

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Ação de Extratos de Espécies de Plantas do Bioma Cerrado Sobre a
Atividade da Alfa-amilase**

Cibele Lima de Albuquerque

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia, para a
obtenção do grau de bacharel em Ciências
Biológicas

Uberlândia/MG
Nov./2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Ação de Extratos de Espécies de Plantas do Bioma Cerrado Sobre a
Atividade da Alfa-amilase**

Cibele Lima de Albuquerque

Foued Salmen Espindola

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia, para a
obtenção do grau de bacharel em Ciências
Biológicas

Uberlândia - MG
Mês - Ano

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA


CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Ação de Extratos de Espécies de Plantas do Bioma Cerrado Sobre a
Atividade da Alfa-amilase**

Cibele Lima de Albuquerque

Aprovado Pela Banca Examinadora Em 17 / 12 / 04 Nota 97

Prof.º Dr.º Foued Salmen Espindola


UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Prof.ª Cibele Loménaro de Paula
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

Prof.º Dr.º Fábio de Oliveira

Ms. Miguel Junior Sordi Bortolini

Uberlândia, 17 de 12 2004

AGRADECIMENTOS

A Deus por possibilitar que este sonho se tornasse realidade e por estar vencendo mais uma etapa na área do conhecimento.

Aos meus pais pelo amparo nos primeiros passos, o abraço na hora certa, as palavras de afeição e muitas vezes de consolo. A força dizendo sempre para prosseguir e vencer os obstáculos.

Ao meu Orientador Professor Foued Salmen Espindola, pela amizade, oportunidade e encaminhamento na pesquisa.

Ao Professor Fábio de Oliveira por sempre estar disposto a me ajudar e me aconselhar e por me co-orientar neste trabalho.

Ao Ms. Miguel Junior por me ensinar os primeiros passos para o desenvolvimento da pesquisa.

A Professora Layla S. Espindola e Professor José Elias de Paula por me ceder os extratos.

Aos amigos Luiz Carlos, Carla, Francislene e Denise e ao Professor Glein por me ajudar nos momentos mais difíceis que passei na realização deste trabalho.

Ao Matheus pela compreensão e carinho nos momentos de ausência.

Aos amigos do laboratório, em especial a Luciana Duarte, Luciana Karen, Pietro, Gerson, Ismair, Romeu, Leonardo, Carol, Karen, Karina, Fabiana, Paulo e Letícia.

Aos técnicos Helinho e Dona Maura pela disposição de sempre estar ajudando.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Alfa-amilase.....	01
1.2. Inibidores de Alfa-amilase.....	02
1.3. Bioma Cerrado.....	03
2. OBJETIVOS	04
2.1. Objetivo Geral.....	04
2.2. Objetivos Específicos.....	04
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	05
3.1. Material Vegetal e Extração Hexânica e Etanólicas.....	05
3.2. Coleta da Saliva.....	05
3.3. Teste dos Extratos.....	06
3.4. Material Vegetal e Extração Aquosa e Hidroalcoólica (1:1).....	06
3.5. Teste de Toxicidade Aguda (Dose Única).....	07
3.6. Tratamento dos Camundongos com Extrato Aquoso de <i>Pouteria ramiflora</i>	07
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	08
4.1. Testes dos 100 Extratos na Concentração de 0,2 mg/ml.....	08
4.2. Testes com os Melhores Extratos em Concentrações Decrescentes.....	14
4.3. Testes com os Extratos Aquosos e Hidroalcoólicos em Concentrações Decrescentes.....	21
4.4. Teste de Toxicidade Agudo.....	23
4.5. Tratamento dos Camundongos com Extrato Aquoso de <i>Pouteria ramiflora</i>	26
5. CONCLUSÃO.....	28
6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS.....	29

RESUMO

Ação de Extratos de Espécies de Plantas do Bioma Cerrado Sobre a Atividade da Alfa-amilase

Foram testados 100 extratos, hexânicos e etanólicos, de espécies do bioma cerrado sobre a inibição da atividade da alfa-amilase salivar humana, pelo método de Caraway nas concentrações de 0,2 a 0,02 mg/mL. Observou-se, que a maioria dos extratos que apresentaram altas taxas de atividade inibitória da alfa-amilase eram etanólicos e referentes à raiz ou caule. Os extratos etanólicos da casca da madeira, madeira da raiz e casca da raiz de *Pouteria ramiflora*, da folha de *Pouteria torta* e da casca da raiz de *Matayba guianenses* apresentaram maiores taxas de inibição. Dentre estes, o mais potente inibidor foi da casca do caule de *Pouteria ramiflora*. Extratos aquoso e hidroalcoólicos de casca do caule de *Pouteria ramiflora* foram testados pelo método de Caraway em concentrações decrescentes. O extrato mais potente foi administrado em camundongos, o que não demonstrou toxicidade em pequenas concentrações de extrato e efeito na perda de peso e diminuição de glicemia. Concluimos que o cerrado brasileiro apresenta espécies capazes de inibir a atividade da alfa-amilase salivar mesmo em baixas concentrações. E que extrato aquoso da casca do caule de *Pouteria ramiflora* tem capacidade de causar perda de peso e diminuição de glicemia em camundongos.

Palavras-chave: Amilase, extrato de planta, inibidor

1. INTRODUÇÃO

1.1. Alfa-amilase

A alfa-amilase (α -1,4-glucon-4-gluconohydrolase, EC 3.2.1.1) catalisa a hidrólise de ligações glicosídicas internas no amido e de poli e oligossacarídeos, provenientes da alimentação, transformando-os em pequenas unidades que podem ser assimiladas pelo organismo.

Em humanos a alfa-amilase está presente em secreções salivares e pancreáticas, ambas têm seqüência de aminoácido e estrutura similares, sendo imunologicamente indistinguíveis, mas apresentam pontos isoeletrônicos, pesos moleculares e propriedades catalíticas diferentes. Na saliva há mais de 200 tipos de proteínas (JENZANO *et al.*, 1986). Entre elas está a alfa-amilase cuja quantidade na saliva humana em relação à proteína total é de, aproximadamente, 10 a 70% (MINAGUCHI e BENNICK, 1989). Os carboidratos, normalmente, constituem o principal componente da dieta humana, sendo o amido o principal componente de carboidratos da dieta. Quando o alimento é mastigado, ele é misturado com a alfa-amilase salivar. Entretanto, o alimento permanece na boca por pouco tempo, e, não mais do que 5% do amido é degradado até o momento em que o alimento é deglutido. Porém, a digestão do amido prossegue no corpo e no fundo do estômago durante até uma hora antes que o alimento seja misturado com as secreções gástricas. A atividade da amilase é bloqueada pelos ácidos da secreção gástrica, visto ser inativa como enzima em pH menor do que 4,0. Todavia, em média, antes do alimento junto com a saliva ser totalmente misturado com as secreções gástrica, 30 a 40% do amido passam por hidrólise. Assim, cerca de 15 a 30 minutos após o

esvaziamento do quimo do estômago, com a passagem do alimento para o duodeno, onde o mesmo é misturado com o suco pancreático, praticamente todos os amidos estão digeridos. A amilase pancreática e salivar humana tem funções quase idênticas, porém a pancreática é várias vezes mais potente (GYUTON, 1997).

1.2. Inibidores de Alfa-amilase

Inibidores de alfa-amilase têm tido um interesse crescente por parte dos pesquisadores nos últimos 40 anos. Entretanto este interesse começou antes de 1933, conforme alguns relatórios científicos (WITAKER, 1988). Vários inibidores protéicos referentes a esta enzima foram isolados de plantas e de microorganismos (HILLEBRAND *et al.*, 1988). As sementes de plantas são ricas fontes de um vasto número de diferentes inibidores protéicos que agem na alfa-amilase e em outras enzimas processadoras de polissacarídeos e também em proteases (GARCIA-OLMEDO *et al.*, 1987).

Em plantas, são sugeridas diferentes funções para os inibidores protéicos, inclusive como proteína de armazenamento, como reguladora de atividades proteolíticas endógenas (RYAN, 1990); como participantes de muitos processos de desenvolvimento, incluindo a programação de morte celular e como componentes associados com a sua resistência contra insetos e patógenos (SOLOMON *et al.*, 1999). Estas substâncias podem ser sintetizadas durante o desenvolvimento normal da planta ou pode ser induzido em resposta ao ataque de insetos e patógenos (RYAN and PEARCE, 1998). Segundo FRANCO (2002), muitas famílias de plantas possuem inibidores de proteinases encontradas em seus órgãos reprodutivos e a maioria desses inibidores são moléculas pequenas, estáveis, abundantes e fáceis de purificar (ALVES *et al.*, 2000).

Alguns inibidores de alfa-amilase mostraram-se altamente específicos, sendo ineficaz sobre outra isoenzima ou enzima de uma espécie diferente (FRANCO *et al.*, 2000). Outros inibidores têm alta afinidade tanto pela alfa-amilase de insetos quanto a de mamíferos, ambas enzimas possuem 35% de seqüência idêntica. Também são encontrados inibidores que agem na alfa-amilase de insetos, mas não na de mamíferos e vice-versa (FRANCO *et al.*, 2002).

Inibidores de enzimas são usados na medicina para o tratamento e diagnóstico de desordens, tais como Diabetes Mellitus tipo 2, para controlar da hiperglicemia pós-prandial (HILLEBRAND *et al.*, 1988), e na hiperamilasemia pancreática. Estes inibidores também são investigados em relação aos aspectos toxicológicos e nutritivos de alimentos (CARLINI *et al.*,

2002). Este é o caso dos inibidores de feijão que podem influenciar na nutrição de humanos e de outros animais. Exemplos destes inibidores estão sendo aplicados como bloqueadores da digestão de amido em pacientes com obesidade e para controle de diabetes (LAYER *et al.*, 1985). O inibidor de mais conhecido é a arcabose, mas, segundo KANDRA (2004), o é um tanino é inibidor de alfa-amilase mais potente que a arcabose. Por esta razão foi sugerido o teste de seu uso para prevenir cáries.

