtos naturais e sintéticos bioativos, para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Chrystian Araújo Pereira

Uberaba (MG)

2017

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

F938s Freitas, Tuanny Cavatão de
Syzygium sp: compostos bioativos e ação sobre as enzimas digestivas / Tuanny Cavatão de Freitas. -- 2017.
58 f. : il., fig., tab.

Dissertação (Mestrado Interdisciplinar em Biociências Aplicadas)
-- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2017
Orientador: Prof. Dr. Chrystian Araújo Pereira
Coorientador: Prof. Dr. Ricardo José Mendonça

1. Diabetes mellitus. 2. Obesidade. 3. *Syzygium*. 4. Inibidores enzimáticos. I. Pereira, Chrystian Araújo. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.379-008.64

TUANNY CAVATÃO DE FREITAS

***Syzygium sp*: compostos bioativos e ação sobre as enzimas digestivas**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Interdisciplinar em Biociências Aplicadas, área de concentração em produtos naturais e sintéticos bioativos, para obtenção do título de mestre.

12 de junho de 2017.

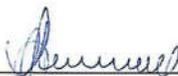
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Chrystian Araújo Pereira – Orientador
Universidade Federal de Lavras



Prof. Dra. Livia das Graças Vieito Lombardi Teodoro
Universidade Federal do Triângulo Mineiro



Prof. Dra. Aline Carvalho Pereira
Universidade Federal de Lavras

*Dedico este trabalho à minha família,
em especial aos meus pais e irmã,
pelo apoio incondicional,
por estarem ao meu lado em todos os momentos,
e por não me deixarem desanimar.
Dedico a todos, que direta ou indiretamente,
contribuíram para a conclusão deste Mestrado.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos professores da UFTM por todos os ensinamentos transmitidos durante o período de pós-graduação.

Agradeço, em especial, o meu orientador Chrystian pelo apoio, dedicação e confiança. Pela oportunidade de realizar mais este trabalho e por me mostrar, novamente, que toda a luta valeria a pena!!!

À minha amiga de pós-graduação Pamela e aos técnicos do Laboratório de Bioquímica da UFTM, Thaíla, Geraldo, Rhéltheer e Flávio, agradeço pela colaboração durante todo o andamento dos ensaios e trabalhos realizados neste mestrado.

À Prof. Dra. Karina Vicentine, por disponibilizar o Laboratório de Farmacologia e pela orientação nos ensaios de citotoxicidade e no *screening* fitoquímico.

Ao Prof. Dr. Ricardo Mendonça, pela co-orientação e execução da análise com o Maldi-ToF.

Ao Prof. Ronaldo Oliveira, às doutorandas Pamela e Angélica, pela realização essencial dos cálculos teóricos.

À Prof. Dra. Ana Carolina da Silva, pelo orientação nas análises de antioxidantes de fenólicos totais.

À Fapemig pela bolsa de mestrado.

A todos que participaram deste momento de crescimento profissional, muito obrigada!!!

RESUMO

Atualmente, o diabetes mellitus e a obesidade representam alguns dos maiores problemas de saúde pública. Devido ao elevado custo do tratamento medicamentoso, a dificuldade ao acesso a tratamentos médicos e a larga tradição da população no uso de espécies vegetais, torna-se necessário a busca por alternativas mais acessíveis, como inibidores das enzimas digestivas presentes em fontes naturais, como as plantas medicinais. Um exemplo é a espécie *Syzygium sp*, referenciada como potencial agente hipoglicemiante e emagrecedor. Portanto, considerando o seu alto potencial de uso na terapia, a necessidade de mais estudos - especialmente os relacionados à eficácia, ao mecanismo de ação hipoglicemiante e antioxidante - e a escassez de informações relacionadas ao seu perfil de inibição das enzimas digestivas, os objetivos do trabalho foram: obter amostras de chás comerciais de *Syzygium sp*, preparar extratos brutos pelo método de infusão na proporção de 1:200 e realizar ensaios de inibição das enzimas digestivas, antes e após a exposição a um fluido gástrico simulado; determinar a presença de compostos fenólicos totais, alcalóides, taninos, flavonóis e flavonas e avaliar a capacidade antioxidante; avaliar a cinética enzimática frente aos inibidores; investigar a presença de inibidores de alfa-amilase nos extratos e realizar estudos teóricos para elucidar o suposto mecanismo de inibição enzimática da amilase por reconhecidos inibidores. As amostras dos chás de *Syzygium sp* demonstraram baixos percentuais de inibição das enzimas digestivas na diluição 1:200. A atividade antioxidante foi significativa, embora os teores de compostos fenólicos totais, de flavonóis e flavonas, de alcalóides e de taninos não foram expressivos nesta diluição. A espectroscopia MALDI/ToF sugere a presença da luteolina e o *docking* molecular revelou que tanto a luteolina quanto o amido se ligam no mesmo sítio ativo da amilase, mas de forma incompetitiva. Conclui-se que a matriz complexa dos extratos de jambolão seja responsável pela variação do perfil inibitório das amostras e que estudos adicionais devem ser conduzidos para elucidação da eficácia e segurança do uso de extratos de *Syzygium sp*, *in vivo*. Logo, considerando a aparente falta de padronização das amostras, ainda não é recomendável seu uso pela população para o auxílio no tratamento do diabetes e da obesidade.

Palavras – chave: *Syzygium*, diabetes, obesidade, enzimas digestivas.

ABSTRACT

Currently, diabetes mellitus and obesity represent some of the greatest public health problems. Due to the high cost of drug treatment, the difficulty in accessing medical treatments and the wide tradition of the population in the use of plant species, it is necessary to search for more accessible alternatives, such as inhibitors of digestive enzymes present in natural sources, such as medicinal plants. An example is the species *Syzygium sp*, referred to as hypoglycemic and efficient in weight loss. Therefore, considering its high potential for use in therapy, the need for further studies - especially those related to efficacy, hypoglycemic and antioxidant mechanism of action - and the scarcity of information related to its inhibition profile of digestive enzymes, the objectives were: obtain samples of *Syzygium sp* commercial teas, prepare raw extracts by the infusion method in a ratio of 1: 200 and carry out digestion enzyme inhibition tests, before and after exposure to a simulated gastric fluid; determine the presence of total phenolics, alkaloids, tannins, flavonols and flavones and evaluate the antioxidant capacity; evaluate enzymatic kinetics against inhibitors; investigate the presence of alpha-amylase inhibitors in the extracts and carry out theoretical studies to elucidate the supposed mechanism of enzymatic inhibition of amylase by recognized inhibitors. *Syzygium sp* tea samples showed low percentages of inhibition of digestive enzymes at the 1: 200 dilution. The antioxidant activity was significant, although the contents of total phenolic compounds, flavonoids and flavones, alkaloids and tannins were not expressive at this dilution. MALDI/ToF spectroscopy suggests the presence of luteolin and molecular docking revealed that both luteolin and starch bind in the same active site of the amylase, but in a competitive manner. It is concluded that the complex matrix of the jambolan extract is responsible for the variation of the inhibitory profile of the samples and that additional studies should be conducted to elucidate the efficacy and safety of the use of extracts of *Syzygium sp* in vivo. Therefore, considering the apparent lack of standardization of the samples, it is still not recommended its use by the population to aid in the treatment of diabetes and obesity.

Key words: *Syzygium*, diabetes, obesity, digestive enzymes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Jambolão (<i>Syzygium sp</i>).....	22
Figura 2 - Estrutura química dos flavonóides.....	24
Figura 3 - Teste qualitativo para identificação de alcalóides. A positividade da reação é observada pela formação de precipitado (Seta: controle positivo).....	41
Figura 4A - Espectroscopia MALDI/ToF – Amostra A. Faixa vermelha: fluido gástrico. Faixa azul: amostra pura. Faixa verde: amostra com fluido gástrico.....	42
Figura 4B - Espectroscopia MALDI/ToF – Amostra B. Faixa vermelha: fluido gástrico. Faixa azul: amostra pura. Faixa verde: amostra com fluido gástrico.....	42
Figura 4C - Espectroscopia MALDI/ToF – Amostra C. Faixa vermelha: fluido gástrico. Faixa azul: amostra pura. Faixa verde: amostra com fluido gástrico.....	43
Figura 4D - Espectroscopia MALDI/ToF – Amostra D. Faixa vermelha: fluido gástrico. Faixa azul: amostra pura. Faixa verde: amostra com fluido gástrico.....	43
Figura 4E - Espectroscopia MALDI/ToF – Amostra E. Faixa vermelha: fluido gástrico. Faixa azul: amostra pura. Faixa verde: amostra com fluido gástrico.....	44
Figura 5 – Estruturas químicas em A: Amido e B: Luteolina.....	45
Figura 6 - Representações esquemáticas na forma de folhas e hélices com os respectivos possíveis sítios de ligação e interação dos resíduos de aminoácidos da macromolécula α -amilase (cód. PDB: 1PPI) complexada em A e B: Luteolina (cód. PDB: 4qya) e em C e D: Amido.....	46
Figura 7. A e C – Superfície do potencial eletrostático do bolsão catalítico da macromolécula α -amilase (cód. PDB: 1PPI) complexada em A: Luteolina (cód. PDB: 4qya) e em C: Amido. As regiões em azul indicam baixa densidade eletrônica e as regiões em vermelho indicam alta densidade eletrônica. B e D - Representações esquemáticas na forma de folhas e hélices da macromolécula α -amilase (cód. PDB: 1PPI) complexada em B: Luteolina (cód. PDB: 4qya) e em D: Amido.....	46

Figura 8 – Representação esquemática e gráfico de Lineweaver-Burk para inibidor
acompetitivo.....48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Médias das porcentagens de inibição das enzimas digestivas por extratos aquosos de <i>Syzygium sp</i> obtidos por infusão na proporção de 1:200, antes e após a exposição a um fluido gástrico simulado.....	35
TABELA 2 - Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais dos extratos aquosos de <i>Syzygium sp</i> obtidos por infusão na proporção de 1:200.....	39
TABELA 3 - Cinética enzimática dos extratos aquosos de <i>Syzygium sp</i> obtidos por infusão na proporção de 1:200.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RENISUS: Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS

SUS: Sistema Único de Saúde

DCV: Doenças cardiovasculares

HMG-CoA: 3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA

UV: Ultravioleta

UFTM: Universidade Federal do Triângulo Mineiro

ICBN: Instituto de Ciências Biológicas e Naturais

ICENE: Instituto de Ciências Exatas, Naturais e Educação

ICTE: Instituto de Ciências Tecnológicas e Exatas

P/v: peso/volume

BApNA: *p*-benzoil-D-L arginina *p*-nitroanilida

USP: The United States Pharmacopeia

K_m: Constante de afinidade

K_i: Constante de inibição

V/v: volume/volume

DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

Rpm: Rotação por minuto

DMSO: Dimetilsulfóxido

CHCA: Ácido alfa-ciano-4- hidroxicinâmico

PDB: Protein Data Bank

TAE: Ácido Tânico Equivalente

ILE: Isoleucina

HIS: Histidina

LYS: Lisina

GLN: Glutamina

TYR: Tirosina

TRP: TripToFano

ES: Enzima-Substrato

ESI: Enzima-Substrato Inativo

Vmax: Velocidade máxima

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS E	xi
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 Diabetes.....	17
2.2 Obesidade.....	19
2.3 <i>Syzygium sp.</i>	20
2.4 Enzimas digestivas.....	23
2.5 Compostos fenólicos.....	23
2.6 Atividade antioxidante.....	25
2.7 Espectrometria MALDI/ToF.....	25
2.8 Cálculos Teóricos.....	26
3 MATERIAS E MÉTODOS.....	29
3.1 <i>Syzygium sp.</i>	29
3.1.1 Obtenção e preparo das amostras.....	29
3.1.1.1 Infusão.....	29
3.2 Atividade enzimática.....	29
3.2.1 Obtenção das enzimas.....	29
3.2.2 Atividade de α -amilase.....	30
3.2.3 Atividade de tripsina.....	30
3.2.4 Preparo do fluido gástrico simulado.....	30
3.3 Cinética enzimática da α -amilase.....	30
3.4 Determinação de compostos fenólicos totais.....	31
3.5 Atividade antioxidante.....	31
3.6 Identificação e quantificação de taninos.....	31
3.7 Determinação de flavonóis e flavonas.....	32
3.8 Teste qualitativo para identificação de alcalóides.....	32
3.9 Espectroscopia MALDI/ToF.....	32

3.10 Estudos Teóricos.....	33
3.11 Análise estatística.....	33
4 RESULTADOS.....	34
4.1 Inibição da α -amilase.....	34
4.2 Inibição da tripsina.....	37
4.3 Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais.....	38
4.4 Determinação de flavonóis e flavonas, identificação e quantificação de taninos e teste qualitativo para identificação de alcalóides.....	40
4.5 Espectroscopia MALDI/ToF.....	42
4.6 <i>Docking</i> molecular.....	45
4.7 Cinética enzimática.....	47
5 CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

1 INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus e a obesidade representam alguns dos maiores problemas de saúde pública da atualidade. Cerca de 80% a 90% dos indivíduos que desenvolvem o diabetes tipo 2 são obesos. O diabetes tipo 2 é um distúrbio metabólico que tem na resistência à ação de insulina o seu principal fator. De progressão lenta e silenciosa, seus prejuízos ao portador são inúmeros e graves. O indivíduo obeso apresenta um tecido adiposo aumentado e que nesse estado, produz uma série de substâncias que diminuem a capacidade do organismo captar a glicose - liberada após a ingestão de alimentos - e transformá-la em energia. Esta captação de glicose pelas células é fundamental para que o indivíduo produza energia. O diabetes tipo 2 já atinge também crianças e adolescentes. Uma criança ou um adolescente que apresente predisposição genética pode desde cedo apresentar certa resistência à insulina, que é agravada pela obesidade (Aguiar & Manini, 2013; Araújo et al., 2013).

