

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

Produção de uma fração concentrada em alfa-amilase salivar humana (HSA)
como alvo para descoberta de novos inibidores e fracionamento do extrato
hidroalcólico da casca de *Pouteria* sp.

Aluna: Neire Moura de Gouveia

Orientador: Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

UBERLÂNDIA - MG
2008

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

**Produção de uma fração concentrada em alfa-amilase salivar humana (HSA)
como alvo para descoberta de novos inibidores e fracionamento do extrato
hidroalcólico da casca de *Pouteria* sp.**

ALUNA: Neire Moura de Gouveia

Orientador: Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

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

**UBERLÂNDIA-MG
2008**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

G719p Gouveia, Neire Moura de, 1984-
Produção de uma fração concentrada em alfa-amilase salivar humana (HSA) como alvo para descoberta de novos inibidores e fracionamento do extrato hidroalcolólico da casca de *Pouteria sp.* / Neire Moura de Gouveia. - 2008.
62 f. : il.

Orientador: Foued Salmen Espindola.
Dissertação(mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.

1. 1. Plantas medicinais - Teses. 2. Enzimas - Teses. I. Espindola, Foued Salmen. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 633.88

Elaborado pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação

Palavras-chave: alfa-amilase salivar humana, *Pouteria ramiflora*, inibição enzimática.



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

**Produção de uma fração concentrada em alfa-amilase salivar humana (HSA)
como alvo para descoberta de novos inibidores e fracionamento do extrato
hidroalcolólico da casca de *Pouteria* sp.**

ALUNA: Neire Moura de Gouveia

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Foued Salmen Espindola (Orientador)

Examinadores:

Paulo Sérgio Pereira - UNAERP
Milton Vieira Coelho – UFU

Data da Defesa: ____ / ____ / ____

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

(Orientador)

*“Já perdoei erros quase imperdoáveis,
tentei substituir pessoas insubstituíveis
e esquecer pessoas inesquecíveis.
Já fiz coisas por impulso...
Já me decepcionei com pessoas
quando nunca pensei me decepcionar,
mas também decepcionei alguém.
Já abracei para proteger,
já dei risada quando não podia,
Já fiz amigos eternos, já amei e fui amado,
Mas também já fui rejeitado,
Já gritei e pulei de tanta felicidade...
Já chorei ouvindo música e vendo fotos...
Já pensei que fosse morrer de tanta saudade...
Não passo pela vida....
E você também não deveria passar.
Viva!!!!!!
Bom mesmo é ir à luta com determinação,
Abraçar a vida e viver com paixão,
Perder com classe e vencer com ousadia,
Porque o mundo pertence a quem se atreve
e
A VIDA É MUITO
para ser insignificante”*

(Charles Chaplin, Vida)

Dedicatória

Dedico este trabalho a Deus, minha família, amigos, enfim a todos que contribuíram para a realização do mesmo.

Agradecimentos

À Deus pela força e amparo nos momentos de dificuldade e por me permitir vencer mais uma etapa da minha vida.

Aos meus pais Ronaldo e Rosemeire que sempre me acompanharam, incentivaram e mais do que pais foram meus amigos e a minha fortaleza. Sempre abdicaram dos seus próprios sonhos para realização dos meus mesmo sem ter condições. Pessoas simples, humildes que a escola da vida deu o título de doutores nas áreas de dignidade, humildade, fraternidade e educação dos filhos.

À minha amada irmã e companheira Thais Moura pela paciência e compreensão.

Aos meus tios Ronivaldo e Luciene, meus primos Thiago e Matheus por me acolherem em seu lar me adotando como membro da família.

Aos meus familiares em geral pela força e apoio.

À Profa. Dra. Rosy Iara Maciel Azambujo Ribeiro pelo incentivo no prosseguimento dos meus estudos e ter me ensinado os passos iniciais da ciência.

Ao meu orientador Prof. Dr. Foued Salmen Espindola por contribuir com meu crescimento acadêmico, humano e profissional. Pela dedicação e orientação permitindo a realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (Labibi) e Laboratório de Bioquímica do Exercício (Labes), em especial a Renata Roland, Luciana Calábria, Rogério Lacerda, Leonardo Gomes, Renato Oliveira, Tatiane Vanessa, Nathália, Vivian, Anibal, Leo Bruno, Romeu e Mundim que me auxiliaram na rotina do Labibi.

Às amigas e companheiras do grupo feminino do Labibi Lú, Rê, Ana Clara, Lets, Livinha, Simone, Ana Flávia, Lorena, Vanessa, Andréia, Claudinha pelo apoio, carinho e momentos de descontração.

Às ICs Fabiana Barcelos e Fernanda Alves pelo auxílio nos experimentos e participação do meu crescimento na co-orientação.

Aos alunos e estagiários Elberth, Mário, Lourdes, Fabícia e Sara que passaram pelo grupo de plantas medicinais do Labibi contribuindo na parte experimental deste trabalho e hoje mais que alunos se tornaram meus amigos.

À amiga de todas as horas Vilma Lúcia Moura pelo companheirismo e ombro amigo.

Aos amigos, funcionários e professores do Instituto de Genética e Bioquímica pela amizade e colaboração.

Ao Prof. Dr. Hudson Armando Canabrava responsável pelo Laboratório de Farmacologia da UFV pela amizade e permitir a utilização do laboratório.

Ao Prof. Dr. Wilson Felipe responsável pelo Laboratório de Fitoterapia da UFV pelo carinho, amizade e permitir a utilização das instalações do laboratório.

À Profa. Dra Júlia Costa-Cruz e a técnica Maria do Rosário do Laboratório de Parasitologia-UFV pela atenção e permitir a utilização do liofilizador.

À Prof. Dra. Laila Salmen Espindola responsável pelo Laboratório de Farmacognosia da UNB pelo apoio e receptividade.

Aos amigos Everton e Aline do Laboratório de Farmacognosia da UNB pela amizade, apoio e receptividade.

À Profa. Dra. Ana Angélica Almeida Barbosa e a aluna Juliana pelo apoio na identificação das espécies de Pouteria sp. na Reserva Ecológica do Caça e Pesca.

À Profa. Dra. Suzelei de Castro França, coordenadora da Unidade de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto-UNERP, pelo acolhimento, receptividade e permitir parte da realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Sérgio Pereira responsável pelo Laboratório de Química de Produtos Naturais-UNAERP, pela receptividade, empenho e colaboração em parte deste trabalho.

Aos amigos, funcionários e professores da Unidade de Biotecnologia, em especial à Sarazete, Rosa de Belém, Renata e Letícia pela amizade, apoio nos momentos de dificuldade e por mostrar uma maneira descontraída de viver a vida.

Ao Prof. Dr. Marcelo Tavares pela contribuição estatística.

Ao CNPQ, UFV, Rede Fitocerrado, Pro Biotec e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Enfim, impossível citar todas as pessoas que fizeram parte dessa história, mas deixo meu sincero agradecimento a todos que me apoiaram e me deram força para vencer mais essa etapa da minha vida, pois as minhas maiores conquistas foram às novas amizades, o fortalecimento das amizades antigas e as lições aprendidas que me servirão de degraus para a conquista de novos desafios que estão por vir...

Muito Obrigada!!!!!!!!!!!!

Índice

Apresentação.....	xiii
Capítulo I Fundamentação teórica.....	01
1. Introdução.....	02
2. Alfa-amilases salivar e pancreática humana: comparação estrutural.....	04
3. Inibidores de alfa-amilase.....	09
4. Biodiversidade do Cerrado brasileiro perspectivas de novas drogas com potencial em inibir a alfa-amilase.....	13
5. Referências.....	15
 Capítulo II.....	 25
 Resumo.....	 26
Abstract.....	27
1. Introdução.....	28
2. Material Métodos.....	30
2.1 Produção da HSA-CTI.....	30
2.1.1 Coleta e preparo da amostra de saliva.....	30
2.1.2 Cromatografia de troca iônica em coluna de Q-Sepharose.....	30
2.1.3 Determinações protéicas.....	31
2.1.4 Eletroforese (SDS-PAGE)	31
2.1.5 Western blotting.....	31
2.1.6 Ultrafiltração.....	32
2.1.7 Ensaio para determinar a atividade da HSA-CTI pelo método cinético GalG2CNP em microplacas.....	32
2.2 Preparo do material vegetal.....	33
2.2.1 Ensaio de inibição da HSA-CTI <i>in vitro</i> com extratos de <i>Pouteria sp.</i>	34
3.0 Resultados e discussão.....	35
4. Referências.....	43

Capítulo III.....	48
Resumo.....	49
Abstract.....	50
1. Introdução.....	51
2. Material Métodos.....	52
2.1 Preparo do material vegetal.....	52
2.2 Fracionamento do EHP-C.....	52
2.3 Ensaio de inibição da alfa-amilase salivar pelas frações de <i>Pouteria</i> sp.....	53
2.4 Dosagem de taninos.....	54
3. Resultados e discussão.....	55
4. Referências.....	58
Anexo.....	60

Lista de figuras do Capítulo I

Figura 1. Representação esquemática da cadeia polipeptídica da alfa-amilase pancreática humana.....	06
Figura 2: Comparação das seqüências alinhadas de alfa-amilases pancreática e salivar humana, de porco, Taka e Niger.....	08

Lista de figuras do Capítulo II

Figura 1: Estrutura do substrato 2-cloro-4-nitrofenil-4-O- β -D-galactopiranosil-maltotriose (GalG2CNP).....	33
Figura 2: Perfil à 280nm das frações 19-44 eluídas da coluna, atividade amilásica (U/mL) e SDS-PAGE das frações obtidas da coluna de Q-Sepharose.....	36
Figura 3: Western blotting com anticorpo anti-HSA.....	36
Figura 4: Em a, velocidade de reação em função da concentração de substrato (0,5-50mM) para a HSA-CTI seguindo a equação de Michaelis-Menten. Em b, representação de Lineweaver-Burk para determinação do K_m	37
Figura 5: Porcentagem de inibição da HSA-CTI obtida da coluna de Q-Sepharose pelos extratos aquoso por decocção (EADP-C), aquoso por infusão (EAIP-C), etanólico (EEP-C) e hidroalcólico (EHP-C) da casca de <i>Pouteria</i> sp. pré-incubação 10 e 30min.....	39
Figura 6: Atividade da HSA-CTI na ausência e na presença de DMSO com pré-incubação por 30min (n=4).....	40
Figura 7: Curva de concentração para determinação do IC ₅₀ do extrato hidroalcólico de <i>Pouteria</i> sp. sobre a atividade da HSA-CTI em diferentes concentrações (3,0-100mg/mL) com pré-incubação por 30min.....	41
Figura 8: Curva de concentração para determinação do IC ₅₀ do inibidor, tipo I (Sigma) extraído do trigo (<i>Triticum aestivum</i>) sobre a atividade da HSA-CTI em diferentes concentrações (0,31-0,01U/mL), com pré-incubação por 30min.....	42

Lista de tabelas do Capítulo II

Tabela 1: Perfil eletroforético e atividade amilásica durante os estágios da produção da fração HSA-CTI a partir da saliva humana.....	37
---	----

Lista de figuras Capítulo III

- Figura 1:** TLC das frações do extrato EHP-C reunidas da coluna de Sephadex LH-20, fase móvel n-butanol, ácido acético e água (4:1:5 v/v), revelada com vanilina sulfúrica.....55
- Figura 2:** Porcentagem de inibição da atividade da HSA-CTI pelo extrato bruto de *Pouteria* sp., frações obtidas da coluna de Sephadex LH 20 e catequina (Sigma) com pré-incubação por 30min. Foram utilizados como controle DMSO e etanol.....56
- Figura 3.** Cromatogramas das frações POUN 2 e 3 a 280nm em HPLC analítico (metanol/ácido acético 0,01%) e semipreparativo (metanol/água); cromatogramas dos padrões ácido gálico e catequina a 280nm em HPLC analítico; e TLC das frações de POUN 2 reunidas do HPLC.....57

Apresentação

As alfa-amilases salivar e pancreática são enzimas importantes no metabolismo de carboidratos, pois são responsáveis pela hidrólise da ligação α -1,4-glicosídica do amido. Recentes estudos de inibição destas enzimas são realizados visando a descoberta de novas drogas com potencial em reduzir a hiperglicemia pós-prandial implicando em possível tratamento para diabetes tipo 2 e obesidade. As seqüências primárias das alfa-amilases pancreática (HPA) e salivar (HSA) exibem 99% de similaridade. Isto sugeriu que a HSA poderia ser usada como alvo para estudos de prospecção e caracterização de inibidores da digestão de carboidrato com potencial para o controle da hiperglicemia pós-prandial. Além disso, o processo de coleta da saliva não é invasivo, ao contrário do suco pancreático que é obtido pela coleta de aspirados duodenais ou canulação endoscópica. Por isso, neste estudo optou-se por obter uma fração concentrada em HSA por cromatografia de troca iônica que permitiu o estudo de sua inibição *in vitro* pelo extrato e frações de *Pouteria ramiflora*.

A família Sapotaceae possui 107 gêneros e mais de 1000 espécies. Essas espécies vivem em áreas tropicais e subtropicais. O gênero *Pouteria* é diversificado em espécies, porém há pouca investigação científica a respeito de seu aproveitamento farmacológico. Em estudo anterior realizado em nosso laboratório verificou-se que o extrato hidroalcólico da casca de *P. ramiflora* dentre outras preparações (aquoso por decocção e maceração, etanólico e hidroalcólico) foi mais eficaz sobre a inibição da alfa-amilase salivar humana *in vitro*. Assim, neste estudo resolveu-se avaliar a inibição da fração HSA-f pelo extrato hidroalcólico da casca de *P. ramiflora* e suas frações.

Esta dissertação de mestrado é composta de três capítulos descritos conforme as normas do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica (PGGB), sendo os dois últimos de acordo com a revista Phytomedicine (<http://www.elsevier.com/fundingbodies>). No primeiro capítulo é apresentado uma fundamentação teórica do tema proposto e trabalhado nos demais capítulos. O segundo capítulo refere-se à obtenção de uma fração concentrada em HSA por cromatografia de troca iônica para realização de estudos de inibição por extratos de *P. ramiflora*. O terceiro capítulo foi desenvolvido na Unidade de Biotecnologia

da Universidade de Ribeirão Preto sob orientação do Prof. Dr. Paulo Sérgio Pereira, onde realizamos o fracionamento do extrato hidroalcólico de *P. ramiflora* para identificar as potenciais substâncias inibidoras da atividade da HSA.

Capítulo I

Fundamentação teórica

Comparação estrutural e funcional das alfa-amilases humana e análise da inibição da sua atividade por extratos vegetais.

1. Introdução

Alfa-amilases (α -1,4-D-glicano-4-glicanohidrolases, EC 3.2.1.1) são endoglucanases, amplamente distribuídas em todos os reinos (Bactéria, Archaea e Eucariotas). Estas enzimas catalisam reações como hidrólise e transglicosilação de polissacarídeos (Janecek, 2000; Yamamoto, 1995), tendo papel importante no metabolismo de carboidratos em microorganismos, plantas e animais (Franco et al. 2002). De acordo com sua estrutura primária estas enzimas foram classificadas dentro da família 13 das glicosil hidrolases (Henrissat, 1991a, b) que também inclui as alfa-glicosidases. A análise da estrutura terciária revela que o domínio catalítico das enzimas desta família, especialmente o sítio ativo, é muito conservado (Ramasubbu et al. 1996a; Aghajari et al. 1998). De fato, alguns estudos mostram que membros desta família de glicosidases utilizam um mecanismo catalítico comum (McCarter and Withers, 1996; Rydberg et al. 2002; Tao et al. 1989; Uitdehaag et al. 1999).

Diversos estudos foram realizados para avaliar a inibição da alfa-amilase na presença de inibidores sintéticos e vegetais com importância biotecnológica para agricultura, medicina e indústria alimentícia e farmacêutica (Ali et al. 2006; Conforti et al. 2005; Gad et al. 2006; Lulek et al. 2000; Kandra et al. 2005; McDougall et al. 2005; Kim et al. 2005b; Yoon and Robyt, 2003; Sasaki et al. 2004). O enfoque principal desta revisão é a importância dos estudos de inibição da alfa-amilase humana para a medicina, mas será apresentada uma pequena discussão envolvendo outras áreas, a fim de ilustrar a importância dos estudos de inibição. Na agricultura há grande interesse no estudo de inibidores visando à produção de plantações transgênicas resistentes ao ataque de pragas, pois carboidratos na forma de amido também fazem parte da dieta de insetos e suas larvas (Yoon and Robyt, 2003). Vegetais transgênicos expressando genes inibidores de alfa-amilase apresentam pouco efeito na digestão de mamíferos (Pusztai et al. 1999), o que sugere que estas proteínas poderiam ser seguramente usadas para produção de plantas resistentes (Lulek et al. 2000). Isso ocorre porque muitos inibidores de alfa-amilase mostram especificidade pela enzima alvo reconhecendo somente uma entre várias isozimas ou enzimas a partir de diferentes espécies (Weselake et al. 1983). Outros inibidores apresentam elevada

afinidade pelas alfa-amilases tanto de mamíferos como de insetos (Franco et al. 2002) com cerca de 35% de identidade na sequência. Vários exemplos são encontrados de inibidores atuando em insetos, mas não atuam em mamíferos e vice-versa (Franco et al. 2002; Ho et al. 1994).

Outro enfoque do estudo de inibição da alfa-amilase é o controle de cáries, pois a amilase liga à bactérias orais *Streptococcus viridans*. Estas bactérias obtêm sua fonte de alimento através da hidrólise do amido pela alfa-amilase. O metabolismo de maltose pela amilase salivar leva à produção de ácido lático pelas bactérias orais, que pode levar à dissolução do esmalte dental, um passo crítico na formação da placa bacteriana e conseqüente origem das cáries (Kandra et al. 2005).

A clivagem do amido pelas alfa-amilases constitui o primeiro passo na degradação enzimática de polissacarídeos, sendo essencial na assimilação de carboidratos (Payan, 2004). A digestão do amido inicia na boca com a alfa-amilase salivar (Yoon and Robyt, 2003), resultando na degradação do substrato polimérico em curtos oligômeros (Ferey-Roux et al. 1998). Em seguida é parada pelo baixo pH do estômago. Quando o bolo alimentar passa do estômago para o intestino delgado ele é neutralizado e a digestão do amido é completada pela alfa-amilase secretada no intestino delgado pelo pâncreas (Yoon and Robyt, 2003). Baseando-se na importância da amilase no metabolismo de carboidratos, recentes estudos de inibição desta enzima são realizados visando a descoberta de novas drogas com potencial em reduzir a hiperglicemia pós-prandial implicando em possível tratamento para diabetes tipo 2 e obesidade (Ali et al. 2006; Gad et al. 2006; Oneda et al. 2004). Os inibidores reduzem a glicemia pós-prandial através da diminuição da digestão de carboidratos com conseqüente diminuição da absorção de glicose no intestino (Oneda et al. 2004). Neste último caso os estudos *in vitro* utilizam como alvo a alfa-amilase pancreática. Como o processo de coleta da saliva não é invasivo, ao contrário do suco pancreático que é obtido pela coleta de aspirados duodenais, canulação endoscópica ou pâncreas fresco, seria interessante usar como alvo a alfa-amilase salivar. Além disso, o grau de homologia das alfa-amilases humana sugere que estudos inibição possam ser realizados utilizando a alfa amilase salivar como alvo de estudo. Assim, esta revisão tem como objetivo comparar estrutural e funcionalmente as

alfa-amilases salivar e pancreática humana, com ênfase na importância médica de estudos de sua inibição, principalmente por inibidores de origem vegetal.