Estudos realizados em cães, ratos e humanos demonstraram que inibidores de alfa-amilase do trigo impedem a digestão de carboidratos por reduzir a insulina plasmática e a glicose pós-prandial em resposta a dietas ricas em carboidratos (KOIKE *et al.*, 1995 e CHOUDHURY *et al.*, 1996).

1.3. Bioma Cerrado

As plantas testadas neste trabalho a fim de obter inibidores de alfa-amilase foram coletadas no cerrado, savana brasileira, que contém uma rica e característica flora que cobre mais de dois milhões de quilômetros quadrados em terras brasileiras. Muitas dessas plantas são de uso popular como remédio natural no tratamento de várias doenças por pessoas que moram nesta região (ALVES *et al.*, 2000). Um exemplo são espécies da família Sapindácea que são usadas por leigos como também pela medicina tradicional como diurético, estimulante, expectorante, surfactante natural, sedativo, vermífugo, contra dor de estômago e dermatites em muitos lugares do mundo (CAVALCANTI *et al.*, 2002).

É vantajoso o uso de inibidores de alfa amilase a partir de plantas do bioma cerrado, pois o seu custo é baixo, em vista dos modernos tratamentos para Diabetes que têm um preço muito elevado, sendo a diabetes uma das doenças metabólicas mais comum em todo mundo, e a do tipo 2 é a mais encontrada entre as diabetes (ALVES *et al.*, 2000).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- Levantamento experimental de espécies do bioma cerrado que inibem a atividade da alfa-amilase salivar

3.2. Objetivos Específicos

- Verificar a ação de extratos, mesmo em baixas concentrações, de espécies de plantas do bioma cerrado sobre a atividade salivar humana;
- Verificar em quais partes da planta estão mais concentrada a substância inibidora;
- Comparar a ação de extratos hidroalcoólico, aquoso, hexânico e etanólico sobre a atividade da alfa-amilase humana;
- Verificar a toxicidade aguda em dose única do extrato mais potente,
- Verificar os efeitos terapêuticos do extrato mais potente sobre perda de peso e diminuição de glicemia.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material Vegetal e Extração Hexânica e Etanólicas

As plantas foram coletadas no bioma Cerrado, localizado nos arredores de Brasília, Distrito Federal, Brasil, em 2002. As espécies foram identificadas pelo Professor José Elias de Paula e suas exsiccatas depositadas no Herbário da Universidade de Brasília. Foram utilizadas as seguintes partes das plantas: raiz, casca do caule, folha, madeira do caule, casca da raiz, madeira da raiz, fruto com semente, madeira mais casca do caule e madeira mais casca da raiz. As diferentes partes foram separadas, secas à temperatura ambiente e pulverizadas em moinho de facas. Foram utilizados os métodos de extração por maceração, iniciada por n-hexano, durante sete dias, repetido por quatro vezes, seguida de pré-filtração e da filtração, obtendo, assim uma solução extrativa concentrada. Esta solução foi dessecada em rotavapor, resultando no extrato bruto hexânico. Este processo foi repetido com etanol 95% para a extração de substâncias polares. Os extratos foram diluídos em dimetilssulfóxido (DMSO), numa concentração de 10 mg de extrato por 1 ml de DMSO, em seguida, foram armazenados a -20° C até o momento do uso.

3.2. Coleta de Saliva

Saliva de nove indivíduos foi coletada pelo método de cuspe, descrito por NAVAZESH (1993). O método de cuspe consiste em uma lavagem bucal com água deionizada e em seguida o voluntário estoca saliva no assoalho da boca até chegar em um volume que pode ser

cuspidado. A saliva é centrifugada em 14.000g, à 4° C por 15 minutos. Em seguida, foram feitas três amostras, contendo saliva de três indivíduos em cada.

3.3. Teste dos Extratos

Foram testados 100 extratos referentes a diversas partes das plantas. Estes extratos pertenciam a 17 espécies, distribuídos em 15 gêneros e 6 famílias (Tabelas em anexo).

Para a realização dos testes, a saliva foi diluída 500 vezes em tampão fosfato pH 7,4. O teste de ação dos extratos na atividade da alfa-amilase salivar seguiu o método de Caraway (Kit Analisa - Belo Horizonte, MG). O método de Caraway consiste em encubar o substrato da alfa-amilase com a saliva durante 7 minutos e 30 segundos à 37° C. A atividade da enzima é parada no tempo exato com o reagente de cor.

O resultado dessa atividade inibitória é expresso em g/dL, em que uma unidade é igual à quantidade de enzima que hidrolisa totalmente 10 mg de amido em 30 minutos à 37° C. Primeiramente, testou-se o DMSO como controle negativo e a saliva pura como parâmetro de comparação para o cálculo da alteração da atividade da alfa-amilase. Os testes foram feitos com 100 extratos inicialmente na concentração de 10 mg/mL, que foram diluídos 50 vezes na saliva com uma concentração final de 0.2 mg/mL. Os extratos foram encubados com a saliva por 4 minutos e 35 segundos à 37° C, depois seguiu a análise da atividade da amilase salivar pelo método de Caraway-Kit Analisa. Foram selecionados os extratos que apresentaram maior taxa de atividade inibitória da alfa-amilase para repetir os testes, com o mesmo método, mas em concentrações fracionadas de 0,1mg/ml, 0,05mg/ml e 0,02mg/ml. Os resultados da atividade inibitória de alfa-amilase foram expressos em percentagem, considerando a atividade da saliva pura como 100% e do controle como 0%.

3.4. Material Vegetal e Extração Aquosa e Hidroalcoólica (1:1)

Casca de caule de dois indivíduos da espécie que apresentou melhor resultado no teste anterior, *Pouteria ramiflora*, foram coletados no mesmo local, cerrado alterado nos arredores de Uberlândia, MG. A casca do caule foi secada à 37° C e triturada em moinho de facas. Foi utilizado o método de extração dos extratos por solução hidroalcoólica (1:1) e aquosa, durante oito dias, seguida de filtração, obtendo uma solução extrativa. A solução extrativa hidroalcoólica passou por rotavapor para retirada do álcool. As duas soluções extrativas foram liofilizadas. Os extratos foram diluídos em água e testados pelo método de Caraway, kit

Analisa. O resultado deste teste foi comparado com os resultados dos primeiros testes, referentes aos extratos da Universidade de Brasília. A diferença entre o extrato hidroalcoólico e o etanólico, testado anteriormente, é a concentração do álcool.

3.5. Teste de Toxicidade Aguda (Dose Única)

O teste de toxicidade aguda, dose simples, do extrato aquoso da casca do caule do indivíduo 1 de *Pouteria ramiflora* seguiu o método proposto por BRITO (1994). Dividiu-se 30 animais em seis grupos contendo cinco camundongos cada. Em três grupos foi administrado o extrato via oral e nos outros três, intraperitoneal. Foram administradas doses crescentes de 0,01; 0,5 e 5 g/Kg de massa corporal. Após as duas primeiras horas de monitoramento constante, os animais foram observados de uma em uma hora até completar oito horas. Posteriormente, o monitoramento foi realizado em intervalos de tempo de vinte e quatro horas por dezoito dias. O número de mortes, sintomas e comportamentos anormais foram apontados.

3.6. Tratamento dos Camundongos com Extrato Aquoso de *Pouteria ramiflora*

Foram usados camundongos machos com os respectivos pesos e idades padronizadas. Os camundongos foram separados em quatro grupos de cinco animais cada. O tratamento foi de modo pulsátil (em dias alternados), o extrato foi administrado oralmente através de cânula e durou oito dias. No primeiro grupo foi administrado somente água (controle negativo), nos seguintes grupos foram administrado extrato aquoso da casca do caule de *Pouteria ramiflora* em concentrações de 25; 50 e 100 mg/kg de massa corporal. Os animais receberam ração e água normalmente. No oitavo dia os animais permaneceram em jejum de oito horas e em seguida foram pesados e sacrificados. Foram medidos os níveis glicêmicos do soro do sangue pelo método Enzimático Colorimétrico (Labtest).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Resultados dos Testes dos 100 Extratos na Concentração de 0,2 mg/ml

Os resultados dos extratos testados na concentração de 0,2 mg/mL estão apresentados nas tabelas 1, 2, 3, 4, 5 e 6. Cada tabela se refere a uma família com suas respectivas espécies, e também apresentam as partes das plantas usadas, além do solvente e código do herbário.

Os extratos testados da família Bignoniaceae, Apocynaceae e Asteraceae (tabelas 1, 5 e 3, respectivamente) não apresentaram inibição satisfatória da alfa-amilase. Portanto, extratos destas espécies não contém inibidores potenciais de alfa-amilase .

Três famílias de plantas avaliadas apresentaram extratos com bons resultados nos testes de inibição da atividade da saliva. Elas são: Sapotaceae, Flacourtiaceae e Sapindaceae.