Devido ao alto custo do tratamento medicamentoso, a dificuldade ao acesso a tratamentos médicos e a vasta tradição da população no uso de espécies vegetais, torna-se promissora a busca por alternativas mais acessíveis, como inibidores das enzimas digestivas presentes em fontes naturais, como as plantas medicinais (Freitas et al., 2014).

As plantas medicinais são uma das fontes ricas para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos, devido à grande presença de metabólitos secundários. Estudos da diversidade metabólica e os seus efeitos sobre diversas doenças por métodos *in vitro* serão úteis para a descoberta de novas terapêuticas (John et al., 2014; Widyawati et al., 2015). Um exemplo é a espécie *Syzygium sp*, referenciada como potencial agente hipoglicemiante e emagrecedor (Srivastava & Chandra, 2013; Baliga et al., 2013; Freitas et al., 2015).

Conhecido no Brasil como "jambolão", *Syzygium sp* é uma árvore pertencente à família *Myrtaceae*. Investigações fitoquímicas revelaram que as folhas de *Syzygium sp* contêm vários terpenóides, alcalóides, lignanas, compostos fenólicos - incluindo a quercetina, miricetina, sitosterol - e ácido betulínico. Além disso, Karthic et al. (2008) trabalhando com extratos aquosos de sementes de *Syzygium cumini*,

identificaram o ácido betulínico e a luteolina como os principais inibidores da alfa-amilase pancreática.

Os usos medicinais de *Syzygium sp* foram reconhecidos em diferentes sistemas de medicina popular tradicional, sendo uma das plantas mais usadas no mundo para o tratamento da diabetes. Além disso, esta espécie tem sido usada para o tratamento de leishmaniose, doenças causadas por bactérias, fungos e vírus, inflamação, diarreia crônica e intestinal e úlceras do trato geniturinário. Estudos também demonstraram que o jambolão tem propriedades anti-alérgica, anti-hiperglicêmica, anti-hiperlipidêmica e antioxidante (Rodrigues et al., 2014; Chagas et al., 2015).

Nesse contexto, o Ministério da Saúde, em 2009, incluiu *Syzygium sp* na lista da RENISUS (Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS), com o objetivo de orientar e direcionar pesquisas com espécies vegetais potencialmente promissoras para uso terapêutico, mas que ainda precisam de estudos mais conclusivos, para que possam ser usadas pela população de forma segura e eficaz no tratamento das principais doenças do país (Ministério da Saúde, 2009).

Logo, considerando o seu grande potencial de uso na terapia, a necessidade de mais estudos - especialmente os relacionados à eficácia, ao mecanismo de ação hipoglicemiante e antioxidante – e a escassez de informações relacionadas ao seu perfil de inibição das enzimas digestivas, os objetivos do trabalho foram: (1) obter amostras de chás comerciais de *Syzygium sp* e preparar extratos brutos pelo método de infusão na proporção de 1:200 simulando o seu uso doméstico; (2) utilizar esses extratos para realizar ensaios de inibição das enzimas digestivas, antes e após a exposição a um fluido gástrico simulado; (3) determinar a presença de fenólicos totais, alcalóides, taninos, flavonóis e flavonas; (4) avaliar a capacidade antioxidante; (5) realizar ensaios para avaliação da cinética enzimática frente aos inibidores; (6) investigar a presença de reconhecidos inibidores de alfa-amilase nos extratos, por espectrometria MALDI/TOF e (7) realizar estudos teóricos para elucidar o suposto mecanismo de inibição enzimática da amilase por reconhecidos inibidores.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Diabetes

O diabetes mellitus é um grupo de doenças caracterizado por concentrações sanguíneas elevadas de glicose resultantes de defeitos na secreção de insulina, ação da insulina ou ambos. Podem também estar presentes anormalidades no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos. O organismo de indivíduos diabéticos não produz ou não responde à insulina, um hormônio produzido pelas células β do pâncreas necessário para o uso ou armazenamento dos combustíveis corporais. Na ausência de ação efetiva da insulina, um quadro de hiperglicemia se instala (glicose sanguínea elevada), podendo levar a complicações sérias e morte prematura. No entanto, os indivíduos diabéticos podem tomar atitudes para controlar a doença e reduzir o risco de complicações, pois elevados níveis de glicemia pode levar a doenças graves que afetam o coração e os vasos sanguíneos, olhos, rins, nervos e dentes. Além disso, as pessoas com diabetes também têm um maior risco de desenvolvimento de infecções. Em quase todos os países de alta renda, o diabetes é uma das principais causas de doenças cardiovasculares, cegueira, insuficiência renal e amputação de membros inferiores (Mahan & Escott-Stump, 2011; IDF, 2015).

Os dois principais tipos de diabetes são o tipo 1 e o tipo 2. O diabetes tipo 1 é também conhecido como diabetes insulino-dependente, diabetes infanto-juvenil e diabetes imunomediado. Neste tipo de diabetes a produção de insulina do pâncreas é insuficiente pois suas células sofrem o que chamamos de destruição autoimune. Os portadores de diabetes tipo 1 necessitam de injeções diárias de insulina para manterem a glicose no sangue em valores normais. Há risco de vida se as doses de insulina não são dadas diariamente. Embora ocorra em qualquer idade é mais comum em crianças, adolescentes ou adultos jovens. Apenas 5% das pessoas com diabetes têm esta forma da doença. Já o diabetes tipo 2 é também chamado de diabetes não insulino-dependente ou diabetes do adulto e corresponde a 90% dos casos de diabetes. Ocorre geralmente em pessoas obesas com mais de 40 anos de idade embora na atualidade se veja com maior frequência em jovens, em virtude de maus hábitos alimentares, sedentarismo e estresse da vida urbana. Neste tipo de

diabetes a insulina está presente, porém sua ação é dificultada, o que é conhecido como resistência insulínica, uma das causas de hiperglicemia. O pâncreas produz insulina extra para compensar a resistência insulínica. Mas, ao longo do tempo, não é capaz de manter-se e não pode produzir insulina suficiente para manter a sua glicose no sangue em níveis normais. Por ser pouco sintomático, na maioria das vezes o diabetes tipo 2 permanece por muitos anos sem diagnóstico e sem tratamento, o que favorece a ocorrência de suas complicações oculares e cutâneas, no coração (hipertensão arterial), nos rins (nefropatia) e no cérebro (acidente vascular cerebral) (SBD, 2015; ADA, 2015).

Atualmente, aproximadamente 415 milhões de pessoas no mundo todo têm diabetes, e mais de 14 milhões no Brasil. Estimativas apontam que em 2040 este número chegará a 642 milhões de indivíduos em todo o mundo. O maior número de acometidos situa-se na faixa etária entre 40 e 59 anos, sendo responsável por diversas comorbidades e cerca de 5 milhões de mortes em 2015 (1 a cada 6 segundos). Do ponto de vista financeiro, pelo menos 673 milhões de dólares de despesas de saúde foram atribuídas ao diabetes em 2015, o que representa 12% do total de gastos em adultos. Os principais fatores predisponentes do diabetes são obesidade e sobrepeso, hábitos alimentares e sedentarismo (IDF, 2016).

Há grandes evidências de que as mudanças de estilo de vida podem ajudar a evitar o desenvolvimento de diabetes tipo 2. Dentre essas estão a perda de peso, aliada à atividade física regular e a hábitos alimentares saudáveis, além do tratamento medicamentoso com antibióticos orais. O tratamento medicamentoso apresenta duas modalidades diferentes: a insulino terapia e a terapia com os hipoglicemiantes orais. Novos grupos terapêuticos como as tiazolidinedionas, os inibidores da α -glicosidase, as sulfoniluréias de terceira geração, a metformina e os análogos de insulina com ação ultra rápida encontram-se disponíveis, permitindo opção mais lógica e condizente com mecanismo fisiopatológico da doença. Porém, apesar da disponibilidade de todo esse arsenal terapêutico, podem trazer reações medicamentosas adversas e um custo oneroso para pacientes em geral. Logo, a vasta tradição da população no uso de plantas, resulta no uso de terapias alternativas com plantas medicinais (Negri, 2005; Araújo et al., 2013; IDF, 2015).

2.2 Obesidade

Sobrepeso e obesidade são definidos como o acúmulo de gordura anormal ou excessivo que podem prejudicar a saúde. A causa fundamental da obesidade e excesso de peso é um desequilíbrio energético entre as calorias consumidas e as calorias gastas. Globalmente, houve um aumento da ingestão de alimentos altamente energéticos que são ricos em gordura e um aumento na inatividade física, devido à natureza cada vez mais sedentária de muitas formas de trabalho, mudando os modos de transporte, e crescente urbanização. As mudanças nos padrões alimentares e de atividade física são muitas vezes o resultado de mudanças ambientais e sociais associados ao desenvolvimento e à falta de políticas de apoio em setores como saúde, agricultura, transportes, urbanismo, meio ambiente, processamento de alimentos, distribuição, marketing e educação (WHO, 2015).

Surpreendentemente no mundo atual, o excesso de peso e a obesidade estão associados a mais mortes do que o baixo peso. A prevalência mundial da obesidade mais do que dobrou entre 1980 e 2014. Em 2014, mais de 1,9 bilhão de adultos acima de 18 anos, estavam acima do peso (39%), dos quais mais de 600 milhões eram obesos (13%). Além disso, 41 milhões de crianças com menos de 5 anos de idade estavam acima do peso ou obesos em 2014. Anteriormente considerado um problema de países de rendimento elevado, o excesso de peso e obesidade estão agora em ascensão em países de baixa e média renda, especialmente em ambientes urbanos. Nos países em desenvolvimento com economias emergentes (classificados pelo Banco Mundial como países de renda média e baixa) a taxa de aumento de sobrepeso e obesidade na infância tem sido mais de 30% superior ao de países desenvolvidos. Portanto, a conjuntura atual expõe um cenário de epidemia global caracterizada como “globesidade”. Nesse sentido, a busca por novos medicamentos e auxiliares no tratamento do diabetes e da obesidade, tem se tornado objetivos de diversas pesquisas nos anos recentes. (WHO, 2016).

A obesidade é causa de incapacidade funcional, de redução da qualidade de vida, redução da expectativa de vida e aumento da mortalidade. Doenças crônicas, como doença renal, osteoartrose, câncer, diabetes mellitus tipo 2, apneia do sono, doença hepática gordurosa não alcoólica, hipertensão arterial sistêmica e, principalmente, doenças cardiovasculares (DCV), estão diretamente relacionadas com incapacidade funcional e com a obesidade. Além disso, muitas dessas

comorbidades também estão diretamente associadas às DCV. Muitos estudos epidemiológicos têm confirmado que a perda de peso leva à melhora dessas doenças, reduzindo os fatores de risco e a mortalidade (Melo, 2011).

2.3 *Syzygium sp*

O jambolão (*Syzygium cumini*, sinônimos: *Syzygium jambolanum* ou *Eugenia jambolana*) é uma planta da família *Myrtaceae*, também conhecido, popularmente, como jamelão, cereja, jalão, kambol, jambu, jambul, azeitona-do-nordeste, ameixa-roxa, azeitona, murta, baga-de-freira, guapê, jambuí e azeitona-da-terra, dentre outros nomes. A família compreende mais de 4.620 espécies agrupados em 129 gêneros. A árvore é de grande porte, podendo alcançar de 8 a 15 metros de altura, possui uma casca espessa marrom-acinzentada, esfoliante e de escamas lenhosas. As folhas são coriáceas, oblongo-ovaladas aelípticas ou obovadas-elíptica com 6 a 12 centímetros de comprimento. Os frutos possuem coloração, inicialmente branca, torna-se vermelha e posteriormente preta, quando maduros, são bagas. Tem um sabor muito doce, transformando levemente adstringente quando se torna maduro (Ross, 1999; Lorenzi & Matos, 2002; Ayyanar & Subash-Badu, 2012).

A planta foi introduzida em muitas regiões tropicais como: leste e oeste da Índia e da África, bem como o Brasil, sendo encontrada em diversos estados das regiões sudeste, nordeste e norte (Danadio et al., 1998). Também é encontrada em algumas regiões subtropicais como Flórida, Califórnia, Argélia e Israel (Mahmoud et al., 2001; Ross, 1999). No Brasil esta planta é encontrada em grande parte nas planícies litorâneas, nas serras e nos planaltos, e cresce muito bem em vários tipos de solo (Gomes, 1983).

Várias espécies têm sido propostas nos últimos anos como possuidoras de potencial hipoglicemiante, mas a *Syzygium sp* (espécies do gênero *Syzygium*) ganhou um papel de destaque entre estas, particularmente na Europa Ocidental, a partir das três décadas antes da descoberta da insulina. Enquanto na maioria dos casos, existem apenas indícios das propriedades antidiabéticas da plantas medicinais tradicionalmente utilizadas, *Syzygium cumini*, foi extensivamente estudada já no final do século XIX, após ter sido importado das Índias Ocidentais para a Europa. No início de 1960 a 1970, foram notificados alguns relatórios

preliminares sobre a atividade antidiabética de diferentes partes do jambolão em animais diabéticos (Ayyanar & Subash-Badu, 2012).

No Brasil, *Syzygium sp* foi incluída pelo Ministério da Saúde, na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), cuja finalidade é orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração da lista de plantas medicinais e fitoterápicos a serem disponibilizados para uso da população, com segurança e eficácia para o tratamento de doenças mais comuns no país (Ministério da Saúde, 2009).

