



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Casca do araticum (*Annona crassiflora* Mart.) como fonte de compostos antioxidantes com atividade de inibição de α -amilase, α -glicosidase e glicação não enzimática

Aluno: Allisson Benatti Justino

Orientador: Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

Co-Orientador: Dr^a. Renata Roland Teixeira

UBERLÂNDIA - MG
2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Casca do araticum (*Annona crassiflora* Mart.) como fonte de compostos antioxidantes com atividade de inibição de α -amilase, α -glicosidase e glicação não enzimática

Aluno: Allisson Benatti Justino

Orientador: Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

Co-Orientadora: Dr^a. Renata Roland Teixeira

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de
Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção do
Título de Mestre em Genética e
Bioquímica (Área Bioquímica)

UBERLÂNDIA - MG
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

J96c
2016

Justino, Allisson Benatti, 1992

Casca do araticum (*Annona crassiflora* Mart.) como fonte de compostos antioxidantes com atividade de inibição de α -amilase, α -glicosidase e glicação não enzimática / Allisson Benatti Justino. - 2016. 89 f. : il.

Orientador: Foued Salmen Espíndola.

Coorientadora: Renata Roland Teixeira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Genética e bioquímica - Teses. 2. Biotecnologia - Teses. 3. Produtos naturais - Teses. 4. Cerrado - Teses. I. Espíndola, Foued Salmen. II. Teixeira, Renata Roland, 1983. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 575



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Casca do araticum (*Annona crassiflora* Mart.) como fonte de compostos antioxidantes com atividade de inibição de α -amilase, α -glicosidase e glicação não enzimática

ALUNO: Allisson Benatti Justino

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Foued Salmen Espindola (Orientador)

Examinadores: Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento
Prof^a Dr^a. Rosy Iara Maciel de Azambuja Ribeiro

Data da Defesa: 29 / 07 / 2016

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a minha família, pois a minha formação como profissional não poderia ter sido consolidada sem a ajuda de meus pais que, no decorrer da minha vida, proporcionaram-me, além de carinho e amor, os conhecimentos da integridade, da perseverança e da honestidade.

Aos meus amigos e professores que estiveram ao meu lado durante todo o percurso de minha vida acadêmica e que sempre me ofereceram apoio incondicional e tornaram este caminho mais fácil de ser percorrido.

Aos meus orientadores e amigos de laboratório que se mostraram dispostos a ensinar e que contribuíram com o meu desenvolvimento profissional e social, além da paciência demonstrada no decorrer do trabalho.

E por fim, ao curso de graduação em Biotecnologia e ao curso de pós graduação em Genética e Bioquímica da UFU, que vêm se destacando a cada dia, e que promete avanços e soluções para diversos problemas relacionados a muitas áreas que acometem a população.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de estar realizando este trabalho.

Aos meus pais Fernando e Karina, irmãos Murilo e Bruno, e toda a minha família, e amigos, Vinícius Rodovalho, Sofia Antunes, Ruan Carlos, Vitor Calábria e Flávia Pineli, pelo incentivo e carinho, principalmente nos momentos de dificuldade, e por estarem comigo nesta jornada tornando-a mais fácil e agradável.

Ao Prof. Dr. Foued Salmen Espindola, pela oportunidade oferecida, orientação deste trabalho de Dissertação e seu grande desprendimento no meu desenvolvimento profissional.

Aos integrantes do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da UFU, Mariana Nunes Pereira, M.^a Danielle Diniz Vilela, Dr. Leonardo Gomes Peixoto, Dra. Renata Roland Teixeira, M.e Mário Machado Martins, Adriele Vieira de Souza, Douglas Caixeta, Lara Naves Barbosa, Heitor Cappato e Marina Tomasini, pela supervisão metodológica, apoio e ajuda na realização dos experimentos e interpretação dos resultados; ao Instituto de Genética e Bioquímica e Instituto de Química da UFU e órgãos de fomento, com o fornecimento de material para a realização deste trabalho; à banca examinadora, ao curso de graduação em Biotecnologia da UFU e ao curso de pós-graduação em Genética e Bioquímica da UFU.

À todos vocês, o meu muito obrigado.

Resumo

Os frutos do Cerrado são uma fonte de compostos antioxidantes e a caracterização de suas biomoléculas tem atraído o interesse da comunidade científica devido à sua segurança e potenciais efeitos terapêuticos e nutricionais. Um ensaio bioguiado foi realizado para identificar os principais compostos da casca do fruto da *Annona crassiflora* Mart., a partir de partições do extrato etanólico com capacidade antioxidante e atividade inibitória contra α -amilase, α -glicosidase e glicação. A capacidade antioxidante foi determinada pelos métodos de DPPH (sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil), ORAC (capacidade de sequestro do radical peroxil) e FRAP (capacidade de redução do ferro). A inibição da α -amilase foi avaliada por um ensaio cinético colorimétrico utilizando uma fração enriquecida de α -amilase salivar e o substrato 2-cloro-p-nitrofenol ligado a maltotriose. A inibição da α -glicosidase foi determinada por um ensaio cinético colorimétrico utilizando uma fração enriquecida de α -glicosidase, obtida do pó cetônico de intestino de rato, e o substrato 4-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo. A inibição da glicação foi determinada por um método fluorimétrico utilizando albumina sérica bovina incubada com frutose. Os compostos bioativos da casca do fruto foram identificados por cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (CLAE-ESI-EM/EM). Todas as análises foram realizadas em triplicata, utilizando várias concentrações das partições orgânicas do extrato etanólico da casca do fruto da *A. crassiflora*. As partições acetato de etila e *n*-butanol apresentaram maior capacidade antioxidante, maior atividade inibitória contra α -amilase, α -glicosidase e glicação, e menor citotoxicidade, em comparação com as outras partições e o extrato etanólico bruto. A análise por CLAE-ESI-EM/EM revelou a presença de biomoléculas conhecidas como potentes antioxidantes, como ácido clorogênico, (epi)catequina, procianidinas, cafeoil-hexosídeo, quercetina-glicosídeo e kaempferol. A casca do fruto da *Annona crassiflora*, uma espécie da biodiversidade do Brasil, apresentou compostos antioxidantes com propriedades de inibir as enzimas envolvidas na digestão de carboidratos e a formação de produtos de glicação. Assim, há um grande potencial em utilizar os subprodutos do fruto dessa espécie vegetal com o objetivo de isolar fitoquímicos específicos para aplicações em suplementos nutracêuticos, aditivos alimentares,

novos produtos alimentícios e farmacêuticos e, dessa forma, contribuir economicamente e socialmente por meio da recuperação dos resíduos agroindustriais.

Palavras-chave: araticum, Cerrado, compostos fenólicos, hidrolases glicosídicas, glicação, biotecnologia de produtos naturais.

Abstract

The Cerrado fruits are a source of antioxidant compounds and the characterization of their biomolecules has attracted the interest of the scientific community because of their safety and potential nutritional and therapeutic effects. A bioguided assay was performed to identify the main bioactive compounds of *Annona crassiflora* Mart. fruit peel from the ethanol extract fractions with antioxidant capacity and α -amylase, α -glucosidase and glycation inhibitory activities. Antioxidant capacity was determined using DPPH (scavenging of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free-radical), ORAC (scavenging capacity of peroxy radical) and FRAP (iron-reducing capacity) methods. The α -amylase inhibition was evaluated by a colorimetric kinetic assay using an enriched fraction of salivary α -amylase (HSAf) and 2-chloro-p-nitrophenol linked to maltotriose. The α -glucosidase inhibition was determined by a colorimetric kinetic assay using an enriched fraction of α -glucosidase from rat intestinal acetone powder (HIGf) and 4-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside. Anti-glycation activity was determined by a fluorometric method using bovine serum albumin incubated with fructose. The bioactive compounds of the fruit peel were identified by liquid chromatography coupled to mass spectrometer (HPLC-ESI-MS/MS). All assays were performed in triplicate, with various concentrations of the organic partitions from ethanolic extract of *A. crassiflora* fruit peel. Ethyl acetate and *n*-butanol partitions showed higher antioxidant capacity, promising inhibitory activities against α -amylase, α -glucosidase and glycation and lower cytotoxicity, compared to the other partitions and crude ethanol extract. The HPLC-ESI-MS/MS analysis revealed the presence of biomolecules known as potent antioxidants, such as chlorogenic acid, (epi)catechin, procyanidins, caffeoyl-hexoside, quercetin-glucoside and kaempferol. The fruit peel of *Annona crassiflora*, a specie of the Brazilian biodiversity, showed a source of antioxidant compounds with properties to block carbohydrate digestive enzymes and formation of glycation products. Thus, there is a potential in using by-products of *A. crassiflora* in order to identify and isolate phytochemicals for applications in nutraceutical supplements, food additives and pharmaceuticals products, and thereby contribute economically and socially through recovery of agro-industrial residues.

Keywords: araticum, Cerrado, phenolic compounds, starch hydrolase, glycation, biotechnology of natural products.

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

AAPH	2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloreto
Abs	Absorbância
Ac. et.	Partição acetato de etila
AGEs	Produtos finais de glicação avançada
Al ³⁺	Cátion alumínio
AlCl ₃	Cloreto de alumínio
ANOVA	Análise de variância
ASC	Área sob a curva
BSA	Albumina sérica bovina
CA	Capacidade antioxidante
CAPES	Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior
CCD	Cromatografia de camada delgada
CLAE-ESI- EM/EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas por ionização <i>electrospray</i>
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO ²	Dióxido de carbono
Cont.	Controle positivo
Dicl.	Partição diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EC	Equivalentes de catequina
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	Ácido etilenoglicoltetracético
EQ	Equivalentes de quercetina
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Etn.	Extrato etanólico da casca do araticum
EUA	Estados Unidos da América
F. aq.	Fração aquosa

f-AG	Fração enriquecida da enzima α -glicosidase
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
f-AS	Fração de saliva enriquecida de α -amilase
Fe ²⁺	Íon ferroso
Fe ³⁺	Íon férrico
Fl	Flavonoides
FRAP	Capacidade de redução do ferro
FT	Fenóis totais
Gal-G2- α -CNP	α -(2-Cloro-4-nitrofenil)- β -1,4-galactopiranosilmaltosídeo
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
Hex.	Partição hexano
IC ₅₀	Concentração eficiente
IF	Intensidade de fluorescência
K _m	Constante de Michaelis-Menten
MES	Tampão ácido 2-(N-morfolino)etanossulfônico
MG	Minas Gerais
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
N. but.	Partição <i>n</i> -butanol
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
NADH	Dicotinamida adenina dinucleotideo reduzida
ORAC	Capacidade de sequestro do radical peroxil
P	Proantocianidinas
pH	Potencial de hidrogênio
<i>p</i> -NPG	4-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SEM	Erro padrão da média
TPTZ	2,4,6-tri(2piridil)-s-triazina
T _R	Tempo de retenção
Tris-HCl	Cloridrato de tris(hidroximetil)aminometano
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
UV	Ultravioleta
V _{máx}	Velocidade enzimática máxima

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1. Frutos do Cerrado e compostos bioativos.....	1
1.2. Diabetes e estresse oxidativo	2
1.3. Enzimas α -amilase e α -glicosidase.....	6
1.4. Produtos avançados de glicação	8
1.6. Araticum (<i>Annona crassiflora</i> Mart.).....	9
2. Objetivos	11
2.1. Objetivo geral.....	11
2.2. Objetivos específicos	11
3. Material e métodos.....	12
3.1. Coleta do material.....	12
3.2. Preparação do extrato etanólico	12
3.3. Partição líquido-líquido do extrato etanólico	13
3.4. Determinação do conteúdo de fenóis totais	13
3.5. Determinação do conteúdo de flavonoides	14
3.6. Determinação do conteúdo de proantocianidinas	14
3.7. Prospeção fitoquímica.....	15
3.8. Determinação da capacidade antioxidante	16
3.8.1. Método do sequestro do radical DPPH.....	16
3.8.2. Método do sequestro do radical peroxil (ORAC).....	17
3.8.3. Método da capacidade de redução do Ferro (FRAP)	18
3.9. Determinação da inibição da atividade das hidrolases glicosídicas.....	18
3.9.1. Inibição da atividade da α -amilase.....	18
3.9.2. Inibição da atividade da α -glicosidase	19
3.9.3. Parâmetros cinéticos das enzimas α -amilase e α -glicosidase	20

3.10. Determinação do potencial de inibição de glicação	21
3.11. Determinação da citotoxicidade	21
3.11.1. Cultivo Celular.....	22
3.11.2. Avaliação da viabilidade celular dos fibroblastos NIH/3T3 tratados com diferentes concentrações do extrato e partições da <i>Annona crassiflora</i>	22
3.12. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas	23
3.13. Análises estatísticas.....	24
4. Resultados	24
4.1. Rendimento de extração e partição líquido-líquido	24
4.2. Conteúdo de fenois totais, flavonoides e proantocianidinas	25
4.3. Prospeção fitoquímica	26
4.4. Atividade antioxidante	27
4.5. Atividade de inibição da α -amilase e α -glicosidase	29
4.6. Capacidade de inibição da glicação	33
4.8. Avaliação da atividade citotóxica	35
4.9. Caracterização fitoquímica por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas	36
5. Discussão	40
6. Conclusão	49
7. Referências	50
Anexos	69

1. Introdução

1.1. Frutos do Cerrado e compostos bioativos

Desde os tempos antigos, as plantas têm sido utilizadas como fontes de medicamentos pelos seus efeitos profiláticos e para o tratamento de doenças e patologias. A flora rica e diversificada do Brasil representa um potencial imenso para o fornecimento de compostos secundários bioativos, muitos dos quais com inúmeras aplicações na fabricação de aditivos alimentares, cosméticos, agroquímicos e, especialmente, produtos farmacêuticos (DE OMENA et al., 2007). Contudo, o Brasil possui um grande número de espécies vegetais pouco exploradas que contêm diversos nutrientes que, quando ausentes no organismo, podem desencadear doenças crônico-degenerativas (OLIVEIRA et al., 2012).

O bioma do Cerrado, uma ecorregião de savana tropical que cobre 1,8 milhões de km² (DRAGANO et al., 2010), é detentor de uma grande parte da biodiversidade encontrada no Brasil (MITTERMEIER et al., 2005), destacando-se como o segundo maior bioma do país e cobrindo uma área de aproximadamente 23% do território nacional (RIBEIRO; WALTER, 1998). Existem diversas espécies vegetais com alto potencial econômico, principalmente por causa da diversidade de árvores frutíferas nativas com elevado valor nutricional e propriedades medicinais (CARAMORI; LIMA; FERNANDES, 2004; RIBEIRO; RODRIGUES, 2006).

O consumo de frutos do Cerrado não está só relacionado ao gosto e à preferência pessoal, mas também com os benefícios à saúde devido ao conteúdo nutricional que eles possuem. Em adição aos nutrientes essenciais, a maioria dos frutos possuem quantidades consideráveis de fibras, micronutrientes, tais como os sais minerais e as vitaminas, e compostos fitoquímicos secundários, que desempenham diversas funções importantes para a saúde humana (RIBEIRO DA SILVA et al., 2014).

Os compostos fitoquímicos secundários não são considerados essenciais para a vida da planta, mas são importantes para a sua sobrevivência (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Eles normalmente são armazenados em pequenas quantidades e sintetizados por vias metabólicas específicas, e podem ser divididos em três grupos principais de acordo com a sua rota biossintética de

origem: terpenoides, compostos nitrogenados (alcaloides, glucosinolatos e cianidrinhas) e compostos fenólicos (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000). Dentre essas classes, os compostos fenólicos apresentam diversas propriedades biológicas benéficas à saúde humana (GOUVEIA; CASTILHO, 2011; KUMAR; PANDEY, 2013).

Os flavonoides são um dos principais compostos fenólicos encontrados nas plantas e possuem uma alta capacidade em inibir a oxidação de biomoléculas do organismo e controlar o estresse oxidativo (KUMAR; PANDEY, 2013). A atividade antioxidante apresentada pelos flavonoides pode ocorrer devido ao sequestro de radicais formados por espécies reativas de oxigênio (EROs) através da doação de hidrogênio e estabilização do radical formado, pela quelatação de metais envolvidos no estresse oxidativo ou pela inibição de enzimas envolvidas na geração de EROs (KUMAR; PANDEY, 2013).

Os frutos do Cerrado são uma fonte de compostos antioxidantes e a caracterização de suas biomoléculas tem atraído o interesse da comunidade científica devido à sua segurança e potenciais efeitos nutricionais e terapêuticos (MATTIETTO; LOPES; MENEZES, 2010; RUFINO et al., 2010). Recentemente, os compostos bioativos presentes em produtos naturais tornaram-se populares e têm sido considerados como agentes auxiliares no controle e/ou tratamento de doenças crônicas. Além de terapias prescritas padrão, um conjunto de ervas e frutos alternativos e complementares, e suplementos dietéticos estão sendo amplamente utilizados para gerir a obesidade, o diabetes e as suas complicações (DEVALARAJA; JAIN; YADAV, 2011). Atualmente, aproximadamente um terço dos pacientes com diabetes mellitus utilizam alguma forma de medicina alternativa e complementar (METCALFE et al., 2010). Desse modo, a caracterização física e química dos frutos e a quantificação de seus compostos bioativos são importantes para a compreensão de seus efeitos biológicos sobre a saúde humana.

1.2. Diabetes e estresse oxidativo

O diabetes mellitus é uma desordem metabólica caracterizada por hiperglicemia causada por uma deficiência absoluta ou relativa na secreção de

insulina e/ou à resistência associada a esse hormônio (SARWAR et al., 2010; BLONDE, 2012). Mais de 220 milhões de pessoas em todo o mundo foram diagnosticadas com diabetes mellitus, e a sua prevalência pode dobrar até 2030, devido ao envelhecimento, hábitos alimentares pouco saudáveis, obesidade e ausência da prática de exercícios físicos (WILD et al., 2004; SARWAR et al., 2010). A nível mundial, o atendimento dos pacientes com diabetes tipo II consome entre 5 e 10% do orçamento destinado ao sistema de saúde devido a uma maior frequência das consultas, internações e tratamentos mais complexos (RIOS; FRANCINI; SCHINELLA, 2015).

Após uma refeição, o hormônio insulina promove a absorção de glicose nos locais de armazenamento e conduz a conversão destes em lipídeos, que representam um meio mais eficiente de armazenamento de calorias (BERG; STRYER; TYMOCZKO, 2014). A interação entre a insulina e o seu receptor desencadeia uma via de sinalização *downstream* responsável por diversos efeitos metabólicos, como aqueles mencionados acima, do hormônio sobre os tecidos-alvo. Quando ocorre resistência à insulina, essa via de sinalização torna-se prejudicada, o que pode tornar o efeito desse hormônio ineficiente (BERG; STRYER; TYMOCZKO, 2014). Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a patogênese da resistência à insulina, como acúmulo de gordura ectópica, estresse do retículo endoplasmático e inflamação sistêmica; esses mecanismos, que refletem um distúrbio de diferentes aspectos do controle metabólico, podem interferir na ação da insulina (SAMUEL; SHULMAN, 2012).

O diabetes tipo II é caracterizado por resistência à insulina e, usualmente, uma relativa deficiência desse hormônio (BERG; STRYER; TYMOCZKO, 2014). O desenvolvimento dessa doença apresenta uma transição gradual, em que alterações funcionais nas células β -pancreáticas são precedidas por um decréscimo da resposta dos tecidos periféricos à insulina (AMERICAN DIABETES, 2013). Esses indivíduos, pelo menos inicialmente, não necessitam de um tratamento com insulina para sobreviverem, sendo que em alguns casos, um controle glicêmico adequado pode ser alcançado por meio da perda de peso, prática de exercício físico regular e consumo de agentes hipoglicemiantes (AMERICAN DIABETES, 2013).

A hiperglicemia crônica está associada com disfunções e falhas de diferentes órgãos, como olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos, e geralmente está relacionada com outros fatores de risco cardiovasculares, como hipertensão, sobrepeso/obesidade, dislipidemia e sedentarismo (BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2008). A hiperglicemia, juntamente com a hiperlipidemia (níveis aumentados de ácidos graxos, triacilgliceróis e lipoproteínas modificadas), induz respostas imunes-inflamatórias e reações de estresse oxidativo por meio da geração de radicais livres que implicam nas complicações cardiovasculares e mortalidade relacionadas ao diabetes tipo II (BAYNES; THORPE, 1999; PICKUP, 2004). A inflamação induzida pelo estresse oxidativo é um dos principais contribuintes para várias condições de doenças, uma vez que a produção de EROs, mediada por ativação de fatores de transcrição redox-sensíveis, e posterior expressão de citocinas inflamatórias, quimiocinas e fatores de crescimento, são características de doenças inflamatórias (BAYNES; THORPE, 1999; BROWNLEE, 2001)

A depleção de antioxidantes e a sua contribuição para complicações cardiovasculares em indivíduos com diabetes têm sido bem documentadas (BAYNES; THORPE, 1999). Vários estudos demonstraram que ocorre uma diminuição significativa de antioxidantes plasmáticos no decurso do diabetes e de suas complicações associadas, tais como a disfunção endotelial e a aterosclerose, sendo que isso é mais proeminente em indivíduos idosos e diabéticos (POLIDORI et al., 2001; PRICE; PRICE; REYNOLDS, 2001; VALABHJI et al., 2001). Portanto, a razão para o uso terapêutico dos antioxidantes no tratamento e prevenção de complicações diabéticas é forte.

Ao longo da história, diferentes remédios e drogas têm sido utilizados para tratar o diabetes tipo II, incluindo a insulina antes do conhecimento sobre o seu mecanismo de ação (RIOS; FRANCINI; SCHINELLA, 2015). Algumas dessas drogas têm sido incluídas no arsenal terapêutico da medicina, e outras têm sido utilizadas como terapia complementar em pacientes com hiperglicemia; no entanto, muitas destas foram obtidas a partir de plantas ou de micro-organismos (RIOS; FRANCINI; SCHINELLA, 2015). Alguns exemplos são a galegina e o picnogenol, que são derivados de plantas, e a acarbose, o miglitol e o voglibose, que são obtidos de micro-organismos (RIOS; FRANCINI; SCHINELLA, 2015).

Antes do advento da insulina exógena e hipoglicemiantes orais, o uso de plantas medicinais era a principal forma de controle do diabetes, pois são importantes fontes de substâncias potencialmente terapêuticas (GRAY; FLATT, 1999). Alguns de seus princípios ativos, principalmente polifenóis, agem aumentando a liberação de insulina, modificando o metabolismo de glicose e de lipídeos, inibindo fatores hiperglicemiantes, inibindo ou estimulando a síntese de enzimas, ou ainda atenuando as complicações relacionadas ao diabetes (PATEL, D. K. et al., 2012; BAHADORAN; MIRMIRAN; AZIZI, 2013). Dentre os compostos ativos antidiabéticos, têm se destacado polissacarídeos, proteínas, esteroides, terpenoides, alcaloides, flavonoides, glicosídeos, triterpenos, óleos essenciais, vitaminas, saponinas, peptídeos e aminoácidos (PATEL, D. K. et al., 2012). Além disso, flavonoides, carotenoides, ácido ascórbico e tocoferóis são os principais antioxidantes recomendados com base em resultados obtidos a partir de modelos experimentais (LU et al., 2010). Esses antioxidantes são capazes de inibir várias enzimas produtoras de EROs, como xantina oxidase, ciclooxigenase, lipoxigenase, mono-oxigenase microssomal, glutathione-S-transferase, succinoxidase mitocondrial e NADH oxidase (LU et al., 2010).

Os bioativos presentes nos vegetais podem levar à ativação de vias de sinalização intracelular relacionadas ao estresse oxidativo, por meio de sua capacidade em estimular e ativar a expressão de genes que expressam proteínas responsáveis pela proteção celular (BASTOS; ROGERO; AREAS, 2009). A capacidade antioxidante, característica de alguns compostos bioativos como os flavonoides, está relacionada ao seu potencial de óxido-redução. Essas moléculas podem competir por sítios de ligação presentes em enzimas, assim como interagir com receptores celulares. Além disso, os compostos bioativos podem atuar na expressão gênica, resultando no aumento da expressão de enzimas antioxidantes, tais como a catalase, a superóxido dismutase, as peroxidases, que estão envolvidas em diversos mecanismos intracelulares contra os processos oxidativos degenerativos, como alterações no DNA e peroxidação lipídica (LU et al., 2010).