2. Alfa-amilases salivar e pancreática humana: comparação estrutural

Dois tipos de alfa-amilases são produzidos pelos mamíferos, alfa-amilase salivar humana (HSA) e a alfa-amilase pancreática (HPA) (Berk, 1979b; Yoon and Robyt, 2003). Estas enzimas possuem uma cadeia polipeptídica composta de 496 aminoácidos. Em humanos, essa cadeia polipeptídica é codificada pelo cromossomo 1 como parte de uma família poligene, com dois tipos de genes expressos em altos níveis nas glândulas salivares (Amy-1) e no pâncreas (Amy-2) (Gumucio et al. 1988). Cada gene pode ocorrer em um dado número de alelos originando menos de 12 fenótipos distintos para isozimas salivares e seis formas para isozimas pancreáticas (Hirtz et al. 2005). Além disso, estes genes são regulados para que as diferentes isozimas sejam sintetizadas pelas glândulas salivar e pancreática (Keller et al. 1971). As diferentes isozimas salivares e pancreáticas foram separadas por técnicas eletroforéticas, focalização isoeletrica, eletroforese em gel de poliacrilamida e cromatografia (Berk et al. 1977a; Ferey-Roux et al. 1998; Keller et al. 1971).

Kauffman et al. (1970a) encontraram que a HPA é uma mistura de mais de cinco isozimas as quais podem ser separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida. Matsuura et al. (1978) em estudo de focalização isoeletrica mostraram a existência de dois componentes no suco pancreático, um grande (HPA I) com pI 7.1 e um pequeno (HPA II) com pI 6,5. Em outro estudo de focalização foram encontrados três componentes um grande (pI 7,2), um pequeno (pI 6,6) e um bem menor (pI 6,2), sendo que o último não foi purificado. Os dois primeiros foram testados quanto à atividade amilolítica juntamente com o inibidor acarbose não havendo diferenças significativas em relação aos parâmetros cinéticos. Os autores concluíram que duas moléculas de acarbose se ligam a HPA (Ferey-Roux et al. 1998). Alguns autores consideram que a HSA é produzida em duas famílias principais (família A e família B). As isozimas da família A são glicosiladas com um simples complexo N-ligado, enquanto as isozimas da família B são do tipo não-glicosiladas (Kauffman et al. 1970a; Steiner and Keller, 1968).

Rosenmund & Kaczmarek (1976) separou por eletrofocalização seis isozimas para HSA e oito para HPA com diferentes pontos isoelétricos. Liang et al. (1999), em estudo de correlação entre isozimas e cáries dentais separadas por cromatografia de interação hidrofóbica e eletroforese de zona capilar encontraram uma mistura de mais de três isozimas de HSA em pH 6,5. Há algumas diferenças físico-químicas nas propriedades destas isozimas, mas os seus sítios ativos podem ser idênticos (Kandra and Gyémánt, 2000). Uma explicação para esta diversidade está no fato de que a alfa-amilase secretada na saliva sofre modificações pós-transducionais (Kauffman et al. 1973b; Kandra and Gyémánt, 2000). A HSA aparece na forma glicosilada (62kDa) e não-glicosilada (55kDa) (Bank et al. 1991; Nishide et al. 1986), sendo que mais de 25% é secretada nesta última forma (Kauffman et al. 1973b; Kandra and Gyémánt, 2000). Outras modificações relatadas incluem desaminação pós-secreção dos resíduos de asparagina e glutamina (Karn et al. 1973). A porcentagem de conversão de glicogênio e amido em glicose, maltose, maltotriose, maltotetraose e oligossacarídeos é dependente do substrato e varia de uma isozima para outra (Rosenmund and Kaczmarek, 1976). Os estudos mostram diferenças na quantidade de isozimas produzidas em cada glândula de acordo com a técnica empregada, pH e glândula secretora. Maiores estudos devem ser realizados para avaliar a composição e proporção de isozimas da saliva e do pâncreas e verificar o comportamento destas com diferentes substratos e na presença de inibidores.

A HSA e HPA (Fig. 1) são proteínas monoméricas, ligantes de cálcio, sendo que suas estruturas consistem de três domínios. O domínio A é constituído pelos resíduos 1-99, 170-404 para HSA e 1-99 e 169-404 para HPA (Brayer et al. 1995; Ramasubbu et al. 1996a). Este domínio consiste em oito cadeias β -barril paralelas rodeadas por um concêntrico cilindro de segmentos alfa-helicoidais. Uma interessante característica do domínio A é que ele é construído a partir de dois segmentos da cadeia polipeptídica que inclui os resíduos 1-99 e 169-404 (Brayer et al. 1995).

O domínio B é construído a partir dos resíduos 100-169 para HSA (Ramasubbu et al. 1996a) e resíduos 100-168 para HPA, ocorrendo entre a terceira cadeia β e a α -helice da β -barril central do domínio A. O enovelamento do domínio B forma uma cavidade oposta a parede β -barril do domínio A, onde o sítio

ligante de cálcio é estabelecido. Um papel do sítio ligante de cálcio na alfa-amilase humana é estabilizar a estrutura do domínio B (Brayer et al. 1995).

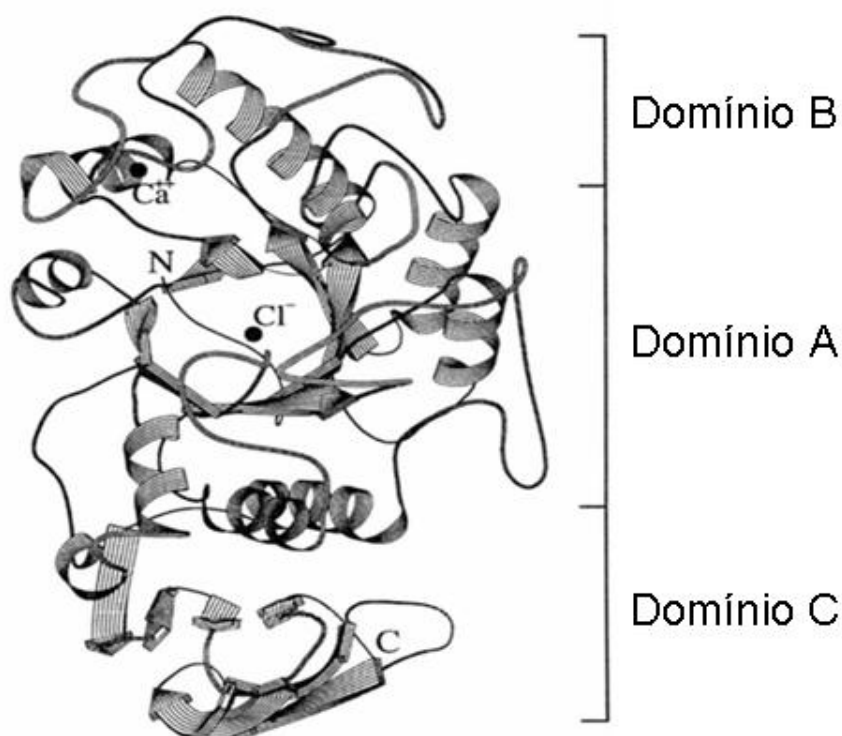


Figura 1. Representação esquemática da cadeia polipeptídica da alfa-amilase pancreática humana. A figura indica as posições relativas dos três domínios estruturais presentes nesta proteína (Domínio A, resíduos 1-99, 169-404; Domínio B, resíduos 100-168; Domínio C, resíduos 405-496), juntamente com as localizações dos sítios ligantes de cloro e cálcio. N- e C- terminal da cadeia polipeptídica são representados como N e C, respectivamente. O destaque central desta estrutura são as oito cadeias β -barril paralelas que formam o esqueleto do domínio A que contém a região do sítio ativo. Adaptado de: Brayer et al. 1995.

O domínio C ocorre a partir dos resíduos 405-496 nas duas enzimas, HPA e HSA. O domínio C forma uma estrutura β -barril antiparalela e é um domínio independente (Kandra et al. 2005; Ramasubbu et al. 1996a) de função ainda desconhecida (Ramasubbu et al. 1996a; Ramasubbu et al. 2003b). Além disso, este domínio está mais associado com o domínio A. Em termos de sequência primária, o domínio C é mais variável entre as alfa-amilases de diferentes origens (MacGregor, 1988; Jespersen et al. 1993).

O sítio ativo da HSA e alfa-amilases de mamíferos é bem estabelecido e está presente no domínio A apresentando um formato de fundo V (Brayer et al. 1995; Ramasubbu et al. 2003b). Além disso, é orientado por três resíduos

catalíticos Asp197, Glu233 e Asp300. Também próximo ao sítio ativo está o sítio de ligação do íon cloro (Brayer et al. 1995). O sítio ativo é dividido em subsítios ligantes de glicanos (-4, -3, -2 e -1) e subsítios ligantes de aglicanos (+1, +2 e +3) (Ramasubbu, 2003b). Estes subsítios foram investigados por interação com resíduos de substrato glicosil e a clivagem ocorre entre os subsítios -1 e +1 (Ramasubbu et al. 1996a). Em termos de região de sítio ativo, duas substituições nos resíduos da HSA podem afetar a ligação do substrato. A primeira substituição envolve a troca do resíduo de Thr163 por um resíduo de serina. Em alfa-amilase de porco estes resíduos interagem na ligação com substratos (Qian et al. 1994b). Na segunda substituição, o resíduo de Leu196 é trocado por um resíduo de isoleucina no meio da região altamente conservada da sequência primária. Na proximidade desta substituição estão os resíduos de Arg 195, onde liga o íon cloro; Asp 197, onde está o resíduo catalítico e His201, onde é parte do sítio ligante de cálcio (Brayer et al. 1995).

A sequência de aminoácidos da HPA e HSA foi deduzida a partir de sequências nucleotídicas de cDNAs (Nakamura et al. 1984) e a HSA foi também determinada a partir de genes clonados (Nishide et al. 1986). A sequência primária da HSA e HPA (fig. 2) são altamente homólogas e exibem elevada similaridade estrutural com 99% de homologia (Brayer et al. 1995; Nishide et al. 1986; Ramasubbu et al. 1996a,b). Funcionalmente a HSA e a HPA são similares, mas não possuem um padrão de clivagem idêntico quando testadas com uma variedade de substratos (Minamiura, 1988). As diferenças funcionais evidenciadas aparecem a partir da substituição de 15 aminoácidos entre estas sequências, muitas das quais ocorrem na região do sítio ativo (Brayer et al. 1995). Uma característica marcante de alfa-amilases isoladas a partir de diferentes fontes é a divergência observada na sua sequência primária. Por exemplo, em sequências alinhadas de alfa-amilases de animais e fungos foi encontrado homologia de aproximadamente 10% (Brayer et al. 1995).

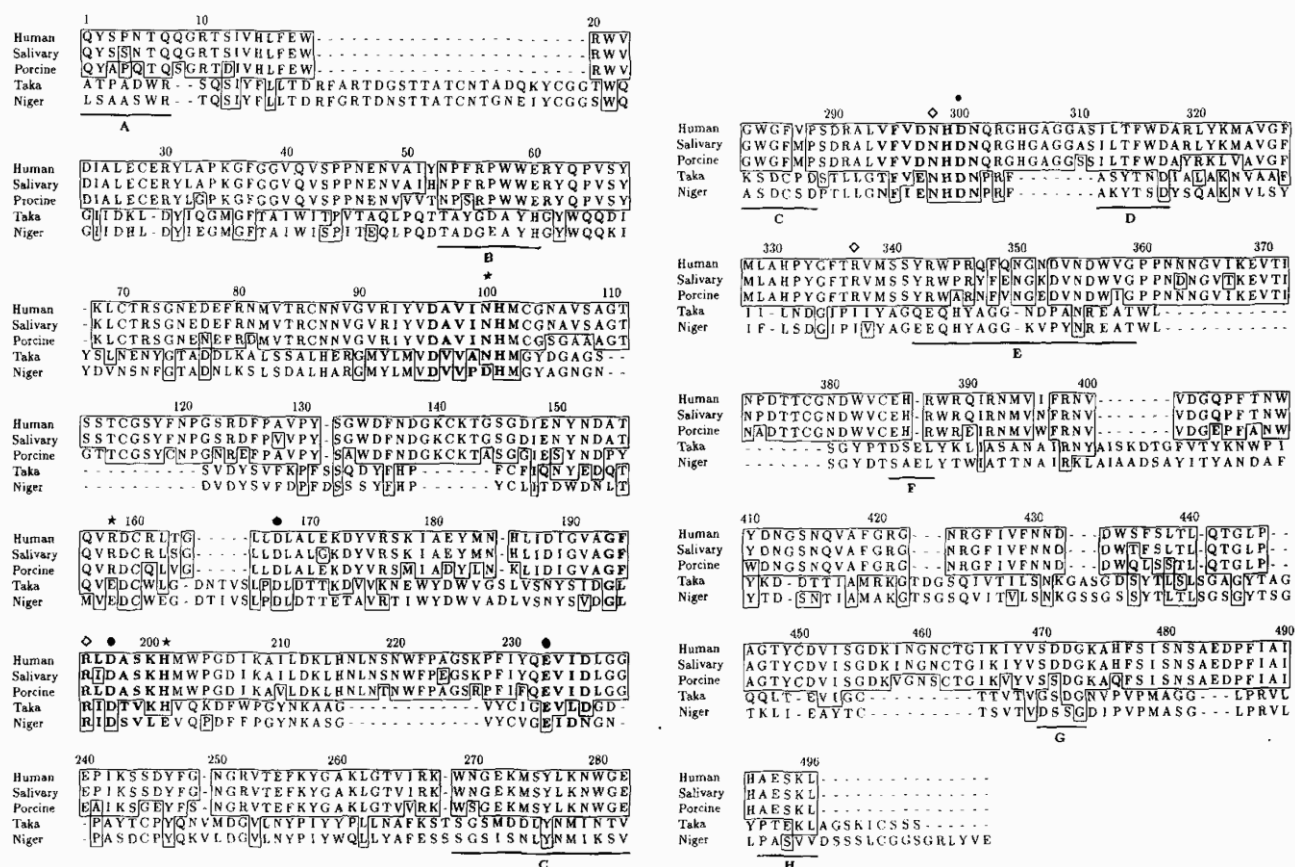


Figura 2: Comparação das seqüências de alfa-amilases pancreática e salivar humana, porco, Taka (*Aspergillus oryzae*) e (*A. niger*) Niger. Seqüências de alfa-amilases pancreática e salivar humana, porco, Taka e Niger foram alinhadas para maximizar a presente homologia estrutural. O único código de letras é usado para identificar aminoácidos e o número do resíduo é baseado na seqüência da alfa-amilase pancreática humana. Os resíduos são indicados formando sítios ligantes de cálcio (*) e cloro (◊), bem como aqueles resíduos (●) que tomam parte diretamente no mecanismo catalítico da alfa-amilase. Quatro segmentos curtos da cadeia polipeptídica que são altamente conservados nestas alfa-amilases são marcados em negrito. Porções da cadeia polipeptídica que ocorrem na mesma localização da seqüência primária nesta figura, mas que são estabelecidas em diferentes conformações na forma enovelada entre alfa-amilases de mamíferos e fungos são sublinhadas e marcadas com as letras A-H. Adaptado de: Brayer et al. 1995.

Estudos estruturais mostram que é elevada a homologia existente entre as alfa-amilases quando comparam a cadeia polipeptídica enovelada. Estudos de estruturas completas de alfa-amilase já incluem a alfa-amilase da cevada (Kadziola et al. 1994), de porco (Qian et al. 1993a; Larson et al. 1994) e enzimas de fungo a partir de *Aspergillus oryzae* (Swift et al. 1991) e *Aspergillus niger* (Brady et al. 1991). Estes estudos mostraram que estas alfa-amilases tem regiões

do sítio ativo similares que estão localizadas ao redor de três grupos carboxílicos altamente conservados.

3. Inibidores de alfa-amilase

Em geral, as plantas contêm certo grau de resistência contra predação de insetos, fato demonstrado pelo limitado número de insetos capazes de alimentar de uma determinada planta. Esta resistência resulta de uma série de mecanismos de defesa adquiridos durante a evolução (Schuler, 1998). Assim, as plantas contêm um grande número de inibidores contra amilases e proteinases. Eles estão presentes nas sementes e órgãos vegetais e estão envolvidos na resistência contra predação por insetos fitopatógenos (Oneda et al. 2004).

Os inibidores vegetais são classificados em protéicos e não-protéicos. Sete tipos de inibidores protéicos de alfa-amilase são encontrados na natureza definidos por similaridades na seqüência e estrutura tridimensional (Franco et al. 2002; Lu et al. 1999). Seis tipos são a partir de vegetais superiores enquanto os outros ocorrem em espécies de *Streptomyces* (Murao et al. 1980). Os seis tipos proposto por Richardson (1990) são classificados em seis classes: *lectin-like*, *knottin-like*, *cereal-type*, *kunitz-like*, *γ -puothionin-like* e *thaumatin-like*.

A maior parte dos estudos de inibição da amilase foram realizados com inibidores protéicos originados de cereais (Fontanini et al. 2007; Santimone et al. 2004; Oneda et al. 2004; Valencia et al. 2000), desde 1943 (Kneen et al. 1943), conhece-se a existência de inibidores de alfa-amilase em cereais. Em plantas, inibidores protéicos estão presentes em cereais como, trigo (*Triticum aestivum*) (Feng et al. 1996; Oneda et al. 2004), cevada (*Hordeum vulgareum*) (Abe, 1993), centeio (*Secale cereale*) (Iulek et al. 2000), mas também em leguminosas com feijão (*Phaseolus vulgaris*) (Santimone et al. 2004).

Em 1975, Marshall e colaboradores purificaram um inibidor de alfa-amilase a partir do feijão *Phaseolus vulgaris* (feijão branco), denominado de faseolamina. Estudos posteriores demonstraram que esse inibidor é uma glicoproteína tetramérica composta de duas subunidades α - de aproximadamente 10,8KDa, duas subunidades beta de aproximadamente 15kDa e apresenta atividade

inibitória ótima em pH em torno de 5,5 e temperatura de 37°C (Le Berre-Anton, 1997). A faseolamina é um inibidor específico para alfa-amilases de animais, não inibindo amilases de plantas, bactérias e fungos (Marshall, 1975). Além disso, o feijão comum (*P. vulgaris*) contém uma família de proteínas de defesa que inclui as fitoemaglutininas (PHA), arcelinas e inibidores de alfa-amilase (α -AI). Três diferentes isoformas de α -AI foram descritas: α -AI1, α -AI2 e α -AI3. α -AI1 é uma glicoproteína dimérica com 43kDa ($\alpha_2\beta_2$) homóloga à PHA (Santimone et al. 2004). α -AI1 e α -AI2 possuem especificidade de inibição, sendo que o primeiro inibe a amilase pancreática de porco (PPA) e não inibe a alfa-amilase de *Zabrotes subfasciatus* (ZSA). Em contraste, α -AI2 não é específico para PPA, mas inibe ZSA.

A classe de inibidores não-protéicos contém diversos tipos de componentes orgânicos como, acarbose, isoacarbose, acarviosine-glicose, ácido hibiscus e ciclodextrinas (Franco et al. 2002).

