

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Caracterização fitoquímica e citotóxica das folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels e avaliação de suas capacidades antioxidantes e antiglicantes, bem como de seu potencial de inibição das enzimas digestivas relacionadas com o Diabetes mellitus tipo 2

Luiz Fernando Ribeiro Zabisky

Monografia apresentada à
Coordenação do Curso de
Biotecnologia da Universidade
Federal de Uberlândia, para a
obtenção do grau de Bacharel em
Biotecnologia

Uberlândia-MG
Dezembro-2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO BIOTECNOLOGIA

Caracterização fitoquímica e citotóxica das folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels e avaliação de suas capacidades antioxidantes e antiglicantes, bem como de seu potencial de inibição das enzimas digestivas relacionadas com o Diabetes mellitus tipo 2

Autor: Luiz Fernando Ribeiro Zabisky

Orientador: Foued Salmen Espindola
Co-orientador: Rodrigo Rodrigues Franco

Monografia apresentada à
Coordenação do Curso de
Biotecnologia da Universidade
Federal de Uberlândia, para a
obtenção do grau de Bacharel em
Biotecnologia

Uberlândia – MG
Dezembro – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO BIOTECNOLOGIA

Caracterização fitoquímica e citotóxica das folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels e avaliação de suas capacidades antioxidantes e antiglicantes, bem como de seu potencial de inibição das enzimas digestivas relacionadas com o Diabetes mellitus tipo 2

Autor: Luiz Fernando Ribeiro Zabisky

Orientador: Foued Salmen Espindola
Unidade acadêmica: Instituto de Biotecnologia
Co-orientador: Rodrigo Rodrigues Franco
Unidade acadêmica: Instituto de Biotecnologia

Homologado pela coordenação do Curso
de Biotecnologia em __/__/__

Coordenador do curso: Edgar Silveira Campos

Uberlândia- MG
Dezembro- 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO BIOTECNOLOGIA

Caracterização fitoquímica e citotóxica das folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels e avaliação de suas capacidades antioxidantes e antiglicantes, bem como de seu potencial de inibição das enzimas digestivas relacionadas com o Diabetes mellitus tipo 2

Autor: Luiz Fernando Ribeiro Zabisky

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / **Nota:** _____

Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

Uberlândia, de de

Resumo

O *Syzygium cumini* (L.) Skeels, também conhecido como Jambolão, é uma planta arbórea nativa da região tropical da Índia. A população que reside nas áreas de incidência desta planta faz amplo uso de diversas partes da mesma (casca, folhas, fruto, sementes) como fitoterápico, uma vez que é possível observar atividade antidiabética, antimicrobiana, anti-inflamatória e anti-hipertensiva. O alinhamento do conhecimento popular com os avanços das pesquisas permite a avaliação das propriedades de plantas com intuito de determinar seu potencial como fitoterápico. Sendo assim, o Jambolão se apresenta como candidato para o tratamento complementar de distúrbios de recorrência global como o Diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Desta forma foi realizado o fracionamento líquido-líquido para separação das frações e consequente realização de ensaios para determinação da capacidade antioxidante e antiglicante, bem como testes de elucidação do potencial inibitório das mesmas sobre as enzimas hidrolases glicolíticas e lipase pancreática. A determinação da citotoxicidade das frações da planta foi realizada pelo teste de hemólise e, por fim, a elucidação de seus compostos bioativos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas (CLAE-ESI-EM/EM) e a quantificação de determinadas classes de compostos foi realizada via prospecção fitoquímica. Os ensaios foram realizados em triplicata com diferentes concentrações das frações orgânicas das folhas de *S. cumini*. As frações Acetato de etila e N-butanol demonstraram valores interessantes de IC₅₀ (µg/mL) para grande parte dos testes, como exemplo têm-se a capacidade antioxidante pelo método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) (IC₅₀: Acetato de etila: 15,7±2,4; N-Butanol: 23,5±2,7), a inibição da α-amilase (IC₅₀: Acetato de etila: 1,1±0,3; N-Butanol: 0,7±0,1) e a inibição da glicação proteica pelo método de albumina sérica bovina e frutose (BSA/FRUT) (IC₅₀: Acetato de etila: 8,2±3,5; N-Butanol: 7,8±3,5). Desta forma a alta atividade antioxidante em conjunto com a inibição da formação de produtos de glicação avançada, a inibição das enzimas hidrolases glicolíticas e lipase pancreática e baixa taxa de hemólise potencializam a sugestão de que estas são as duas melhores frações para tratamento complementar do DM2. A análise de CLAE-ESI-EM/EM permitiu também a elucidação de compostos bioativos que podem ser responsáveis pelas ações observadas nas frações, tais como: Quercetina 3-O-β-D-glicosídeo, Quercetina-3-O-glicuronídeo, Cianidina-3-O-glicosídeo, Kaempferol 3-O-β-D-glicosídeo, Luteolina-3-O-glicuronídeo, Ácido Rosmarínico e (Epi) galocatequina-O-glicuronídeo. Portanto, os baixos valores de IC₅₀ para os ensaios previstos, a possibilidade de isolar compostos bioativos de alta relevância e a eficácia do *S. cumini* em múltiplos quadros do DM2, corroboram para perspectivas futuras de formulação de fármacos e suplementos alimentares com base nesta planta.

Palavras-chave: *Syzygium cumini*. Diabetes mellitus. Antioxidante. Hidrolases glicolíticas, Glicação.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1. Diabetes mellitus e estresse oxidativo	1
1.2. Enzimas α -amilase, α -glicosidase e lipase pancreática.....	2
1.3. Produtos finais da glicação avançada (AGEs)	3
1.4. Plantas medicinais e compostos bioativos	5
1.5. <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels.....	6
2. Objetivos	7
2.1. Objetivo geral	7
2.2. Objetivos específicos.....	7
3. Material e métodos	8
3.1. Obtenção do material vegetal	8
3.2. Particionamento e diluição dos extratos.....	8
3.3. Prospecção fitoquímica	9
3.3.1. Determinação de Flavonoides.....	10
3.3.2. Determinação de Taninos condensados (Proantocianidinas)	10
3.3.3. Determinação de Fenóis totais.....	11
3.4. Capacidade de absorção dos radicais de oxigênio (ORAC).....	11
3.5. Potencial antioxidante de redução do íon ferro (FRAP).....	12
3.6. Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)	13
3.7. Determinação da inibição da atividade das enzimas hidrolases glicosídicas e lipídica	14
3.7.1. Inibição da atividade da α -amilase	14
3.7.2 Inibição da atividade da α -glicosidase	15
3.8. Parâmetros cinéticos da α -amilase.....	16
3.9. Inibição da enzima lipase pancreática	16
3.10. Inibição da formação de produtos finais de glicação avançada (antiglicação)	16
3.10.1. Ensaio de antiglicação: Modelo BSA (Albumina Sérica Bovina) /Frutose.....	17
3.10.2. Ensaio de antiglicação: Modelo BSA/Metilglioxal.....	18
3.10.3. Ensaio de antiglicação: Modelo Arginina/ Metilglioxal	19
3.11. Citotoxicidade das partições do extrato etanólico de <i>S. cumini</i> pelo método de hemólise.....	21
3.12. Análise de compostos bioativos de <i>S. cumini</i> por CLAE-ESI-EM/EM	22
3.13. Análises estatísticas	23
4. Resultados	23
4.1. Rendimento do particionamento.....	23
4.3. Capacidade antioxidante	25
4.4. Determinação da inibição da atividade das enzimas α -amilase e α -glicosidase	28

4.5. Inibição da enzima lipase pancreática	31
4.6. Inibição da formação de produtos finais de glicação avançada (Antiglicação)	31
4.7. Citotoxicidade das partições do extrato etanólico de <i>S. cumini</i> pelo método de hemólise.	34
4.8. Análise de compostos bioativos de <i>S. cumini</i> por CLAE-ESI-EM/EM	35
5. Discussão	37
6. Conclusão	42
7. Referências	44

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Avaliação da capacidade antioxidante pelo método FRAP (Poder de redução do íon ferro). 26
- Figura 2.** Avaliação do potencial antioxidante das frações de *S. cumini* pelo método ORAC. 27
- Figura 3.** Avaliação do potencial antioxidante das frações de *S. cumini* pelo método de DPPH. 27
- Figura 4.** Avaliação da capacidade de inibição das frações de *S. cumini* sobre a enzima α -amilase. 29
- Figura 5.** Cinética enzimática da α -amilase 29
- Figura 6.** Avaliação da capacidade de inibição das frações de *S. cumini* sobre a enzima α -glicosidase. 30
- Figura 7.** Avaliação do potencial de inibição da enzima lipase pancreática pelas frações do extrato etanólico de *S. cumini*. 31
- Figura 8.** Avaliação do potencial antiglicante das partições orgânicas das folhas de *S. cumini* no método BSA/FRUT. 33
- Figura 9.** Avaliação do potencial antiglicante das partições orgânicas das folhas de *S. cumini* no método BSA/MET. 33
- Figura 10.** Avaliação do potencial antiglicante das partições orgânicas das folhas de *S. cumini* no método ARG/MET. 34
- Figura 11.** Capacidade hemolítica de diferentes concentrações das partições orgânicas das folhas de *S. cumini*. 35

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Rendimento do particionamento líquido-líquido das folhas de *S. cumini*. 23
- Tabela 2.** Determinação do conteúdo de Flavonoides, Fenóis totais e Proantocianidinas nas partições de *S. cumini*. 24
- Tabela 3.** Compostos propostos pela análise dos dados obtidos pelo procedimento CLAE-ESI-EM/EM (modo negativo) da fração Acetato de etila do extrato etanólico das folhas de *S. cumini*. 36
- Tabela 4.** Compostos propostos pela análise dos dados obtidos pelo procedimento CLAE-ESI-EM/EM (modo negativo) da fração N-butanol do extrato etanólico das folhas de *S. cumini*. 37

1. Introdução

1.1. Diabetes mellitus e estresse oxidativo

Os radicais livres são moléculas com um ou mais elétrons não ligados, possuem alta instabilidade, baixo tempo de meio vida e se caracterizam por apresentarem alta reatividade química (Bianchi e Antunes, 1999). O desequilíbrio entre a produção de radicais livres por meio de ações catalíticas enzimáticas e a defesa pelas moléculas antioxidantes resulta em danos celulares causados pelos radicais livres, este dano é conhecido como estresse oxidativo e é uma das complicações metabólicas frequentes no Diabetes mellitus tipo 2 (Bianchi e Antunes, 1999).

Diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é uma doença endócrina marcada por uma série de distúrbios metabólicos que resultam em hiperglicemia de jejum e alta glicemia pós-prandial (Almeida *et al.*, 2009). A DM2 é caracterizada pela resistência à insulina, que pode ser causada pela adiposidade central, associada à elevação dos níveis de triglicérides, decréscimo das concentrações de lipoproteína de alta densidade (HDL) e pressão arterial aumentada (Almeida *et al.*, 2009).

As células- β pancreáticas são afetadas pelo estresse oxidativo, fator este que age como modulador negativo para a produção de insulina, e pode culminar no agravamento do quadro do DM2 (Dornas *et al.*, 2009). As plantas medicinais podem ser facilmente incorporadas no cotidiano do indivíduo para serem utilizadas como inibidoras de hidrolases glicosídicas e lipídicas, relacionadas com a absorção de monossacarídeos e de ácidos graxos responsáveis pela hiperglicemia e hiperlipidemia pós-prandiais, além de fornecerem aporte antioxidante e antiglicante ao organismo e assim levar a uma melhora nas complicações relacionadas ao DM2 (Dornas *et al.*, 2009).

1.2. Enzimas α -amilase, α -glicosidase e lipase pancreática

A α -amilase é o produto principal das secreções pancreáticas e das glândulas salivares. Esta enzima pertence à família das glicosil hidrolases, que por sua vez são responsáveis por agir como catalisadoras da quebra de amido em oligossacarídeos, ação esta que reflete em aumento da glicemia pós-prandial, fator este que se correlaciona fortemente com o DM2 e torna esta enzima um dos alvos para que se amenize os efeitos desta desordem que afeta grande parte da população mundial (Zorzin, 2014).

A α -glicosidase é uma enzima que se encontra presente nas células do intestino delgado, liberada ao lúmen na forma de suco entérico, sendo responsável pela hidrólise da ligação glicosídica α -(1,4) de oligo e dissacarídeos, catalisando estas moléculas em monossacarídeos livres e absorvíveis (Silva, 2017).

As enzimas α -amilase e α -glicosidase se apresentam como as principais moduladoras da hidrólise de carboidratos e, portanto, uma estratégia de controle da hiperglicemia pós-prandial consiste na inibição destas enzimas (Zorzin, 2014), uma vez que retardaria a catálise de moléculas complexas em glicose e outros monossacarídeos, o que por sua vez permite a ligação gradativa de insulina em seu receptor, de forma que ocorre a sinalização para os transportadores de glicose tipo 4 (GLUT-4) presentes em vesículas intracelulares, que são translocados para a membrana plasmática e assim realizam a internalização da glicose. Tal processo resulta na diminuição do quadro de hiperglicemia sérica pós-prandial, sendo este capaz de agravar os efeitos do DM2 e da obesidade (Franco *et al.*, 2018).

As lipases são um grupo heterogêneo de proteínas que atuam nas ligações ésteres de triglicerídios, o que resulta na hidrólise destas moléculas e conseqüentemente na liberação de ácidos graxos e glicerol. A lipase pancreática é a enzima mais bem conhecida deste grupo, e é responsável pela absorção de lipídios, ela é sintetizada pelo pâncreas e é responsável pela

absorção de 50 a 70% da gordura total da dieta (Pereira, 2016). Tendo em vista a ação desta enzima, sua inibição pode vir a ser uma forma de reduzir o ganho de massa, uma vez que isto iria reduzir a absorção do produto da quebra dos triglicerídios (ácidos graxos e glicerol), esta ação se faria válida para evitar a obesidade que é tão frequente em indivíduos com DM2 (De Souza *et al.*, 2012).