Dessa forma, os produtos naturais, especialmente os de origem vegetal, são importantes fontes de compostos com diferentes estruturas químicas que, agindo por meio de diversos mecanismos moleculares, podem auxiliar no controle

e/ou tratamento do diabetes. Uma vez que os resultados relacionados a vários desses compostos sejam preliminares ou inadequadamente documentados, é necessário continuar desenvolvendo pesquisas com o objetivo de identificar os compostos bioativos e elucidar os seus possíveis efeitos biológicos.

1.3. Enzimas α -amilase e α -glicosidase

A principal fonte da glicose sanguínea são os carboidratos da dieta hidrolisados pelas enzimas α -amilase e α -glicosidase, que são posteriormente absorvidos pelo intestino delgado (SU; LAI; NG, 2013). A α -amilase, principal produto de secreção do pâncreas e das glândulas salivares, é uma proteína monomérica cálcio dependente, responsável pela catálise da hidrólise inicial de amido em oligossacarídeos mais curtos por meio da clivagem de ligações α -D-(1-4) glicosídicas (BERG; STRYER; TYMOCZKO, 2014). A α -glicosidase é uma outra hidrolase glicosídica, presente no intestino delgado, que também atua sobre ligações α -D-(1-4) glicosídicas, decompondo oligossacarídeos e dissacarídeos em resíduos de glicose (FLANAGAN; FORSTNER, 1978). Após a hidrólise do amido pela α -amilase, a maltose e as unidades menores de oligossacarídeos são clivadas pela ação da α -glicosidase, levando a produção de glicose que será absorvida pelo organismo (SHINDE et al., 2008). A degradação do amido presente na dieta prossegue rapidamente e conduz a hiperglicemia pós-prandial (FUJISAWA et al., 2005).

Assim, prevenir ou retardar a absorção de glicose por meio da inibição de hidrolases glicosídicas nos órgãos digestivos pode representar uma abordagem promissora no tratamento do diabetes e das suas complicações (LEVETAN; PIERCE, 2013). Os inibidores de α -amilase e α -glicosidase tem sido associados com a redução da hiperglicemia pós-prandial induzida pela digestão de carboidratos no intestino delgado (LORDAN et al., 2013; RIOS; FRANCINI; SCHINELLA, 2015).

Alguns fármacos antidiabéticos atualmente disponíveis, como a acarbose, miglitol e voglibose, atuam inibindo a atividade da α -glicosidase e da α -amilase (GUO et al., 2010; LORDAN et al., 2013). Contudo, eles estão associados com efeitos colaterais gastrointestinais, como dores abdominais, flatulência,

meteorismo e diarreia (GUO et al., 2010; FIGUEIREDO-GONZALEZ et al., 2016). Desse modo, estudos têm sido direcionados para a descoberta de produtos naturais que possuem substâncias capazes de inibir essas enzimas digestivas, devido ao seu baixo custo, segurança e baixa incidência de efeitos colaterais indesejáveis (FIGUEIREDO-GONZALEZ et al., 2016).

Diferentes compostos fenólicos, como flavonoides e antocianinas, têm efeitos positivos sobre o diabetes, uma vez que eles são responsáveis pela inibição da atividade da maltase e da α -glicosidase intestinal e, consequentemente, podem reduzir a glicemia após refeições ricas em amido (MATSUI et al., 2001; BEDEKAR; SHAH; KOFFAS, 2010). A atividade de inibição das antocianinas depende de sua estrutura, sendo que o potencial inibitório é maior em antocianinas aciladas em relação às substâncias derivadas desaciladas (MATSUI et al., 2001). Outros compostos, como a catequina, as procianidinas e os derivados cafeoil, também são capazes de inibir a atividade de enzimas digestivas, principalmente a α -glicosidase (SCHAFER; HOGGER, 2007; RIOS; FRANCINI; SCHINELLA, 2015).

Diversas plantas do bioma do Cerrado são capazes de inibir as enzimas α -amilase e α -glicosidase. Os extratos aquosos de *Eugenia dysenterica*, *Pouteria caimito* e *Pouteria torta* apresentaram uma alta atividade inibitória contra a α -amilase (valores de IC_{50} de 14,93, 13,6 e 5,67 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente) e a α -glicosidase (valores de IC_{50} de 0,46, 2,58 e 0,22 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente). O extrato etanólico de *Stryphnodendron adstringens* também apresentou atividade inibitória contra ambas as enzimas (IC_{50} de 1,86 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para α -amilase e 0,61 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para α -glicosidase) (SOUZA et al., 2012). Em um estudo realizado por de Gouveia et al. (2013), os extratos etanólicos da casca do caule e da raiz de *Pouteria ramiflora* apresentaram mais de 95% de atividade de inibição da α -amilase na concentração de 1 mg.mL^{-1} . Além disso, camundongos Swiss adultos machos tratados oralmente com o extrato aquoso de *Pouteria ramiflora* por oito dias foram capazes de reduzir o peso corporal e o nível glicêmico (DE GOUVEIA et al., 2013; GOUVEIA et al., 2013).

Assim, a modulação da atividade das enzimas envolvidas na digestão de carboidratos, como a α -amilase a α -glicosidase, por meio do uso terapêutico de inibidores naturais encontrados no Cerrado brasileiro, representa um grande

potencial para o desenvolvimento de novas estratégias com o objetivo de prevenir e/ou controlar a hiperglicemia pós-prandial e contribuir com a saúde pública do país.

1.4. Produtos avançados de glicação

As complicações vasculares relacionadas ao diabetes mellitus são a principal causa de morbimortalidade, especialmente devido à hiperglicemia crônica conduzir danos celulares e teciduais (ZIMMET; ALBERTI; SHAW, 2001). Muitas vezes, esses danos às estruturas moleculares do organismo são ocasionados pela formação e ação dos produtos finais de glicação avançada, também denominados AGEs (BROWNLEE, 2001).

A glicação das proteínas é iniciada por uma reação de adição nucleofílica entre um grupo amino livre de uma proteína e um grupo carbonil de um açúcar redutor para formar uma base de Schiff reversível. Essa reação não-enzimática ocorre durante um período de horas e, uma vez formada, a base de Schiff se reorganiza para formar uma cetoamina mais estável ou um produto de Amadori. A formação de produtos de Amadori ocorre em um período de dias e, após formados, são praticamente irreversíveis (AHMED, 2005).

A glicação de proteínas é uma reação espontânea e dependente do nível e da duração da hiperglicemia, da meia-vida da proteína e da permeabilidade do tecido em relação à glicose livre (AHMED, 2005). As proteínas glicadas podem sofrer reações posteriores envolvendo intermediários dicarbonílicos, como 3-desoxiglicosona, dando origem aos AGEs (AHMED, 2005). Os AGEs são moléculas complexas e heterogêneas e os seus efeitos patológicos estão relacionados à capacidade destes compostos de modificar as propriedades químicas e funcionais de diversas estruturas biológicas, por meio da formação de ligações cruzadas com proteínas, geração de radicais livres, interações com receptores celulares (JAKUS; RIETBROCK, 2004). Devido à complexidade e heterogeneidade das reações que podem ocorrer, poucos AGEs foram identificados; a carboximetilisina, a pirralhina e a pentosidina são exemplos de produtos avançados de glicação bem caracterizados (AHMED, 2005).

Os AGEs podem danificar as células por meio de três mecanismos moleculares: modificação de estruturas intracelulares; interação com proteínas da matriz extracelular, o que ocasiona a alteração da sinalização entre as moléculas da matriz e a célula; e modificação de proteínas e lipídeos sanguíneos, que podem se ligam a receptores específicos e provocar a produção de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento (BIERHAUS et al., 1998; BROWNLEE, 2001). As proteínas glicadas perdem a sua funcionalidade e aumentam a sua resistência à remoção por enzimas proteolíticas. Além disso, receptores de AGEs são expressos em diversos tipos celulares, como células de músculo liso, monócitos, macrófagos, células endoteliais, astrócitos, podócitos e microglia. A ligação de AGEs com seus receptores medeiam a sinalização intracelular e promove o estresse oxidativo, causando assim danos teciduais. Além disso, a formação de AGEs intracelulares leva a uma redução de óxido nítrico e uma degradação dos fatores de crescimento (ENGELN; STEHOUWER; SCHALKWIJK, 2013). Assim, a descoberta de inibidores de glicação dentro dos recursos da biodiversidade poderá levar à produção de princípios naturais farmacologicamente ativos que poderiam ser adquiridos por meio da dieta.

1.6. Araticum (*Annona crassiflora* Mart.)

A Annonaceae é uma grande família de plantas encontrada na Savana brasileira, região conhecida como Cerrado brasileiro, e compreende aproximadamente 27 gêneros e 290 espécies, incluindo a fruta do Conde (*Annona squamosa*), a Graviola (*Annona muricata*) e o Marolo ou Araticum (*Annona crassiflora* Mart.) (DRAGANO et al., 2010; FORMAGIO et al., 2015). Essas plantas geralmente são encontradas em áreas rurais e são comumente consumidas *in natura* por pessoas nativas, ou utilizadas na preparação de alimentos e sucos (ALMEIDA; PROENÇA; RIBEIRO, 1994; FORMAGIO et al., 2015). Muitos membros dessa família são utilizados na medicina popular para tratamentos antiparasitários e antitumorais relacionados ao intestino. Algumas espécies da família Annonaceae têm sido estudadas com o objetivo de isolar e caracterizar as diversas classes de compostos, além de avaliar as suas propriedades farmacológicas (LEBOEUF et al., 1982; FORMAGIO et al., 2015).

Diversas espécies do gênero *Annona* contêm policetídeos com atividades citotóxica, antitumoral, pesticida, antimicrobiana e antiparasitária (LIAW et al., 2016).

A *Annona crassiflora* Mart., cujo fruto é popularmente conhecido como “araticum”, é um membro da família Annonaceae encontrado nas regiões de Cerrado do Brasil. O uso tradicional dessa planta inclui o tratamento para reumatismo, diarreia, feridas, doenças venéreas, acidentes ofídicos, piolhos e micro-organismos (ALMEIDA; SILVA; RIBEIRO, 1987; VILAR et al., 2008). A polpa do araticum é uma fonte rica de carotenoides, polifenóis, tocoferóis, flavonoides e algumas vitaminas e minerais (ROESLER et al., 2007). Alguns desses compostos bioativos podem reduzir a ocorrência de mutações genéticas e retardar a progressão de tumores, enquanto que outros podem diminuir a produção de radicais livres e, consequentemente, proteger o DNA contra danos oxidativos. Um estudo recente também demonstrou o potencial do araticum como agente nematocida, antimalárico, quimiopreventivo e anti-inflamatório (MACHADO et al., 2015).

Durante a produção de sucos e alimentos, uma grande quantidade da casca do fruto de *Annona crassiflora* é descartada. Esses subprodutos geralmente não são utilizados pois possuem um sabor adstringente devido ao alto teor de compostos fenólicos (ROESLER et al., 2007). Até o momento, há poucas informações sobre as características fitoquímicas das substâncias presentes na casca desse fruto. Um dos poucos estudos foi realizado por Roesler et al. (2007), que mostraram o potencial antioxidante do extrato etanólico da casca do araticum por meio de métodos *in vitro* e indicaram a presença de alguns compostos fenólicos com alta capacidade antioxidante, como rutina, xantoxilina, ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido ascórbico e ácido quínico. No entanto, isso foi observado apenas no extrato bruto da casca do araticum. O particionamento líquido-líquido de um extrato bruto vegetal é uma estratégia adotada com o objetivo de concentrar esses compostos bioativos em específicas frações e aumentar as suas atividades biológicas (Cheng, Cai, Ni, Wang, Zhou, Ji, et al., 2015). No entanto, a identificação de compostos bioativos e a sua relação com a capacidade antioxidante e atividade inibitória contra hidrolases glicosídicas e

glicação não enzimática, em diferentes partições do extrato etanólico da casca de araticum, ainda não foram investigadas.

Desse modo, devido à baixa quantidade de estudos científicos sobre as características bioquímicas dos frutos do Cerrado e de seus subprodutos (SILVA et al., 2008) torna-se necessária a sua caracterização fitoquímica. Um melhor entendimento sobre as possíveis propriedades biológicas associadas a esses produtos naturais favorece a segurança do seu consumo e contribui com a sustentabilidade desse bioma. Além disso, propicia o desenvolvimento de novos produtos e isolamento de substâncias que tratem ou melhorem determinadas doenças, como o diabetes. A prevalência e o uso de plantas medicinais pertencentes à família Annonaceae, o seu potencial biológico e a importância de descobrir novos agentes bioativos motivou o estudo da espécie *Annona crassiflora*.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo fracionar a casca do araticum (*Annona crassiflora*) e caracterizar os seus principais compostos bioativos associados com a capacidade antioxidante e atividades de inibição de hidrolases glicosídicas e glicação não enzimática.

2.2. Objetivos específicos

- Fracionar o extrato etanólico da casca do araticum por meio de partição líquido-líquido, utilizando solventes de polaridade crescente;
- Determinar o teor de fenóis totais, flavonoides e proantocianidinas do extrato bruto e de suas partições orgânicas;
- Investigar a presença de classes de compostos nas amostras por meio da prospecção fitoquímica;
- Avaliar a capacidade antioxidante do extrato bruto e de suas partições orgânicas pelos métodos de DPPH (sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-

picrilhidrazil), ORAC (capacidade de sequestro do radical peroxil) e FRAP (capacidade de redução do ferro);

- Avaliar a atividade de inibição das enzimas α -amilase e α -glicosidase do extrato bruto e de suas partições orgânicas;
- Investigar a atividade de inibição da glicação do extrato bruto e de suas partições orgânicas;
- Determinar a citotoxicidade do extrato bruto e de suas partições orgânicas;
- Identificar os principais compostos bioativos presentes nas partições que evidenciem alta capacidade antioxidante e atividade promissora de inibição das hidrolases glicosídicas e da formação de produtos de glicação, por meio de CLAE-ESI-EM/EM.

3. Material e métodos

3.1. Coleta do material

O Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), nos termos Deliberação 246/2009, do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético, autorizou o acesso e a remessa de componente do patrimônio genético, nº 010743/2015-4. Os frutos de araticum (*Annona crassiflora* Mart.) foram coletados nos recursos naturais do Bioma Cerrado na região norte do estado de Minas Gerais, em Março de 2015, por um comerciante de frutos nativos do Cerrado localizado em Presidente Olegário, Minas Gerais, Brasil. As cascas do araticum foram cuidadosamente retiradas do fruto para serem transportadas, sob proteção da luz, para o Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Uberlândia. As cascas foram armazenadas a -20° C até o momento das extrações e análises. Não foi observada oxidação do material vegetal.

3.2. Preparação do extrato etanólico

O extrato etanólico da casca do fruto araticum foi obtido pelo processo de maceração à temperatura ambiente, sob proteção da luz. Foi utilizado 1,0 kg de cascas do fruto, triturados e previamente secos em estufa a 50° C durante 24

horas. A maceração foi realizada utilizando 5,0 L de etanol 98% como solvente (proporção de 1:5 m.v⁻¹). O material vegetal foi deixado em maceração durante 6 dias. Após esse período, a solução com os extrativos foi filtrada e o solvente foi removido em um evaporador rotativo sob pressão reduzida a 40° C. O extrato foi congelado e liofilizado para a remoção da água. O processo de maceração com o material vegetal filtrado foi repetido até a exaustão da extração. O extrato etanólico foi armazenado a -20° C.

3.3. Partição líquido-líquido do extrato etanólico

Para a partição líquido-líquido, aproximadamente 20 g de extrato etanólico da casca do araticum foi solubilizado em 200,0 mL de solução metanol:água (9:1). Com o auxílio de um funil de separação, a partição líquido-líquido foi realizada com solventes de polaridade crescente: hexano, diclorometano, acetato de etila, *n*-butanol e água. Para esse processo, foram realizadas quatro extrações com aproximadamente 200,0 mL de cada solvente. Os solventes das frações foram totalmente removidos por rotaevaporação sob pressão reduzida a 40° C; as frações foram congeladas e liofilizadas para a remoção da água remanescente e, em seguida, armazenadas a -20° C.

3.4. Determinação do conteúdo de fenóis totais

A determinação do teor de fenólicos totais foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Moraes et al. (2008), utilizando o reagente Folin-Ciocalteu. Na qual envolve a redução do reagente de Folin (mistura dos ácidos fosfomolibdico e fosfotungstístico) pelos compostos fenólicos (OLIVEIRA et al., 2009). O ensaio foi preparado com uma mistura de uma alíquota de 0,5 mL de solução metanólica de extrato/partição (500 µg.mL⁻¹), 2,5 mL de solução aquosa do reagente Folin-Ciocalteu 10% (v.v⁻¹) e 2,0 mL de uma solução de Na₂CO₃ 7,5% (m.v⁻¹). Os tubos de ensaio foram submetidos a um banho Maria durante 5 minutos, 50 °C e a absorbância foi lida a 760 nm. O mesmo procedimento foi realizado utilizando 0,5 mL de metanol para obtenção do branco. O conteúdo de fenóis totais foi obtido utilizando uma curva analítica construída com padrões de ácido gálico. Todas as análises foram feitas em triplicata e os resultados foram

expressos como miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (MORAIS et al., 2008).

3.5. Determinação do conteúdo de flavonoides

O teor de flavonoides foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Woisky e Salatino (1998), com a quantificação realizada utilizando cloreto de alumínio. Nessa análise, o cátion alumínio (Al^{3+}) forma complexos estáveis com os flavonoides, que apresentam absorção em comprimento de onda maior do que o flavonoide não complexado (WOISKY; SALATINO, 1998). Em tubos de ensaio, foram adicionados 2,0 mL de solução em metanol do extrato/partições ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$), 1,0 mL de solução em metanol de AlCl_3 5% (m.v⁻¹) e 2,0 mL de metanol e, em seguida, a mistura foi deixada em repouso por 30 min à temperatura ambiente e a absorbância foi registrada a 425 nm. Para a obtenção do branco, o mesmo procedimento foi realizado substituindo a amostra por metanol. O conteúdo de flavonoides foi obtido utilizando uma curva analítica construída com padrões de quercetina. Todas as análises foram feitas em triplicata e os resultados foram expressos como miligramas de equivalentes de quercetina por grama de amostra.

3.6. Determinação do conteúdo de proantocianidinas

O conteúdo de proantocianidinas foi determinado de acordo com Moraes et al. (2008), utilizando vanilina sulfúrica. O mecanismo da reação que ocorre entre a vanilina e o tanino condensado em H_2SO_4 é do tipo substituição eletrofílica no anel aromático. Essa metodologia não identifica os taninos hidrolisáveis pois, conforme as suas estruturas de ressonância, os carbonos na posição *orto* em relação à carbonila apresentam densidade de carga positiva para os taninos hidrolisáveis, o que impede que ocorra uma substituição eletrofílica no anel aromático (SCHOFIELD; MBUGUA; PELL, 2001). Em um tubo de ensaio, foram adicionados 1,0 mL de solução metanólica de extrato/partição ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e 2,0 mL de solução de vanilina 0,5% (m.v⁻¹) em H_2SO_4 70% (m.v⁻¹). A mistura foi mantida por 15 min em banho a 50 °C e, em seguida, a absorbância foi lida a 500 nm. O mesmo procedimento foi realizado utilizando 1,0 mL de metanol para

obtenção do branco. O teor de proantocianidinas foi determinado por meio de uma curva analítica construída com padrões de catequina. Todas as análises foram feitas em triplicata e os resultados foram expressos como miligramas equivalentes de catequina por grama de amostra (MORAIS et al., 2008).

3.7. Prospeção fitoquímica

Para a análise da classe de compostos presentes nas amostras, o extrato e as partições foram solubilizados em metanol na concentração de 1 mg.mL⁻¹. As soluções foram aplicadas em placas de cromatografia de camada delgada (CCD) em fase estacionária de sílica gel (60G) e indicador de fluorescência. Foram utilizados dois tipos de eluentes (WAGNER; BLADT, 1996): clorofórmio:metanol:hidróxido de amônio (proporção de 9:1:0,25) e acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético:água (proporção de 10:1,1:1,1:2,6). Abaixo está descrita a metodologia, de acordo com Wagner e Bladt (1996), para o preparo dos reveladores utilizados na análise dos compostos.

Para a detecção de terpenos, esteroides, fenol e açúcares, o revelador utilizado foi o anisaldeído-ácido sulfúrico. Para a obtenção desse revelador, foi preparada uma solução contendo anisaldeído 5% (v.v⁻¹) em ácido acético glacial, seguida da adição de metanol e ácido sulfúrico concentrado. A placa de CCD foi borrifada com o revelador aquecido a 100° C por 5 min. O revelador Liebermann-Buchard também foi usado para a detecção de terpenos e esteroides. Para o seu preparo, anidrido acético e ácido sulfúrico concentrado foram adicionados a etanol absoluto, sob banho de gelo. A placa de CCD foi pulverizada com a solução recém-preparada e aquecida a 100° C por 5 min. A placa foi observada em luz UV (365 nm).

A detecção de alcaloides foi realizada por meio dos reveladores Dragendorff e Iodocloroplatinado. Para o preparo do revelador Dragendorff, foram feitas 2 soluções (soluções A e B); dissolveu-se nitrato de bismuto em ácido acético glacial, e adicionou-se água destilada sob aquecimento (solução A); dissolveu-se iodeto de potássio em água (solução B). As soluções A e B foram misturadas na mesma proporção e o revelador foi obtido misturando a solução recém-preparada com ácido acético glacial e água (proporção de 1:2:10). Para o

preparo do revelador Iodocloroplatinado, foi preparada uma solução A contendo ácido hexacloroplatínico 5% em água (m.v^{-1}) e uma solução B contendo iodeto de potássio 10% em água (m.v^{-1}). A solução reveladora foi preparada misturando-se a solução A, a solução B e água (proporção de 1:9:10).

A detecção de flavonoides foi realizada por meio dos reveladores NP/PEG e Cloreto de Alumínio (AlCl_3). Para o preparo do revelador NP/PEG, foram misturadas uma solução A, contendo difenilboriloxietilamina 1% (m.v^{-1}) em metanol, e uma solução B, contendo polietileno glicol-4000 5% (m.v^{-1}) em etanol (proporção de 5:4). A placa de CCD foi borrifada com o revelador NP/PEG e observada em luz UV a 365 nm. O revelador cloreto de alumínio foi obtido por meio do preparo de uma solução contendo AlCl_3 1% (m.v^{-1}) em metanol. A placa de CCD foi borrifada com o revelador AlCl_3 e observada em luz visível.

3.8. Determinação da capacidade antioxidante

3.8.1. Método do sequestro do radical DPPH

O procedimento foi realizado utilizando o radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) de acordo com o método descrito por Yildirim, Mavi e Kara (2001) modificado. Na análise da capacidade antioxidante pelo sequestro do radical DPPH, a reação entre os compostos fenólicos e o radical pode ocorrer por meio da transferência de hidrogênio atômico ou por perda sequencial de próton na transferência de elétron (LIU, 2010). O extrato bruto e as partições orgânicas foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO). O ensaio foi iniciado com 250 μL de extrato/partição solubilizado em 750 μL de solução metanólica de DPPH ($0,06 \text{ mmol.L}^{-1}$). A mistura contendo extrato/partição foi incubada a 30°C , na ausência de luz, por 20 min. A redução na absorbância da mistura foi medida em espectrofotômetro a 517 nm. O controle foi realizado substituindo o extrato/partição por metanol. O branco foi realizado substituindo a solução de DPPH por metanol. O ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo. O cálculo da porcentagem da capacidade antioxidante (CA), que corresponde à porcentagem de DPPH “sequestrado”, foi determinada pela Equação 1 (YILDIRIM; MAVI; KARA, 2001).

$$CA = (\%) = \left(\frac{Abs\ controle - (Abs\ amostra - Abs\ branco)}{Abs\ controle} \right) \cdot 100 \quad \text{Equação 1}$$

Onde: *Abs controle* é a absorbância inicial da solução metanólica de DPPH, *Abs amostra* é a absorbância da mistura (DPPH + amostra), *Abs branco* é a absorbância da amostra em metanol.

Todas as análises foram realizadas em triplicata com diferentes concentrações de cada amostra para a determinação dos valores de IC₅₀.