A acarbose é um produto natural produzido pela fermentação de *Actinoplanes* sp. Ela é um pseudotetrassacarídeo com um ciclitol (2,3,4-triidroxi-5-(hidroximetil)-5,6-ciclohexano na configuração D-glicose) ligado no nitrogênio da 4-amino-4,6-dideoxi-D-glicopiranosose, cuja a qual é ligado à α -(1-4) para maltose. Acarbose é um inibidor competitivo da alfa-glicosidase, amilase, glicanotransferase ciclodextrina, glicoamilase e glicanosucrases. O mecanismo de inibição para estas enzimas é devido ao anel ciclohexano insaturado e a ligação nitrogênio glicosídica que mimetiza o estado de transição para clivagem enzimática de ligações glicosídicas (Yoon and Robyt et al. 2003).

As duas formas de ácido hibiscus, purificadas a partir de chá Roselle (*Hibiscus sabdariffa*), a acarviosine-glicose, isoacarbose e α -, β - e γ -ciclodextrinas são altamente ativos contra HPA (Kim et al. 1999a; Qian et al. 2001c). A atividade inibitória destes componentes é em parte devido a sua estrutura cíclica que lembra o substrato da alfa-amilase e, portanto liga ao sítio catalítico da enzima (Franco et al. 2002). Em estudos prévios de cristalografia de raio-X, observou-se três moléculas de ciclodextrinas I-III ligadas a PPA. A alfa-ciclodextrina I e II ligam perto do sítio catalítico, enquanto alfa-ciclodextrina III liga a um sítio acessório. A α - e β -ciclodextrina não são hidrolisadas por α -amilases, exceto amilases de fungos (Kamitori et al. 1999; Suetsugu et al. 1974). O mecanismo de inibição da

PPA pela ciclodextrina é dependente do pH, temperatura e substrato. Quando o substrato é a amilose a inibição é do tipo competitiva, mas quando se usa maltopentose a inibição é incompetitiva (Kokiekoulou et al. 2001).

É crescente o número de estudos de inibição da alfa-amilase e potencial hipoglicemiante de extratos vegetais *in vitro* e em modelos animais (Ali et al. 2006; Arambewela et al. 2005; Conforti et al. 2005; Gad et al. 2006; McDougall et al. 2005; Kim et al. 2005b; Sasaki et al. 2004), sendo a grande maioria baseada no uso popular. Estudos comprovam o potencial de ação de plantas antidiabéticas com propósito de conferir aprovação científica e sistemática do uso destas como agentes hipoglicemiantes (Gad et al. 2006; Ali et al. 2006; Funke and Melzig, 2006). Mais de 1123 espécies de plantas foram usadas etnofarmacologicamente ou experimentalmente para tratar sintomas de diabetes (Grover et al. 2002). Existem mais de 200 compostos puros a partir de plantas que diminuem a glicose sangüínea (Marles and Farnsworth, 1994).

As plantas têm um papel importante no tratamento de diabetes, particularmente em países em desenvolvimento, onde a maioria das pessoas tem fontes limitadas e não tem acesso a tratamentos modernos (Ali et al. 2006). O aumento na demanda de países industrialmente desenvolvidos na busca de tratamentos alternativos para diabetes, tais como medicinas baseadas em plantas, é também devido a efeitos colaterais associados com o uso de insulina e agentes hipoglicemiantes orais (Marles and Farnsworth, 1994).

No *screening* com 41 plantas usadas pela medicina tradicional da Mongólia realizado por Kobayashi et al. (2003), somente sete apresentaram mais de 30% de inibição, sendo a concentração de final de inibidor na reação foi de 300µg/mL. Após tratamento com Policlar-VT para remoção de compostos fenólicos estes extratos não demonstraram inibição. Este resultado permite concluir que o efeito inibitório destes extratos estejam relacionados com a presença destes compostos. Destas apenas *Vaccinium uliginosum* diminuiu o nível de glicose sangüínea. Há relatos de que frações polifenólicas de plantas podem alterar a utilização de glicose, independentemente da capacidade antioxidante, por influência direta sobre a atividade enzimática, ou seja, em algumas plantas foram encontradas substâncias fenólicas com atividade inibitória efetiva sobre a α -glicosidase intestinal (Matsui, et al. 2001). Kandra et al. (2004) em estudo cinético de inibição

da alfa-amilase verificaram que taninos são inibidores mais potentes do que a acarbose, apresentando inibição do tipo competitiva. O estudo de Matsui et al. 2001 observou que extratos polifenólicos de um número de plantas foram mais efetivos inibidores da alfa-glicosidase com valores de K_i semelhantes aos inibidores sintéticos (acarbose e voglibose) (Matsui et al. 2001).

No estudo realizado com plantas da Malásia por Ali et al. 2006 observou-se que o extrato hexânico de *Phyllanthus amarus* inibiu significativamente a atividade da HPA. O valor de IC₅₀ foi de 32µg/mL, havendo inibição significativa à concentrações baixas de até 10µg/mL. Foram identificados triacontanol, dotriacontanol docosanoato e mistura isomérica de ácido olenalólico e ácido ursólico, sendo a mistura de triterpenóides responsável pela inibição da atividade da amilase, mostrando IC₅₀ de 2,01µg/mL.

As plantas possuem uma variedade de compostos envolvidos na proteção contra pragas e doenças. Taninos são compostos fenólicos solúveis em água de alto peso molecular que possui habilidade de ligar a carboidratos e proteínas. Estes compostos são classificados de acordo com a estrutura química em dois grupos: hidrolisáveis e condensados. Os taninos hidrolisáveis podem ser hidrolisados por ácido (ou enzimas) em açúcares, um poliol e um ácido carboxílico fenólico. Dependendo da natureza do ácido carboxílico fenólico os taninos hidrolisáveis podem ser subdivididos em galotaninos e elagitaninos. A hidrólise de galotaninos resulta em ácido gálico enquanto a hidrólise de elagitaninos resulta em ácido elágico. O grupo de taninos condensados não possui grupo açúcar na molécula (Kandra et al. 2004). O “Tannin Handbook” do Laboratório Hangerman contém informações detalhadas sobre taninos (www.users.muohio.edu/hagermae).

Taninos apresentam diversos efeitos nos sistemas biológicos porque têm potencial de quelar íons metálicos, precipitar proteínas e são antioxidantes biológicos. Kandra et al. 2004 relata que o consumo de chá reduz cáries dentais em humanos e em animais experimentais porque contém elevado conteúdo de taninos. Os polifenóis presentes no chá verde incluem epigallocatequina galato, epicatequina galato, epigallocatequina, epicatequina galato e epicatequina (Del Rio et al. 2004). Estes compostos possuem várias funções que envolvem atividade antiviral, antioxidante, antimutagênica, anticarcinogênica, antiobesidade

e hipocolesterolêmica (Dufrese and Farnworth, 2001). Assim, vegetais contendo taninos são potenciais candidatos para o desenvolvimento de futuros fármacos ou fitoterápicos inibidores de amilase, uma vez que são vários os efeitos terapêuticos envolvidos além da inibição enzimática.

4. Biodiversidade do Cerrado brasileiro perspectivas de novas drogas com potencial em inibir a alfa-amilase

O Cerrado brasileiro, uma vegetação semelhante à savana, é uma das maiores regiões biogeográficas do mundo com mais de 7000 espécies de plantas vasculares (Mendonça et al. 1998). Muitas destas são comumente usadas como remédios naturais por pessoas que habitam a área do Cerrado para tratamento de várias doenças (Almeida et al. 1998).

A investigação de produtos naturais, muitas vezes é guiada por investigação etnofarmacológica, e representa substancial contribuição para a inovação de drogas fornecendo novas estruturas químicas e/ou mecanismos de ação (Rates, 2001). Nos últimos vinte anos no Brasil, o número de informações sobre plantas tem crescido apenas 8% anualmente (Brito and Brito, 1993). Isso mostra que em um país biologicamente tão rico, mas com ecossistemas tão ameaçados, pesquisas com plantas medicinais devem ser incentivadas. Este é o caso do bioma Cerrado, detentor de uma grande diversidade biológica e taxonômica apresentando grande número de compostos (Guarim Neto and Moraes, 2003), mas devido à expansão de áreas para agricultura é preocupante a extinção de suas espécies vegetais. Muitas delas não tiveram seus componentes estudados, cujas quais poderiam ter aplicações biotecnológicas já que muitas plantas do cerrado são conhecidas por terem aplicação médica e na indústria alimentícia (Caramori et al. 2004).

Existem poucos trabalhos em caráter preliminar de inibição da HSA envolvendo a biodiversidade brasileira, incluindo o bioma Cerrado (Albuquerque et al. 2002a, b; Antunes et al. 2007). Albuquerque et al, 2003 em estudo preliminar de bioprospecção de inibidores da HSA a partir de extratos de plantas do Cerrado verificaram a atividade inibitória de 100 extratos hexânicos e etanólicos sobre a HSA. Foram avaliadas 17 espécies, distribuídas em 6 famílias e 15 gêneros, e os

extratos foram referentes a diversas partes das plantas (madeira e casca do caule e da raiz e folha). As famílias Flacourtiaceae, Sapotaceae e Sapindaceae contêm espécies que se destacaram. Os extratos da casca do caule de *Serjania* sp., madeira do caule de *Casearia* sp., madeira do caule de *Pouteria* sp. e casca da raiz de *Cupania* sp. apresentaram taxa de inibição entre 50 a 70% na concentração de 0,02mg/mL. Os extratos da casca da raiz de *Matayba* sp., casca da raiz de *Serjania* sp., folha de *Pouteria* sp. e madeira da raiz e casca do caule de *Pouteria* sp. inibiram de 70 a 100 a atividade da alfa-amilase. Estes dados indicam que o Cerrado brasileiro possui grande potencial medicinal e que estudos para validação destas plantas devem ser incentivados para preservação e valorização da sua biodiversidade medicinal.

Estudos de caracterização, elucidação estrutural e mecanismos de ação biológicos de tais compostos devem ser realizados a fim de validar estas substâncias, porque além de contribuir para a inovação do conhecimento científico pode também levar a valorização da biodiversidade brasileira com conseqüente elevação do PIB. No Brasil, estima-se que 25% dos US\$ 8 bilhões do faturamento da indústria farmacêutica, no ano de 1996, foram originados de medicamentos derivados de plantas (Guerra et al. 2001). Embora nosso país possua a maior diversidade vegetal do mundo, com cerca de 60.000 espécies vegetais superiores catalogadas (Prance, 1977), apenas 8% foram estudadas para pesquisas de compostos bioativos e 1.100 espécies foram avaliadas em suas propriedades medicinais (Guerra et al. 2001).

Descobrir novos compostos ativos a partir da biodiversidade do Cerrado seria importante para o conhecimento científico contribuindo com informações para novos estudos. Como a alfa-amilase está envolvida no metabolismo de carboidratos sua inibição pode reduzir a absorção de glicose com conseqüente diminuição da hiperglicemia pós-prandial, assim estudos de inibição da alfa-amilase podem fornecer informações importantes para futuro tratamento de diabetes mellitus tipo 2 e obesidade.

5. Referências Bibliográficas

- Abe, J.I., Sidenius, U., Svensson, B., 1993. Arginine is essential for the α -amilase inhibitory activity of the α -amilase inhibitory activity of the α -amilase/subtilisin inhibitor (BSAI) from barley seeds. *Biochem. J.* 293, 151-155.
- Aghajari, N., Feller, G., Gerday, C., Haser, R., 1998. Crystal structures of the psychrophilic alpha-amylase from *Alteromonas haloplanctis* in its native form and complexed with an inhibitor. *Protein Sci.* 7, 564–572.
- Albuquerque, C.L., Bortolini Júnior, M.A., Mesquita, M.L., Silveira, D., Paula, J.E., Espindola, F.S., 2002. Inibição da atividade de alfa amilase da saliva humana por extratos de plantas. *In: XVII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Cuiabá.*
- Albuquerque, C.L., Paula, J.E., Espindola, L.S., Espindola, F.S., 2003. Uso de extratos vegetais em diferentes concentrações na inibição de alfa-amilase da saliva humana. *In: XVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Curitiba/PR.*
- Ali, H., Houghton, P.J., Soumyanath, A., 2006. α -amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *J. Ethnopharmacol.* 449-55.
- Almeida, S.P., Proença, C.E.B., Sano, S.M., Ribeiro, J.F., 1998. Cerrado: espécies vegetais úteis: EMBRAPA, Planaltina, Distrito Federal, pp. 38–39.
- Antunes, A.F., Jimenez, A.V., Rocha, T.L. ; S.A., M.F.G., Paula, J.E., Espindola, L.S., 2007. Atividade inibitória de extratos de plantas sobre alfa-amilase salivar. *In: VI Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, Belém - Pará. Jornal Brasileiro de Fitomedicina. São Paulo.*
- Arambewela, L.S., Arawwawala, L.D., Ratnasooriya, W.D., 2005. Antidiabetic activities of aqueous and ethanolic extracts of Piper betle leaves in rats. *J Ethnopharmacol.* 14, 239-45.

Bank, R.A., Hettema, E.H., Arwert, F., Amerongen, A. V., Pronk, J. C., 1991. Electrophoretic characterization of posttranslational modifications of human parotid salivary alpha-amylase. *Electrophoresis*, 12, 74–79.

Berk J.E., Fridhandler, L., Montgomery, K.A., 1977. Clinical application of isoamylase analysis. In: Berk, J.E. (ed.) *Developments in digestive diseases clinical relevance*. 1, pp. 133-52.

Berk, J.E., 1979. Clinical application of isoamylase analysis. *Clin. Biochem.* 12, 164-6.

Brady, R.L., Brzozowski, A.M., Derewenda, Z.S., Dodson, E.J., Dodson, G.G., 1991. Solution of the structure of *Aspergillus niger* acid alpha-amylase by combined molecular replacement and multiple isomorphous replacement methods. *Acta Crystallogr B*. 47, 521-535.

Brayer, G.D., Luo, Y., Withers, S.G., 1995. The structure of human pancreatic alpha-amylase at 1.8 Angstrom resolution and comparisons with related enzymes. *Protein Sci.* 4, 1730–1742.

Brito, A.R.M., Brito, A.A.S., 1993. Forty years of Brazilian medicinal plant research. *J. Ethnopharmacol.* 39, 53-67.

Caramori, S.S., Lima, C.S., Fernandes, K.F., 2004. Biochemical characterization of selected plant species from Brazilian savannas. *Braz. arch. biol. technol.* 47, 253-259.

Conforti, F., Loizzo, M.R., Statti, G.A., Menichini, F., 2005. Comparative radical scavenging and antidiabetic activities of methanolic extract and fractions from *Achillea ligustica*. *Ann Biol Pharm Bull.* 28, 1791-4.

Del Rio, D., Stewart, A.J., Mullen, W., Burns, J., Lean, M.E., Brighenti, F., Crozier, A., 2004. HPLC-MS analysis of phenolic compounds and purine alkaloids in green and black tea. *J. Agric. Food Chem.* 52, 2807-2815.

Dufrese, C.J., Farnworth, E.R., 2001. A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. *J. Nutr. Biochem.* 12, 404-421.

Feng, G. H., Richardson, M., Chen, M.S., Karmer, K.J., Morgan, T.D.; Reeck, G.R., 1996. α -amilase inhibitors from wheat: a sequences and patterns of inhibition of insect and human α -amilases. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26, 419-426.

Ferey-Roux, G., Perrier, J., Forest, E., Marchis-Mouren, G., Puigserver, A., Santimone, M., 1998. The human pancreatic α -amylase isoforms: isolation, structural studies and kinetics of inhibition by acarbose. *BBA.* 1388, 10-20.

Fontanini, D., Capocchi, A., Saviozzi, F., Galleschi, L., 2007. Simplified electrophoretic assay for human salivary α -amylase inhibitor detection in cereal seed flours. *J. Agric. Food Chem.* 55, 4334-4339.

Franco, O.L., Rigden, D.J., Melo, F.R., Grossi-de-Sá, M.F., 2002. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases. Structure, function and potential for crop protection, *Eur. J. Biochem.* 269, 397– 412.

Funke, I., Melzig, M., 2006. Traditionally used plants in diabetes therapy – phytotherapeutics as inhibitors of α -amylase activity. *Rev. Bras. Farmacogn.* 16, 1-5.

Gad, M.Z., El-Sawalhi, M.M., Ismail, M.F., El-Tanbouly, N.D., 2006. Biochemical study of the anti-diabetic action of the Egyptian plants Fenugreek and Balanites. *Mol Cell Biochem.* 281, 173-83.

Grover, J.K., Yadav, S., Vats, V., 2002. Medicinal plants of India with antidiabetic potential. *J. Ethnopharmacol.* 81, 81–100.

Guarim Neto, G.; Morais, R.G., 2003. Medicinal plants resources in the Cerrado of Mato Grosso State, Brazil: a review. *Acta Bot. Bras.* 4. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S01023062003000400009&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 11 Novembro, 2007. Pré-publicação.

Guerra, P.M., Nodari, O.R., 2001. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Simões, M.O. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, pp.15.

Gumucio, D.L., Wiebauer, K., Caldwell, R.M., Samuelson, L.C., Meisler, M.H., 1988. Concerted evolution of human amylase genes. *Mol Cell*.8, 97-1205.

Henrissat, B., 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280, 309–316.

Henrissat, B., Callebaut, I., Fabrega, S., Lehn, P., Mornon, J. P., and Davies, G. 1995. Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 7090–7094

Hirtz, C., Chevalier, F., Centeno, D., Rofidal, V., Egea, J.C., Rossignol, M., Sommerer, N., Péreère, D.D., 2005. MS characterization of multiple forms of alpha-amylase in human saliva. *Proteomics*. 5, 4597-4607.

Ho, M.F., Yin, F.F., Lajolo, F., Whitaker, J.R., 1994. Naturally occurring α -amylase inhibitors: structure/function relationships, *In*: Yada, R.Y., Jackman, R.L., Smith, J.L. (Eds.), *Protein Structure– Function Relationships in Foods*, Blackie Academic and Professional, London, pp. 89– 119.

Iulek, J., Franco, O.L., Silva, M., Slivinski, C.T., Bloch Jr, C., Rigden, D.J., Grossi de Sa, M.F., 2000. Purification, biochemical characterisation and partial primary structure of a new α -amylase inhibitor from *Secale cereale* (Rye). *Inter. J. Biochem. Cell Physiol.* 32, 1195-1204.

Janecek, S., 2000. Structural features and evolutionary relationships in the α -amylase family. *In*: Ohnishi, M., Hayashi, T., Ishima, S., Kuriki, T., (eds), pp. 19–54. *Glycoenzymes*. The Japanese Scientific Societies Press.

Jespersen, H.M., MacGregor, E.A., Henrissat, B., Sierks, M.R., Svensson, B., 1993. Starch and glycogen debranching and branching enzymes: Prediction of

structural features of the catalytic (α/α) β -barrel domain and evolutionary relationship to other amylolytic enzymes. *J. Protein Chem.* 12, 791-805.

Kadziola, A., Abe, J., Svensson, B., Haser, R., 1994. Crystal and molecular structure of barley α -amylase. *J Mol Biol.* 239, 104-121.

Kamitori, S., Kondo, S., Okuyama, K., Yokota, T., Shimura, Y., Tonozuka, T. Sakano, Y. 1999. Crystal structure of *Thermo-actinomyces vulgaris* R-47 α -amylase II (TVA II) hydrolyzing cyclodextrins and Pullulan at 2.6 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 287, 907-921.