Quatro espécies da família Sapotaceae (*Chrysophyllum soboliferum*, *Pouteria ramiflora*, *Pouteria gardinerii* e *Pouteria torta*) foram testadas, mas apenas três espécies apresentaram extratos com alta capacidade de inibir a atividade da alfa-amilase. Os extratos hexânicos e etanólicos das folhas de *Chrysophyllum soboliferum* foram testadas, sendo que o primeiro não apresentou bom resultado, pois inibiu apenas 10,73% da atividade da saliva. Já o segundo extrato inibiu 81,23%. Nove extratos de *Pouteria ramiflora* foram testados, sendo que quatro deles apresentaram alta atividade inibitória da alfa-amilase. Estes extratos são todos etanólicos e se referem a casca da raiz, madeira do caule, madeira da raiz e casca do caule. Suas taxas de inibição foram acima de 78% da atividade da saliva pura. A terceira espécie com bons resultados de inibição foi a *Pouteria torta*, sendo que apenas os extratos hexânico e etanólico da folha desta planta foram testados. Novamente, o extrato hexânico não apresentou um bom resultado, sendo que o etanólico inibiu 77,97% da atividade

da amilase salivar. Entretanto, os extratos da espécie do mesmo gênero, *Pouteria gardnerii*, não apresentaram inibição significativa. Estes resultados estão apresentados na tabela 6. A madeira da espécie *Pouteria ramiflora* é usada para fazer caixotes e brinquedos. Nenhum uso medicinal das espécies citadas acima foi encontrado na literatura.

Duas espécies da família Flacourtiaceae (tabela 4) foram testadas. A espécie *Piptocarpha macropoda* não apresentou inibição significativa. Já a *Casearia sylvestris*, dos dez extratos que foram testados, dois demonstraram-se potentes inibidores. Os dois extratos eram etanólicos e se referiam a madeira do caule e casca do caule, eles apresentaram taxas de AIA de 87,43 e 90,07%, respectivamente. A *Casearia sylvestris* é conhecida popularmente como erva-lagarto ou erva-lagarto-do-campo. É uma espécie arbórea encontrada em mata ou cerrado. Possui uso medicinal popular (RODRIGUES et al., 2002).

Quatro espécies da família Sapindaceae (tabela 2) foram testadas para a verificação da atividade inibitória da amilase. A espécie *Magonia pubescens* não apresentou inibição significativa. Dez extratos de *Cupania vernalis* foram testados, sendo que os extratos etanólicos da casca da raiz, casca do caule e raiz apresentaram capacidade de inibição acima de 82%. *Cupania vernalis* é conhecida popularmente como Camboatá, é uma espécie arbórea encontrada em mata e muito usada como madeira de travamento (RODRIGUES et al., 2002). Nenhum uso medicinal foi encontrado na literatura. Seis extratos de *Matayba guianenses* foram testados, sendo que os extratos etanólicos da casca do caule e casca da raiz obtiveram uma boa inibição de 79,60 e 86,56%. Quatro extratos, dos oito testados, de *Serjania lethalis* apresentaram alta taxa de AIA. Estes extratos são hexânico da casca do caule e etanólicos da madeira do caule, casca do caule e casca da raiz e inibiram 92,30; 92,67; 98,53 e 89,03%, respectivamente. Nenhum uso medicinal, relacionada as quatro espécies da família Sapindaceae testadas, foi encontrada na literatura.

Nossos resultados sugerem que a maioria das substâncias responsável pela inibição da alfa-amilase seja de natureza polar, tendo em vista que a maioria dos extratos que apresentou elevada taxa de AIA era etanólico. Os resultados também sugere que estas substâncias estão mais concentradas na raiz e no caule das plantas. Devido a limitação da análise não é possível determinar qual é a substância inibidora.

As tabelas a seguir apresentam os resultados dos testes na concentração de 0,2mg/ml. Os resultados estão representados por família.

Tabela 1. Efeito de extratos da família Bignoniaceae na atividade da amilase salivar humana.

Família Nome específico	Código do Herbário	Parte da Planta	Solvente	Média n=3	Desvio Padrão		
Bignoniaceae							
<i>Tabebuia caraiba</i> (Silva Manso) Benth. & Hook.f ex S. Moore	(UB) 3701	Casca da Raiz	E	14,33	22,53		
		Casca do Caule	H	18,23	12,43		
		Folha	H	3,37	3,81		
		Folha	E	6,30	6,07		
		Madeira do Caule	H	43,53	39,48		
		Madeira do Caule	E	14,49	8,77		
		Casca do Caule	E	3,70	4,07		
		Casca da Raiz	H	2,63	3,07		
		Madeira da Raiz	E	13,70	22,36		
		<i>Anemopaegma arvense</i> (Vell.) Stellf.	(UB) 3691	Folha	H	5,47	3,59
Caule (Madeira +Caule)	H			2,33	2,14		
Raiz	H			4,60	5,86		
Fruto c/ Semente	H			8,97	12,62		
Fruto c/ Semente	E			24,53	20,67		
Caule (Madeira +Casca)	E			17,33	20,72		
Raiz(Madeira +Casca)	E			7,27	6,60		
Folha	E			10,53	9,81		
<i>Cybistax antisyphilitica</i> (Mart.) Mart.	(UB) 3696			Madeira+Casca do Caule	H	23,83	19,71
				Folha	H	9,17	8,11
		Folha	E	15,17	16,97		
		Madeira do Caule	H	15,31	26,32		
		Casca do Caule	H	31,13	38,38		
		Madeira do Caule	E	15,27	15,28		
		Madeira + Casca do Caule	E	8,03	5,85		
		Casca do Caule	E	9,27	11,58		

Legenda: E: extrato etanólico; H: extrato hexânico.

Tabela 2. Efeito de extratos da família Sapindácea na atividade da amilase salivar humana.

Família Nome específico	Código do Herbário	Parte da Planta	Solvente	Média n=3	Desvio Padrão
<i>Sapindaceae</i>					
<i>Cupania vernalis</i> Cambess.	(UB) 3695	Casca do Caule	H	31,39	53,71
		Casca da Raiz	H	11,97	14,58
		Madeira da Raiz	H	11,97	14,58
		Madeira do Caule	H	18,75	19,62
		Folha	H	57,53	50,16
		Madeira do Caule	E	63,70	55,35
		Casca da Raiz	E	94,40	5,63
		Folha	E	33,33	57,74
		Casca do Caule	E	82,73	16,02
		Raiz	E	81,53	21,96
<i>Matayba guianensis</i> Aubl.	(UB) 3697	Casca do Caule	H	0,00	0,00
		Madeira do Caule	H	8,10	14,03
		Casca da Raiz	H	22,77	24,59
		Casca do Caule	E	79,60	20,08
		Madeira do Caule	E	0,97	1,67
		Casca da Raiz	E	86,56	9,18
<i>Serjania lethalis</i> A.St.Hil.		Folha	H	13,97	14,75
		Madeira do Caule	H	9,73	9,29
		Casca do Caule	H	92,30	6,80
		Casca da Raiz	H	66,03	14,03
		Folha	E	15,33	12,45
		Madeira do Caule	E	92,67	3,54
		Casca do Caule	E	98,53	1,50
<i>Magonia pubescens</i> A. St.Hill.	(UB) 3702	Casca da Raiz	E	89,03	1,47
		Folha	H	22,87	16,76
		Casca do Caule	H	17,33	10,78

Legenda: E: extrato etanólico; H: extrato hexânico.

Tabela 3. Efeito de extratos da família Asteraceae na atividade da amilase salivar humana.

Família Nome específico	Código do Herbário	Parte da Planta	Solvente	Média n=3	Desvio Padrão
Asteraceae					
<i>Piptocarpha rotundifolia</i>		Madeira da Raiz	H	39,37	38,95
		Madeira da Raiz	E	14,23	21,33
		Folha	H	5,07	3,18
		Casca da Raiz	H	33,13	22,87
		Casca da Raiz	E	16,63	22,55
		Folha	E	6,40	6,40
		Casca do Caule	H	10,50	12,13
		Madeira do Caule	E	35,83	25,70

Legenda: E: extrato etanólico; H: extrato hexânico.

Tabela 4. Efeito de extratos da família Flacoutireaceae na atividade da amilase salivar humana.

Família Nome específico	Código do Herbário	Parte da Planta	Solvente	Média n=3	Desvio Padrão
Flacourtiaceae					
<i>Casearia sylvestris</i> SW. var. <i>lingua</i> (Camb.) Eichl.	(UB) 3693	Madeira do Caule	H	13,43	14,48
		Casca da Raiz	H	58,40	50,90
		Casca do Caule	H	13,67	7,21
		Madeira do Caule	E	87,43	5,24
		Madeira da Raiz	H	5,60	6,62
		Casca da Raiz	E	68,23	31,31
		Casca do Caule	E	90,07	5,85
		Raiz	E	3,90	2,14
		Folha	H	36,00	27,11
		Folha	E	0,93	0,81
<i>Piptocarpha macropoda</i>		Casca do Caule	H	7,27	6,21
		Folha	H	11,07	4,47

Legenda: E: extrato etanólico; H: extrato hexânico.

Tabela 5. Efeito de extratos da família Apocynaceae na atividade da amilase salivar humana.

Família Nome específico	Código do Herbário	Parte da Planta	Solvente	Média n=3	Desvio Padrão
<i>Apocynaceae</i>					
<i>Aspidosperma macrocarpa</i> Woodson	(UB) 3692	Madeira do Caule	H	7,37	12,76
		Casca do Caule	H	9,63	16,69
		Madeira do Caule	E	1,60	1,90
		Madeira da Raiz	E	6,23	6,10
		Casca da Raiz	H	9,33	15,73
		Casca do Caule	E	24,40	41,14
		Folha	E	29,20	22,73
		Casca da Raiz	E	33,13	22,87
		Casca da Raiz	H	22,63	14,13
		Folha	H	4,87	3,93
<i>Himatantus obovatus</i>		Folha		3,77	3,66
		Madeira da Raiz	H	6,6	6,03
		Casca da Raiz	H	11,53	11,90
<i>Hancornia pubescens</i>		Folha		3,77	3,66
		Madeira da Raiz	H	6,6	6,03
		Casca da Raiz	H	11,53	11,90

Legenda: E: extrato etanólico; H: extrato hexânico.

Tabela 6. Efeito de extratos da família Sapotaceae na atividade da amilase salivar humana.