Esta planta apresenta constituintes químicos diversos e, por meio da triagem fitoquímica, os compostos apresentam variabilidade nas diferentes estruturas de sua anatomia, sendo nas sementes encontrados taninos hidrolisáveis (ácido gálico, elágico, corilágico), quercetina, antimelina, óleo essencial (α e β -pineno, canfeno, mirceno, limoneno, *cis*-ocineno, *trans*-ocineno, γ -terpineno, acetato de bornila, α -copaeno, α -humuleno e candineno), materiais resinosos e glicose, nas cascas foram encontrado ácido acetil oleanólico, triterpenóides, ácido elágico, isoquercetina, quercetina, canferol e miricetina, nas folhas foram encontrados ácido gálico, metilgalato, canferol, miricetina, ácido elágico, ácido clorogênico, quercetina e nilocitina, nos frutos foram encontradas antocianidinas e nas flores foi encontrado ácido oleanólico (Chitnis et al., 2012; Mahmoud et al., 2001; Migliato et al., 2006; Ross, 1999).

O uso do chá tem um forte apelo cultural. No caso de plantas utilizadas para a diabetes, isto é particularmente importante, porque os antioxidantes são geralmente solúveis em água (Trojan-Rodrigues et al., 2012).

No que se refere especificamente ao seu efeito hipoglicemiante e potencial uso no combate ao diabetes existem diversos indícios sugerindo tais ações farmacológicas (Helmstaedter, 2008; Schoenfelder et al., 2010). Segundo Rizvi & Mishra (2013), a redução da glicose sanguínea pelo efeito de *Syzygium sp* pode ser devida a um aumento da secreção de insulina pelo pâncreas ou por inibição da degradação de insulina. Sobre essa planta também é relatado um efeito na redução de lipídeos evidenciado pela redução do colesterol no sangue, triglicéridos e ácidos graxos livres. Este efeito tem sido observado devido à presença de flavonóides, saponinas, e glicosídeos no extrato, diminuindo a atividade da enzima 3-HMG Co-A redutase no fígado. Adicionalmente, cabe aqui ressaltar que trabalhos preliminares do nosso grupo de grupo de pesquisa demonstraram atividade inibitória da alfa-

amilase por chás comerciais de folhas de *Syzygium sp*, até então não relatada na literatura (Freitas et al., 2014).

Embora *Syzygium sp* tenha provado ser um importante fitoterápico devido às suas propriedades medicinais, há ainda a necessidade de mais bases científicas antes de usá-lo para auxílio no tratamento de doenças. Pesquisas envolvendo modelos *in vitro* para estudar os efeitos de seus constituintes fitoquímicos devem ser realizadas (Chaudary & Mukhopadhyay, 2012).

Diversos estudos demonstram a eficácia, a importância e o potencial de uso de inibidores de amilases, no tratamento do diabetes, obesidade e comorbidades associadas e reforçam a necessidade da busca por novas fontes naturais desses inibidores (Freitas et al., 2015).



Figura 1 – Jambolão (*Syzygium sp*) (Vizzotto, 2008).

2.4 Enzimas digestivas

A busca crescente de métodos seguros e eficazes de tratamento para combater o diabetes e a obesidade tem apontado o uso de plantas medicinais como uma valiosa fonte de inibidores das enzimas digestivas, que inibem a quebra de carboidratos complexos e gorduras no intestino. Estes inibidores exercem o seu efeito anti-diabético por dificultarem a atividade de enzimas envolvidas na hidrólise do amido, tais como a alfa-amilase pancreática e a alfa-glicosidase (enzima presente na borda em escova intestinal). A alfa-amilase catalisa a hidrólise inicial do amido em oligossacarídeos e dissacarídeos, através da clivagem de ligações glicosídicas entre os resíduos de glicose. Inibidores de alfa-amilase podem atrasar, eficazmente, a digestão do amido, ou seja, retardar a formação e a absorção de glicose através da inibição das enzimas glicolíticas. Isto pode reduzir a taxa de absorção de glicose na corrente sanguínea e, conseqüentemente, amenizar o aumento pós-prandial de glicose plasmática em pacientes diabéticos, podendo induzir também alguma perda de peso (Tucci et al., 2010; Manaharan et al., 2011; Tong et al., 2014).

Adicionalmente, inibidores de tripsina presentes nos extratos vegetais podem ocasionar diminuição na digestibilidade protéica, podendo acarretar também uma redução de peso (Simão et al., 2014), porém indesejável do ponto de vista nutricional.

2.5 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são originados do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução. São formados em condições de estresse como infecções, ferimentos, radiações UV, dentre outros. As principais fontes de compostos fenólicos são frutas cítricas, como limão, laranja e tangerina, além de outras frutas como cereja, uva, ameixa, pêra, maçã e mamão, sendo encontrados em maiores quantidades na polpa que no suco da fruta. Pimenta verde, brócolis, repolho roxo, cebola, alho e tomate também são excelentes fontes destes compostos. Fitoquímicos fenólicos presentes nas plantas, além de apresentar diversas aplicações industriais, tem revelado efeitos benéficos à saúde, especialmente em doenças crônicas como doenças cardiovasculares, obesidade e

diabetes. Os fenólicos englobam desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização. Estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas. Os compostos fenólicos são incluídos na categoria de interruptores de radicais livres, sendo muito eficientes na prevenção da autoxidação e também inibem diferentes tipos de enzimas oxidantes. (Angelo & Jorge, 2007; Etxeberria et al., 2012; Subedi et al., 2014).

Quimicamente, os fenólicos são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Possuem estrutura variável e com isso, são multifuncionais. Existem cerca de cinco mil fenóis, dentre os quais, destacam-se os flavonóides (Figura 2), ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis (Angelo & Jorge, 2007).

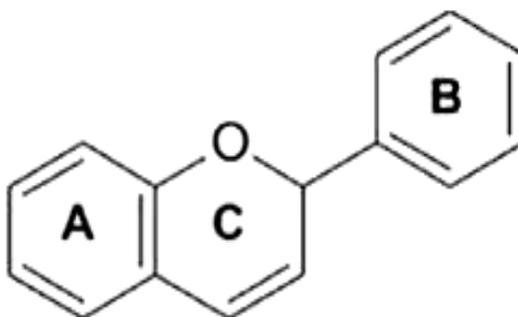


Figura 2. Estrutura química dos flavonóides

De acordo com seu modo de ação, os antioxidantes fenólicos podem ser classificados em primários e secundários. Os primários atuam interrompendo a cadeia da reação através da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, convertendo-os em produtos termodinamicamente estáveis e/ou reagindo com os radicais livres, formando o complexo lipídio-antioxidante que pode reagir com outro radical livre. Os antioxidantes secundários atuam retardando a etapa de iniciação da autoxidação por diferentes mecanismos que incluem complexação de metais, sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos para formar espécie não radical, absorção da radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio (Angelo & Jorge, 2007).

Muitos estudos tem encontrado uma relação direta entre a quantidade de compostos fenólicos em plantas e sua capacidade de inibir enzimas digestivas,

especialmente alfa-amilase e alfa-glicosidases, podendo assim contribuir no tratamento do diabetes e obesidade (Etxeberria et al., 2012).

2.6 Atividade antioxidante

Antioxidante é um composto que protege o sistema biológico contra o efeito nocivo de processos ou reações que podem causar oxidação excessiva (que pode levar à lesão e morte celular). Assim, os antioxidantes têm a capacidade de neutralizar os efeitos prejudiciais dos radicais livres dentro do nosso corpo. Se os radicais livres formados são deixados sem neutralização, eles acabariam levando à etiologia de uma série de doenças. Estes radicais livres possuem efeitos tóxicos e benéficos. As espécies reativas de oxigênio exercem efeitos benéficos sobre as respostas celulares e função imune a nível baixo ou moderado. Eles geram estresse oxidativo em altas concentrações, que é um processo deletério que pode danificar a estrutura celular e função. O estresse oxidativo é um fator importante na progressão de doenças crônicas degenerativas, incluindo doenças coronarianas, câncer e artrite (Priya et al., 2017).

Os antioxidantes podem ser divididos em duas classes: com atividade enzimática e sem atividade enzimática. Na primeira, estão os compostos capazes de bloquear a iniciação da oxidação, ou seja, as enzimas que removem as espécies reativas ao oxigênio. Na segunda classe, estão moléculas que interagem com as espécies radicalares e são consumidas durante a reação. Nesta classe incluem-se os antioxidantes naturais e sintéticos como os compostos fenólicos. Este mecanismo de ação dos antioxidantes presentes em extratos de plantas possui um papel importante na redução da oxidação lipídica em tecidos, vegetal e animal, pois quando incorporado na alimentação humana não conserva apenas a qualidade do alimento, mas também reduz o risco de desenvolvimento de patologias, como arteriosclerose e câncer (Angelo & Jorge, 2007; Rufino et al., 2007; Mohamed et al., 2013).

2.7 Espectrometria MALDI/ToF

Ionização/dessorção a laser assistida por matriz (MALDI/ToF) é uma técnica de espectrometria de massa que tem sido utilizada para a análise de alimentos e extratos vegetais, apresentando muitas vantagens, tais como a velocidade, a

facilidade de utilização e alta sensibilidade. A análise direta de um extrato é possível porque a técnica é tolerante a impurezas e permite a determinação simultânea de massas em misturas complexas de compostos de baixo e de elevado peso molecular. A técnica foi originalmente desenvolvida para análises de grandes biomoléculas como proteínas. É geralmente conhecida como uma ionização "suave" que produz quase exclusivamente as espécies de íons pseudomolecular intactas sem fragmentação dos mesmos no momento do evento de desorção (Menet et al., 2004).

No que diz respeito ao *Syzygium sp.*, há relatos da presença do flavonóide luteolina como responsável pela inibição da alfa-amilase (Karthic et al., 2008). Contudo, tal inibição relacionada à luteolina foi detectada apenas em sementes, não havendo relatos de sua ocorrência em folhas ou chás. Desta forma, a técnica de MALDI/ToF foi utilizada para investigar a presença da luteolina em amostras de chás comerciais de *Syzygium sp.*

2.8 Cálculos Teóricos

Docking molecular também chamado de acoplamento, encaixe ou ancoramento molecular é uma ferramenta computacional que visa prever a conformação de um complexo formado por ligações intermoleculares entre duas ou mais moléculas constituintes, neste caso podendo haver mais de um ligante ou mais de um receptor. O receptor poderá ser uma proteína ou uma molécula composta por ácidos desoxirribonucleicos (DNA) e ribonucleicos (RNA). O ligante é uma molécula pequena ou também pode ser uma outra proteína, podendo formar uma ligação do tipo Proteína-Ligante ou Proteína-Proteína. Essa previsão conformacional mostra através de estimativas a posição do ligante no local predito da proteína (Dias et al., 2008).

Por meio dessa previsão do modo de ligação e da afinidade de ligação de uma molécula no sítio de ligação do receptor, pode-se identificar onde está o alvo de interesse, pois, quando realizado de forma bem sucedida prevê corretamente a posição do ligante na sua forma nativa dentro do local de ligação do receptor e as interações físico-químicas existentes. Existem três objetivos principais para o *docking* molecular, e são: a predição das possíveis posições de ligação, uma

seleção virtual das melhores posições e uma estimativa da afinidade de ligação entre o receptor-ligante (Jain et al., 2008).

Neste trabalho foi utilizado o AutoDock 4.2 que possui licença livre. O AutoDock 4.2 é composto por um conjunto de ferramentas automatizadas para a realização do *docking*, dessa forma uma de suas características é a de poder prever como e de que forma pequenas moléculas, substratos ou candidatos a fármacos, se ligam a um receptor de estrutura tridimensional conhecida. O objetivo do *docking* é que possa-se obter uma modelagem estrutural precisa e uma previsão correta da atividade funcional no alvo de interesse.

O AutoDock usa o método de Monte Carlo para simulação e o algoritmo genético lamarckiano para gerar o conjunto das possíveis conformações existentes do ligante. Esse algoritmo é usado com a função de otimização global e também para a minimização de energia. Estudos de minimização de energia são feitos para o ligante, porque o ligante pode existir em diversas conformações diferentes, sendo assim o mais correto é encontrar o mínimo global para a energia de interação receptor e ligante procurando explorar todos os graus de liberdade disponíveis para o sistema.

A aplicação dessa metodologia computacional para estudar a formação de complexos através das interações intermoleculares é atualmente objeto de intensa pesquisa, pois, embora o número de graus de liberdade do receptor e do ligante são grandes mesmo ao desconsiderar a presença explícita do solvente, é necessário realizar aproximações para reduzir a dimensão do problema e torná-lo tratável computacionalmente. Esta ferramenta foi desenvolvida com a finalidade de se obter um ligante que se encaixe geometricamente e energeticamente no sítio de ligação mais aceitável baseada em diferentes funções de classificação.

Dessa forma, foram propostos aproximações para flexibilidade da interação proteína-ligante e dentre elas podem destacar-se o *docking* rígido onde geralmente tem-se uma posição do ligante fazendo interação com o receptor na sua forma rígida; e o *docking* flexível onde tem-se uma geometria favorável para a interação receptor-ligante e neste caso o receptor continua rígido enquanto o ligante é flexível. Essa flexibilidade é obtida através da troca das torções internas do ligante no sítio ativo. E por último, pode ser realizado o *docking* flexível total onde o ligante é flexível por meio dos seus ângulos de torção assim como a cadeia lateral dos resíduos dentro do sítio de ligação.