Kandra, L., Gyémánt, G., 2000. Examination of the active sites of human salivary α -amylase (HSA). *Carbohydr. Res.* 329, 579–585.

Kandra, L., Gyémánt, G., Zajácz, Á., Batta, G., 2004. Inhibitory effects of tannin on human salivary α -amylase. *BBRC.* 319, 1265-1271.

Kandra, L., Zajácz, Á., Remenyik, J., Gyémánt, G., 2005. Kinetic investigation of a new inhibitor for human salivary α -amylase. *BBRC.* 334, 824-828.

Karn, R.C., Shulkin, J.D., Merritt, A.D., Newell, R.C., 1973. Evidence for post-transcriptional modification of human salivary amylase (amyl) isozymes. *Biochem. Genet.* 10, 341–350.

Kauffman, D.L., Watanabe, S., Evans, J.R., Keller, P.J., 1973. The existence of glycosylated and non-glycosylated forms of human submandibular amylase. *Archs. Oral. Biol.* 18, 1105–1111.

Kauffman, D.L., Zager, N.I., Cohen, E., Keller, P.J., 1970. The isoenzymes of human parotid amylase. *Arch. Biochem. Biophys.* 137, 325.

Keller, P.J., Kauffman, D.L., Allan, B.J., Williams, B.L. 1971. *Biochem* 10, 4867.

Kim, M.J., Lee, S.B., Lee, H.B., Lee, S.Y., Baek, J.S., Kim, D., Moon, T.W., Robyt, J.F., Park, K.H. 1999. Comparative study of the inhibition of α -glucosidase,

α -amylase, and cyclomaltodextrin glucanotransferase by acarbose, isomaltose, and acarviosine-glucose. Arch. Biochem. Biophys. 371, 277-283.

Kim, Y.M., Jeong, Y.K., Wang, M.H., Lee, W.I., Rhee, H.I., 2005. Inhibitory effect of pine extract on α -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. Nutrition. 21, 756-761.

Kneen, E., Sandstead, R.M., 1943. An amylase inhibitor from certain cereals. J. Am. Chem. Soc. 65, 1247.

Kobayashi, K., Baba, E., Fushiya, S., Takano, F., Batkhuu, J., Bash, T., Sanchir, C., Yoshizaki, F., 2003. Screening of Mongolian Plants of Influence on Amylase Activity in Mouse Plasma and Gastrointestinal Tube. Biol. Pharm. Bull. 26, 1045-1048.

Koukiekoulou, R., Desseaux, V., Moreau, Y., Marchis-Mouren, G., Santimone, M. 2001. Mechanism of porcine pancreatic α -amylase. Inhibition of amylose and maltopentaose hydrolysis by α -, β - and γ -cyclodextrins. Eur. J. Biochem. 268, 841-848.

Larson, S.B., Greenwood, A., Casio, D., Day, J., McPherson, A., 1994. Refined molecular structure of pig pancreatic α -amylase at 2.1 Å resolution. J Mol Biol. 235, 1560-1584

Le Berre-Anton, V., Bompard-Gilles, C., Payan, F., Rougé, P., 1997. Characterization and functional properties of the α -amylase inhibitor from kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. BBA, 1343, 31.

Liang, H., Wang Y., Wang, Q., Ruan, M.S., 1999. Hydrophobic interaction chromatography and capillary zone electrophoresis to explore the correlation between the isoenzymes of salivary α -amylase and dental caries. J. Chromatogr. B. 724, 381-388.

Lu, S., Deng, P., Liu, X., Luo, J., Han, R. Gu, X., Liang, S., Wang, X., Li, F., Lozanov, V., Patthy, A., Pongor, S., 1999. Solution structure of the major α -amylase inhibitor of the crop plant amaranth, J. Biol.Chem. 274, 20473– 20478.

MacGregor, E., 1988. α -Amylase structure and activity. *J Protein Chem.* 7, 399-415.

Marles, R., Farnsworth, N., 1994. Plants as sources of antidiabetic agents. *In: Wagner, H., Farnsworth, N.R., (Eds.), Economic and Medicinal Plant Research.* Academic Press Ltd., UK. 6, pp. 149–187.

Marshall, J.J, Lauda, C.M., 1975. Purification and properties of Phaseolamin, an inhibitor of alpha-amylase, from the kidney bean, *Phaseolus vulgaris*. *JBC.* 20, 8030.

Matsui, T., Ueda, T., Oki, T., Sugita, K., Terahara, N., Matsumoto, K., 2001. Alpha-Glucosidase inhibitory action of natural acylated anthocyanins. 2.alpha-Glucosidase inhibition by isolated acylated anthocyanins. *J. Agric. Food. Chem.* 49, 1952.

Matsuura, K., Ogawa, M., Kosaki, G., Minamiura, N., Yamamoto, T., 1978. α -Amylase from human pancreatic juice as an electrophoretically pure isozyme. *J. Biochem.* 83, 329–332.

McCarter, J.D., Withers, S.G., 1996. Unequivocal identification of Asp-214 as the catalytic nucleophile of *Saccharomyces cerevisiae* alpha-glucosidase using 5-fluoro glycosyl fluorides. *J. Biol. Chem.* 271, 6889–6894.

McDougall, G.J., Shpiro, F., Dobson, P., Smith, P., Blake, A., Stewart, D., 2005. Different Polyphenolic Components of Soft Fruits Inhibit α -Amylase and α -Glicosidase. *J. Agric. Food. Chem.* 53, 2760-2766.

Mendonça, R.C., Felfili, J.M., Walter, B.M.T., Silva, M.C., Rezende, A.R., Filguieras, T.S., Nogueira, P.E., 1998. Flora vascular do Cerrado. *In: Sano, S.M., Almeida, S.P. (Eds.), Cerrado ambiente e flora, EMBRAPA. Planaltina, Distrito Federal,* pp. 286–556.

Minamiura, N., 1988. Human salivary and pancreatic a-amylases. *In: Yamamoto T, Kitahata S, eds. Handbook of amylases and related enzymes.* Tokyo: Pergamon Press. pp 18-22.

Murao, S., Goto, A., Matsui, Y., Ohyama, K., 1980. New proteinous inhibitor (Haim) of animal α -amylase from *Streptomyces griseosporus* YM-25, *Agric. Biol. Chem.* 44, 1679–1681.

Nakamura, Y., Ogawa, M., Nishide, T., Emi, M., Kosaki, G., Himeno, S., Matsubara, K., 1984. Sequences of cDNAs for human salivary and pancreatic K-amylase, *Gene* 28, 263-270.

Nishide, T., Nakamura, Y., Emi, M., Yamamoto, T., Ogawa, M., Mori, T., Matsubara, K., 1986. Primary structure of human salivary α -amylase gene. *Gene*. 41, 299–304.

Oneda, H., Lee, S., Inouye, K., 2004. Inhibitory effect of 0,19 α -amylase from wheat kernel on the activity of porcine pancreas α -amylase and its thermal stability. *J. Biochem.* 135, 421-427.

Payan, F., 2004. Structural basis for the inhibition of mammalian and insect α -amylases by plant protein inhibitors. *Biochim Biophys Acta.* 12, 171-80. Review.

Prance, G. T., 1977. Floristic inventory of the tropics: where do we stand. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 64, 559-684.

Pusztai, A., Bardocz, G.G., Alonso, R., Chrispeels, M.J., Schroeder, H.E., Tabe, L.M., Higgins, T.J., 1999. Expression of the insecticidal bean α -amylase inhibitor transgene has minimal detrimental effect on the nutritional value of peas fed to rats at 30% of the diet. *J. Nutrit.* 129, 1597-1603.

Qian, M., Haser, R., Buisson, G., Duee, E., Payan, F., 1994. The active center of a mammalian α -amylase. Structure of the complex of a pancreatic α -amylase with a carbohydrate inhibitor refined to 2.2 Å resolution. *Biochem.* 33, 6284-6294.

Qian, M., Haser, R., Payan, F., 1993. Structure and molecular model refinement of pig pancreatic α -amylase at 2.1 Å resolution. *J Mol Bio.* 231,785-799.

Qian, M., Nahoum, V., Bonicel, J., Bisho, H., Henrissat, B., Payan, F., 2001. Enzyme-catalyzed condensation reaction in a mammalian α -amylase. *High*

resolution structural analysis of an enzyme inhibitor complex. *Biochem.* 40, 7700-7709.

Ramasubbu, N., Paloth, V., Luo, Y., Brayer, G.D., Levine, M.J., 1996. Structure of human salivary α -amylase at 1.6 Angstrom resolution: implications for its role in the oral cavity. *Acta Crystallogr.* 52, 435–446.

Ramasubbu, N., Ragunath, C., Mishra, P.J., 2003. Probing the role of a mobile loop in substrate binding and enzyme activity of human salivary amylase. *J. Mol. Biol.* 325, 1061–1076.

Rates, S.M.K., 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon.* 29, 603.

Richardson, M., 1990. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. *In: Methods in Plant Biochemistry.* Academic Press, London, UK. 5, pp. 261-307.

Rosenmund, H., Kaczmarek, M.J., 1976. Isolation and characterization of isoenzymes of human salivary and pancreatic alpha-amylase. *Clin. Chim Acta.* 71, 185-9.

Rydberg, E.H., Li, C., Maurus, R., Overall, C.M., Brayer, G.D., Withers, S.G., 2002. *Biochem.* 41, 4492–4502.

Santimone, M. Koukiekolo, R., Moreau, Y., Berre, V.L., Rougé, P., Marchis-Mouren, G., Desseaux, V., 2004. Porcine pancreatic α -amylase inhibition by the kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) inhibitor (α -AI1) and structural changes in the α -amylase inhibitor complex. *BBA.*1696, 181-190.

Sasaki, K., Ito, S., Nakamura, Y., Yoshizaki, F., 2004. Effect of Saiko-ka-rykotsu-borei-to on Amylase Activity in Mice. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 1688-1690.

Schuler, H.T., Poppy, M.G., Kerry, B.R., Denholm, L., 1998. Insect-resistant transgenic plants. *Trends Biotechnol.* 16, 168-174.

Steiner, J.C., Keller, P.J., 1968. An electrophoretic analysis of the protein components of human parotid saliva. *Arch. Oral.* 13, 1213.

Suetsugu, N., Koyama, S., Takeo, K., Kuge, T., 1974. Kinetic studies on the hydrolases of α -, β - and γ -cyclodextrins by Taka-amylase A. J. Biochem. 76, 57-63.

Swift, H.J., Brady, L., Derewenda, Z.S., Dodson, E.J., Dodson, G.G., Turkenburg, J.P., Wilkinson, A.J., 1991. Structure and molecular model refinement of annealing method. Acta Crystallogr. 47, 535-544.

Tao, B.Y., Reilly, P.J., Robyt, J.F., 1989. Detection of a covalent intermediate in the mechanism of action of porcine pancreatic α -amylase by using ^{13}C nuclear magnetic resonance. Biochim. Biophys. Acta. 995, 214–220.

Uitdehaag, J. C., Mosi, R., Kalk, K. H., van der Veen, B. A., Dijkhuizen, L., Withers, S. G., and Dijkstra, B. W., 1999. Nat. Struct. Biol. 6, 432–436.

Valencia, A., Bustillo, A.E., Ossa, G.E., Chrispeels, M.J., 2000. α -amylase of the coffee berer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. Insect. Biochem. Mol. Biol. 30, 207-213.

Weselake, R.J., MacGregor, A.W., Hill, R.D., 1983. An endogenous α -amylase inhibitor in barley kernel, Plant Physiol. 72, 809– 812.

Yamamoto, T., 1995. Enzyme Chemistry and Molecular Biology of Amylases and Related Enzymes. CRC Press Inc.

Yoon, S.H., Robyt, J.F., 2003. Study of the inhibition of four α amylases by acarbose and its 4^{IV}- α -maltohexaosyl and 4^{IV}- α -maltododecaosyl analogues. Carbohydr. Res. 338, 1969-1980.

Capítulo II

**Produção de uma fração concentrada em alfa-amilase
salivar humana (HSA) por cromatografia de troca iônica
para estudos de inibição com extratos vegetais**

Resumo

As alfa-amilases (α -1,4-D-glicano-4-glicanohidrolases, EC 3.2.1.1) são enzimas responsáveis pela digestão de carboidratos e são encontradas na saliva e no suco pancreático. As seqüências primárias das alfa-amilases salivar (HSA) e pancreática (HPA) exibem 99% de similaridade estrutural o que sugere que a HSA pode ser um alvo de estudos experimentais de inibição da digestão de carboidratos uma vez que potenciais inibidores teriam comportamentos similares para HPA e HSA. Desse modo, pelas vantagens da coleta não invasiva da saliva em relação ao suco pancreático obteve-se no presente estudo, uma fração denominada HSA-CTI. Com esta preparação verificou-se o efeito inibitório sobre a atividade enzimática da HSA-CTI a partir de preparações do extrato bruto da casca de *Pouteria* sp. Amostras de saliva foram congeladas por 48h, centrifugadas e o sobrenadante foi sujeito a cromatografia de troca iônica em coluna de Q-Sepharose equilibrada com 25mM de tampão Tris-HCl, pH 8,0 contendo 5mM de EDTA e 5mM de EGTA. A coluna foi lavada com o mesmo tampão de equilíbrio e eluída com um gradiente de NaCl (0-1M). Realizou-se dosagem protéica, SDS-PAGE, Western blotting e medida da atividade amilásica das frações obtidas. A fração HSA-CTI não interagiu com a coluna, sendo assim preparada por liofilização e armazenada em congelador até o momento dos ensaios de inibição. Preparações aquosa por maceração (EAP-C), aquosa por decocção (EADP-C), hidroalcóolica (EHP-C) e etanólica (EEP-C) do extrato da casca (10mg/mL em DMSO) foram testados pré-incubando por 10 e 30min a 37°C com a fração HSA-CTI (1:10). Somente o polipeptídeo de 56kDa presente nesta fração exibiu reação cruzada com o anticorpo anti-HSA. O extrato EHP-C mostrou-se mais efetivo em inibir a atividade da HSA-CTI. Estes resultados indicam que a HSA-CTI pode ser obtida por um método rápido de cromatografia podendo ser utilizada em ensaios de inibição a partir de extratos vegetais. O extrato de *Pouteria* sp. apresentou como potencial candidato para estudos de fracionamento e descoberta de novas substâncias com atividade sobre estas enzimas.

Palavras-chave: *Pouteria* sp., amilase salivar humana, inibição amilase, cromatografia de troca iônica.

Abstract

The α -amylases (α -1,4-D-glucan-4-glucanohydrolases, EC 3.2.1.1) are enzymes responsible for the digestion of carbohydrates and are found in saliva and in the pancreatic juice. The primary sequences of the salivary (HSA) and pancreatic (HPA) α -amylases show structural similarity of 99%. This standard homology suggests that the HSA can be target of experimental studies of the digestion of carbohydrates inhibition, besides studies showed that potential inhibitors have similar behavior to HPA and HSA. Considering the benefits of noninvasive collection of saliva in relation of pancreatic juice, in this present study obtained a fraction called HSA-CTI. Preparations of the crude extract of the bark of *Pouteria sp.* was tested about the inhibitory effect of enzymatic activity of the HSA-CTI. Samples of saliva were frozen for 48h, centrifugation and the supernatant was subjected to chromatography in Q-Sepharose column (QS-column) equilibrated in 50mM Tris-HCl buffer at pH 8.0 containing 10mM EDTA and 10mM EGTA. The bound proteins were eluted from QS-column with a gradient concentration of NaCl (0-1M). SDS-PAGE, Western blotting assays and amylase activity measured were performed of the obtained fractions. The HSA-CTI fraction not interacted with the column, and thus prepared by lyophilization and stored in the frozen until realization of the inhibition assays. Aqueous preparations for infusion (EAP-C), decoction (EAP-C), hydroalcoholic (EHP-C) and ethanolic (EEP-C) of the stem bark extract (10mg/mL in DMSO) have assays by pre-incubation at 10 and 30min at 37°C with the HAS-CTI (1:10). Only the polypeptide of 56Kda, abundant in the fraction, exhibited cross-reaction with anti-HSA antibody. The assay inhibition showed that stem bark extract has effective in to inhibit the HSA-CTI activity. These results indicate that the HSA-CTI can be obtained by a rapid chromatography method can be used in tests of inhibition from plant extracts. The extract of *Pouteria sp.* presented as a potential candidate for studies of fractionation and discovery of new substances with activity on these enzymes.

Keywords: *Pouteria sp.*, human salivary amylase, amylase inhibition, ion exchange chromatography.

1. Introdução

A alfa-amilase salivar humana (HSA, EC 3.2.1.1) é a enzima mais abundante da saliva (Kandra et al. 2004) e sua atividade enzimática constitui na hidrólise da ligação α -1,4-D-glicosídica do amido, amilose, amilopectina, glicogênio e várias maltodextrinas. Recentes estudos de inibição da alfa-amilase são realizados visando à descoberta de novas drogas com potencial em reduzir a hiperglicemia pós-prandial implicando em possível tratamento para diabetes tipo 2 e obesidade (Ali et al. 2006; Gad et al. 2006; Oneda et al. 2004). Os inibidores reduzem a glicemia pós-prandial através da diminuição da digestão de carboidratos com conseqüente diminuição da absorção de glicose no intestino (Oneda et al. 2004). Uma terapia já utilizada para estabilizar a glicose sanguínea pós-prandial é com os inibidores sintéticos da alfa-glicosidase, tais como a acarbose e voglibose (Hanefeld et al. 2004). Diferentemente dos inibidores da alfa-glicosidase, os inibidores da alfa-amilase diminuem a hidrólise de macromoléculas, como resultado, produtos digestivos osmoticamente ativos não se acumularão no lúmen intestinal, e conseqüentemente efeitos colaterais serão evitados, como diarreia e flatulência, comuns com o uso de inibidores sintéticos da alfa-glicosidase (Miura et al. 1998).

Reduzindo os picos de glicemia pós-prandial conseqüentemente os inibidores contribuirão para redução das complicações associadas ao diabetes tipo 2 como problemas cardiovasculares, cerebrovasculares e doenças vasculares periféricas, que conduzem para infarto do miocárdio, ataques cardíacos e amputações.

Estudos de inibição da alfa-amilase pancreática (HPA) por extratos vegetais são realizados *in vitro* e *in vivo* (Ali et al. 2006; Conforti et al. 2005; Gad et al. 2006), mas existem poucos trabalhos em caráter preliminar de inibição da HSA envolvendo a biodiversidade brasileira, incluindo o bioma Cerrado (Albuquerque et al. 2002a,b; Antunes et al. 2007). E o grande agravante está no fato de que cerca de 40% do bioma já tenha sido devastado, sendo somente 1,5% de sua extensão protegida por lei (Kaplan et al. 1994).