Família Nome específico	Código do Herbário	Parte da Planta	Solvente	Média n=3	Desvio Padrão
<i>Sapotaceae</i>					
<i>Chrysophyllum soboliferum</i>		Folha	H	10,73	9,49
		Folha	E	81,23	26,44
<i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.) Radlk	(UB) 3671	Folha	H	16,53	13,03
		Casca da Raiz	H	26,13	20,22
		Folha	E	61,60	42,51
		Madeira do Caule	H	24,01	41,13
		Casca da Raiz	E	96,63	4,91
		Madeira do Caule	E	83,93	15,38
		Madeira da Raiz	E	97,30	4,68
		Casca do caule	E	77,57	19,95
		Casca do caule	H	23,10	20,32
		Folha	H	9,30	12,11
<i>Pouteria gardnerii</i>		Folha	E	34,03	19,43
		Folha	H	9,23	6,82
<i>Pouteria torta</i>		Folha	H	9,23	6,82
		Folha	E	77,97	6,70

Legenda: E: extrato etanólico; H: extrato hexânico.

4.2. Testes com os Melhores Extratos em Concentrações Decrescentes

Na seleção dos extratos para repetição dos testes em concentrações decrescentes de 0,1; 0,05 e 0,02 mg/ml foi considerada a alta capacidade de inibição da atividade amilase salivar e o baixo desvio padrão.

Os resultados menos significativos na concentração mais baixa, 0,02 mg/ml, foram dos extratos da madeira e casca do caule de *Serjania lethalis*, que inibiram menos de 40% a atividade da alfa-amilase.

Já os extratos da casca do caule de *Serjania lethalis*, madeira do caule de *Casearia silvestres*, madeira do caule de *Pouteria ramiflora* e casca da raiz de *Cupania vernalis* apresentaram uma razoável taxa de AIA que ficou entre 51,30 a 68,87% a 0,02 mg/ml.

Entretanto, os extratos que mais inibiram a atividade da alfa-amilase foram o da casca da raiz de *Matayba guianenses* (83,13%); Casca da raiz de *Serjania lethalis* (74,77%); folha de *Pouteria torta* (81,77%) e madeira da raiz (83,47%) e casca do caule (100%) de *Pouteria ramiflora*.

Embora não tenha sido encontrada na literatura nenhuma referência sobre o uso destas espécies como plantas medicinais, ao inibir a ação da amilase, tais plantas podem vir a ser usadas no tratamento de Diabetes mellitus tipo II e obesidade. Segundo MURAI (2002) e CHOUDHURY et al. (1996) inibidores da alfa-amilase produzem uma má absorção do amido proveniente da dieta e isto implica em diminuição da glicemia pós-prandial e perda de peso, tendo efeito na tolerância aos carboidratos, esvaziamento gástrico e saciedade (BOIVIN et al., 1988). Os inibidores de alfa-amilase que já estão sendo usados em humanos são proteínas knots encontradas na espécie *Amaranthus hypochondriacus* e em outra planta conhecida com Gumarin (35); proteínas CM encontradas no trigo e na cevada e a lectina encontrada no feijão branco, vermelho e preto (LE BERRE et al., 200). Inibidores de alfa-glicosidase também influencia na concentração de glicose pós-prandial, porém causam efeitos colaterais, o que não ocorre com o uso de inibidores de alfa-amilase (KOIKE et al., 1995). Os exemplos de inibidores sintéticos de alfa-glicosidase são a arcabose e a voglibose. Seu modo de ação faz com que haja um acúmulo excessivo de glicose e dos próprios inibidores gerando uma solução hiperosmolar indigerível e inabsorvível. Isso contribui para a proliferação de microorganismos da flora intestinal causando efeitos colaterais como flatulência, diarreia e câibras abdominais (KOIKE et al., 1995), além de causar aumento na incidência de tumores renais e danos hepáticos (CHOUDHURY et al., 1996 e CHARPENTIER ET AL., 2000). Por

outro lado, inibidores de alfa-amilase não estão associados a um gradiente osmótico, pelo fato da flora intestinal ser capaz de metabolizar grande quantidade de amido sem produzir diarreia.

A literatura indica que a inibição necessária para reduzir a absorção pós-prandial de carboidratos, a glicose plasmática e a demanda de insulina é maior ou igual à 90% (JAIN et al., 1989). Portanto os extratos etanólicos da casca da raiz e da casca da madeira de *Pouteria ramiflora* são bons candidatos a um medicamento fitoterápico que reduz a absorção de carboidratos, pois estes extratos inibiram, in-vitro, a atividade da alfa-amilase para mais de 95%, mesmo em baixas concentrações.

Os resultados dos testes das concentrações decrescentes estão apresentados nos gráficos a seguir.

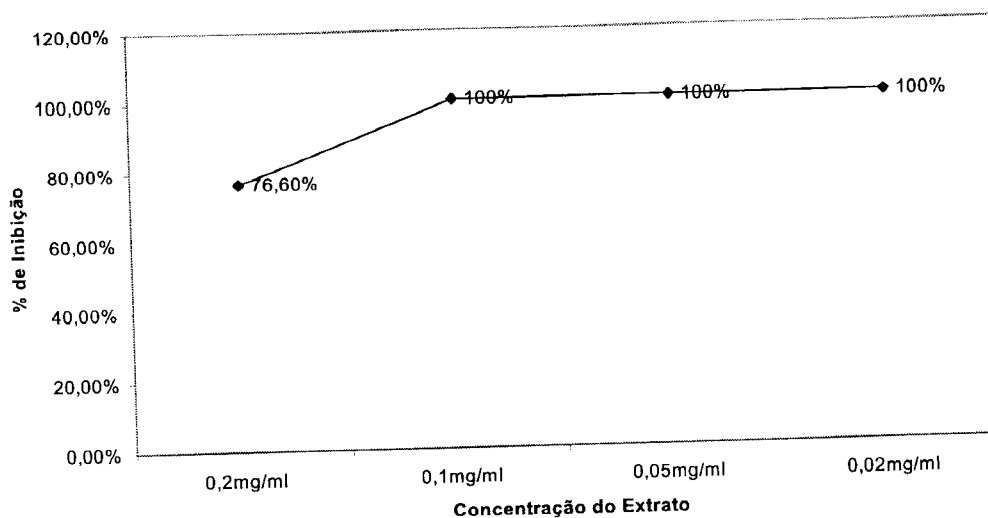


Fig. 1: Porcentagem de inibição do extrato etanólico da casca da madeira de *Pouteria ramiflora*.

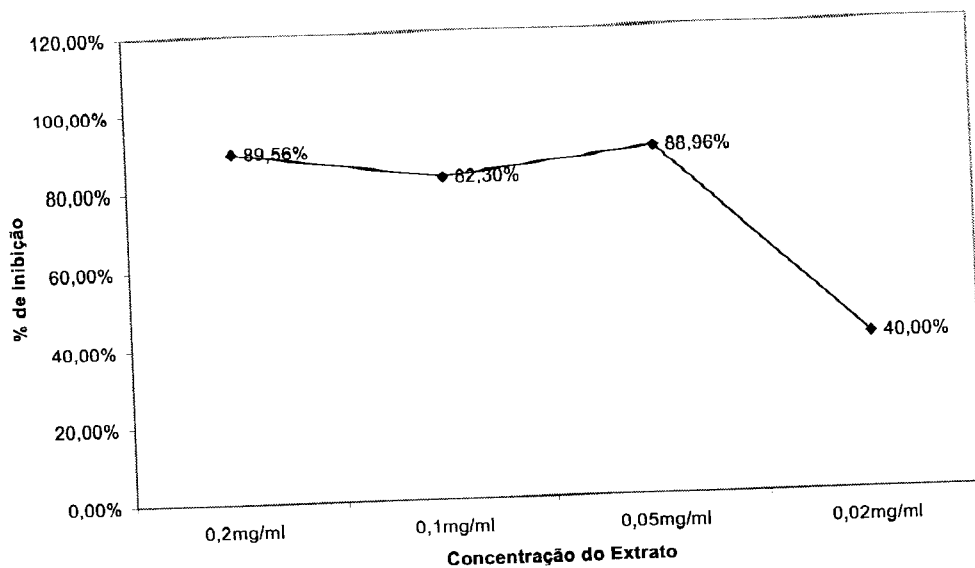


Fig. 2: Porcentagem de inibição do extrato etanólico da madeira do caule de *Casearia silvestres*.

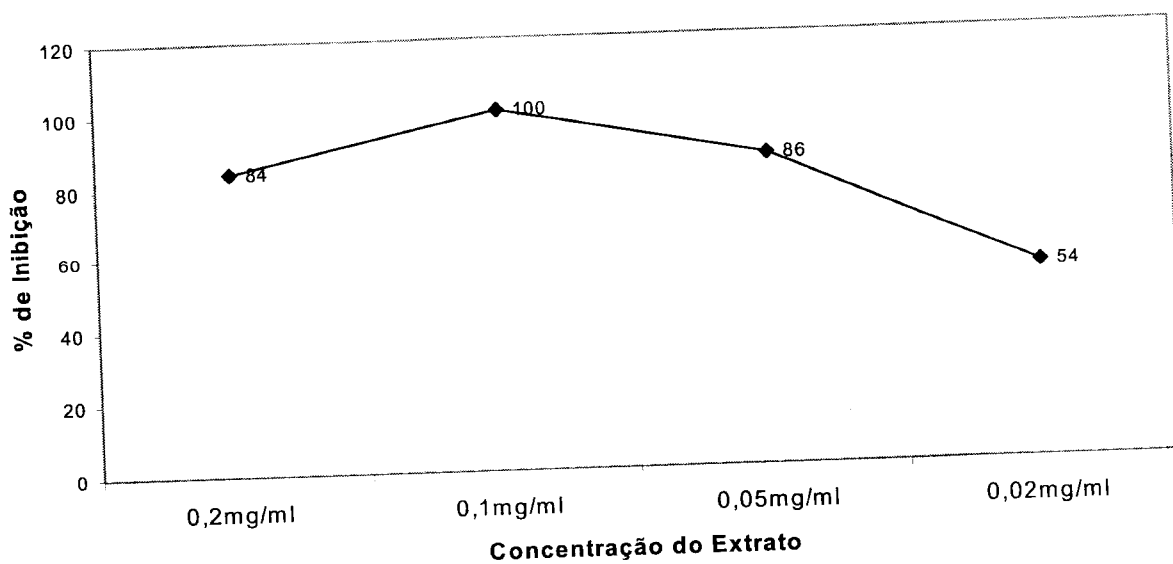


Fig. 3: Porcentagem de inibição do extrato etanólico da madeira do caule de *Pouteria ramiflora*.

