



NATALIA RITTER RUAS

**INIBIÇÃO DE α -GLICOSIDASE POR PREPARAÇÕES RICAS
EM VERBASCOSÍDEO DE *Lippia dulcis* Trevir.
(VERBENACEAE)**

**LAVRAS-MG
2020**

NATALIA RITTER RUAS

**INIBIÇÃO DE α -GLICOSIDASE POR PREPARAÇÕES RICAS EM
VERBASCOSÍDEO DE *Lippia dulcis* Trevir. (VERBENACEAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, área de concentração em Bioatividade de Plantas Medicinais, para a obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci
Orientadora

**LAVRAS-MG
2020**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA,
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Ruas, Natalia Ritter.

Inibição de α -glicosidase por preparações ricas em verbascosídeo de *Lippia dulcis* Trevir. (Verbenaceae) / Natalia Ritter Ruas. – 2020.

57 p. : il.

Orientador: Suzan Kelly Vilela Bertolucci.

Dissertação (Mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Capim doce. 2. Planta medicinal. 3. Potencial antidiabético. I. Bertolucci, Suzan Kelly Vilela. II. Título.

NATALIA RITTER RUAS

**INIBIÇÃO DE α -GLICOSIDASE POR PREPARAÇÕES RICAS EM
VERBASCOSÍDEO DE *Lippia dulcis* Trevir. (VERBENACEAE)**

**α -GLYCOSIDASE INHIBITION BY PREPARATIONS RICH IN VERBASCOSIDE
OF *Lippia dulcis* Trevir. (VERBENACEAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, área de concentração em Bioatividade de Plantas Medicinais, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 07 de fevereiro de 2020.

Dra. Elaine Fontes Ferreira da Cunha UFLA

Dra. Luciana Lopes Silva Pereira UFLA

Dra. Aline Carvalho Pereira UFLA

Profa. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci

Orientadora

**LAVRAS-MG
2020**

À minha família, que torna tudo possível.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Renan e Gleice, eu dedico mais essa etapa da minha vida. Meu pai, pela oportunidade, incentivo, amor e apoio incondicional. À minha mãe, por todo amor, por ter sido a disciplinadora da minha vida, sabendo incentivar com ternura e firmeza, com confiança e certeza de que não havia obstáculo que eu não pudesse vencer. Aos meus irmãos Matheus, Rafaela e Manuela, por estarem presentes, mesmo que distantes, em todos os momentos. Vocês são a base e a razão de todo o meu esforço.

Ao meu padrinho e a minha madrinha, pela confiança, amor e apoio incondicional. À minha família, vovós, tias, e primos que, em todos os momentos, se fizeram presentes.

Ao meu namorado Gabriel, por todos os momentos compartilhados, por ser meu parceiro de vida, me apoiando e cuidando de mim sempre. Aos meus filhos de 4 patas, Hati e Brisa, pelo companheirismo e amor incondicional.

À minha amiga Bel, pela amizade e companheirismo, ao longo desses anos e pelo exemplo de garra, força e resiliência. Você foi um presente que a vida me deu!

À Carolina Germano que, mesmo longe, se fez presente, sendo fundamental no processo de construção desse trabalho e por ser uma amiga tão especial. Sinto falta do nosso convívio diário.

À Fatinha, pela amizade, pelas caronas, pelas alegrias e tristezas compartilhadas. Que essa amizade perdure a vida inteira

À Ana Paula, pela amizade e companhia em todos os momentos de alegria, tristeza, estresse, medo, insegurança e pela sua ajuda em todos os momentos que eu precisei. Agradeço todos os dias, pela sua amizade.

À Erica, pela amizade, caronas, pela convivência diária e por ser a rainha do HPLC e me ajudar com todas as análises.

A todos os amigos do Laboratório de Fitoquímica do Horto de Plantas Medicinais, da UFLA, passamos bons momentos juntos. Vocês fizeram toda a diferença no meu dia a dia.

À Professora Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci, pela oportunidade, orientação, credibilidade, amizade e confiança durante todo o projeto.

À Professora Dra. Aline Carvalho Pereira, pela orientação e ajuda na construção desse trabalho.

À Professora Dra. Luciana Lopes Silva Pereira, pela orientação nos ensaios enzimáticos, pela disponibilidade e incentivo na realização desse trabalho.

À Professora Dra. Elaine Fontes Ferreira da Cunha, pela realização do estudo teórico de ancoramento molecular, pela disponibilidade e orientação.

Ao Professor Dr. Jose Eduardo Pinto, por sempre estar disponível para ajudar os alunos.

Aos técnicos do Horto: Annete, Paulinho, Leandro (Dico) e Giulia, que estão sempre dispostos a nos ajudar. Aprendi muito com vocês.

À Universidade Federal de Lavras por oferecer essa oportunidade e estrutura para o meu crescimento e formação profissional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Plantas Mediciniais, Aromáticas e Condimentares, pela oportunidade.

Ao Laboratório de Fitoquímica do Horto de Plantas Mediciniais, pela estrutura fornecida para realização dos experimentos.

Às agências de fomento CAPES, FAPEMIG e CNPq, pelo apoio financeiro na execução desta pesquisa.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Lippia dulcis Trevir. (Verbenaceae) é uma planta medicinal utilizada por comunidades amazônicas, para o controle do diabetes e como calmante. Estudos recentes do nosso grupo indicaram o potencial de preparações de *L. dulcis* em inibir a α -glicosidase (GL). No presente trabalho, originou-se um artigo que teve como objetivo confirmar a atividade inibitória da GL, assim como quantificar o verbascosídeo (VEB) e realizar estudos de ancoragem molecular de VEB com a GL de *Bacillus stearothermophilus*. O mesmo extrato etanólico (EE) e as frações ensaiadas por Germano (2019) foram reavaliadas. No entanto, o presente ensaio de inibição *in vitro* da GL foi otimizado quanto à concentração do substrato, quanto à presença de GHS; e, um rigoroso controle da temperatura de trabalho. Além disso, os ensaios foram realizados na presença e ausência de um fluido gástrico simulado. O EE e as frações de *L. dulcis* apresentam atividade inibidora da GL de *Bacillus stearothermophilus*. As frações FAD2 e FAD3, no ensaio sem fluido gástrico, foram as que mais inibiram a GL, apresentando inibições de 63,67% e 61,74% e valores de UIG de 675,00 e 654,57 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ de amostra, respectivamente. Análises cromatográficas por CLAE-DAD confirmaram a presença de VEB nas amostras. As amostras apresentaram concentrações de VEB entre 49,9 mg/g e 243,5 mg/g. Estudos teóricos de ancoramento molecular do VEB com a enzima GL de *Bacillus stearothermophilus* foram consistentes com a atividade inibitória dessa enzima nos ensaios de bancada. Com isso, podemos confirmar que as preparações de *L. dulcis* apresentam atividade inibidora da enzima GL de *Bacillus stearothermophilus*.

Palavras-chave: Capim doce. Planta medicinal. Potencial antidiabético.

ABSTRACT

Lippia dulcis Trevir. (Verbenaceae) is a medicinal plant used by Amazonian communities in the control of diabetes and as a tranquilizer. Recent studies by our group have indicated the potential of *L. dulcis* preparations to inhibit α -glycosidase (GL). The present study originated an article that aimed to confirm the inhibitory activity of GL, as well as to quantify the verbascoside (VEB) and to perform studies of molecular anchoring of VEB with GL of *Bacillus stearothermophilus*. The same ethanolic extract (EE) and the fractions tested by Germano (2019) were reassessed. However, the present *in vitro* inhibition test of GL was optimized in terms of substrate concentration; the presence of GHS; and a strict control of the working temperature. In addition, the tests were performed in the presence and absence of a simulated gastric fluid. The EE and the fractions *L. dulcis* present inhibitory activity of *Bacillus stearothermophilus* GL. The fractions FAD2 and FAD3, in the assay without gastric fluid, were the ones that most inhibited GL, with inhibitions of 63.67% and 61.74% and UIG values of 675.00 and 654.57 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ of sample, respectively. HPLC-DAD analysis confirmed the predominant presence of VEB in the samples. Theoretical studies of molecular docking of VEB with the enzyme GL from *Bacillus stearothermophilus* were consistent with the inhibitory activity of this enzyme in the experimental tests. Therefore, we can confirm that the preparations of *L. dulcis* present inhibitory activity of the enzyme GL from *Bacillus stearothermophilus*.

Keywords: Sweet grass. Medicinal plant. Antidiabetic potential. Verbascoside.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

- Figura 1 - Exemplar de espécie do gênero *Lippia dulcis* Trevir. 16
- Figura 2 - Estruturas químicas representativas de sesquiterpenos do tipo bisabolano isolados de *Lippia dulcis*. 18
- Figura 3 - Estruturas químicas representativas de glicosídeos feniletanóides isolados de *Lippia dulcis*. 19
- Figura 4 - Estruturas químicas representativas de flavonoides isolados de *Lippia dulcis*. 19
- Figura 5 - Esquemas de reação hidrolítica e de transferência de: α -glicosidase (A) e glicoamilase (B). 21
- Figura 6 - Dobras de glicosidase: barril (α/β)₈ 22
- Figura 7 - Mecanismo de ação dos inibidores da α -glicosidase. 24

SEGUNDA PARTE - ARTIGO

- Figura 1 - Perfis cromatográficos representativos por CLAE-DAD a 210 nm de preparações de *Lippia dulcis* empregadas no ensaio de inibição da α -glicosidase e de amostra autêntica de verbascosídeo. 48
- Figura 2 - Média das curvas analíticas obtidas por CLAE-DAD em dois dias consecutivos. 50
- Figura 3 - Estrutura tridimensional da enzima α -glicosidase de *Bacillus stearothermophilus*. A cavidade está representada em cinza e os três resíduos catalíticos em rosa. As α -hélices estão em vermelho e as folhas- β em azul. 52

LISTA DE TABELAS

PRIMEIRA PARTE

Tabela 1 - Clãs de glicosidase.....	22
-------------------------------------	----

SEGUNDA PARTE - ARTIGO

Tabela 1 - Correspondência entre os volumes e as massas injetadas para construção da curva analítica do verbascosídeo, conforme a concentração da solução de referência.	43
Tabela 2 - Porcentagem de inibição da enzima α -glicosidase (%I); Unidades de Inibição de α - glicosidase (UIG) do extrato etanólico e frações de <i>Lippia dulcis</i> , sem e com fluido gástrico simulado e concentração de verbascosídeo nas amostras.	46
Tabela 3 - Massa injetada, áreas médias ($n = 3$) e desvio padrão relativo das curvas analíticas de verbascosídeo nos dois dias de análise.	49
Tabela 4 - Resultados da regressão linear para curvas analíticas de verbascosídeo, em dois dias consecutivos de análise.....	50
Tabela 5 - Valores de energia total do complexo proteína-ligante, energia intermolecular, energia intramolecular e energia de ligação hidrogênio.....	52

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	12
1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVO	14
2.1	Objetivo específico	14
3	REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1	<i>Lippia dulcis</i> caracterização botânica, ocorrência, usos populares e atividades biológicas	15
3.2	A química da espécie	17
3.3	Glicosidases	20
3.4	Inibição de enzimas digestivas: α -Glicosidase	23
3.5	Diabetes <i>mellitus</i>	26
	REFERÊNCIAS	28
	SEGUNDA PARTE – ARTIGO	34
	ARTIGO 1 - INIBIÇÃO DE α-GLICOSIDASE POR PREPARAÇÕES DE <i>Lippia dulcis</i> Trevir. (VERBENACEAE), QUANTIFICAÇÃO E ESTUDO DE ANCORAMENTO MOLECULAR DE VERBASCOSÍDEO	34
1	INTRODUÇÃO	37
2	MATERIAL E MÉTODOS	39
2.1	Obtenção do extrato bruto etanólico e frações de <i>L. dulcis</i>	39
2.2	Reagentes e equipamentos	39
2.3	Atividade inibidora de α -glicosidase	40
2.3.1	Padronização da enzima controle	40
2.3.2	Teste de solubilidade	40
2.3.3	Preparo das amostras	40
2.3.4	Preparo do fluido gástrico simulado	41
2.3.5	Ensaio de inibição da α -glicosidase	41
2.3.6	Determinação da inibição	41
2.4	Perfis cromatográficos por CLAE-DAD	42
2.4.1	Preparo das amostras	42
2.4.2	Condições cromatográficas	42
2.4.3	Caracterização e quantificação do verbascosídeo	43
2.5	Análise de ancoramento molecular	44
3	RESULTADOS E DISCUSSÕES	45
4	CONCLUSÃO	54
	REFERÊNCIAS	55

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Medicamentos à base de plantas têm contribuído revolucionariamente à terapêutica moderna. Há cerca de um século, a maioria dos medicamentos eficazes foram baseados em plantas e muitos medicamentos convencionais se originaram de fontes vegetais, como ácido acetilsalicílico (casca de salgueiro), digoxina (da dedaleira), quinina (da casca de cinchona) e morfina (da papoula do ópio) (GUNJAN et al., 2015). Segundo a OMS, quase 25% dos medicamentos modernos foram derivados de plantas utilizadas na medicina tradicional. Muitos outros são análogos sintéticos produzidos a partir de compostos modelos isolados de plantas (AHMAD; KHAN, 2019).