Assim, o controle calórico e sequencialmente da obesidade, poderiam possibilitar uma melhora no quadro de resistência à insulina, possibilitando sua ligação aos seus receptores, o que culminaria na sinalização para a captura de glicose pelos transportadores de glicose tipo 4 (GLUT-4) (Zorzin, 2014). Compostos bioativos presentes em plantas, como flavonoides e taninos tem sido amplamente estudados para a inibição destas enzimas e consequentemente redução dos efeitos negativos provocados pelo DM2 (Zorzin, 2014).

1.3. Produtos finais da glicação avançada (AGEs)

Os produtos finais da glicação avançada são formados por interações amino carbonilo não enzimáticas entre açúcares redutores ou lipídeos oxidados e proteínas (Barbosa *et al.*, 2008). Esse processo é caracterizado pela oxidação de lipídeos ou de açúcares, produzindo compostos dicarbonílicos intermediários de alta reatividade, como por exemplo a produção de Metilglioxal pela glicólise seguida de ligação deste produto aos aminoácidos arginina e lisina (Barbosa *et al.*, 2008).

Uma das mais importantes consequências da hiperglicemia crônica que reflete em danos celulares consiste na formação de AGEs, estes exercem efeitos patológicos no organismo via modificação química e funcional de diversas estruturas biológicas (Rocha *et al.*, 2006). A alteração é feita por geração de radicais livres, ligações cruzadas com proteínas e ainda via interação com receptores celulares (Rocha *et al.*, 2006). As ações dos AGEs culminam em aumento de proliferação dos mediadores inflamatórios e provocam o estresse oxidativo. A

síntese dos produtos finais da glicação avançada tem um fator que se apresenta como agravante adicional, que é a produção de EROs e consequente aumento do estresse oxidativo (Barbosa *et al.*, 2016).

As complicações que os AGEs causam em portadores de Diabetes mellitus tipo 1 e 2 são divididas em microangiopatias e macroangiopatias (Almeida *et al.*, 1999). As microangiopatias diabéticas consistem na danificação do endotélio e de células associadas via hiperglicemia (Corrêa-Giannella e Vieira, 2008). As células afetadas pela hiperglicemia são principalmente as endoteliais dos capilares da retina (implica no desenvolvimento de cegueira), as células mesangiais do glomérulo renal (fator agravante que pode levar à falência renal), os neurônios e as células de Schwann nos nervos periféricos (culmina no surgimento de defeitos nas respostas vasomotoras) (Barbosa *et al.*, 2008). As macroangiopatias diabéticas consistem nas complicações cardiovasculares causadas pelo Diabetes mellitus, os AGEs podem se ligar de forma cruzada com proteínas da matriz plasmática, agindo como moduladores negativos do óxido nítrico e das prostaciclina, que são dois importantes fatores para relaxamento vascular, ocorre ainda a produção de endotelina-1 pelas células endoteliais, que é um potente vasoconstritor (Barbosa *et al.*, 2008).

Compostos bioativos de plantas se apresentam como grandes agentes reguladores da hiperglicemia, podem também controlar a formação de AGEs (Rocha *et al.*, 2006). Estas moléculas vegetais agem por meio de vários mecanismos, como exemplo têm-se as fibras hidrossolúveis como a pectina, que apresentam relação com o aumento da viscosidade do conteúdo gastrointestinal, o que resulta em diminuição da velocidade de esvaziamento do mesmo e consequentemente retarda a absorção de carboidratos, de forma a retardar o acúmulo de açúcares redutores responsáveis pelos processos glicantes (Rocha *et al.*, 2006).

Os flavonoides constituem-se como um grupo de compostos bioativos amplamente conhecido por suas atividades medicinais, como exemplo pode-se citar a ação destas

moléculas como agentes inibidores da formação de produtos de glicação avançada (Wu e Yen, 2005). Os flavonoides agem principalmente por evitar oxidação de produtos de Amadori e sequestro de radicais livres, o que de certa forma auxilia na diminuição da formação dos produtos de glicação avançada (Wu e Yen, 2005).

1.4. Plantas medicinais e compostos bioativos

O uso das plantas medicinais como agentes terapêuticos remonta os primórdios da espécie humana, cujo conhecimento foi passado de geração em geração no decorrer da história (Maciel *et al.*, 2002). O Brasil é considerado o país com a maior biodiversidade do mundo, com estimativa de mais de 49 mil espécies de plantas descritas (Peixoto e Morim, 2003), o que evidencia o potencial da flora brasileira ainda não estudada frente a vários segmentos, tais como o farmacêutico e o alimentício.

As plantas possuem moléculas chamadas metabólitos secundários, consideradas não essenciais para a sua sobrevivência, mas que são importantes para sua plena adaptação ao habitat, podendo atribuir proteção contra patógenos, combater herbivoria, dentre outras (Reichling, 2018). Os metabólitos secundários podem ser divididos em três grandes grupos que variam com relação as suas rotas biossintéticas: Terpenoides, alcaloides e polifenóis (Croteau *et al.*, 2000).

Os flavonoides são os principais representantes dos compostos fenólicos, tais metabólitos possuem papel antioxidante, que por sua vez possui grande importância para inibir ou diminuir oxidações no organismo por meio de sequestro de radicais formados por espécies reativas de Oxigênio (EROs) através da doação de hidrogênios ou de elétrons (Alves *et al.*, 2007). Os flavonoides podem ainda inibir enzimas responsáveis pela geração de EROs e promover a estabilização dos radicais livres formados pela quelatação de metais (Alves *et al.*, 2007). Graças ao potencial terapêutico dos metabólitos secundários, aliado a descobertas

crecentes de novas moléculas em conjunto com a tendência crescente de se utilizar fitoterápicos (Ketylin *et al.*, 2006).

1.5. *Syzygium cumini* (L.) Skeels

O *Syzygium cumini* (L.) Skeels, conhecido como Jambolão, é uma árvore da família Myrtaceae nativa da região tropical da Índia, no continente asiático (Faria *et al.*, 2011). A medicina popular indiana faz uso de todas as partes da planta (casca, fruto, folhas) como fitoterápico, este é utilizado para uma grande gama de finalidades, tais como: antidiabético, antimicrobiano, anti-inflamatório, diurético e anti-hipertensivo (Migliato *et al.*, 2007). As propriedades terapêuticas do Jambolão, com destaque da capacidade antidiabética foram os principais fatores que culminaram na introdução desta medicina oriental nos países ocidentais (Nahid *et al.*, 2017). O Brasil foi um dos países do ocidente que introduziram o *Syzygium cumini* (L.) Skeels em seu território, a árvore se adaptou bem às condições climáticas brasileiras e ao solo (Lago *et al.*, 2006).

As partes (folhas, flores, casca, frutos) do *Syzygium cumini* (L.) Skeels são fontes potenciais de compostos bioativos como flavonoides, antocianinas e terpenos (Swami *et al.*, 2012), como destaque têm-se as folhas, estas são detentoras de biocompostos tais como: ácido gálico, metilgalato, canferol, miricetina, ácido elágico, ácido clorogênico, quercetina e nilocitina (Ketylin *et al.*, 2006). Essas e outras biomoléculas conferem propriedades fitoterápicas à planta, o que a torna um potencial alvo de estudos para elucidação e prospecção de novos compostos bioativos para tratamento de desordens como o DM2.

Com a crescente aplicação dos fitoterápicos como tratamentos complementares, há necessidade de se avaliar a constituição fitoquímica, para se mensurar a atividade de plantas potenciais como o Jambolão e o modo que estas agem sobre as doenças alvo.

As propriedades descritas na literatura e em trabalho anteriormente publicado pelo nosso grupo de pesquisa (Franco *et al.*, 2018) acerca do *S. cumini* motivaram a seleção desta planta como alvo da pesquisa a ser realizada.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo fracionar as folhas do Jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) 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 das folhas do Jambolão por meio de partição líquido-líquido, com uso de solventes de polaridade crescente;
- Determinar o teor de fenóis totais, flavonoides e proantocianidinas das partições orgânicas do extrato bruto etanólico de *S. cumini*;
- Avaliar a capacidade antioxidante das partições orgânicas do extrato bruto pelos métodos 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 lipase, α -amilase e α -glicosidase das partições orgânicas do extrato bruto;
- Avaliar a atividade antiglicante das partições orgânicas do extrato bruto etanólico pelos métodos BSA (albumina sérica bovina) /Frutose, BSA /Metilglioxal e Arginina /Metilglioxal;
- Determinar a citotoxicidade das partições orgânicas do extrato bruto pelo método de hemólise;

- Identificar os principais compostos bioativos presentes nas partições que demonstrarem resultados promissores quanto à capacidade antioxidante, antiglicante, de inibição da lipase e das hidrolases glicosídicas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas (CLAE-ESI-EM/EM).

3. Material e métodos

3.1. Obtenção do material vegetal

As folhas de jambolão foram compradas da empresa Santos Flora Comércio de Ervas Ltda. (Mariporã, São Paulo, Brasil), a mesma é devidamente registrada na ANVISA e Conselho Regional de Farmácia. Foi avaliada a apresentação do controle de qualidade do material adquirido, com certificado de origem e identificação por meio de características organolépticas, macroscópicas e microscópicas, bem como pela análise de marcadores fitoquímicos.

3.2. Particionamento e diluição dos extratos

O extrato bruto foi obtido a partir da maceração estática das folhas de *S. cumini*, onde o material foi imergido em solvente etanólico com proporção de 1:5 m/v (massa por volume) por um tempo aproximado de seis dias. Após esse período, a solução com os extrativos foi filtrada e o solvente removido com uso do rotaevaporador, este operou sobre pressão reduzida a 40° C.

O resíduo do material vegetal foi submetido a duas macerações, utilizando-se o solvente recuperado na rotaevaporação. O extrato foi congelado e posteriormente liofilizado para a remoção da água livre, após este procedimento a amostra foi diluída a uma razão de 1:9 (20 mL de água e 180 mL de metanol). Por fim, homogeneizou-se a diluição do metanol com o extrato bruto e, com o papel filtro dentro de um funil, filtrou-se o homogeneizado para o

interior do funil de bromo. A massa remanescente no papel filtro foi descontada, para isto secou-se o filtro e aferiu-se a massa do mesmo em balança analítica. No filtrado já dentro do funil de bromo adicionou-se 200 mL do primeiro solvente, após esta adição, a solução foi levemente agitada e a válvula aberta para eliminação da pressão interna, feito isto, a solução foi posta em repouso, de forma que a mesma se separou em uma solução bifásica, a divisão das fases permitiu isolar a parte fracionada pelo solvente.

O procedimento de extração foi realizado três vezes com 200 mL de cada solvente. Somente após término das 3 extrações via primeiro solvente se fez uso do segundo, e assim por diante até o último. A ordem dos solventes utilizados foi: hexano, diclorometano, acetato de etila e N-butanol. Ao final do processo uma fração residual foi observada, a mesma possui denominação de fração água residual. Cada fração separada por funil de bromo foi depositada em placas de petri e alocadas em capela com exaustão para secagem das mesmas.

Realizado o processo de secagem houve a raspagem do material seco das placas para se retirar o extrativo e, assim submeter o mesmo à liofilização para a eliminação da água livre contida na amostra. Concluída a liofilização os extratos foram diluídos a 10 mg/mL em solução de etanol para realização dos ensaios propostos pelo trabalho (Franco *et al.*, 2018).

3.3. Prospecção fitoquímica

Para a determinação das concentrações totais de polifenóis, flavonoides e taninos condensados nas frações de *S. cumini*, foi utilizado como base o método de (Zou *et al.*, 2011) em microplacas de 96 poços. Os extratos/partições foram diluídos em etanol na concentração de 10 mg/mL. Todas as análises futuras foram conduzidas em triplicata.

3.3.1. Determinação de Flavonoides

Adicionou-se 30 µL do extrato em triplicata para cada fração em uma placa de 96 poços, acrescentou-se 180 µL de água milli-Q e 10 µL de solução de 5% de NaNO₂ em todos os poços e foi incubada por 6 minutos à 25° C. Adicionou-se 20 µL de AlCl₃ a 10% a solução foi posta em repouso por 6 minutos, posteriormente houve adição de 60 µL de solução a 4% de NaOH à mistura e incubação durante 15 minutos. A curva padrão foi elaborada para a análise dos dados com uso de quercetina (QE) nas concentrações de 7,81, 15,625, 31,25, 62,5, 125, 250, 500, 1000 µg/mL. Tanto a curva padrão quanto o branco (medida negativa, onde utiliza-se água ou metanol) foram adicionados em proporções equivalentes à dos extratos nos poços (30 µL). A placa foi lida em espectrofotômetro no comprimento de 510 nm, onde o valor do branco foi descontado das amostras posteriormente. Tais medidas foram expressas como miligramas de equivalente de quercetina por grama de material vegetal (mg QE/g) (Zou *et al.*, 2011).

3.3.2. Determinação de Taninos condensados (Proantocianidinas)

Adicionou-se 10 µL do extrato em triplicata para cada fração em uma placa de 96 poços, posteriormente acrescentou-se 200 µL de solução de 4% de vanilina em metanol em todos os poços com pipeta multicanal, por fim foi realizada uma incubação por 15 minutos à 25° C. A curva padrão foi preparada para análise dos dados com uso de catequina (CE) nas concentrações de 7,81, 15,625, 31,25, 62,5, 125, 250, 500, 1000 µg/mL. Tanto a curva padrão quanto o branco (medida negativa, utiliza-se água ou metanol) foram adicionados em proporções equivalentes às de extrato nos poços (10 µL). A placa passou por leitura em espectrofotômetro no comprimento de 500 nm, onde o branco foi descontado das amostras posteriormente. Tais medidas foram expressas em miligramas de equivalente de catequina por grama de material vegetal (mg CE/g) (Zou *et al.*, 2011).