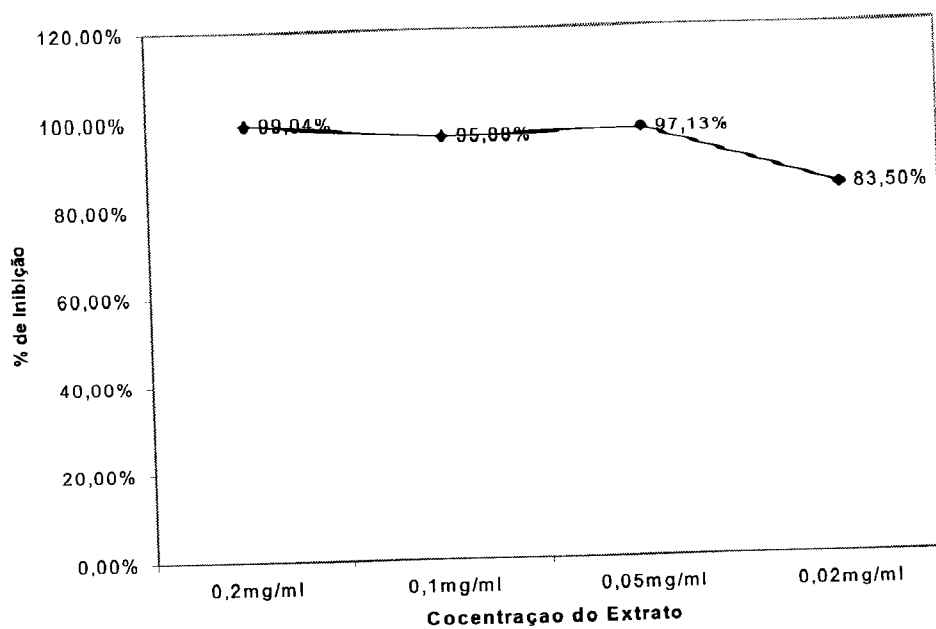


Fig. 4: Porcentagem de inibição do extrato etanólico da madeira da raiz de *Pouteria ramiflora*.

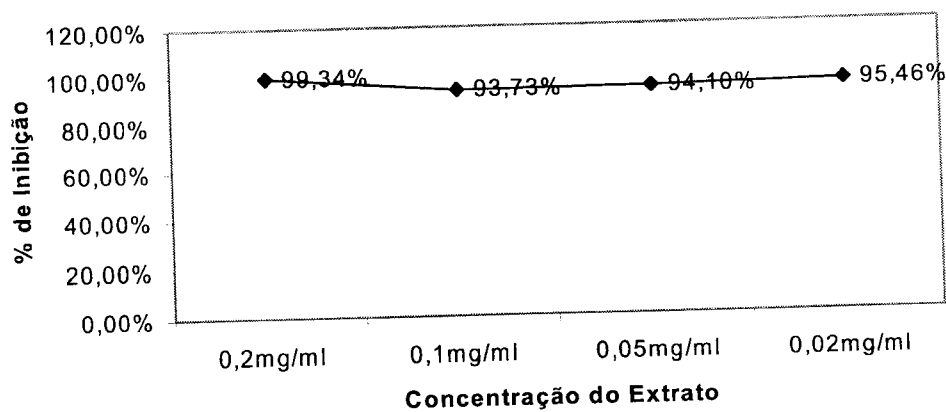


Fig. 5: Porcentagem de inibição do extrato etanólico da casca da raiz de *Pouteria ramiflora*.

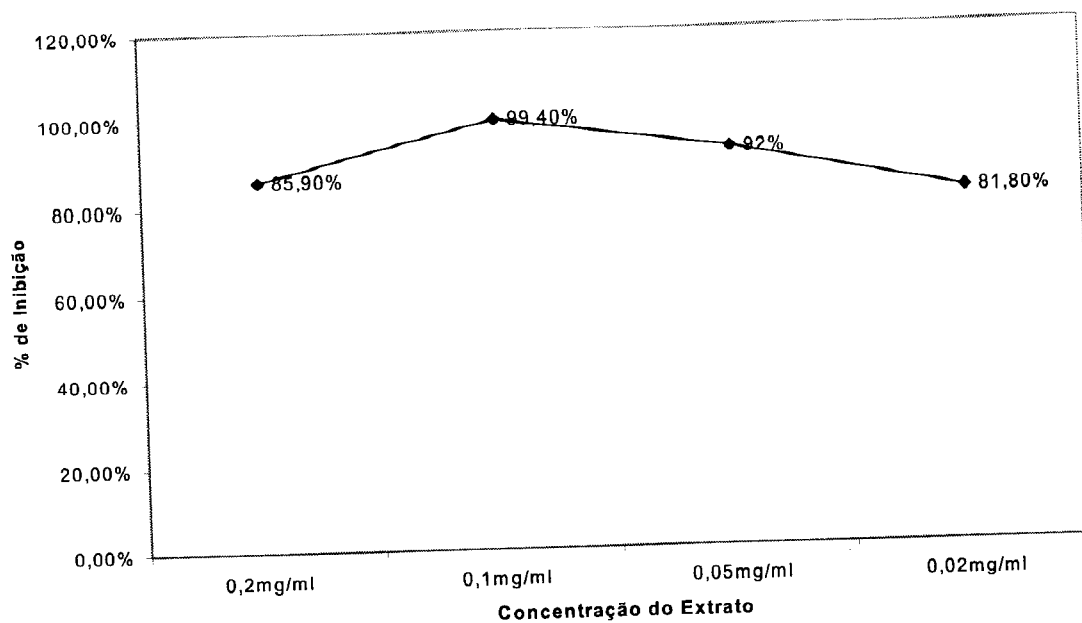


Fig. 6: Porcentagem de inibição do extrato etanólico da folha de *Pouteria torta*.

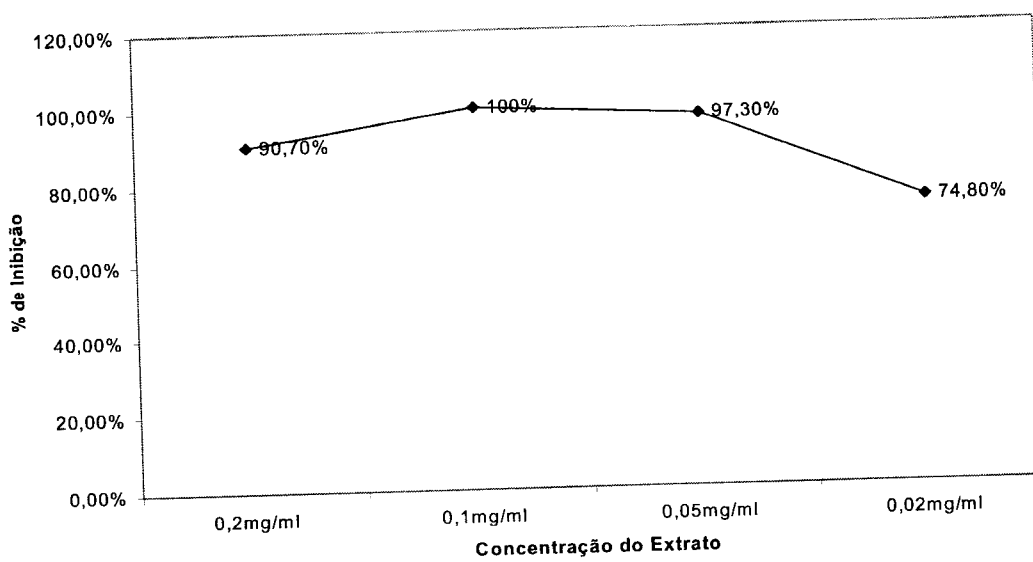


Fig. 7: Porcentagem de inibição do extrato etanólico da casca da raiz de *Serjania lethalis*.

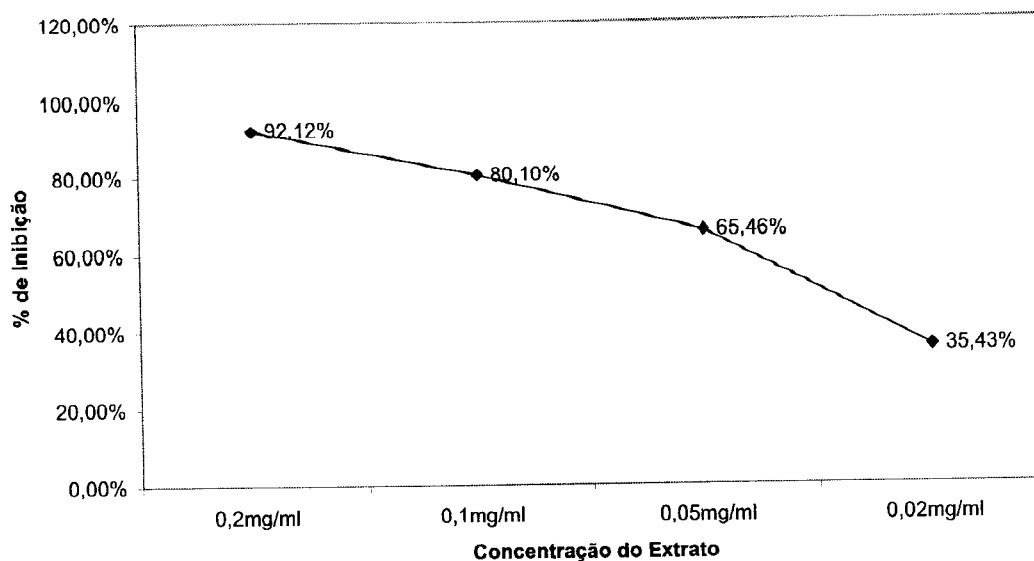


Fig. 8: Porcentagem de inibição do extrato etanólico da madeira do caule de *Serjania*

lethalis.