3.8.2. Método do sequestro do radical peroxil (ORAC)

A capacidade antioxidante foi avaliada de acordo com a eficácia de absorção do radical peroxil do extrato/partições (PRIOR et al., 2003). A análise da capacidade antioxidante pelo método de absorção do radical peroxil (ORAC) é baseada na inibição da oxidação induzida do radical peroxil iniciada por decomposição térmica do composto 2,2'-azobis (2-amidino-propano) dihidroclorato; a fluoresceína é utilizada como sonda fluorescente, e a perda de sua fluorescência é avaliada ao longo do tempo, na ausência e presença de antioxidante (PRIOR et al., 2003). O extrato bruto e as partições orgânicas foram diluídos em DMSO na concentração de 20 µg.mL⁻¹. Neste ensaio, todos os reagentes foram preparados em tampão fosfato a 75 mmol.L⁻¹, pH 7.4. Inicialmente, 25 µL de extrato/partição foram misturados a 150 µL de fluoresceína (0,085 nmol.L⁻¹) e incubados à temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, 30 µL da solução de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorato (AAPH) para dar início à reação. A intensidade de fluorescência (485 nm_{ex}/528 nm_{em}) foi medida em espectrofluorímetro e foi verificada a cada 1 min e 30 s durante 90 min. O branco foi realizado substituindo o extrato/partição por tampão fosfato. O ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo. A perda de fluorescência da fluoresceína foi medida utilizando o cálculo da área sob a curva e a capacidade antioxidante foi determinada por meio de uma curva analítica construída com ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox). Todas as análises foram feitas em triplicata e os resultados foram expressos como µmol equivalente de Trolox por grama de amostra.

3.8.3. Método da capacidade de redução do Ferro (FRAP)

A capacidade antioxidante do extrato/partições foi determinada por meio do potencial antioxidante redutor férrico. Neste ensaio, os antioxidantes presentes nas amostras reduzem o Fe^{3+} a Fe^{2+} , o qual é quelado pela 2,4,6-tri(2piridil)-s-triazina (TPTZ) para formar o complexo Fe^{2+} -TPTZ, de coloração azul intensa (BENZIE; STRAIN, 1996). O extrato bruto e as partições orgânicas foram diluídos em DMSO na concentração de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Neste ensaio, incuba-se $250 \mu\text{L}$ do reagente de FRAP, que contém 10 volumes de tampão acetato de sódio a $0,3 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 3,6, 1 volume de solução ácida de TPTZ a 10 mmol.L^{-1} e 1 volume de solução aquosa de cloreto férrico a 20 mmol.L^{-1} , com $10 \mu\text{L}$ de extrato/partição e $25 \mu\text{L}$ de água durante 6 min a 37°C . As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro a 593 nm e a capacidade antioxidante foi determinada por meio de uma curva analítica construída com ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox). Todas as análises foram feitas em triplicata e os resultados foram expressos como μmol equivalente de Trolox por grama de amostra.

3.9. Determinação da inibição da atividade das hidrolases glicosídicas

3.9.1. Inibição da atividade da α -amilase

O extrato etanólico da casca do araticum e as suas partições orgânicas foram analisadas em relação à sua capacidade em inibir a atividade da α -amilase pelo método GALG2CNP modificado, utilizando o substrato α -(2-cloro-4-nitrofenil)- β -1,4-galactopiranosilmaltosídeo (GAL-G2- α -CNP) e uma fração de saliva enriquecida da enzima α -amilase (f-AS) (SANTOS et al., 2012; DE GOUVEIA et al., 2014). Para o preparo da f-AS, saliva humana foi coletada pelo método de cuspe e armazenada a -20°C por 48 h (parecer do comitê de ética no. 407.597). Após esse período, a saliva foi descongelada e centrifugada a $12000 \times g$ por 10 min a 20°C . O sobrenadante foi fracionado em uma coluna de Q-Sepharose utilizando como fase móvel um tampão contendo 50 mmol.L^{-1} de Tris-HCl (pH 8,0), 10 mmol.L^{-1} de EDTA e 10 mmol.L^{-1} de EGTA. O volume de exclusão da coluna de Q-Sepharose foi dialisado em tampão de bicarbonato de amônio (50

mmol.L⁻¹, pH 7,0), liofilizado e solubilizado em 50 mmol.L⁻¹ de tampão ácido 2-(N-morfolino)-etanossulfônico (MES), contendo 5 mmol.L⁻¹ de cloreto de cálcio, 140 mmol.L⁻¹ de tiocianato de potássio e 300 mmol.L⁻¹ de cloreto de sódio (pH 6,0).

As amostras de extrato/partições foram dissolvidas em DMSO e incubadas com a f-AS (proporção de 1:10) durante 30 min a 37° C. A reação foi iniciada pela adição de 320 µL do substrato GAL-G2-α-CNP (12 mmol.L⁻¹) e os valores de absorbâncias foram medidos a 405 nm, durante 3 min, com intervalo de 1 min, a 37° C. O controle foi realizado substituindo o extrato/partição por tampão MES. A acarbose foi utilizada como controle positivo. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado foi apresentado como porcentagem de inibição da α-amilase, calculado por meio da Equação 4. As Equações 2 e 3 determinam a atividade da enzima em U.mL⁻¹ e %, respectivamente, e foram utilizadas no cálculo da inibição (Equação 3).

$$\text{Atividade da } \alpha - \text{amilase} \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{\left[\left(\frac{\Delta Abs}{min} \right) \cdot Vf \cdot Fd \right]}{\xi \cdot Vs \cdot l} \quad \text{Equação 2}$$

$$\text{Atividade da } \alpha - \text{amilase} (\%) = \frac{(A \text{ amostra})}{(A \text{ controle})} \cdot 100 \quad \text{Equação 3}$$

$$\text{Inibição da } \alpha - \text{amilase} (\%) = 100 - (\text{Atividade da } \alpha - \text{amilase em } \%) \quad \text{Equação 4}$$

Onde: $\Delta Abs/min = [(Abs_3 - Abs_1)/2]$ é a diferença de absorbância por minuto (Abs = absorbância; 1 e 3 = minutos); Vf é o volume total da reação (328 µL); Vs é o volume de amostra (extrato/fração mais enzima α-amilase, 8 µL); Fd é o fator de diluição da saliva (50); ξ é o coeficiente de absorvidade do 2-cloro-*p*-nitrofenol; l é o comprimento do percurso da luz (0,97); $A \text{ controle}$ é a atividade da α-amilase e $A \text{ amostra}$ é a atividade da α-amilase na presença do extrato/fração.

Todas as análises foram realizadas em triplicata com diferentes concentrações de cada amostra para a determinação dos valores de IC₅₀.

3.9.2. Inibição da atividade da α-glicosidase

O extrato etanólico da casca do araticum e as suas partições orgânicas foram analisadas em relação à sua capacidade em inibir a atividade da α-

glicosidase utilizando o substrato 4-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (*p*-NPG) (SHAN et al., 2016) e uma fração enriquecida da enzima α -glicosidase (f-AG) (Sigma-Aldrich I-1630) (TOMA et al., 2014). Para o preparo da f-AG, 200 mg de pó cetônico de intestino de rato foi homogeneizado em 3 mL de solução aquosa de cloreto de sódio (0,9% m.v⁻¹). O homogeneizado foi centrifugado a 12000 *xg* por 30 min e o sobrenadante (f-AG) foi utilizado no ensaio. As amostras de extrato/partições foram dissolvidas em DMSO e foram incubadas com a f-AG e 1,5 mmol.L⁻¹ de glutathiona reduzida (diluída em tampão fosfato a 50 mmol.L⁻¹, pH 6,8) durante 20 min a 37° C. A reação foi iniciada pela adição do substrato *p*-NPG (4 mmol.L⁻¹, em tampão fosfato de sódio a 50 mmol.L⁻¹, pH 6,8) e os valores de absorbâncias foram medidos a 405 nm, durante 30 min, com intervalo de 5 min, a 37° C. O controle foi realizado substituindo o extrato/partição por tampão fosfato. A acarbose foi utilizada como controle positivo. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. O resultado é dado em porcentagem de inibição da α -glicosidase, calculado por meio da Equação 5.

$$\text{Inibição da } \alpha - \text{glicosidase} = \left(\frac{(ASC \text{ controle} - ASC \text{ amostra})}{ASC \text{ controle}} \right) \cdot 100 \quad \text{Equação 5}$$

Onde: *ASC controle* é a área sob a curva na ausência de extrato/partição, e *ASC amostra* é a área sob a curva na presença de extrato/partição.

Todas as análises foram realizadas em triplicata com diferentes concentrações de cada amostra para a determinação dos valores de IC₅₀.

3.9.3. Parâmetros cinéticos das enzimas α -amilase e α -glicosidase

Para investigar o modo de inibição para a α -amilase e α -glicosidase, concentrações crescentes de GAL-G2- α -CNP e *p*-NPG, respectivamente, foram utilizadas na ausência e presença de concentrações específicas das partições acetato de etila e *n*-butanol. A absorbância foi lida a 405 nm e uma curva de calibração foi preparada de acordo com os dados de concentração e atividade das enzimas. De acordo com a cinética de Michaelis-Menten e utilizando a análise do duplo recíproco, os parâmetros cinéticos da enzima foram observados e

utilizados para o estudo do efeito inibitório da partição sobre a α -amilase e a α -glicosidase.

3.10. Determinação do potencial de inibição de glicação

Para este ensaio, foram adicionados em tubos de ensaio 50 mg.mL⁻¹ de BSA (Albumina Sérica Bovina) diluída em tampão fosfato (200 mmol.L⁻¹, pH 7,4), 1,25 mol.L⁻¹ de frutose diluída em tampão fosfato (200 mmol.L⁻¹, pH 7,4) e o extrato/partições diluídos em DMSO. Os tubos foram incubados à 37° C por 72 horas, na ausência de luz. Após esse período, 1,6 mL de ácido tricloroacético 20% (m.v⁻¹) foi adicionado em cada tubo. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 10000 *xg* por 10 min e o *pellet* foi ressuspensionado em 1,6 mL de tampão fosfato (200 mmol.L⁻¹, pH 7,4). A redução da fluorescência do BSA quando se liga ao açúcar (frutose) foi avaliada em espectrofluorímetro, com excitação a 350 nm e emissão a 420 nm (SRI HARSHA; LAVELLI; SCARAFONI, 2014). O controle foi realizado substituindo o extrato/partição por DMSO. O branco foi realizado substituindo a frutose por tampão fosfato (200 mmol.L⁻¹, pH 7,4), e o extrato/partição por DMSO. A quercetina foi usada como controle positivo. A porcentagem de inibição de glicação (IG) é calculada por meio da Equação 6.

$$IG (\%) = 100 - \left(\frac{(IF \text{ amostra} - IF \text{ branco})}{(IF \text{ controle} - IF \text{ branco})} \cdot 100 \right) \quad \text{Equação 6}$$

Sendo: *IF amostra* a intensidade de fluorescência na presença de extrato/partição, *IF branco* a intensidade de fluorescência na ausência de frutose e extrato/partição, e *IF controle* a intensidade de fluorescência na ausência de extrato/partição.

Todas as análises foram realizadas em triplicata com diferentes concentrações de cada amostra para a determinação dos valores de IC₅₀.

3.11. Determinação da citotoxicidade

3.11.1. Cultivo Celular

A linhagem celular murina do tipo fibroblasto NIH/3T3 foi adquirida do American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EUA) e mantida em cultura no Laboratório de Imunopatologia da Universidade Federal de Uberlândia. Os fibroblastos foram cultivados em frascos de cultura de 25 cm² contendo meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF), 2 mmol.L⁻¹ de L-glutamina, 100 U.mL⁻¹ de penicilina e 100 mg.mL⁻¹ de estreptomicina em estufa umidificada a 37° C e 5% de CO₂.

3.11.2. Avaliação da viabilidade celular dos fibroblastos NIH/3T3 tratados com diferentes concentrações do extrato e partições da *Annona crassiflora*

A viabilidade celular dos fibroblastos NIH/3T3 foi avaliada pelo ensaio colorimétrico MTT [brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio], que se baseia na capacidade das células viáveis reduzirem metabolicamente o sal de MTT, por meio da enzima mitocondrial desidrogenase succínica, em cristais de formazan de cor azul-púrpura que se acumula no citoplasma celular (MOSMANN, 1983). Assim, as células NIH/3T3 foram retiradas dos frascos de cultura pela ação de tripsina, centrifugadas e ressuspensas em 1 mL de meio RPMI 1640 com soro (para neutralizar a ação da tripsina) e contadas em câmara de Neubauer. Após o ajuste para uma concentração de 3x10⁴ células a cada 200 µL de meio, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços e mantidas por 24 h a 37° C e 5% de CO₂. Após esse período, os meios foram aspirados e descartados, as células foram tratadas com diferentes concentrações do extrato etanólico da casca de araticum e de suas partições orgânicas (30 µg.mL⁻¹, 60 µg.mL⁻¹, 120 µg.mL⁻¹ e 240 µg.mL⁻¹) e incubadas novamente por 24 h em estufa a 37° C, 5% de CO₂. Posteriormente, as células foram lavadas com meio e a elas foram adicionadas 10 µL de azul de tiazolil (solução de MTT) na concentração de 5 mg.mL⁻¹ em 90 µL de meio RPMI completo e, então, incubadas por mais 4 h. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as partículas insolúveis de coloração roxa, produzidas por células viáveis que metabolizaram o MTT, foram solubilizadas com 100 µL por poço de solução 10% de duodecil sulfato de sódio

(SDS) e 50% N, N-dimetil formamida. Após 30 minutos de incubação, a densidade óptica foi determinada a 570 nm. A porcentagem de células viáveis foi calculada em todas as condições experimentais em relação ao controle (células não tratadas), que correspondeu a 100% de viabilidade (BARBOSA et al., 2012).

3.12. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas

Para a identificação dos principais compostos presentes nas amostras que apresentaram melhores atividades biológicas avaliadas nesse trabalho, foram feitas análises por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas com fonte de ionização por *electrospray* (CLAE-ESI-EM/EM) utilizando o equipamento da Bruker Daltonics, modelo MAxis 3G microTOF. As amostras foram solubilizadas em água/isopropanol (proporção de 70:30) e introduzidas utilizando seringa (500 µL), adaptada a uma bomba de infusão direta com fluxo de 200 µ.hora⁻¹. O capilar foi aquecido a 200° C com fluxo de gás nebulizante de 4 L.min⁻¹ e 4,5 KV. Foi realizada uma calibração com formiato de sódio a 10 mmol.L⁻¹ em cada amostra, no início da corrida cromatográfica. Os parâmetros do CLAE foram: coluna Shimadzu Shim-pack XR-ODS III 150 x 2 mm, partículas de 5 µm e poros de 110 Å de diâmetro, fase móvel: água acidificada com ácido fórmico (0,1%, v.v⁻¹) (A) e acetonitrila acidificada com ácido fórmico (0,1%, v.v⁻¹) (B). Foi utilizado o seguinte sistema gradiente de solventes: 15-40% (0-7 min); 40-90% (7-8 min); 90-90% (8-9 min); 90-15% (9-10 min), e utilizou-se fluxo de 0,35 mL.min⁻¹, detecção: UV 280 e 360 nm. Os dados foram adquiridos no modo negativo e positivo, com ajuste para faixa de 20 a 1500 m.z⁻¹. A resolução do equipamento é de 2 ppm. Os dados obtidos são medidas de alta resolução de massa e comparadas através do erro (em ppm) calculado em relação a massa exata por meio da Equação 7.

$$E \text{ ppm} = \left[\frac{(\text{massa exata} - \text{massa experimental})}{\text{massa exata}} \right] \cdot 10^6 \quad \text{Equação 7}$$

3.13. Análises estatísticas

Para avaliar a diferença entre os resultados obtidos, utilizou-se o método da Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni. Para as análises de correlação entre os dados, foi utilizado o teste de Pearson. O programa GraphPad Prism versão 6.0 foi utilizado para a confecção dos gráficos e análises estatísticas. Todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4. Resultados

4.1. Rendimento de extração e partição líquido-líquido

Na tabela 1 encontram-se os rendimentos das extrações etanólicas por maceração da casca de araticum (*Annona crassiflora*).

Tabela 1. Rendimento do processo de extração etanólica por maceração à temperatura ambiente da casca do araticum (*Annona crassiflora*).

Extração (número)	Massa seca (g)	Massa final (g)	Rendimento (%)
1	1000	49,8	5,0
2	1000	50,4	5,0
3	1000	63,7	6,4
Média \pm desvio padrão	1000	54,6 \pm 7,8	5,5 \pm 0,8

O extrato etanólico bruto foi solubilizado em metanol:água (proporção de 9:1) e fracionados por meio da partição líquido-líquido para a obtenção das partições hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol; o resíduo remanescente foi denominado fração aquosa. A Tabela 2 mostra os valores de rendimento referentes a cada partição. A partição *n*-butanol apresentou mais de 60% do rendimento total, seguido da partição acetato de etila, cujo rendimento foi 10%. As demais partições apresentaram rendimento inferior a 4%.

Tabela 2. Rendimento da partição líquido-líquido do extrato etanólico da casca do araticum (*Annona crassiflora*).

Partições	Massa final das extrações (g)	Rendimento (%)
Hexano	0,42	2,1
Diclorometano	0,67	3,4
Acetato de etila	2,06	10,4
<i>n</i> -Butanol	11,96	60,4
Fração aquosa	0,47	2,3

Nota: massa de extrato etanólico utilizado para a partição orgânica foi 19,8 g.

4.2. Conteúdo de fenóis totais, flavonoides e proantocianidinas

A quantificação do teor de fenóis totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu. A partição acetato de etila apresentou uma quantidade de fenóis totais muito superior à das outras amostras. A partição *n*-butanol também mostrou um elevado teor de compostos fenólicos, em comparação com as partições hexano, diclorometano e fração aquosa (Tabela 3). Comportamento semelhante ao dos fenóis totais foi observado para o conteúdo de proantocianidinas do extrato/partições. A partição acetato de etila apresentou o maior teor de taninos condensados, seguida da partição *n*-butanol (Tabela 3). Em relação aos flavonoides, foi possível verificar que a partição *n*-butanol apresentou o maior conteúdo dessas substâncias, em comparação com o extrato bruto e as demais partições (Tabela 3).

Tabela 3. Teor de fenóis totais, flavonoides e proantocianidinas do extrato etanólico da casca de araticum (*Annona crassiflora*) e de suas partições orgânicas.

Amostras	Fenóis totais (mg EAG/g de amostra)	Flavonoides (mg EQ/g de amostra)	Proantocianidinas (mg EC/g de amostra)
Etn.	319,40 ± 7,41 ^a	15,97 ± 0,88 ^a	234,60 ± 2,50 ^a
Hex.	41,11 ± 0,69 ^b	13,74 ± 0,29 ^a	68,64 ± 1,73 ^{bc}
Dicl.	57,11 ± 1,69 ^b	15,21 ± 0,10 ^a	49,38 ± 0,99 ^b
Ac. et.	497,90 ± 38,73 ^c	19,06 ± 0,67 ^a	757,5 ± 12,01 ^d
N. but.	383,90 ± 11,53 ^a	45,28 ± 4,19 ^b	458,9 ± 4,04 ^e
F. aq.	85,41 ± 1,30 ^b	4,11 ± 0,20 ^c	86,42 ± 8,36 ^c

Nota: valores expressos como média ± erro padrão. Letras iguais entre as linhas não mostraram diferença significativa ($p < 0,05$). Etn.: extrato bruto etanólico, Hex.: partição hexano, Dicl.:

partição diclorometano, Ac. et.: partição acetato de etila, N. but.: partição *n*-butanol, F. aq.: fração aquosa.

Ao comparar os resultados obtidos das análises do teor de fenóis totais e proantocianidinas utilizando o teste de correlação de Pearson, verifica-se uma alta correlação positiva entre essas análises, ou seja, a amostra que apresenta maior conteúdo de fenóis totais também apresenta maior conteúdo de proantocianidinas ($r = 0,94$, $p < 0,05$) (Figura 1). No entanto, para as amostras de araticum analisadas nesse trabalho, não foi possível observar uma alta correlação entre o teor de flavonoides e os teores de fenóis totais ($r = 0,56$, $p < 0,05$) e proantocianidinas ($r = 0,49$, $p < 0,05$).

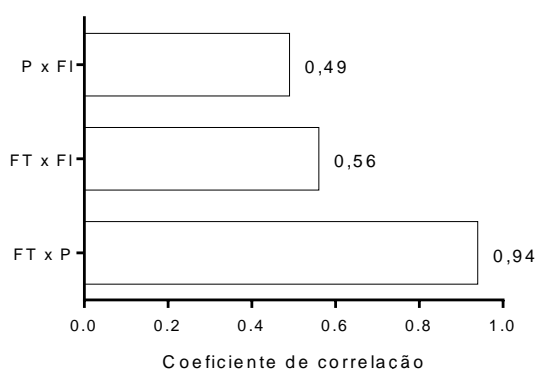


Figura 1. Coeficiente de correlação entre as análises de fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides. Nota: FT: fenóis totais; P: proantocianidinas; FI: flavonoides.

4.3. Prospeção fitoquímica

A prospeção fitoquímica do extrato e das partições da casca do araticum foi realizada por meio de cromatografia de camada delgada, com a utilização de duas fases móveis, polar e apolar, e de diferentes reveladores químicos. Foi possível identificar a presença de alcaloides no extrato bruto e nas partições menos polares (hexano e diclorometano). A presença de terpenos, esteroides e açúcares também foi confirmada no extrato bruto e nas partições menos polares. Além disso, foi verificada a presença de flavonoides no extrato bruto e nas partições hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol. Esses resultados estão representados na Tabela 4.

Tabela 4. Prospecção fitoquímica do extrato etanólico da casca do araticum (*Annona crassiflora*) e de suas partições orgânicas.

Amostras	Flavonoides		Alcaloides		Terpenos e esteroides	Terpenos, esteroides, fenol e açúcar
	AlCl ₃	NP/PEG	Iodocloro platinado	Dragendorff	Libermann-Buchard	Anisaldeído
Etn.	-	+	+	+	+	+
Hex.	-	+	+	+	+	+
Dicl.	-	+	+	+	+	+
Ac. et.	+	+	-	-	-	-
N. but.	+	+	-	-	-	-
F. aq.	-	-	-	-	-	-

Nota: Etn.: extrato bruto etanólico, Hex.: partição hexano, Dicl.: partição diclorometano, Ac. et.: partição acetato de etila, N. but.: partição *n*-butanol, F. aq.: fração aquosa. + presente, - ausente.

4.4. Atividade antioxidante

Uma vez que o extrato etanólico da casca de araticum (*Annona crassiflora*) e suas partições orgânicas apresentaram um elevado teor de compostos fenólicos, a atividade antioxidante foi analisada utilizando três diferentes métodos. Comparadas com o controle (ácido ascórbico), todas as amostras apresentaram uma alta capacidade antioxidante pelo método de ORAC, com exceção da partição hexano e da fração aquosa (Figura 2A).

Pelo método de redução do ferro (FRAP), as partições *n*-butanol e acetato de etila apresentaram maior capacidade antioxidante, sendo esses resultados semelhantes ao do ácido ascórbico (Figura 2B). Ao comparar os resultados obtidos das análises do teor de fenóis totais e proantocianidinas com os resultados de capacidade antioxidante obtidos por esse método, verifica-se que quanto maior a capacidade antioxidante, maior o teor de fenóis totais ($r = 0,93$, $p < 0,05$) e proantocianidinas ($r = 0,88$, $p < 0,05$) (Figura 3).

Os resultados da análise da capacidade antioxidante pelo método de DPPH foram expressos como IC₅₀, que corresponde à concentração de amostra necessária para obter 50% de atividade antioxidante (Figura 2C). Assim como nos

demais métodos, as partições *n*-butanol e acetato de etila apresentaram maior capacidade antioxidante, com valores de IC₅₀ menores do que o ácido ascórbico. Além disso, a partição diclorometano apresentou menor capacidade antioxidante em comparação com as demais amostras.