3.3.3. Determinação de Fenóis totais

Adicionou-se 5 μL do extrato em triplicata para cada fração em uma placa de 96 poços, acrescentou-se 195 μL de água milli-Q e 25 μL de reagente Folin-Ciocalteu em todos os poços e foi realizada incubação por 6 minutos à 25° C. Adicionou-se 75 μL de Na_2CO_3 a 7% e foi realizada incubação por duas horas no escuro à 25° C. A curva padrão para análise dos dados foi elaborada com uso de ácido gálico (GAE) nas concentrações de 7,81, 15,625, 31,25, 62,5, 125, 250, 500, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Tanto a curva padrão quanto o branco (medida negativa, utiliza-se água ou metanol) foram adicionados em proporções equivalentes às de extrato nos poços (5 μL). A placa foi submetida a leitura em espectrofotômetro no comprimento de 765 nm, onde o branco foi descontado das amostras posteriormente. Tais medidas foram expressas em miligramas de equivalente de ácido gálico por grama de material vegetal (mg GAE/g) (Zou *et al.*, 2011).

3.4. Capacidade de absorção dos radicais de oxigênio (ORAC)

O teste mede a degradação oxidativa da molécula fluorescente (fluoresceína) após ser misturada com radicais livres, tais como compostos azoiniciador. Azo-iniciadores (Azobis) são utilizados para produzir o radical peroxil por aquecimento, o que degrada a molécula fluorescente, e resulta na perda de fluorescência (Prior *et al.*, 2003).

A princípio houve preparação do tampão ORAC a 75 mM em pH 7,4 e do radical Azobis a 153 mM. A curva padrão foi realizada com Trolox (0,0125g de Trolox em 5 mL de tampão ORAC) e diluiu-se serialmente para as concentrações de 7,81, 15,625, 31,25, 62,5, 125, 250 e 500 μM . Preparou-se fluoresceína em tampão ORAC pesando 0,016 g de fluoresceína diluídos em 100 mL do tampão, esta solução foi diluída em tampão a uma proporção de 1:99.

1 mL da segunda solução foi diluído em 50 mL de tampão, chegando a uma concentração de $8,5 \times 10^{-5}$ mM de fluoresceína.

Em uma microplaca preta de 96 poços pipetou-se 25 μ L do extrato em triplicata, no caso da curva foi pipetada a mesma quantidade das concentrações em triplicata e ainda se acrescentou na mesma proporção tampão ORAC em triplicata na microplaca, este será o valor do branco que foi descontado em análise posterior dos dados. Adicionou-se a todos os poços 150 μ L da solução de fluoresceína à concentração de $8,5 \times 10^{-5}$ mM e momentos antes da leitura acrescentou-se 30 μ L da solução de Azobis. O espectrofluorímetro foi utilizado para análise da fluorescência, com excitação a 485 nm e emissão a 528 nm, em temperatura de 37 °C durante 90 minutos. O controle positivo para atividade antioxidante utilizado foi o Ácido ascórbico.

3.5. Potencial antioxidante de redução do íon ferro (FRAP)

Os antioxidantes presentes na amostra reduzirão Fe^{3+} a Fe^{2+} , o qual será quelado pela 2,4,6-tri (2 piridil)-s-triazina (TPTZ) para formação do complexo Fe^{2+} - TPTZ, de coloração azul, que teve a absorção lida a 593 nm (Benzie e Strain, 1996).

O primeiro passo foi a confecção do tampão de acetato de sódio à 0,3 M e pH 3,6. Em seguida uma solução de HCl à 40 mM, esta foi utilizada no preparo da solução de TPTZ à 10 mM, que por sua vez foi armazenada em frasco âmbar e em refrigeração. O íon de ferro (Fe^{3+}) foi utilizado à concentração de 0,5%.

Utilizando-se das soluções de TPTZ e da solução de cloreto férrico, juntamente com o tampão de acetato de sódio, preparou-se o tampão FRAP, na seguinte proporção: 10 partes de tampão de acetato de sódio para 1 parte de cada solução, 1 parte de solução TPTZ e 1 parte de solução de cloreto férrico. A curva padrão foi realizada com Trolox (0,0125g de Trolox em 5 mL de tampão FRAP) e diluída serialmente para as concentrações de 10, 20, 40, 60, 80, 100,

150 e 200 µM. O controle positivo foi confeccionado com preparação de soluções de ácido ascórbico nas mesmas concentrações das frações.

A reação foi realizada em microplaca de 96 poços adicionando-se 10 µL da amostra ou uma das diluições da curva Trolox, com adição de 25 µL de água destilada e 250 µL tampão FRAP. Após realização dos passos previamente citados, incubou-se a microplaca por 6 minutos a uma temperatura de 37°C e, por fim, realizou-se leitura da placa no espectrofotômetro em 593 nm.

3.6. Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

O método se baseou na doação de um elétron ou hidrogênio da amostra para o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila, quando a amostra se mostrou capaz de reduzir o radical, é possível observar a reação que ocorre numa absorvância de 517 nm lida no espectrofotômetro (Yıldırım *et al.*, 2001).

O preparo da solução de DPPH (0,06 mM) foi o primeiro passo para realização do método, uma vez que a concentração do DPPH foi devidamente corrigida iniciou-se o processo em microplaca, com adição de solução amostra-DPPH a razão de 1:3, esta foi incubada por 30 minutos a uma temperatura de 30°C, em ausência de luz, uma vez que o agente DPPH é fotossensível. Ao fim da incubação, foi realizada a leitura da placa no comprimento de 517 nm. Para obtenção dos valores de branco outra microplaca foi usada, nesta foram adicionados 50 µL das amostras testadas com adição de 200 µL de metanol em cada poço.

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

Onde: CA corresponde à capacidade antioxidante, Abs controle é a absorvância inicial da solução metanólica de DPPH, Abs amostra é a absorvância da mistura (DPPH + amostra), Abs branco é a absorvância da amostra em metanol.

3.7. Determinação da inibição da atividade das enzimas hidrolases glicosídicas e lipídica

3.7.1. Inibição da atividade da α -amilase

As partições orgânicas das folhas do Jambolão foram analisadas quanto à sua capacidade de inibição sobre a enzima α -amilase pelo método GALC2CNP modificado, onde foram necessários o substrato α -(2-cloro-4-nitrofenil)- β -1,4-galactopiranosilmaltosídeo (GAL-G2- α -CNP) e a fração de saliva enriquecida de enzima α -amilase (Justino *et al.*, 2018). O preparo da amostra de saliva ocorreu via método de salivagem, onde o indivíduo voluntário salivou e posteriormente depositou a saliva em um recipiente que foi armazenado a -20 °C. A saliva foi descongelada e centrifugada a 12000 xg por 10 minutos a 20 °C. O sobrenadante passou por fracionamento em uma coluna de Q-Sepharose, com uso de tampão contendo 50 mmol.L⁻¹ de Tris-HCL (pH 8,0), 10 mmol.L⁻¹ de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e 10 mmol.L⁻¹ de EGTA (ácido etilenoglicol tetra-acético). 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).

As partições de extrato orgânicas foram incubadas com a fração enriquecida de α -amilase (proporção 1:10) por 30 minutos a 37 °C. A reação se iniciou com a adição de 320 μ L do substrato GAL-G2- α -CNP (12 mmol.L⁻¹), as absorbâncias foram medidas a 405 nm, durante 3 minutos com intervalos de 1 minuto, a 37 °C. O controle positivo utilizado consistiu em Acarbose, esta foi diluída nas concentrações das frações. O ensaio foi realizado em triplicata e o resultado expresso em porcentagem de inibição da α -amilase, este foi calculado pela Equação 3. As equações 2 e 3 determinaram a atividade da enzima em U.mL⁻¹ e porcentagem respectivamente (Justino *et al.*, 2018).

$$\text{Atividade de } \alpha \text{ - amilase (U /mL)} = [(\delta \text{Abs /minuto}) \cdot V_f \cdot F_d] / \xi \cdot V_s \cdot I \quad \text{Equação 2}$$

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

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

Onde: $\delta\text{Abs /minuto}$ significa a diferença das absorbâncias por minuto ($\text{Abs}_3 - \text{Abs}_1/2$); ($\text{Abs} = \text{Absorbância}$); V_f é o volume total da reação ($328\mu\text{L}$); V_s é o volume de amostra de fração de extrato somado com a enzima α -amilase que corresponde a $8\mu\text{L}$; F_d é o fator de diluição da saliva (50); ξ é o coeficiente de absorvidade do 2-cloro-p-nitrofenol; I consiste no comprimento d percurso da luz (0,97); “A controle” é a atividade da α -amilase e “A amostra” é a atividade da α -amilase na presença das partições orgânicas do extrato bruto.

As análises foram realizadas em triplicatas com diferentes concentrações de extrato, afim de determinar a concentração de amostra que atingiu um grau de 50% de inibição da enzima (IC_{50}). A equação 3 consiste em mensurar a taxa de inibição da enzima α -amilase realizando a subtração da atividade normal da enzima (100%) pela atividade em condições de teste (os dados foram apresentados em porcentagem).

3.7.2 Inibição da atividade da α -glicosidase

O ensaio de inibição da enzima α -glicosidase foi realizado com uso de fração enriquecida da mesma, esta foi obtida com solubilização de pó cetônico de intestino de rato em tampão fosfato de potássio a uma razão de 1:30, seguido de centrifugação a $12000\times g$ por 30 minutos, o sobrenadante foi isolado após centrifugação. Foram extraídos $75\mu\text{L}$ de enzima do sobrenadante, e adicionados $30\mu\text{L}$ de Glutathione reduzida (GSH), por fim $15\mu\text{L}$ de inibidor. A solução contendo a enzima, GSH e amostra foi incubada a 37°C por vinte minutos, posteriormente separou-se a placa de 96 poços e adicionou-se $50\mu\text{L}$ da solução e $220\mu\text{L}$ de substrato (Substrato p-nitrofenil-alfa-D-glicopiranosídeo a 4 mM). O ensaio cinético foi conduzido a 405 nm durante 30 minutos, com intervalos de leitura a cada 5 minutos (Justino *et al.*, 2018).

$$\text{Inibição da } \alpha \text{ - glicosidase} = ((\text{ASC Controle} - \text{ASC amostra}) / \text{ASC controle}) . 100 \quad \text{Equação 5}$$

Onde: ASC controle é a área sob a curva na ausência da fração, e ASC amostra é a área sob a curva na presença da fração.

3.8. Parâmetros cinéticos da α -amilase

A elucidação do tipo de inibição das frações de *S. cumini* sobre a enzimas α -amilase ocorreu com uso de concentrações crescentes de GAL-G2- α -CNP. O substrato da enzima foi exposto a concentrações diferentes das frações acetato de etila, N-butanol e uma amostra sem inibidor. A absorbância foi lida a 405 nm. De acordo com a cinética de Michaelis-Menten e com uso da análise do duplo-recíproco, os parâmetros cinéticos foram observados e por fim o tipo de inibição das frações sobre a mesma foi determinado (Justino *et al.*, 2018).

3.9. Inibição da enzima lipase pancreática

O ensaio teve como materiais necessários, o tampão Tris-HCl 0,05 mol/L, que contem CaCl₂ 0,01 mol/L e NaCl 0,025 mol/L (pH 8), o substrato 4-nitrofenil palmitato a 0,8 mmol.L⁻¹ e enzima lipase pancreática porcina em concentração 10 mg.mL⁻¹. A enzima foi centrifugada em 2000xg por 3 minutos. O controle positivo foi confeccionado com uso de Orlistate, que foi diluído em DMSO (Dimetilsulfóxido) nas mesmas concentrações das frações. O procedimento ocorreu com a adição de 100 μ L da enzima e 50 μ L do inibidor e, posterior incubação por 10 minutos a 37°C, em poço separado adicionou-se 100 μ L da enzima e 50 μ L de tampão (controle negativo), por fim adicionou-se 50 μ L de substrato e realizou-se a leitura durante 30 minutos a 25°C a 410 nm (Justino *et al.*, 2018).

$$\text{Inibição da lipase} = ((ASC \text{ Controle} - ASC \text{ amostra}) / ASC \text{ controle}) . 100 \quad \text{Equação 6}$$

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

3.10. Inibição da formação de produtos finais de glicação avançada (antiglicação)

3.10.1. Ensaio de antiglicação: Modelo BSA (Albumina Sérica Bovina) /Frutose

O ensaio contou com quatro tipos de preparações em microtubos distintos, sendo: Preparação 1, a que apresentava como constituintes 450 µL de tampão fosfato 200 mM a pH 7,4 (adicionado de 0,02% de azida), 150 µL de BSA a concentração de 50 mg/mL em tampão fosfato, 150 µL de frutose 1,25 M em tampão fosfato e 50 µL do agente antiglicante, que são os extratos particionados das folhas de *S. cumini*. Preparação 2, representou o controle positivo, onde não houve glicação, este continha 450 µL de tampão fosfato 200 mM a pH 7,4 (adicionado de 0,02% de azida), 150 µL de BSA a concentração de 50 mg/mL em tampão fosfato, 150 µL de frutose 1,25 M em tampão fosfato e 50 µL de quercetina (inicialmente a 10 mg/mL e diluída serialmente mais seis vezes).

Preparação 3, nesta amostra houve glicação, sendo assim considerada o controle negativo, seu conteúdo foi de 450 µL de tampão fosfato 200 mM a pH 7,4 (adicionado de 0,02% de azida), 150 µL de BSA a concentração de 50 mg/mL em tampão fosfato, 150 µL de frutose 1,25 M em tampão fosfato e 50 µL de água. Preparação 4, foi a denominada tubo branco, onde não se adicionou frutose e agentes antiglicantes, esta preparação continha 450 µL de tampão fosfato 200 mM a pH 7,4 (adicionado de 0,02% de azida), 150 µL de BSA a concentração de 50 mg/mL em tampão fosfato, 150 µL de tampão fosfato 200 mM a pH 7,4 (adicionado de 0,02% de azida) e 50 µL de água.