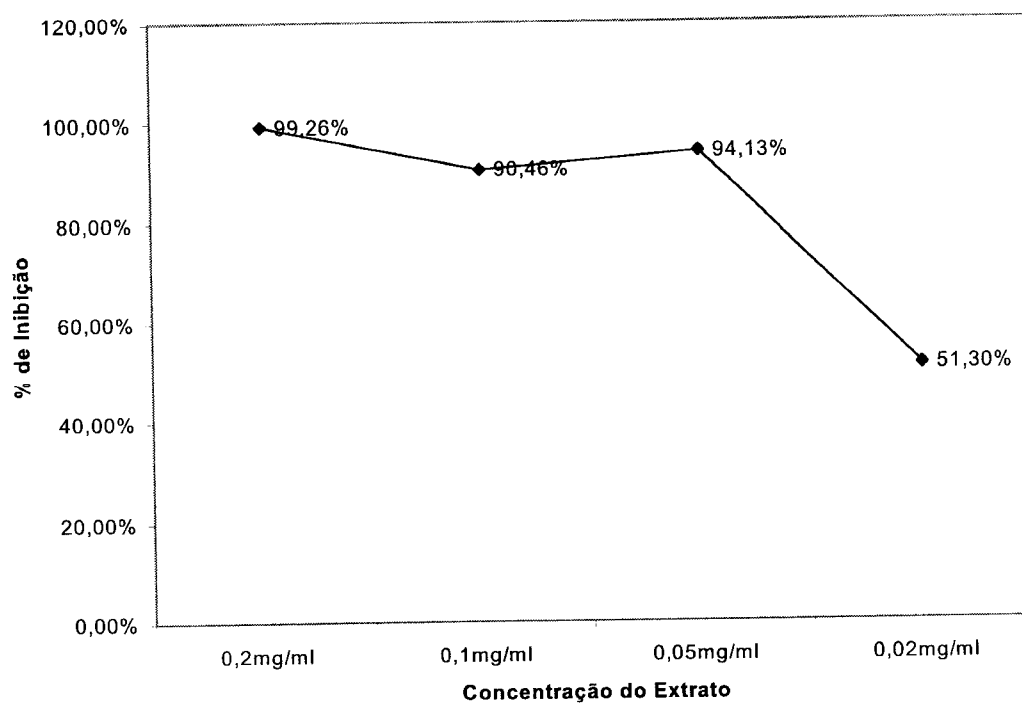


Fig. 9: Porcentagem de inibição do extrato etanólico da casca do caule de *Serjania*

lethalis.

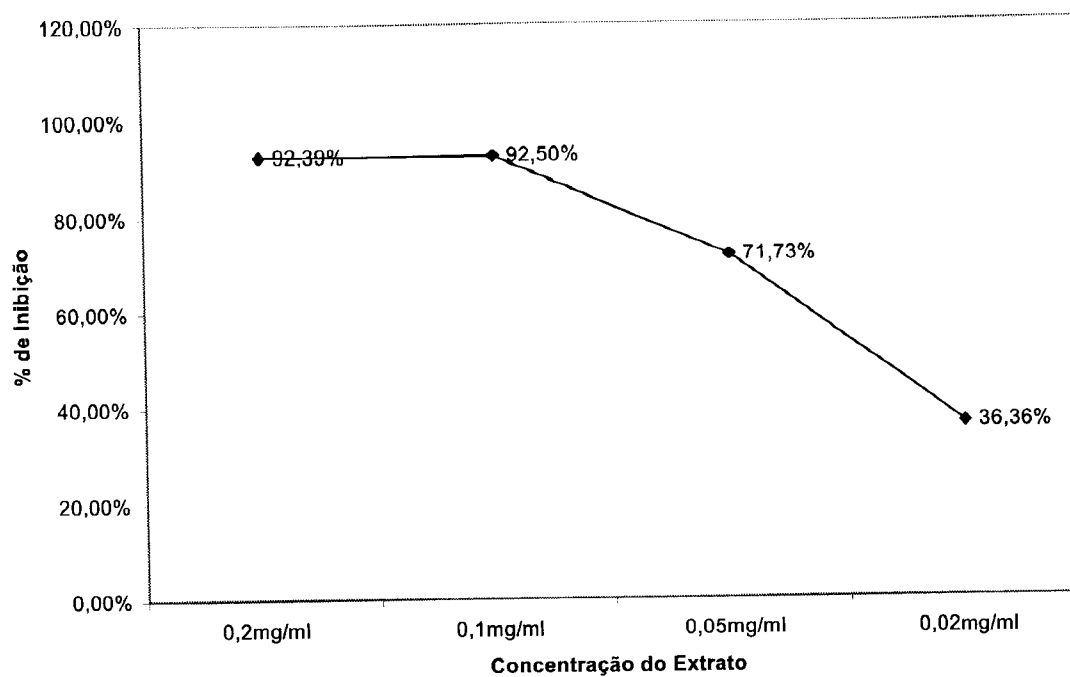


Fig. 10: Porcentagem de inibição do extrato hexânico da casca do caule de *Serjania lethalis*.

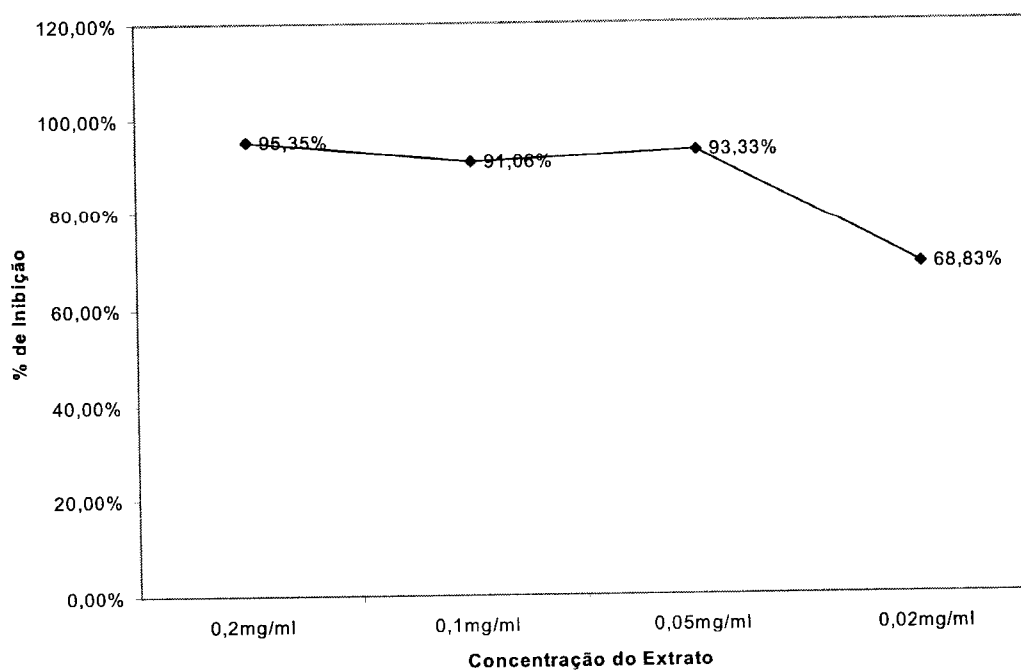


Fig. 11: Porcentagem de inibição do extrato etanólico da casca da raiz de *Cupania vernalis*.

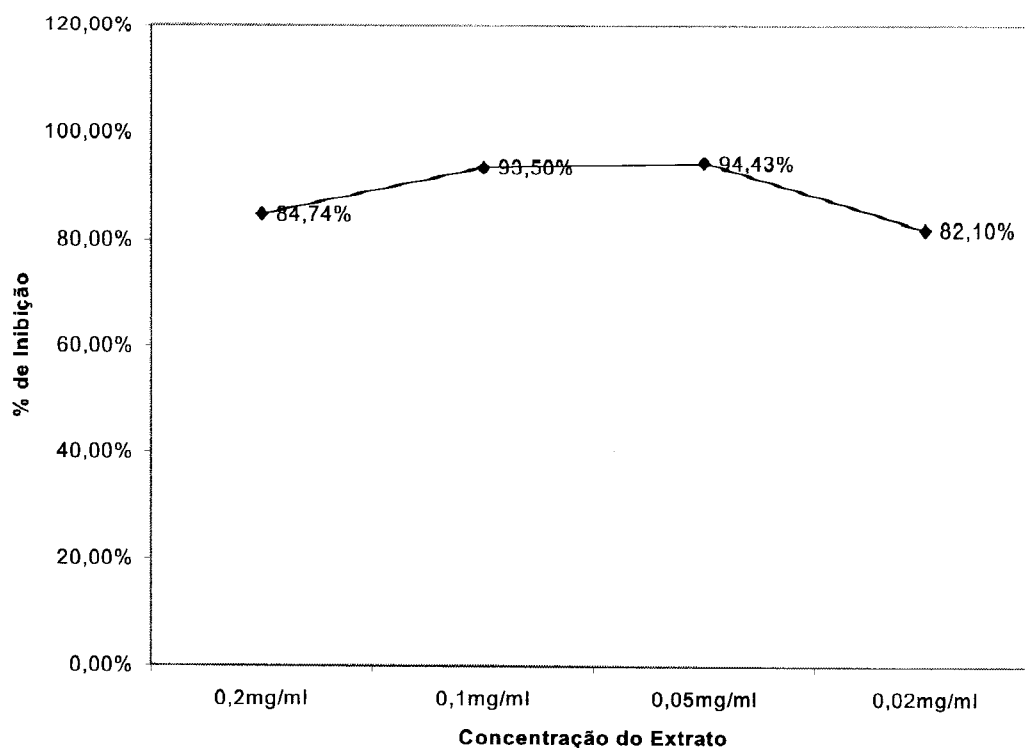


Fig. 12: Porcentagem de inibição do extrato etanólico da casca da raiz de *Matayba guianenses*.