Os resultados teóricos obtidos com o *docking* molecular se tornam cada vez mais atraentes e relevantes para a compreensão das interações proteína-ligante e são importantes para fundamentar os resultados experimentais, para assim, seguir com estudos futuros para desenho racional de novos fármacos de interesse médico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

As análises foram conduzidas nos Laboratórios de: Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas e Naturais da (ICBN/UFTM), de Biofísica Teórica do Instituto de Ciências Exatas, Naturais e Educação (ICENE/UFTM), de Engenharia de Alimentos do Instituto de Ciências Tecnológicas e Exatas (ICTE/UFTM) - todos da Universidade Federal do Triângulo Mineiro.

3.1 *Syzygium sp*

3.1.1 Obtenção e preparo das amostras

Cinco amostras (A, B, C, D e E) de chás de *Syzygium sp* foram adquiridas comercialmente em farmácias de manipulação, drogarias e estabelecimentos de venda de produtos naturais dos municípios de Juiz de Fora, Lavras e Uberaba, todos em Minas Gerais - Brasil. A seguir, as amostras foram levadas ao Laboratório de Bioquímica do ICBN/UFTM onde foram preparadas pelo método de infusão (descrito abaixo), aliqüotadas e estocadas em freezer, até as análises experimentais.

3.1.1.1 Infusão

Amostras dos chás comerciais, foram imersas em água fervente na proporção de 1:200 (p/v) durante 10 minutos, simulando o uso doméstico. A seguir a mistura foi filtrada em tecido organza e o extrato bruto obtido foi utilizado nos ensaios de inibição enzimática.

3.2 Atividade enzimática

3.2.1 Obtenção das enzimas

Foram utilizadas as enzimas alfa-amilase pancreática suína tipo VIB (Sigma®) e tripsina pancreática suína (Merck®).

3.2.2 Atividade de α -amilase

A atividade de α -amilase foi determinada segundo a metodologia proposta por Noelting & Bernfeld (1948). 50 μ L da amostra de extrato vegetal e 50 μ L de enzima α -amilase foram pré-incubados, por 20 minutos, em banho-maria a 37°C. O substrato utilizado foi o amido 1% preparado em tampão Tris 0,05 mol L⁻¹, pH 7,0 acrescido de NaCl 38 mmol L⁻¹ e CaCl₂ 0,1 mmol L⁻¹. Após adição de 100 μ L do substrato, a mistura foi incubada por quatro períodos de tempo. A reação foi interrompida adicionando-se 200 μ L do reagente ácido 3,5 dinitrosalicílico (reagente cromogênico), levada à fervura durante cinco minutos e o produto lido em espectrofotômetro a 540 nm.

3.2.3 Atividade da tripsina

A atividade da tripsina foi determinada segundo a metodologia proposta por Erlanger (1961). 200 μ L da amostra e 200 μ L de enzima foram incubados em banho-maria, a 37°C, por quatro períodos de tempo (15, 30, 45 e 60 min.), após adição de 800 μ L do substrato *p*-benzoil-D-L arginina *p*-nitroanilida (BApNA) preparado em tampão TRIS 0,05 mol L⁻¹, pH 8,2. A reação foi interrompida adicionando-se 200 μ L de ácido acético 30% e a absorbância do produto lida em espectrofotômetro a 410 nm.

3.2.4 Preparo do fluido gástrico simulado

Com o objetivo de simular o processo de digestão no estômago *in vitro*, foram realizados os ensaios de atividades enzimáticas na presença de um fluido gástrico simulado. Para tal, os extratos foram incubados com o fluido gástrico simulado preparado segundo a The United States Pharmacopeia – USP (1995), por 1 hora em banho-maria, a 37°C. Após esse período, foram neutralizados com o sal bicarbonato de sódio até pH fisiológico e a seguir realizados os ensaios de atividade.

3.3 Cinética enzimática da alfa-amilase

A cinética enzimática dos inibidores de alfa-amilase foi avaliada usando as condições do ensaio padrão descrito acima (atividade de alfa-amilase). Os ensaios foram realizadas com concentrações crescentes de substrato (10, 20, 30, 40, 50, 60,

70, 80, 90 e 100 μL amido), na ausência e na presença das amostras. O modo de inibição foi determinado graficamente a partir da equação de Michaelis-Menten e posteriormente, com base no gráfico de Lineweaver-Burk, para determinação dos valores das constantes de afinidade (K_m) e de inibição (K_i).

3.4 Determinação de compostos fenólicos totais

A quantificação de polifenóis totais foi determinada de acordo com a metodologia de Folin-Ciocalteu modificada por Sigleton et al. (1965) usando catequina como padrão. Para realizar a quantificação de polifenóis a amostra foi diluída na proporção 1:10 (v/v) em água destilada. Após, em um tubo de ensaio foram adicionados 100 μl da amostra + 500 μl do Reagente Folin-Ciocalteu + 400 μl de carbonato de cálcio a 7,5%. A solução foi agitada e deixada em repouso por 30 min. A medida da absorbância foi feita em espectrofotômetro UV visível a 765 nm. Foram realizadas no mínimo três repetições e o resultado expresso por uma curva de mg de catequina equivalentes, com o auxílio de uma equação da reta.

3.5 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi avaliada pela capacidade das amostras em doar hidrogênio para o 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) provocando a varredura deste radical livre e modificando a coloração da solução conforme o método descrito Yamaguchi et al. (1998). Foram realizadas no mínimo três repetições e o resultado foi expresso em porcentagem.

3.6 Identificação e quantificação de taninos

Uma alíquota de 1 mL de extrato foi misturada a 1 mL de reagente de Folin-Denis (20g de tungstato de sódio, 4 g de ácido fosfomolibdico e 10 ml de ácido fosfórico em 150 mL de água destilada) sendo agitada vigorosamente e deixada em repouso por 3 minutos. Posteriormente, foram adicionados 2 mL de solução de carbonato de sódio 8% e a mistura agitada. Após 2 horas em repouso, a amostra foi centrifugada a 2000 rpm e submetida à leitura espectrofotométrica do sobrenadante a 725nm. O teor de taninos totais foi determinado por interpolação da absorbância

das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido tânico. As análises foram realizadas em triplicata (Seigler et al., 1986).

3.7 Determinação de flavonóis e flavonas

O conteúdo de flavonóides presente nos extratos foi determinado através de método colorimétrico utilizando cloreto de alumínio, que forma um complexo ácido estável com o grupamento cetona do C₄ ou hidroxil dos C₃ ou C₅. Os extratos foram ressuspendidos em etanol 80% ou DMSO e 500 µL desta solução foram misturados a 1500 µL de etanol 95%, 100 µL de cloreto de alumínio 10%, 100 µL de acetato de potássio 1M e 2800 µL de água destilada. Após 30 minutos a temperatura ambiente, foi realizada a leitura espectrofotométrica em 415 nm. O conteúdo de flavonóis e flavonas foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com diferentes concentrações de quercetina. As análises foram realizadas em triplicata (Chang et al., 2002).

3.8 Teste qualitativo para identificação de alcalóides

A identificação de alcalóides nos extratos foi realizada segundo metodologia descrita por Costa (2002), que utiliza os reagentes de Mayer, Bertrand, Dragendorf e Wagner. Os extratos foram solubilizados em água destilada ou DMSO e uma alíquota de 2 mL foi adicionada a 15 mL de água destilada e 0,5 mL de ácido sulfúrico diluído a 10% (v/v). A mistura foi fervida por 2 minutos e após resfriamento, submetida à filtração em papel de filtro. Cerca de 50 µL das amostras foram misturadas a 50 µL de cada reagente em vidro de relógio para verificar a positividade da reação (formação de precipitado).

3.9 Espectroscopia MALDI/ToF

As amostras foram submetidas à análises em espectrômetro de massas tipo MALDI/ToF (Ionização e Dessorção à Laser Assistida por Matriz), (Axima Performance, Shimadzu Corp., Kyoto, Japão). Antes a obtenção dos dados, o aparelho foi previamente calibrado utilizando-se de uma mistura de 2 matrizes: ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA – 189,17 g/mol) e ácido dihidroxibenzóico

(DHB – 154,12 g/mol). Após a calibração, a amostra foi co-cristalizada com o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (solução saturada em Acetonitrila/ Água / 0,1% de ácido trifluoroacético) (matriz) e depositada sobre o amostrador para a secagem a temperatura ambiente. Os espectros foram obtidos utilizando-se o modo reflectron positivo, com um intervalo de massas entre 10 e 1000 Da.

3.10 Estudos teóricos

As simulações do Docking Molecular foram realizadas utilizando AutoDock 4.2 (Goodsell et al., 1996), e a análise e visualização da simulação foi utilizado o AutoDockTools 1.5.6 (Sanner et al., 1999). A estrutura cristalina foi obtida a partir do Protein Data Bank (Berman et al., 2000), cujos PDBs foram para luteolina (4QYA) e alfa-amilase (1PPI).

As coordenadas atômicas de 1PPI foram armazenados em um arquivo separado e as moléculas de água foram removidos, as coordenadas atômicas dos ligantes luteolina e amido também foram separados em outro arquivo. Onde para a luteolina pegou-se somente os átomos da luteolina e para o amido foram selecionados os átomos que compõem os três complexos que formam o amido (DAF – 4,6-dideoxy-4-[[[(1S,5R,6S)-3-formyl-5,6-dihydroxy-4-oxocyclohex-2-en-1-yl]amino]-alpha-Dxylo-hex-5-enopyranose, GLC – Alpha-D-Glucose, BGC – Beta-D-Glucose).

Foram gerados pelo AutoGrid uma caixa para definir os sítios do ligante com uma dimensão de 80 x 80 x 80 e o espaçamento da grade foi de 0,375Å. A posição de ligação do ligante luteolina foi centrada nas coordenadas X -0.10, Y 45.64, Z 15.39, e para o ligante amido também usou-se as mesmas coordenadas, o parâmetro algoritmo genético Lamarckian foi usado com um total de 200 corridas para cada ligação. Para cada simulação, foram utilizadas uma população de 300 indivíduos com 27000 gerações 25.000.000 avaliações de energia, rate of Crossover 0,8. A análise de agrupamento dos resultados ancorados foram realizadas utilizando uma tolerância desvio da raiz quadrada média dos 53,49Å para a luteolina e 0,88Å para o amido.

3.11 Análise estatística

Os ensaios foram realizados em triplicata, os dados digitados na planilha Excel, e os resultados à análise de variância, utilizando-se o software SISVAR.

4 RESULTADOS

4.1 Inibição da α -amilase

As médias das três repetições das inibições enzimáticas da alfa-amilase e da tripsina, antes e após a exposição a um fluido gástrico simulado, das amostras de *Syzygium sp* são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Médias¹ das porcentagens de inibição das enzimas digestivas por extratos aquosos de *Syzygium sp* obtidos por infusão na proporção de 1:200, antes e após a exposição a um fluido gástrico simulado.

Amostra	A-amilase		Tripsina	
	Ensaio Enzimático	Média ± DP	Ensaio Enzimático	Média ± DP
A	Antes do fluido	13,23 ± 3,29 ^{a1}	Antes do fluido	13,47 ± 12,62 ^{a1}
	Após o fluido	30,86 ± 20,49 ^{a2}	Após o fluido	0,00 ± 0,00 ^{a1}
B	Antes do fluido	13,20 ± 1,86 ^{a1}	Antes do fluido	6,88 ± 0,24 ^{a1}
	Após o fluido	20,25 ± 25,57 ^{a2}	Após o fluido	0,00 ± 0,00 ^{a1}
C	Antes do fluido	0,00 ± 0,00 ^{a1}	Antes do fluido	9,88 ± 3,67 ^{a1}
	Após o fluido	35,79 ± 19,50 ^{a2}	Após o fluido	15,45 ± 11,54 ^{a1}
D	Antes do fluido	31,67 ± 10,93 ^{a2}	Antes do fluido	11,22 ± 3,83 ^{a1}
	Após o fluido	0,00 ± 0,00 ^{a1}	Após o fluido	11,88 ± 6,43 ^{a1}
E	Antes do fluido	13,19 ± 4,44 ^{a1}	Antes do fluido	8,79 ± 1,52 ^{a1}
	Após o fluido	0,00 ± 0,00 ^{a1}	Após o fluido	10,75 ± 8,05 ^{a1}

¹Dados são a média de triplicatas ± desvio padrão.

^{a1} e ^{a2} = índices diferentes representam diferença significativa ($p = 0,05$) pelo teste de Scott-Knott.

Considerando os ensaios da enzima alfa-amilase, observou-se porcentagens variadas de inibição das cinco amostras, antes (0% a 31,67%) e após a exposição do fluido gástrico simulado (0% a 35,79%).

Observa-se que as amostras A, B e C da alfa-amilase, apresentaram uma tendência de aumento na porcentagem de inibição enzimática após a exposição do fluido gástrico simulado. Já as amostras D e E, apresentaram redução da porcentagem de inibição da alfa-amilase após o contato com o fluido gástrico.

Assim, considerando os diferentes comportamentos frente à inibição enzimática, sugere-se que, embora todas as amostras sejam comercializadas como “jambolão”, há dificuldades de padronização das matérias-primas. Ressalta-se aqui que tais dificuldades podem estar relacionadas por exemplo a condições edafoclimáticas.