Ainda hoje, as plantas medicinais desempenham um papel vital para o desenvolvimento de novos medicamentos (AHMAD; KHAN, 2019). Segundo Crag e Newman (2013), os produtos naturais são uma fonte contínua de novas possibilidades de medicamentos, exigindo uma exploração rigorosa, por meio de todas as abordagens para a descoberta de novas drogas. A flora brasileira é, sem dúvida, uma das mais abundantes fontes de inspiração para o desenvolvimento de novos medicamentos. No entanto, a vasta e empolgante biodiversidade da flora brasileira ainda é pouco explorada (MODOLO; FOGGIO, 2019).

Lippia dulcis Trevir. (Verbenaceae) é uma planta utilizada há muito tempo, na medicina tradicional mexicana, especialmente para o tratamento de tosse, resfriado, bronquite, asma e cólica (NAYAL; MELZIG, 2005). Na Amazônia brasileira, é conhecida como capim-doce e consumida na forma de chá, preparado a partir das folhas, e utilizada no controle do diabetes e como calmante. Além do sabor doce, decorrente da presença de (+)-hernandulcina, um sesquiterpeno 1000 vezes mais doce que a sacarose, a planta também contém verbascosídeo, um glicosídeo feniletanoide que apontou efeitos inibitórios sobre a α -glicosidase (COMPADRE et al., 1985; KANEDA e al., 1982; LIU et al., 2014; MORIKAWA et al., 2014; ONO et al., 2005).

As glicosidases estão envolvidas em uma ampla gama de processos biológicos importantes, como digestão intestinal, processamento pós-tradução da cadeia de açúcar das glicoproteínas, sistemas de controle de qualidade no retículo endoplasmático (RE) e o mecanismo de degradação associado ao RE, e o catabolismo lisossômico de glicoconjugados. Esse princípio é a base para o uso potencial de inibidores de glicosidase nas infecções virais,

câncer, distúrbios genéticos e controle do diabetes (ASSANO, 2009; KAWAMORI et al., 2009; NEYE, 2002). Em especial, a utilização de inibidores de α -glicosidase tem sido um dos tratamentos para o controle do nível glicêmico, uma vez que essa enzima, localizada nas vilosidades dos enterócitos desempenha um papel importante, na etapa final da digestão de carboidratos (KAWAMORI et al., 2009; NEYE, 2002; PAPPACHAN; FERNANDEZ; CHACKO, 2019; ROSS; GULVE; WANG, 2004).

Estudos têm demonstrado o potencial antidiabético de plantas medicinais por mecanismos de inibição de α -glicosidase: *Aloysia gratissima*, *Verbena carolina*, *Bouchea prismatica*, *Verbena menthiflora*, *Priva mexicana* foram capazes de inibir a α -glicosidase (ÁVILA-REYES, 2019). A crescente busca por compostos naturais com atividade antidiabética se deve ao fato de terem apresentado menos efeitos colaterais quando comparados aos medicamentos sintéticos (BOUKHRIS et al., 2012).

No entanto, é possível que nem todos os componentes dos extratos vegetais tenham efeitos mensuráveis, em razão da presença de componentes interferentes (THOMFORD et al., 2018) ou mesmo, em decorrência das baixas concentrações. Para não incorrer a erros e descredenciar o valor terapêutico de uma planta medicinal, várias estratégias inovadoras podem ser usadas para a prospecção e/ou validação clínica de uma planta medicinal (CHE; ZANG, 2019; GUNJAN et al., 2015; THOMFORD et al., 2018). Dentre as várias estratégias para a seleção de candidatos a medicamentos, incluem-se métodos de fracionamento de extratos e métodos computacionais que, combinados com testes biológicos *in vitro* e *in vivo* podem diminuir, drasticamente, o tempo e o custo da descoberta e apontar com maior segurança os resultados obtidos (CHE; ZANG, 2019; THOMFORD et al., 2018).

Como exposto acima, uma vez que *Lippia dulcis* é usada, popularmente, na Amazônia brasileira para o controle do diabetes, a planta pode conter verbascosídeo e, essa substância pode ser apontada como um inibidor de α -glicosidase, no presente estudo, objetivou-se avaliar o potencial de preparações de *L. dulcis* em inibir a enzima α -glicosidase, como uma perspectiva da espécie poder futuramente ser explorada sobre esse ponto de vista.

2 OBJETIVO

Avaliar a inibição da enzima α -glicosidase de *Bacillus stearothermophilus*, por extrato bruto etanólico e frações de *L. dulcis*.

2.1 Objetivo específico

- a) Adaptar a metodologia de avaliação da inibição *in vitro* da enzima α -glicosidase descrita por Kwon, Vattem e Shetty (2006) e Pereira et al. (2012), a partir de ensaios de testes de solubilidade e estudos de cinética com diferentes concentrações da enzima e do substrato;
- b) Avaliar o extrato bruto e frações de *L. dulcis* sobre a atividade inibitória *in vitro* da α -glicosidase, na presença e na ausência de fluido gástrico simulado;
- c) Registrar os perfis cromatográficos por CLAE-FR do extrato bruto e frações, co-injeções com padrão autêntico de verbascosídeo e verbascosídeo de referência, a fim de caracterizar o pico do verbascosídeo e avaliar sua condição de separação com possíveis picos vizinhos;
- d) Quantificar o verbascosídeo no extrato e frações de *L. dulcis*;
- e) Realizar um estudo de ancoramento molecular entre verbascosídeo e a enzima α -glicosidase de *Bacillus stearothermophilus*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 *Lippia dulcis* caracterização botânica, ocorrência, usos populares e atividades biológicas

O gênero *Lippia* L., pertencente à família Verbenaceae, possui, aproximadamente, 200 espécies de ervas, arbustos e pequenas árvores, cujos maiores centros de dispersão se encontram em países das Américas do Sul e Central, como também em territórios da África tropical (GOMES; NOGUEIRA; MORAES, 2011).

Ao longo dos anos, algumas espécies de *Lippia* têm apresentado problemas de nomenclatura botânica, em decorrência da dificuldade em torno da correta identificação de certas espécies, ocasionando a utilização de diversas sinonímias para uma mesma espécie (PASCUAL et al., 2001). *L. dulcis*, também conhecida como *Phyla scaberrima* (Juss. ex Pers.) Moldenke e *Phyla dulcis* (Trevir.) Moldenke, é uma erva perene nativa da América tropical, incluindo México, Costa Rica, Porto Rico e Venezuela (ATTIA et al., 2012; IANNICELLI et al., 2018). De acordo com List (2019) a espécie é classificada no gênero *Phyla* e nomeada como *Phyla scaberrima*, mas segundo O’Leary e Múlgura (2012) essa espécie é classificada como *Lippia dulcis*, pois não apresenta tricomas malpighiáceos, que são característicos do gênero *Phyla*.

Lippia dulcis é uma espécie originária da América Central, extremamente aromática, com folhas e flores de sabor adocicado. É uma planta herbácea, perene, ereta ou prostrada, com cerca de 20 cm de altura, mas podendo chegar a 60 cm (FIGURA 1). As folhas têm caules de 0,5 a 1,5 cm de comprimento, a lâmina da folha é rômbrica a oval e de 1 a 6 cm de comprimento, com uma margem dentada serrilhada. A parte superior da folha é áspera e a parte inferior indistintamente glandular. As inflorescências de 1 a 5 cm de comprimento ficam individualmente nas axilas das folhas, com pequenas brácteas alongadas. O cálice é minúsculo, desgrenhado; a coroa branca, 1 a 1,5 mm de comprimento. A inflorescência é disposta em um cone central (NAYAL; MELZIG, 2005).

Essa espécie ocorre, espontaneamente, em climas quentes e semiquentes, à nível do mar até 1.800m em orla de matas e ao longo de rios, nas regiões de origem (SOUTO-BACHILLER et al., 1997). Tradicionalmente, essa espécie é utilizada para tratar condições inflamatórias, tosse, diarreia, bronquite, infecção urinária dor de estômago (PEREZ et al., 2005).

Figura 1 - Exemplar de espécie do gênero *Lippia dulcis* Trevir.



Fonte: Da autora (2019).

Na Amazônia brasileira, é conhecida como capim-doce e consumida na forma de chá, preparado a partir das folhas, e utilizada no controle do diabetes e como calmante. Essa planta possui sabor doce, em razão da presença de hernandulcina, o primeiro sesquiterpenoide intensamente doce conhecido, um composto que é um constituinte volátil do óleo (COMPADRE; ROBBINS; KINGHORN, 1986; KANEDA et al., 1992).

Alguns estudos para avaliar as atividades farmacológicas de *Lippia dulcis* já são descritos na literatura. Cáceres et al. (1993) realizaram um levantamento bibliográfico de plantas utilizadas na Guatemala, para o tratamento de distúrbios gastrointestinais e selecionaram 84 espécies para triagem *in vitro* da atividade contra cinco enterobactérias que produzem diarreia em humanos. Um total de 34 espécies vegetais inibiu o crescimento *in vitro* de pelo menos uma das enterobactérias estudadas. Das plantas com atividade antibacteriana 16 foram selecionados para confirmação, dentre elas a *Lippia dulcis*. Foram utilizados três tipos de solventes para o preparo dos extratos (*n*-hexano, acetona e álcool), sendo para espécie *L. dulcis* o extrato de acetona o que apresentou zonas de inibição ligeiramente maiores. *L. dulcis* apresentou atividade frente às bactérias *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* e *Shigella flexneri*.

Em estudo realizado com extrato metanólico das partes aéreas de *Lippia dulcis* avaliou a atividade antiproliferativa dos compostos isolados contra células de melanoma murino (B16F10), adenocarcinoma gástrico humano (MK-1) e carcinoma uterino humano (HeLa), sendo o verbascosídeo responsável pela atividade (ABE et al., 2002).

A atividade antiinflamatória *in vivo* de extratos hexânicos e etanólicos de *Lippia dulcis* foi demonstrada em modelo de edema de pata de ratos induzido pela carragenina. O extrato hexânico mostrou-se inativo, mas o extrato etanólico em doses de 400 mg/kg produziu

inibição significativa do edema da pata e reduziu o peso do granuloma induzido por pellets de algodão, além disso, a aplicação tópica de 0,5 mg/orelha, desse extrato, inibiu o edema induzido com acetato de tetradecanoilforbol (TPA) em 49,13%, um efeito de menor intensidade do que o produzido pela indometacina na mesma dose (PEREZ et al., 2005).

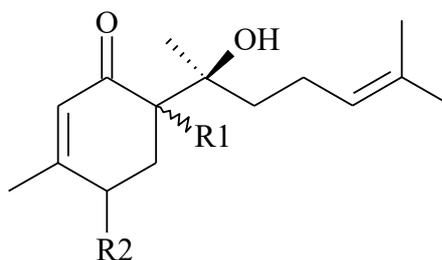
Görnemann et al. (2008) avaliaram a atividade antiespasmódica o óleo essencial de *Lippia dulcis*. Foi realizado um bioensaio brônquico, em suíno, para estudar as respostas contráteis ao carbacol e histamina na ausência ou na presença do óleo essencial. O óleo essencial apresentou atividades anti-histaminérgicas e anticolinérgicas a 100 µg/ml, corroborando o uso da planta para tratar broncoespamos.

3.2 A química da espécie

Lippia dulcis já foi objeto de alguns estudos fitoquímicos. Compadre, Robbins e Kinghorn (1986) buscaram, na literatura etnobotânica mexicana, registros de plantas com sabor doce e intenso. Enquanto examinavam uma monografia envolvida em História Natural da Nova Espanha, escrita entre 1570 e 1576, pelo médico Spanis Francisco Hernandez, encontraram uma planta, notavelmente doce, conhecida pelo povo asteca pelo nome Tzonpelic xihuil. A tradução literal dessa palavra é erva doce. A descrição precisa e a ilustração da planta fornecida por Hernandez permitiram a atribuição de Tzonpelic xihuil como *Lippia dulcis* Trev. O principal componente doce de *L. dulcis*, presente, principalmente, nas folhas e flores, foi isolado em forma pura após partição de solvente e fracionamento cromatográfico. Esse composto, chamado hernandulcina, em homenagem a Francisco Hernandez, foi obtido como um óleo incolor.