4.3. Testes com os Extratos Aquosos e Hidroalcoólicos em Concentrações Decrescentes

Houve grande diferença de inibição entre os dois extratos aquosos. O indivíduo 1 inibiu 92% da atividade da enzima mesmo em baixas concentração do extrato, enquanto o indivíduo 2 inibiu 34% na mesma concentração (gráfico 13). Este fato sugere que indivíduos da mesma espécie de plantas, cultivados no mesmo local podem apresentar variações quanto a seus metabólitos secundários, já que estes podem estar relacionados a vários fatores como estresse de vários tipos, ataque de pragas e insetos, dentre outros (RYAN and PEARCE, 1998).

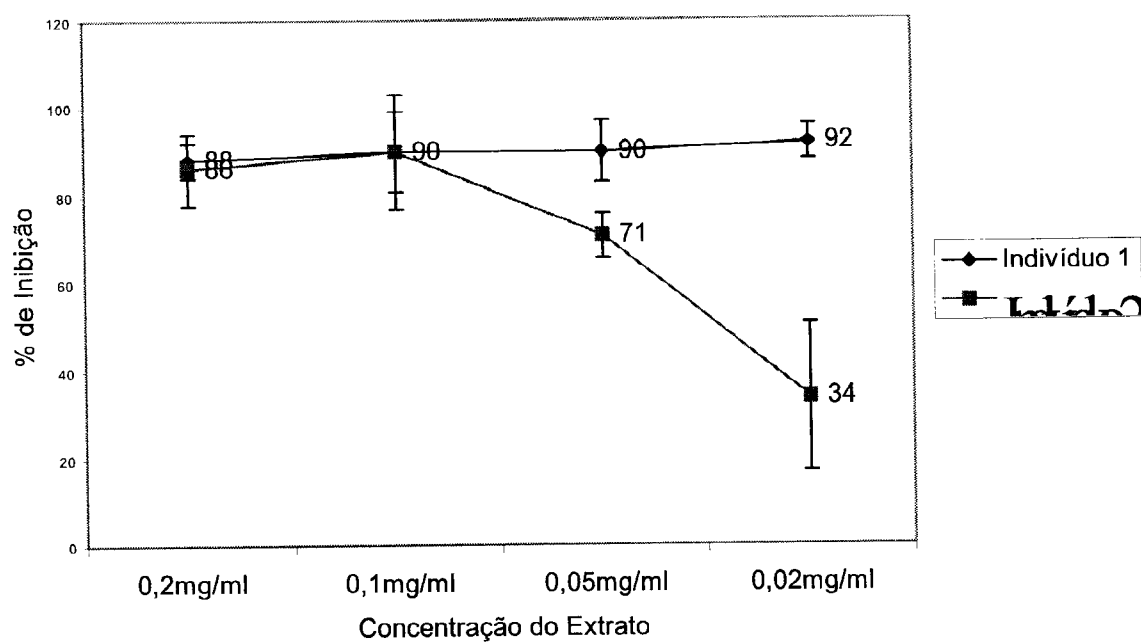


Figura 13: Porcentagem de AIA dos extratos aquosos liofilizados da casca do caule de *Pouteria ramiflora*.

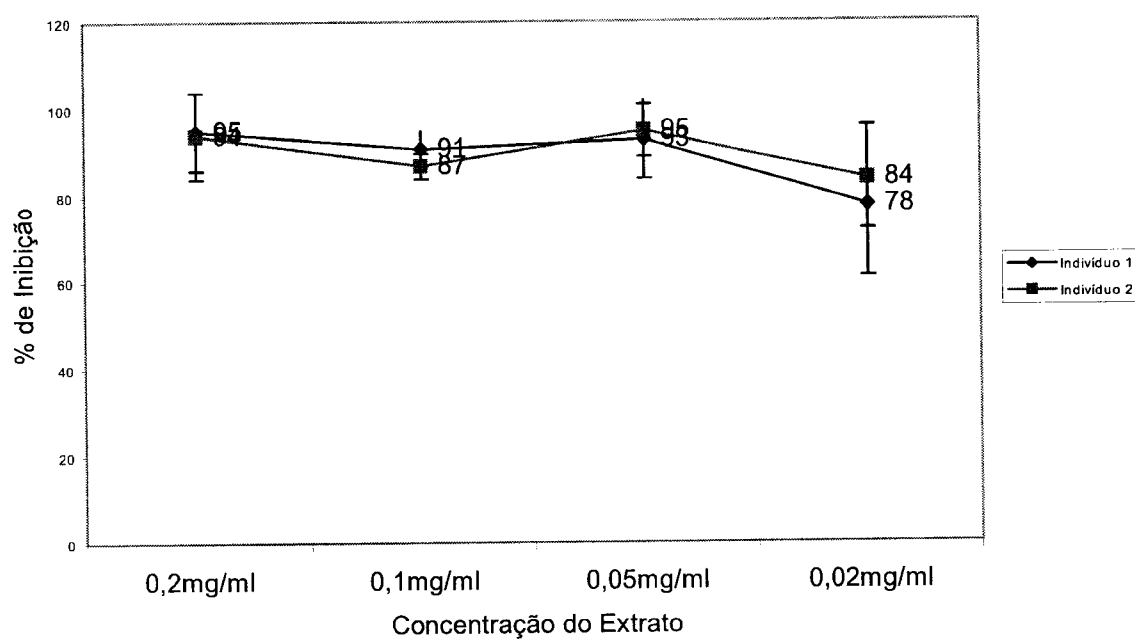


Figura 14: Porcentagem de AIA dos extratos hidroalcoólicos liofilizados da casca do caule de *Pouteria ramiflora*.

Com relação aos extratos hidroalcoólicos, não houve diferenças significativas entre os dois indivíduos, como está mostrado no gráfico 14. Ambos extratos inibiram fortemente a atividade da alfa-amilase mesmo em pequenas concentrações.

Quatro extratos da casca do caule de *Pouteria ramiflora* foram testados (hexânico, etanólico, aquoso e hidroalcoólico), o extrato hexânico na concentração de 0,2 mg/ml inibiu fracamente a atividade da alfa-amilase. Porém, os outros três extratos inibiram fortemente a enzima mesmo em pequenas concentrações, com exceção ao indivíduo 2 do extrato aquoso que inibiu 34% da atividade enzimática na concentração de 0,02 mg/ml. Este fato dá suporte a hipótese citada anteriormente de que o princípio ativo responsável pela inibição da alfa-amilase é polar.

4.4. Teste de Toxicidade Agudo (dose única)

A escolha do extrato aquoso da casca do caule do indivíduo um da espécie *Pouteria ramiflora* para o teste de toxicidade agudo e para o tratamento, em camundongos, levou em consideração a alta taxa de AIA e baixo desvio padrão que este extrato apresentou em relação aos outros três.

O teste de toxicidade aguda é muito importante para a aprovação de qualquer composto terapêutico, sendo que este deve ser avaliado não apenas pelas suas propriedades terapêuticas, mas também pelos seus possíveis efeitos tóxicos (RANG apud EHRLICH, 2001). Assim, foram realizados teste de toxicidade aguda (dose única) via oral. A administração do extrato da casca do caule de *Pouteria ramiflora* na dose de até 0,5mg/kg não provocou reação adversa, ou seja, o extrato não apresentou toxicidade aparente. Porém, os camundongos que receberam dose de 5g/kg de massa corporal apresentaram hipnose e dispnéia. Após 2 horas e 30 minutos um animal foi a óbito. A presença de tais reações sugere este extrato é tóxico quando administrado via oral na dose 5g/kg.

Os animais tratados com doses maiores de 0,5 mg/kg via intraperitonal demonstraram sinais aparente de toxicidade como hipnose, dispnéia e contorção. Houve uma morte oito horas depois dos animais serem tratados com a dose de 5g/kg. Um animal morreu logo após receber a dose de 0,5 mg/kg e outro morreu algumas horas depois de receber a mesma dose. Os animais tratados com dose menor de 0,5mg/kg não apresentaram sinais aparentes de toxicidade.

Esta avaliação foi realizada por observações macroscópicas, sugerindo-se, para maiores conclusões, cortes histológicos de órgãos dos animais que vieram a óbito e também dos que sobreviveram. Mas isto não foi possível.

A tabela 7 apresenta o quadro comportamental e fisiológicos observado no monitoramento dos camundongos tratados com dose única do extrato aquoso da casca do caule de *Pouteria ramiflora*. Após as duas primeiras horas de monitoramento constante, os animais foram observados de uma em uma hora até oito horas após a administração do extrato. Posteriormente, foram monitorados até o 18º dia, sendo verificado segundo a presença (+) e ausência (-) de sintomatologia.