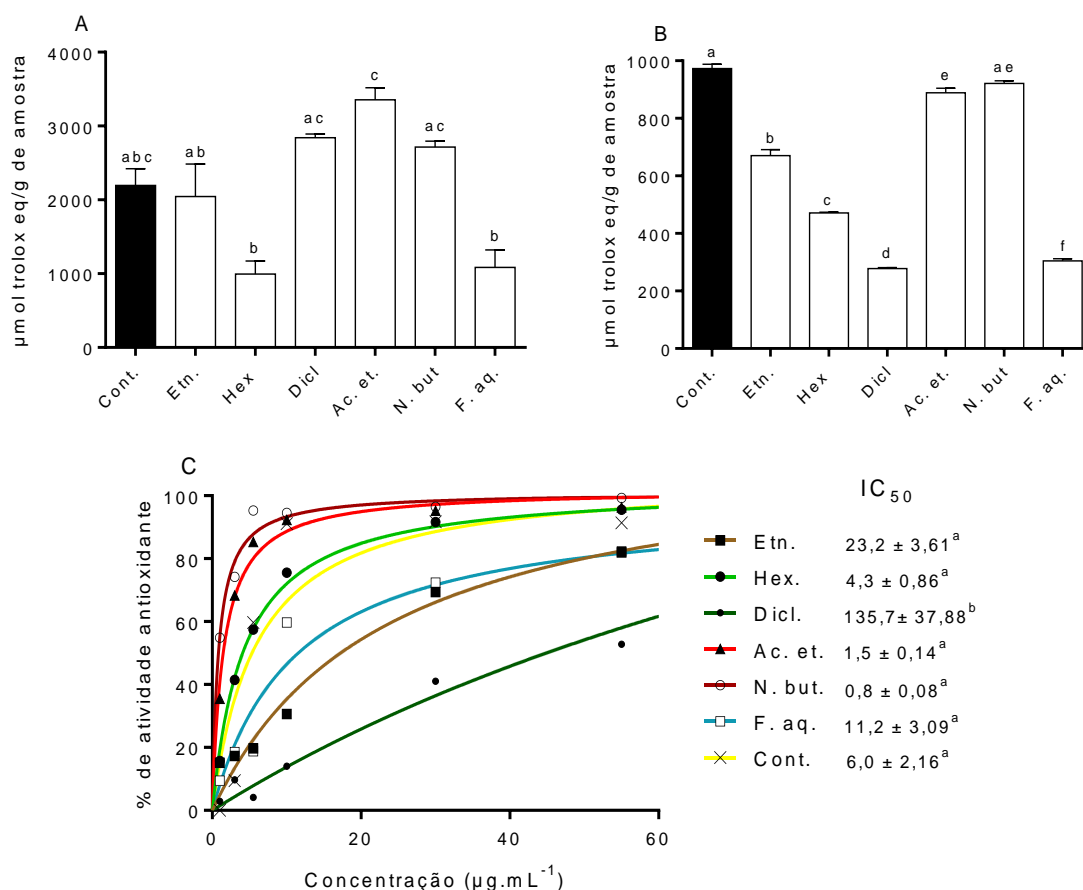


Figura 2. Análise da capacidade antioxidante do extrato etanólico da casca de araticum (*Annona crassiflora*) e de suas partições orgânicas pelos métodos ORAC (A), FRAP (B) e DPPH (C). Valores expressos em μmol de equivalentes de trolox por grama de amostra (A e B), porcentagem de atividade antioxidante e concentração capaz de atingir 50% de atividade antioxidante (IC₅₀) (C). Valores expressos como média ± erro padrão. Nota: Etn.: extrato bruto etanólico, Hex.: partição hexano, Dicl.: partição diclorometano, Ac. et.: partição acetato de etila, N. but.: partição *n*-butanol, F. aq.: fração aquosa, Contr.: controle positivo. Letras diferentes apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

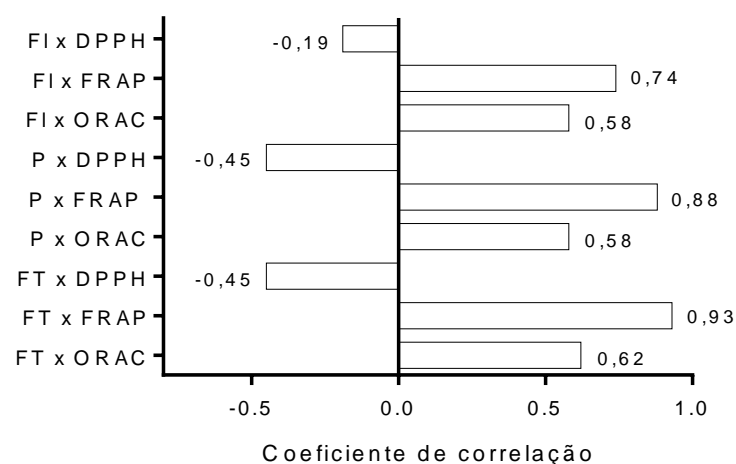


Figura 3. Coeficiente de correlação entre a capacidade antioxidante avaliada pelos métodos DPPH, FRAP e ORAC e o conteúdo de fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides. Nota: FT: fenóis totais; P: proantocianidinas; FI: flavonoides.

4.5. Atividade de inibição da α -amilase e α -glicosidase

A Figura 4A mostra a porcentagem de inibição da α -amilase pelo(as) extrato/partições da casca de araticum, assim como os valores de concentração capazes de inibir 50% a atividade da enzima (IC_{50}). A partir da concentração de $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$, as partições hexano, acetato de etila e *n*-butanol e a fração aquosa apresentaram atividade de inibição da α -amilase acima de 90%. De acordo com os valores de IC_{50} , verifica-se que a partição *n*-butanol apresentou a maior capacidade de inibir a α -amilase, seguida da partição acetato de etila. No entanto, a partição diclorometano apresentou o maior valor de IC_{50} e, consequentemente, uma menor atividade de inibição.

Os resultados de inibição da atividade da α -glicosidase pelo extrato etanólico da casca de araticum e por suas partições orgânicas são mostrados na Figura 4B. As partições acetato de etila e *n*-butanol apresentaram os menores valores de IC_{50} , enquanto que a partição diclorometano mostrou o maior valor de IC_{50} . Comparando a capacidade de inibição da α -glicosidase com os teores de fenóis totais e proantocianidinas do extrato/partições, verifica-se que quanto maior o teor desses compostos, menor o IC_{50} , ou seja, maior a atividade de inibição enzimática, uma vez que foi observado uma alta correlação entre a capacidade da

amostra em inibir a α -glicosidase e o seu conteúdo de fenóis totais ($r = -0,86$, $p < 0,05$) e proantocianidinas ($r = -0,81$, $p < 0,05$) (Figura 5).

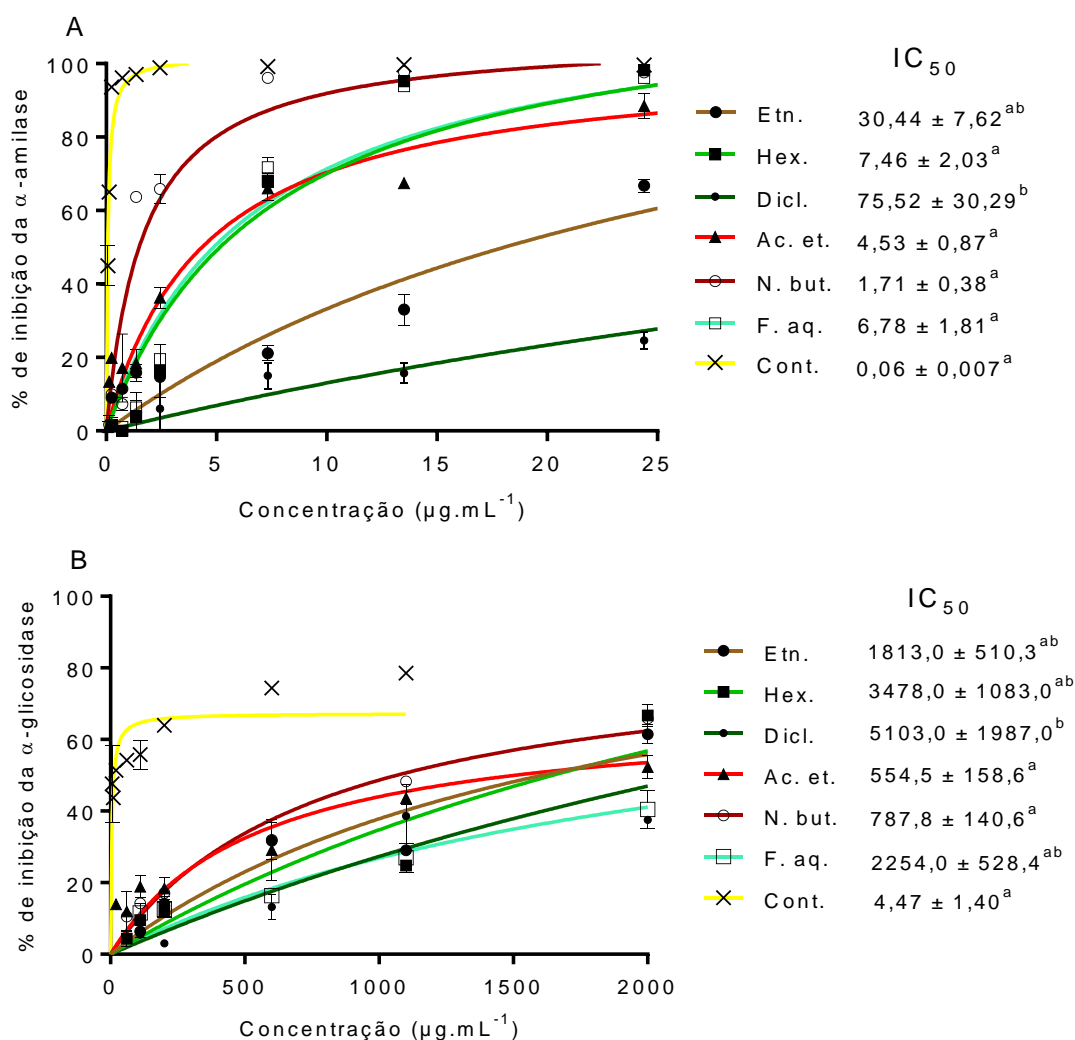


Figura 4. Análise da inibição da atividade das enzimas α -amilase (A) e α -glicosidase (B) pelo extrato etanólico da casca de araticum (*Annona crassiflora*) e por suas partições orgânicas. Valores expressos em porcentagem de inibição enzimática e concentração capaz de inibir 50% a atividade das enzimas (IC₅₀). Valores expressos como média \pm erro padrão. Nota: Etn.: extrato bruto etanólico, Hex.: partição hexano, Dicl.: partição diclorometano, Ac. et.: partição acetato de etila, N. but.: partição *n*-butanol, F. aq.: fração aquosa, Contr.: controle positivo. Letras diferentes apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

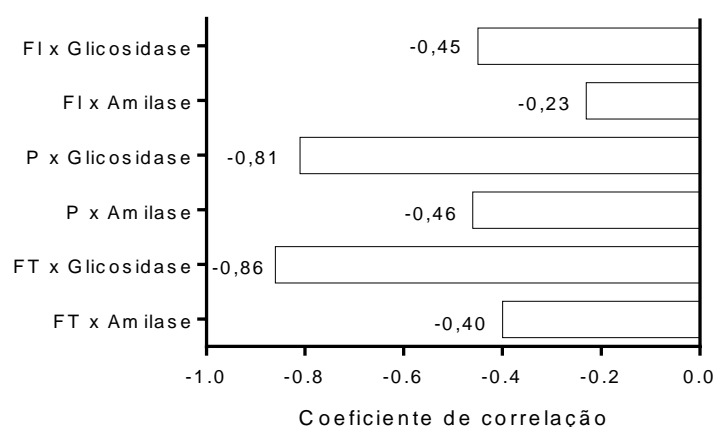


Figura 5. Coeficiente de correlação entre as atividades de inibição da α -amilase e α -glicosidase e o conteúdo de fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides. Nota: FT: fenóis totais; P: proantocianidinas; FI: flavonoides.

O padrão de inibição da α -glicosidase entre as partições foi semelhante ao padrão observado na inibição da α -amilase, porém, os valores de IC_{50} referentes à α -glicosidase foram superiores. Esses resultados indicam que são necessárias concentrações maiores das partições provenientes da casca de araticum para inibir a atividade da α -glicosidase, em comparação com α -amilase.

Para esclarecer o tipo de inibição exercido pelas partições sobre as enzimas α -amilase e α -glicosidase, a plotagem dos dados utilizando Lineweaver-Burk foi realizada (Figuras 6 e 7). Para a α -amilase, um decréscimo nos valores de $V_{m\acute{a}x}$ foi observado enquanto que os valores de K_m mantiveram-se inalterados, quando foram utilizadas diferentes concentrações fixas das partições acetato de etila e *n*-butanol. Esse resultado indica que os compostos presentes nessas frações exibem predominantemente um modo de inibição não-competitivo. Para a α -glicosidase, os valores de $V_{m\acute{a}x}$ diminuíram na presença de ambas as partições. No entanto, enquanto que na presença da partição *n*-butanol o valor de K_m manteve-se inalterado, a presença da partição acetato de etila diminuiu o valor de K_m . Isso sugere modos de inibição não-competitivo e incompetitivo para as partições *n*-butanol e acetato de etila, respectivamente.

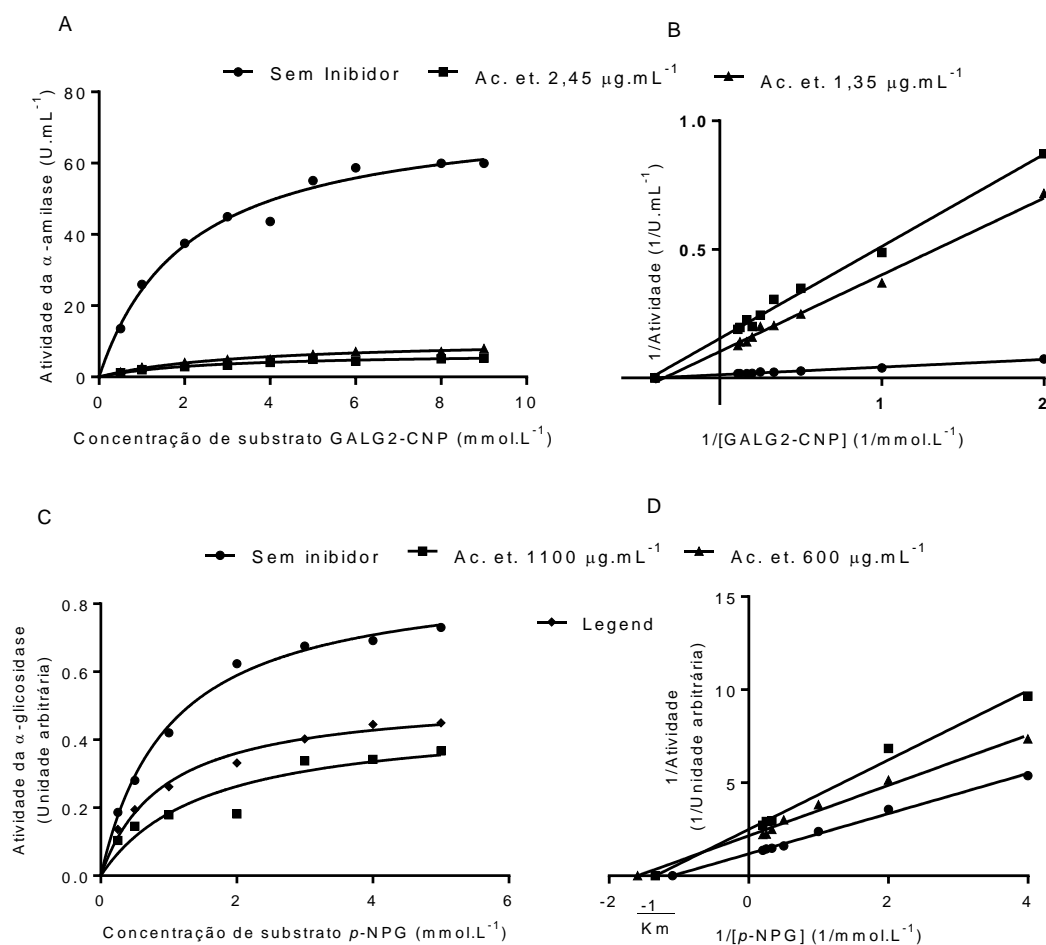


Figura 6. Efeito de diferentes concentrações da partição acetato de etila sobre a atividade da enzima α -amilase (A) e α -glicosidase (C). Plotagem dos dados por meio do duplo recíproco (Lineweaver-Burk) da reação da α -amilase (B) e α -glicosidase (D) com diferentes concentrações de substrato na ausência e presença de concentrações específicas da partição acetato de etila. Nota: Ac. et.: partição acetato de etila, N. but.: partição n -butanol.

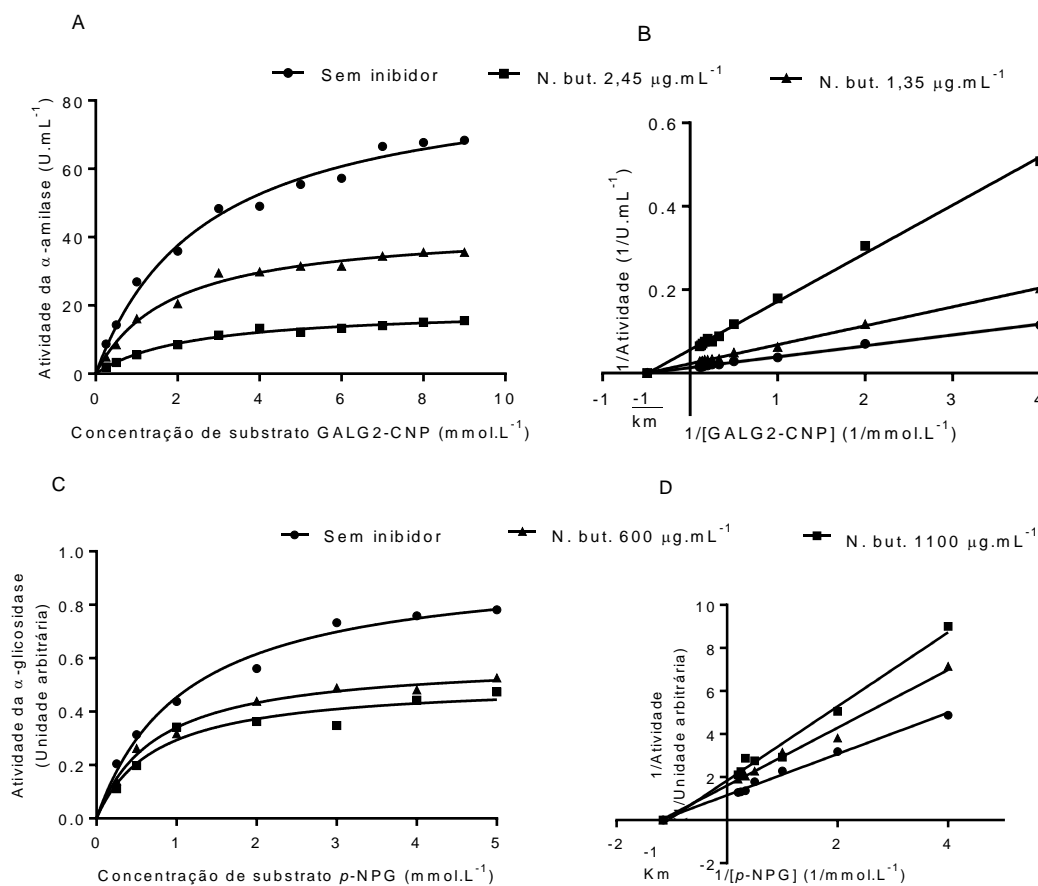


Figura 7. Efeito de diferentes concentrações da partição *n*-butanol sobre a atividade da enzima α -amilase (A) e α -glicosidase (C). Plotagem dos dados por meio do duplo recíproco (Lineweaver-Burk) da reação da α -amilase (B) e α -glicosidase (D) com diferentes concentrações de substrato na ausência e presença de concentrações específicas da partição *n*-butanol. Nota: Ac. et.: partição acetato de etila, N. but.: partição *n*-butanol.

4.6. Capacidade de inibição da glicação

Para avaliar o efeito do extrato/partições sobre a glicação proteica, albumina sérica bovina foi incubada com frutose na presença e ausência de extrato/partição e a intensidade de fluorescência foi medida após 72 h de incubação. Os resultados da capacidade anti-glicação do extrato etanólico da casca de araticum e de suas partições orgânicas estão ilustrados na Figura 8. A partir da concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, todas as amostras foram capazes de inibir a glicação acima de 80%, com exceção da partição diclorometano. As partições

acetato de etila e *n*-butanol exibiram resultados semelhantes ao da quercetina e apresentaram os menores valores de IC₅₀.

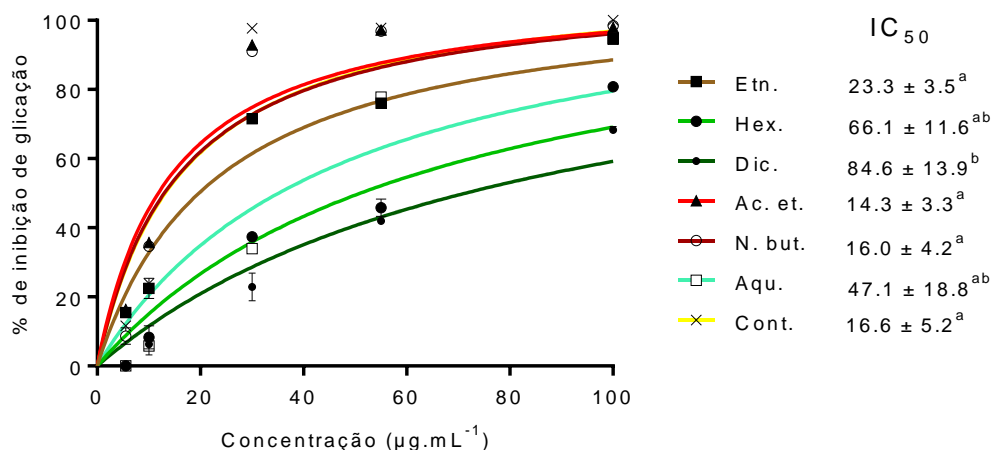


Figura 8. Análise da capacidade de inibição da glicação pelo extrato bruto e suas partições orgânicas. Valores expressos em porcentagem de inibição de glicação e concentração capaz de inibir a glicação em 50% (IC₅₀). Valores expressos como média ± erro padrão. Nota: Etn.: extrato bruto etanólico, Hex.: partição hexano, Dicl.: partição diclorometano, Ac. et.: partição acetato de etila, N. but.: partição *n*-butanol, F. aq.: fração aquosa, Contr.: controle positivo. *Há diferença significativa em relação ao controle positivo ($p < 0,05$).

Comparando a capacidade de inibição da glicação com os conteúdos de fenóis totais e proantocianidinas do extrato/partições, verifica-se que quanto maior o teor desses compostos, menor o IC₅₀, ou seja, maior a atividade anti-glicação, uma vez que foi observado uma alta correlação entre a capacidade da amostra em inibir a glicação e o seu conteúdo de fenóis totais ($r = -0,91$, $p < 0,05$) e proantocianidinas ($r = -0,81$, $p < 0,05$) (Figura 9).

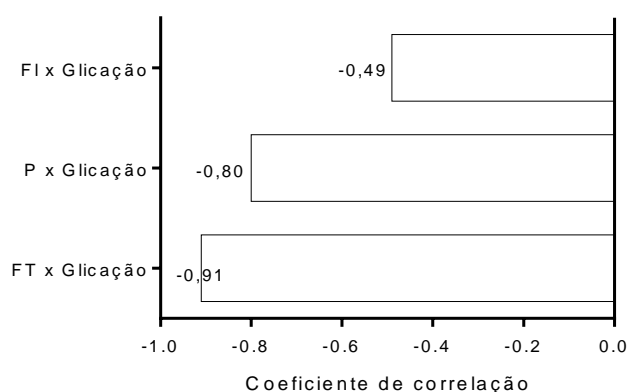


Figura 9. Coeficiente de correlação entre a atividade de inibição de glicação e o conteúdo de fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides. Nota: FT: fenóis totais; P: proantocianidinas; FI: flavonoides.