Em estudo preliminar de bioprospecção de inibidores da HSA a partir de 100 extratos de plantas do Cerrado realizado por Albuquerque et al. (2003)

demonstrou que os extratos da casca do caule de *Serjania* sp. (Sapindaceae), madeira do caule de *Casearia* sp. (Flacutireaceae), madeira do caule de *Pouteria* sp. (Sapotaceae) e casca da raiz de *Cupania* sp. (Sapindaceae) revelaram taxas de inibição entre 50 a 70% na concentração de 0,02mg/mL. Os extratos da casca da *Matayba* sp. (Sapindaceae), casca da raiz de *Serjania* sp., folha de *Pouteria* sp. e madeira da raiz e casca do caule de *Pouteria* sp. inibiram de 70 a 100% a atividade da alfa-amilase. Em teste de toxicidade aguda do extrato hidroalcolico da casca de *Pouteria* sp. em ratos não houve sinais aparentes de toxicidade na dose de 500mg/Kg, além disso causou diminuição de peso e glicemia nos animais (Albuquerque et al. 2003b). Fontes Junior, (2004) observou que o extrato etanólico da raiz de *Pouteria* sp. não mostrou sinais de toxicidade em camundongos na dose de 100mg/Kg, além disso provocou efeito antiinflamatório em doses menores que estas.

A seqüência primária da HSA e HPA são altamente homólogas e exibem elevada similaridade estrutural com 99% de homologia (Brayer et al. 1995; Ramasubbu et al. 2006a,b). Este grau de homologia indica que a HSA poderia ser usada como modelo experimental em estudos de inibição. Dados revelam que alguns inibidores têm o mesmo comportamento para as duas amilases (Kim et al. 2005; McDougall et al. 2005). Além disso, o processo de coleta da saliva não é invasivo, ao contrário do suco pancreático que é obtido pela coleta de aspirados duodenais, canulação endoscópica ou pâncreas fresco. No estudo de bioprospecção citado anteriormente foi utilizado como alvo de estudo a saliva bruta, mesmo demonstrando resultados interessantes sobre o padrão de inibição da amilase pelos extratos, a utilização da saliva bruta nestes testes não permitia a reprodução e apresentava variações nos resultados. Na tentativa de minimizar estas variações a obtenção de uma fração rica em amilase com concentração protéica conhecida poderia ser uma solução. A produção de uma fração concentrada em HSA por cromatografia de troca iônica (CTI) pode ser uma forma de obtenção de material parcialmente purificado, em quantidade adequada e com estabilidade durante armazenamento, suficiente para estudos de sua inibição. Assim, o presente trabalho teve como objetivo produzir uma fração concentrada em HSA (HSA-CTI) por cromatografia de troca iônica e verificar por método

cinético o efeito inibitório de preparações do extrato bruto da casca de *Pouteria sp.* sobre sua atividade.

2. Materiais e Métodos:

2.1 Produção da HSA-CTI

2.1.1 Coleta e preparo da amostra de saliva

A saliva foi coletada pelo método de cuspe segundo Navazesh, (1993) com algumas modificações. Resumindo os voluntários fizeram prévia higiene bucal com pasta de dente e enxaguaram a boca três vezes com água destilada. A salivação foi estimulada pela mastigação de um chiclete sabor menta. A coleta foi realizada no período da tarde por volta das 16:00h, onde os voluntários mastigaram o chiclete até perder o sabor. Após isso se deu início à coleta de saliva cuspidando em copinho plástico.

A saliva coletada de cinco voluntários (60mL) foi reunida e congelada à -20°C por 48h para precipitação protéica. Após o descongelamento a amostra foi centrifugada a 12.000g por 10min à 20°C (Francis et al. 2000). O sobrenadante foi diluído 1:1 (v/v) em tampão Tris-HCl 50mM pH 8,0, contendo 10mM de EGTA e 10mM de EDTA e azida sódica à 0,2%. Alíquotas do sobrenadante e do pelete foram armazenadas para dosagem protéica, SDS-PAGE, western blotting e dosagem da atividade amilásica.

2.1.2 Cromatografia de troca iônica em coluna de Q-Sepharose

Para a cromatografia usou-se uma coluna de vidro 9cm de altura x 2,0cm de diâmetro empacotada com 63mL da resina Q-Sepharose fast flow. A coluna foi equilibrada com cinco volumes de Tris-HCL 25mM pH 8,0, contendo 5mM de EGTA, 5mM de EDTA e azida sódica à 0,2%. Foi aplicado 120mL da amostra diluída, sendo desprezado o volume morto, e em seguida a coluna foi lavada com 5v do tampão de equilíbrio e eluída com um gradiente de NaCl (0-1M).

2.1.3 Determinações protéicas

Monitorou-se a presença de proteínas nas frações não interagida com a coluna e eluídas por um gradiente salino. O teste baseou-se na utilização de microplacas de 96 poços, aplicando em cada poço 15µL de amostra e 45µL de reagente Bradford. As amostras detectadas como positivas (coloração azulada) foram destinadas ao procedimento de dosagem da concentração protéica realizada em aparelho de espectofotometria, medida a 620nm (Bradford, 1976).

2.1.4 Eletroforese (SDS-PAGE)

Todas as frações foram submetidas à SDS-PAGE de acordo com o procedimento de Laemmli and Favre, (1973). Foram utilizados géis com gradiente de acrilamida de 5-22% no gel de separação e 3% no gel de empilhamento. As bandas protéicas foram visualizadas por coração com Coomassie Brilliant Blue R-250.

2.1.5 Western blotting

Realizou-se Western blotting de todas as frações obtidas da coluna com anticorpo anti-HSA (Sigma) e como controle foi usado saliva humana. Alíquotas das frações foram separadas por SDS-PAGE (5-22%). As amostras separadas por SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose por período overnight sob corrente constante de 80mA. Após a transferência a membrana foi corada com Ponceau 0,5% (Towbin et al. 1979) e bloqueada com 5% de leite desnatado em TBS-T por 12h e lavado (três vezes por 5min cada) com TBS-T. Depois de bloqueada e lavada a membrana foi incubada por período overnight com anticorpo primário anti-HSA, seguida de lavagem (três vezes por 5min cada) com TBS-T. A membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-coelho conjugado com fosfatase alcalina por duas horas, seguido de lavagem com TBS-T (três vezes por 5min cada). A reatividade foi detectada revelando com NBT/BCIP.

2.1.6 Ultrafiltração

As frações eluídas da coluna foram ultrafiltradas em concentrador Centriprep-30 (Amicon) que retém proteínas com mais de 30.000 daltons, na tentativa de purificar, concentrar e desalinizar as frações. Centrifugou-se à 3.000g por 30min, 4°C e o volume retido foi lavado com PBS 0,01M pH 7,2.

2.1.7 Ensaio para determinar a atividade da HSA-CTI pelo método cinético GalG2CNP em microplacas

Determinou-se a atividade de todas as frações obtidas da coluna Q-Sepharose pelo método cinético GalG2CNP em microplacas. O método baseia-se na hidrólise do substrato 2-cloro-4-nitrofenil- β -D-galactopiranosilmaltoside (Fig. 1) pela alfa-amilase, liberando 2-cloro-4-nitrofenil (CNP) e maltoside. A velocidade de formação do CNP de cor amarela é medida fotometricamente a 405nm. A atividade da amilase é diretamente proporcional ao aumento da absorbância.

Para os estudos de atividade, a fração não interagida com a coluna foi dialisada contra tampão bicarbonato de amônio pH 7,0 por 3 vezes, sendo posteriormente liofilizada obtendo 100mg e ressuspensa em 3mL de tampão PBS 0.01M pH 7.2, aliquoteada e armazenada à -20°C passando a ser denominada HSA-CTI. A atividade da HSA-CTI após liofilização foi comparada com a atividade da saliva bruta, sendo que estas foram diluídas 100x em tampão MES 50mM, contendo 5mM de CaCl_2 e 300mM de NaCl, pH 6,0. As frações eluídas da coluna de Q-Sepharose não foram diluídas por terem sido concentradas por ultrafiltração. A reação iniciou-se pela adição de 300 μ L do substrato em 10 μ L da enzima, sendo realizadas três leituras em intervalos de um minuto à 37°C. O ensaio foi realizado em duplicata. A atividade foi calculada pela fórmula:

$$\text{Atividade} = \frac{\sum \Delta \text{Abs/min} \times \text{TV} \times \text{DF}}{\text{MMA} \times \text{SV} \times \text{LP}} = \text{U/mL}$$

Onde: $\Delta \text{Abs/min}$ = somatório da diferença de absorbância por minuto $((A3 - A2) + (A2 - A1))/2$; TV = Volume total de reação (0,310); DF = fator de diluição (100); MMA = Coeficiente de absorvidade do 2-cloro-p-nitrofenol (12,9); SV = volume da amostra (0,01mL); LP = caminho óptico (0,97cm).

Devido à HSA-CTI na diluição 100x ter saído da faixa linear do método foi necessário diluir a amostra 595x por diluição seriada em tampão MES, pH 6,0.

Para determinar o K_m da HSA-CTI variou-se a concentração de substrato de 0,1 a 10mM, usando a amilase na concentração de 6nM diluída em tampão MES. O substrato foi padronizado no ensaio na concentração de 2mM.

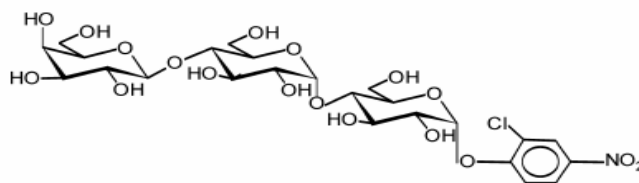


Fig. 1: Estrutura do substrato 2-cloro-4-nitrofenil-4-O- β -D-galactopiranosilmaltoside (GalG2CNP). Retirado de: Kandra et al. 2004.

2.2 Preparo do material vegetal

Coletou-se a casca do caule de cinco espécimes de *Pouteria sp.* (Sapotaceae) na Reserva Ecológica do caça e Pesca, município de Uberlândia/MG em maio de 2006 no período da manhã. As exsiccatas foram identificadas pela Profa. Dra. Ana Angélica Almeida Barbosa do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia e depositadas no Herbário do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia, (HUFU 45.535). O material vegetal foi seco à temperatura ambiente mantido no Laboratório de Farmacologia da Universidade Federal de Uberlândia. Após a secagem, o material foi triturado em liquidificador industrial até a obtenção de pó.

Foram preparados extratos hidroalcolico (EHP-C), etanólico (EEP-C), aquoso por maceração (EAP-C) e aquoso por decocção (EADP-C). Para o extrato hidroalcolico o pó obtido (100g) foi macerado (48h x 2 vezes) em 1L de

água:etanol (v/v). Os demais extratos foram preparados na mesma proporção (1:10 p/v), sendo o extrato etanólico macerado (48h x 2 vezes) em etanol; o extrato aquoso por maceração foi macerado por duas horas em água destilada e o extrato aquoso por decocção foi mantido sob agitação por quatro horas à 50°C. Todos os extratos foram filtrados com filtro de poliéster e centrifugados a 2000g por 20min a 4°C. O sobrenadante foi rotavaporado e posteriormente liofilizado.

2.2.1 Ensaio de inibição da HSA-CTI por extratos de *Pouteria sp.*

Para o ensaio de inibição, a HSA-CTI foi diluída 595x por diluição seriada em tampão MES pH 6,0. Os extratos (10mg/mL em DMSO) foram pré-incubados por 10 e 30 minutos a 37°C com a HSA-CTI (1:10). A concentração final da solução de pré-incubação foi de 100µg/mL para os extratos. Em placas de microtitulação de 96 poços, fundo chato, adicionou-se 10µl da solução pré-incubada e a reação foi iniciada pela adição de 300µl do substrato sintético GalG2CNP (2mM). A concentração final de reação dos extratos foi de 32µg/mL. Foram realizadas três leituras a 405nm com intervalos de 3 minutos a 37°C e foi realizado o controle com a amilase. O ensaio foi padronizado posteriormente com 30min de pré-incubação.

Para verificar a eficácia do método realizou-se um ensaio com inibidor extraído do trigo *Triticum aestivum*, tipo I (Sigma), onde cada mg contém 1U de proteína que reduz a atividade de 2U de alfa-amilase em 50%. Preparou-se 20U/mL em tampão PBS 7,4 e realizou-se diluições duplas seriadas para determinar o IC50. A concentração foi variada de 20U/mL à 0,01U/mL. O inibidor foi incubado por 30min à 37°C com a amilase (1:10) diluída 595x.

Também determinou o IC50 do extrato hidroalcólico de *Pouteria sp.* preparando-se 100mg/mL (concentração final de reação de 322µg/mL) e realizando diluições dupla seriais até a concentração de 3mg/mL.

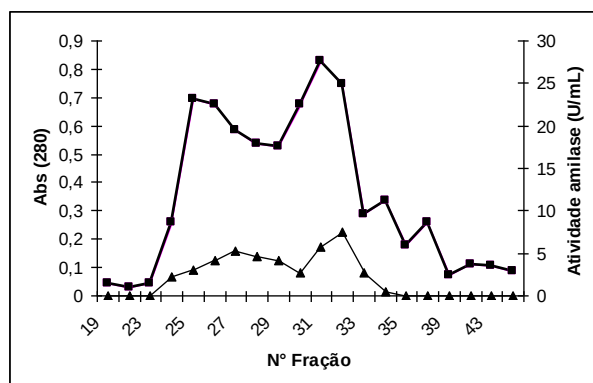
As análises foram realizadas em quadruplicatas para delineamento estatístico pelo teste Scott-Knott a nível de 5% de variância e o IC50 foi determinado por equação de regressão linear.

3.0 Resultados e discussão

Analisando a fig. 2b observa-se o perfil eletroforético da amostra de saliva após fracionamento por cromatografia de troca iônica em condições quelantes de cátions divalentes. Pela análise do perfil eletroforético observa-se a migração de polipetídeos com Mr similares ao Mr da amilase presente na amostra de saliva tanto na fração que não interagiu com a coluna como nas frações dela eluídas. Pelo gradiente de NaCl houve eluição de polipetídeos de alta Mr com poucos polipetídeos de baixa Mr nas frações iniciais, seguido pela eluição de polipetídeos de média e baixa Mr nas frações posteriores. A presença de HSA nestas frações foi confirmada por Western blotting (Fig. 3). A análise do blotting revelou reação cruzada do anticorpo anti-HSA apenas com o polipeptídeo com Mr de 56kDa encontrado na fração que não interagiu com a coluna.

Os dados do ensaio de atividade revelam 479,6U/mL para a HSA-CTI, sendo que esta atividade foi cinco vezes maior do que a atividade da saliva bruta que apresentou 97,4U/mL para a mesma diluição (100x). Como mostra a tabela 1, a saliva bruta, o sobrenadante e o volume excluído da coluna apresentaram o mesmo padrão de atividade. Deve-se considerar que o volume excluído está diluído em tampão contendo quelantes de Ca^{+} e que a atividade da amilase é dependente deste íon. Observa-se que após a diálise a atividade da fração HSA-CTI aumentou três vezes em relação à saliva bruta e após a concentração da fração por processo de liofilização a atividade aumentou cinco vezes. Estes dados sugerem que a atividade da fração HSA-CTI foi maior devido à sua concentração por liofilização e pela eliminação de interferentes após a passagem na coluna. A análise cinética revelou um K_m de 5mM para HSA-CTI na presença do substrato GalG2CNP em microplaca (Fig 4).

(a)



(b)

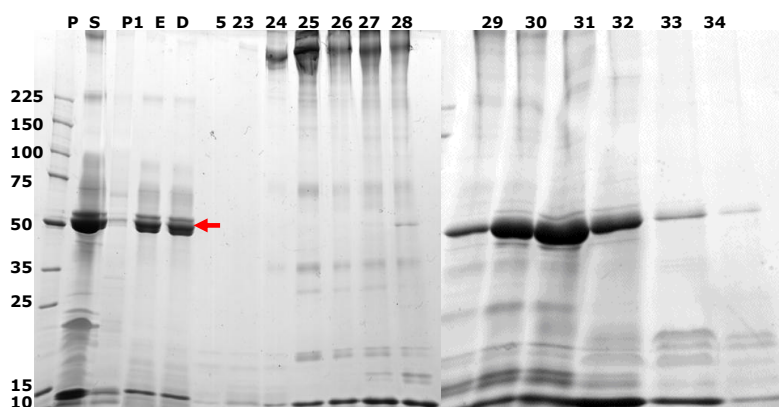


Fig. 2: (a) Perfil das frações 19-44 eluídas da coluna à 280nm (■) e atividade amilásica (U/mL) (▲); (b) SDS-PAGE das frações obtidas da coluna de Q-Sepharose: linha WM- padrão de massa molecular, S- sobrenadante, P- pelete, E- fração não interagida (a seta indica a HSA-CTI), D- fração não interagida após diálise; linhas 5 to 34 – proteínas eluídas da coluna.



Fig. 3: Western blotting com anticorpo anti-HSA. Linha WM – padrão de massa molecular; SB - saliva; S – sobrenadante; P – pelete; E – fração não interagida; Linhas 24-34 frações eluídas da coluna de Q-Sepharose por gradiente de NaCl.

Tabela 1: Perfil eletroforético e atividade amilásica durante os estágios da produção da fração HSA-CTI a partir da saliva humana.

Estágio Purificação	Atividade amilase (U/mL)	Dosagem protéica ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
Saliva bruta	97,4	5,16
Sobrenadante	77,9	4,08
Volume excluído	55,1	5,16
Após diálise	256,8	11,61
Após liofilização	479,6	20,21

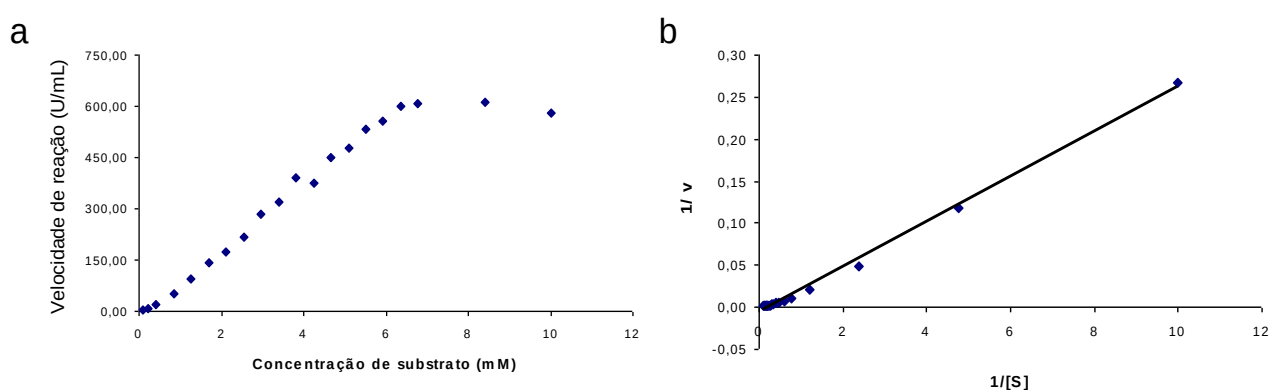


Fig. 4: Em a, velocidade de reação em função da concentração de substrato (0,1-10mM) para a HSA-CTI seguindo a equação de Michaelis-Menten. Em b, representação de Lineweaver-Burk para determinação do K_m .

Cada fração eluída da coluna por gradiente de NaCl foi ultrafiltrada em tampão PBS, este procedimento apenas concentrou e dessalinizou as frações para realização do ensaio de inibição, não proporcionando separação adicional de proteínas salivares. Estas frações não apresentaram atividade amilásica pelo ensaio de inibição (Fig. 2a).