O fracionamento cromatográfico do extrato de éter de petróleo de folhas e flores secas de *Lippia dulcis* coletadas, no Panamá, resultou no isolamento (+)-hernandulcina, 6-metil-5-hepten-2-ona, (+)-4β-hidroxihernandulcina, (-)-*epi*-hernandulcina. O acteosídeo (verbascosídeo), um glicósídeo feniletanóide, foi isolado das flores de *L. dulcis* (KANEDA et al., 1992). Estruturas químicas de sesquiterpenos bisabolânicos isolados de *Lippia dulcis* estão representadas na Figura 2.

Figura 2 - Estruturas químicas representativas de sesquiterpenos do tipo bisabolano isolados de *Lippia dulcis*.



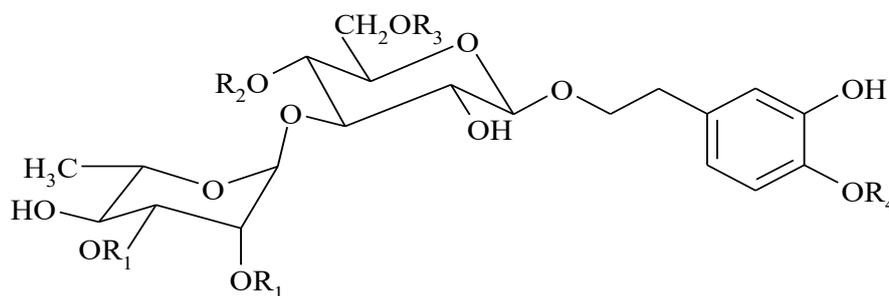
Constituinte químico	R1	R2
(+)-hernandulcina	b-H	H
(-)-epihernandulcina	a-H	H
(+)-4b-hidroxihernandulcina	b-H	OH

Fonte: Kaneda et al. (1992).

Este e outros compostos também foram encontrados por Souto-Bachiller et al. (1997). O óleo essencial de *Lippia dulcis* coletada em Porto Rico foi analisado por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM), possibilitando a identificação de sesquiterpenoides (79%), sendo os principais (+)-hernandulcina (36%) e seu epímero (-)-epihernandulcina (22%). Já, a planta coletada no México é constituída, principalmente, de monoterpenóides (86%), sendo a cânfora o principal (53%).

O fracionamento cromatográfico do extrato metanólico de partes aéreas de *Lippia dulcis* resultou no isolamento dos três sesquiterpenos do tipo bisabolano [(+)-hernandulcina, (-)-epihernandulcina, (+)-animol] e quatro glicosídeos feniletanóides [acteosídeo, isoacteosídeo, martinósídeo e um novo composto, diacetilmartinósídeo] (ABE et al., 2002). Estruturas químicas de glicosídeos feniletanóides isolados de *Lippia dulcis* estão representadas na Figura 3.

Figura 3 - Estruturas químicas representativas de glicosídeos feniletanóides isolados de *Lippia dulcis*.

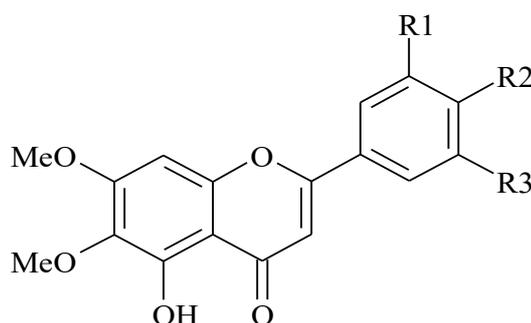


Constituinte químico	R1	R2	R3	R4
verbascosídeo	H	cafeoil	H	H
isoverbascosídeo	H	H	cafeoil	H
martinosídeo	H	feruloil	H	CH ₃
diacetilmartinosídeo	COCH ₃	feruloil	H	CH ₃
decafeoilverbascosídeo	H	H	H	H

Fonte: Abe et al. (2002) e Ono et al. (2005).

Do extrato metanólico das partes aéreas de *L. dulcis* foram isolados 10 compostos: cinco flavonoides (a cirsimaritina, salvigenina, eupatorina, 5-hidroxi-6,7,3',4'-tetrametoxiflavona e 5,3'-dihidroxi-6,7,4',5'-tetrametoxiflavona); três glicosídeos feniletanóides (o decafeoilverbascosídeo, verbascosídeo e isoverbascosídeo) e dois glicosídeos iridóides (o 8-epiloganina e lamiida) (ONO et al., 2005). Estruturas químicas de flavonoides isolados de *Lippia dulcis* estão representadas na Figura 4.

Figura 4 - Estruturas químicas representativas de flavonoides isolados de *Lippia dulcis*.



Constituinte químico	R1	R2	R3
cirsimaritina	H	OH	H
salvigenina	H	OMe	H
eupatorina	OH	OMe	H
5-hidroxi-6,7,3',4'-tetrametoxiflavona	OMe	OMe	H
5,3'-dihidroxi-6,7,4',5'-tetrametoxiflavona	OMe	OMe	OH

Fonte: Ono et al. (2005).

Em outro estudo realizado por Ono et al. (2006), o fracionamento cromatográfico do extrato metanólico de partes aéreas de *Lippia dulcis* resultou na obtenção de 8 sesquiterpenos [peroxilipidulcina A, peroxilipidulcina B, peroxilipidulcina C, peroxiepilipidulcina B, epilipidulcina B e epilipidulcina C, lipidulcina A e epilipidulcina A], sete flavonoides [sakuranetina, cirsimaritina, pectolinarigenina, salvigenina, eupatorina, eupatilina, 5,3'-dihidroxi-6,7,4', 5' -tetrametoxiflavona] e um triterpenóide [ácido betunílico]

Partes aéreas secas de *Lippia dulcis* foram utilizadas para a extração de óleo essencial, pelo método de arraste a vapor. Os constituintes voláteis majoritários hernandulcina e cânfora foram quantificados por cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (CG-DIC) (GÖRNEMANN et al., 2008).

A composição química do óleo essencial das folhas de *Lippia dulcis* da Colômbia obtido por hidrodestilação foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM) e cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (CG-DIC), identificando 40 compostos, dos quais os principais foram α -copaeno (18,0%), β -cariofileno (17,8%) e δ -cadineno (14,7%) (MORENO-MURILLO et al., 2010).

No trabalho de Escobar et al. (2010), os constituintes voláteis foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM), possibilitando a identificação de alguns compostos como o *trans*- β -carofileno, δ -cadineno, α -bisabolol, α -copaeno e biciclogermacreno.

3.3 Glicosidases

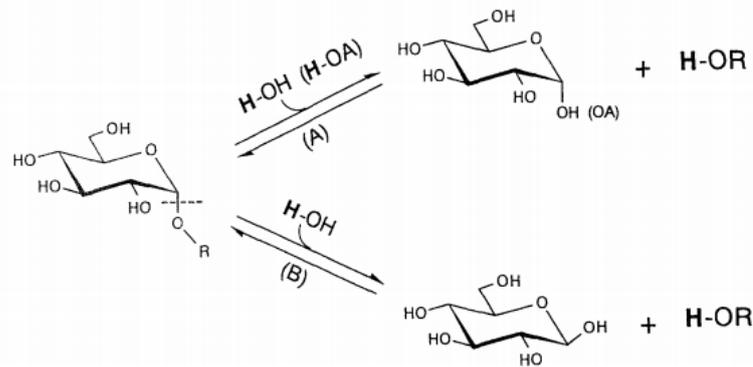
As enzimas são moléculas proteicas que atuam como catalisadores biológicos capazes de diminuir a energia de ativação necessária para formar um complexo de transição ativado que dará origem a um produto (REX, 1969). Elas atuam em quase todas as reações do metabolismo celular, no processo de digestão, por exemplo, as enzimas digestivas são responsáveis pela redução das moléculas alimentares em estruturas mais simples, facilitando a sua absorção pelo organismo (PEREIRA et al., 2011).

As glicosidases ou glicosídeo hidrolases são um grupo diverso de enzimas que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas. Estas desempenham um papel central em vários processos biológicos de interesse significativo para bioquímica, medicina e biotecnologia (WITHERS; AEBERSOLD, 1995).

As enzimas glicosidases têm dois mecanismos de ação catalítica, podendo ser também classificadas em duas categorias principais. Aquelas que hidrolisam a ligação glicosídica com

inversão da configuração anomérica, denominadas enzimas inversoras e aquelas que agem sem modificar esta configuração são denominadas enzimas retentoras (FIGURA 5) (WITHERS; AEBERSOLD, 1995).

Figura 5 - Esquemas de reação hidrolítica e de transferência de: α -glicosidase (A) e glicocamilase (B).



Fonte: Chiba (1997).

A classificação pela União Internacional de Número da Comissão de Enzima Bioquímica e Biologia Molecular (EC) provou ser insatisfatória para classificar e prever relações estrutura / função da glicosidase, isso ocorre, principalmente, porque o sistema depende de especificidades do substrato. Na década de 90, Henrissat iniciou uma classificação baseada em sequência de enzimas ativas de carboidratos e, posteriormente, estabeleceu o banco de dados de classificação CAZy (<http://www.cazy.org>). Atualmente, o CAZy abrange mais de 130 famílias de glicosidase e sustenta toda consideração funcional, estrutural e mecanicista dessas proteínas (CARBOHYDRATE ACTIVE ENZYMES - CAZY, 2019; KÖTZLER; HANCOCK; WITHERS, 2014).

Os resíduos do sítio ativo que definem um determinado mecanismo catalítico são essencialmente conservados em uma determinada família glicosídeo hidrolase (GH) e, com poucas exceções, todos os membros da mesma família GH têm o mesmo resultado estereoquímico da reação. A semelhança de sequência é refletida na conservação estrutural e, portanto, membros de uma determinada família GH compartilham a mesma dobra. Além disso, muitas famílias com sequências diversas compartilham a mesma dobra 3D, apesar de atuarem em diferentes substratos (KÖTZLER; HANCOCK; WITHERS, 2014).

As glicosidases são classificadas, principalmente, em dois grupos, família GH 13 e 31, com base na homologia da sequência (ANDRADE; VALENTÃO; PEREIRA, 2017). As

famílias GH exibem, essencialmente, a mesma topologia tridimensional global e com conservação da química do sítio ativo foram, portanto, mais agrupadas em 'clãs' (TABELA 1).

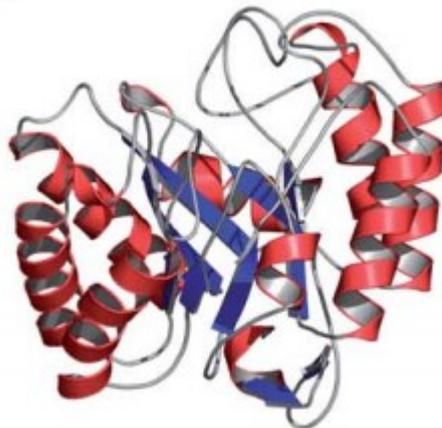
Tabela 1 - Clãs de glicosidase.

Clan	Fold	Function	Families
GH-A	$(\beta/\alpha)_8$	β -Retaining	1 2 5 10 17 26 30 35 39 42 50 51 53 59 72 79 86 113 128
GH-B	β -Jelly roll	β -Retaining	7 16
GH-C	β -Jelly roll	β -Retaining	11 12
GH-D	$(\beta/\alpha)_8$	α -Retaining	27 31 36
GH-E	Six fold β -propeller	α -Retaining	33 34 83 93
GH-F	Five fold β -propeller	Inverting	43 62
GH-G	$(\alpha/\alpha)_6$	α -Inverting	37 63
GH-H	$(\beta/\alpha)_8$	α -Retaining	13 70 77
GH-I	$\alpha + \beta$	β -Inverting	24 46 80
GH-J	Five fold β -propeller	α -Retaining	32 68
GH-K	$(\beta/\alpha)_8$	β -Retaining	18 20 85
GH-L	$(\alpha/\alpha)_6$	α -Inverting	15 65 125
GH-M	$(\alpha/\alpha)_6$	β -Inverting	8 48
GH-N	β -Helix	α -Inverting	28 49

Fonte: Kötztler, Hancock e Withers (2014).

O clã GH-A, por exemplo, inclui uma grande variedade de famílias de retenção de GH ativas em uma variedade de glicosídeos β -D nos quais os principais resíduos catalíticos estão localizados nos mesmos fios de uma estrutura de 8 barris $(\alpha/\beta)_8$. O barril $(\alpha/\beta)_8$ consiste em oito fios β paralelos e oito α hélices que se alternam, ao longo da sequência de proteínas, com os cordões β formando o cano interno e as α hélices flanqueando o exterior (FIGURA 6) (KÖTZLER; HANCOCK; WITHERS, 2014).

Figura 6 - Dobras de glicosidase: barril $(\alpha/\beta)_8$



Fonte: Kötztler, Hancock e Withers (2014).