4.8. Avaliação da atividade citotóxica

A Tabela 5 mostra os resultados referentes à viabilidade celular dos fibroblastos NIH/3T3 tratados com diferentes concentrações do extrato e partições da casca de araticum. O extrato bruto evidenciou alta citotoxicidade, mesmo em concentrações mais baixas. A partição diclorometano foi a partição que mais influenciou a viabilidade dos fibroblastos, sendo esta altamente citotóxica em concentrações a partir de 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. No entanto, as partições mais polares foram menos citotóxicas do que as partições apolares, sendo que a partição *n*-butanol e a fração aquosa evidenciaram menor citotoxicidade do que as demais partições.

Tabela 5. Análise da viabilidade celular de fibroblastos tratados com diferentes concentrações de extrato/partição da casca de araticum.

Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Viabilidade celular (%)					
	Etn.	Hex.	Dicl.	Ac. et.	N. but.	F. aq.
0	100	100	100	100	100	100
30	78,8 \pm 5,7 ***	84,4 \pm 4,3	70,2 \pm 3,2 ***	104,5 \pm 8,0	88,7 \pm 1,7	90,6 \pm 6,6
60	88,5 \pm 3,6 *	92,7 \pm 7,5	76,5 \pm 4,2 ***	90,7 \pm 7,4	88,0 \pm 4,9	95,0 \pm 1,4
120	78,0 \pm 2,0 ***	88,9 \pm 4,1	8,5 \pm 0,4 ***	78,3 \pm 6,5 *	89,6 \pm 2,5	87,2 \pm 4,5
240	50,4 \pm 3,8 ***	43,1 \pm 4,3 ***	5,3 \pm 0,4 ***	57,9 \pm 3,6 ***	65,4 \pm 5,4 ***	79,9 \pm 3,3 **

Valores expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao controle (sem tratamento).

Nota: Etn.: extrato bruto etanólico, Hex.: partição hexano, Dicl.: partição diclorometano, Ac. et.: partição acetato de etila, N. but.: partição *n*-butanol, F. aq.: fração aquosa. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (em comparação com o controle).

4.9. Caracterização fitoquímica por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas

Uma vez que as partições acetato de etila e *n*-butanol evidenciaram baixa citotoxicidade, alta capacidade antioxidante e atividade promissora de inibição das hidrolases glicosídicas e da formação de produtos de glicação, um ensaio bioguiado para a identificação dos compostos bioativos foi realizado, por meio de análises por CLAE-ESI-EM/EM. A Figura 10 mostra os cromatogramas referentes às partições acetato de etila e *n*-butanol provenientes do extrato etanólico da casca de araticum. Os espectros de massas EM/EM em alta resolução das *m/z* dos compostos identificados nas partições acetato de etila e *n*-butanol são mostrados nas figuras complementares na seção Anexos.

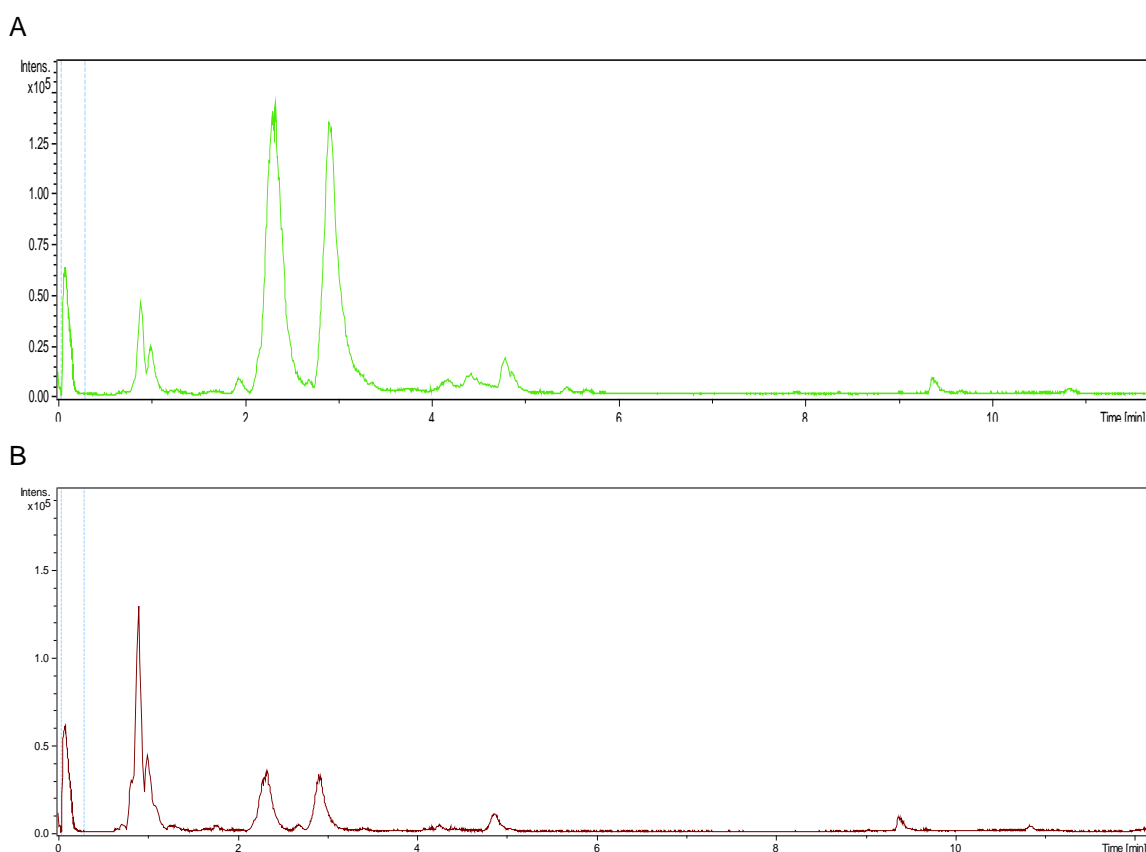


Figura 10. Cromatograma da partição acetato de etila (A) e *n*-butanol (B) do extrato etanólico da casca do araticum (*Annona crassiflora*) por CLAE-ESI-EM/EM (modo negativo).

Por meio do perfil do padrão de fragmentação, do erro (ppm) e com base em trabalhos disponíveis na literatura, foi possível identificar os compostos

presentes nas partições acetato de etila e *n*-butanol (Tabelas 6 e 7, respectivamente). As estruturas dos compostos sugeridos pela análise de CLAE-ESI-EM/EM (modo negativo) das partições acetato de etila e *n*-butanol estão ilustradas nas Figuras 11 e 12, respectivamente.

Tabela 6. Dados obtidos da análise da partição acetato de etila do extrato etanólico da casca do araticum (*Annona crassiflora*) por CLAE-ESI-EM/EM (modo negativo).

Composto	T _R (min)	Fórmula [M-H] ⁻	Massa calculada para [M- H] ⁻	m/z de [M-H] ⁻	Erro (ppm)	m/z dos fragmentos de [M-H] ⁻	Referência
Ácido glucônico	0,89	C ₆ H ₁₁ O ₇ ⁻	195,0510	195,0510	0,5	177, 151, 129	(FELIPE et al., 2014)
Ácido quínico	0,92	C ₇ H ₁₁ O ₆ ⁻	191,0560	191,0576	7,9	171, 129	(NG; LAFONTAINE; VANIER, 2004; ROESLER et al., 2007)
Ácido málico	1,11	C ₄ H ₅ O ₅ ⁻	133,0142	133,0142	0	115	(ROESLER et al., 2007)
Cafeoil-glicosídeo (derivado do ácido cafeico)	1,70	C ₁₅ H ₁₇ O ₉ ⁻	341,0878	341,0886	2,3	179, 161, 135, 133	(CHEN; INBARAJ; CHEN, 2012)
(Epi)catequina	2,18	C ₁₅ H ₁₃ O ₆ ⁻	289,0718	289,0708	3,5	245, 227, 205, 203, 179, 161, 137	(SUN et al., 2007)
Procianidina B2	2,20	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂ ⁻	577,1351	577,1355	0,7	425, 451, 407, 289, 125	(SUN et al., 2007)
Procianidina C1	2,46	C ₄₅ H ₃₇ O ₁₈ ⁻	865,1985	865,1914	0,7	713, 695, 577, 425, 407, 289	(TALA et al., 2013)
Feruloil- galactosídeo (derivado do ácido ferúlico)	2,71	C ₁₆ H ₁₉ O ₉ ⁻	355,1035	3155,103 8	0,8	264, 235, 193, 178, 175	(VALLVERDU- QUERALT et al., 2010)
Quercetina-3- glicosídeo	4,88	C ₁₂ H ₁₉ O ₁₂ ⁻	463,0877	463,0896	4,1	301, 300, 271, 255, 179, 151	(GOUVEIA; CASTILHO, 2011; FELIPE et al., 2014)
Kaempferol-3-O- rutinosídeo	5,15	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅ ⁻	593,1512	593,1526	2,4	285, 284, 255, 227, 180, 151, 125	(VALLVERDU- QUERALT et al., 2010; WANG et al., 2012)
Kaempferol-7-O- glucosídeo	5,41	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁ ⁻	447,0933	447,0938	1,1	285, 284, 255, 229, 227, 211, 193, 189, 187, 179, 171, 164, 151	(IBRAHIM et al., 2015)

Tabela 7. Dados obtidos da análise da partição *n*-butanol do extrato etanólico da casca do araticum (*Annona crassiflora*) por CLAE-ESI-EM/EM (modo negativo).

Composto	T _R (min)	Fórmula [M-H] ⁻	Massa calculada para [M- H] ⁻	<i>m/z</i> de [M- H] ⁻	Erro (ppm)	<i>m/z</i> dos fragmentos de [M-H] ⁻	Referência
Ácido glucônico	0,88	C ₆ H ₁₁ O ₇ ⁻	195,0510	195,0515	2,6	177, 159, 151, 129, 75, 58	(FELIPE et al., 2014)
Ácido quínico	0,95	C ₇ H ₁₁ O ₆ ⁻	191,0561	191,0563	1,0	171, 129, 127, 87, 60	(NG; LAFONTAINE; VANIER, 2004; ROESLER et al., 2007)
Ácido málico	1,04	C ₄ H ₅ O ₅ ⁻	133,0142	133,0147	3,8	115,0; 130,8	(ROESLER et al., 2007)
Ácido cítrico	1,13	C ₆ H ₇ O ₇ ⁻	191,0197	191,0199	1,0	171, 129, 127, 87, 60	(NG; LAFONTAINE; VANIER, 2004; ROESLER et al., 2007)
Cafeoil-glicosídeo (derivado do ácido cafeico)	1,72	C ₁₅ H ₁₇ O ₉ ⁻	341,0878	341,0879	0,3	179, 161, 135, 133	(CHEN; INBARAJ; CHEN, 2012)
Ácido clorogênico	2,20	C ₁₆ H ₁₇ O ₉ ⁻	353,0878	353,0885	2,0	191, 161, 127	(SUN et al., 2007)
Procianidina B2	2,35	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂ ⁻	577,1351	577,1352	0,2	425, 451, 407, 289, 125	(SUN et al., 2007)
Feruloil- galactosídeo (derivado do ácido ferúlico)	2,73	C ₁₆ H ₁₉ O ₉ ⁻	355,1035	3155,1038	0,8	264, 235, 193, 178, 175	(VALLVERDU- QUERALT et al., 2010)
(Epi)catequina	2,92	C ₁₅ H ₁₃ O ₆ ⁻	289,0718	289,0719	0,3	245, 205, 203, 179, 125	(SUN et al., 2007)

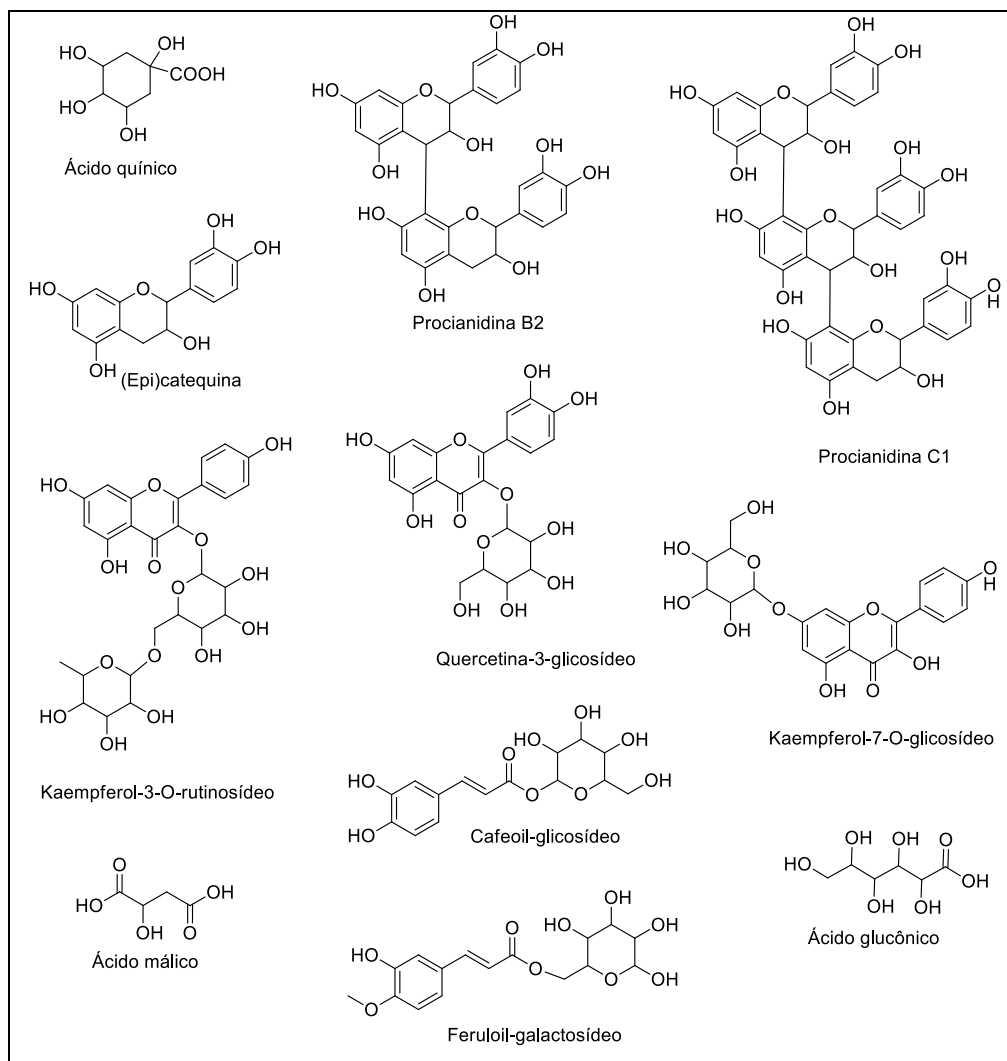


Figura 11. Estrutura das moléculas sugeridas pela análise de CLAE-ESI-EM/EM (modo negativo) da partição acetato de etila do extrato etanólico da casca do araticum (*Annona crassiflora*).

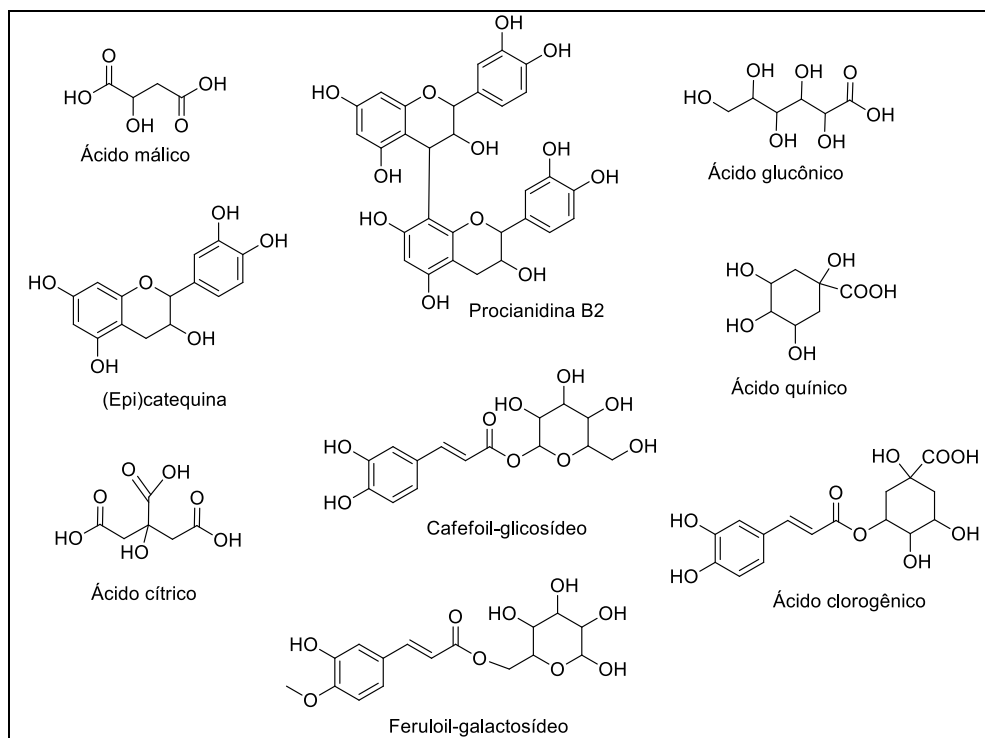


Figura 12. Estrutura das moléculas sugeridas pela análise de CLAE-ESI-EM/EM (modo negativo) da partição *n*-butanol do extrato etanólico da casca do araticum (*Annona crassiflora*).

5. Discussão

Os frutos do Cerrado possuem diversos compostos bioativos, muitos dos quais com atividade antioxidante e efeitos benéficos sobre o diabetes e as suas complicações (SHAHIDI; WANASUNDARA, 1992; SHON et al., 2004); tais compostos antioxidantes têm sido associados com a redução da hiperglicemia e melhora das complicações relacionadas ao diabetes (DEMBINSKA-KIEC et al., 2008; SATHYA; SIDDHURAJU, 2012). Nesse sentido, foram avaliados a capacidade antioxidante e o potencial em inibir a glicação e a atividade das enzimas α -amilase e α -glicosidase das partições orgânicas provenientes do extrato etanólico da casca do araticum (*Annona crassiflora*), assim como a citotoxicidade associada a elas. Além disso, foram realizadas uma caracterização fitoquímica das amostras e uma investigação da relação entre os compostos fenólicos presentes nas partições com as atividades biológicas evidenciadas neste estudo.

A busca por compostos fenólicos naturais tem ganhado destaque devido à sua baixa toxicidade e boa atividade antioxidante, em comparação com os compostos sintéticos (LOBO et al., 2010). As substâncias fenólicas, com a sua capacidade de doar hidrogênio ou elétrons para formar radicais intermediários estáveis, inibem o dano oxidativo resultante da geração e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (FERGUSON, 2001). Desse modo, elas estão envolvidas na manutenção da saúde celular, prevenção e tratamento de doenças crônico-degenerativas (FERGUSON, 2001; REIS et al., 2007). Além disso, esses compostos têm efeitos positivos sobre o diabetes mellitus, por quelar íons metálicos, ativar a expressão de enzimas antioxidantes, inibir a peroxidação lipídica e melhorar a disponibilidade de glicose (FERGUSON, 2001; DEARLOVE et al., 2008; DORSEY; GREENSPAN, 2014).

As cascas são uma das principais fontes de compostos fenólicos de um fruto (ROESLER et al., 2007). Os resultados mostraram que o extrato etanólico da casca do araticum e as suas partições orgânicas, principalmente a acetato de etila e a *n*-butanol, possuem um elevado teor de compostos fenólicos, tais como flavonoides e proantocianidinas, os quais estão de acordo com a análise realizada por CLAE-ESI-EM/EM. À medida que a polaridade do solvente da partição se eleva, aumenta-se também a quantidade de compostos polares que são extraídos, o que justifica o maior teor desses compostos nas partições acetato de etila e *n*-butanol.

Foram evidenciadas diversas biomoléculas em comum nas partições acetato de etila e *n*-butanol, como ácido glucônico, ácido quínico, ácido málico, cafeoil-glicosídeo, (epi)catequina, procianidina B2 e feruloil-galactosídeo. Isso pode ter ocorrido devido à semelhança na polaridade dos solventes utilizados para a extração. No entanto, os compostos kaempferol-glicosídeo, kaempferol-rutinosídeo, quercetina-glicosídeo e procianidina C1 foram identificados apenas na partição acetato de etila, enquanto que o ácido cítrico e o ácido clorogênico foram detectados apenas na partição *n*-butanol. Esse resultado indica que o modo de extração utilizando solventes de polaridade crescente pode concentrar determinados compostos em partições específicas, de acordo com a afinidade química entre eles. Isso foi observado para os taninos condensados, que foram

identificados apenas na partição acetato de etila, corroborando a análise do conteúdo de proantocianidinas totais.

Os níveis de compostos fenólicos podem ser divididos em três categorias: baixo, quando o teor de polifenóis está abaixo de 500 mg de EAG/100 g de amostra; intermediário, quando o teor está entre 500 e 2500 mg de EAG/100 g de amostra; e alto, quando o teor está acima de 2500 mg de EAG/100 g de amostra (VASCO; RUALES; KAMAL-ELDIN, 2008). Assim, aplicando a classificação proposta aos resultados obtidos nesse trabalho, verifica-se que o extrato etanólico e as partições orgânicas da casca do fruto da *Annona crassiflora* possui um alto nível de compostos fenólicos.

Comparando os resultados obtidos das análises do conteúdo de fenóis totais e proantocianidinas, verifica-se uma alta correlação positiva entre as análises ($r = 0,94$). A intensidade do coeficiente de correlação pode ser classificada de acordo com o seu valor em módulo, assim, $|r| = 0$ a correlação é nula, $|r| = 0 - 0,3$ é fraca, $|r| = 0,3 - 0,6$ é regular, $|r| = 0,6 - 0,9$ é forte, $|r| = 0,9 - 1$ é muito forte e $|r| = 1$ a correlação é perfeita (CALLEGARI-JACQUES, 2003). Desse modo, a amostra que apresenta o maior teor de fenóis totais também apresenta o maior conteúdo de proantocianidinas.

Os resultados da prospecção fitoquímica estão de acordo com os resultados obtidos na análise do conteúdo de fenóis totais, proantocianidinas e flavonoides. Desse modo, as partições acetato de etila e *n*-butanol são promissoras no isolamento de compostos bioativos da classe dos flavonoides, uma vez que essas substâncias possuem diversas funções benéficas sobre a saúde humana. Além disso, foi verificada a presença de alcaloides nas partições hexano e diclorometano, o que as tornam promissoras no isolamento de compostos nitrogenados com aplicações farmacológicas, uma vez que os alcaloides podem possuir atividades antimicrobiana, anti-parasitária e agir sobre o sistema nervoso central (PATEL, K. et al., 2012).

As biomoléculas presentes na casca do araticum originam de uma via biossintética em comum. O ácido cafeico é biossintetizado por meio da hidroxilação do éster coumaroil do ácido quínico; essa hidroxilação produz o éster ácido cafeico do ácido chiquímico, que se converte em ácido clorogênico. Este,

por sua vez, pode se transformar em ácido ferúlico pela enzima ácido cafeico-O-metil transferase (ZHONG et al., 1998; CLIFFORD et al., 2003).

A formação dos flavonoides e proantocianidinas tem início com a condensação seguida de ciclização intramolecular de três moléculas de malonil-CoA com uma *p*-coumaroil-CoA, resultando na naringenina-chalcona, sendo catalisado pela enzima chalcona sintase. Na sequência ocorre a isomerização da naringenina-chalcona em naringenina, por meio da enzima chalcona isomerase. Para a formação do kaempferol, um grupo hidroxila é adicionado à naringenina originando dihidrokaempferol; uma dupla ligação é introduzida ao dihidrokaempferol para formar o kaempferol (CALDERON-MONTANO et al., 2011).