A HSA é codificada pelo cromossomo 1 como parte de uma família poligene, expressados em altos níveis nas glândulas salivares pelo gene Amy-1 (Gumucio et al. 1988). Estes genes podem originar menos de 12 fenótipos distintos para isozimas salivares (Hirtz et al. 2005). Hirtz et al. (2005) em estudo de caracterização de formas múltiplas da alfa-amilase encontraram mais de 350 spots, destes mais de 140 foram identificados por MALDI-TOF MS com alta confiança, sendo 26 proteínas diferentes identificadas em banco de dados com massa entre 18 e 59KDa e pI entre 3,5 e 7,6; resultando na observação de

isoformas com 59kDa e formas nativas com 56kDa. Os polipeptídeos com Mr semelhante à amilase observados no perfil eletroforético das frações eluídas da coluna de Q-Sepharose não são isoformas da amilase ou perderam sua atividade após a desagregação protéica, pois não foram ativos na presença do substrato e não reagiram com o anticorpo anti-HSA.

As alfa-amilases são proteínas ligantes de cálcio e possuem um sítio ligante de cloro no domínio A próximo ao sítio ativo (Brayer et al. 1995). Com isso observa-se que talvez a HSA-CTI não interagiu com a coluna porque foi fracionada em condições quelantes na presença de EGTA e EDTA, ocorrendo uma mudança de cargas nesta enzima. Não foi encontrado na literatura consultada relatos de estudos de purificação da HSA que utilizem condições quelantes, os trabalhos baseiam-se na precipitação protéica por acetona ou sulfato de amônio, seguida por cromatografia de interação hidrofóbica ou afinidade (Liang et al. 1999; Reddy et al. 1987; Skuy-Peck and Thuvasethakul, 1977). Alguns autores referem que o Ca^{2+} é responsável pela estabilidade das amilases e estas são desestabilizadas ou inibidas na presença de agentes quelantes (Machius et al. 1998; Sajedi et al. 2005). A HSA-CTI manteve-se ativa mesmo quando armazenada pelo período de um ano à -18°C .

Considerando a homologia entre a HSA e HPA, estudos de bioprospecção com extratos vegetais poderiam ser realizados utilizando a HSA como alvo para descoberta de inibidores de sua atividade por extratos vegetais e as potenciais substâncias ativas com propriedade de bloquear a digestão de carboidratos. Além disso, autores relatam que membros da família das glicosidases incluindo as alfa-amilases utilizam um mecanismo catalítico comum (McCarter and Withers, 1996; Rydberg et al. 2002). Kim et al. (2005) compararam o efeito da acarbose e do extrato etanólico de pinho e observaram que este extrato mostrou similar inibição sobre a HPA e HSA, mesmo sendo mais efetivo para amilase salivar ao contrário da acarbose que atua da mesma maneira para as duas amilases. McDougall et al. (2005) também encontraram que extratos de frutas tais como framboesa e morango foram efetivos contra ambas amilases. Estes estudos demonstram que alguns inibidores apresentam o mesmo efeito sobre a HPA e HSA, dando suporte maior para utilização da HSA em ensaios de inibição ao invés de se usar HPA. A produção de uma fração concentrada em uma só etapa de cromatografia seria

uma forma rápida que permitiria a obtenção de material em quantidade suficiente para a realização de estudos de bioprospecção de inibidores. Estudos de inibição da HSA são importante para descoberta de drogas que bloqueiam a digestão de carboidratos e auxiliam de modo preventivo no controle da hiperglicemia pós-prandial e as complicações cardiovasculares provenientes dela em portadores de diabetes mellitus tipo 2 e obesidade.

De acordo com a análise da fig. 5 o método de extração influenciou significativamente na porcentagem de inibição da atividade da HSA-CTI. A preparação hidroalcóolica do extrato de *Pouteria* sp. foi mais efetiva e menos variável no ensaio de inibição após 30min de pré-incubação, causando uma inibição de 57% da atividade da HSA-CTI e 44% de inibição após 10min de pré-incubação (Fig. 5). Ali et al. (2006) observaram que usando o método de pré-incubação muitos extratos de plantas apresentaram atividade significativa ao contrário do método sem pré-incubação. A análise da fig. 6 revela que o DMSO não afetou a atividade da enzima.

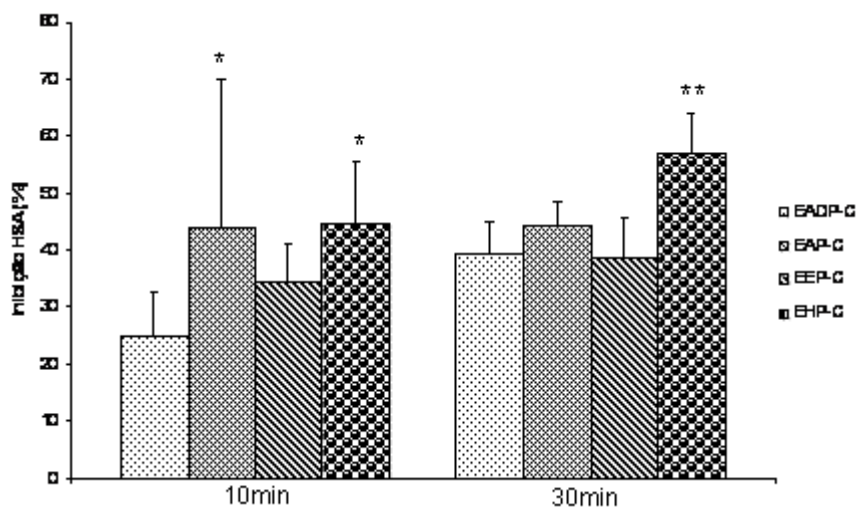


Fig. 5: Porcentagem de inibição da atividade da HSA-CTI obtida da coluna de Q-Sepharose pelos extratos aquoso por decocção (EADP-C), aquoso por maceração (EAP-C), etanólico (EEP-C) e hidroalcóolico (EHP-C) da casca de *Pouteria* sp. com pré-incubação 10 e 30min. Dados expressos pela média ($n=4$) $\pm$ desvio padrão, $p<0,05$ pelo teste Scott-Knott.

O extrato *Pouteria* foi mais eficiente quando preparado por maceração com etanol/água (1:1) do que somente aquoso ou etanólico. Este extrato inibiu em 77% a atividade da alfa-amilase com concentração de final de reação de 322 μ g/mL e 18% na concentração de 80 μ g/mL (Fig. 7). O Extrato ainda revelou

um IC₅₀ de 190µg/mL, sendo que a atividade da enzima apresentou 7% de inibição na presença de DMSO. O extrato EHP-C No *screening* com 41 plantas usadas pela medicina tradicional da Mongólia realizado por Kobayashi et al. (2003), somente sete apresentaram mais de 30% de inibição, sendo a concentração final de reação 300µg/mL. Gad et al. (2006) encontraram que duas plantas egípcias Fenugreek e Balanites inibiram 50% da atividade da HSA nas concentrações de 1,3mg/mL e 12mg/mL, respectivamente. Com base nos estudos descritos na literatura há dificuldade de comparação, pois são métodos diferentes com substratos diferentes, espécies, famílias e métodos de preparo dos extratos diversos. Portanto, os estudos disponíveis mostram extratos vegetais com potencial distintos para inibir a atividade da alfa-amilase, indicando uma faixa de concentração de extrato que também se enquadra o extrato EHP-C aqui investigado que vai desde concentrações mais baixas à concentrações mais altas o que leva a concluir que o extrato EHP-C está dentro da faixa de inibição encontrada na literatura.

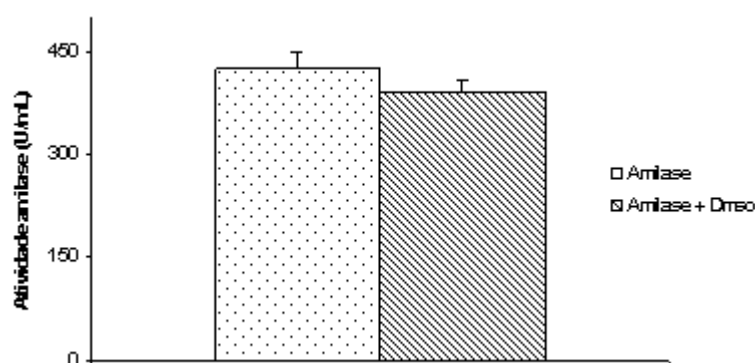


Fig. 6: Atividade da HSA-CTI na ausência e na presença de DMSO com pré-incubação por 30min (n=4).

A inibição da alfa-amilase por extratos vegetais geralmente está associada a presença de compostos fenólicos, taninos e triterpenóides (Ali et al. 2006; Kandra et al. 2004). Até o presente momento não se conhece as substâncias ativas presentes no extrato hidroalcoólico de *Pouteria* sp. relacionadas com a inibição da amilase, mas não é descartada a hipótese de estar relacionada com a presença de compostos fenólicos. Ma et al. (2004) realizaram a análise de antioxidantes polifenólicos dos frutos de três espécies de *Pouteria* (*P. sapota*, *P.*

viridis e *P. campechiana*) por cromatografia líquida e espectrometria de massa. Foram encontrados sete compostos, dentre eles ácido gálico, galocatequina, catequina, epicatequina, dihidromiricetina, catequina-3-O-galato e miricitrina.

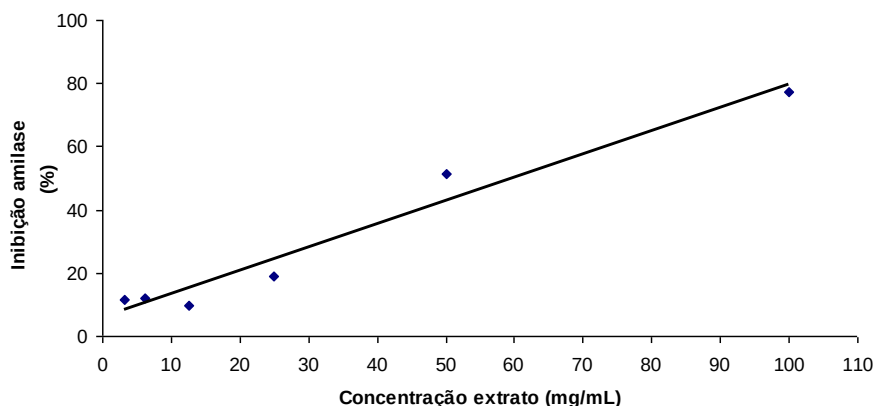


Fig. 7: Curva de concentração para determinação do IC₅₀ do extrato hidroalcolólico de *Pouteria* sp. sobre a atividade da HSA-CTI em diferentes concentrações (3,0-100mg/mL) com pré-incubação por 30min. Cada ponto representa a média de 4 experimentos com R²=0,96.

Existem vários estudos na literatura mostrando a inibição da amilase por peptídeos extraídos e purificados de cereais e leguminosas (Fontanini et al. 2007; Santimone et al. 2004; Oneda et al. 2004). Assim, no presente estudo verificou-se a eficiência do método analisando o padrão de inibição da HSA-CTI pelo inibidor de HSA extraído do trigo (*Triticum aestivum*). Os resultados obtidos com o inibidor de trigo, tipo I sobre a HSA-CTI revelaram que 0,31U/mL inibiu a atividade da enzima em 93% e 0,07U/mL inibiu em 34%. Além disso, o inibidor apresentou um IC₅₀ de 0,13U/mL (Fig. 8). A análise destes resultados sugere que a HSA-CTI pode ser usada como alvo para avaliar a eficiência de inibidores. O estudo de Ali et al. 2006 usando o mesmo inibidor para a HPA mostrou valores de inibição significativa em uma concentração maior do que a concentração usada neste estudo, entretanto os métodos de análise da atividade enzimática foram distintos. Ali et al. 2006 usaram o método de DNS e observaram que o inibidor de trigo inibiu a atividade na concentração de 5U/mL, enquanto o método cinético com GalG2CNP aqui empregado inibiu a atividade da HSA na concentração de 0,31U/mL.

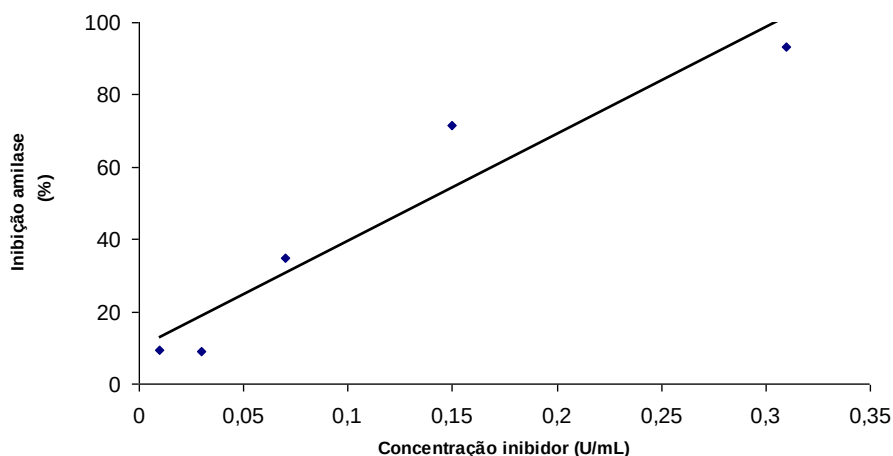


Fig. 8: Curva de concentração para determinação do IC₅₀ do inibidor, tipo I (Sigma) extraído do trigo (*Triticum aestivum*) sobre a atividade da HSA-CTI em diferentes concentrações (0,31-0,01U/mL), com pré-incubação por 30min. Cada ponto representa a média de 2 experimentos com R²=0,91.

Uma variedade de métodos é usada para avaliar a inibição da alfa-amilase por extratos vegetais, mas apresentam limitações como pouca estabilidade, dificuldade de preparo e reprodutibilidade, além disso, consomem tempo e grande quantidade de reagentes (Soor and Hincke, 1990). A realização do ensaio de inibição pelo método cinético GalG2CNP em microplaca facilita a realização de estudos de bioprospecção, pois permite testar vários extratos ao mesmo tempo. Além disso, é um método bastante específico e preciso, pois o substrato GalG2CNP não requer enzimas adicionais para liberar o cromóforo (Morishita et al. 2000). Kandra et al. (2005) verificou que substratos de cadeia curta permitem melhor interação da enzima com o inibidor do que substratos de cadeia longa. Este método apresentou vantagens em relação aos dados mostrados no estudo de Albuquerque et al. (2003) em relação a menor variação e maior reprodutibilidade (dados não mostrados).

Através do fracionamento da saliva humana por cromatografia de troca iônica em condições quelantes obteve-se uma fração concentrada em amilase que foi denominada de HSA-CTI. Esta fração pode ser usada para estudos de inibição por método cinético para descoberta de novos inibidores. A análise dos resultados do ensaio de inibição revela que o extrato hidroalcóolico de *Pouteria*

sp. é um potencial candidato para estudos de elucidação estrutural, isolamento de seus compostos ativos e mecanismo de ação biológico. Além disso, estudos de inibição da HSA a partir da flora brasileira são de grande importância, pois podem contribuir no crescimento do conhecimento científico, podendo fornecer informações importantes para futuras alternativas de tratamento para o diabetes mellitus tipo 2 e obesidade.

4. Referências

Albuquerque, C.L., Bortolini Júnior., M.A., Mesquita, M.L., Silveira, D., Paula, J.E., Espindola, F.S., 2002. Inibição da atividade de alfa amilase da saliva humana por extratos de plantas. *In: XVII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2002, Cuiabá.*

Albuquerque, C.L., Paula, J.E., Espindola, L. S., Espindola, F. S., 2003. Uso de extratos vegetais em diferentes concentrações na inibição de alfa-amilase da saliva humana. *In: XVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Curitiba/PR.*

Ali, H., Houghton, P.J., Soumyanath, A., 2006. α -amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *J. Ethnopharmacol.* 449-55.

Antunes, A.F., Jimenez, A.V., Rocha, T.L. ; S.A., M.F.G., Paula, J.E., Espindola, L.S., 2007. Atividade inibitória de extratos de plantas sobre alfa-amilase salivar. *In: VI Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, Belém - Pará. Jornal Brasileiro de Fitomedicina. São Paulo.*

Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.

Brayer, G.D., Luo, Y. Withers, S.G., 1995. The structure of human pancreatic alpha-amylase at 1.8 Angstrom resolution and comparisons with related enzymes. *Protein Sci.* 4, 1730–1742.

Conforti, F., Loizzo, M.R., Statti, G.A., Menichini, F., 2005. Comparative radical scavenging and antidiabetic activities of methanolic extract and fractions from *Achillea ligustica*. *Alb. Biol. Pharm. Bull.* 1791-4.

Fontanini, D., Capocchi, A., Saviozzi, F., Galleschi, L., 2007. Simplified electrophoretic assay for human salivary α -amylase inhibitor detection in cereal seed flours. *J. Agric. Food Chem.* 55, 4334-4339

Fontanini, D., Capocchi, A., Saviozzi, F., Galleschi, L., 2007. Simplified electrophoretic assay for human salivary α -amylase inhibitor detection in cereal seed flours. *J. Agric. Food Chem.* 55, 4334-4339.

Fontes Junior, E. A., 2004. Investigação das possíveis atividades antinociceptiva e antiinflamatória do extrato etanólico de raiz de *Pouteria ramiflora* Radlk. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Brasil.

Francis, C.A., Hector, M.P., Proctor, G.B., 2000. Precipitation of specific proteins by freeze-thawing of human saliva. *Arch. Oral Biol.* 45, 601-606.

Gad, M.Z., El-Sawalhi, M.M., Ismail, M.F., El-Tanbouly, N.D., 2006. Biochemical study of the anti-diabetic action of the Egyptian plants Fenugreek and Balanites. *Mol Cell Biochem.* 173-83.

Gumucio, D.L., Wiebauer, K., Caldwell, R.M., Samuelson, L.C., Meisler, M.H., 1988. Concerted evolution of human amylase genes. *Mol Cell Biol.* 1197-1205.

Hanefeld, M., Cagatay, M., Petrowitsch, T., Neuser, D., Petzinna, D., Rupp, M., 2004. Acarbose reduces the risk for myocardial infarction in type 2 diabetic patients: meta-analysis of seven long-term studies. *Eur Heart J.* 25, 10-6.

Hirtz, C., Chevalier, F., Centeno, D., Rofidal, V., Egea, J.C., Rossignol, M., Sommerer, N., Péreère, D.D., 2005. MS characterization of multiple forms of alpha-amylase in human saliva. *Proteomics.* 5, 4597-4607.

Kandra, L., Gyémánt, G., Zajác, Á., Batta, G., 2004. Inhibitory effects of tannin on human salivary α -amylase. BBRC. 319, p. 1265-1271.

Kandra, L., Zajác, Á., Remenyik, J., Gyémánt, G., 2005. Kinetic investigation of a new inhibitor for human salivary α -amylase. BBRC. 334, 824-828.

Kaplan, M. A. C. Figueiredo, M. R., Gottlieb, O. R., 1994. Chemical diversity of plants from Brazilian Cerrados. Anais da Academia Brasileira de Ciências 66. Supl. 1 - parte I, 50-55.

Kim, Y.M., Jeong, Y.K., Wang, M.H., Lee, W.I., Rhee, H.I., 2005. Inhibitory effect of pine extract on α -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. Nutrition. 756-761.

Kobayashi, K., Baba, E., Fushiya, S., Takano, F., Batkhui, J., Bash, T., Sanchir, C., Yoshizaki, F., 2003. Screening of Mongolian Plants of Influence on Amylase Activity in Mouse Plasma and Gastrointestinal Tube. Biol. Pharm. Bull. 26, 1045-1048.