A utilização de inibidores da α -glicosidase tem sido um dos tratamentos base para o controle do nível glicêmico, uma vez que essa enzima, localizada nas vilosidades dos enterócitos, desempenha um papel importante na etapa final da digestão de carboidratos (PAPPACHAN; FERNANDEZ; CHACKO, 2019; ROSS; GULVE; WANG, 2004). Nos seres humanos, duas glicosidases da família GH31 são conhecidas para atuar na etapa final da digestão do amido: maltase-glicoamilase e sacarase-isomaltase (KÖTZLER; HANCOCK; WITHERS, 2014).

Um dos métodos utilizados para avaliar a atividade α -glicosidase é baseada na determinação espectrofotométrica do *p*-nitrofenol (pNP) liberado do substrato de *p*-nitrofenil - α - D- glicopiranosídeo (*p*-NPG), pela ação da enzima (KÖTZLER; HANCOCK; WITHERS, 2014).

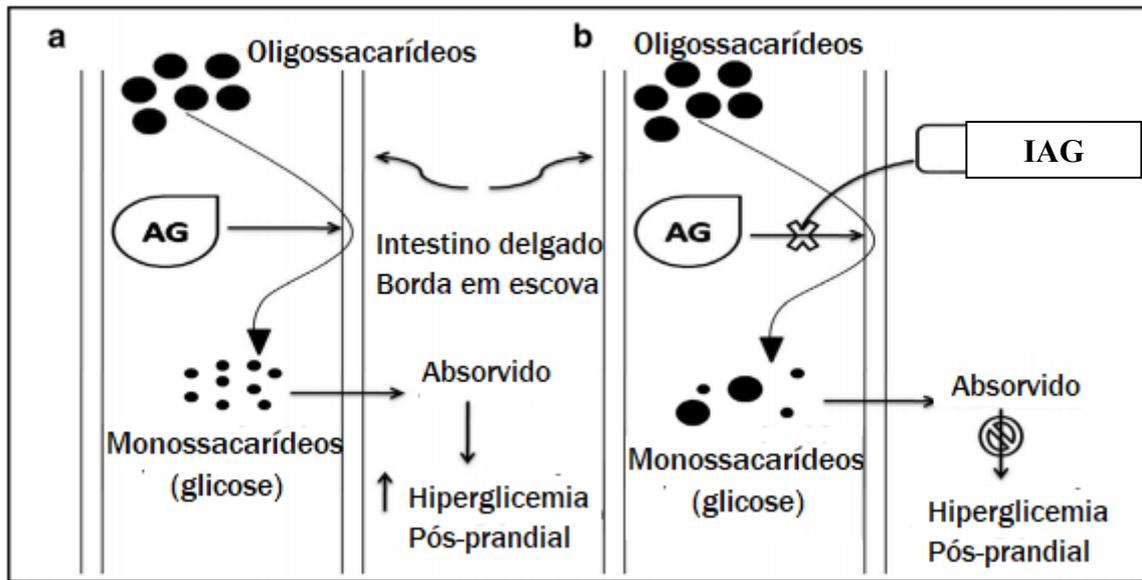
O uso de plantas medicinais tem capacidade de inibir as principais enzimas digestivas de carboidratos (amilase e glicosidase), regulando, assim, os níveis de glicose no sangue e os picos pós-prandiais em diabéticos (SEETALOO et al., 2019).

3.4 Inibição de enzimas digestivas: α -Glicosidase

Nos seres humanos, quatro enzimas diferentes mediam a digestão dos carboidratos ingeridos. As primeiras α -amilases salivares e pancreáticas são duas glicosidases retentoras de ação direta, que decompõem as complexas moléculas de amido em pequenos oligômeros lineares de maltose (LM) e dextrinas α -limite ramificadas (α LDx). Em seguida, duas exoglicosidases de retenção, maltase-glicoamilase (MGAM) e sacarase-isomaltase (SI), convertem essas moléculas em glicose no intestino delgado (MOHAN; ESKANDARI; PINTO, 2014).

Assim, as enzimas amilase e glicosidase são responsáveis pelo processamento de carboidratos provenientes da dieta, atuando na quebra do amido e na absorção de monossacarídeos pelos enterócitos (PEREIRA et al., 2011). Inibidores dessas enzimas podem atuar de forma estratégica no controle da glicemia, pois eles reduzem os níveis séricos de glicose pós-prandial, retardando sua captação, por meio da quebra do amido e absorção da glicose no intestino (FIGURA 7) (GOMES; LERARIO, 2009; KIM et al., 2005).

Figura 7 - Mecanismo de ação dos inibidores da α -glicosidase.



a. Ação da α -glicosidase no carboidrato na ausência de inibidor da α -glicosidase. **b.** Ação da α -glicosidase no carboidrato na presença de inibidor da α -glicosidase. AG. α -glicosidase. IAG Inibidor da α -glicosidase.

Fonte: Patil et al. (2015).

A ação da α -amilase provoca a hidrólise do amido em unidades menores de oligossacarídeos que são clivadas pela ação da α -glicosidase, liberando unidades de glicose que serão absorvidas pelo organismo (SHINDE et al., 2008). Essa degradação provoca a hiperglicemia pós-prandial (FUJISAWA et al., 2005), um fator importante envolvido no desenvolvimento do DM2 e de complicações associadas, como alterações micro e macrovascular (KIM et al., 2008).

Alguns fármacos antidiabéticos disponíveis, como a acarbose, miglitol e voglibose, atuam inibindo a atividade da α -glicosidase (TAN et al., 2018). Atualmente, existem poucas opções disponíveis, comercialmente, de fármacos com ação inibidora das glicosidases e estes apresentam em sua estrutura derivados de açúcar, são quimicamente difíceis de sintetizar e clinicamente são associados com sérios efeitos colaterais gastrointestinais, como diarreias, flatulências e cólica abdominal (YIN et al., 2014).

De acordo com Figueiredo-Gonzalez et al. (2016) pesquisas têm sido direcionadas para a descoberta de produtos naturais que possuem substâncias capazes de inibir essas enzimas digestivas, em decorrência de seu baixo custo, segurança e baixa incidência de efeitos colaterais indesejáveis. Nesse contexto, um estudo de revisão sistêmica identificou noventa e quatro plantas de diferentes famílias botânicas com propriedades inibidoras de enzimas digestivas, sendo 17 delas inibidoras da α -glicosidase (SEETALOO et al., 2019).

A respeito da família Verbenaceae há poucos estudos sobre a inibição da α -glicosidase para o controle de DM2, um dos mais relevantes foi o estudo de Ávila-Reyes (2019), os quais confirmaram o alto potencial inibitório de 10 espécies de Verbenaceae sobre a α -glicosidase.

As α -glicosidases (α -D-glicosídeo glicohidrolase EC 3.2.1.20) são enzimas exoamilases, presentes no intestino delgado, que catalisam, preferencialmente, a hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 de dissacarídeos e liberam unidades de α -D-glicose (GIANNESI et al., 2006; OKUYAMA et al., 2005). Além de estarem presentes nos mamíferos, essas enzimas também podem ser encontradas em vegetais e microrganismos como na bactéria *Bacillus stearothermophilus* (CHEN et al., 2019).

Alguns estudos como o de Nakkharat e Haltrich (2006), relatam que as enzimas glicosidases possuem especificidade por substratos, esses autores, por exemplo, estudando a β -galactosidase, verificaram que a eficiência catalítica da enzima era desenvolvida com determinados glicosídeos como substratos. Já, a α -glicosidase pelo método *in vitro* em extrato etanólico, possui maior afinidade pelo p-Nitrofenil- α -D-Glucopiranosídeo (PNPG), hidrolisando-o em glicose (SULISTIYANI; SAFITHRI; SARI, 2016).

As α -glicosidases pertencem às famílias 13 e 31 do glicosídeo hidrolase, e mostram diversas funções na hidrólise de substratos, possuindo especificidades de ligação e preferências de tamanho, bem como na transglicosilação, formando ligações α -glicosídicas específicas, as quais catalisam a degradação das ligações α -glicosídicas nas extremidades não redutoras de substratos para liberar glicose (OKUYAMA et al., 2016).

Dessas famílias, a denominada de “13” são constituídas por bactérias capazes de codificar proteínas do tipo α -glicosidases presentes, principalmente, no trato gastrointestinal humano, como no estudo de Kelly et al. (2016), onde a bactéria *Bifidobacterium breve* foi capaz de hidrolisar todas as ligações α -glicosídicas presentes no intestino. Ainda nesse estudo os autores observaram que as enzimas glicolíticas apresentaram especificidade hidrolítica em relação a algumas ligações.

À alta sequência e semelhança estrutural dos locais ativos das α -glicosidases humanas (maltase-glicoamilase e sucrase-isomaltase) e das α -glicosidases bacterianas do intestino, como as de *Ro- α G1 (Obeum)*, podem processar carboidratos da dieta (por exemplo, maltose e isomaltose), bem como ser, efetivamente, inibidos por inibidores de α -glicosidase com forças comparáveis, dessa maneira os inibidores dos locais ativos de enzimas digestivas da α -glicosidases poderão retardar a absorção de glicose na corrente sanguínea e reduzem a hiperglicemia pós-prandial (TAN et al., 2018).

3.5 Diabetes *mellitus*

O diabetes *mellitus* (DM) é uma doença crônica caracterizada pela elevação da glicose no sangue (hiperglicemia), resultante de defeitos na secreção e/ou na ação do hormônio insulina, que é produzido no pâncreas pelas células β , denominadas também de Ilhotas de Langerhans (SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA - SBEM, 2007). Quando não controlada, a hiperglicemia pode causar danos em longo prazo, disfunção e insuficiência de diferentes órgãos, especialmente dos olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES - SBD, 2017).

Atualmente, a classificação do diabetes proposta pela OMS e pela Associação Americana de Diabetes (ADA), baseia-se na etiologia e não mais no tipo de tratamento. Essa classificação inclui quatro classes clínicas: diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1), diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), outros tipos específicos de diabetes *mellitus* e diabetes gestacional (SBD, 2017).

O DM2 é caracterizado pela secreção inapropriada de insulina ou pela resistência à ação desse hormônio. A resistência à insulina é uma disfunção metabólica com alterações intracelulares que resulta em prejuízos na translocação de vesículas, que contém GLUT4, para a membrana, diminuindo a capacidade do músculo esquelético e outros tecidos de captar glicose para as células, levando a um estado hiperglicêmico (CASTRO et al., 2013). Os mecanismos para o desenvolvimento da resistência à insulina são caracterizados por alterações, em certas etapas, na sinalização da insulina, apresentando redução na concentração e atividade quinase do receptor específico de membrana (IR), da fosforilação de tirosina em substratos denominados IRS-1 e IRS-2 e redução da atividade da proteína fosfatidilinositol 3-quinase (PI3q) e assim comprometer a translocação do GLUT-4 para a membrana plasmática (UENO et al., 2005).

O DM2 possui etiologia complexa e multifatorial, envolvendo componentes genéticos e ambientais (SBD, 2017). Hábitos alimentares inadequados e sedentarismo, que contribuem para a obesidade, destacam-se como os principais fatores de risco. O DM2 acomete cerca de 90 a 95% das pessoas diagnosticadas com DM, ocorrendo com maior frequência em adultos, indivíduos hipertensos ou com dislipidemia (SBD, 2019).

O diagnóstico do diabetes é realizado a partir da determinação da glicemia e/ou hemoglobina glicada (HbA1c) no paciente. O indivíduo é considerado diabético caso apresente um valor de glicemia em jejum (nenhuma ingestão calórica por, no mínimo, 8 h) maior ou igual a 126 mg/dl em duas dosagens; valor de glicemia determinado pelo teste de

tolerância à glicose maior ou igual a 200 mg/dl (2h após sobrecarga com 75 g de dextrosol); valor de glicemia ao acaso maior ou igual a 200 mg/dl associado a sintomas clássicos de hiperglicemia ou ainda pela determinação de HbA1c em duas amostras, sendo considerado diabético valores de HbA1C maiores ou iguais a 6,5% (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION - ADA, 2013).

O diagnóstico, por meio da HbA1c, oferece vantagens ao refletir níveis glicêmicos dos últimos três a quatro meses e ao sofrer menor variabilidade no dia a dia e independe do estado de jejum, sendo utilizado no diagnóstico do diabetes e no monitoramento do controle metabólico do paciente em tratamento (ADA, 2013; SÁ; ALVES, NAVAS, 2014).

O cuidado nutricional no tratamento do DM associado a mudanças no estilo de vida, incluindo atividades físicas, são considerados terapia de primeira escolha. O tratamento de DM1 é realizado empregando-se insulino-terapia individualizada para cada paciente. Já, para o DM2, o tratamento é realizado utilizando-se diversos agentes antidiabéticos orais, indicados quando o paciente não responde, adequadamente, às terapias de primeira escolha (ADA, 2013).