O ensaio possuiu como segmento incubação por 3 dias em condições de privação de luz a 37°C, após esta etapa foram adicionados 800 µL de ácido tricloroacético 20%, posteriormente centrifugou-se os tubos a 10000xg por 10 minutos e descartou-se o sobrenadante para que o pellet fosse ressuspendido em 800 µL de tampão fosfato. Foram pipetados 300 µL da solução em placa de 96 poços preta, tampão fosfato foi pipetado em alguns poços para que fosse efetuada a subtração dos valores de leitura destes sobre as amostras. A leitura foi realizada no

comprimento de onda de excitação (350 nanômetros) e de emissão (420 nanômetros). A porcentagem de inibição foi calculada da seguinte forma (Justino *et al.*, 2018):

$$IG (\%) = 100 - ((IF amostra - IF branco) / (IF controle - IF branco).100) \text{ Equação 7}$$

Sendo: IG (%) a porcentagem de inibição da glicação, 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.

3.10.2. Ensaio de antiglicação: Modelo BSA/Metilglioxal

O ensaio contou com quatro tipos de preparações em microtubos distintos, sendo: Preparação 1, aquela onde as partições de interesse foram inseridas para determinação da atividade antiglicante, logo, apresentavam como composição 450 µL de tampão fosfato 200 mM pH 7,4 (adicionado de 0,02% de azida), 150 µL de BSA à concentração de 50 mg/mL em tampão fosfato, 150 µL de Metilglioxal 53,3 mM em tampão fosfato e 50 µL das partições das folhas de *S. cumini*. Preparação 2, é a que não houve glicação, logo, foi tida como controle positivo para antiglicação, esta continha 450 µL de tampão fosfato 200 mM pH 7,4 (adicionado de 0,02% de azida), 150 µL de BSA à concentração de 50 mg/mL em tampão fosfato, 150 µL de Metilglioxal 53,3 mM em tampão fosfato e 50 µL de quercetina (inicialmente a 10 mg/mL e diluída serialmente mais seis vezes).

Preparação 3, tubo controle negativo, onde se observou glicação, este apresentou como composição 450 µL de tampão fosfato 200 mM pH 7,4 (adicionado de 0,02% de azida), 150 µL de BSA à concentração de 50 mg/mL em tampão fosfato, 150 µL de Metilglioxal 53,3 mM

em tampão fosfato e 50 µL de água. Preparação 4, consiste no tubo branco, onde não havia presença de metilglioxal e de agente antiglicação, este continha 450 µL de tampão fosfato 200 mM pH 7,4 (adicionado de 0,02% de azida), 150 µL de BSA à concentração de 50 mg/mL em tampão fosfato, 150 µL de tampão fosfato 200 mM pH 7,4 (adicionado de 0,02% de azida) e 50 µL de água.

O procedimento apresentou como segmento, incubação por 3 dias no escuro a 37°C, após esta etapa foram adicionados 800 µL de ácido tricloroacético 20%, posteriormente realizou-se centrifugação dos tubos a 10000xg por 10 minutos, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet em 800 µL de tampão fosfato, foram pipetados 300 µL de amostra na microplaca preta de 96 poços, foi pipetado somente tampão fosfato em alguns poços para que estes tivessem seus valores descontados das demais amostras. A leitura foi realizada em comprimento de onda de excitação (340 nm) e de emissão (380 nm). A porcentagem de inibição foi calculada pela seguinte equação (Justino *et al.*, 2018):

$$IG (\%) = 100 - \left(\frac{(IF \text{ amostra} - IF \text{ branco})}{(IF \text{ controle} - IF \text{ branco})} \cdot 100 \right) \text{Equação 8}$$

Sendo: IG (%) a porcentagem de inibição da glicação, 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.

3.10.3. Ensaio de antiglicação: Modelo Arginina/ Metilglioxal

O ensaio contou com quatro tipos de preparações em microtubos distintos, sendo: Preparação 1, aquelas onde as partições de interesse foram inseridas para determinação da atividade antiglicante, logo, possuíam como composição 450 µL de tampão fosfato 200 mM pH 7,4 (adicionado de 0,02% de azida), 150 µL de Arginina 106,6 mM em tampão fosfato,

150 µL de Metilglioxal 53,3 mM em tampão fosfato e 50 µL das partições das folhas de *S. cumini*. Preparação 2, é a que não houve glicação, logo, foi considerada controle positivo para antiglicação, esta continha 450 µL de tampão fosfato 200 mM pH 7,4 (adicionado de 0,02% de azida), 150 µL de Arginina 106,6 mM em tampão fosfato, 150 µL de Metilglioxal 53,3 mM em tampão fosfato e 50 µL de quercetina (inicialmente a 10 mg/mL e diluída serialmente mais seis vezes).

Preparação 3, foi tida como controle negativo, onde ocorreu glicação, esta apresentou como composição 450 µL de tampão fosfato 200 mM pH 7,4 (adicionado de 0,02% de azida), 150 µL de Arginina 106,6 mM em tampão fosfato, 150 µL de Metilglioxal 53,3 mM em tampão fosfato e 50 µL de água. Preparação 4, que consistia no tubo branco, onde não havia presença de metilglioxal e de agente antiglicante, esta continha 450 µL de tampão fosfato 200 mM pH 7,4 (adicionado de 0,02% de azida), 150 µL de Arginina 106,6 mM em tampão fosfato, 150 µL de tampão fosfato 200 mM pH 7,4 (adicionado de 0,02% de azida) e 50 µL de água.

O procedimento teve como segmento a incubação, que se seguiu por 3 dias no escuro a 37°C, posteriormente 300 µL de amostra foram pipetados na microplaca preta de 96 poços, a inserção de tampão fosfato em alguns poços se fez necessária para que estes tenham seus valores descontados das demais amostras. A leitura foi realizada em comprimento de onda de excitação (340 nm) e de emissão (380 nm). A porcentagem de inibição foi calculada pela seguinte equação (Justino *et al.*, 2018):

$$IG (\%) = 100 - ((IF amostra - IF branco) / (IF controle - IF branco).100) \text{ Equação 9}$$

Sendo: IG (%) a porcentagem de inibição da glicação, 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. Citotoxicidade das partições do extrato etanólico de *S. cumini* pelo método de hemólise

O ensaio de hemólise teve como base o estudo de (Evans *et al.*, 2013). Para que fosse possível a avaliação da capacidade hemolítica, as partições do extrato etanólico bruto das folhas de *S. cumini* e a saponina *Quillaja sp.* (controle positivo Sigma para hemólise) foram diluídas serialmente em etanol para que fosse possível a obtenção das seguintes concentrações de extratos: 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,67 µg/mL. A princípio foram avaliadas as amostras de concentração 500, 250 e 125 µg/mL. Para que o experimento prosseguisse, a retirada de 1 mL de sangue de rato Wistar macho devidamente sedado se fez necessária, isto ocorreu por meio de tubo revestido com K2-EDTA (parecer do comitê de ética no. 015/17).

Após remoção o sangue foi centrifugado a 500xg durante 5 minutos, para que assim fosse possível destacar o plasma (sobrenadante). Foi realizado ressuspensamento das células em tampão fosfato de sódio (PBS) com pH 7,4. A solução passou por centrifugação a 500xg durante 5 minutos, após este procedimento o sobrenadante foi descartado, este processo foi repetido 3 vezes, para que fosse possível lavar as células. Posteriormente, o sobrenadante foi removido ao final da lavagem e substituído por PBS enriquecido com glicose (10mmol /L) para obtenção da solução rica em eritrócitos (SRE).

Um tubo de 10 mL foi destacado para que houvesse a inserção de 9800µL de PBS e 200µL de SRE (diluição 1:50) para obtenção da solução diluída de eritrócitos (SDE). O ensaio teve início com a adição de 10µL de amostra (partições do *S. cumini*) e 190µL de SDE em placa de 96 poços com fundo em V. A placa foi incubada por uma hora a 37°C. A etapa seguinte consistiu na centrifugação a 500xg por 5 minutos para que os eritrócitos fossem sedimentados intactos. Houve a transferência de 100µL do sobrenadante de cada poço para

novos poços de uma placa de 96 poços de fundo plano, para que assim a realização do ensaio fosse possível.

As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro a 405 nm. Para a confecção da amostra branco, foram utilizados 10 µL de solução de triton (10%). O valor médio de eritrócitos em sangue de rato Wistar macho foi de $8,65 \times 10^6$ células/µL, portanto, a concentração final de eritrócitos foi de aproximadamente 18×10^5 células por poço (LIMA; LIMA; MELO, 2014).

$$\% \text{ Inibição da hemólise} = 100 - 100 * (\text{agente} - \text{branco}) / (\text{controle} - \text{branco}) \text{ equação 10}$$

Onde: a porcentagem de hemólise é medida pela subtração de 100 pela razão entre 100 e o valor da subtração entre valores de extrato descontados dos valores de branco divididos pela subtração entre valor de controle e branco.

3.12. Análise de compostos bioativos de *S. cumini* por CLAE-ESI-EM/EM

Os compostos nas frações que apresentaram melhores atividades biológicas foram identificados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massa com ionização por eletrospray (HPLC-ESI-MS / MS, Agilent Q-TOF, modelo 6520). A solução Metanol-H₂O (4:1) foi usada como sistema de solvente e as amostras infundidas na fonte ESI do equipamento a uma taxa de fluxo de 200 µl / h. O gás nitrogênio foi utilizado como gás de secagem a uma taxa de fluxo de 8 L/min e como gás nebulizador a 58 psi.

A temperatura do nebulizador foi ajustada para 200°C e potencial de 4,5 kV aplicado ao capilar. A energia de impacto do elétron foi ajustada para 5-30 eV. Os parâmetros do HPLC foram: coluna Agilent Zorbax modelo 50 x 2,1 mm, partículas de 1,8 µm e diâmetro de poro de 110 Å, fase móvel: água acidificada com ácido fórmico (0,1% v v-1) (A) e metanol (B). O sistema solvente de gradiente (B) foi: 2% (0 min); 98% (0-15 min); 100% (15-17 min); 2%

(17-18 min); 2% (18-22 min), com um fluxo de 0,35 mL/min e detectado a UV de 280 e 360 nm. Os dados foram adquiridos nos modos negativo e positivo, com ajuste para um intervalo de 20-1000 m/z (Justino *et al.*, 2018).

3.13. Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas e a confecção dos gráficos foram realizados com uso do software GraphPad Prism versão 6.0. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média e a análise da variância foi realizada pelo teste One-Way ANOVA com pós teste Dunnett para comparações múltiplas entre os controles e as médias das amostras, One-Way e two-Way ANOVA com pós teste de Tukey para comparações múltiplas entre as médias das amostras e dos controles. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4. Resultados

4.1. Rendimento do particionamento

Na tabela 1 foi ilustrado o rendimento do particionamento líquido-líquido das folhas do *S. cumini*.

Tabela 1. Rendimento do particionamento líquido-líquido das folhas de *S. cumini*.

Partições	Massa final das extrações (g)	Rendimento (%)
Hexano	0,207	3,98
Diclorometano	1,314	25,31
Acetato de etila	0,092	1,77
N-butanol	0,628	12,09
Água residual	0,278	5,35

Nota: O rendimento das partições do extrato etanólico de *S. cumini* foi dado em porcentagem e as massas foram representadas em gramas (g).

A massa de extrato etanólico de *S. cumini* utilizado para a realização do particionamento líquido-líquido foi de 5,656 gramas, a amostra foi solubilizada em metanol para o procedimento anteriormente citado, e posteriormente passou por uma filtração para depósito da amostra no funil de bromo, logo, a massa de amostra retida no filtro, que foi de 0,464 gramas (o filtro foi seco em estufa por 2 dias para a obtenção de sua massa seca), deve ser descontada para cálculo do rendimento do particionamento, assim, o valor resultante foi de 5,192 gramas. Foi realizada a determinação da porcentagem de rendimento com 5,192 gramas tido como total, ou seja, 100%, e assim a massa obtida para cada fração foi tida em porcentagem. Pôde-se observar que o rendimento da fração diclorometano e n-butanol foram os maiores, tendo água residual e hexano como intermediários em relação aos demais, e acetato de etila apresentou o menor rendimento dentre todos os solventes aos quais a amostra foi submetida.

4.2. Prospecção fitoquímica

O resultado da determinação do conteúdo de Flavonoides, Fenóis totais e Proantocianidinas presente nas amostras foi representado pela Tabela 2.

Tabela 2. Determinação do conteúdo de Flavonoides, Fenóis totais e Proantocianidinas nas partições de *S. cumini*.

Amostras	Fenóis totais (mg EAG/g de amostra)	Flavonoides (mg QE/g de amostra)	Proantocianidinas (mg CE/g de amostra)
Hexano	31,37±0,74 ^a	9,47±0,90 ^a	8,38±0,76 ^a

Diclorometano	97,43±2,66 ^b	10,03±0,59 ^a	10,08±0,89 ^a
Acetato de etila	183,8±0,56 ^c	18,72±0,14 ^b	20,88±0,25 ^b
N-butanol	161,8±0,15 ^d	25,71±1,16 ^c	24,17±0,38 ^c
Água residual	136,3±0,14 ^e	10,26±0,74 ^a	14,45±0,95 ^d

Nota: A unidade de determinação de Flavonoides teve como unidade miligramas de quercetina por grama de amostra (mg QE/g), para representação dos valores de Fenóis totais usou-se a unidade miligramas de Ácido gálico por grama de amostra (mg GAE/g), o ensaio de determinação de Proantocianidinas teve como unidade miligramas de catequina por grama de amostra (mg CE/g). Colunas com letras iguais não possuem diferença estatística. A análise estatística foi realizada pelo pós teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os dados na Tabela 2 permitem observar que as frações de N-butanol e Acetato de etila foram as que demonstraram maior conteúdo de Flavonoides, Fenóis totais e Proantocianidinas. Na determinação de Fenóis totais pôde-se observar que a fração de água residual também se mostrou grande obtentora desta classe de compostos.