Laemmli, U.K., Favre, M., 1973. Maturation of the head of bacteriophage T4. J. Mol. Biol. 80, 575-579.

Liang, H., Wang Y., Wang, Q., Ruan, M.S., 1999. Hydrophobic interaction chromatography and capillary zone electrophoresis to explore the correlation between the isoenzymes of salivary α -amylase and dental caries. J. chromatogr. B. 724, 381-388.

Ma, J., Yang, H., Basile, M.J., Kennelly, E.J., 2004. Analysis of polyphenolic antioxidants from the fruits of three Pouteria species by selected ion monitoring liquid chromatography-mass spectrometry. J. Agric. Food Chem. 52, 5873-5878.

Machius, M., Declerck, N., Huber, R., Wiegand, G., 1998. Activation of *Bacillus licheniformis* α -amylase through a disorder-order transition of the substrate-binding site mediated by a calcium-sodium-calcium metal triad. Structure. 6, 281-292.

McCarter, J. D., and Withers, S. G., 1996. Unequivocal identification of Asp-214 as the catalytic nucleophile of *Saccharomyces cerevisiae* alpha-glucosidase using 5-fluoro glycosyl fluorides. *J. Biol. Chem.* 271, 6889–6894

McDougall, G.J., Shpiro, F., Dobson, P., Smith, P., Blake, A., Stewart, D., 2005. Different Polyphenolic Components of Soft Fruits Inhibit α -Amylase and α -Glicosidase. *J. Agric. Food Chem.* 53, 2760-2766.

Miura, T., Koide, T., Ohichi, R., Kako, M., Usami, M., Ishihara, E., Yasuda, N., Ishida, H., Seino, Y., Tanigawa, K., 1998. Effect of acarbose (alpha-glucosidase inhibitor) on disaccharase activity in small intestine in KK-Ay and ddY mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 44, 371-9.

Morishita, Y., Iinuma, Y., Nakashima, N., Majima, K., Mizuguchi, K., Kawamura, Y., 2000. Total and pancreatic amylase measured with 2-chloro-4-nitrophenyl-4-O- β -D-galactopyranosylmatoside. *Clin. Chem.* 46, 928-933.

Navazesh, M., 1993. Methods for collecting saliva. *Annals of the New York Academy of Science, Saliva as a diagnostic fluid.* New York, pp. 216-233.

Oneda, H., Lee, S., Inouye, K., 2004. Inhibitory effect of 0,19 α -amylase from wheat kernel on the activity of porcine pancreas α -amylase and its thermal stability. *J. Biochem.* 135, 421-427.

Ramasubbu, N., Paloth, V., Luo, Y., Brayer, G.D., Levine, M.J., 1996. Structure of human salivary α -amylase at 1.6 Angstrom resolution: implications for its role in the oral cavity. *Acta Crystallogr. D* 52, pp. 435–446.

Ramasubbu, N., Ragunath, C., Mishra, P.J., 2003. Probing the role of a mobile loop in substrate binding and enzyme activity of human salivary amylase. *J. Mol. Biol.* 325, 1061–1076.

Reddy, M.K., Heda, G.D., Reddy, J.K., 1987. Purification and characterization of α -amylase from rat pancreatic acinar carcinoma Comparison with pancreatic α -amylase. *Biochem. J.* 242, 681-687.

Rydberg, E. H., Li, C., Maurus, R., Overall, C. M., Brayer, G. D., and Withers, S. G., 2002. Mechanistic analyses of catalysis in human pancreatic alpha-amylase: detailed kinetic and structural studies of mutants of three conserved carboxylic acids. *Biochemistry*. 41, 4492–4502.

Sajedi, R.H., Naderi-Manesh, H., Khajed, K., Ahmadvand, R., Ranjbar, B., Asoodeh, A., Moradian, F., 2005. A Ca-independent α -amylase that is active and stable at low pH from the *Bacillus* sp. KR-8104. 36, 666-671.

Santimone, M. Koukiekolo, R., Moreau, Y., Berre, V.L., Rougé, P., Marchis-Mouren, G., Desseaux, V., 2004. Porcine pancreatic α -amylase inhibition by the kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) inhibitor (α -AI1) and structural changes in the α -amylase inhibitor complex. *BBA*.1696, 181-190.

Santimone, M. Koukiekolo, R., Moreau, Y., Berre, V.L., Rougé, P., Marchis-Mouren, G., Desseaux, V., 2004. Porcine pancreatic α -amylase inhibition by the kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) inhibitor (α -AI1) and structural changes in the α -amylase inhibitor complex. *BBA*.1696, 181-190.

Sky-Peck, H.H., 1977. Thuvasethakul, P. Human pancreatic alpha-amylase I. Purification and characterization. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 7, 298-309.

Soor, S.K., Hincke, M.T., 1990. Microplate reader-based kinetic determination of α -amylase activity: application to quantitation of secretion from rat parotid acini. *Anal. Biochem.* 188, 187-191.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, .4350-4354.

Capítulo III

Short Communication

**Fracionamento do extrato hidroalcoólico da casca de
Pouteria sp. para investigar os potenciais inibidores de
amilase**

Resumo

Alguns estudos preliminares sobre extratos de plantas do gênero *Pouteria* (Sapotaceae) abordam seu potencial em inibir a alfa-amilase humana. Estes estudos de inibição podem implicar na descoberta de novas fontes para reduzir a hiperglicemia pós-prandial, importante no tratamento de diabetes e obesidade. Os componentes ativos de *Pouteria* são ainda na maioria desconhecidos, por isso, o presente estudo fracionou e investigou as substâncias presentes no extrato hidroalcóolico de *Pouteria* sp. com potencial inibitório sobre a alfa-amilase salivar *in vitro*. O extrato foi fracionado em coluna Sephadex-LH 20 equilibrada com metanol lavada com água, seguido por acetona. Todas as frações (POUN) foram testadas quanto ao potencial em inibir a alfa-amilase *in vitro*. As frações POUN2 e 3 foram injetadas em HPLC semipreparativo coluna Supelcosil LC-18 fase móvel metanol:água e analisadas em HPLC analítico coluna Supelcosil LC-18 fase móvel metanol:ácido acético 0,1%. A fração POUN7 apresentou padrões de inibição semelhantes ao extrato bruto inibindo 40,22% a atividade da amilase, além disso, representa 35% do extrato e é marcada por conter 48,81% de taninos em sua composição. As frações POUN2 e 3 inibiram 15% da atividade da amilase sendo constituídas por taninos. O extrato avaliado é rico em taninos concluindo que este é um potencial candidato a outros estudos devido a estas substâncias estarem envolvidos em diversas funções terapêuticas.

Palavras-chave: *Pouteria* sp., taninos, inibição amilase, investigação fitoquímica.

Abstract

Preliminary studies about extracts from plants of the kind of *Pouteria* (Sapotaceae) deal their potential to inhibit human alpha-amylase. These studies may involve the discovery of new sources to reduce post-prandial hyperglycemia, important in the treatment of diabetes and obesity. The active components of *Pouteria sp.* are still mostly unknown, therefore, the present study fractionated and investigated the substances present in the extract of hydroalcoholic *Pouteria sp.* with the potential inhibitory on the salivary amylase *in vitro*. The extract has fractionated in Sephadex LH 20 column equilibrated in methanol and washed with water following by acetone. All the fractions (POUN) was assayed to inhibit the alpha-amylase *in vitro*. POUN 2 and 3 fractions have injected in semipreparative HPLC (Supecolsyl LC-18 column, mobile phase methanol: water) and analyzed in analytical HPLC (Supecolsyl LC-18 Sp column, mobile phase methanol: acetic acid 0.1%). Assay of inhibition showed that fraction POUN7 exhibited inhibition similar of the crude extract with 40.22% and fractions POUN 2 and 3 exhibited inhibition with 15% of the amylase activity. The fraction POUN7 has 48.81% of the constitute it in tannin and represent 35% of the composition of extract. The stem bark crude extract *Pouteria sp.* have composition it rich in tannin, in addition this extract is potential to others studies, due to this substances have involvement in others therapeutic function.

Keywords: *Pouteria sp.*, tannin, amylase inhibition, phytochemistry investigation.

1. Introdução

A família Sapotaceae possui 107 gêneros e mais de 1000 espécies. Há muitos gêneros que produzem frutos comestíveis, tais como *Chrysophyllum*, *Manilkara*, *Mimusops* e *Pouteria* (Mabberley, 1993). Essas espécies vivem em áreas tropicais e subtropicais. O gênero *Pouteria* é diversificado em espécies, porém há pouca investigação científica a respeito de seu aproveitamento farmacológico. Alguns estudos com *Pouteria* sp. mostram seu potencial de inibição sobre a alfa-amilase salivar humana, atividade citotóxica e hemaglutinante (Albuquerque et al. 2003; Manzan et al. 2002; Napolitano et al., 2003; Paula et al. 2004). Albuquerque (2003) em estudo de bioprospecção de inibidores de α -amilase salivar humana a partir de extratos de plantas do Cerrado verificou a atividade inibitória de 100 extratos hexânicos e etanólicos. Neste estudo destacaram-se os extratos da casca da *Matayba guianenses*, casca da raiz de *Serjania lethalis*, folha de *Pouteria torta* e madeira da raiz e casca do caule de *Pouteria* sp. que inibiram de 70 a 100% a atividade da alfa-amilase.

Em estudo anterior realizado em nosso laboratório verificou-se que o extrato hidroalcólico da casca de *Pouteria* sp. dentre outras preparações (aquoso por decocção e maceração, etanólico e hidroalcólico) foi mais eficaz sobre a inibição da alfa-amilase salivar humana *in vitro*. Além disso, Albuquerque et al. (2003) demonstrou que o extrato hidroalcólico da casca de *Pouteria* sp. não mostrou sinais aparentes de toxicidade em teste agudo na dose de 0,5mg/Kg, além disso causou diminuição de peso e glicemia em ratos. Fontes Junior (2004) concluiu que o extrato etanólico da raiz de *Pouteria* sp. não mostrou sinais de toxicidade em camundongos na dose de 100mg/Kg, além disso provocou efeito antiinflamatório em doses menores que estas. Assim, o presente trabalho teve como objetivo fracionar o extrato hidroalcólico da casca de *Pouteria* sp. e investigar os potenciais inibidores da amilase salivar.

2. Material e Métodos

2.1 Preparo do material vegetal

Coletou-se a casca e entrecasca do caule de cinco espécimes de *Pouteria sp.* na Reserva Ecológica do caça e Pesca, município de Uberlândia/MG em janeiro de 2007 no período da manhã. As exsiccatas foram identificadas pela Profa. Dra. Ana Angélica Almeida Barbosa do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia e depositadas no Herbário do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia, (HUFU 45.535). O material vegetal foi seco à temperatura ambiente e após a secagem foi triturado em liquidificador industrial até a obtenção de pó.

Preparou-se o extrato hidroalcóolico (EHP-C) do pó obtido (100g) por maceração (48h x 2 vezes) em 1L de água:etanol (v/v). Após isso o extrato foi filtrado com filtro de poliéster e centrifugado a 2000g por 20min a 4°C. O sobrenadante foi rotavaporado e posteriormente liofilizado.

2.2 Fracionamento do EHP-C.

5g do EHP-C foram dissolvidos em 10mL de metanol e centrifugados. O sobrenadante foi aplicado em coluna de Sephadex LH-20 (100cm x 3,0cm). Coletou-se 72 tubos com aproximadamente 13mL/tubo sob um fluxo de 2,6mL/min e seis erlenmeyers com 150mL cada. Após a coleta do último erlenmeyrer a coluna foi lavada com água e posteriormente acetona. As frações (POUN) obtidas foram reunidas de acordo com perfil analisado por TLC (thin-layer chromatography) fase móvel n-butanol, ácido acético e água (4:1:5 v/v), revelada com vanilina sulfúrica. Todas as frações foram testadas quanto ao potencial em inibir a atividade da amilase salivar humana na concentração de 10mg/mL em DMSO.

As frações POUN2 e POUN3 foram injetadas em HPLC semipreparativo, coluna Supelcosil LC-18 (25,0cm x 10,0mm), fluxo 2mL/min e fase móvel metanol (B) e água (A). A fase móvel consistiu em 0% de B na condição inicial, seguido

por um aumento de B para 30% em 100min, e passando para 100% de B com 110min. Em 120 min retorna à condição inicial e termina com 125min.

As frações POUN2 e POUN3 foram analisadas em HPLC analítico, coluna Supelcosil LC-18 (25,0cm x 4,6mm), fluxo 1mL/min e fase móvel metanol (B) e ácido acético 0,1% (A). Sendo a condição inicial de 10% em B, passando para 66% com 32min, voltando a condição inicial aos 35min e parando com 40min. Padrões de ácido gálico (0,1mg/mL) e catequina (5mg/ml) (Sigma) foram analisados nas mesmas condições.

2.3 Ensaio de inibição da alfa-amilase salivar pelas frações de EHP-C.

O ensaio de inibição foi determinado pelo método cinético GALG2CNP. Foi utilizada uma fração com concentração protéica conhecida rica em alfa-amilase (HSA-CTI) obtida a partir da saliva bruta, onde amostras de saliva foram coletadas e congeladas por 48h para precipitação protéica. Após centrifugação, o sobrenadante foi sujeito a cromatografia em coluna de Q-Sepharose equilibrada com 25mM de tampão Tris-HCl, pH 8,0 contendo 5mM de EDTA e 5mM de EGTA. O sobrenadante foi diluído na proporção 1:1 no mesmo tampão usado para equilíbrio da coluna (2 vezes concentrado). A fração não interagida com a coluna foi dialisada contra tampão bicarbonato de amônio pH 7,0 por três vezes, liofilizada e resuspendida em 3mL de tampão PBS 0,01M, pH 7,2. A fração HSA-CTI foi diluída 595x em tampão MES pH 6,0. As frações (10mg/mL solubilizadas em DMSO) foram pré-incubadas 30 minutos a 37°C com a amilase (1:10). Em placas de microtitulação de 96 poços, fundo chato, foi adicionado 10µl da solução pré-incubada e a reação foi iniciada pela adição de 300µl do substrato sintético GalG2CNP (2mM). Padrão de catequina (Sigma) foi testada na concentração de 50mg/mL solubilizada em etanol, seguindo indicação da Sigma, pois a amostra não solubiliza em DMSO. Foram realizados os controles com etanol e substrato na presença de amilase. Foram realizadas três leituras a 405nm com intervalos de 3 minutos a 37°C e o controle foi realizado pela amilase sem a presença do extrato. A atividade foi calculada pela fórmula:

$$\text{Atividade} = \frac{\sum \Delta \text{Abs/min} \times \text{TV} \times \text{DF}}{\text{MMA} \times \text{SV} \times \text{LP}} = \text{U/mL}$$

Onde: $\Delta \text{Abs/min}$ = somatório da diferença de absorbância por minuto $((A_3 - A_2) + (A_2 - A_1))/2$; TV = Volume total de reação (0,310); DF = fator de diluição (595); MMA = Coeficiente de absorvidade do 2-cloro-p-nitrofenol (12,9); SV = volume da amostra (0,01mL); LP = caminho óptico (0,97cm).

2.4 Dosagem de taninos

Realizou-se a dosagem de taninos do extrato bruto e fração POUN7 por ensaio colorimétrico baseando-se nos procedimentos descritos por Glasl, (1983), com algumas modificações e utilizando o protocolo da Farmacopéia Brasileira. Pesou-se 0,150g do pó do extrato hidroalcolico e da fração adicionando em seguida 50mL de água destilada. Esta solução foi denominada de solução-mãe (SM). Realizou-se a dosagem de polifenóis totais (A1), a partir de 5mL da SM completando o volume para 25mL com água destilada em um balão volumétrico. Para a dosagem de polifenóis não adsorvidos pela caseína (A2) 10mL da SM foram acrescidos à 0,15g de caseína agitando-se vigorosamente em agitador elétrico, por 60min. Filtrou-se e completou 5mL do filtrado para 25mL com água destilada em balão volumétrico. A solução referência (A3) foi preparada dissolvendo-se 0,05g de pirogalol em água e diluindo para 100ml. Diluiu-se 5ml desta solução a 100ml com água e aguardou 30 minutos. Para realizar a dosagem foram transferidos 2mL para cada solução, 2mL do reagente de Folin-Cicalteau e 16mL de Na₂CO₃ a 20% (p/v) e completou para 50mL com água destilada. A absorbância foi medida à 750nm, exatamente 2min após a adição do último reagente. Utilizou-se água destilada como branco. As análises foram realizadas em triplicatas. Calculou-se o teor de taninos totais, fração tanante e fração não tanante utilizando as expressões (2), (3) e (4):

$$A^{1\%} = \frac{A_3 \times 10}{C} \quad (1) \quad \text{TT} = \frac{FD \times A_1}{(m-p) \times A^{1\%}} \quad (2) \quad \text{NT} = \frac{FD \times A_2}{(m-p) \times A^{1\%}} \quad (3) \quad \text{FT} = \text{TT} - \text{NT} \quad (4)$$

$A^{1\%}$ = Absorbância específica da solução referência; A₃=Absorbância medida para a substância referência; C= Concentração em mg/mL do Pirogalol (0,025);

TT= Taninos totais (%) (p/p); FD= Fator de diluição (12500); A1= Absorbância medida para taninos totais; m= massa da droga (g); p= Determinação de água (g) (m-p=0,67);

NT= Fração não tanante em % (p/p); A2= Absorbância medida para taninos não precipitáveis; FT= Fração tanante em % (p/p). Os resultados foram fornecido em % (p/p).

3. Resultados e discussão

As frações do EHP-C obtidas da coluna de Sephadex LH-20 foram reunidas segundo perfil analisado por TLC, sendo denominadas de POUN1 a 7 (Fig. 1). A fração POUN1 representa 26% (1,32g) do extrato bruto total, a fração POUN7 representa 35% (1,73g) do extrato bruto e as demais representam ao todo 25% (POUN2: 0,38g; POUN3: 0,35g; POUN4: 0,12g; POUN5: 0,13g; POUN6: 0,25g) do extrato bruto.



Fig. 1: TLC das frações do EHP-C reunidas da coluna de Sephadex LH-20, fase móvel n-butanol, ácido acético e água (4:1:5 v/v), revelada com vanilina sulfúrica, sendo linha 1, POUN1; linha 2, POUN2; linha 3, POUN3; linha 4, POUN4; linha 5, POUN5; linha 6, POUN6; linha 7, POUN7.

A fração POUN7 foi mais ativa com 40% de inibição sobre a atividade da alfa-amilase, seguida das frações POUN2 e 3 com 20% de inibição. O ensaio de inibição mostrou que a fração POUN7 apresentou valores de inibição próximos ao extrato bruto que inibiu em 50% a atividade da amilase (Figura 2). Em relação à

dosagem de taninos totais, o extrato bruto apresentou concentração de $51,62\% \pm 5,15$. A fração POUN7 possui $48,81\% \pm 2,16$ da sua constituição representada por taninos. A inibição da alfa-amilase salivar pelo EHP-C pode estar relacionada à presença destas substâncias. Kandra et al. (2004) em estudo cinético testaram ácido tânico sobre a inibição da amilase salivar *in vitro* encontrando que taninos são mais potentes inibidores de amilase do que a acarbose. Ma et al. (2004) identificaram sete compostos polifenólicos antioxidantes (ácido gálico, galocatequina, catequina, epicatequina, diidromiricetina, catequina-3-O-galato e miricitrina) do extrato do fruto de três espécies de *Pouteria* (*P. Sapota*, *P. Viridis*, *P. Campechiana*).