Freitas et al. (2014) demonstraram que infusões de folhas de *Syzygium sp* em diferentes diluições (1:20, 1:50 e 1:100), apresentam elevados percentuais de inibição da enzima alfa-amilase antes do fluido gástrico (acima de 90% em todas diluições). Os autores sugeriram uma possível relação da inibição da amilase com a presença de compostos fenólicos. A exemplo destes resultados, Tong et al. (2014) verificaram que o extrato bruto metanólico de *Eugenia jambolana* apresenta forte atividade inibitória contra a alfa-amilase ($IC_{50} = 1,1 \pm 0,4 \mu\text{g/ ml}$), superior até à acarbose ($IC_{50} = 19,0 \pm 2,0 \mu\text{g/ ml}$). Os autores atribuíram a inibição à presença de taninos hidrolisáveis que retardam a digestão do amido, com efeitos secundários mínimos e assim, reduzem a hiperglicemia pós-prandial em pacientes diabéticos. Pereira et al. (2010), trabalhando com infusões de chá verde e chá preto na diluição de 1:25 verificaram inibições da alfa-amilase de 42,19% e 73,44%, respectivamente. A inibição também foi relacionada com a presença de compostos fenólicos nos chás.

Poongunran et al. (2016), trabalhando com folhas secas de *Syzygium cumini* constataram que extratos de metanol e água apresentaram a alta atividade inibitória da α -amilase ($98,3 \pm 2,3$ e $98,6 \pm 1,6\%$, respectivamente, com extratos de 1 mg/mL). Os autores relatam que a forte inibição da enzima é devido a presença de ácido oleanólico e ácido ursólico, isolados a partir das folhas de *Syzygium*.

Os extratos de *Syzygium sp* na diluição 1:200 demonstraram menor inibição enzimática em relação aos obtidos em outros trabalhos, provavelmente por conta da maior diluição das amostras. Considerando o uso doméstico de infusões de folhas

de *Syzygium sp*, sugere-se que a diluição está diretamente relacionada com o eventual potencial hipoglicemiante.

Após a exposição dos extratos a um fluido gástrico simulado, resultados semelhantes foram obtidos por Freitas et al. (2014), trabalhando com folhas de *Syzygium sp* e por Pereira et al. (2010), trabalhando com chás verde e preto. Em ambos os casos os autores atribuíram a queda ou desaparecimento da inibição à mudanças estruturais ou conformacionais do inibidor, provocadas pelo meio ácido. Tal hipótese sugere que embora exista um potencial hipoglicemiante dos chás de *Syzygium sp*, sua passagem pelo ambiente gástrico após a ingestão, reduziria a ação que ocorreria posteriormente no ambiente intestinal. Contudo, ensaios biológicos são necessários para avaliar o comportamento *in vivo* e corroborar ou contrapor tal hipótese.

A propósito da variação nas inibições da alfa-amilase das cinco amostras de *Syzygium sp* (de a1 até a2), Oliveira e Pereira (2015), trabalhando com chás de insulina vegetal (*Myrcia sphaerocarpa* DC) observaram grande variação da inibição desta enzima entre as cinco amostras testadas. Segundo os autores, a despeito das amostras serem comercializadas supostamente como iguais, é preciso considerar que tais variações nas porcentagens de inibição podem ser atribuídas a fatores edafoclimáticos, métodos de preparação e possíveis contaminações com outras espécies.

4.2 Inibição da tripsina

Assim como na inibição da alfa-amilase, os resultados da tripsina apresentaram variação média com valores de 6,88% a 13,47% de inibição antes do fluido e de 0% até 15,45% após o fluido gástrico simulado.

As amostras A e B da tripsina tiveram uma redução da porcentagem de inibição após o fluido gástrico e a amostra C, teve um aumento dessa inibição. Já a amostra D manteve a porcentagem de inibição antes e após o fluido e a amostra E teve um discreto aumento após a exposição do fluido gástrico simulado. A exemplo do que foi observado para a amilase, os resultados de inibição da tripsina também sugerem possíveis dificuldades de padronização das amostras comercializadas.

Pereira et al. (2011), trabalhando com inibição de enzimas digestivas por extratos de *Hoodia gordonii*, não detectaram inibição da tripsina. Já Marques et al. (2014), avaliando a inibição das enzimas digestivas por pellets de lúpulo, verificaram alta inibição da tripsina antes e após a exposição do fluido gástrico simulado com valores de 67,48% e 89,01, respectivamente.

Os inibidores de tripsina presentes nos extratos vegetais podem levar a uma diminuição na digestibilidade proteica, podendo causar uma redução na taxa de crescimento em animais e também uma redução de peso, porém indesejável do ponto de vista nutricional (Marques et al., 2014; Simão et al., 2012).

A passagem do extrato de *Syzygium sp*, pelo trato gastrointestinal poderia causar alterações/deformações estruturais nos inibidores devido ao pH ácido do estômago, inativando-os. Considerando os metabolismos protéico, glicídico e lipídico, esse comportamento seria desejável do ponto de vista terapêutico, para o inibidor de tripsina, mas não para os inibidores da alfa-amilase e lipase (Pereira et al., 2010; Marques et al., 2014).

4.3 Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais

As médias das três repetições da capacidade antioxidante e o teor de compostos fenólicos totais presentes nas amostras de *Syzygium sp* foram expressos na Tabela 2.

TABELA 2. Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais dos extratos aquosos de *Syzygium sp* obtidos por infusão na proporção de 1:200.

Amostra	Capacidade Antioxidante (%)	Compostos Fenólicos Totais (mg/L)	Inibição da α -amilase (%)
	Média \pm DP	Média \pm DP	Média \pm DP
A	51,49 \pm 3,12 ^{a1}	29,22 \pm 6,45 ^{a1}	13,23 \pm 3,29 ^{a1}
B	67,40 \pm 8,23 ^{a2}	24,55 \pm 7,38 ^{a1}	13,20 \pm 1,86 ^{a1}
C	76,97 \pm 0,36 ^{a3}	27,22 \pm 1,26 ^{a1}	0,00 \pm 0,00 ^{a1}
D	89,00 \pm 2,84 ^{a4}	41,22 \pm 9,43 ^{a2}	31,67 \pm 10,93 ^{a2}
E	67,24 \pm 0,46 ^{a2}	21,00 \pm 6,44 ^{a1}	13,19 \pm 4,44 ^{a1}

^{a1} ^{a2}, ^{a3} e ^{a4} = índices diferentes representam diferença significativa (p = 0,05) pelo teste de Scott-Knott.

A porcentagem da atividade antioxidante foi obtida com médias variando de 51,49% (amostra A) a 89,00% (amostra D). Já o teor de compostos fenólicos totais variou de 21,00 mg/L (amostra E) a 41,22 mg/L (amostra D).

Segundo relatos da literatura, o teor de compostos fenólicos encontrado nas plantas tem sido associado com inibições de enzimas digestivas, especialmente alfa-amilase e alfa-glicosidades, sugerindo um potencial auxílio no tratamento do diabetes e obesidade. Estudos também mostram que esses polifenóis possuem bioatividade conferida às suas propriedades antioxidantes (Faria et al., 2011; Etxeberria et al., 2012; Adefegha & Oboh, 2012).

Correlacionando a porcentagem de inibição da amilase com a capacidade antioxidante e os compostos fenólicos totais, observa-se a amostra D apresentou os maiores valores de capacidade antioxidante e fenólicos totais com a maior porcentagem de inibição da alfa-amilase antes do fluido gástrico. Por outro lado, a amostra C, com a segunda maior capacidade antioxidante e a terceira na presença de compostos fenólico totais, não apresentou inibição contra a alfa-amilase, antes do fluido gástrico simulado. Tais achados reforçam a hipótese de falta de padronização das amostras podendo portanto, levá-las a apresentar efeitos diferentes no auxílio do tratamento do diabetes e da obesidade.

Adefegha & Oboh (2012) demonstraram que o extrato fenólico solúvel de *Syzygium aromaticum* possui atividade inibidora de alfa-amilase e alfa-glicosidase de forma dose-dependente. A concentração utilizada para inibir 50% das enzimas (IC_{50}) foi 497,27 $\mu\text{g/ml}$ e 145,07 $\mu\text{g/ml}$ para alfa-amilase e alfa-glicosidase, respectivamente. Para a atividade antioxidante, os autores avaliaram o poder redutor do radical DPPH, obtendo $IC_{50} = 212,53 \mu\text{g/ml}$. Os mesmos concluíram que as propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos poderiam ser um possível mecanismo que induz os efeitos antidiabéticos da planta (Adefegha & Oboh, 2012).

Priya et al. (2017) consideram que todas as frações (fração aquosa, fração com hexano, fração com acetato de etilo, fração com metanol, fração com 70% metanol) das sementes de *Syzygium cumini* continham uma quantidade significativa de compostos fenólicos. O teor fenólico mais alto foi exibido por fração metanólica de 70% (entre $906 \pm 7,2$, $808,5 \pm 3,9$ e $864,4 \pm 5,6 \text{ mg GAE/g}$ peso seco das frações).

Ruan et al. (2008), avaliando a atividade antioxidante das folhas de “jambolão”, mostraram que o teor de fenólicos totais no extrato metanólico de *Syzygium cumini* foi $610,32 \pm 9,03 \text{ mg/g}$. Para a análise do potencial antioxidante utilizando o radical DPPH, o extrato metanólico das folhas de *Syzygium cumini* foi fracionado em água (solvente-solvente). Na concentração de 15,63 $\mu\text{g/mL}$ de DPPH, obteve-se 91,03% de remanescente de DPPH, ao passo que nas concentrações de 31,25 $\mu\text{g/mL}$, 62,4 $\mu\text{g/mL}$ e 125 $\mu\text{g/mL}$ de DPPH, as porcentagens remanescentes foram, respectivamente, 86,02%, 75,72% e 56,85%. Os autores sugeriram que a atividade antioxidante dos extratos de folhas *Syzygium cumini* pode estar relacionada com a presença dos compostos fenólicos.

4.4 Determinação de flavonóis e flavonas, identificação e quantificação de taninos e teste qualitativo para identificação de alcalóides

A presença de compostos bioativos nas folhas do “jambolão” supostamente está relacionada com seus efeitos benéficos para o organismo. Nesse sentido, realizou-se o *screening* fitoquímico das amostras. A determinação de flavonóis e flavonas (0,047 - 0,052 mg/ml) e a identificação e quantificação de taninos ($2,79 \times 10^{-5}$ – $8,84 \times 10^{-5} \text{ mg}$) revelou baixos teores na proporção de 1:200, provavelmente

devido a essa maior diluição das amostras. Adicionalmente, no teste qualitativo para identificação de alcalóides, não foi detectada sua presença nas amostras (Figura 3).



Figura 3. Teste qualitativo para identificação de alcalóides. A positividade da reação é observada pela formação de precipitado (Seta: controle positivo).

Segundo estudo realizado por Faria et al. (2011), o teor de taninos encontrado no extrato funcional (extrato rico em antocianinas extraído das frutas do “jambolão”) - 0,2 mg TAE/100g amostra - foi inferior em comparação com o fruto - 3,9 mg TAE/100g amostra. Teores elevados de taninos são indesejáveis em alimentos devido ao sabor adstringente, a complexação com proteínas, entre outros efeitos que estes compostos podem causar.

Etzeberria et al. (2012), em seus artigos de revisão relatam que seis grupos de flavonóides foram categorizados: flavonas, flavanonas, flavonóis, as isoflavonas, os flavonóides e antocianidinas. Vinte e dois flavonóides foram avaliados quanto à sua atividade inibidora contra a α -glicosidase. Entre todos eles, isoflavonas e luteolina mostrou o IC50 inferior. Além disso, a luteolina foi mais eficiente do que a acarbose na inibição da alfa-amilase (IC50 de cerca de 0,5 mg/ml). Em contraste, em outro estudo desta revisão, os autores concluem que os flavonóides testados não têm o suficiente poder para atrasar ou inibir a liberação de glicose no trato gastrointestinal (Etzeberria et al., 2012).

4.5 Espectroscopia MALDI/ToF

Adicionalmente foram realizadas análises em espectroscopia MALDI/ToF para investigação da presença de compostos fenólicos reconhecidamente inibidores de alfa-amilase.

Amostra 11 - CHCA - Fluido liofilizado0002, Amostra 1 - CHCA - Amostra A pulsed extraction0001, Amos Shimadzu Biotech Axima Performance 2.9.3.20110624
%Int. 1.7 mV 11 mV 13 mV

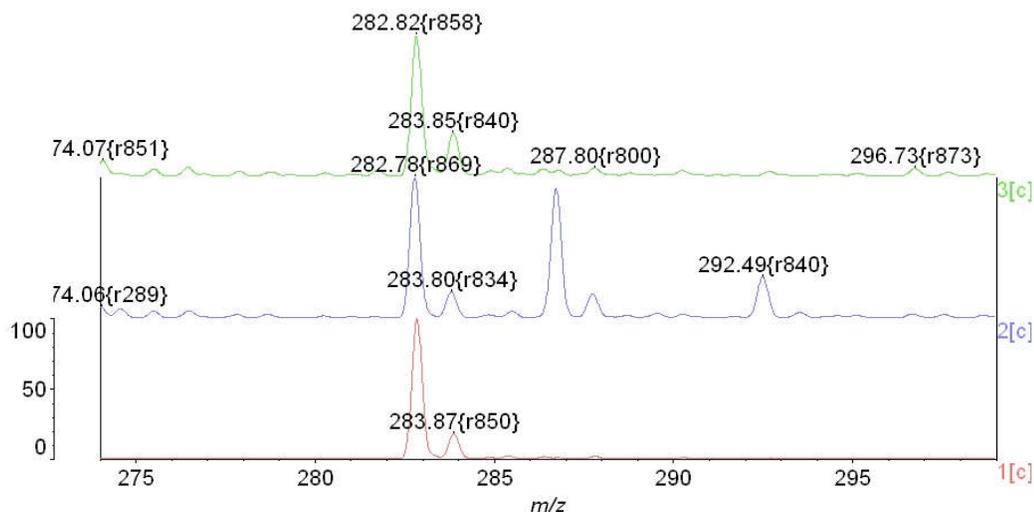


Figura 4A. Espectroscopia MALDI/ToF – Amostra A. Faixa vermelha: fluido gástrico. Faixa azul: amostra pura. Faixa verde: amostra com fluido gástrico.