4.3. Capacidade antioxidante

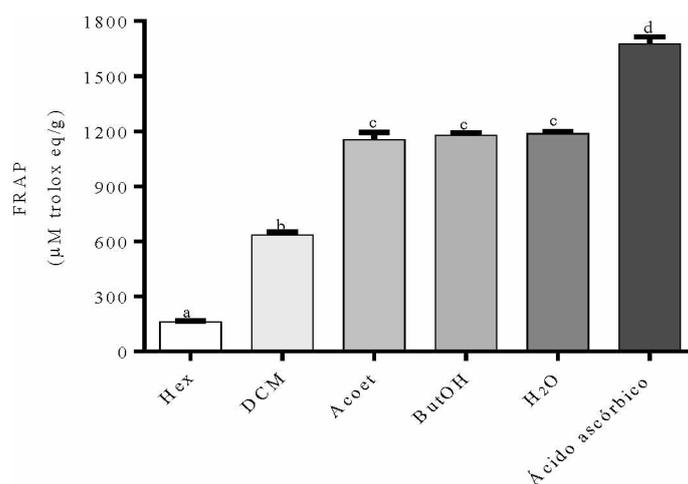
Após a determinação do conteúdo de compostos bioativos presentes nas partições orgânicas do extrato etanólico de *S. cumini*, a etapa que se seguiu foi a elucidação da capacidade antioxidante, esta foi mensurada por três métodos distintos (FRAP, ORAC e DPPH) e comparada ao controle positivo para atividade antioxidante ácido ascórbico.

Pelo método FRAP pôde-se observar na Figura 1 os seguintes valores: Hex 161,063, DCM 634,523, Acoet 1154,49, ButOH 1178,27, H2O 1187,15, Ácido ascórbico 1677,53 (mmol trolox eq/L). Por outro lado, no ensaio ORAC observado na Figura 2, todas as frações obtiveram resultados comparáveis ao ácido ascórbico, com exceção do Hexano, que se mostrou levemente inferior às demais amostras, desta forma os resultados observados foram:

Hex 1125, 23, DCM 1326,87, Acoet 1242,63, ButOH 1313,53, H2O 1370,32, Ácido ascórbico 1477,33 (mmol trolox eq/g).

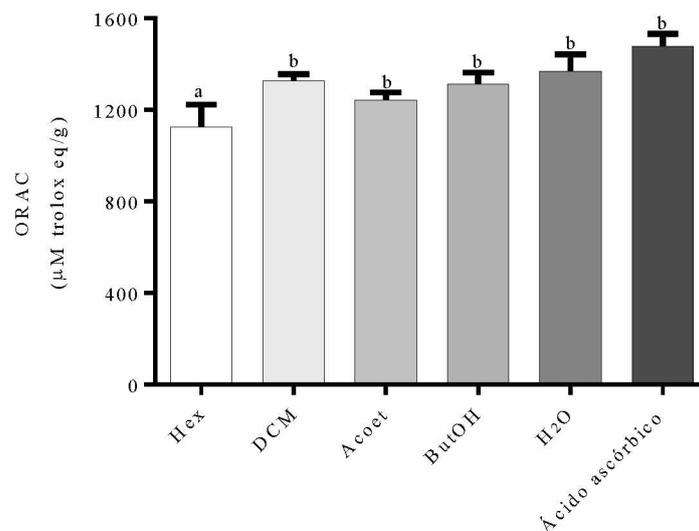
Os resultados do teste DPPH foram compilados na Figura 3 e dados em IC₅₀ com intuito de determinar a menor concentração necessária para se atingir um grau de 50% de inibição, desta forma foi possível observar como IC₅₀ das partições os seguintes valores: Hex 377,5±67,1, DCM 43,7±5,9, Acoet 15,7±2,4, ButOH 23,5±2,7, H2O 31,4±3,9, Ácido ascórbico 7,4±0,6 (µg/mL).

Figura 1. Avaliação da capacidade antioxidante pelo método FRAP (Poder de redução do íon ferro).



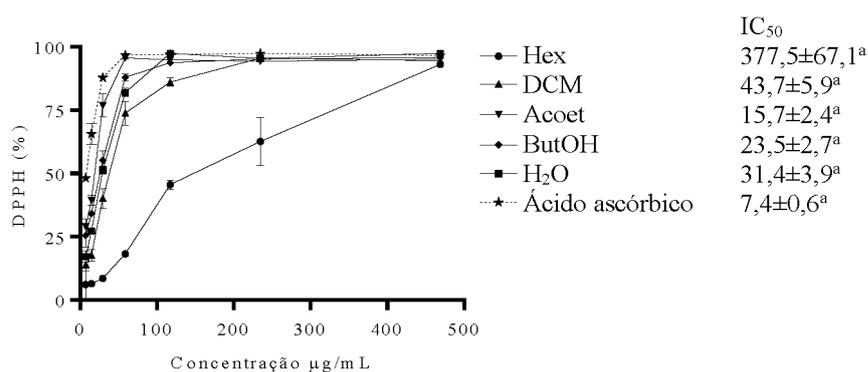
Nota: A unidade utilizada foi micromolar de trolox equivalente por grama. As letras indicadas ao topo de cada coluna indicam se há ou não significância entre as frações em relação à atividade antioxidante, ou seja, colunas com letras iguais não possuem diferença estatística. A denominação Hex corresponde a Hexano, DCM (Diclorometano), Acoet (Acetato de etila), ButOH (N-butanol), H2O (Água residual). A análise estatística foi realizada com confecção de Anova e pelo pós teste de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 2. Avaliação do potencial antioxidante das frações de *S. cumini* pelo método ORAC.



Nota: A unidade utilizada foi micromolar de trolox equivalente por grama. As letras indicadas ao topo de cada coluna indicam se há ou não significância entre as frações em relação à atividade antioxidante, ou seja, colunas com letras iguais não possuem diferença estatística. A denominação Hex corresponde a Hexano, DCM (Diclorometano), Acoet (Acetato de etila), ButOH (N-butanol), H₂O (Água residual). A análise estatística foi realizada com confecção de Anova e pelo pós teste de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 3. Avaliação do potencial antioxidante das frações de *S. cumini* pelo método de DPPH.



Nota: No eixo “y” do gráfico observa-se a inibição do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) em porcentagem perante diferentes concentrações das frações. À direita do gráfico têm-se as legendas dos símbolos equivalentes a cada fração e os valores de IC₅₀. A denominação Hex corresponde a Hexano, DCM

(Diclorometano), Acoet (Acetato de etila), ButOH (N-butanol), H₂O (Água residual). A análise estatística foi realizada com confecção de Anova e pelo pós teste de Tukey (p<0,05).

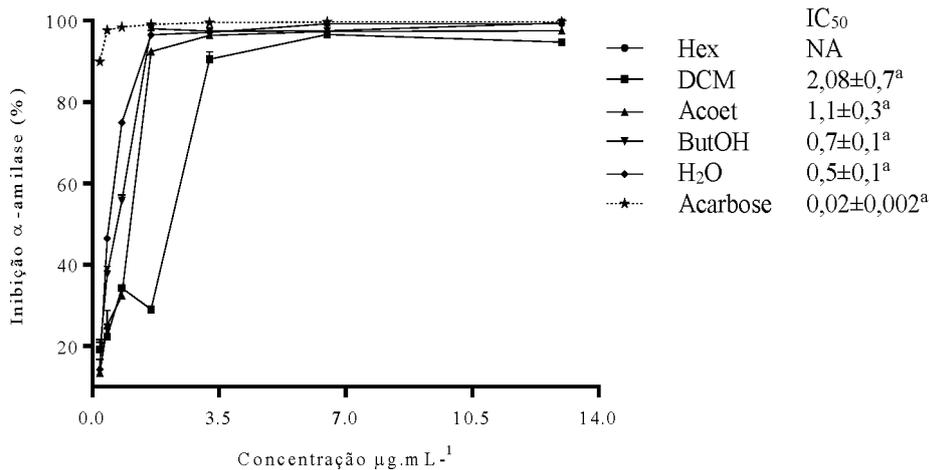
4.4. Determinação da inibição da atividade das enzimas α -amilase e α -glicosidase

A capacidade de inibição da enzima α -amilase expressa na Figura 4, foi avaliada em IC₅₀ e foi feito uso da Acarbose como controle positivo para inibição da enzima. Os valores de inibição da enzima foram: Hex (não apresentou atividade), DCM 2,08±0,7^a, Acoet 1,1±0,3^a, ButOH 0,7±0,1^a, H₂O 0,5±0,1^a, e por fim, Acarbose 0,02±0,002^a ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

O teste para determinação da capacidade de inibição da α -glicosidase seguiu o padrão do teste anterior, fazendo assim uso do mesmo controle e tendo seus resultados apresentados em IC₅₀, como consta na Figura 6. Desta forma, foi possível chegar aos seguintes valores de IC₅₀: Hex (não apresentou atividade), DCM (não apresentou atividade), Acoet 126±33,7^a, ButOH 536,1±161,8^b, H₂O 473,8±104,2^b, Acarbose 7,1±1,4^c.

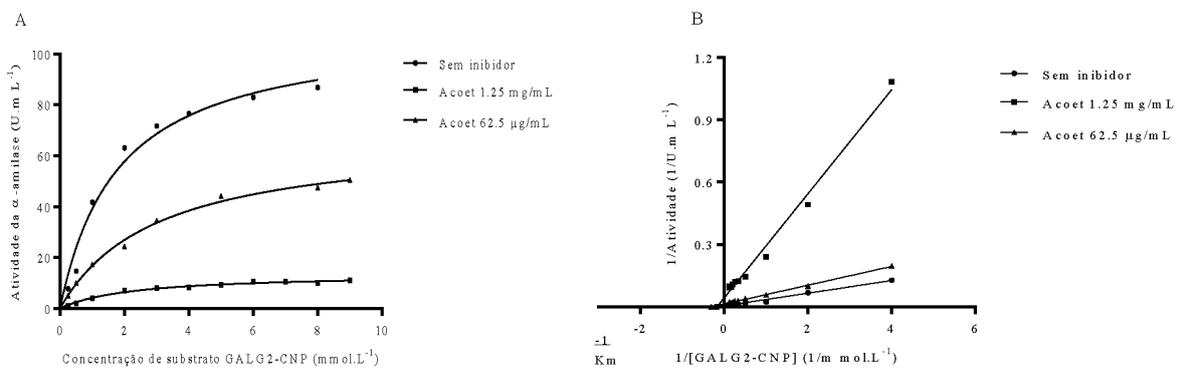
Em busca de elucidar o tipo de inibição exercida pelas frações sobre a enzimas α -amilase, a plotagem dos dados por Lineweaver-Burk (duplo-recíproco) foi realizada (Figura 5). Frente à enzima α -amilase pôde-se observar queda nos valores de KM e V_{máx} em comparação com o valor da amostra sem inibidor, este tipo de ação é característica de inibição incompetitiva, logo, é possível afirmar que os compostos presentes nas frações Acetato de etila e N-butanol possuem ação predominantemente incompetitiva frente a ação da enzima α -amilase.

Figura 4. Avaliação da capacidade de inibição das frações de *S. cumini* sobre a enzima α -amilase.

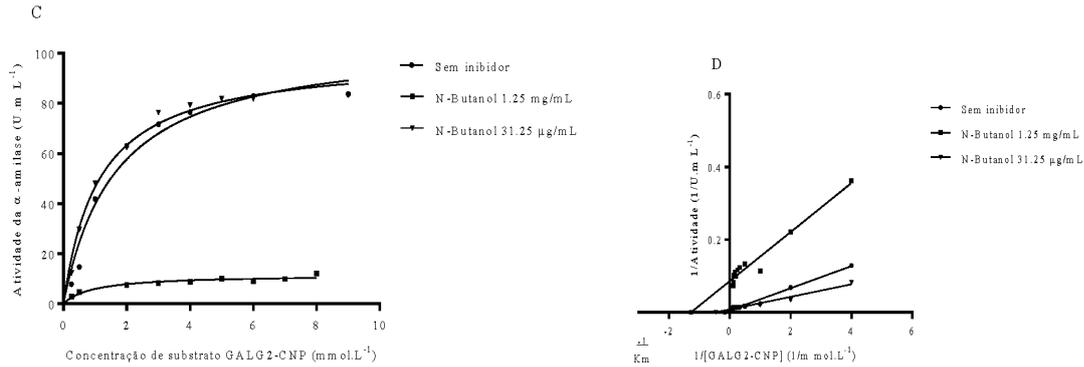


Nota: No eixo “y” do gráfico é representado o grau de inibição (em porcentagem) da enzima α -amilase frente às diferentes concentrações de cada fração de *S. cumini* (eixo “x”). À direita do gráfico pode-se observar as legendas referentes a cada fração e os valores de IC₅₀ para o ensaio. O termo “NA” foi adotado para indicar que não houve atividade inibitória sobre a enzima. A denominação Hex corresponde a Hexano, DCM (Diclorometano), Acoet (Acetato de etila), ButOH (N-butanol), H₂O (Água residual). A análise estatística foi realizada com confecção de Anova e pelo pós teste de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 5. Cinética enzimática da α -amilase

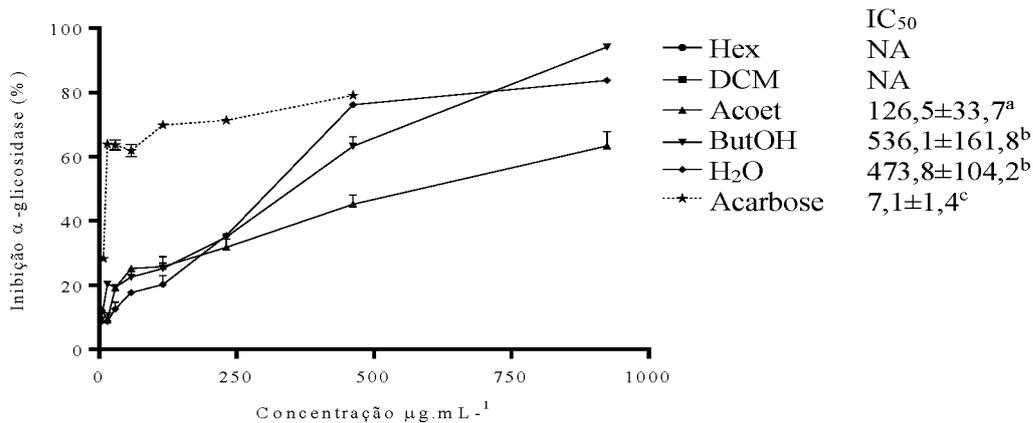


Nota: Efeito de diferentes concentrações da fração acetato de etila (Acoet) sobre a atividade da enzima α -amilase (A). Plotagem dos dados por Lineweaver-Burk (duplo-recíproco) frente à interação de diferentes concentrações da fração Acoet e de uma amostra sem presença de inibidor (B). A análise estatística foi realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



Nota: Efeito de diferentes concentrações da fração N-butanol sobre a atividade da enzima α -amilase (C). Plotagem dos dados por Lineweaver-Burk (duplo-recíproco) frente à interação de diferentes concentrações da fração N-butanol e de uma amostra sem presença de inibidor (D).