Os fármacos utilizados no tratamento do DM podem ser subdivididos em classes, de acordo com seus mecanismos de ação: os hipoglicemiantes ou secretagogos de insulina (sulfonilureias e glinidina); os anti-hiperglicemiantes (inibidores da α -glicosidade, biguanidas e glitazonas); e os que aumentam a secreção de insulina de forma glicose-dependente, além de promover a supressão do glucagon (gliptinas) (CONCEIÇÃO; SILVA; BARBOSA, 2017). Esses fármacos podem ser utilizados como monoterapia ou como terapia combinada e, em alguns casos, faz-se necessário instituir uma combinação de insulino-terapia, em razão do declínio progressivo da função das células β -pancreáticas (ADA, 2013).

Fármacos como acarbose, miglitol e voglibose, usados em pessoas com diabetes tipo 2, apresentam efeitos colaterais como inchaço, flatulência e diarreia, limitando seu uso por grande parte da população. Portanto, a obtenção de drogas naturais alternativas às sintéticas já existentes para o controle glicêmico tem se tornado significativa (ALI; HOUGHTON; SOUMYANATH, 2006).

REFERÊNCIAS

- ABE, F. et al. Antiproliferative constituents in plants 9. Aerial Parts of *Lippia dulcis* and *Lippia canescens*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 25, p. 920-922, 2002.
- AHMAD, I.; KHAN, M. S. A. Herbal medicine: current trends and future prospects. In: KHAN, M. S. A.; AHMAD, I.; CHATTOPADHYAY, D. (Ed.). **New look to phytomedicine: advancements in herbal products as novel drug leads**. New York: Elsevier, 2019. p. 3-13.
- ALI, H.; HOUGHTON, P.; SOUMYANATH, A. α -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes: with particular reference to *Phyllanthus amarus*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 107, n. 3, p. 449-455, 2006.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of Diabetes mellitus. **Diabetes Care**, Alexandria, v. 36, p. S81-S90, 2013.
- ANDRADE, P. B.; VALENTÃO, P.; PEREIRA, D. M. **Natural products targeting clinically relevant enzymes**. Berlin: Wiley - VCH, 2017.
- ASSANO, N. Sugar-mimicking glycosidase inhibitors: bioactivity and application. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 66, p. 1479-1492, 2009.
- ATTIA, M. et al. Molecular cloning and characterization of (+)-epi-a-bisabolol synthase, catalyzing the first step in the biosynthesis of the natural sweetener, hernandulcin, in *Lippia dulcis*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 527, p. 37-44, 2012.
- ÁVILA-REYES, J. A. α -Glucosidase and α -amylase inhibition potentials of ten wild Mexican species of Verbenaceae. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, Benin, v. 18, p. 31-36, 2019.
- BORZANI, W. et al. **Biotecnologia industrial: fundamentos: volume 1**. São Paulo: E. Blucher, 2001. 254 p.
- BOUDJELAL, A. et al. Compositional analysis and in vivo anti-diabetic activity of wild Algerian *Marrubium vulgare* L. infusion. **Fitoterapia**, Milano, v. 83, p. 286-292, 2012.
- CÁCERES, A. et al. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders: 3., confirmation of activity against enterobacteria of 16 plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 38, p. 31-38, 1993.
- CARBOHYDRATE ACTIVE ENZYMES. **Glycoside Hydrolase family classification**. Disponível em: <<http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>>. Acesso em: 10 mar. 2019.
- CASTRO, G. et al. Diet-induced obesity induces endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in the amygdala of rats. **FEBS Open Bio**, Oxford, v. 11, p. 443-449, 2013.
- CHE, C. T.; ZHANG, H. Plant natural products for human health. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 20, n. 4, p. 830, 2019.

- CHEN, P. et al. Starch biotransformation into isomaltooligosaccharides using thermostable alpha-glucosidase from *Geobacillus stearothermophilus*. **PeerJ**, Corte Madera, v. 6, p. e5086, 2019.
- CHIBA, S. Molecular mechanism in α -Glucosidase and Glucoamylase. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 61, n. 8, p. 1233-1239, 1997.
- COMPADRE, C. M. et al. Hernandulcin: an intensely sweet compound discovered by review of ancient literature. **Science**, New York, v. 227, p. 417-419, 1985.
- COMPADRE, C. M.; ROBBINS, E. F.; KINGHORN, A. D. The intensely sweet herb, *Lippia dulcis* Trev.: historical uses, field inquiries, and constituents. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 15, p. 89-106, 1986.
- CONCEIÇÃO, A. da R.; SILVA, P. N. da; BARBOSA, M. Fármacos para o tratamento do diabetes tipo II: uma vista ao passado e um olhar para o futuro. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 9, n. 2, p. 514-534, 2017.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, Alberta, v. 1830, p. 3670-3695, 2013.
- ESCOBAR, P. et al. Chemical composition and antiprotozoal activities of colombian *Lippia* ssp essential oils and their major components. **Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 2, p. 184-190, mar. 2010.
- FIGUEIREDO-GONZALEZ, M. et al. Alpha-Glucosidase and alpha-amylase inhibitors from *Myrcia* spp.: a stronger alternative to acarbose? **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 118, p. 322-327, 2016.
- FUJISAWA, T. et al. Effect of two alpha-glucosidase inhibitors, voglibose and acarbose, on post prandial hyperglycemia correlates with subjective abdominal symptoms. **Metabolism**, New York, v. 54, n. 3, p. 387-390, 2005.
- GERMANO, C. M. **Phytochemistry and evaluation of the antidiabetic and antioxidant potential of phyla betulifolia (kunth) greene (VERBENACEAE)**. 2019. 94 p. Tese (Doutorado em Plantas Mediciniais, Aromáticas e Condimentares)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2019.
- GIANNESI, G. C. et al. A novel - glucosidase from *Chaetomium thermophilum* var. *coprophilum* that converts maltose into trehalose: purification and partial characterization of the enzyme. **Process Biochemistry**, London, v. 41, p. 1729-1735, 2006.
- GOMES, M. D. B.; LERARIO, A. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2009**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Diabetes, 2009.
- GOMES, S. V. F.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Eclética Química**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 64-77, 2011.

GÖRNEMANN, T. et al. Antispasmodic activity of essential oil from *Lippia dulcis* Trev. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 117, p. 166-169, 2008.

GUNJAN, M. et al. Marketing trends & future prospects of herbal medicine in the treatment of various disease. **World Journal of Pharmaceutical Research**, Houston, v. 4, p. 132-155, 2015.

IANNICELLI, J. et al. Traditional uses, conservation status and biotechnological advances for a group of aromatic/medicinal native plants from America. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, Santiago, v. 17, p. 453-491, 2018.

KANEDA, N. et al. (+)-4P-hydroxyhernandulcina, new sweet sesquiterpene from the leaves and flowers of *Lippia dulcis*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 55, n. 8, p. 1130-1141, 1992.

KAWAMORI, R. et al. Voglibose for prevention of type 2 diabetes mellitus: a randomised, double-blind trial in Japanese individuals with impaired glucose tolerance. **The Lancet**, London, v. 373, n. 9675, p. 1607-1614, 2009.

KELLY, E. D. et al. Glycoside hydrolase family 13 α -glucosidases encoded by *Bifidobacterium breve* UCC2003: a comparative analysis of function, structure and phylogeny. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 224, n. 2, p. 55-65, May 2016.

KIM, K. Y. et al. Potent α -glucosidase inhibitors purified from the red alga *Grateloupia elliptica*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 69, n. 16, p. 2820-2825, 2008.

KIM, Y. M. et al. Inhibitory effect of pine extract on α -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. **Nutrition**, Philadelphia, v. 21, n. 6, p. 756-761, 2005.

KWON, Y. I.; VATTEM, D. A.; SHETTY, K. Evaluation of clonal herbs of Lamiaceae species for management of diabetes and hypertension. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, Victoria, v. 15, p. 107-118, 2006.

KÖTZLER, M. P.; HANCOCK, S. M.; WITHERS, S. G. **Glycosidases: functions, families and folds**. Oxford: Wiley, 2014.

LIST, T. P. *Lippia dulcis* Trevir. 2012. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-113439>>. Acesso em: 6 dez. 2019.

LIU, Q. et al. Diterpenoids and phenylethanoid glycosides from the roots of *Clerodendrum bungei* and their inhibitory effects against angiotensin converting enzyme and α -glucosidase. **Phytochemistry**, Oxford, v. 103, p. 196-202, 2014.

MODOLO, L. V.; FOGGIO, M. A. (Ed.). **Brazilian medicinal plants**. Boca Raton: CRC, 2019. 342 p.

MOHAN, S.; ESKANDARI, R.; PINTO, B. M. Naturally occurring sulfonium-ion glucosidase inhibitors and their derivatives: a promising class of potential antidiabetic agents. **Accounts of Chemical Research**, Washington, v. 47, n. 1, p. 211-225, 2014.

MORENO-MURILLO, B. et al. Essential oil from leaves of *Lippia dulcis* grown in Colombia. **Natural Product Communications**, Westville, v. 5, p. 613-614, 2010.

MORIKAWA, T. et al. Acylated phenylethanoid glycosides, echinacoside and acteoside from *Cistanche tubulosa*, improve glucose tolerance in mice. **Journal of Natural Medicines**, Berlin, v. 68, p. 561-566, 2014.

NAKKHARAT, P.; HALTRICH, D. Purification and characterisation of an intracellular enzyme with β -glucosidase and β -galactosidase activity from the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus* CBS 236.58. **Journal of Biotechnology**, Netherlands, v. 123, n. 3, p. 304-313, 2006.

NAYAL, R.; MELZIG, M. F. *Lippia dulcis* Trevis. **Zeitschrift für Phytotherapie**, Leipzig, v. 26, p. 42-46, 2005.

NEYE, H. Gegen postprandiale Glukosespitzen Glucosidase-hemmstoffe. **Pharmazie**, Münster, n. 3, p. 272-278, 2002.

OKUYAMA, M. et al. α -Glucosidases and α -1,4-glucan lyases: structures, functions, and physiological actions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 73, n. 14, p. 2727-2751, 2016.

OKUYAMA, M. et al. Purification and characterization of the hyper-glycosylated extracellular α -glucosidase from *Schizosaccharomyces pombe*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 37, p. 472-480, 2005.

O'LEARY, N.; MÚLGURA, M. E. A taxonomic revision of the Genus *Phyla* (Verbenaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Saint Louis, v. 98, n. 4, p. 578-596, 2012.

ONO, M. et al. Bisabolane-type Sesquiterpenes from the Aerial parts of *Lippia dulcis*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 69, p. 1417-1429, 2006.

ONO, M. et al. New bisabolane-type sesquiterpenes from the aerial parts of *Lippia dulcis*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 53, p. 1175-1177, 2005.

PAPPACHAN, J. M.; FERNANDEZ, C. J.; CHACKO, E. C. Diabetes and antidiabetic drugs. **Molecular Aspects of Medicine**, Elmsford, v. 66, p. 3-12, 2019.

PASCUAL, M. E. et al. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 76, n. 3, p. 201-214, Aug. 2001.

PATIL, P. et al. Food protein-derived bioactive peptides in management of type 2 diabetes. **European Journal of Nutrition**, Darmstadt, v. 54, n. 6, p. 863-880, Sept. 2015.

PEREIRA, A. C. et al. Inhibition of α -Glucosidase and Hypoglycemic Effect of Stilbenes from the Amazonian Plant *Deguelia rufescens* var. *urucu* (Ducke) A.M.G. Azevedo (Leguminosae). **Planta Medica**, Stuttgart, v. 78, p. 36-38, 2012.

PEREIRA, C. A. et al. Inibição de enzimas digestivas por extratos de pó comercial de *Hoodia gordonii* utilizado no tratamento da obesidade. **Brazilian Journal of Biosciences**, Porto Alegre, v. 9, p. 265-269, 2011.

PEREZ, S. et al. Antiinflammatory activity of *Lippia dulcis*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 102, p. 1-4, 2005.

REX, L. Activation diagrams in enzyme catalysis. **Journal of Theoretical Biology**, London, v. 24, n. 3, p. 247-265, 1969.

ROSS, S. A.; GULVE, E. A.; WANG, M. Chemistry and biochemistry of type 2 diabetes. **Chemical Reviews**, Washington, v. 104, n. 3, p. 1255-1282, 2004.

SÁ, R. S.; ALVES, S. R.; NAVAS, E. A. F. A. Diabetes mellitus: avaliação e controle através da glicemia em jejum e hemoglobina glicada. **Revista UniVap**, São José dos Campos, v. 20, n. 35, p. 15-23, 2014.

SEETALOO, A. D. et al. Potential of traditionally consumed medicinal herbs, spices, and food plants to inhibit key digestive enzymes geared towards diabetes mellitus management: a systematic review. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 120, p. 3-24, Jan. 2019.