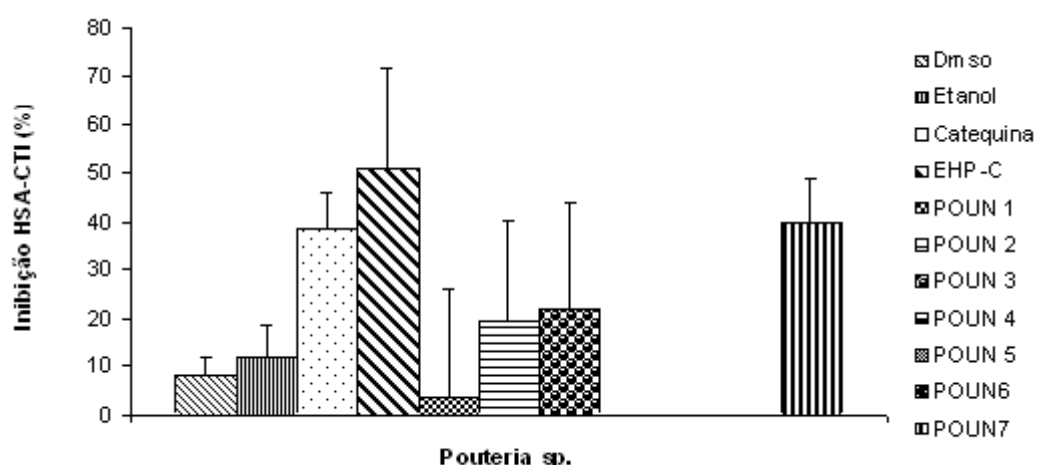


Fig. 2: Porcentagem de inibição da atividade da HSA-CTI pelo extrato bruto de *Pouteria* sp., frações obtidas da coluna de Sephadex LH 20 e catequina (Sigma) com pré-incubação por 30min. Foram utilizados como controle DMSO e etanol.

As frações POUN 2 e 3 foram injetadas em HPLC semipreparativo na tentativa de isolar os compostos ativos (Fig. 2). A fração POUN7 foi mais eficiente do que as demais, mas pelo fato dos taninos serem poliméricos e de elevado peso molecular haverá dificuldade de fracionamento.

Pela análise em HPLC observa-se que possivelmente há presença de catequina e ácido gálico nas frações POUN2 e 3, mas somente a análise espectral fornecerá dados seguros. Ainda não se sabe qual a substância presente no extrato hidroalcolico de *Pouteria* sp. que provoca a inibição da alfa-amilase salivar, mas no ensaio de inibição realizado com a catequina pôde-se obter 36% de inibição e o controle com etanol não apresentou inibição (Figura 2).

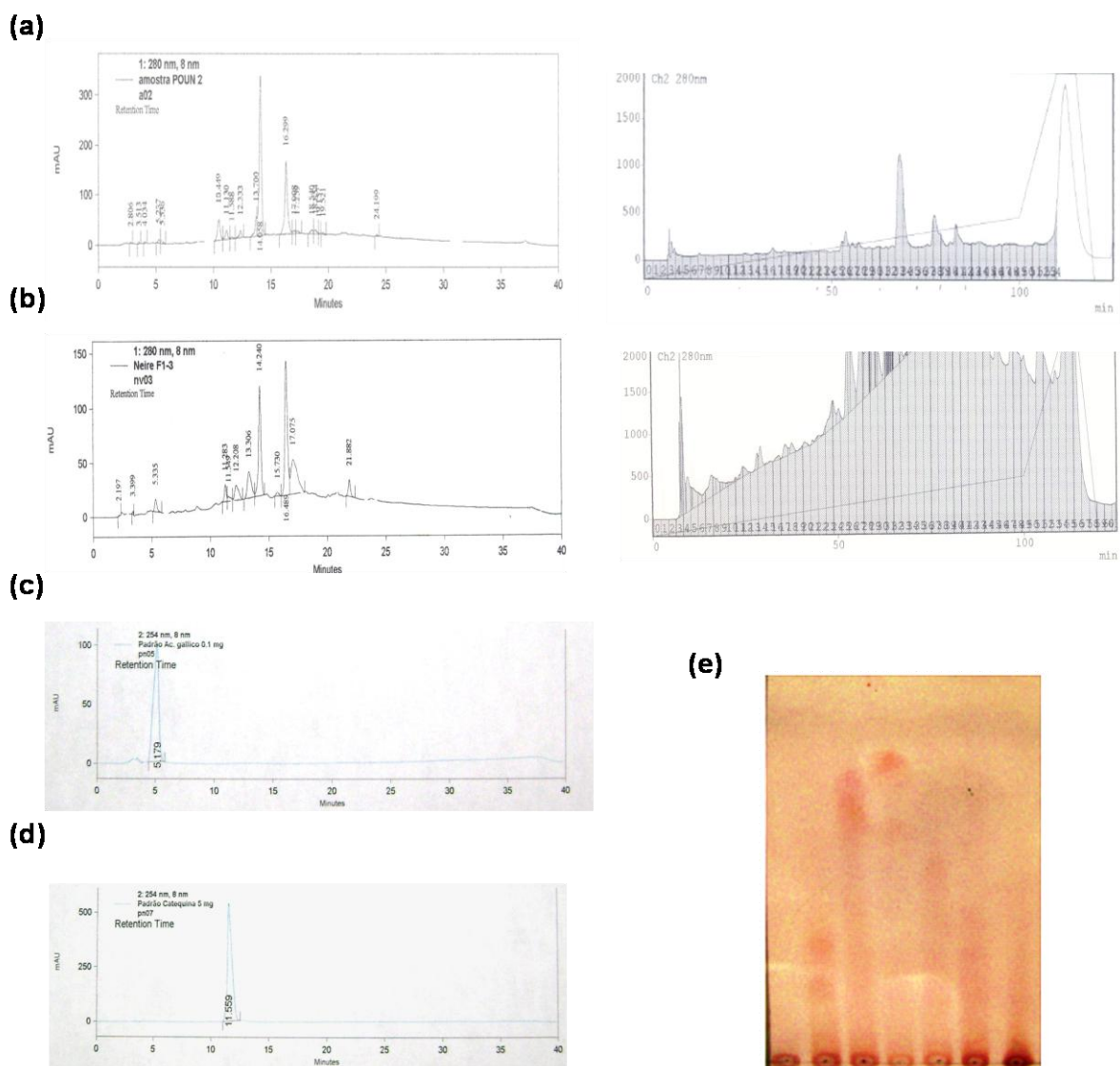


Fig. 3. (a) Cromatogramas da fração POUN 2 a 280nm em HPLC analítico (metanol/ácido acético 0,01%) e HPLC semipreparativo (metanol/água); (b) Cromatogramas da fração 3 a 280nm em HPLC analítico (metanol/ácido acético 0,01%) e HPLC semipreparativo (metanol:água); (c) Padrão ácido gálico (0,1mg/mL) a 280nm; (d) Padrão catequina (5mg/mL) a 280nm; (e) TLC frações de POUN 2 reunidas do HPLC, sendo linha 1, POUN2.1; linha 2, POUN2.2; linha 3, POUN2.3; linha 4, POUN2.4; linha 5, POUN2.5; linha 6, POUN2.6; linha 7, POUN2.7.

Taninos apresentam diversos efeitos nos sistemas biológicos porque têm potencial de quelar íons metálicos, precipitar proteínas e são antioxidantes biológicos. Estes compostos possuem várias funções que envolvem atividade antiviral, antioxidante, antimutagênica, anticarcinogênica, antiobesidade e hipocolesterolêmica (Dufrese and Farnworth, 2001; Kroll et al. 2003). Assim, vegetais contendo taninos são potenciais candidatos para estudos de

caracterização e elucidação estrutural, pois promovem diversos efeitos terapêuticos. Este fato sugere que o EHP-C além de inibir a atividade da alfa-amilase tem potencial para outros estudos como antioxidante, antiinflamatório, antibacteriano e etc.

Este método é um bom caminho para separação de taninos como mostrado na figura 2e, mas há como inconveniente os baixos rendimentos de material após liofilização dificultando a análise por RMN. Estudos complementares serão realizados a fim de isolar e identificar por RMN as substâncias inibidoras da amilase presentes no EHP-C. Além disso, realizar ensaio cinético para definir o comportamento do complexo ESI e estudos *in vivo* (glicêmicos e toxicológicos) para verificar a eficácia do inibidor.

4. Referências

Albuquerque, C. L., Paula, J. E., Espindola, L. S., Espindola, F. S., 2003. Uso de extratos vegetais em diferentes concentrações na inibição de alfa-amilase da saliva humana. In: XVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Curitiba/PR.

Dufrese, C. J., Farnworth, E. R., 2001. A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. J. Nutr. Biochem. 12, 404-421.

Farmacopéia Brasileira, 1996. IV edição, v.2 São Paulo, Atheneu.

Fontes Junior, E. A., 2004. Investigação das possíveis atividades antinociceptiva e antiinflamatória do extrato etanólico de raiz de *Pouteria ramiflora* Radlk. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Brasil.

Kandra, L., Gyémánt, G., Zajácz, Á., Batta, G., 2004. Inhibitory effects of tannin on human salivary α -amylase. BBRC. 319, 1265-1271.

Kroll, J., Rawel, H., Rohn, S., 2003. Reactions of plant phenolics with food proteins and enzymes under special consideration of covalent bonds. Food Sci. Technol. Res. 13, 184-196.

Ma, J., Yang, H., Basile, M. J., Kennelly, E. J., 2004. Analysis of poliphenolic antioxidants from the fruits of three Pouteria species by selected ion monitoring liquid chromatography-mass spectrometry. J. Agric. Food Chem. 52, 5873-5878.

Mabberley, D.J., 1993. The Plant-Book: A Portable Dictionary of the Higher Plants, Cambridge University Press: New York, pp. 520.

Manzan, R. M., Carneiro, W. P., Tuteleers, M. D. P. L., Caixeta, C., Napolitano, D. R., Silveira, D., Paula, J. E., Espindola, L. S., Souza, M. A., Espindola, F. S., 2002. Análise da ação hemaglutinante de plantas em eritrócitos humanos. In: III workshop da Pós Graduação em imunologia e Parasitologia Aplicadas, Uberlândia. Bioscience Journal. v. 18. pp. 67-67.

Napolitano, D. R., Espindola, L. S., Souza, M. A., Paula, J. E., Espindola, F. S., 2003. Down-modulation of nitric oxide production by murine macrophages treated with extracts from Casearia sylvestris, Serjania lethalis, Pouteria ramiflora and Cupania vernalis . In: I Encontro Anual de Pesquisa em Bioquímica e Imunologia- Prof. Marcos Luiz dos Mares Guia, Belo Horizonte. Anais do I Encontro Anual de Pesquisa em Bioquímica e Imunologia, pp. 51-51.

Paula, F. S., Souza, M. A., Espindola, L. S., Paula, J. E., Espindola, F. S., 2004. Atividade Hemaglutinante de extratos de plantas do bioma cerrado. In: XV Congresso da Sociedade de Botânica de São Paulo, Ubatuba. Anais XV Congresso da Sociedade de Botânica de São Paulo. v. 15. pp. 168-168.

Anexo

Instructions to Authors

Aims and Scopes

PHYTOMEDICINE An international Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology is devoted to the advancement and promotion of research on medicinal plants.

The following areas are covered:

- Clinical studies of standardized preparations
- Pharmacological and molecular biological studies of standardized plant extracts
- New pharmacological and molecular biological results on isolated plant constituents having significant bioactivity
- Pharmacokinetic and bioavailability studies of prominent bioactive compounds from standardized plant extracts
- New standardization methods for prominent plant extracts and their constituents
- Results presented have to be innovative and should be discussed with respect to possible therapeutic relevance
- Outstanding and novel clinical and pharmacological studies have first preference
- papers on the isolation and structure elucidation of bioactive compounds do not fall into the scope of Phytomedicine
- Screening results of plants will not be considered.

Clinical studies

- Clinical studies must be designed, implemented and analyzed in a manner to meet current standards for clinical trials (GCP = Good Clinical Practice), which are equivalent to those required for synthetic drugs.
- For guidelines and necessary information see the following reviews: "Improving the quality of reporting of randomized controlled trials. The CONSORT statement", C. Begg et al. (1996) JAMA 276:637-639 and "Better reporting of randomized controlled trials: the CONSORT statement", D.G. Altman (1996) BMJ 313:570-571. All subjective as well as objective parameters must be measured, reported and analyzed.
- The plant extract(s) studied must be defined and standardized in the same way as described under "Pharmacological and molecular biological studies".
- Clinical studies must be approved by an Institutional Ethics Committee or its equivalent.

Pharmacological and molecular biological studies (*in vitro*, *ex vivo* or *in vivo*)

- Results have to be based on adequate statistics. Positive controls (reference/ standard compounds) and at least three dose responses have to be included.
- Correlation of pharmacological results with the known bioactive constituents of the extract tested, should be discussed, if possible.
- Manuscripts in which new pharmacological results of plant extracts are reported, must contain a discussion on the suggested or identified active principles which might be responsible for the pharmacological activities of the extract.
- If the phytochemical facilities are not available or the expertise is lacking, the authors are asked to seek cooperation with a phytochemical laboratory.
- It is required that the extract being reported with pharmacological activity must have some type of standardization. The standardization can be carried out by means of a HPLC-fingerprint or quantitative assessment of known bioactive compounds. A qualitative HPLC-fingerprint analysis for extracts

whose bioactive constituents are unknown may be used. A marker substance should be included, but it should not be a ubiquitous constituent. Without standardization of an extract, results cannot be reproduced and are not acceptable for pharmacological and clinical studies.

- Papers which describe classes of compounds or pharmacological activities which follow a market trend (e.g. antioxidants, phytoestrogens, antiphlogistics, antidiabetics etc.) will be accepted only if the activities presented exceed those of standard substances and could be promising candidates for further thorough pharmacological and clinical investigations.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Preparation and Format of manuscripts

Manuscripts submitted to Phytomedicine should be structured in the following manner:

Title

Full author names referenced by arabic superscripts with affiliation and addresses of all authors, e.g.

A. Hymele^a, T.H. Iversen^a, J. Rohloff^{a,b}, B. Erho^b

^aDepartment of Biology, The Plant Biocentre, Norwegian University of Science and Technology N-7491 Trondheim, Norway

^bInstitute of Pathobiology, Addis Ababa University P.O. 1176; Addis Ababa, Ethiopia

*The phone, fax and email address of the corresponding author should be placed on the cover page.

An Abstract should contain brief information on purpose, methods, results and conclusions in no more than 1000 words

Keywords: Not more than six words

Introduction

Materials and Methods

Results and Discussion

Acknowledgement

Literature citations should appear parenthetically in the text as the last name of the author and year of publication, such as (Wagner, 1992), (Smith and Peters, 1991) or (Johnson et al. 1987). Citations should be presented in the bibliography alphabetically by author names and if two or more publications are used by the same authors and the same year of publication, lower case letters following the year of publication should distinguish them, e.g. (Smith, 1990a,b), (Gunter and Miller 1990b) etc.

The correct citation in the bibliography is e.g.

Brown, J.H., Tylor P., 1996. Muscarine receptor agonist and antagonists. In: Hardman, J.G., Limbird, L.E. (Eds.), Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. McGraw-Hill, New York, pp. 141-160.

Offermann, F., 1998. Zur Phytochemie, Pharmakologie und Analytik der chinesischen Arzneipflanzen *Drynaria fortunei*, *Fritillaria* und

Bupleurum. PhD thesis, Faculty of Chemistry and Pharmacy, University of Munich, Germany.
 Liu, C.D., Kwan, D., Saxton, R.E., McFadden, D.W., 2000. Hypericin and photodynamic therapy decreases human pancreatic cancer in vitro and in vivo. *J. Surgical Res.* 93, 137–143.

Documentation of Materials being studied: All biological materials used in the investigation should be stated as derived from cultivated plants or from their natural habitat. Voucher specimens representing the material being studied must be deposited in a specific location with a voucher number. The site (GPS coordinates) and date of collection, with the part(s) used in the study, should be documented. If fresh plant material is not used, the method of drying should be stated. The most recent botanically accepted Latin binomial(s), with authorities, of the plant(s) used must be given, together with accepted synonymy, if appropriate. Vernacular names should also be given for plants used in the study. Data on plants not identified to the species level will not be accepted.

The concentration(s) of known biologically active secondary metabolites in the plant(s) or extract(s) being studied must be presented, together with the methodology (a reference may be sufficient) used to determine these levels, in the event that the activity being studied is related to the activity of the constituent(s).

When pharmacological activity of defined chemical constituents are being studied, the degree of purity must be indicated and the means by which the analysis was conducted.

Abbreviations: See "Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals" (1991) *New England Journal of Medicine* 324:424–428.

Typewriting, Figures and Tables: The manuscript has to be written in the English language. Typewritten manuscripts should be double-spaced.

Text, including italics and bold characters, should be saved as Word or WordPerfect .rtf or .doc documents for Windows.

Figures and Tables: The maximum type area is 17 cm (6.7 inch) width and 22.5 cm (8.9 inch) height. Figures must be clearly lettered and suitable for reproduction to fit either one column width (8.2 cm or 3.2 inch) or two-columns width (17 cm or 6.7 inch). In addition to the printed version figures and tables can be supplied in digital format (EPS, TIFF, JPG or PPT and XLS format, final resolution 300 dpi for halftones, 1270 dpi for black/white line drawings). Colour: If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge that these figures will appear in colour on the web (e.g., Science Direct

and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the print version. Colour figures can be printed only if the costs are covered by the author (EURO 450.00 for one colour plate, EUR 350.00 for every following colour plate/for more than one plate ask for a cost estimate). Authors who agreed to pay the production costs for figures to be published in colour will automatically receive 50 additional free offprints. For further information on the preparation of electronic artwork, please see www.elsevier.com/artworkinstructions.

Label each figure with figure number. Figures should be cited in the text as Fig. 1 or Figs. 1 and 2. Figures should be placed after the References (and Appendices, if any) in the manuscript. They should be preceded by the figure legends on a separate page. Indicate in the margins of the manuscript where figures should be placed. Tables should be prepared so that they can be printed in one column or full page width (see above). Tables should be submitted at the end of the manuscript, placed on separate pages, double spaced and numbered sequentially. Indicate in the margins of the manuscript where tables should be placed. Tables should be cited in the text as Table 1 or Table 1 and 2. Tables containing a great amount of pharmacological should be better presented as instructive graphs.

Forms of Manuscripts

Original Papers

The papers should contain not more than 12–15 typewritten pages or up to 5000 words, including references, tables and figures. Previously reported methods should be referenced only. The number of references should not exceed 30 (except for review articles).

Short Communications

They should be condensed to 4–8 typewritten pages or not more than 2500 words including references and a maximum of two illustrations.

Review Articles

Review articles will only be by invitation. Review articles can provide concise and critical updates on a subject of current interest. Herbal drug-monographs are only acceptable if they contain the newest pharmacological and toxicological issues and an outlook on future directions.

Submission of Manuscripts

Please submit your manuscripts electronically to: <http://ees.elsevier.com/phymed>

Offprints: The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail, or, alternatively, free paper offprints. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Additional paper offprints can be ordered by the authors. An order form with prices will be sent to the corresponding author.