Figura 6. Avaliação da capacidade de inibição das frações de *S. cumini* sobre a enzima α -glicosidase.

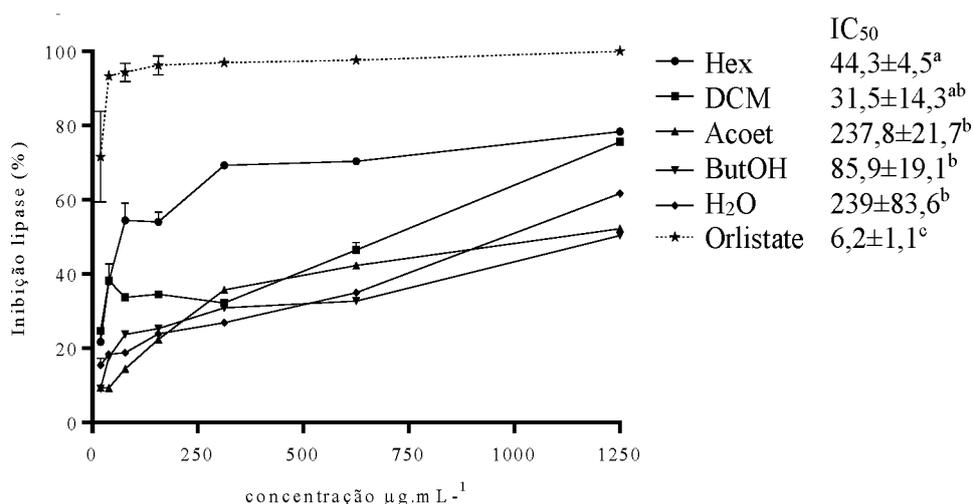


Nota: No eixo “y” do gráfico é representado o grau de inibição (em porcentagem) da enzima α -glicosidase frente às diferentes concentrações de cada fração de *S. cumini* (eixo “x”). À direita do gráfico pode-se observar as legendas referentes a cada fração e os valores de IC₅₀ para o ensaio. O termo “NA” foi adotado para indicar que não houve atividade inibitória sobre a enzima. A denominação Hex corresponde a Hexano, DCM (Diclorometano), Acoet (Acetato de etila), ButOH (N-butanol), H₂O (Água residual). A análise estatística foi realizada com confecção de Anova e pelo pós teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.5. Inibição da enzima lipase pancreática

O ensaio de inibição da enzima lipase pancreática expresso na Figura 8, foi avaliado em IC_{50} no intuito de determinar a menor concentração necessária para se obter um grau de 50% de inibição da enzima. O Orlistate, é um fármaco utilizado para tratamento de obesidade foi empregado como controle positivo para inibição da lipase pancreática. O ensaio permitiu aferir os seguintes valores de IC_{50} : Hex $44,3 \pm 4,5$, DCM $31,5 \pm 14,3$, Acoet $237,8 \pm 21,7$, ButOH $85,9 \pm 19,1$, H₂O $239 \pm 83,6$, Orlistate $6,2 \pm 1,1$.

Figura 7. Avaliação do potencial de inibição da enzima lipase pancreática pelas frações do extrato etanólico de *S. cumini*.



Nota: No eixo “y” do gráfico é representado o grau de inibição (em porcentagem) da enzima lipase pancreática frente às diferentes concentrações de cada fração de *S. cumini* (eixo “x”). À direita do gráfico pode-se observar as legendas referentes a cada fração e os valores de IC_{50} para o ensaio. A denominação Hex corresponde a Hexano, DCM (Diclorometano), Acoet (Acetato de etila), ButOH (N-butanol), H₂O (Água residual). A análise estatística foi realizada com confecção de Anova e pelo pós teste de Tukey ($p < 0,05$).

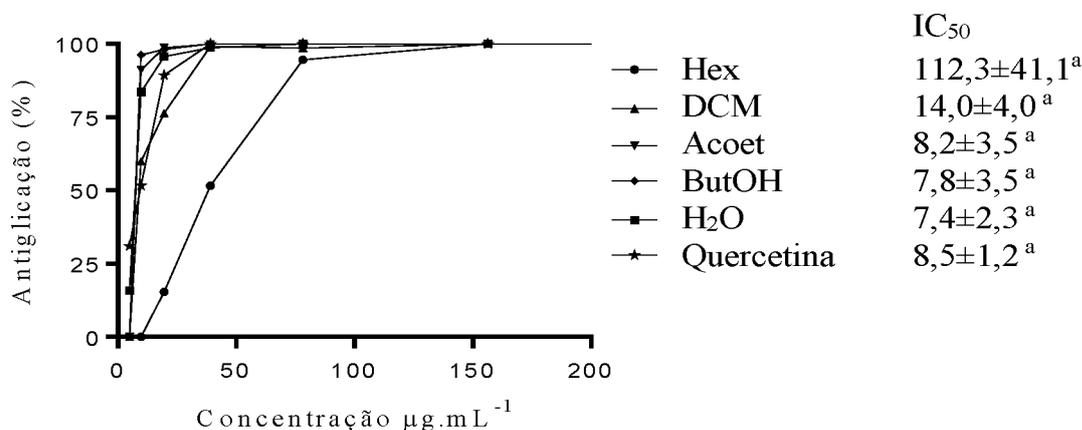
4.6. Inibição da formação de produtos finais de glicação avançada (Antiglicação)

A atividade antiglicante foi feita com uso de três métodos diferentes, são eles: BSA/Frutose (BSA/FRUT), BSA/Metilglioxal (BSA/MET) e Arginina/Metilglioxal

(ARG/MET). Na Figura 9 pode-se observar os valores de inibição das partições orgânicas de *S. cumini* sobre o ensaio BSA/FRUT, o grupo Hex teve como IC₅₀ 112,3±41,1, DCM 14,0±4,0, Acoet 8,2±3,5, ButOH 7,8±3,5, H₂O 7,4±2,3, e por fim, o controle positivo para inibição da glicação: Quercetina 8,5±1,2 (µg.mL⁻¹).

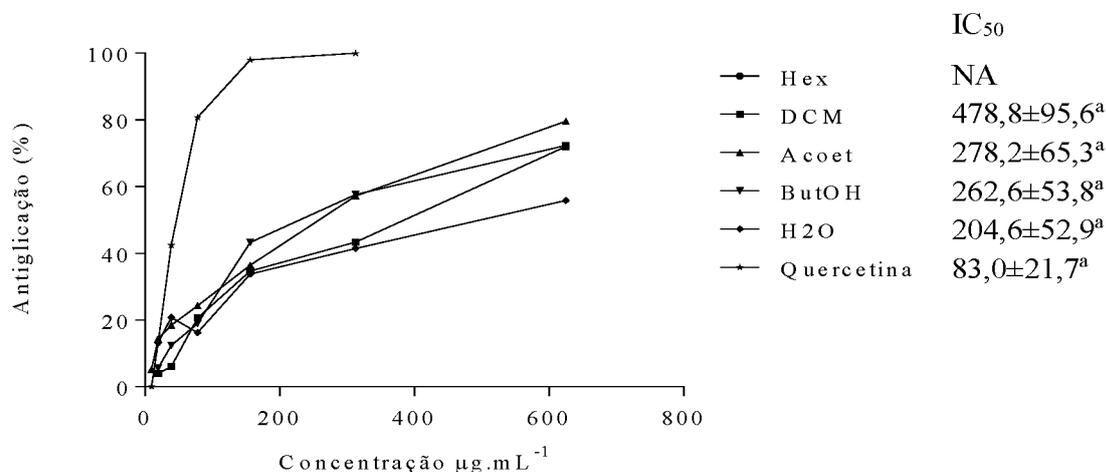
Para o método de BSA/MET representado pela Figura 10, as partições apresentaram os seguintes valores de IC₅₀: Hex 1022±582,3, DCM 478,8±95,61, Acoet 281±54,03, ButOH 268,5±48,19, H₂O 146,8±37,71, Quercetina 83,66±20,32 (µg.mL⁻¹). O método ARG/MET representado pela Figura 11 apresentou os seguintes valores de IC₅₀: Hex 88,48±32,14, DCM 382,0±80,75, Acoet 179,4±31,43, ButOH 178,6±25,03, H₂O 821,6± 225,9, e por fim, Quercetina 37,54±2,41. (µg.mL⁻¹).

Figura 8. Avaliação do potencial antiglicante das partições orgânicas das folhas de *S. cumini* no método BSA/FRUT.



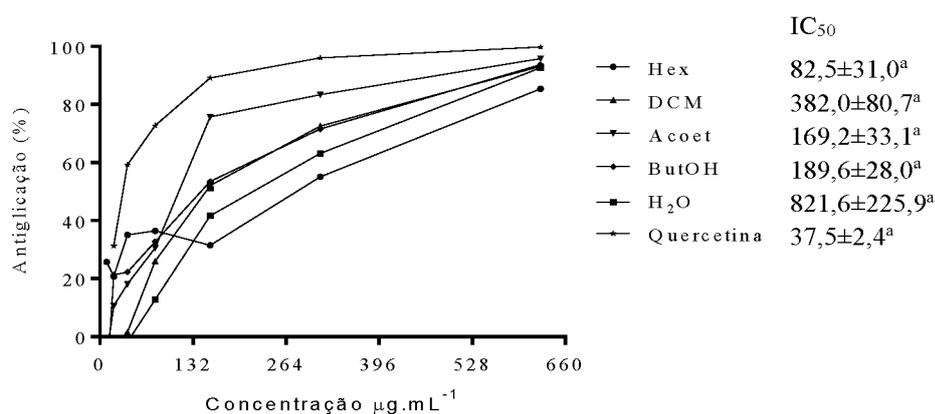
Nota: No eixo “y” do gráfico é representado o grau de inibição (em porcentagem) da glicação proteica frente às diferentes concentrações de cada partição de *S. cumini* (eixo “x”). À direita do gráfico pode-se observar as legendas referentes aos valores de IC₅₀ para o ensaio. A denominação Hex corresponde a Hexano, DCM (Diclorometano), Acoet (Acetato de etila), ButOH (N-butanol), H₂O (Água residual). A análise estatística foi realizada com confecção de Anova e pelo pós teste de Tukey (p<0,05).

Figura 9. Avaliação do potencial antiglicante das partições orgânicas das folhas de *S. cumini* no método BSA/MET.



Nota: No eixo “y” do gráfico é representado o grau de inibição (em porcentagem) da glicação proteica frente às diferentes concentrações de cada partição de *S. cumini* (eixo “x”). À direita do gráfico pode-se observar as legendas referentes aos valores de IC₅₀ para o ensaio. A denominação Hex corresponde a Hexano, DCM (Diclorometano), Acoet (Acetato de etila), ButOH (N-butanol), H₂O (Água residual). A análise estatística foi realizada com confecção de Anova e pelo pós teste de Tukey (p<0,05).

Figura 10. Avaliação do potencial antiglicante das partições orgânicas das folhas de *S. cumini* no método ARG/MET.



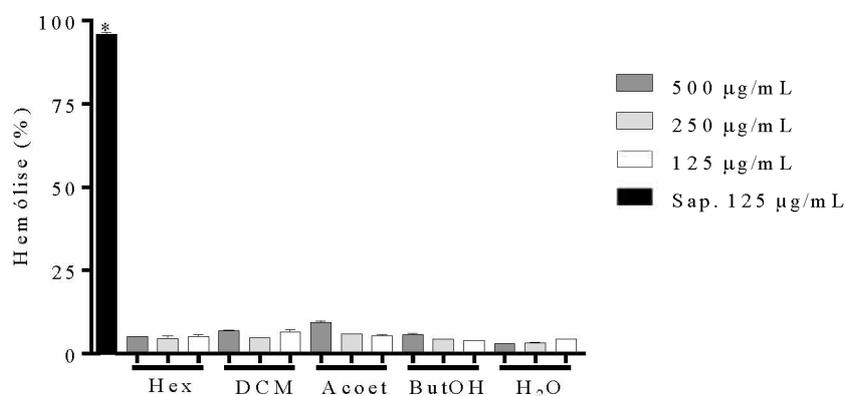
Nota: No eixo “y” do gráfico é representado o grau de inibição (em porcentagem) da glicação proteica frente às diferentes concentrações de cada partição de *S. cumini* (eixo “x”). À direita do gráfico pode-se observar as legendas referentes aos valores de IC₅₀ para o ensaio. A denominação Hex corresponde a Hexano, DCM

(Diclorometano), Acoet (Acetato de etila), ButOH (N-butanol), H₂O (Água residual). A análise estatística foi realizada com confecção de Anova e pelo pós teste de Tukey (p<0,05).

4.7. Citotoxicidade das partições do extrato etanólico de *S. cumini* pelo método de hemólise

O ensaio acerca da hemólise causada pelas partições orgânicas das folhas de *S. cumini* foi realizado e teve como controle positivo para a hemólise a Saponina. Assim os resultados observados na Figura 12 foram os seguintes: Para a concentração 125 µg/mL das partições de *S. cumini* Hex apresentou 5,07% de hemólise, DCM 6,49%, Acoet 5,36%, ButOH 3,91% e H₂O 4,37%. Para a concentração intermediária de 250 µg/mL das partições, Hex 4,53%, DCM 4,77%, Acoet 5,93%, ButOH 4,41%, H₂O 3,22%. Por fim, a maior concentração das partições utilizada foi de 500 µg/mL, neste caso Hex apresentou 5,12% de hemólise, DCM 6,97%, Acoet 9,39%, ButOH 5,70%, H₂O 3,04%. O controle positivo para hemólise foi testado somente à concentração de 125 µg/mL, uma vez que nesta a Saponina já atingiu o valor de 95,96% de hemólise.