SHINDE, J. et al. Alpha-glucosidase inhibitory activity of *Syzygium cumini* (Linn.) Skeels seedkernel invitro and in Goto-Kakizaki (GK) rats. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 343, n. 7, p. 1278-1281, 2008.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018**. São Paulo: Clannad, 2017.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Tipos de diabetes**. Disponível em: <<https://www.diabetes.org.br/publico/diabetes/tipos-de-diabetes>>. Acesso em: 2 dez. 2019.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA. **O que é diabetes?** 2007. Disponível em: <https://www.endocrino.org.br/o-que-e-diabetes/>>. Acesso em: 18 jul. 2018.

SOUTO-BACHILLER et al. Terpenoid composition of *Lippia dulcis*. **Phytochemistry**, Saint Paul, v. 44, p. 1077-1086, 1997.

SULISTİYANI, S.; SAFITHRI, M.; SARI, Y. P. Inhibition of α -glucosidase activity by ethanolic extract of *Melia azedarach* L. leaves. In: IOP CONFERENCE SERIES: EARTH AND ENVIRONMENTAL SCIENCE, 31., 2015, Bogor. **Proceedings...** Bogor: IOP, 2016. Disponível em: <<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/31/1/012025>>. Acesso em: 18 jul. 2018.

TAN, K. et al. Interaction of antidiabetic α -glucosidase inhibitors and gut bacteria α -glucosidase. **Protein Science**, Cold Spring Harbor, v. 27, n. 8, p. 1498-1508, 2018.

THOMFORD, N. E. et al. Natural products for drug discovery in the 21st century: innovations for novel drug discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 19, p. 2-29, 2018.

UENO, M. et al. Regulation of insulin signalling by hyperinsulinaemia: role of IRS-1/2 serine phosphorylation and the mTOR/p70 S6K pathway. **Diabetologia**, New York, v. 48, p. 506-518, 2005.

WITHERS, S. G.; AEBERSOLD, R. Approaches to labeling and identification of active site residues in glycosidases. **Protein Science**, Cold Springer Harbor, v. 4, p. 361-372, 1995.

YIN, Z. et al. α -Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. **Food Science and Human Wellness**, New York, v. 3, n. 3, p. 136-174, 2014.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

ARTIGO 1 - INIBIÇÃO DE α -GLICOSIDASE POR PREPARAÇÕES DE *Lippia dulcis* TREVIR. (VERBENACEAE), QUANTIFICAÇÃO E ESTUDO DE ANCORAMENTO MOLECULAR DE VERBASCOSÍDEO

ARTICLE 1 - α -GLYCOSIDASE INHIBITION BY *Lippia dulcis* TREVIR. (VERBENACEAE) PREPARATIONS, QUANTIFICATION AND VERBASCOSIDE MOLECULAR DOCKING

Artigo redigido conforme a NBR 6022 (ABNT, 2003) e formatado de acordo com o Manual da UFLA de apresentação de teses e dissertações.

RESUMO

Lippia dulcis Trevir. (Verbenaceae) é uma planta medicinal, tradicionalmente, utilizada por comunidades amazônicas para o controle do diabetes e como calmante. Estudos recentes do nosso grupo indicaram o potencial de preparações de *L. dulcis* em inibir a α -glicosidase (GL). Variações nas condições experimentais de ensaios enzimáticos levam a uma grande variabilidade nas respostas de atividade. No presente estudo, objetivou-se confirmar a atividade inibitória da GL de preparações de *L. dulcis*, assim como quantificar o verbascosídeo (VEB) e realizar estudos de ancoragem molecular de VEB com a GL de *Bacillus stearothermophilus*. O mesmo extrato etanólico e frações ensaiadas por Germano (2019) foram reavaliados no presente estudo. No entanto, em distinção ao estudo anterior, o presente ensaio de inibição *in vitro* da enzima GL foi otimizado quanto à concentração do substrato; a presença de GHS; e, um rigoroso controle da temperatura de trabalho. Além disso, os ensaios foram realizados na presença e ausência de um fluido gástrico simulado. As frações FAD2 e FAD3, no ensaio sem fluido gástrico, foram as que mais inibiram a GL. Análises cromatográficas por CLAE-DAD confirmaram a presença predominante de VEB nas amostras. As amostras apresentaram concentrações de VEB entre 49,9 mg/g e 243,5 mg/g. Estudos de ancoramento molecular do VEB foram consistentes com a atividade inibitória dessa enzima. Conclui-se que o EE e as frações de *L. dulcis* apresentam atividade inibidora da enzima α -glicosidase de *Bacillus stearothermophilus*, entretanto, ensaios adicionais são necessários para comprovar sua eficácia.

Palavras-chave: Planta medicinal. Capim doce. Hipoglicemiante. Inibidores de glicosidases. Glicosídeo feniletanóide.

ABSTRACT

Lippia dulcis Trevir. (Verbenaceae) is a medicinal plant, traditionally used by Amazonian communities to control diabetes and as a tranquilizer. Recent studies by our group have indicated the potential of *L. dulcis* preparations to inhibit α -glycosidase (GL). Variations in the experimental conditions of enzymatic tests lead to great variability in activity responses. The present study aimed to confirm the inhibitory activity of GL of *L. dulcis* preparations, as well as to quantify verbascoside (VEB) and to perform studies of molecular docking of VEB with the GL from *Bacillus stearothermophilus*. The ethanolic extract (EE) and the fractions tested by Germano (2019) were reevaluated in the present study. However, in contrast to the previous study, the present *in vitro* inhibition test of the GL enzyme was optimized in terms of the substrate concentration; the presence of GHS; and a strict control of the working temperature. In addition, the tests were performed in the presence and absence of a simulated gastric fluid. The fractions FAD2 and FAD3, in the assay without gastric fluid, were the ones that most inhibited GL. HPLC-DAD analysis confirmed the predominant presence of VEB in the samples. The samples showed VEB concentrations ranging from 49.9 mg g⁻¹ to 243.5 mg g⁻¹. Theoretical studies of molecular docking of VEB with the enzyme GL from *Bacillus stearothermophilus* were consistent with the inhibitory activity of this enzyme performed by experimental tests. Therefore, that the EE and *L. dulcis* fractions present inhibitory activity of GL from *Bacillus stearothermophilus*. More studies are needed focusing on proving their effectiveness.

Keywords: Medicinal plant. Sweet grass. Hypoglycemic. Glycosidase inhibitors. Phenylethanoid glycoside.

1 INTRODUÇÃO

Lippia dulcis Trevir. (Verbenaceae) é uma planta utilizada, há muito tempo, na medicina tradicional mexicana, especialmente, para o tratamento de tosse, resfriado, bronquite, asma, cólica e como emenagogo (COMPADRE; ROBBINS; KINGHORN, 1986). *L. dulcis*, também conhecida como *Phyla scaberrima* (Juss. ex Pers.) Moldenke e *Phyla dulcis* (Trevir.) Moldenke, é uma erva perene nativa da América tropical incluindo México, Costa Rica, Porto Rico e Venezuela. Tradicionalmente, além de seu uso medicinal, é usada como adoçante (ATTIA et al., 2012; IANNICELLI et al., 2018). *Lippia dulcis*, conhecida por capim doce por comunidades amazônicas é utilizada na forma de chá preparado a partir das folhas no controle do diabetes e como calmante. Além do sabor doce, decorrente da presença de (+)-hernandulcina, um sesquiterpeno 1000 vezes mais doce que a sacarose, a planta também contém verbascosídeo, um glicosídeo feniletanóide, que apontou efeitos inibitórios sobre a α -glicosidase (COMPADRE et al., 1985; KANEDA et al., 1992; LIU et al., 2014; MORIKAWA et al., 2014; ONO et al., 2005).

Vários estudos químico-biológicos, a partir de produtos naturais, têm sido conduzidos na busca de inibidores de α -glicosidase, utilizando diferentes métodos *in vitro* de determinação da atividade enzimática, a partir de diferentes fontes da enzima (GERMANO, 2019; KIM; WANG; RHEE, 2004; MOGALE et al., 2011; NGUYEN; WANG, 2017; PEREIRA et al., 2012; SAJID et al., 2020; SPÍNOLA; CASTILHO, 2018; THANAKOSAI; PHUWAPRAISIRISAN, 2013; TUNDIS; LOIZZO; MENICHINI, 2010). Entretanto, as “pequenas modificações” descritas nos métodos de referência levam a uma grande variabilidade nas atividades relatadas e, isso contribui para a dificuldade em comparar resultados (GRANADOS-GUZMÁN et al., 2018). Portanto, a otimização e o estabelecimento das condições ideais para um método de determinação de atividade enzimática corroboram na confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados. As diferenças nas atividades inibitórias também são reflexos da diversidade das fontes comerciais de α -glicosidase. Dentre as α -glicosidasas mais comumente empregadas em ensaios de inibição enzimática estão as da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, da bactéria *Bacillus stearothermophilus*, de arroz tipo 4 e, as de origem mamífera (intestino delgado de suíno ou intestino de rato) (KIM; WANG; RHEE, 2004; NGUYEN; WANG, 2017).

O uso de técnicas computacionais, envolvendo a modelagem molecular por homologia e os diferentes métodos para predição de interações moleculares entre ligante e receptor, tem contribuído para o planejamento e desenvolvimento de inibidores de glicosidase. Os métodos

in silico analisam a interação proteína-inibidor baseados no ligante/inibidor ou na proteína, sendo que o ligante a ser testado é comparado com outros inibidores conhecidos, avaliando a forma do composto e até os possíveis grupos de interação com a proteína buscando aqueles mais semelhantes (HAWKINS; SKILLMAN; NICHOLLS, 2007). Essa abordagem *in silico* é importante para presumir quais metabólitos podem interagir com determinada proteína e como é essa interação (LO PIPARO et al., 2008).

Estudos recentes de nosso grupo apontaram evidências de que preparações de *Lippia dulcis* não só apresentaram atividade inibitória da α -glicosidase, mas também tiveram a capacidade de inibirem a formação dos produtos finais de glicação avançada e apresentaram efeito agudo sobre a glicemia de camundongos (GERMANO, 2019). No presente estudo, empregando uma metodologia otimizada para o ensaio *in vitro* de atividade inibidora da α -glicosidase, buscou-se a confirmação dessa atividade, assim como a quantificação e estudos de ancoramento molecular (*molecular docking*) de verbascosídeo com a α -glicosidase de *Bacillus stearothermophilus*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do extrato bruto etanólico e frações de *L. dulcis*

O extrato bruto etanólico (EE) das folhas secas de *Lippia dulcis* e frações estudadas, no presente estudo, correspondem às mesmas obtidas por Germano (2019). Essas frações representam as seguintes: fração hexânica solúvel em etanol (FHE), fração hexânica solúvel em metanol (FHM), fração antidiabética 2 (FAD2) e fração antidiabética 3 (FAD 3). Em síntese, as frações primárias FHE e FHM são provenientes de fracionamento por partição líquido-líquido a partir do EE e as frações antidiabéticas (FAD) são provenientes de fracionamento em coluna aberta de sílica gel das frações primárias reunidas (FHE + FHM).

No entanto, recentemente, nosso grupo de pesquisa tomou conhecimento de que a espécie estudada por Germano (2019) não se trata de *Phyla betulifolia* (Kunth) Greene, mas de *Lippia dulcis* Trevir. A exsiccata incorporada no Herbário da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), por Germano (2019) está sob o registro PAMG 57807. Material vegetal da mesma matriz vegetal utilizada nos estudos de Germano (2019) foi herborizado e encaminhado para a Dra. Fátima Salimena da Universidade Federal de Juiz de Fora, para fins de reincorporação ao herbário e correção da classificação realizada previamente.

2.2 Reagentes e equipamentos

Enzima α -glicosidase de *Bacillus stearothermophilus* (*Geobacillus stearothermophilus*), Sigma-Aldrich (EC 3.2.1.20; CAS: 9001-42-7; 109 U/mg); *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo (*p*-NPG) $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich (EC:223-189-3; CAS:3767-28-0); glutationa reduzida, Sigma-Aldrich (EC:200-725-4 CAS: 70-18-8); Kolliphor® RH 40, Sigma-Aldrich (CAS: 61788-85-0); 4-Nitrofenol $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich (EC:202-811-7; CAS:100-02-07) ; Tween® 80 solution, Sigma-Aldrich (CAS: 9005-65-6); Verbascosídeo, padrão de referência primário, Sigma-Aldrich (CAS: 61276-17-3). Leitor de microplaca TECAN Infinity® M200 PRO, *software* Icontrol® versão 3.37.

2.3 Atividade inibidora de α -glicosidase

A atividade inibidora da enzima α -glicosidase foi realizada em microplacas de 96 poços na ausência e na presença de fluido gástrico simulado. O ensaio foi determinado pelo método cromogênico, conforme Kwon, Apostolidis e Shetty (2008), Pereira et al. (2010, 2012) com modificações. Os ajustes metodológicos foram realizados de acordo com os procedimentos detalhados abaixo.