Esse estudo é uma avaliação estimativa e preliminar das propriedades tóxicas de um composto-teste, fornecendo informações acerca dos riscos para a saúde resultantes de uma exposição de curta duração pela via escolhida. A extrapolação dos resultados para seres humanos de estudos de efeitos toxicológicos produzidos pela administração aguda de um composto em roedores é intencionalmente aceita, embora não seja considerada como um valor absoluto e tampouco dispense a realização de ensaios de tolerância em humanos. A obtenção de resultados similares neste teste, efetuados em outras espécies animais, pode reforçar a validade da extrapolação desses estudos para seres humanos (BRITO, 1994).

Tabela 7: Quadros comportamentais e fisiológicos observados no monitoramento dos camundongos no teste de toxicidade aguda.

Camundongo	Contorção	Hipnose	Piloereção	Dispnéia	Agitação	Resposta ao toque	Óbito (horas)
0,05g/kgEA (v.o.)							
1	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-
0,5g/kg EA (v.o.)							
1	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-
5g/kg EA (v.o.)							
1	-	+	-	+	-	-	2'30''
2	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	+	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-
0,05g/kg EA (i.p.)							
1	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-
0,5g/kg EA (i.p.)							
1	-	-	-	-	-	-	-
2	-	+	-	+	-	-	24 h.
3	-	-	-	-	-	-	-
4	+	+	-	+	-	-	10'
5	-	-	-	-	-	-	-
5g/kg EA (i.p.)							
1	-	+	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-
3	-	+	-	+	-	-	8 h.
4	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: EA: extrato aquoso; v.o.: via oral; i.p.: intraperitoneal.

Como podemos observar na tabela 8, os camundongos tratados com doses de 25 e 50 mg/kg de massa corporal não responderam da mesma forma ao tratamento, o que é uma situação normal, levando em consideração as diferenças genéticas e fisiológicas que um organismo tem em relação a outro. Mas, podemos observar que os animais ou perderam uma pequena parcela de seu peso ou engordaram pouco em relação ao grupo controle (tratado com água). Porém, todos os animais do grupo tratado com 100 mg/kg da massa corporal perderam peso, e essa perda variou entre 3,8 a 16% de seu peso inicial (antes do tratamento). Também foi mensurado o nível glicêmico do sangue dos animais (gráfico 15). Observou-se uma brusca queda glicêmica nos animais que receberam doses de 50 e 100 mg/kg. Já, este efeito não foi observado nos animais que receberam 25 mg/kg de extrato por massa corporal. A razão para a perda de peso e queda de níveis de glicose do sangue pelo tratamento com o extrato aquoso da casca do caule de *Pouteria ramiflora* não está elucidado, mas pode-se cogitar a hipótese do extrato causar inibição da atividade da alfa-amilase salivar, como foi comprovada em testes (in vitro) anteriores com a saliva humana. A inibição desta enzima provoca diminuição da hidrólise dos carboidratos provenientes da dieta, causando menos absorção destes, resultando numa menor oferta de glicose para as células e conseqüentemente perda de peso.

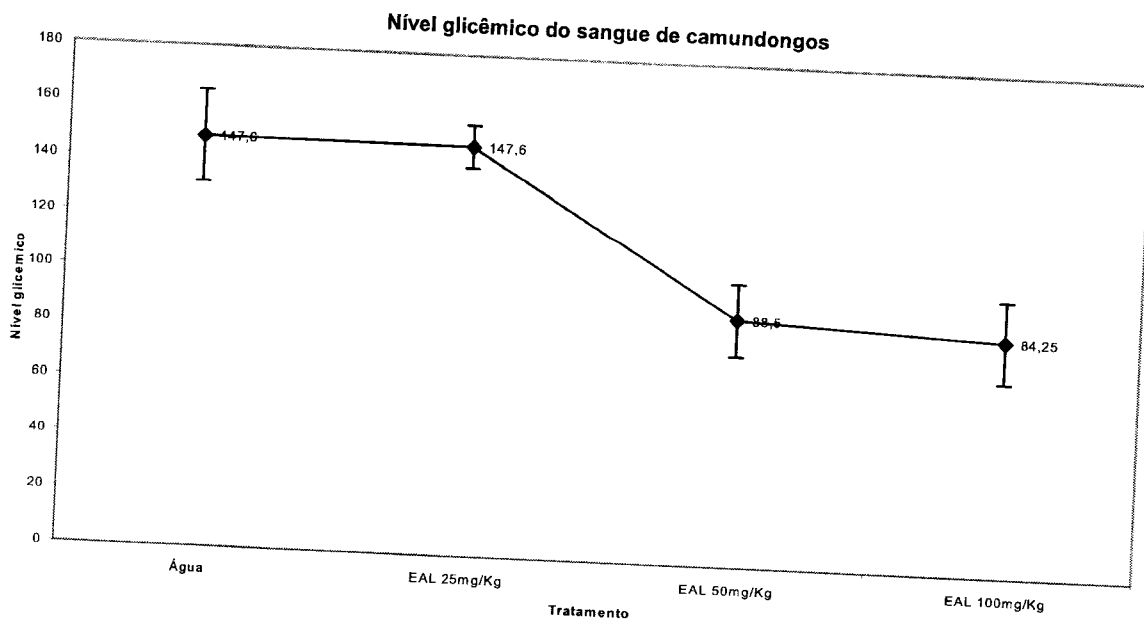


Figura 15: Curva do nível glicêmico do soro sanguíneo de camundongos tratados com concentrações crescentes (25, 50 e 100 mg/kg de massa corporal) do extrato aquoso da casca do caule de *Pouteria ramiflora*.

5. CONCLUSÃO:

Com base nos resultados obtidos, sugerimos que o cerrado brasileiro apresenta plantas com potencial inibidor de alfa-amilase salivar humana, como é o caso das espécies *Matayba guianenses*, *Serjania lethalis*, *Pouteria torta* e *Pouteria ramiflora*, que inibiram mais que 75% da atividade desta enzima, mesmo em baixas concentrações de extrato. Sugerimos também, que extrato aquoso da casca do caule de *Pouteria ramiflora* não apresenta sinais aparente de toxicidade em dose aguda única de 0,5g/kg via oral e 0,05g/kg via intraperitoneal, além de ter a capacidade de causar perda de peso e diminuição de glicemia em camundongos.

- FRANCO, O. L.; RIGDEN, D.J.; MELO, F. R.; GROSSI DE AS, M.F. Activity of wheat alpha-amylase inhibitors toward bruchid alpha-amylase and structural explanation of observed specificities. **European Journal Biochemistry**. 267, 2166-2173. 2000.
- FRANCO, O. L.; RIGDEN, D.J.; MELO, F. R.; GROSSI DE AS, M.F. Plant alpha-amylase inhibitors and their interacion with insect alpha-amylases. Structure, function And crop protection. **European Journal of Biochemistry**. Londres, Inglaterra. 269 (2):397-412. jan. 2002.
- GARCIA-OLMEDO, P.; SALCEDO, G.; SANCHES-MONGE, R.; GOMES, L.; ROYO, J.; CARBONERO, P. Plant proteinaceous inhibitors and proteinases and alpha-amylase, Oxford Surv. **Plant Molecular Cell Biology**. 4: 275-334. 1987.
- HILLEBRAND I.; CAGATAY M.; SCHULZ H.; STREICHER-SAIED U. Efficacy and tolerability of the glucosidase inhibitor acarbose (Bay-g5421) evaluated by clinical data pool. **Therapie**.; 43:153. 1988.
- JENZANO, J. W. et al. Comparison of five tecnicas for determination of protein content in mixed human saliva. **Analytical Biochemistry**. North Carolina, v.159, p.370-376, jul, 1986.
- KANDRA, L.; GYÉMÁNT, G.; ZAJÁ CZ, A.; BATTA, G. inhibitory effects of tannin salivary alfa-amylase. **Biochemical and Biophysical Reaserch Communications**. V. 319, P.1265-1271. 2004.
- KOIKE, D.; YAMADERA, K.; DIMAGNO, E.P. Effect of a wheat amylase inhibitor on canine carbohydrate digestion, gastrointestinal function, and pancreatic growth. **Gastroenterology** 1995;108:1221-9.
- LAYER, P., CARLSON, G.L., DIMAGNO, E.P. Partially purified white bean amylase inhibitor reduces starch digestion in vitro and inactivates intraduodenal amylase in humans. **Gastroenterology**. 88:1895-1902. 1985

MINAGUCHI, K., BENNICK, A. Invented review. Genetics of human salivary protein. **J. Dent. Res.** Chiba City, v.689, n°1, p.2-15. Jan, 1989.

MURAI, A.; IWAMURA, K.; MASAYASU, T.; OGAWA, K.; USUI, T.; OKUMURA, J. Control of postprandial hyperglycaemia by galactosyl maltobionolactone and its novel anti-amylase effect in mice. **Life Sciences.** 71:1405-1415. 2002

NAVAZESH, M. Methods for collecting saliva. **Annals of the New York Academy of Science**, Saliva as a diagnostic fluid. New York, v.694, p.216-233, Sept, 1993. Número Especial.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia.** 4^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RYAN, C. A. Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Phytopathology.** 28, 425-449. 1990.

RYAN, C. A.; PEARCE, G.. Systemin: A polypeptide signal for plant defensive genes. **Annual Review Cell Development Biological.** 14, 1-17.1998.

SILANO, V. Alpha-amylase inhibitors, in: J. Kruger, D. Lineback (Eds.). Enzymes and Their Role in Cereal Technology, **American Association of Cereal Chemists.** St. Paul, 141-199. 1987.

SOLOMON, M.; BELENGHI, B.; DELLEDONNE, M.; MENACHEN, E.; LEVINE, A. The involvement of cysteine protease and protease inhibitors genes in the regulation of programmed cell death in plants. **Plant Cell.** 11, 431-444. 1999.

WITAKER, J. R. Alpha-amylase inhibitor of higher plants and microorganisms. **American Oil Chemical Society.** Champaign. IL, 354-380. 1988.