Figura 11. Capacidade hemolítica de diferentes concentrações das partições orgânicas das folhas de *S. cumini*



Nota: No eixo “y” do gráfico é representado o grau de hemólise (em porcentagem) frente às diferentes concentrações de cada partição de *S. cumini* (eixo “x”), sendo que, a concentração de 125 µg/mL é representada

pela cor branca, 250 µg/mL é representada em cinza claro, 500 µg/mL é representada por cinza escuro e, por fim, o controle na concentração de 125 µg/mL é representado na cor preto. Na parte inferior do gráfico pode-se observar as legendas referentes às nomenclaturas das partições. A denominação Hex corresponde a Hexano, DCM (Diclorometano), Acoet (Acetato de etila), ButOH (N-butanol), H₂O (Água residual). A análise estatística foi realizada pelo teste de Dunnet (p<0,05).

4.8. Análise de compostos bioativos de *S. cumini* por CLAE-ESI-EM/EM

As frações Acetato de etila e N-butanol se mostraram de certa forma as mais promissoras dentre as demais, uma vez que apresentaram baixa citotoxicidade, alta atividade antioxidante, antiglicante e de inibição enzimática. Assim, foi performado um ensaio em CLAE-ESI-EM/EM no intuito de elucidar compostos bioativos que podem ser responsáveis por estas atividades observadas em ensaios posteriores (tabelas 3 e 4).

Tabela 3. Compostos propostos pela análise dos dados obtidos pelo procedimento CLAE-ESI-EM/EM (modo negativo) da fração Acetato de etila do extrato etanólico das folhas de *S. cumini*.

Composto	TR (min)	Massa calculada [M-H] ⁻	m/z teórico	Erro (ppm)	m/z dos fragmentos de [M-H] ⁻	Referências
Éster de galoil-glicose	12, 79	331,1911	332,0734	8,15	289, 280, 250, 247, 228, 136	(Faria <i>et al.</i> , 2011)
Vescalagina	13,44	933,6932	934,0712	1,39	889, 805, 703, 613, 506	(De Carvalho Tavares <i>et al.</i> , 2016)
Quercetina 3-O-β-D-glucosídeo	6,68	463,0893	464,0955	4,53	383, 316, 271, 229, 179	(Abdel-Hameed <i>et al.</i> , 2013)
Quercetina-3-O-glicuronídeo	7,00	477,0678	478,0747	7,75	403, 316, 301, 236,	(Oszmiański <i>et al.</i> , 2015)

151						
Cianidina-3-O-glicosídeo	6,47	449,0721	450,1157	9,57	417, 310, 287, 161	(Oszmiański <i>et al.</i> , 2015)
Kaempferol 3-O-β-D-glicosídeo	7,67	447,058	448,1006	8,94	315, 248, 179, 151, 124	(Abdel-Hameed <i>et al.</i> , 2013)
Luteolina-3-O-glicuronídeo	7,76	461,0272	462,0798	3,47	431, 349, 300, 285, 151	(Oszmiański <i>et al.</i> , 2015)

Tabela 4. Compostos propostos pela análise dos dados obtidos pelo procedimento CLAE-ESI-EM/EM (modo negativo) da fração N-butanol do extrato etanólico das folhas de *S. cumini*.

Composto	TR (min)	Massa calculada [M-H] ⁻	m/z teórico	Erro (ppm)	m/z dos fragmentos de [M-H] ⁻	Referências
Quercetina-O-hexosídeo	6,18	463,0512	464,0955	6,92	313, 301, 271, 257	(Ye <i>et al.</i> , 2012)
Kaempferol 3-O-hexosídeo	7,05	447,0562	448,1006	7,60	425, 374, 355, 284, 255	(Alberti, 2014)
Miricetina-3-O-Acetil-Ramnosídeo	7,24	505,0982	506,1060	0,00	433, 403, 355, 316, 271	(Negri e Tabach, 2013)
Ácido urônico crosseriol	4,97	475,1453	476,0955	5,05	455, 411, 377, 322, 272	(Plazonić <i>et al.</i> , 2009)
Ácido Rosmarínico	13,14	359,2192	360,0845	0,83	335, 290, 231, 161, 133	(Wang <i>et al.</i> , 2012)
(Epi) galocatequina-O-	0,78	481,0634	482,1060	2,49	428, 368, 313, 275, 203	(Tala <i>et al.</i> , 2013)

glicuronídeo						
Quercetina 3-O-glicosídeo	6,82	463,0882	464,0955	12,52	421, 300, 271, 186, 150	(Abdel-Hameed <i>et al.</i> , 2013)
Kaempferol 3-O-glicosídeo	7,52	447,0944	448,1006	7,60	421, 375, 299, 216, 151	(Abdel-Hameed <i>et al.</i> , 2013)
Epicatequina-3-Galato	13,64	441,2598	442,0900	12,92	397, 329, 271, 208, 163, 113	(Lin <i>et al.</i> , 2014)

5. Discussão

As plantas são conhecidas como grande fonte de compostos antioxidantes, estes por sua vez estão associados com o controle de desordens crônicas, tais como o DM2 (Pereira e Das Graças Cardoso, 2012). Assim, estudos acerca das plantas nativas e naturalizadas no Brasil se fazem de grande valia, uma vez que muitas populações não possuem acesso a um sistema de saúde e recorrem aos fitoterápicos como fonte primária de alívio para suas enfermidades (Maciel *et al.*, 2002).

Tendo em vista os efeitos descritos das plantas medicinais sobre algumas desordens como o DM2 (Franco *et al.*, 2018), foram realizados ensaios para determinação do potencial antioxidante do *S. cumini*, assim como o potencial antiglicante e de inibição de enzimas relacionadas com a hiperglicemia e hiperlipidemia pós-prandiais (enzimas α -amilase, α -glicosidase e lipase de mamíferos), em adição, neste estudo foi realizada a avaliação fitoquímica no intuito de quantificar o conteúdo de polifenóis, flavonoides e taninos presentes nas partições orgânicas do extrato etanólico de *S. cumini* e, ainda, elucidar seus compostos por CLAE-ESI-EM/EM (modo negativo).

Por fim, todas estas análises foram aliadas à determinação da capacidade hemolítica das partições anteriormente citadas, uma vez que as amostras com alta taxa de hemólise não são

viáveis por conta de sua citotoxicidade. O processo de particionamento líquido-líquido foi realizado com o uso dos solventes orgânicos: Hexano, Diclorometano, Acetato de etila e N-butanol. Estes solventes foram escolhidos pelo fato de permitirem o isolamento de compostos bioativos por polaridade crescente (Justino *et al.*, 2018).

Segundo Schmidt (2005), esses solventes são capazes de isolar classes distintas de metabólitos secundários. Sabendo-se disso, a fração hexânica apresenta como principais compostos os esteroides, terpenos e acetofenonas. Na fração diclorometano há presença principalmente de compostos dos grupos lignanas, flavonoides metoxilados, lactonas, triterpenos e cumarinas. Na fração acetato de etila as classes predominantemente encontradas são os flavonoides, taninos, compostos fenólicos, Ácidos triterpênicos e saponinas. Na fração N-butanol encontra-se principalmente flavonoides glicosilados, taninos, saponinas e carboidratos. Por fim, na fração aquosa encontram-se compostos que não foram separados pelos demais solventes, por esta razão é denominada fração água residual (Schmidt, 2005).

A classe dos polifenóis, bem como suas subclasses de taninos e de flavonoides, são considerados compostos abundantes em grande parte das plantas e a eles muitas vezes é atribuído o potencial antioxidante do vegetal. Os flavonoides se destacam entre os polifenóis, uma vez que são relacionados com a inibição da oxidação do ácido linolêico, peroxidação de fosfolípídeos da membrana, peroxidação de eritrócitos e fotoxidação, dentre outras ações (De Moraes *et al.*, 2009).

Foram realizados três ensaios para avaliação do potencial antioxidante, foram eles, FRAP, ORAC e DPPH. De modo geral, a fração hexânica apresentou baixa atividade nos ensaios antioxidantes, mas por outro lado, as frações mais polares, acetato de etila e N-butanol, apresentaram capacidade antioxidante total semelhante ao do controle positivo utilizado (ácido ascórbico). Este resultado pode ser interpretado pela observação dos grupos de

compostos ativos presentes nestas duas frações, que foram sugeridos na análise CLAE-ESI-EM/EM feitos no presente estudo, uma vez que estes possuem alto potencial antioxidante.

Segundo Magina *et al.*, (2010), a quantificação de compostos fenólicos e flavonoides realizada pelo ensaio de prospecção fitoquímica, atesta que frações que possuem maior quantidade destes metabólitos secundários mostram conseqüentemente maior capacidade antioxidante, desta forma, foi possível observar que as frações Acetato de etila e N-butanol foram as que demonstraram maior conteúdo destes compostos bioativos. O achado também está de acordo com o descrito em Ruan *et al.*, (2008), onde foi possível correlacionar a atividade antioxidante do extrato metanólico das folhas de *S. cumini* com a presença de compostos fenólicos, atividade esta que é justificada pelos autores devido ao fato destas moléculas serem capazes de sequestrar radicais livres.

A atividade inibitória das frações do extrato etanólico de *S. cumini* sobre as enzimas hidrolases α -amilase e α -glicosidase foram avaliadas por ensaios anteriormente descritos, após elucidação dos resultados do ensaio com α -amilase, foi possível observar que o IC₅₀ das frações foram estatisticamente iguais, inclusive o controle positivo, com exceção da fração hexânica. Segundo estudo conduzido por Freitas, (2017), a presença de compostos como a quercetina e a miricetina repercutem de forma marcante na inibição desta enzima. Em Benalla *et al.*, (2010), foi explicitado que a fração clorofórmica do extrato metanólico das folhas de *S. cumini* se mostrou boa inibidora de glicosidases, tais como α -amilase porcina e glicosidase pancreática e intestinal murina.

Contudo, é possível que a ação inibitória das frações ocorra através da sinergia entre seus compostos bioativos e, não pela ação de compostos isolados como descrito em Chagas *et al.*, (2018), onde foi comprovado que nas folhas de *S. cumini* há formação de um complexo entre os compostos ácido gálico, miricetina e quercetina, que age de forma mais eficiente que estes

compostos de forma isolada, achado este que permite que se tenha mais de uma interpretação acerca das atividades apresentadas pelas frações do extrato etanólico de *S. cumini*.

A atividade inibitória das frações de *S. cumini* sobre a enzima lipase pancreática porcina foi determinada e, como resultado foi possível observar que as frações hexano e diclorometano apresentaram resultados mais próximo do controle positivo Orlistate. De forma contrária a grande parte das análises anteriores, foi possível observar melhor atividade nas frações mais apolares do *S. cumini*, isto ocorre pelo conteúdo de compostos bioativos presentes nas mesmas, estes são principalmente polifenóis metoxilados e terpenos que, segundo Castejon, (2011), podem ser capazes de inibir a enzima lipase pancreática.

A elucidação da capacidade inibitória das frações orgânicas das folhas de *S. cumini* leva a buscar como os compostos bioativos da planta agem sobre as enzimas, de forma a estimular o delineamento acerca do tipo de inibição exercido pelas amostras sobre o alvo. Assim, foi realizado o ensaio para determinação do tipo de inibição das frações sobre a enzima α -amilase, onde os resultados permitiram observar que mesmo com aumento da concentração do substrato, a velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) e o K_m (constante de Michaelis-Menten) foram reduzidos na presença das frações orgânicas acetato de etila e N-butanol, este evento é característico do modo de inibição incompetitiva (Picot *et al.*, 2014), assim os compostos bioativos presentes nestas amostras atuam predominantemente de forma incompetitiva sobre a α -amilase.

O tipo de inibição incompetitivo é característico pela ligação do inibidor ao complexo enzima-substrato, o que resulta na formação do complexo enzima-substrato-inibidor. Este complexo tem como ação a diminuição da afinidade do substrato pelo sítio ativo da enzima, o que culmina no atraso da reação e, conseqüentemente, diminuição da taxa da mesma (Picot *et al.*, 2014).

O estudo conduzido por Fais *et al.*, (2018) sugeriu que os compostos kaempferol e quercetina agliconas e glicosilados podem estar ligados com a atividade inibitória incompetitiva sobre a enzima α -amilase. Algo que corrobora com o achado inédito em relação à inibição que as frações Acetato de etila e N-butanol de *S. cumini* apresentaram, uma vez que nestas frações foi possível observar a presença dos compostos citados pelo trabalho de (Fais *et al.*, 2018).

A glicação proteica causa interferência nas funções típicas das proteínas pela modificação conformacional que é causada pela ligação de açúcares redutores nas mesmas, o que resulta na formação de AGES (Tschiedel, 2014). Dito isto, foram realizados ensaios de antiglicação, onde o *S. cumini* se destacou na metodologia BSA-FRUT, com resultados próximos ao do controle positivo. As frações acetato de etila e N-butanol se destacaram como potenciais agentes antiglicantes, isto ocorre pela grande quantidade de compostos fenólicos presentes nas mesmas, tais como glicosídeos, taninos, flavonoides e outros polifenóis (Perera *et al.*, 2013).

Assim, com o fato de que a auto-oxidação da glicose e oxidação dos produtos de amadori (produtos intermediários entre a proteína normal e seu estado de glicação avançado) formam AGES e radicais livres, chega-se à conclusão de que plantas que possuem alto teor de compostos fenólicos aliados a uma grande capacidade antioxidante são potenciais agentes antiglicantes (Hunt *et al.*, 1993). Em Tupe *et al.*, (2015), foi observada a influência do conteúdo fenólico do extrato aquoso das sementes de *S. cumini* para com sua capacidade antiglicante.