A naringenina também pode sofrer uma hidroxilação em seu anel B para originar o eriodictol, por meio da enzima flavonoide 3'-hidroxilase (WINKEL-SHIRLEY, 2001; HE et al., 2008). A enzima flavonol 3 β -hidroxilase converte o eriodictol em taxifolin na presença de oxigênio e 2-oxoglutarato. Nesta etapa, dependendo do tipo de enzima que irá atuar, serão formados flavonóis (quercetrina, isoquercetrina e rutina), ou flavan-3-ol (epicatequina) e proantocianidinas (B2 e C1) (WINKEL-SHIRLEY, 2001; TANNER et al., 2003; HE et al., 2008; CALDERON-MONTANO et al., 2011).

Para a formação dos flavonóis, a enzima flavonol sintase é responsável pela oxidação do taxifolin em flavonol (quercetina) (MUIR et al., 2001; WINKEL-SHIRLEY, 2001). Na sequência, a quercetina é glicosilada tanto pela enzima ramnosil tranferase, originando a quercitrina, como pela glicosil tranferase, originando a isoquercitrina (quercetina-3-glicosídeo), que por sua vez é glicosilada pela ramnosil transferase para formar a rutina (MUIR et al., 2001). Para a formação dos flavan-3-ol, a enzima dihidroxiflavanol 4-redutase, na presença de NADPH, forma a leucocianidina que, pela ação da antocianidina sintase, é oxidada a cianidina. Por meio da antocianidina redutase, na presença de NADPH, é formada a epicatequina (HE et al., 2008). A catequina é um diastereoisômero da epicatequina e, para ser formada, a enzima leucoantocianidina redutase precisa ser expressa para catalisar a conversão direta da leucocianidina em catequina (DIXON; XIE; SHARMA, 2005; HE et al., 2008). Em relação às proantocianidinas, não está bem definida a sua formação. Porém, estudos propõem que a enzima

polifenol oxidase converte a epicatequina em quinona-metide, que é convertida em carbocátion via flav-3-en-ol; o ataque nucleofílico da epicatequina no carbocátion resulta na produção do dímero procianidina B2, e o ataque do dímero no carbocátion resulta no trímero procianidina C1 (MARLES; RAY; GRUBER, 2003; DIXON; XIE; SHARMA, 2005; HE et al., 2008).

Uma vez que as partições do extrato etanólico da casca do araticum apresentaram um elevado teor de fenóis totais, foi investigado o potencial antioxidante dessas amostras. Há diversos métodos que avaliam a capacidade antioxidante de um extrato ou composto isolado. Dentre eles, destacam-se os métodos *in vitro*, sendo estes capazes de identificar as propriedades antioxidantes de uma amostra de maneira eficaz. É recomendado que, no mínimo, dois métodos sejam realizados e combinados para fornecer um resultado confiável da capacidade antioxidante total de um material biológico, desde que as vantagens, limitações e aplicabilidade de cada tipo de técnica sejam considerados (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2008). Evidentemente que uma análise mais complexa *in vivo* é necessária, porém, uma amostra que apresenta baixa atividade antioxidante *in vitro* provavelmente não apresentará uma atividade melhor *in vivo* (ARUOMA, 1999). Essa informação ressalta a importância de uma caracterização inicial do material a ser estudado *in vitro*.

Ao avaliar os resultados provenientes das análises de ORAC e FRAP, verificou-se que as partições acetato de etila e *n*-butanol apresentaram elevado potencial em inibir a oxidação de moléculas, sendo que os resultados obtidos para essas amostras são comparáveis ao do ácido ascórbico. Além disso, comparando a atividade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP) com as análises de fenóis totais e proantocianidinas realizadas, verifica-se que quanto maior o teor, maior a atividade antioxidante. A intensidade da atividade antioxidante também pode ser correlacionada com o valor obtido de IC₅₀. Para o método envolvendo a análise de sequestro do radical DPPH, valores de IC₅₀ menores do que 50 µg.mL⁻¹ indicam elevada capacidade antioxidante (REYNERTSON; BASILE; KENNELLY, 2005). Nesse contexto, o extrato bruto e todas as suas partições, com exceção da partição diclorometano, são potenciais fontes de compostos antioxidantes, uma vez que os seus valores de IC₅₀ foram menores do que 50 µg.mL⁻¹ no método DPPH.

A investigação utilizando CLAE-ESI-EM/EM mostrou os principais compostos fenólicos presentes nas partições acetato de etila e *n*-butanol (Tabela 5 e 6, respectivamente), os quais estão amplamente reportados como potentes antioxidantes. Ácido clorogênico, cafeoil-glicosídeo, (epi)catequina, procianidinas B2 e C1, feruloil-galactosídeo, quercetina-glicosídeo e kaempferol têm propriedades de eliminação de radicais livres (YAGI; OHISHI, 1979; COS et al., 2003; GU et al., 2006; WU, 2007; GAO et al., 2011; VELLOSA et al., 2011). O potencial antioxidante dos polifenóis está associado com propriedades de redução de agentes doadores de hidrogênio e/ou elétrons, assim como a sua capacidade de formar um radical derivado mais estável (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997).

Tais resultados obtidos nesse trabalho corroboram outros estudos que demonstraram um alto conteúdo de compostos fenólicos e uma alta capacidade antioxidante de algumas espécies da família Annonaceae, incluindo a *Annona crassiflora* (ROESLER et al., 2007; ADEFEGHA; OBOH, 2012; NANDHAKUMAR; INDUMATHI, 2013; FLORENCE et al., 2014; ADEFEGHA; OYELEYE; OBOH, 2015). Um estudo conduzido por Roesler et al. (2007) demonstraram um alto teor de compostos fenólicos e uma elevada capacidade antioxidante da casca do araticum, o que corrobora os nossos resultados. No entanto, este estudo analisou apenas o extrato bruto etanólico; aqui, por meio de uma partição líquido-líquido do extrato bruto etanólico, mostramos que as partições acetato de etila e *n*-butanol concentraram os compostos fenólicos, o que contribuiu com o aumento da capacidade antioxidante. Assim, considerando os resultados provenientes de diferentes métodos de análise da capacidade antioxidante, demonstramos que as partições acetato de etila e *n*-butanol provenientes do extrato etanólico da casca do araticum são promissoras para o isolamento de compostos com excelente atividade antioxidante.

A capacidade de inibir a atividade das hidrolases glicosídicas α -amilase e α -glicosidase pode ser uma opção para o tratamento de doenças relacionadas à digestão de carboidratos, como diabetes, obesidade, hiperlipidemia e até doenças orais. No entanto, nenhum dos inibidores atualmente disponíveis para o uso clínico são desprovidos de efeitos colaterais severos. Para o tratamento do diabetes tipo II, uma dosagem típica da acarbose é de 25 a 100 mg, três vezes ao

dia; porém, os efeitos colaterais mais comuns incluem a diarreia e a flatulência, que são causadas pelas bactérias ao metabolizar os dissacarídeos no cólon. Além disso, hepatotoxicidade tem sido associada com a terapia utilizando acarbose na dosagem de 100 mg, três vezes ao dia, oralmente (HSIAO et al., 2006). Assim, a busca por novos agentes originados de recursos naturais, especialmente daqueles que já são utilizados na medicina tradicional, torna-se uma abordagem atrativa para o controle da hiperglicemia pós-prandial.

Ainda há poucos estudos que relacionam a inibição da α -amilase e α -glicosidase com os frutos do cerrado e seus compostos bioativos. Alguns desses trabalhos demonstraram o potencial de algumas espécies da família Annonaceae em inibir a atividade dessas enzimas (ADEFEGHA; OBOH, 2012; ADEFEGHA; OYELEYE; OBOH, 2015), o que ressalta a importância de se estudar outras espécies pouco exploradas dessa família. Os resultados desse trabalho mostraram que o extrato e as partições orgânicas da casca do araticum, especialmente as partições acetato de etila e *n*-butanol, são capazes de inibir a enzima α -amilase salivar. De fato, com valores de IC_{50} menores que $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, a relevância fisiológica dessas partições é bastante alta. Além disso, as partições acetato de etila e *n*-butanol também foram capazes de inibir a enzima α -glicosidase, porém, em concentrações maiores em relação à inibição da α -amilase. Esses resultados demonstram o potencial inibitório dessas frações enriquecidas de polifenóis provenientes da casca do araticum sobre as hidrolases glicosídicas, as quais poderiam ser utilizadas para controlar a hiperglicemia pós-prandial, sendo esta um fator de risco para as complicações micro e macro vasculares no diabetes mellitus.

Os compostos fenólicos têm demonstrado atividade inibidora das enzimas α -amilase e α -glicosidase, fato que tem explicado o controle glicêmico de pacientes que fazem o uso de alimentos ricos em compostos fenólicos (SILVA; SILVA, 1999; TADERA et al., 2006; LO PIPARO et al., 2008). Esse fato está de acordo com as análises realizadas neste trabalho, que mostraram que as partições com o maior conteúdo de compostos fenólicos também apresentaram maior atividade antioxidante e maior capacidade de inibir as enzimas α -amilase e α -glicosidase, sendo que os valores de IC_{50} referentes à análise de inibição de α -amilase foram inversamente proporcionais ao conteúdo de fenóis totais e

proantocianidinas. Entre os compostos identificados nas partições acetato de etila e *n*-butanol, ácido clorogênico, catequina, procianidinas, quercetina-glicosídeo, cafeoil-glicosídeo e kaempferol-rutinosídeo são conhecidos por suas atividades inibitórias contra as enzimas α -amilase e α -glicosidase (ISHIKAWA et al., 2007; YOSHIDA et al., 2008; LI et al., 2009; HABTEMARIAM, 2011; DEY; MITRA, 2013). A estrutura dessas biomoléculas apresenta muitos grupos fenólicos, os quais podem contribuir com a atividade inibitória das partições acetato de etila e *n*-butanol, uma vez que o decréscimo da atividade das enzimas depende do número e da posição dos grupos hidroxilas dos compostos fenólicos (ROHN; RAWEL; KROLL, 2002). Os resultados sugerem que tais partições podem contribuir com a redução da absorção de carboidratos no intestino e, assim, reduzir o aumento acentuado dos níveis de glicose no sangue que os pacientes diabéticos normalmente vivenciam após as refeições.

A elucidação de como esses inibidores se ligam às enzimas pode fornecer uma base racional para o isolamento de novas moléculas e para o desenvolvimento de agentes naturais com um aumento na afinidade e especificidade para a α -amilase e α -glicosidase. Os resultados mostraram que, mesmo aumentando a concentração de substrato, a velocidade máxima é reduzida na presença das partições acetato de etila e *n*-butanol. Portanto, o modo de inibição apresentado pelos compostos presentes na partição *n*-butanol é predominantemente não-competitivo para ambas as enzimas. A partição acetato de etila também apresentou um modo de inibição predominantemente não-competitivo para a α -amilase, porém, um modo de inibição predominantemente incompetitivo foi observado para a α -glicosidase. Esses resultados podem ser explicados pelas diferenças na composição dessas duas partições. Está bem documentado que a quercetina e o ácido clorogênico inibem, de modo não-competitivo, as enzimas α -amilase e α -glicosidase, respectivamente (ISHIKAWA et al., 2007; YUAN et al., 2014). Assim, o ácido clorogênico presente na partição *n*-butanol pode ter contribuído para o seu tipo de inibição predominantemente não-competitivo sobre a α -glicosidase. Um estudo mostrou que quercetina-glicosídeo exerce um tipo misto de inibição não-competitiva e incompetitiva sobre a α -glicosidase (LI et al., 2009). Além disso, a catequina é um inibidor incompetitivo da α -glicosidase intestinal de rato (OKI; MATSUI; OSAJIMA, 1999).

Desse modo, essas biomoléculas podem ter contribuído para a inibição predominantemente incompetitiva da α -glicosidase exercida pela partição acetato de etila. Os resultados desse estudo sugerem que as biomoléculas das partições acetato de etila e *n*-butanol ligam-se preferencialmente em locais diferentes do sítio ativo da α -amilase/ α -glicosidase, influenciando a atividade enzimática.

A prevenção da glicação representa uma estratégia viável para prevenir a formação de AGEs, uma vez que essas moléculas têm sido associadas às patologias provenientes de complicações do diabetes devido à sua capacidade de alterar irreversivelmente as propriedades químicas e funcionais de diversas estruturas biológicas (BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2008). As proteínas glicadas normalmente são formadas por uma reação não-enzimática entre açúcares redutores e grupamentos amino de proteínas por meio de uma adição nucleofílica com a formação de bases de Schiff (RONDEAU; BOURDON, 2011). O acúmulo dos produtos de glicação no organismo devido às reações não enzimáticas de proteínas está associado com várias condições patológicas, como o envelhecimento e o diabetes mellitus (KHAN; AHMAD; AHMAD, 2014). Os radicais livres também estão associados com a formação dos AGEs, o que ressalta ainda mais a importância dos compostos antioxidantes na prevenção das complicações do diabetes (KUSIRISIN et al., 2009).

Os resultados desse estudo mostraram que o extrato etanólico da casca de araticum e as suas partições orgânicas foram capazes de inibir a ligação entre o açúcar e a proteína, com valores de IC_{50} menores que $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo as partições acetato de etila e *n*-butanol com as maiores atividades anti-glicação. A capacidade de extratos vegetais em inibir a glicação de proteínas está associada ao seu conteúdo de compostos fenólicos (DEARLOVE et al., 2008; WU et al., 2010; WU et al., 2011; DORSEY; GREENSPAN, 2014). A maioria dos compostos fenólicos, especialmente flavonoides e proantocianidinas como kaempferol-3-rutinosídeo e procianidina B2, são capazes de inibir o processo de glicação (WU et al., 2010; WU et al., 2011; LAL SHYAULA et al., 2012; MUTHENNA et al., 2013). Wu et al. (2005) realizaram um estudo utilizando diferentes flavonoides com o objetivo de distinguir os inibidores específicos de diferentes estágios da glicação. Eles mostraram que a quercetina e a rutina exibiram efeitos inibitórios contra a glicação nos estágios inicial e intermediário (WU; YEN, 2005). Além

disso, ácidos fenólicos como o ácido ferúlico, identificado nas partições acetato de etila e *n*-butanol, e o ácido clorogênico, identificado na partição *n*-butanol, são capazes de inibir a glicação e a ligação cruzada de proteínas (WU et al., 2011).

O mecanismo pelo qual os compostos fenólicos inibem a glicação de proteínas pode estar associado com as suas propriedades antioxidantes (WU et al., 2011). O efeito anti-glicação dos flavonoides pode estar associado com a presença do grupo hidroxila na posição C-3 (WU et al., 2011). Além disso, diversos inibidores podem suprimir a formação de AGEs por meio da captura de precursores, como 1,2-dicarbonilos (MESIAS et al., 2013). Kusirisin et al. (2009) sugeriram que a rutina e a catequina presente em extratos vegetais podem interagir com a glicose e impedi-la de se ligar às proteínas.

Ao demonstrar as atividades biológicas promissoras da casca do araticum para o controle das complicações relacionadas ao diabetes, buscamos avaliar a sua citotoxicidade. O extrato bruto e a partição diclorometano mostraram efeitos citotóxicos significativos a partir da concentração de 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Possivelmente, esses efeitos citotóxicos estão relacionados com os alcaloides que estão presentes nessas amostras, uma vez que muitas desses compostos nitrogenados são tóxicos para as células (PATEL, K. et al., 2012; LUCIO et al., 2015). No entanto, as partições acetato de etila e *n*-butanol, em concentrações menores do que 240 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, apresentaram baixa citotoxicidade; acima dessa concentração, essas partições influenciaram a viabilidade celular. Esses resultados mostraram que a partição líquido-líquido foi capaz de separar a maioria dos compostos citotóxicos nas partições mais apolares, como a diclorometano, e a maioria dos compostos fenólicos antioxidantes nas partições mais polares. Além disso, a atividade biológica exercida pelas partições acetato de etila e *n*-butanol foi observada em concentrações abaixo do nível citotóxico, sugerindo a utilização dessas frações em novos ensaios *in vivo* sem causar riscos para o modelo animal em doses bioativas.

6. Conclusão

As partições acetato de etila e *n*-butanol apresentaram maior capacidade antioxidante, atividades inibitórias promissoras contra a α -amilase, α -glicosidase e

glicação, e menor citotoxicidade, em comparação com as outras partições e o extrato bruto etanólico. A análise por CLAE-ESI-EM/EM revelou a presença de compostos bioativos conhecidos como potentes antioxidantes, como ácido clorogênico, (epi)catequina, procianidinas, cafeoil-hexosídeos, quercetina-glicosídeos e kaempferol. Considerando os baixos valores de IC₅₀ e a alta atividade inibitória contra as hidrolases glicosídicas e a glicação não enzimática, há um grande potencial em utilizar os subprodutos do fruto da *Annona crassiflora* com o objetivo de isolar fitoquímicos específicos para aplicações em suplementos nutracêuticos, aditivos alimentares, novos produtos alimentícios e farmacêuticos e, dessa forma, contribuir economicamente e socialmente por meio da recuperação dos resíduos agroindustriais

7. Referências

ADEFEGHA, S. A.; OBOH, G. Inhibition of key enzymes linked to type 2 diabetes and sodium nitroprusside-induced lipid peroxidation in rat pancreas by water extractable phytochemicals from some tropical spices. **Pharm Biol**, v. 50, n. 7, p. 857-865, 2012.

ADEFEGHA, S. A.; OYELEYE, S. I.; OBOH, G. Distribution of Phenolic Contents, Antidiabetic Potentials, Antihypertensive Properties, and Antioxidative Effects of Soursop (*Annona muricata* L.) Fruit Parts In Vitro. **Biochem Res Int**, v. 2015, p. 347673, 2015.

AHMED, N. Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 67, n. 1, p. 3-21, 2005.

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Embrapa-CPAC, Planaltina: 1994.

ALMEIDA, S. P.; SILVA, J. A.; RIBEIRO, J. F. **Aproveitamento alimentar de espécies nativas dos cerrados: araticum, barú, cagaita e jatobá**. 1a ed. Embrapa-CPAC, Planaltina: 1987.

AMERICAN DIABETES, A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 36 Suppl 1, p. S67-74, 2013.

ARUOMA, O. I. Free radicals, antioxidants and international nutrition. **Asia Pac J Clin Nutr**, v. 8, n. 1, p. 53-63, 1999.

BAHADORAN, Z.; MIRMIRAN, P.; AZIZI, F. Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. **J Diabetes Metab Disord**, v. 12, n. 1, p. 43, 2013.

BARBOSA, B. F. et al. Enrofloxacin is able to control *Toxoplasma gondii* infection in both in vitro and in vivo experimental models. **Vet Parasitol**, v. 187, n. 1-2, p. 44-52, 2012.

BARBOSA, J. H.; OLIVEIRA, S. L.; SEARA, L. T. [The role of advanced glycation end-products (AGEs) in the development of vascular diabetic complications]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 52, n. 6, p. 940-950, 2008.

BASTOS, D. H.; ROGERO, M. M.; AREAS, J. A. [Effects of dietary bioactive compounds on obesity induced inflammation]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 53, n. 5, p. 646-656, 2009.

BAYNES, J. W.; THORPE, S. R. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. **Diabetes**, v. 48, n. 1, p. 1-9, 1999.

BEDEKAR, A.; SHAH, K.; KOFFAS, M. Natural products for type II diabetes treatment. **Adv Appl Microbiol**, v. 71, p. 21-73, 2010.

BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Anal Biochem**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.

BERG, J. M.; STRYER, L.; TYMOCZKO, J. L. **Bioquímica**. 7a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: 2014. 1162 p.

BIERHAUS, A. et al. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. **Cardiovasc Res**, v. 37, n. 3, p. 586-600, 1998.

BLONDE, L. Benefits and risks for intensive glycemic control in patients with diabetes mellitus. **Am J Med Sci**, v. 343, n. 1, p. 17-20, 2012.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 813-820, 2001.

CALDERON-MONTANO, J. M. et al. A review on the dietary flavonoid kaempferol. **Mini Rev Med Chem**, v. 11, n. 4, p. 298-344, 2011.

CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística: princípios e aplicações**. 1a ed. Porto Alegre: Artmed: 2003. 255 p.

CARAMORI, S. S.; LIMA, C. S.; FERNANDES, K. F. Biochemical characterization of selected plant species from brazilian savannas. **Brazilian Archives of Biology and Techniology**, v. 47, n. 2, p. 253-259, 2004.

CHEN, H. J.; INBARAJ, B. S.; CHEN, B. H. Determination of phenolic acids and flavonoids in *Taraxacum formosanum* Kitam by liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with a post-column derivatization technique. **Int J Mol Sci**, v. 13, n. 1, p. 260-285, 2012.

CLIFFORD, M. N. et al. Hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids. **J Agric Food Chem**, v. 51, n. 10, p. 2900-2911, 2003.

COS, P. et al. Comparative study of eight well-known polyphenolic antioxidants. **J Pharm Pharmacol**, v. 55, n. 9, p. 1291-1297, 2003.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. **Natural products: secondary metabolites. In: Biochemistry and Molecular Biology of Plants.** Rockville: American Society of Plant Physiologists: 2000. 1250-1318.

DE GOUVEIA, N. M. et al. An in vitro and in vivo study of the alpha-amylase activity of phaseolamin. **J Med Food**, v. 17, n. 8, p. 915-920, 2014.

DE GOUVEIA, N. M. et al. *Pouteria ramiflora* extract inhibits salivary amylolytic activity and decreases glycemic level in mice. **An Acad Bras Cienc**, v. 85, n. 3, p. 1141-1148, 2013.

DE OMENA, M. C. et al. Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants. **Bioresour Technol**, v. 98, n. 13, p. 2549-2556, 2007.

DEARLOVE, R. P. et al. Inhibition of protein glycation by extracts of culinary herbs and spices. **J Med Food**, v. 11, n. 2, p. 275-281, 2008.

DEMBINSKA-KIEC, A. et al. Antioxidant phytochemicals against type 2 diabetes. **Br J Nutr**, v. 99 E Suppl 1, p. ES109-117, 2008.

DEVALARAJA, S.; JAIN, S.; YADAV, H. Exotic fruits as therapeutic complements for diabetes, obesity and metabolic syndrome. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1856-1865, 2011.

DEY, B.; MITRA, A. Chemo-profiling of eucalyptus and study of its hypoglycemic potential. **World J Diabetes**, v. 4, n. 5, p. 170-176, 2013.

DIXON, R. A.; XIE, D. Y.; SHARMA, S. B. Proanthocyanidins--a final frontier in flavonoid research? **New Phytol**, v. 165, n. 1, p. 9-28, 2005.

DORSEY, P. G.; GREENSPAN, P. Inhibition of nonenzymatic protein glycation by pomegranate and other fruit juices. **J Med Food**, v. 17, n. 4, p. 447-454, 2014.

DRAGANO, N. R. et al. Influence of Marolo (*Annona crassiflora* Mart.) pulp intake on the modulation of mutagenic/antimutagenic processes and its action on oxidative stress in vivo. **Plant Foods Hum Nutr**, v. 65, n. 4, p. 319-325, 2010.

ENGELN, L.; STEHOUWER, C. D.; SCHALKWIJK, C. G. Current therapeutic interventions in the glycation pathway: evidence from clinical studies. **Diabetes Obes Metab**, v. 15, n. 8, p. 677-689, 2013.

FELIPE, D. F. et al. Phytochemical analysis of *Pfaffia glomerata* inflorescences by LC-ESI-MS/MS. **Molecules**, v. 19, n. 10, p. 15720-15734, 2014.

FERGUSON, L. R. Role of plant polyphenols in genomic stability. **Mutat Res**, v. 475, n. 1-2, p. 89-111, 2001.

FIGUEIREDO-GONZALEZ, M. et al. alpha-Glucosidase and alpha-amylase inhibitors from *Myrcia* spp.: a stronger alternative to acarbose? **J Pharm Biomed Anal**, v. 118, p. 322-327, 2016.

FLANAGAN, P. R.; FORSTNER, G. G. Purification of rat intestinal maltase/glucoamylase and its anomalous dissociation either by heat or by low pH. **Biochem J**, v. 173, n. 2, p. 553-563, 1978.

FLORENCE, N. T. et al. Antidiabetic and antioxidant effects of *Annona muricata* (Annonaceae), aqueous extract on streptozotocin-induced diabetic rats. **J Ethnopharmacol**, v. 151, n. 2, p. 784-790, 2014.

FORMAGIO, A. S. et al. In vitro biological screening of the anticholinesterase and antiproliferative activities of medicinal plants belonging to Annonaceae. **Braz J Med Biol Res**, v. 48, n. 4, p. 308-315, 2015.