Amostra 11 - CHCA - Fluido liofilizado0002, Amostra 3 - CHCA - Amostra B pulsed extraction0002, Amos Shimadzu Biotech Axima Performance 2.9.3.20110624
%Int. 1.7 mV 50 mV 10 mV

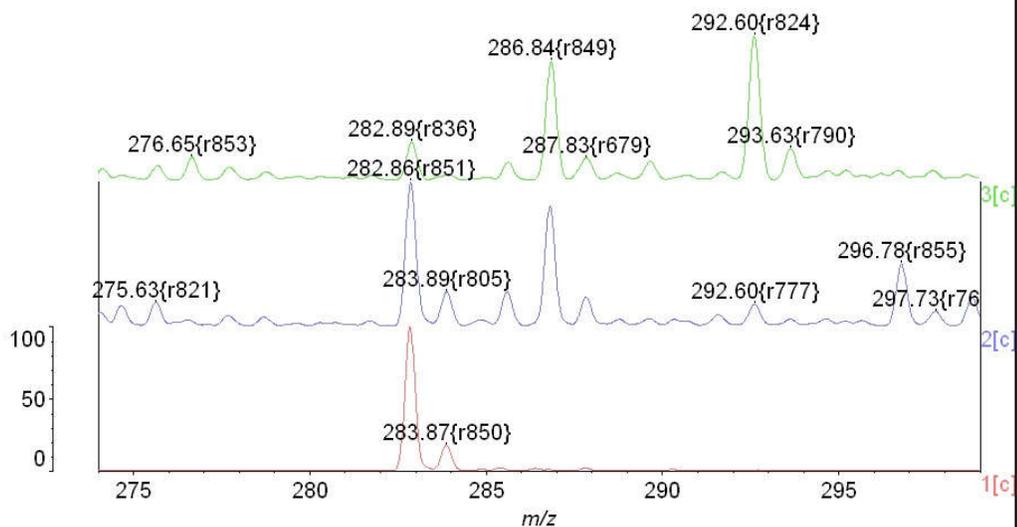


Figura 4B. Espectroscopia MALDI/ToF – Amostra B. Faixa vermelha: fluido gástrico. Faixa azul: amostra pura. Faixa verde: amostra com fluido gástrico.

Amostra 11 - CHCA - Fluido liofilizado0002, Amostra 5 - CHCA - Amostra C pura0001, Amostra 5 - CHCA - Amostra C com fluido gástrico0001
 Shimadzu Biotech Axima Performance 2.9.3.20110624

%Int. 1.7 mV 36 mV 6.2 mV

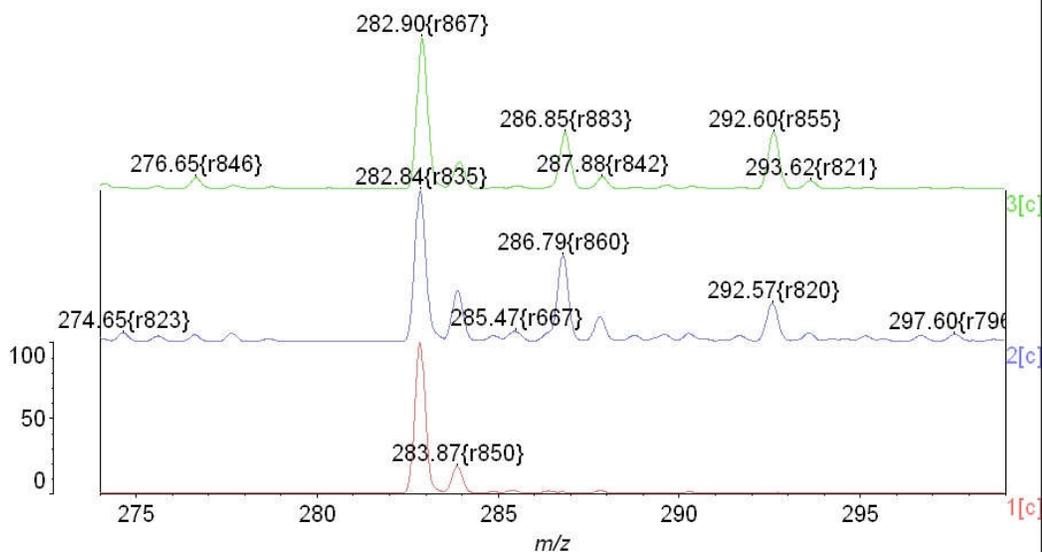


Figura 4C. Espectroscopia MALDI/ToF – Amostra C. Faixa vermelha: fluido gástrico. Faixa azul: amostra pura. Faixa verde: amostra com fluido gástrico.

Amostra 11 - CHCA - Fluido liofilizado0002, Amostra 7 - CHCA - Amostra D0002, Amostra 7 - CHCA - Amostra D com fluido gástrico0001
 Shimadzu Biotech Axima Performance 2.9.3.20110624

%Int. 1.7 mV 112 mV 58 mV

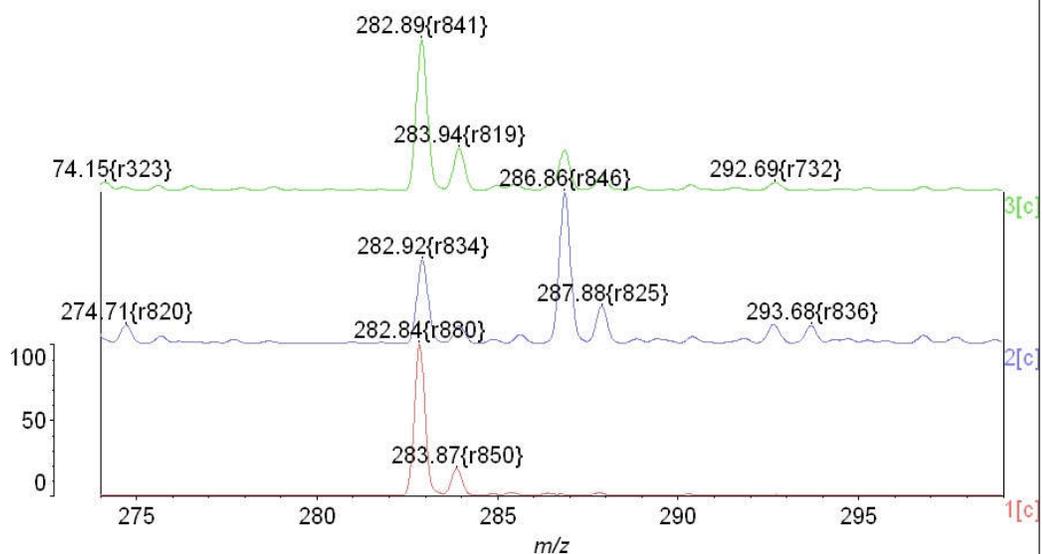


Figura 4D. Espectroscopia MALDI/ToF – Amostra D. Faixa vermelha: fluido gástrico. Faixa azul: amostra pura. Faixa verde: amostra com fluido gástrico.

Amostra 11 - CHCA - Fluido liofilizado0002, Amostra 9 - CHCA - Amostra E0001, Amostra 9 - CHCA - An
 Shimadzu Biotech Axima Performance 2.9.3.20110624
 %Int. 1.7 mV 46 mV 46 mV

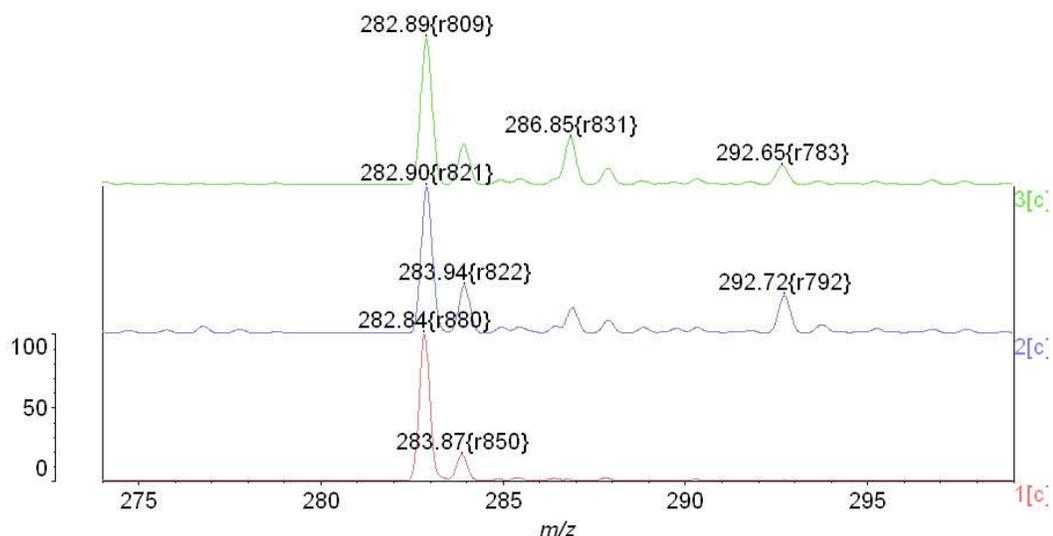


Figura 4E. Espectroscopia MALDI/ToF – Amostra E. Faixa vermelha: fluido gástrico. Faixa azul: amostra pura. Faixa verde: amostra com fluido gástrico.

Ao analisar as Figuras 4A a 4E da espectrometria MALDI/ToF dos extratos de folhas de *Syzygium sp*, pode-se observar que há presença de um pico na região de massa molar próxima à luteolina (massa molar = 286,24 g/mol) nas cinco amostras puras. Nas amostras com fluido gástrico, o pico só não foi encontrado na Amostra A.

Como demonstrado em alguns trabalhos (Karthic et al., 2008; Yan et al., 2014), os compostos fenólicos apresentam grande inibição das enzimas digestivas, levantando hipóteses de seu potencial uso no tratamento do diabetes e da obesidade. Contudo, a maioria destes trabalhos é limitada aos ensaios de atividade enzimática, não sendo descritos os prováveis mecanismos destas inibições. Dentre os fenólicos, destaca-se o flavonóide luteolina, cujos potenciais inibitórios da alfa-glicosidase e da alfa-amilase foram demonstrados (Karthic et al., 2008; Kim et al., 2000; Yan et al., 2014). A luteolina já foi descrita como importante inibidor de alfa-amilase presente em sementes de *Syzygium cumini* (Karthic et al., 2008). Entretanto, sua presença em folhas de *Syzygium sp*, particularmente em chás comerciais, ainda não foi relatada.

Além da luteolina, Karthic et al. (2008) e Poongunran et al. (2016), descreveram a presença de outros inibidores de alfa-amilase e alfa-glicosidase nas sementes e folhas de *Syzygium cumini*, respectivamente. São eles: ácido betulínico,

ácido ursólico e ácido oleanólico, todos com massa molar de 456,7g/mol. Porém, em nosso estudo, não foram encontrados picos nesta região em nenhuma das amostras.

Logo, em se tratando de uma matriz complexa, embora tenha sido sugerido a presença da luteolina (exceção da amostra A com fluido), este fato pode ser o responsável pela variação do perfil de inibição enzimática entre as amostras, seja por inativação ou estimulação; alia-se a isto a possível falta de padronização das amostras.

4.6 Docking molecular

Para avaliar as interações entre a alfa-amilase pancreática e o suposto inibidor foi realizado o *docking* molecular (Figuras 6 e 7). Esta abordagem prediz a conformação de um ligante dentro do sítio ativo de um receptor e encontra o modo de ligação com menor energia entre eles (Kang et al., 2012; Kitchen et al., 2004).

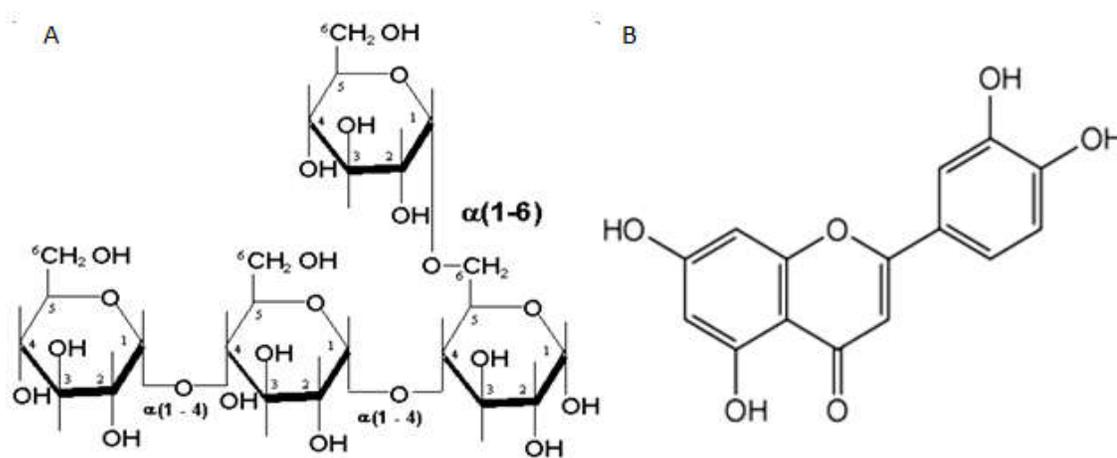


Figura 5. Estruturas químicas em A: Amido e B: Luteolina.