2.3.1 Padronização da enzima controle

Seguindo o protocolo de avaliação da inibição da α -glicosidase, realizado por Pereira et al. (2012), a enzima indicou uma absorvância inicial muito baixa ($<0,05$). Assim, a fim de ajustar a concentração ideal da enzima, foram realizados ensaios de padronização de absorvância da quantidade de produto formado. A partir desses estudos, definiu-se a concentração ótima da enzima e o tempo de leitura de 10 min para a realização do ensaio.

2.3.2 Teste de solubilidade

Um teste de solubilidade, empregando diferentes solventes e concentrações, foi realizado, a fim de garantir a solubilidade total das amostras. Para isso, 2,5 mg do EE e das frações foram pesados diretamente para microtubos. Em seguida, foram adicionados 1 mL das soluções tamponadas de Tween 80® nas concentrações de 5mg/mL, 10mg/mL, 50mg/mL e 100 mg/mL e de Kolliphor® nas concentrações de 5mg/mL e 10mg/mL. O tampão empregado foi o fosfato (pH 6,8). As soluções foram submetidas a 10 min de sonicação e, posterior homogeneização em vortex por 1 min. Em seguida, foram observadas a olho nu, sendo àquela que não continha a presença de precipitados visíveis escolhida para os ensaios de inibição da enzima α -glicosidase.

2.3.3 Preparo das amostras

As amostras foram preparadas, pesando-se diretamente em microtubos 2,5 mg das preparações de *Lippia dulcis*. Em seguida, foram adicionados 1 mL de Kolliphor® 1% em tampão fosfato (pH 6,8), procedendo à solubilização em banho de ultrassom, durante 10 min e, posterior homogeneização em vórtex por 1 min.

2.3.4 Preparo do fluido gástrico simulado

Com o intuito de simular a passagem gástrica *in vitro*, foi realizado o ensaio de atividade enzimática na presença do fluido gástrico simulado. O fluido gástrico simulado foi preparado segundo a The United States Pharmacopeia (1995). Para realizar esse ensaio, 5mL das amostras preparadas, conforme descrito no item 4.3.3, foram incubados com 5mL do fluido gástrico simulado, por 60 min em banho-maria a 37°C. Como a amostra foi incubada com o fluido gástrico na proporção 1:1, esta foi preparada com o dobro da concentração desejada, já que o fluido dilui a amostra. Após esse período, foram neutralizados com o sal bicarbonato de sódio até pH 6,9-7,2 e, só então realizados os ensaios de atividade.

2.3.5 Ensaio de inibição da α -glicosidase

Para o EE e frações de *L. dulcis* foram preparadas soluções com concentrações de 0,625 a 2,5 mg/mL. Antes da realização da mistura reacional, todos os reagentes e as amostras foram pré-incubados em banho-maria a 37°C por 15 min. A mistura reacional composta de 20 μ L das amostras (preparadas conforme o item 2.3.4), 20 μ L de enzima (2 U/mL) e 20 μ L de uma solução aquosa de glutathione reduzida (GSH) (0,1 mM) foram pré-incubados, durante 1 min a 37°C. Após a pré-incubação foram adicionados 20 μ L de uma solução aquosa do substrato *p*-nitrofenil- α -Dglicopiranosídeo (4,25 mM). A atividade da α -glicosidase foi determinada, medindo-se a absorbância em espectrofotômetro do produto da catálise da α -glicosidase sobre o substrato *p*-NPG a 405 nm. As leituras foram realizadas em intervalos de um em um minuto, durante 10 min, empregando a programação de ciclo de cinética do *software* I-control®, com programação e monitoramento de temperatura a 37°C. As leituras foram realizadas em triplicata e mensuradas contra um branco-amostra contendo 40 μ L de tampão fosfato (pH 6,8); 20 μ L da amostra (EE ou frações); 20 μ L de GSH; 20 μ L de *p*-NPG.

2.3.6 Determinação da inibição

A inibição da enzima foi determinada a partir das inclinações das retas (absorbância x tempo) do ensaio de atividade da enzima controle (sem amostra) e enzima + inibidor (com amostra). A inclinação da reta é decorrente da velocidade de formação de produto por minuto de reação e a presença do inibidor ocasiona uma diminuição nessa inclinação. A porcentagem

de inibição foi calculada, a partir das inclinações das retas, controle e amostra, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Porcentagem de inibição (\%)} = \left[\frac{A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \right] \times 100$$

Legenda: A_{controle} = coeficiente angular do controle. A_{amostra} = coeficiente angular da amostra.

As Unidades de Inibição da Glicosidase (UIG em $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ amostra) foram calculadas, a partir das inclinações das retas, onde os valores de absorbância foram convertidos em μmol de produto formado, por meio de uma curva padrão de *p*-nitrofenol. Portanto, o valor de uma UIG define a quantidade da enzima que inibe 1 μmol de produto formado por minuto por grama de amostra.

2.4 Perfis cromatográficos por CLAE-DAD

2.4.1 Preparo das amostras

As amostras foram pesadas diretamente em microtubos e solubilizadas em metanol grau CLAE, na concentração de 2,5 mg/mL para as amostras de *Lippia dulcis* e 1mg/mL para a substância de referência (verbascosídeo). As amostras foram solubilizadas em banho de ultrassom, durante 15 min, seguido de centrifugação a 10.000 rpm, por 10 min. Empregaram-se os sobrenadantes para análise por CLAE. Foram injetadas alíquotas de 10 μL dos sobrenadantes, de modo automático, no sistema cromatográfico.

2.4.2 Condições cromatográficas

Os perfis cromatográficos por CLAE-DAD foram realizados em um sistema de cromatografia líquida Agilent 1200 (Agilent Technologies®, Waldbronn, Alemanha) equipado com uma bomba quaternária (G1311A) com sistema desgaseificador (G13222A), amostrador automático ALS (G1322A) e conjunto aquecedor TCC (G1316A). Utilizou-se um detector de ultravioleta de comprimento de onda variável (G1315D), para obter-se cromatogramas a 210 nm e os espectros no UV de 190 a 400 nm também foram registrados on-line. O equipamento foi controlado pelo *software* OpenLAB versão A07.04, build 04.07.28. As separações foram realizadas em uma coluna analítica de fase reversa C18

(Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies®, EUA) com um empacotamento à base de sílica (150 mm × 4,6 mm D.I., 5 µm) e pré-coluna (12,5 mm × 4,6 mm D.I., 5 µm). Um volume de 10 µL das amostras foi injetado na coluna com temperatura mantida a 30°C e uma taxa de fluxo constante de 1,0 mL / min. Utilizou-se água (A) e acetonitrila (B) como eluentes, ambos contendo 0,1% (v/v) de ácido fosfórico. A condição inicial foi de 90% A e 10 % B, seguido de um gradiente linear de 8 min até 70% A e 30% de B; na sequência, um gradiente linear de 2 min de 40% A e 60% de B e mais 2 min de gradiente linear de 10% A e 90% B, mantendo-se condição isocrática, por 3 min para, em seguida, retornar a condição inicial em gradiente linear de 90% A, 10% B, concluindo o tempo de análise em 20 minutos.

2.4.3 Caracterização e quantificação do verbascosídeo

A presença de verbascosídeo, na amostra, foi caracterizada inicialmente pela comparação do tempo de retenção e do espectro no UV do pico majoritário com aquele da amostra autêntica de verbascosídeo. Posteriormente, o registro de perfis cromatográficos por co-injeções possibilitou identificar o verbascosídeo no extrato e nas frações de *Lippia dulcis*.

A seletividade do pico referente ao verbascosídeo foi avaliada pela homogeneidade dos espectros registrados pelo DAD nas regiões ascendente, apical e descendente dos picos. A quantificação do verbascosídeo, nas amostras, baseou-se no método do padrão externo (RIBANI et al., 2004). Para isso, foram preparadas duas réplicas da solução de referência. Pesaram-se, precisamente, cerca de 1 mg de verbascosídeo, em papel manteiga, o qual foi transferido para balões volumétricos de 2 mL. Dissolveu-se em MeOH grau CLAE e completou-se o volume com o mesmo solvente, obtendo-se as soluções na concentração final de 0,5 mg/mL. Para a construção das curvas analíticas, essas soluções foram injetadas no sistema cromatográfico, conforme indicado na Tabela 1.

Tabela 1 - Correspondência entre os volumes e as massas injetadas para construção da curva analítica do verbascosídeo, conforme a concentração da solução de referência.

Volume (µL)	Massa (µg)
Solução de referência 1 mg/1ml	
12	6
8	4
6	3
4	2
2	1

Fonte: Da autora (2020).

A linearidade foi determinada utilizando-se, no mínimo, cinco concentrações distintas. Cada ponto das curvas analíticas foi obtido pela injeção, em triplicata, de diferentes alíquotas da solução de referência (TABELA 3), na faixa de 12 a 2 μL , como indicados na Tabela 3. As curvas analíticas foram determinadas em relação à massa injetada de cada substância de referência, em dois dias consecutivos.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados e os coeficientes de determinação (r^2) correspondentes foram calculados. As curvas obtidas nos dois dias consecutivos foram comparadas, estatisticamente, por análise de variância ($p < 0,05$). Os dados quantitativos de verbascosídeo foram expressos em mg/g de amostra, calculados, a partir da equação média das curvas analíticas.

2.5 Análise de ancoramento molecular

Para o entendimento, em nível molecular, das interações envolvidas na inibição da glicosidase, estudos de ancoramento molecular foram realizados entre a enzima α -glicosidase do *Bacillus stearothermophilus* e os compostos acarbose, acarbose_hexa, miglitol, verbascosídeo e isoverbascosídeo. O programa *Molegro Virtual Docker (MVD)* (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006) foi utilizado para o cálculo das energias, permitindo determinar a conformação mais provável de interação do ligante com a macromolécula. As coordenadas da estrutura tridimensional da enzima glicosidase do *Bacillus stearothermophilus* foram construídas, por meio da modelagem por homologia.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O mesmo extrato e as mesmas frações de *Lippia dulcis* (erroneamente identificada por *Phyla betulifolia* (Kunth) Greene) haviam sido previamente avaliadas quanto à inibição da α -glicosidase de *Bacillus stearothermophilus*, por nosso grupo nos estudos de Germano (2019). Assim, buscando a confirmação da atividade *in vitro* da enzima α -glicosidase, no presente estudo foi empregado outro método de avaliação da atividade inibitória da enzima α -glicosidase. Conforme detalhadamente descrito na metodologia, a otimização do método de avaliação da atividade inibidora da α -glicosidase foi baseada em condições propostas por Kwon, Apostolidis e Shetty (2008) e Pereira et al. (2012). Em distinção ao método empregado por Germano (2019), o presente ensaio empregou diferente concentração do substrato; foi realizado na presença de GHS; e, houve um controle rigoroso da temperatura de trabalho.

Em um estudo de otimização e validação em microescala do método de avaliação da atividade inibitória *in vitro* da α -glicosidase, Granados-Guzmán et al. (2018) apontaram que as concentrações da enzima e do substrato e a temperatura e o tempo de incubação levam a variações significativas na resposta da atividade enzimática, sendo a concentração da enzima e a temperatura de incubação os fatores mais significativos. No presente estudo, quanto à otimização da concentração da enzima, foi uma pesquisa de cinética que indicou que a concentração ótima da enzima α -glicosidase para o ensaio.

No que tange a temperatura do ensaio, tanto na pré-mistura dos reagentes quanto na pré-incubação e durante todo o período de leitura, a microplaca foi mantida na temperatura de 37°C. O tempo de incubação foi determinado em 10 min, pois, acima desse período já não se observavam alterações significativas nos valores de absorbâncias. Essas condições corroboram em parte com as validadas por Granados-Guzmán et al. (2018) que estabeleceram que as temperaturas ótimas de incubação devem permanecer entre 37 e 39 °C, mas o tempo de incubação ideal, nas condições experimentais dos referidos autores, foi estabelecido entre 17,5 e 20 min.

Os resultados da atividade inibitória da α -glicosidase estão apresentados na Tabela 2. As preparações de *Lippia dulcis*, independente do ensaio de inibição da α -glicosidase com e sem fluido gástrico, indicaram uma faixa de inibição de 46,69 a 63,67%. De acordo com Kwon, Vattem e Shetty (2006), tais percentuais estão dentro de uma faixa de atividade inibidora da α -glicosidase considerada moderada.

Tabela 2 - Porcentagem de inibição da enzima α -glicosidase (%I); Unidades de Inibição de α -glicosidase (UIG) do extrato etanólico e frações de *Lippia dulcis*, sem e com fluido gástrico simulado e concentração de verbascosídeo nas amostras.