A avaliação de um meio de tratamento consiste em algo complexo, sendo assim, ao se atestar as propriedades do *S. cumini* em relação à sua atividade biológica frente ao quadro do DM2, foi realizado ensaio para avaliar a atividade hemolítica, de forma que a menor taxa desta se traduz como um bom resultado. A taxa de hemólise é uma das formas de análise da citotoxicidade do extrato sobre o organismo para que seja indicada sua viabilidade, plantas

possuem variadas composições de metabólitos secundários e, alguns deles podem ser caracterizados como citotóxicos (Maria Do Carmo e Nascimento, 2003).

Para o teste de hemólise das frações orgânicas das folhas de *S. cumini* foram usadas as concentrações de 500, 250 e 125 µg/mL, que foram as concentrações onde se verificou maior atividade frente aos demais ensaios. O controle positivo para hemólise foi a saponina, que é capaz de gerar desordens na membrana dos glóbulos vermelhos do sangue, o que leva a hemólise (Castejon, 2011). Estudo conduzido por (Furtado, 2014) analisou a citotoxicidade das folhas de *S. cumini* e, observou que o teor de saponinas não influenciou na taxa hemolítica da planta, o que corrobora o achado neste estudo, uma vez que nas concentrações anteriormente citadas nenhuma fração apresentou atividade hemolítica significativa, ou seja, acima de 10% de hemólise.

6. Conclusão

A perspectiva futura de aumento do número de pessoas assoladas pelo DM2 gera uma necessidade imediata, que consiste em uma forma de tratamento complementar, que, por sua vez, visa amenizar o quadro das pessoas que são acometidas por esta desordem. Assim, os resultados encontrados por este estudo são de grande valia para o uso do *S. cumini* como tratamento complementar do DM2, uma vez que a planta apresentou alto potencial antioxidante, capacidade de evitar a formação de compostos de glicação avançados, inibição das enzimas hidrolases glicolíticas e da lipase pancreática, assim como baixa citotoxicidade.

Além disso, as frações orgânicas das folhas de *S. cumini* se destacaram como potenciais fontes de compostos bioativos, que foram analisados por CLAE-ESI-EM/EM. Análises mais aprofundadas podem ser realizadas para que seja possível realizar o isolamento de seus compostos fitoquímicos ou, ainda, sugerir a presença de outros compostos.

Portanto, os baixos valores de IC₅₀ para os ensaios realizados, a possível presença de compostos bioativos de alta relevância, resultam em perspectivas futuras de formulação de fármacos ou suplementos alimentares com base nesta planta. Contudo, novos estudos são necessários para se avaliar o completo potencial biológico das folhas de *S. cumini* em modelos *in vitro* e *in vivo*.

7. Referências

ABDEL-HAMEED, E.-S. S.; BAZAID, S. A.; SALMAN, M. S. Characterization of the phytochemical constituents of Taif rose and its antioxidant and anticancer activities. **BioMed research international**, v. 2013, 2013. ISSN 2314-6133.

ALBERTI, Á. **LC-ESI-MS/MS methods in profiling of flavonoid glycosides and phenolic acids in traditional medicinal plants: *Sempervivum tectorum* L. and *Corylus avellana* L.** 2014.

ALMEIDA, A. A. et al. Perfil epidemiológico do diabetes mellitus auto-referido em uma zona urbana de Juiz de Fora, Minas Gerais. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 43, n. 3, p. 199-204, 1999. ISSN 0004-2730.

ALMEIDA, S. S. et al. Diabetes Mellitus tipo 2: Aspectos fisiológicos, genéticos e formas de exercício físico para seu controle. **Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum**, v. 11, n. 1, p. 103-111, 2009.

ALVES, C. Q. et al. Avaliação da atividade antioxidante de flavonóides. **Diálogos & Ciência**, v. 12, p. 1-8, 2007.

BARBOSA, J. H.; OLIVEIRA, S. L.; SEARA, L. T. The role of advanced glycation end-products (AGEs) in the development of vascular diabetic complications. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 6, p. 940-950, 2008. ISSN 0004-2730.

BARBOSA, J. H. P. et al. A determinação dos produtos avançados de glicação (AGEs) e de lipoxidação (ALEs) em alimentos e em sistemas biológicos: avanços, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 39, n. 5, p. 608-620, 2016. ISSN 0100-4042.

BENALLA, W.; BELLAHCEN, S.; BNOUHAM, M. Antidiabetic medicinal plants as a source of alpha glucosidase inhibitors. **Current diabetes reviews**, v. 6, n. 4, p. 247-254, 2010. ISSN 1573-3998.

BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996. ISSN 0003-2697.

BIANCHI, M. D. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev Nutr**, v. 12, n. 2, p. 123-30, 1999.

CASTEJON, F. V. Taninos e saponinas. **Seminário apresentado junto à disciplina Seminários Aplicados do Programa de Pós-Graduação–Universidade Federal de Goiás, Goiânia**, 2011.

CHAGAS, V. T. et al. Protective Effects of a Polyphenol-Rich Extract from *Syzygium cumini* (L.) Skeels Leaf on Oxidative Stress-Induced Diabetic Rats. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018, 2018. ISSN 1942-0900.

CORRÊA-GIANNELLA, M. L.; VIEIRA, S. M. Genetic susceptibility to microangiopathy development in Type 1 diabetes mellitus. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 2, p. 375-386, 2008. ISSN 0004-2730.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). **Biochemistry and molecular biology of plants**, v. 24, p. 1250-1319, 2000.

DE CARVALHO TAVARES, I. M. et al. Comprehensive study of the phenolic composition of the edible parts of jambolan fruit (*Syzygium cumini* (L.) Skeels). **Food Research International**, v. 82, p. 1-13, 2016. ISSN 0963-9969.

DE MORAIS, S. M. et al. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 1B, p. 315-320, 2009.

DE SOUZA, S. P. et al. Estudo da atividade antiobesidade do extrato metanólico de *Baccharis trimera* (Less.) DC. **Rev. Bras. Farm.**, v. 93, n. 1, p. 27-32, 2012.

DORNAS, W. et al. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 3, p. 241-249, 2009. ISSN 2179-443X.

EVANS, B. C. et al. Ex vivo red blood cell hemolysis assay for the evaluation of pH-responsive endosomolytic agents for cytosolic delivery of biomacromolecular drugs. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 73, 2013.

FAIS, A. et al. Selected Enzyme Inhibitory Effects of *Euphorbia characias* Extracts. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018. ISSN 2314-6133.

FARIA, A. F.; MARQUES, M. C.; MERCADANTE, A. Z. Identification of bioactive compounds from jambolão (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions. **Food chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1571-1578, 2011. ISSN 0308-8146.

FRANCO, R. R. et al. Antioxidant and anti-glycation capacities of some medicinal plants and their potential inhibitory against digestive enzymes related to type 2 diabetes mellitus. **Journal of ethnopharmacology**, v. 215, p. 140-146, 2018. ISSN 0378-8741.

FREITAS, T. C. *Syzygium* sp: compostos bioativos e ação sobre as enzimas digestivas. 2017.

FURTADO, N. A. D. O. C. Estudos com *Syzygium cumini* (L.) Skeel: Caracterização da matéria-prima, perfil fitoquímico, citotoxicidade e atividade antimicrobiana sobre microorganismos associados ao biofilme dental. 2014.

HUNT, J. V.; BOTTOMS, M. A.; MITCHINSON, M. J. Oxidative alterations in the experimental glycation model of diabetes mellitus are due to protein-glucose adduct oxidation. Some fundamental differences in proposed mechanisms of glucose oxidation and oxidant production. **Biochemical Journal**, v. 291, n. 2, p. 529-535, 1993. ISSN 0264-6021.

JUSTINO, A. B. et al. *Annona muricata* Linn. leaf as a source of antioxidant compounds with in vitro antidiabetic and inhibitory potential against α -amylase, α -glucosidase, lipase, non-enzymatic glycation and lipid peroxidation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 100, p. 83-92, 2018. ISSN 0753-3322.

KETYLIN, F. M. et al. Ação farmacológica de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **acta farmacéutica bonaerense**, v. 25, n. 2, p. 310-4, 2006.

LAGO, E. S.; GOMES, E.; SILVA, R. D. Produção de geléia de jambolão (*Syzygium cumini* Lamarck): processamento, parâmetros físico-químicos e avaliação sensorial. **Food Science and Technology (Campinas)**, p. 847-852, 2006. ISSN 0101-2061.

LIMA, Claudio Moreira et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia Plena**, v. 10, n. 3, 2014.

LIN, L.-Z. et al. UHPLC-PDA-ESI/HRMS n profiling method to identify and quantify oligomeric proanthocyanidins in plant products. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 39, p. 9387-9400, 2014. ISSN 0021-8561.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002. ISSN 0100-4042.

MAGINA, M. A. et al. Atividade antioxidante de três espécies de *Eugenia* (Myrtaceae). **Lat Am J Pharm**, v. 29, n. 3, p. 376-82, 2010.

MARIA DO CARMO, C.; NASCIMENTO, S. C. Atividade citotóxica de *Plectranthus barbatus* Andr.(Lamiaceae). **Acta Farm. Bonaerense**, v. 22, n. 2, p. 155-8, 2003.

MIGLIATO, K. F. et al. Quality control of *Syzygium cumini* (L.) Skeels fruits. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 94-101, 2007. ISSN 0102-695X.

NAHID, S. et al. Cardio-and hepato-protective potential of methanolic extract of *Syzygium cumini* (L.) Skeels seeds: A diabetic rat model study. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 2, p. 126-133, 2017. ISSN 2221-1691.

NEGRI, G.; TABACH, R. Saponins, tannins and flavonols found in hydroethanolic extract from *Periandra dulcis* roots. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 6, p. 851-860, 2013. ISSN 0102-695X.

OSZMIANŚKI, J. et al. Analysis of phenolic compounds and antioxidant activity in wild blackberry fruits. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 7, p. 14540-14553, 2015.

PEIXOTO, A. L.; MORIM, M. P. Coleções botânicas: documentação da biodiversidade brasileira. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, p. 21-24, 2003. ISSN 0009-6725.

PEREIRA, M. N. Extração, isolamento e identificação de alcaloide da casca do fruto de *Annona crassiflora* Mart. e avaliação do seu potencial de inibição da lipase pancreática. 2016.

PEREIRA, R. J.; DAS GRAÇAS CARDOSO, M. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, 2012. ISSN 2179-4804.

PERERA, P.; EKANAYAKA, S.; RANAWEERA, K. Phytochemical screening and in vitro antiglycation and antioxidant activity of water extract of *Syzygium cumini* bark. **J Phytochem Photon**, v. 114, p. 188-195, 2013.

PICOT, C.; SUBRATTY, A. H.; MAHOMOODALLY, M. F. Inhibitory potential of five traditionally used native antidiabetic medicinal plants on α -amylase, α -glucosidase, glucose entrapment, and amylolysis kinetics in vitro. **Advances in pharmacological sciences**, v. 2014, 2014. ISSN 1687-6334.

PLAZONIC, A. et al. Identification and quantification of flavonoids and phenolic acids in burr parsley (*Caucalis platycarpos* L.), using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2466-2490, 2009.

PRIOR, R. L. et al. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 11, p. 3273-3279, 2003. ISSN 0021-8561.

REICHLING, J. Plant-microbe interactions and secondary metabolites with antibacterial, antifungal and antiviral properties. **Annual plant reviews**, p. 214-347, 2018.

ROCHA, F. D. et al. Diabetes mellitus e estresse oxidativo: produtos naturais como alvo de novos modelos terapêuticos. **Rev Bras Farm**, v. 87, n. 2, p. 49-54, 2006.

RUAN, Z. P.; ZHANG, L. L.; LIN, Y. M. Evaluation of the antioxidant activity of *Syzygium cumini* leaves. **Molecules**, v. 13, n. 10, p. 2545-2556, 2008.

SCHMIDT, D. D. F. N. Estudo químico, biológico e farmacológico das espécies *Allamanda blanchetti* e *Allamanda schottii* para obtenção de frações e moléculas bioativas de potencial terapêutico. 2005.

SILVA, H. Triagem virtual de compostos provenientes de plantas da biodiversidade brasileira, com potencial atividade inibitória das enzimas alfa-amilase, alfa-glicosidase humanas. 2017.

SWAMI, S. B. et al. Jamun (*Syzygium cumini* (L.)): a review of its food and medicinal uses. **Food and Nutrition Sciences**, v. 3, n. 08, p. 1100, 2012.

TALA, V. R. S. 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.

TSCHIEDEL, B. Complicações crônicas do diabetes. **J. bras. med**, v. 102, n. 5, 2014. ISSN 0047-2077.

TUPE, R. S. et al. Aqueous extract of some indigenous medicinal plants inhibits glycation at multiple stages and protects erythrocytes from oxidative damage—an in vitro study. **Journal of food science and technology**, v. 52, n. 4, p. 1911-1923, 2015. ISSN 0022-1155.

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.

WU, C.-H.; YEN, G.-C. Inhibitory effect of naturally occurring flavonoids on the formation of advanced glycation endproducts. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 8, p. 3167-3173, 2005. ISSN 0021-8561.

YE, M. et al. Characterization of flavonoids in *Millettia nitida* var. *hirsutissima* by HPLC/DAD/ESI-MSn. **Journal of pharmaceutical analysis**, v. 2, n. 1, p. 35-42, 2012. ISSN 2095-1779.

YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A. A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 8, p. 4083-4089, 2001. ISSN 0021-8561.

ZORZIN, F. M. Avaliação da atividade de inibição de alfa-amilase e padronização do extrato aquoso da folha de *Eugenia dysenterica*. 2014.

ZOU, Y. et al. Antioxidant activity and phenolic compositions of lentil (*Lens culinaris* var. Morton) extract and its fractions. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 6, p. 2268-2276, 2011. ISSN 0021-8561.