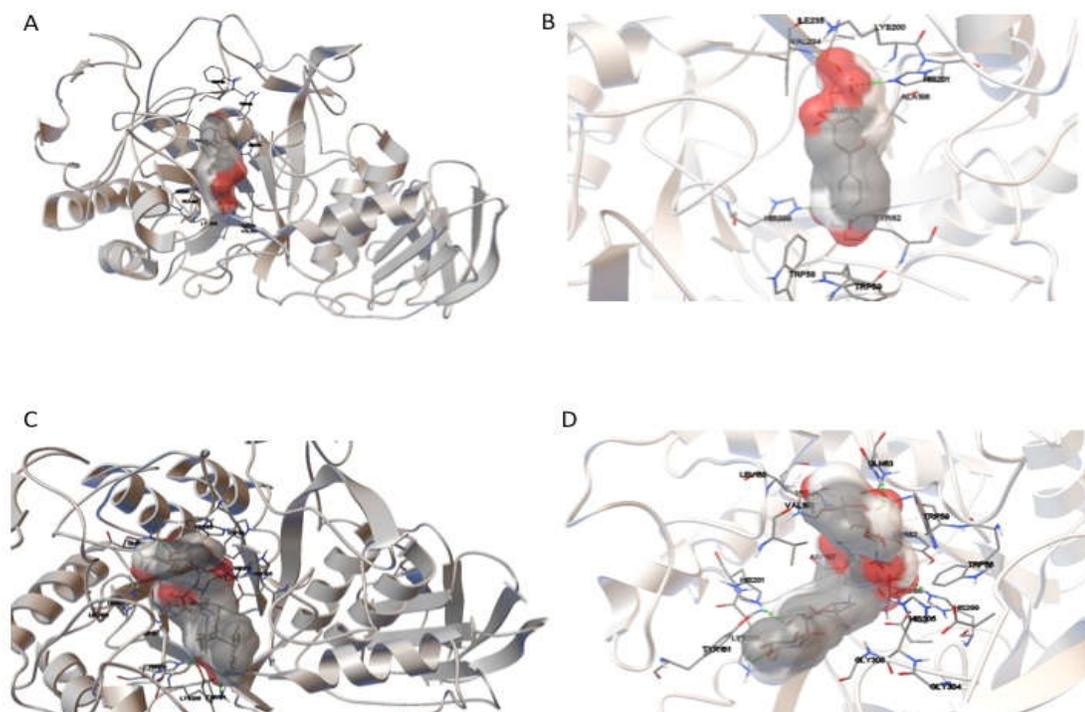


Figura 6. Representações esquemáticas na forma de folhas e hélices com os respectivos possíveis sítios de ligação e interação dos resíduos de aminoácidos da macromolécula α -amilase (cód. PDB: 1PPI) complexada em A e B: Luteolina (cód. PDB: 4qya) e em C e D: Amido.

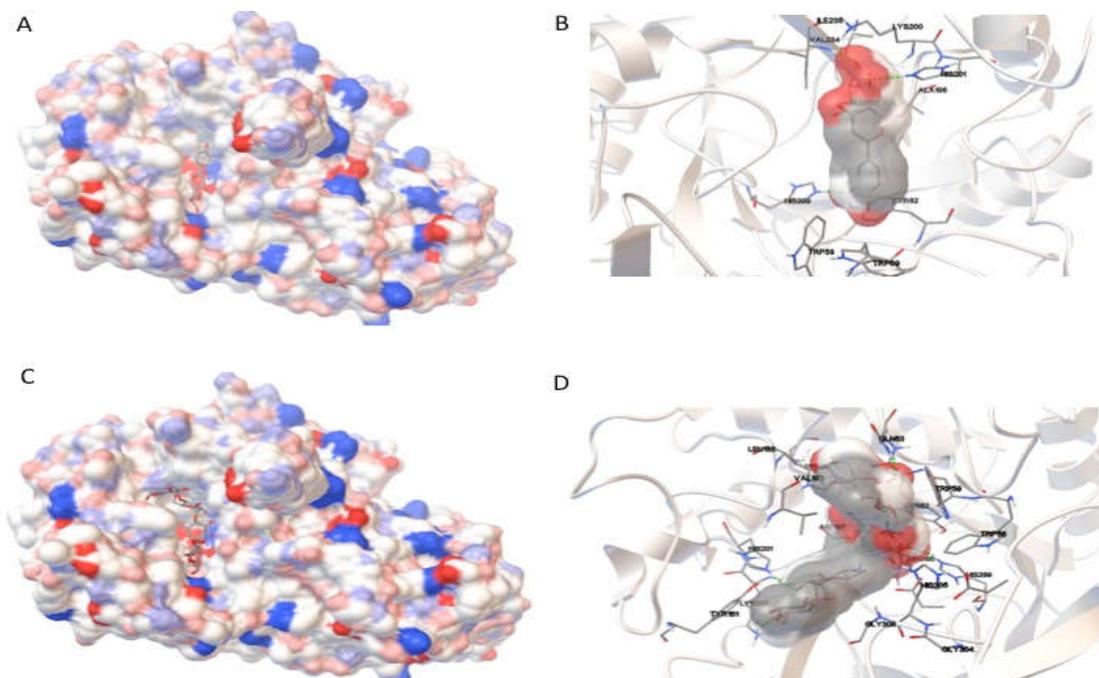


Figura 7. A e C – Superfície do potencial eletrostático do bolsão catalítico da macromolécula α -amilase (cód. PDB: 1PPI) complexada em A: Luteolina (cód. PDB: 4qya) e em C: Amido. As regiões em azul indicam baixa densidade eletrônica e as regiões em vermelho indicam alta densidade eletrônica. B e D - Representações esquemáticas na forma de folhas e hélices da macromolécula α -amilase (cód. PDB: 1PPI) complexada em B: Luteolina (cód. PDB: 4qya) e em D: Amido.

Para a luteolina foram identificadas 3 ligações de hidrogênios fazendo interações nos resíduos de aminoácidos ILE 235, HIS 201 e HIS 299. Já para o amido foram identificados 4 átomos para os resíduos HIS 201, LYS 200, GLN 63, HIS 299.

De acordo com os dados obtidos, tanto o amido quanto a luteolina se ligam e interagem com a enzima alfa-amilase. Pelo fato de ambos apresentarem interações de hidrogênio em dois aminoácidos comuns (HIS 201 e HIS 299), e ainda se ligarem de forma hidrofóbica à enzima pelos aminoácidos TYR 62, TRP 58 e TRP 59 também em ambos, pode-se observar que se ligam no mesmo sítio de ligação.

4.7 Cinética Enzimática

Com relação ao estudo cinético, todas as amostras mostram uma inibição incompetitiva contra a alfa-amilase, como mostra a Tabela 3.

TABELA 3. Cinética enzimática dos extratos aquosos de *Syzygium sp* obtidos por infusão na proporção de 1:200.

Amostra	Vmax com Inibidor	Ki	Inibição
A	0,081	1,17	Acompetitiva
B	0,323	2,78	Acompetitiva
C	0,090	0,45	Acompetitiva
D	0,296	2,86	Acompetitiva
E	0,329	3,34	Acompetitiva

Os valores de Vmax e Km obtidos foram 0,430 e 6,67, respectivamente, nos ensaios da enzima controle realizados simultaneamente com todas as amostras. Nesse sentido, todas as amostras apresentaram um perfil de inibição incompetitiva sobre a alfa-amilase, caracterizada pela diminuição do Km e Vmáx.

Neste tipo de inibição, o inibidor só se liga ao complexo enzima-substrato. A enzima livre não interage com o inibidor, ou seja, o inibidor incompetitivo liga-se

apenas ao complexo ES da enzima originando um complexo inativo, ESI. O inibidor não se combina com a enzima livre. A inibição não é revertida pelo aumento na concentração do substrato. O resultado é a modificação (diminuição) aparente do K_m e V_{max} (Motta, 2011; Nelson & Cox, 2013). Os valores de V_{max} e K_m obtidos foram 0,430 e 6,67, respectivamente, para todas as amostras.

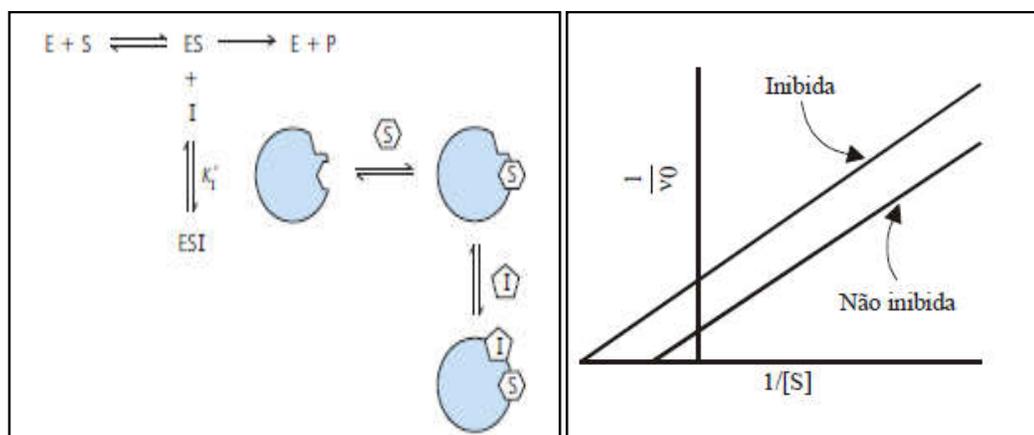


Figura 8. Representação esquemática e gráfico de Lineweaver-Burk para um inibidor Acompetitivo

Em trabalho realizado por Ponnusamy et al. (2011), os extratos da semente de *Syzygium cumini* (extraídos em água quente e fria) exibiram inibição dependente da concentração (competitiva). Em contrapartida, Tong et al. (2014), demonstraram que os taninos hidrossolúveis isolados do extrato metanólico da *Eugenia jambolana* inibiram a alfa-amilase de maneira não competitiva.

Como o *docking* molecular mostrou que tanto o amido quanto a luteolina se ligam no mesmo sítio de ligação da alfa-amilase, era de se esperar uma inibição competitiva. Logo, surge a hipótese de que existam outros compostos inibidores presentes nos extratos aquosos de *Syzygium sp.* Assim, é possível que além da luteolina estejam presentes outros compostos inibidores ou corroborando os demais achados, que a matriz complexa de cada extrato também seja a responsável pela variação do perfil inibitório ou ainda que exista uma contaminação da amostra.

5 CONCLUSÃO

Os extratos aquosos de *Syzygium sp*, obtidos por infusão na proporção de 1:200, apresentam baixos percentuais de inibição das enzimas digestivas, sugerindo uma queda do potencial efeito hipoglicemiante nesta diluição, em relação aos encontrados anteriormente em menores diluições. Assim, considerando os diferentes perfis de inibição enzimática, sugere-se dificuldades de padronização das amostras, a despeito de sua comercialização como “jambolão”.

Embora a atividade antioxidante do chá tenha sido significativa, os teores de compostos fenólicos, de flavonóis e flavonas, de alcalóides e de taninos não foram expressivos na diluição de 1:200.

Os resultados de espectroscopia Maldi/ToF revelaram em todas as amostras (exceto na Amostra A com fluido gástrico) um pico em torno de 286 na região de massa (m/z), sugerindo a presença da luteolina.

O *docking* molecular revelou que a luteolina e o amido se ligam no mesmo sítio de ligação da enzima, mas a cinética enzimática mostra uma inibição incompetitiva, indicando que há a presença de outros inibidores enzimáticos. Logo, a matriz complexa dos extrato de *Syzygium sp* pode também ser responsável pela variação do perfil inibitório das amostras.

Estudos adicionais devem ser conduzidos para elucidação da eficácia e segurança do uso de extratos de *Syzygium sp*, *in vivo*.

Considerando a aparente falta de padronização das amostras, ainda não é recomendável seu uso pela população para o auxílio no tratamento do diabetes e da obesidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEFEGHA, S. A.; OBOH, G. *In vitro* inhibition activity of polyphenol-rich extracts from *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry (Clove) buds against carbohydrate hydrolyzing enzymes linked to type 2 diabetes and Fe²⁺ - induced lipid peroxidation in rat pancreas. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 10, p. 774-781, 2012.

AGUIAR, R. S.; MANINI, R. A fisiologia da obesidade: bases genéticas, ambientais e sua relação com o diabetes. **Com Ciência**, n. 145, 2013.

American Diabetes Association (ADA) (2015). Disponível em: <www.diabetes.org>. Acesso em 14 abril 2015.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

ARAÚJO, M. F. M.; DE ARAÚJO, T. M.; ALVES, P. J. S.; VERAS, V. S.; ZANETTI, M. L.; DAMASCENO, M. M. C. Uso de medicamentos, glicemia capilar e índice de massa corpórea em pacientes com diabetes mellitus. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 66, n. 5, p. 709-14, 2013.

AYYANAR, M.; SUBASH-BABU, P. *Syzygium cumini* (L.) Skeels: A review of its phytochemical constituents and traditional uses. **Asian Pac J Trop Biomed**, v.2, n. 3, p. 240-246, 2012.

BALIGA, M. S.; FERNANDES, S.; THILAKCHAND, K. R.; D'SOUZA, P.; RAO, S. Scientific Validation of the Antidiabetic Effects of *Syzygium jambolanum* DC (Black Plum), a Traditional Medicinal Plant of India. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 19, n. 3, 2013.