FUJISAWA, T. et al. Effect of two alpha-glucosidase inhibitors, voglibose and acarbose, on postprandial hyperglycemia correlates with subjective abdominal symptoms. **Metabolism**, v. 54, n. 3, p. 387-390, 2005.

GAO, J. et al. Evaluation of the hepatoprotective and antioxidant activities of *Rubus parvifolius* L. **J Zhejiang Univ Sci B**, v. 12, n. 2, p. 135-142, 2011.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOUVEIA, N. M. et al. *Pouteria ramiflora* extract inhibits salivary amylolytic activity and decreases glycemic level in mice. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 3, p. 1141-1148, 2013.

GOUVEIA, S.; CASTILHO, P. C. Characterisation of phenolic acid derivatives and flavonoids from different morphological parts of *Helichrysum obconicum* by a RP-HPLC–DAD(–)–ESI–MSn method. **Food Chemistry**, v. 129, n. 2, p. 333-344, 2011.

GRAY, A. M.; FLATT, P. R. Insulin-releasing and insulin-like activity of the traditional anti-diabetic plant *Coriandrum sativum* (coriander). **Br J Nutr**, v. 81, n. 3, p. 203-209, 1999.

GU, L. et al. Procyanidin and catechin contents and antioxidant capacity of cocoa and chocolate products. **J Agric Food Chem**, v. 54, n. 11, p. 4057-4061, 2006.

GUO, L. P. et al. Screening alpha-glucosidase inhibitors from traditional Chinese drugs by capillary electrophoresis with electrophoretically mediated microanalysis. **J Pharm Biomed Anal**, v. 53, n. 5, p. 1250-1253, 2010.

HABTEMARIAM, S. A-glucosidase inhibitory activity of kaempferol-3-O-rutinoside. **Nat Prod Commun**, v. 6, n. 2, p. 201-203, 2011.

HE, F. et al. Biosynthesis and genetic regulation of proanthocyanidins in plants. **Molecules**, v. 13, n. 10, p. 2674-2703, 2008.

HSIAO, S. H. et al. Hepatotoxicity associated with acarbose therapy. **Ann Pharmacother**, v. 40, n. 1, p. 151-154, 2006.

IBRAHIM, R. M. et al. HPLC-DAD-MS/MS profiling of phenolics from *Securigera securidaca* flowers and its anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 2, p. 134-141, 2015.

ISHIKAWA, A. et al. Characterization of inhibitors of postprandial hyperglycemia from the leaves of *Nerium indicum*. **J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)**, v. 53, n. 2, p. 166-173, 2007.

JAKUS, V.; RIETBROCK, N. Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications. **Physiol Res**, v. 53, n. 2, p. 131-142, 2004.

KHAN, I.; AHMAD, H.; AHMAD, B. Anti-glycation and anti-oxidation properties of *Capsicum frutescens* and *Curcuma longa* fruits: possible role in prevention of diabetic complication. **Pak J Pharm Sci**, v. 27, n. 5, p. 1359-1362, 2014.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **ScientificWorldJournal**, v. 2013, p. 162750, 2013.

KUSIRISIN, W. et al. Antioxidative activity, polyphenolic content and anti-glycation effect of some Thai medicinal plants traditionally used in diabetic patients. **Med Chem**, v. 5, n. 2, p. 139-147, 2009.

LAL SHYAULA, S. et al. Synthesis and antiglycation activity of kaempferol-3-O-rutinoside (nicotiflorin). **Med Chem**, v. 8, n. 3, p. 415-420, 2012.

LEBOEUF, M. et al. The phytochemistry of the Annonaceae. **Phytochemistry**, v. 12, p. 2783-2813, 1982.

LEVETAN, C. S.; PIERCE, S. M. Distinctions between the islets of mice and men: implications for new therapies for type 1 and 2 diabetes. **Endocr Pract**, v. 19, n. 2, p. 301-312, 2013.

LI, Y. Q. et al. Comparative evaluation of quercetin, isoquercetin and rutin as inhibitors of alpha-glucosidase. **J Agric Food Chem**, v. 57, n. 24, p. 11463-11468, 2009.

LIAW, C. C. et al. Acetogenins from Annonaceae. **Prog Chem Org Nat Prod**, v. 101, p. 113-230, 2016.

LIU, Z. Q. Chemical methods to evaluate antioxidant ability. **Chem Rev**, v. 110, n. 10, p. 5675-5691, 2010.

LO PIPARO, E. et al. Flavonoids for controlling starch digestion: structural requirements for inhibiting human alpha-amylase. **J Med Chem**, v. 51, n. 12, p. 3555-3561, 2008.

LOBO, V. et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacogn Rev**, v. 4, n. 8, p. 118-126, 2010.

LORDAN, S. et al. The alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts. **Food Chem**, v. 141, n. 3, p. 2170-2176, 2013.

LU, J. M. et al. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **J Cell Mol Med**, v. 14, n. 4, p. 840-860, 2010.

LUCIO, A. S. et al. Alkaloids of the Annonaceae: occurrence and a compilation of their biological activities. **Alkaloids Chem Biol**, v. 74, p. 233-409, 2015.

MACHADO, A. R. et al. Nematicidal activity of *Annona crassiflora* leaf extract on *Caenorhabditis elegans*. **Parasit Vectors**, v. 8, p. 113, 2015.

MARLES, M. A.; RAY, H.; GRUBER, M. Y. New perspectives on proanthocyanidin biochemistry and molecular regulation. **Phytochemistry**, v. 64, n. 2, p. 367-383, 2003.

MATSUI, T. et al. alpha-Glucosidase inhibitory action of natural acylated anthocyanins. 2. alpha-Glucosidase inhibition by isolated acylated anthocyanins. **J Agric Food Chem**, v. 49, n. 4, p. 1952-1956, 2001.

MATTIETTO, R. A.; LOPES, A. S.; MENEZES, H. C. Caracterização física e físico-química dos frutos da cajazeira (*Spondias mombin* L.) e de duas polpas obtidas por dois tipos de extrator. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 13, p. 156-164, 2010.

MESIAS, M. et al. Antiglycative effect of fruit and vegetable seed extracts: inhibition of AGE formation and carbonyl-trapping abilities. **J Sci Food Agric**, v. 93, n. 8, p. 2037-2044, 2013.

METCALFE, A. et al. Use of complementary and alternative medicine by those with a chronic disease and the general population--results of a national population based survey. **BMC Complement Altern Med**, v. 10, p. 58, 2010.

MITTERMEIER, R. A. et al. Uma breve história da conservação da biodiversidade no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 14-21, 2005.

MORAIS, S. A. L. et al. Análise de compostos bioativos, grupos ácidos e da atividade antioxidante do café arábica (*Coffea arabica*) do cerrado e de seus

grãos defeituosos (PVA) submetidos a diferentes torras. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 198-207, 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MUIR, S. R. et al. Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols. **Nat Biotechnol**, v. 19, n. 5, p. 470-474, 2001.

MUTHENNA, P. et al. Inhibition of protein glycation by procyanidin-B2 enriched fraction of cinnamon: delay of diabetic cataract in rats. **IUBMB Life**, v. 65, n. 11, p. 941-950, 2013.

NANDHAKUMAR, E.; INDUMATHI, P. In vitro antioxidant activities of methanol and aqueous extract of *Annona squamosa* (L.) fruit pulp. **J Acupunct Meridian Stud**, v. 6, n. 3, p. 142-148, 2013.

NG, L. K.; LAFONTAINE, P.; VANIER, M. Characterization of cigarette tobacco by direct electrospray ionization-ion trap mass spectrometry (ESI-ITMS) analysis of the aqueous extract--a novel and simple approach. **J Agric Food Chem**, v. 52, n. 24, p. 7251-7257, 2004.

OKI, T.; MATSUI, T.; OSAJIMA, Y. Inhibitory effect of alpha-glucosidase inhibitors varies according to its origin. **J Agric Food Chem**, v. 47, n. 2, p. 550-553, 1999.

OLIVEIRA, A. C. D. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

OLIVEIRA, V. B. et al. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 48, p. 170-179, 2012.

PATEL, D. K. et al. An overview on antidiabetic medicinal plants having insulin mimetic property. **Asian Pac J Trop Biomed**, v. 2, n. 4, p. 320-330, 2012.

PATEL, K. et al. A review on medicinal importance, pharmacological activity and bioanalytical aspects of beta-carboline alkaloid "Harmine". **Asian Pac J Trop Biomed**, v. 2, n. 8, p. 660-664, 2012.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J. et al. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: extraction, measurement and expression of results. **Food Research International**, v. 41, n. 3, p. 274-285, 2008.

PICKUP, J. C. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, n. 3, p. 813-823, 2004.

POLIDORI, M. C. et al. Profiles of antioxidants in human plasma. **Free Radic Biol Med**, v. 30, n. 5, p. 456-462, 2001.

PRICE, K. D.; PRICE, C. S.; REYNOLDS, R. D. Hyperglycemia-induced ascorbic acid deficiency promotes endothelial dysfunction and the development of atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 158, n. 1, p. 1-12, 2001.

PRIOR, R. L. et al. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC(FL))) of plasma and other biological and food samples. **J Agric Food Chem**, v. 51, n. 11, p. 3273-3279, 2003.

REIS, M. et al. A theoretical study of phenolic compounds with antioxidant properties. **Eur J Med Chem**, v. 42, n. 4, p. 440-446, 2007.

REYNERTSON, K. A.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Antioxidant potential of seven myrtaceous fruits. **Ethnobotany Research and Applications**, v. 3, n. 1, p. 25-35, 2005.

RIBEIRO DA SILVA, L. M. et al. Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. **Food Chem**, v. 143, p. 398-404, 2014.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. **O Bioma Cerrado: In: Cerrado: Ambiente e Flora**. Embrapa - CPAC, Planaltina: 1998.

RIBEIRO, R. A.; RODRIGUES, F. M. Genética da conservação em espécies vegetais do cerrado. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 5, p. 253-260, 2006.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 4, p. 152-159, 1997.

RIOS, J. L.; FRANCINI, F.; SCHINELLA, G. R. Natural Products for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. **Planta Med**, v. 81, n. 12-13, p. 975-994, 2015.

ROESLER, R. et al. Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chem**, v. 104, p. 1048-1054, 2007.

ROHN, S.; RAWEL, H. M.; KROLL, J. Inhibitory effects of plant phenols on the activity of selected enzymes. **J Agric Food Chem**, v. 50, n. 12, p. 3566-3571, 2002.

RONDEAU, P.; BOURDON, E. The glycation of albumin: structural and functional impacts. **Biochimie**, v. 93, n. 4, p. 645-658, 2011.

RUFINO, M. S. M. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chem**, v. 121, n. 4, p. 996-1002, 2010.

SAMUEL, V. T.; SHULMAN, G. I. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. **Cell**, v. 148, n. 5, p. 852-871, 2012.

SANTOS, T. V. S. et al. Bioelectrode for detection of human salivary amylase. **Materials Science and Engineering: C**, v. 32, n. 3, p. 530-535, 2012.

SARWAR, N. et al. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. **Lancet**, v. 375, n. 9733, p. 2215-2222, 2010.

SATHYA, A.; SIDDHURAJU, P. Role of phenolics as antioxidants, biomolecule protectors and as anti-diabetic factors--evaluation on bark and empty pods of *Acacia auriculiformis*. **Asian Pac J Trop Med**, v. 5, n. 10, p. 757-765, 2012.

SCHAFER, A.; HOGGER, P. Oligomeric procyanidins of French maritime pine bark extract (Pycnogenol) effectively inhibit alpha-glucosidase. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 77, n. 1, p. 41-46, 2007.

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, n. 1-2, p. 21-40, 2001.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, P. K. Phenolic antioxidants. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 32, n. 1, p. 67-103, 1992.

SHAN, X. et al. In vitro and in vivo hypoglycemic effects of brown algal fucoidans. **Int J Biol Macromol**, v. 82, p. 249-255, 2016.

SHINDE, J. et al. Alpha-glucosidase inhibitory activity of *Syzygium cumini* (Linn.) Skeels seed kernel in vitro and in Goto-Kakizaki (GK) rats. **Carbohydr Res**, v. 343, n. 7, p. 1278-1281, 2008.

SHON, M. Y. et al. Antimutagenic, antioxidant and free radical scavenging activity of ethyl acetate extracts from white, yellow and red onions. **Food Chem Toxicol**, v. 42, n. 4, p. 659-666, 2004.

SILVA, M. R. et al. Chemical characterization of native species of fruits from savanna ecosystem. **Ciência Rural**, v. 38, n. 6, p. 1790-1793, 2008.

SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. D. Aspectos nutricionais de fitatos e taninos. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 1, p. 21-32, 1999.

SOUZA, P. M. et al. Inhibitory activity of alpha-amylase and alpha-glucosidase by plant extracts from the Brazilian cerrado. **Planta Med**, v. 78, n. 4, p. 393-399, 2012.

SRI HARSHA, P. S.; LAVELLI, V.; SCARAFONI, A. Protective ability of phenolics from white grape vinification by-products against structural damage of bovine serum albumin induced by glycation. **Food Chem**, v. 156, p. 220-226, 2014.

SU, C. H.; LAI, M. N.; NG, L. T. Inhibitory effects of medicinal mushrooms on alpha-amylase and alpha-glucosidase - enzymes related to hyperglycemia. **Food Funct**, v. 4, n. 4, p. 644-649, 2013.

SUN, J. et al. Screening non-colored phenolics in red wines using liquid chromatography/ultraviolet and mass spectrometry/mass spectrometry libraries. **Molecules**, v. 12, n. 3, p. 679-693, 2007.

TADERA, K. et al. Inhibition of alpha-glucosidase and alpha-amylase by flavonoids. **J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)**, v. 52, n. 2, p. 149-153, 2006.

TALA, V. R. et al. Characterization of proanthocyanidins from *Parkia biglobosa* (Jacq.) G. Don. (Fabaceae) by Flow Injection Analysis-Electrospray Ionization Ion Trap Tandem Mass Spectrometry and Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Molecules**, v. 18, n. 3, p. 2803-2820, 2013.

TANNER, G. J. et al. Proanthocyanidin biosynthesis in plants. Purification of legume leucoanthocyanidin reductase and molecular cloning of its cDNA. **J Biol Chem**, v. 278, n. 34, p. 31647-31656, 2003.

TOMA, A. et al. Intestinal α -glucosidase and some pancreatic enzymes inhibitory effect of hydroalcoholic extract of *Moringa stenopetala* leaves. **BMC Complement Altern Med**, v. 14, p. 1-5, 2014.

VALABHJI, J. et al. Total antioxidant status and coronary artery calcification in type 1 diabetes. **Diabetes Care**, v. 24, n. 9, p. 1608-1613, 2001.

VALLVERDU-QUERALT, A. et al. Improved characterization of tomato polyphenols using liquid chromatography/electrospray ionization linear ion trap quadrupole Orbitrap mass spectrometry and liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 24, n. 20, p. 2986-2992, 2010.

VASCO, C.; RUALES, J.; KAMAL-ELDIN, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. **Food Chem**, v. 111, n. 4, p. 816-823, 2008.

VELLOSA, J. C. R. et al. Antioxidant and cytotoxic studies for kaempferol, quercetin and isoquercitrin. **Eclética Química**, v. 36, p. 07-20, 2011.

VILAR, J. B. et al. Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. **Braz J Biol**, v. 68, n. 1, p. 141-147, 2008.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2a ed. Berlin: Springer: 1996. 384 p.

WANG, S. et al. Structural characterization and identification of major constituents in Jitai tablets by high-performance liquid chromatography/diode-array detection coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Molecules**, v. 17, n. 9, p. 10470-10493, 2012.

WILD, S. et al. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27, n. 5, p. 1047-1053, 2004.

WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. **Plant Physiol**, v. 126, n. 2, p. 485-493, 2001.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal Apicultural Research**, v. 37, n. 2, p. 99-105, 1998.

WU, C. H. et al. Inhibition of advanced glycation endproduct formation by foodstuffs. **Food Funct**, v. 2, n. 5, p. 224-234, 2011.

WU, C. H. et al. Dietary phenolic acids attenuate multiple stages of protein glycation and high-glucose-stimulated proinflammatory IL-1 β activation by interfering with chromatin remodeling and transcription in monocytes. **Mol Nutr Food Res**, v. 54 Suppl 2, p. S127-140, 2010.

WU, C. H.; YEN, G. C. Inhibitory effect of naturally occurring flavonoids on the formation of advanced glycation endproducts. **J Agric Food Chem**, v. 53, n. 8, p. 3167-3173, 2005.

WU, L. Effect of chlorogenic acid on antioxidant activity of Flos Lonicerae extracts. **J Zhejiang Univ Sci B**, v. 8, n. 9, p. 673-679, 2007.

YAGI, K.; OHISHI, N. Action of ferulic acid and its derivatives as antioxidants. **J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)**, v. 25, n. 2, p. 127-130, 1979.

YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A. A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of Rumex crispus L. extracts. **J Agric Food Chem**, v. 49, n. 8, p. 4083-4089, 2001.

YOSHIDA, K. et al. Flavonol Caffeoylglycosides as alpha-Glucosidase Inhibitors from Spiraea cantoniensis Flower. **J Agric Food Chem**, v. 56, n. 12, p. 4367-4371, 2008.


YUAN, E. et al. Structure activity relationships of flavonoids as potent alpha-amylase inhibitors. **Nat Prod Commun**, v. 9, n. 8, p. 1173-1176, 2014.

ZHONG, R. et al. Dual methylation pathways in lignin biosynthesis. **Plant Cell**, v. 10, n. 12, p. 2033-2046, 1998.

ZIMMET, P.; ALBERTI, K. G.; SHAW, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 782-787, 2001.

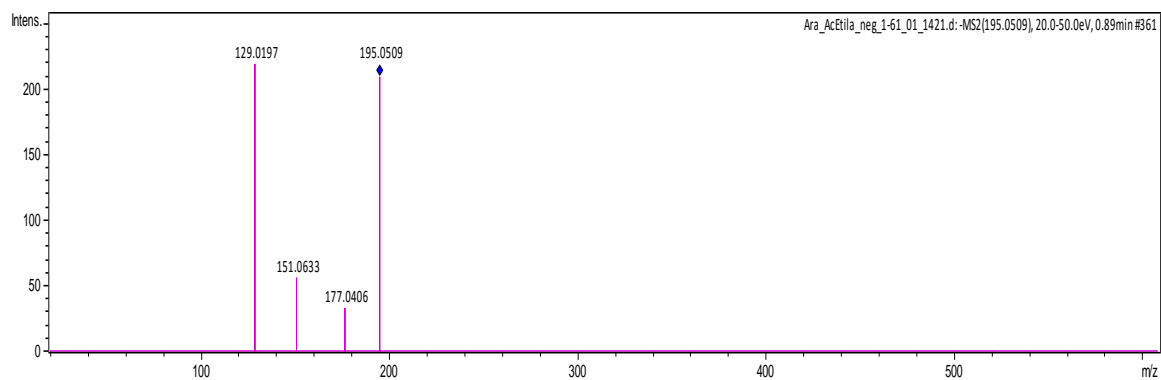
Anexos

Anexo 1. Autorização de acesso e de remessa de componente do patrimônio genético.

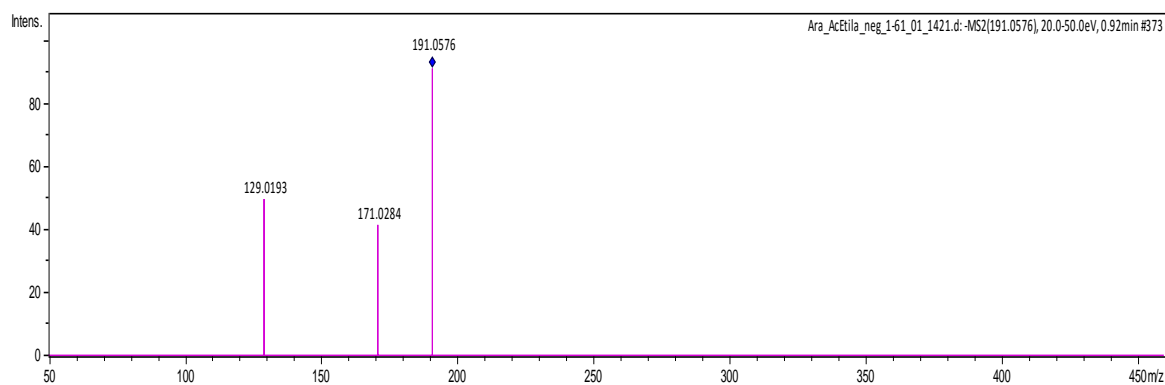
 <p>Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético</p> <p>O Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, nos termos Deliberação 246/2009, do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético, autoriza a instituição identificada no verso deste documento a acessar e remeter componente do Patrimônio Genético com a finalidade de pesquisa científica.</p> <p>Brasília, 02 de outubro de 2015</p> <p>Marcelo Marcos Morales Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde PO 513/2013</p>	<p>Processo: 010743/2015-4 Validade: 02/11/2015 a 02/11/2017 Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA CNPJ: 256.483.870/0001-18 Pesquisador: Foued Salmen Espindola CPF: 242.039.476-34 RG: M1189277 - SSP / MG</p> <p><i>Para visualizar a versão digital da Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético, V.Sa. poderá utilizar a ferramenta disponibilizada pelo CNPq para esse fim na página http://servicosweb.cnpq.br/visualizador e informar o número do protocolo 9504814591790738 para recuperá-la do banco de dados do CNPq</i></p>
--	---

Anexo 2. Espectro de MS/MS dos compostos identificados para a fração acetato de etila.