BERMAN, H. M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T. N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I. N.; BOURNE, P. E. **The Protein Data Bank**. Nucleic

acids research [Internet], v. 28, n. 1, p. 235-242, 2000. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=102472&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

CHAGAS, V.T.; FRANÇA, L.M.; MALIK, S.; PAES, A. M. A. *Syzygium cumini* (L.) skeels: a prominent source of bioactive molecules against cardiometabolic diseases. **Frontiers of Pharmacology**, p. 6:259, 2015.

CHANG, C. C.; YANG, M. H.; WEN, H. M.; CHERN J. C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **J. Food Drugs Anal**, v. 10, p. 178-182, 2002.

CHAUDARY, B.; MUKHOPADHYAY, K. *Syzygium cumini* (L.) Skeels: a potential source of nutraceuticals. **International Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 2, n. 1, p. 46-53, 2012.

CHITNIS, K. S.; PALEKAR, S. B.; KOPPAR, D. R.; MESTRY, D. Y. Evaluation of *Syzygium cumini* linn. seed formulations available in the market using spectrophotometric and chromatographic techniques. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 3, n. 2, p. 556-560, 2012.

COSTA, A. F. **Farmacognosia. Lisboa**: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 1, n. 6, p. 202-315, 2002.

DANADIO, L. C.; NACHTIGAL, J. C.; & SACRAMENTO, C. K. **Frutas exóticas**. Funep, Jaboticabal, p. 119-120, 1998.

DIAS, R.; DE AZEVEDO JR, W. F. Molecular Docking Algorithms. **Current Drug Targets**, v. 9, p. 1040-1047, 2008.

ERLANGER, B. F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 95, p. 271-278, Nov. 1961.

ETXEERRIA, U.; GARZA, A. L.; CAMPIÓN, J.; MARTÍNEZ, J. A.; MILAGRO, F. Antidiabetic effects of natural plant extracts via inhibition of carbohydrate hydrolysis enzymes with emphasis on pancreatic alpha amylase. **Expert Opin. Ther. Targets**, v. 16, n. 3, 2012.

FARIA, A. F.; MARQUES, M. C.; MERCADANTE, A. Z. Identification of bioactive compounds from jambolão (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1571- 1578, 2011.

FREITAS, T. C.; PEREIRA, C. A.; PEREIRA, L. L. S. *Syzygium* sp (*Myrtaceae*) Extracts: Inhibition of Alpha Amylase. **European J Med Plants**, v. 4, n. 1, p. 116-25, 2014.

FREITAS, T. C.; PEREIRA, C. A.; PEREIRA, L. L. S. *Syzygium* sp (*Myrtaceae*): Promising for diabetes treating. **European J Med Plants**, v. 7, n. 4, p. 167-176, 2015.

GOMES, R. P. **Fruticultura brasileira**. 9. ed. São Paulo: Nobel, p. 269, 1983.

GOODSELL, D. S.; MORRIS G. M.; OLSON, A. J. Automated docking of flexible ligands: Applications of AutoDock. **Journal of Molecular Recognition**, v. 9, n. 1, p. 1-5, 1996.

HELMSTADTER, A. *Syzygium cumini* (L.) SKEELS (*Myrtaceae*) against diabetes – 125 years of research. **Pharmazie**, v. 63, p. 91–101, 2008.

International Diabetes Federation (IDF) (2015). Disponível em: <www.idf.org>. Acesso em 27 mar 2015.

International Diabetes Federation (IDF) (2016). Disponível em: <www.idf.org/about-diabetes/facts-figures>. Acesso em 27 nov 2016.

JAIN, A. N.; NICHOLLS, A. Recommendations for evaluation of computational methods. **J Comput Aided Mol Des**, v. 22, p. 133, 2008.

JOHN, K. M. M.; AYYANAR, M.; JEEVA, S.; SURESH, M.; ENKHTAIVAN, G.; KILM, D. H. Metabolic Variations, Antioxidant Potential, and Antiviral Activity of Different Extracts of *Eugenia singampattiana* (an Endangered Medicinal Plant Used by Kani Tribals, Tamil Nadu, India) Leaf. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

KANG, L.; GUO, Q.; WANG, X. A hierarchical method for molecular docking using cloud computing. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, p. 6568–6572, 2012.

KARTHIC, K.; KIRTHIRAM, K. S.; SADAVISAM, S.; THAYUMANAVAN, B. Identification of α amylase inhibitors from *Syzygium cumini* Linn seeds. **Indian J. Exp. Biol.**, v. 46, p. 677, 2008.

KIM, J-S.; KWON, C-S.; SON, K. H. Inhibition of alpha-glucosidase and amylase by luteolin, a flavonoid. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 64, n. 11, p. 2458-2461, 2000.

KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **J. Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 3, p. 935-949, 2004.

LORENZI. H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa, SP: Computação gráfica Osmar Gomes, p. 357, 2002.

MAHAN, L. K; ESCOTT-STUMP, S. **Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

MAHMOUD, I. I.; MARZOUK, M. S. A.; MAHARRAM, F. A.; EL-GINDI, M. R.; HASSAN, A. M. K. **Phytochemistry**, v. 58, p.1239-44, 2001.

MANAHARAN, T; APPLETON, D; CHENG, H. M.; PALANISAMY, U. D. Flavonoids isolated from *Syzygium aqueum* leaf extract as potential antihyperglycaemic agents. **Food Chemistry**, v. 132, p. 1802–1807, 2011.

MARQUES, T. R.; PEREIRA, L. L. S.; SIMÃO, A. A.; RAMOS, V. O.; BRAGA, M. A.; CORRÊA, A. D.; SANTOS, C. D. Inibição de enzimas digestivas por pellets de lúpulo (*Humulus lupulus* L.). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 12, p. 183-187, 2014.

MELO, M. E. **Doenças Desencadeadas ou Agravadas pela Obesidade**. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica – ABESO, 2011.

MENET, M. C.; SANG, S.; YANG, C. S.; HO, C. T.; ROSEN, R. T. Analysis of The a flavins and The a rubigins from Black Tea Extract by MALDI-TOF Mass Spectrometry. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 2455-2461, 2004.

MIGLIATO, K. F.; BABY, A. R.; ZAGUE, V. et al. Ação Farmacológica de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Acta Farmaceutica Bonaerense** , v. 25, n. 2, p. 310-4, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (2009). **Fitoterapia**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1336>. Acesso em 10 nov 2016.

MOHAMED, A. A.; ALI, S. I.; EL-BAZ, F. K. Antioxidant and Antibacterial Activities of Crude Extracts and Essential Oils of *Syzygium cumini* Leaves. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.

MOTTA, V. T. **Bioquímica**. 2ª ed. Rio de Janeiro:MedBook, 2011, 463p.

NEGRI, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas (Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences)**, vol. 41, n. 2, 2005.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of Biochemistry - Lehninger**. 6th. ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2013, 1198p.

NOELTING, G.; BERNFELD, P. Sur les enzymes amylolytiques. III. La α -amylase: dosage d'activité et controle de l'absence d' α -amylase. **Helvetica Chimica Acta**, v. 31, n. 1, p. 286-290, 1948.

OLIVEIRA, A. R.; PEREIRA C. A. Inhibition of alpha-amylase by 'insulin plant' (*Myrcia sphaerocarpa* DC) extracts: an alternative for the treatment of diabetes mellitus? **J App Pharm Sci.**, v. 5, n. 5, p. 089-093, 2015.

PEREIRA, L. L. S.; DOS SANTOS, C. D.; SÁTIRO, L. C.; MARCUSSI, S.; PEREIRA, C. A.; DE SOUZA, S. P. Ação inibitória e estabilidade do extrato de farinha de feijão branco sobre enzimas digestivas na presença de fluido gástrico simulado. **Rev. Bras. Farm.**, v. 92, n. 4, p. 367-372, 2011.

PEREIRA, L. L. S.; SOUZA, S. P.; SILVA, M. C.; CARVALHO, G. A.; SANTOS, C. D.; CORREA, A. D.; ABREU C. M. P. Glucosidase activity in the presence of green tea and black tea. **Rev. Bras. Pl. Med**, v. 12, n. 4, p. 516-518, 2010.

PONNUSAMY, S.; RAVINDRAN, R.; ZINJARDE, S.; BHARGAVA, S.; KUMAR, A.R. Evaluation of traditional indian antidiabetic medicinal plants for human pancreatic amylase inhibitory effect *in vitro*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2011.

POONGUNRAN, J.; PERERA, H. K. I.; JAYASINGHE, L.; FERNANDO, I. T.; SIVAKANESAN, R.; ARAYA, H.; FUJIMOTO, Y. Bioassay-guided fractionation and identification of α -amylase inhibitors from *Syzygium cumini* leaves. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n.1, p. 206-211, 2016.

PRIYA, S. H.; PRAKASAN, N.; PURUSHOTHAMAN, J. Antioxidant activity, phenolic-flavonoid content and high-performance liquid chromatography profiling of three different variants of *Syzygium cumini* seeds: A comparative study. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**, v. 6, 2017.

RIZVI, S. I; MISHRA, N. Traditional Indian Medicines Used for the Management of Diabetes Mellitus. **Journal of Diabetes Research**, v. 2013, 2013.

RODRIGUES, K. A. F.; AMORIM, L. V.; DIAS, C. N.; MORAES, D. F. C.; CARNEIRO, S. M. P.; CARVALHO, F. A. A. *Syzygium cumini* (L.) Skeels essential oil and its major constituent α -pinene exhibit anti-Leishmania activity through immunomodulation in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 160, p. 32–40, 2014.

ROSS, I. A. “**Medicinal Plants of the World: Chemical constituents, Traditional and Modern Uses**”, Human Press, Totowa, p. 283-289, 1999.

RUAN, Z. P.; ZHANG, L. L.; LIN, Y. M. Evaluation of the antioxidant activity of *Syzygium cumini* leaves. **Molecules**, v. 13, p. 2545-2556, 2008.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S.; DE MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉRESZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH**. Embrapa, 2007.

SANNER, M. F. Python: A programming language for software integration and development. **Journal of Molecular Graphics & Modelling**, v. 17, n. 1, p. 57-61, 1999.

SCHOENFELDER et al. Hypoglycemic and hypolipidemic effect of leaves from *Syzygium cumini* (L.) Skeels, *Myrtaceae*. in diabetic rats. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.20, n.2, p. 222-227, 2010.

SEIGLER, D. S.; SEILHEIMER, S.; KESSY, J.; HUANG, H. F. Tannins from four common *Acacia* species of Texas and Northeastern Mexico. **Economic Botany**, v. 40, p. 220-232, 1986.

SIMÃO, A. A.; CORRÊA, A. D.; CHAGAS, P. M. B. Inhibition of digestive enzymes by medicinal plant aqueous extracts used to aid the treatment of obesity. **Journal Medicine Plants Research**, v. 6, n. 47, p. 5826-5830, 2012.

SIMÃO, A. A.; CORRÊA, A. D.; MARQUES, T. R.; MARCUSSI, S. **Inibição de enzimas digestivas pelo extrato aquoso de *Pereskia grandifolia***. XXVIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química – MG, 2014.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. **Am. J. Enol. Viticul.**, v. 16, p. 144-158, 1965.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD) (2015). Disponível em: <www.diabetes.org.br> . Acesso em 28 mar 2015.

SRIVASTAVA, S.; CHANDRA, D. Pharmacological potentials of *Syzygium cumini*: A review. **J Sci Food Agric**, v. 93, p. 2084-2093, 2013.

SUBEDI, L.; TIMALSENA, S.; DUWADI, P.; THAPA, R.; PAUDEL, A.; PARAJULI, K. Antioxidant activity and phenol and flavonoid contents of eight medicinal plants from Western Nepal. **J Tradit Chin Med**, v. 34, n.5, p. 584-590, 2014.

The United States Pharmacopeia (USP) – The National Formulary NF 18 (Pharmacopeial Convention Inc) Rockville, MD. Janeiro 1995.

TONG, W. Y.; WANG, H.; WAISUNDARA, V. Y.; HUANG, D. Inhibiting enzymatic starch digestion by hydrolyzable tannins isolated from *Eugenia jambolana*. **Food Science and Technology**, v.59, p. 389-395, 2014.

TROJAN-RODRIGUES, M.; ALVES, T. L. S; SOARES, G. L. G; RITTER, M. R. Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, 2012.

TUCCI, S. A.; BOYLAND, E. J.; HALFORD, J. C. G. The role of lipid and carbohydrate digestive enzyme inhibitors in the management of obesity: a review of current and emerging therapeutic agents. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 2010, n. 3, p. 125–143, 2010.

VIZZOTTO, M. **Caracterização das propriedades funcionais do jambolão/** Marcia Vizzotto, Marina Couto Pereira. — Pelotas: Embrapa Clima Temperado, p. 26, 2008. (Embrapa Clima Temperado. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 79).

WIDYAWATI, T.; YUSOFF, N.A.; ASMAWI, M.Z.; AHMAD M. Antihyperglycemic effect of *Syzygium polyanthum* (Wight.) leaf in streptozotocin-induced diabetic rats. **Nutrients**, v. 7, p. 7764-7780, 2015.

World Health Organization (WHO) (2015). Disponível em: <www.who.int>. Acesso em 28 mar 2015.

World Health Organization (WHO) (2016). Disponível em: <www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. Acesso em 08 dez 2016.

YAN, J; ZHANG, G., PAN, J; WANG, Y. Alfa-Glucosidase inhibition by luteolin: Kinetics, interaction and molecular docking. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 64, p. 213-223, 2014.

YAMAGUCHI, T. et al. HPLC method for evaluation of the free radical – scavenging of foods by using 1.1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 62, n. 6, p. 1201-1204, 1998.