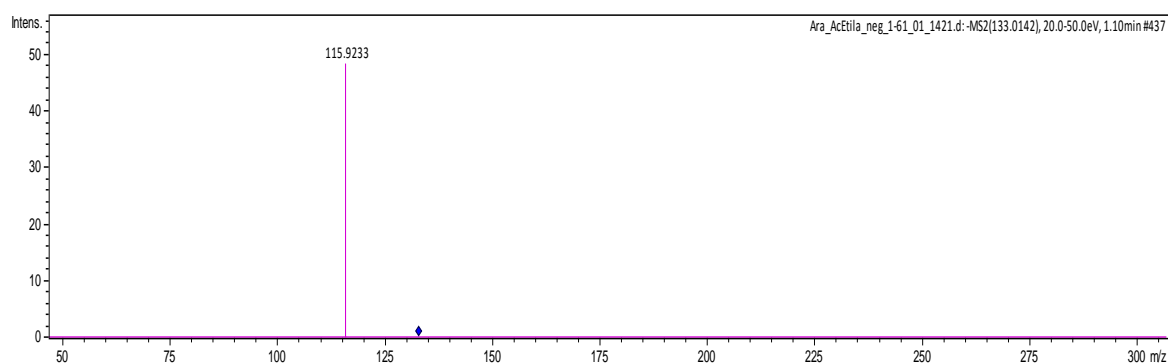
Ácido glucônico



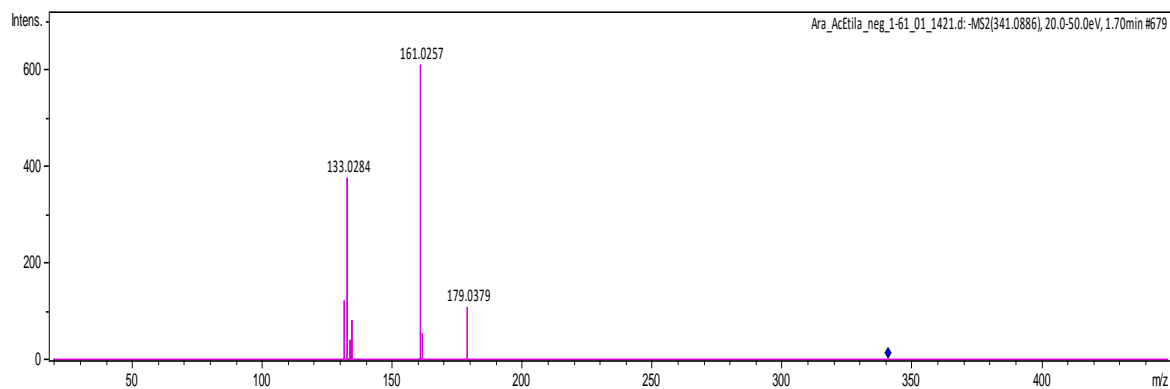
Ácido quínico



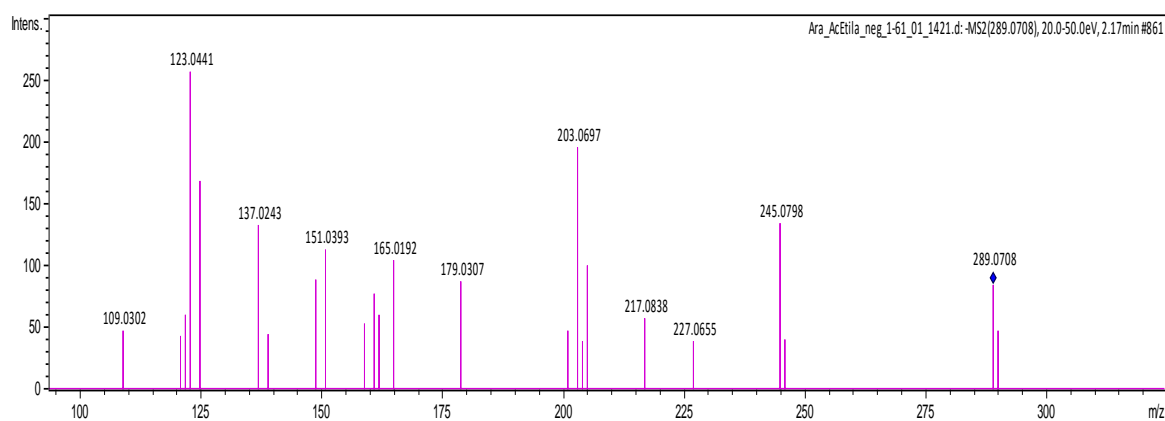
Ácido málico



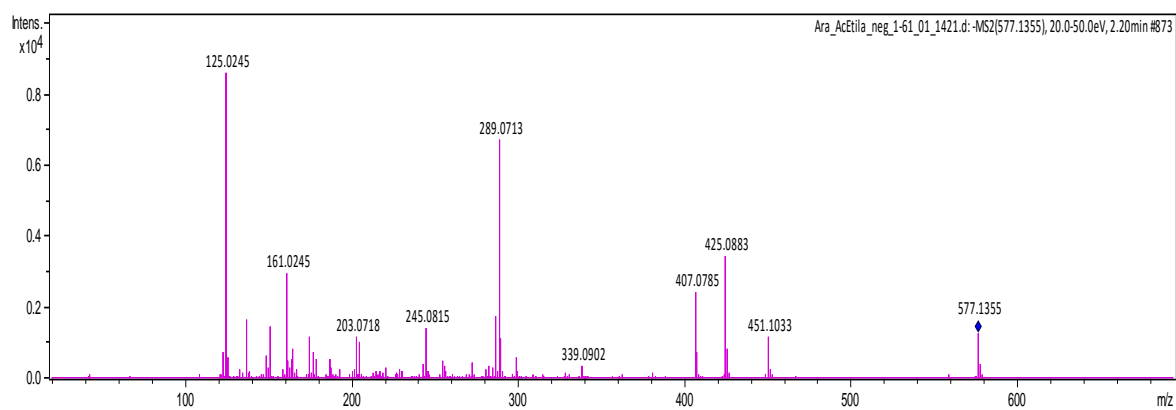
Cafeoil-glicosídeo (derivado do ácido cafeico)



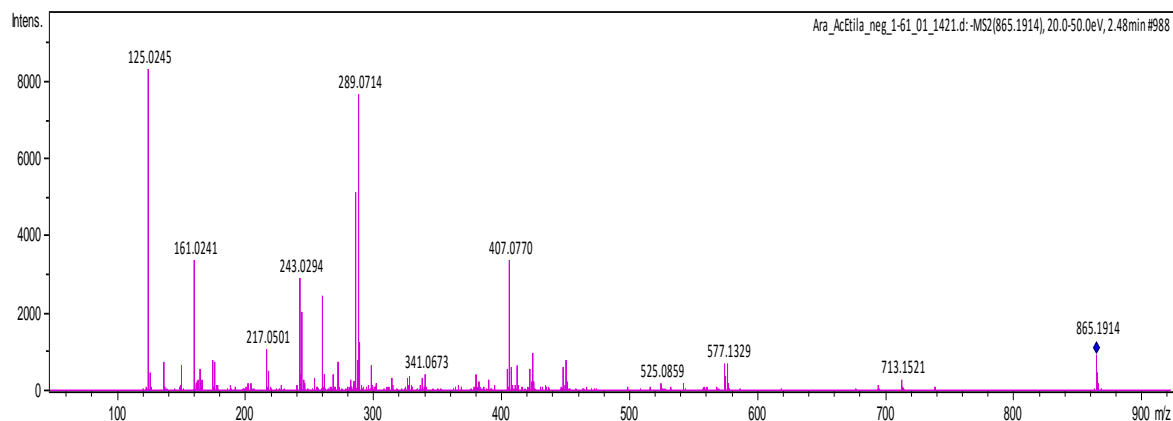
(Epi)catequina



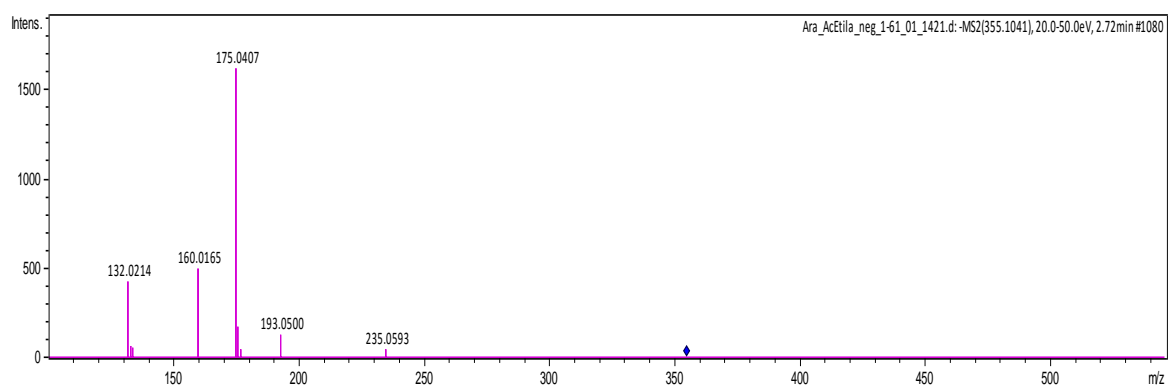
Procianidina B2



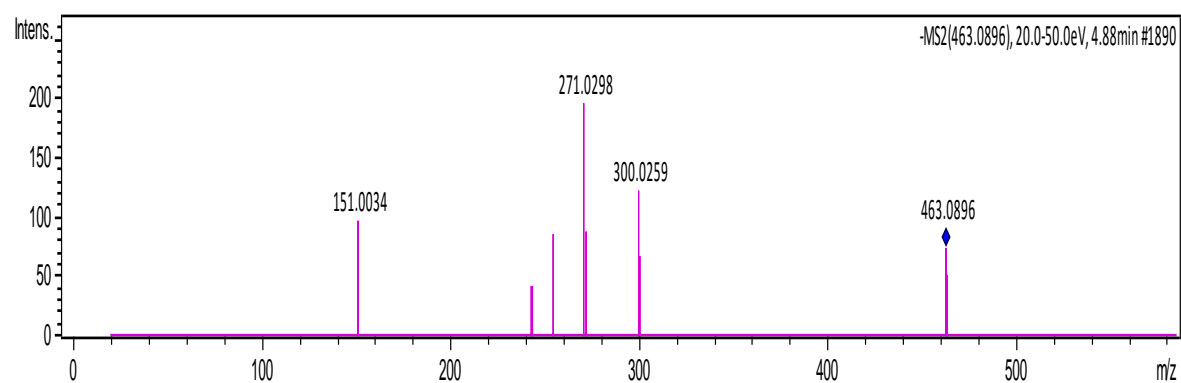
Procianidina C1



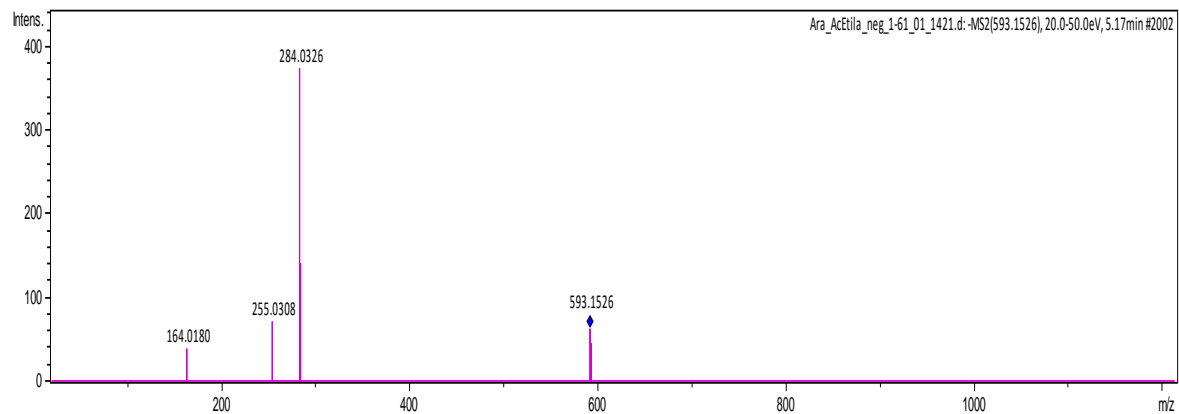
Feruloil-galactosídeo (derivado do ácido ferúlico)



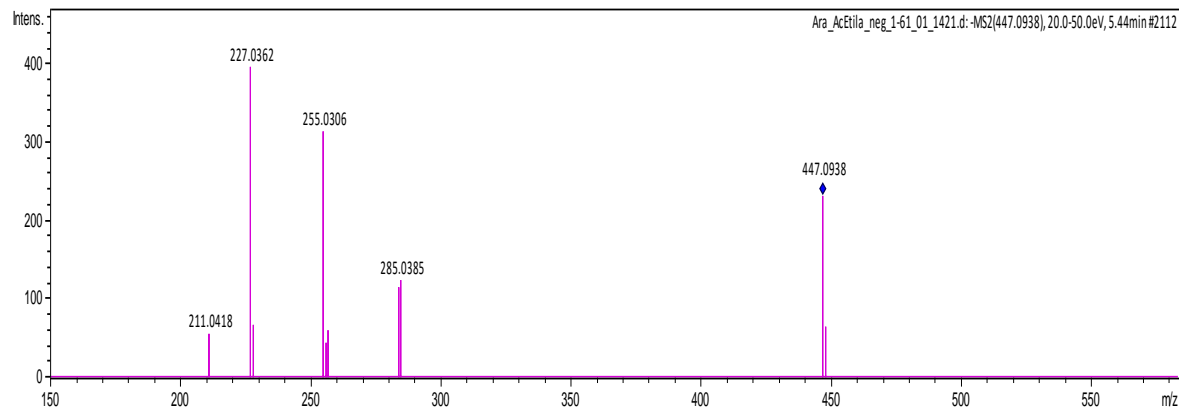
Quercetina-3-glicosídeo



Kaempferol-3-O-rutinosídeo

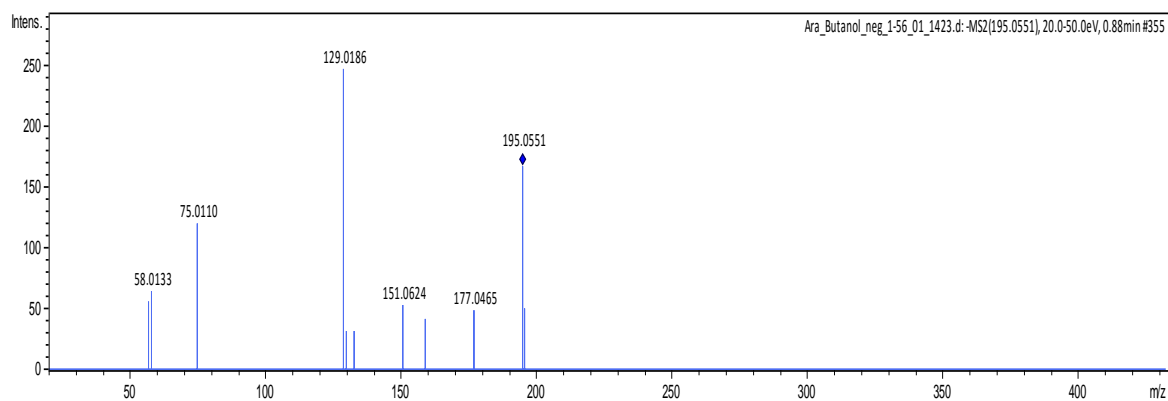


Kaempferol-7-O-glicosídeo

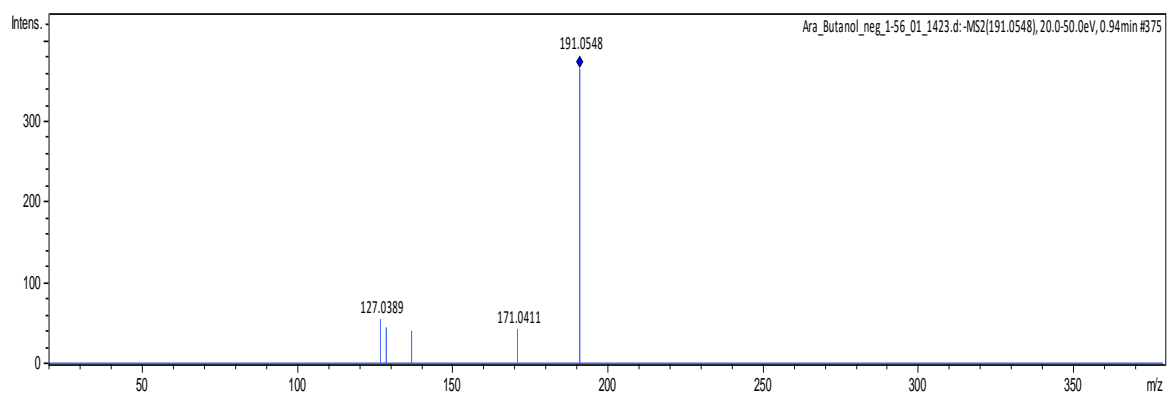


Anexo 2. Espectro de MS/MS dos compostos identificados para a fração *n*-butanol

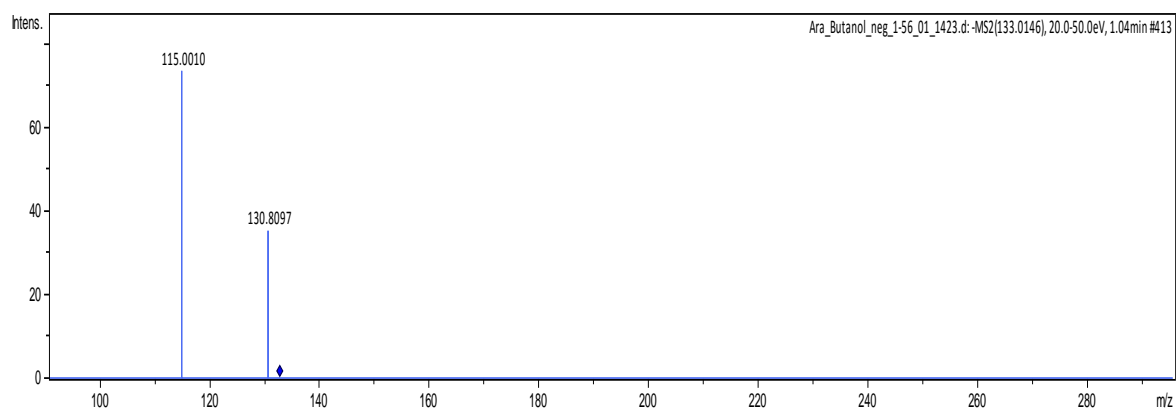
Ácido glucônico



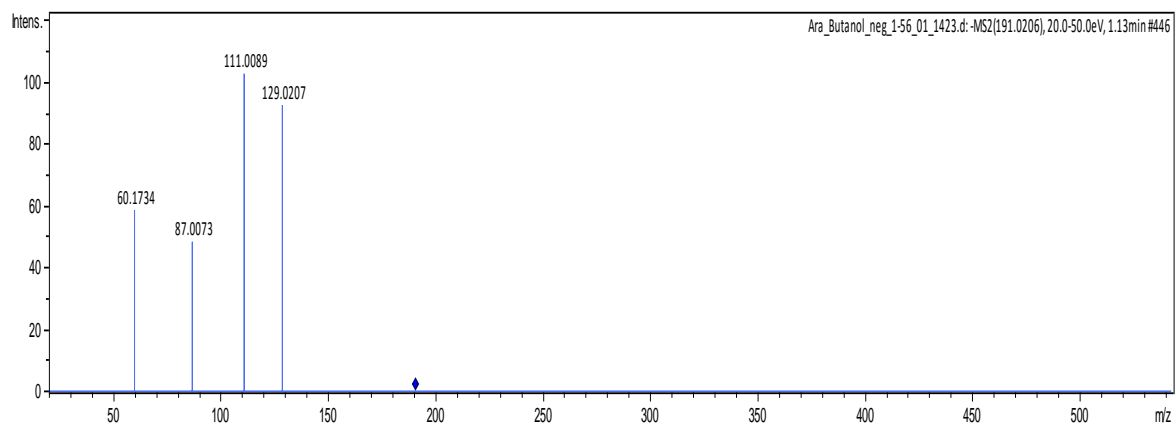
Ácido quínico



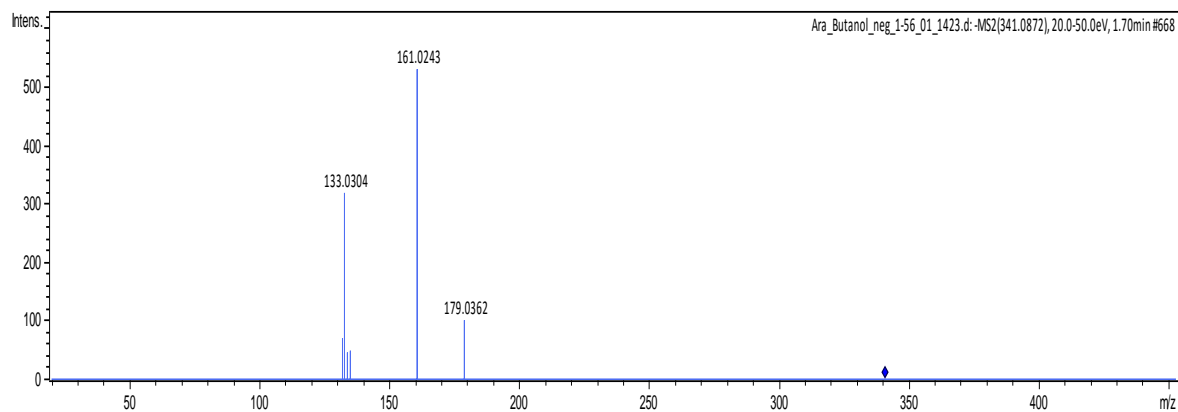
Ácido málico



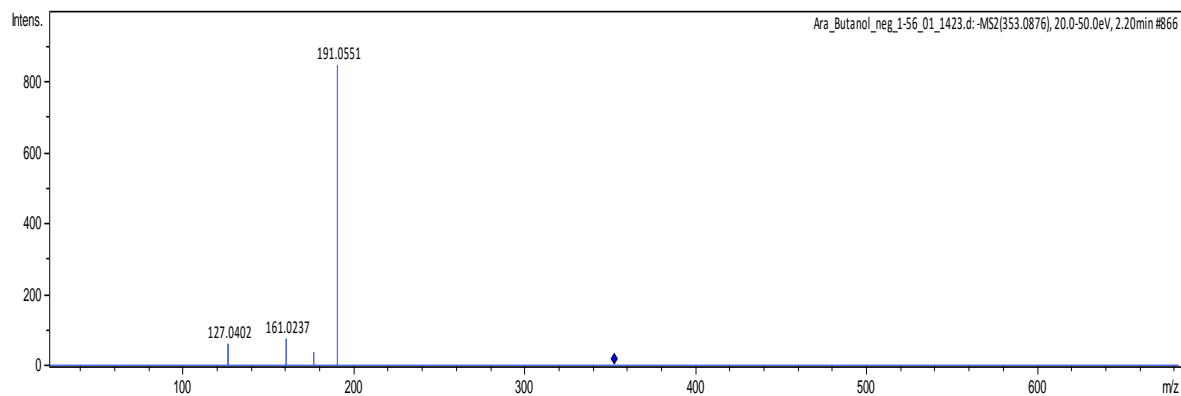
Ácido cítrico



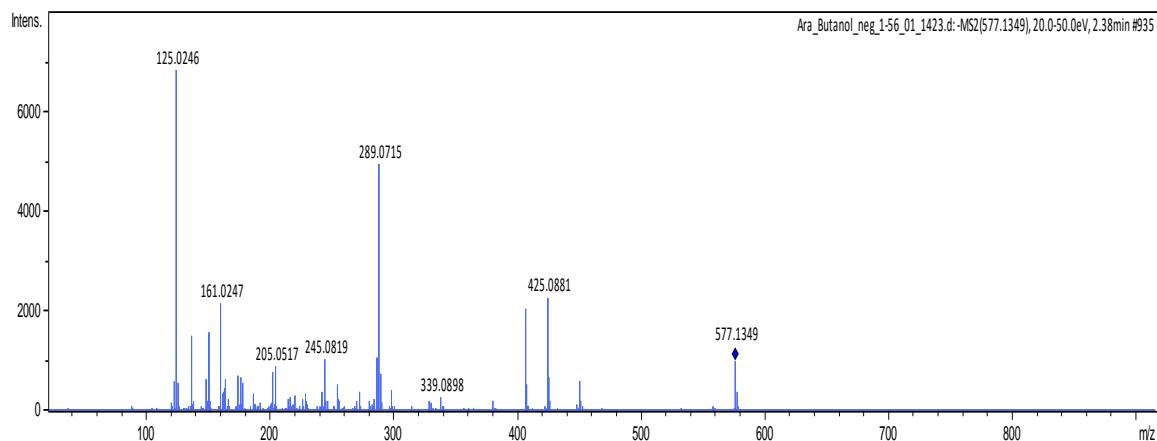
Cafeoil-glicosídeo (derivado do ácido cafeico)



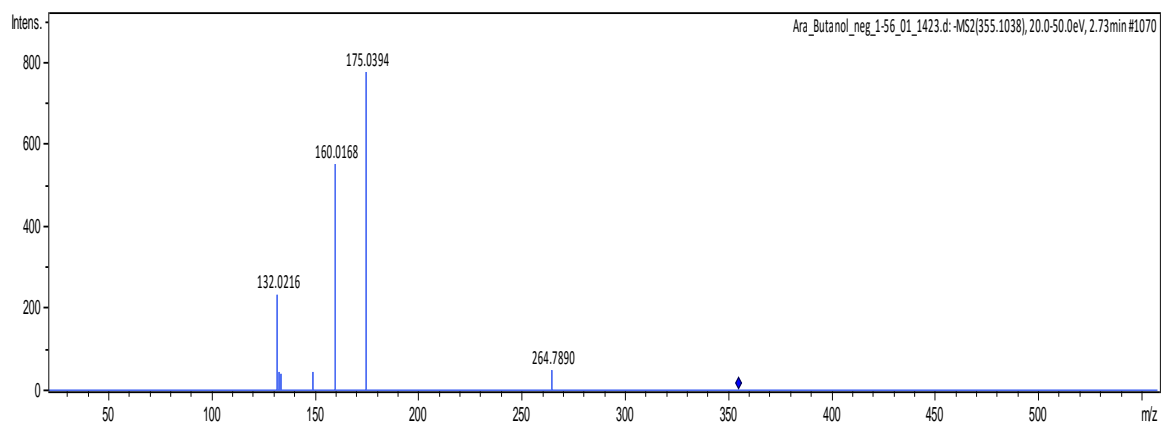
Ácido clorogênico



Procianidina B2



Feruloil-galactosídeo (derivado do ácido ferúlico)



(Epi)catequina