Amostra	%I \pm DP		UIG \pm DP ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ de amostra)		VEB \pm DP (mg/g)
	Sem fluido	Com fluido	Sem fluido	Com fluido	
EE	54,0 \pm 1,0 b	Nd	318,4 \pm 3,6 e	Nd	243,59 \pm 0,04
FHE	54,8 \pm 1,8 bA	54,5 \pm 1,3 aA	646, 5 \pm 3,4 cA	567,8 \pm 1,4 aB	172,54 \pm 0,40
FHM	53,7 \pm 1,7 bA	51,6 \pm 1,0 aA	632, 6 \pm 2,1 dA	537,1 \pm 2,8 bB	89,50 \pm 0,34
FAD2	63,7\pm2,6 aA	46,7 \pm 1,0 bB	675,0\pm3,0 aA	486,4 \pm 2,9cB	130,37 \pm 0,39
FAD3	61,7\pm2,5 aA	51,2 \pm 1,1 aB	654,6\pm3,6 bA	533,1 \pm 3,1bB	49,97 \pm 1,20

Fonte: Da autora (2020).

DP: desvio padrão ($n = 3$). **UIG ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ de amostra)**: define a quantidade da enzima que inibe 1 μmol de produto, expresso em *p*-nitrofenol, por minuto por grama de planta. **VEB**: quantidade de verbascosídeo em mg/g de amostra. **EE**: extrato etanólico; **FHE**: fração hexânica solúvel em etanol 92,8°; **FHM**: fração hexânica solúvel em metanol; **FAD2**: fração antidiabética 2; **FAD 3**: fração antidiabética 3. **nd**: inibição não detectada. Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula na linha não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

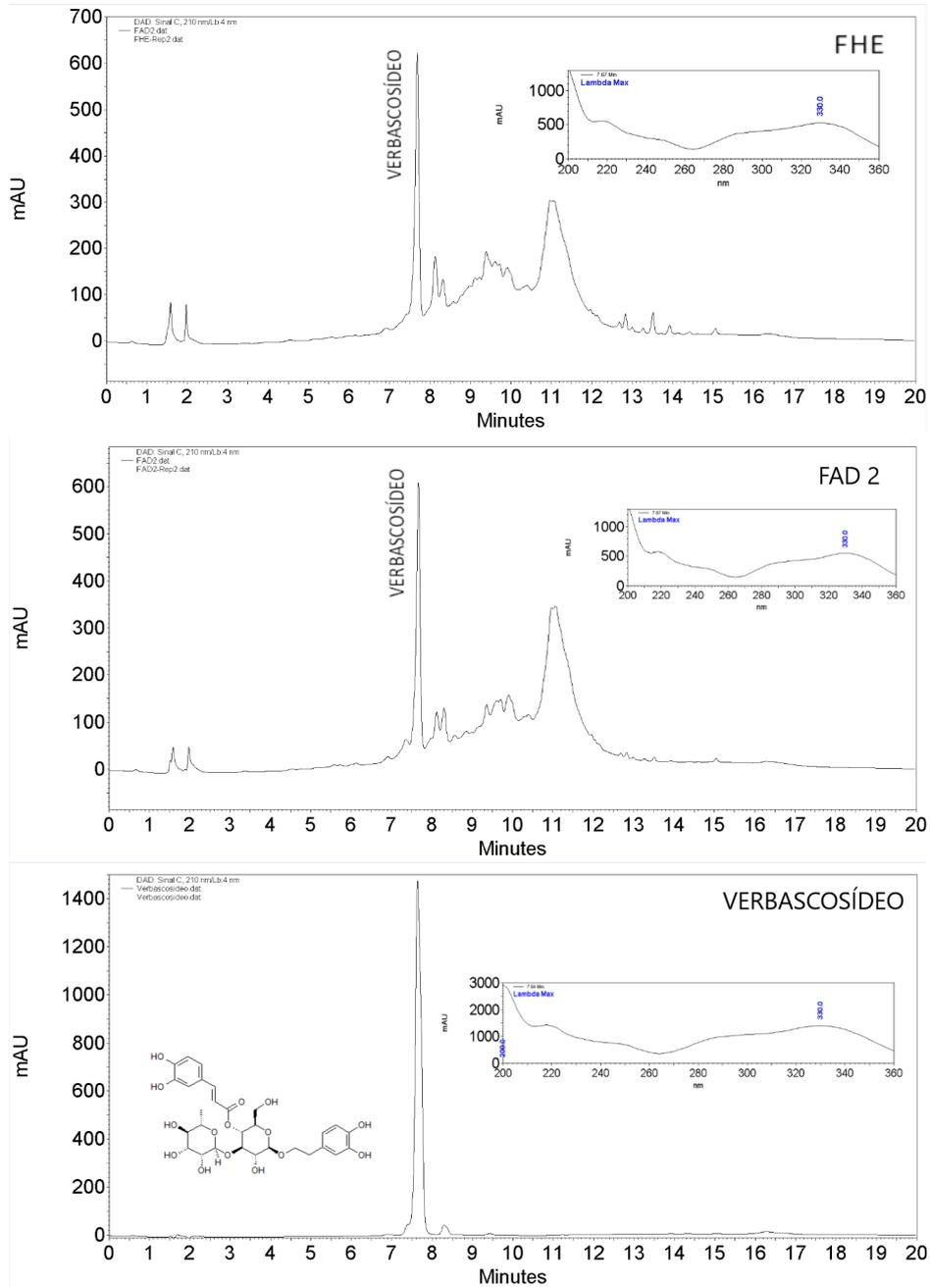
As frações FAD2 e FAD3, no ensaio sem fluido gástrico, foram as que mais inibiram a α -glicosidase, apresentando inibições de 63,67% e 61,74%, respectivamente. Esse resultado foi confirmado pela relação linear com *p*-nitrofenol, cujos valores de UIG para as frações FAD2 e FAD3, na ausência do fluido gástrico, foram os maiores, respectivamente, 675,00 e 654,57 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ de amostra. No entanto, após a exposição ao fluido gástrico verificou-se uma significativa diminuição na atividade inibitória da α -glicosidase dessas frações, sugerindo que o pH extremamente ácido do estômago e, possivelmente, outros componentes do fluido gástrico, causaram alterações moleculares no inibidor, acarretando uma menor interação com a enzima em questão.

As preparações menos purificadas de *Lippia dulcis* (EE, FHE e FHM) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas na porcentagem de inibição da α -glicosidase. No entanto, o EE quando submetido à simulação do fluido gástrico, não apresentou atividade inibitória da enzima, mas as frações FHE e FHM não alteraram sua atividade com ou sem fluido gástrico simulado.

Kwon, Vatter e Shetty (2006) demonstraram que o pH é um importante fator que contribui na atividade inibitória da α -glicosidase de compostos fenólicos. Polifenóis das classes dos flavonóides e de glicosídeos feniletanóides, como verbascosídeo, já foram isolados de *Lippia dulcis* e outras espécies de *Lippia* (ABE et al., 2002; OLIVIER et al., 2010; ONO et al., 2005). Análises por CLUE-DAD-ESI-MS/MS e comparação com padrão

autêntico realizada por Germano (2019) evidenciaram a presença majoritária de verbascosídeo nas preparações de *Lippia dulcis*. No presente estudo, a fim de se verificar a estabilidade química e confirmar a presença do verbascosídeo nas preparações, análises de perfis cromatográficos foram, novamente registradas por CLAE-DAD e comparadas com padrão autêntico. Os resultados indicaram a presença de verbascosídeo, nas amostras (FIGURA 1). Assim, as diferenças observadas na atividade inibitória da α -glicosidase na presença e ausência de fluido gástrico simulado, podem estar associadas ao verbascosídeo ou a outros compostos fenólicos, possivelmente, presentes nas amostras.

Figura 1 - Perfis cromatográficos representativos por CLAE-DAD a 210 nm de preparações de *Lippia dulcis* empregadas no ensaio de inibição da α -glicosidase e de amostra autêntica de verbascosídeo.



Fonte: Da autora (2020).

O verbascosídeo e seus derivados já foram relacionados com atividades antidiabéticas em outros estudos. Liu et al. (2014) demonstraram que o verbascosídeo e outros glicosídeos feniletanóides isolados de raízes de *Clerodendrum bungei* (L.) Kuntze (Lamiaceae) exibiram efeitos inibitórios mais fortes contra a α -glicosidase do que a acarbose. O extrato aquoso de *Marrubium vulgare* L. (Lamiaceae), rico em uma série de moléculas complexas, caracterizadas como derivados do verbascosídeo, induziu efeito antidiabético dose-

dependente significativo em ratos Wistar albinos diabete-induzidos por aloxano (BOUDJELAL et al., 2012). Dentre outros estudos, destacam-se os efeitos para diminuir ou evitar as complicações causadas pelo diabetes, como a inibição da atividade das enzimas α -, β -glicosidases, α -amilase e lipase pancreática (SPÍNOLA; CASTILHO, 2018), inibição dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) (FERRIER et al., 2018) e seu possível efeito anti-hiperglicêmico (YOUSSEF et al., 2017). Diante das evidências relatadas para o verbascosídeo quanto a sua atividade antidiabética, este foi quantificado nas amostras.

A fim de garantir que a determinação quantitativa não estivesse sujeita a interferências de outros componentes da matriz, inicialmente, avaliou-se a seletividade referente ao pico do verbascosídeo nos cromatogramas registrados. A seletividade foi demonstrada pela homogeneidade espectral do pico referente ao verbascosídeo nas amostras nas regiões ascendente, apical e descendente do pico. A linearidade do método foi determinada a partir da construção de duas curvas analíticas obtidas em dois dias consecutivos. As curvas analíticas foram determinadas em relação à massa injetada de verbascosídeo, conforme apresentado na Tabela 3. Os dados da análise de regressão linear, dos dois dias de análises, e a curva analítica obtida pela média das duas curvas, para o verbascosídeo estão apresentados na Tabela 4 e Figura 2.

Tabela 3 - Massa injetada, áreas médias ($n = 3$) e desvio padrão relativo das curvas analíticas de verbascosídeo nos dois dias de análise.

Volume injetado (μL)	Massa injetada (μg)	Dia 1		Dia 2	
		Área média	DPR (%)	Área média	DPR (%)
Solução de referência (1 mg/mL)					
12,0	6,0	16.724.825	4,70	16.892.650	1,22
8,0	4,0	12.066.834	1,10	12.568.337	1,63
6,0	3,0	9.039.406	0,08	9.464.612	0,16
4,0	2,0	5.998.513	1,17	6.373.115	0,64
2,0	1,0	2.988.103	0,29	3.205.670	0,15

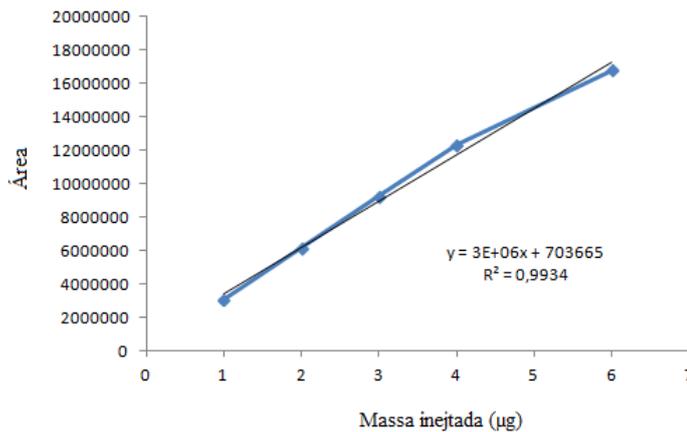
Fonte: Da autora (2020).

Tabela 4 - Resultados da regressão linear para curvas analíticas de verbascosídeo, em dois dias consecutivos de análise.

Parâmetros estatísticos	VB	
	Dia 1	Dia 2
Faixa linear (μg)	6-1	
Coefficiente de determinação	0,9954	0,9912
Inclinação	2763720	2754119
Erro padrão da inclinação	108885	150147
Valor P – inclinações das 2 curvas	0,9604	
Intercepto	519633	887697
Erro padrão do intercepto	395597	545510
Valor P – interceptos das 2 curvas	0,2912	

Fonte: Da autora (2020).

Figura 2 - Média das curvas analíticas obtidas por CLAE-DAD em dois dias consecutivos.



Fonte: Da autora (2020).

As curvas obtidas nos dois dias consecutivos não apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$) e indicaram relação linear entre a massa injetada de verbascosídeo (μg) versus a área do pico correspondente, atestando a linearidade do método pelo coeficiente de determinação (R^2) médio de 0,9934.

A concentração de verbascosídeo foi muito diferente entre as amostras (TABELA 2). A menor concentração foi observada na FAD3 (49,9 mg/g) e a maior na EE (243,5 mg/g). Entretanto, nota-se, pelos resultados apresentados na Tabela 2, que a atividade inibitória da α -glicosidase independe da concentração de verbascosídeo nas amostras. Comparando os valores de UIG das frações mais ativas (FAD2 e FAD3), as diferenças da concentração de verbascosídeo nessas amostras (130,3 mg/g e 49,9 mg/g, respectivamente) não modificaram

sua atividade. Comportamento similar foi demonstrado por estudos de cinética realizados por Kuusk e Väljamäe (2017) para a enzima β -glicosidase.

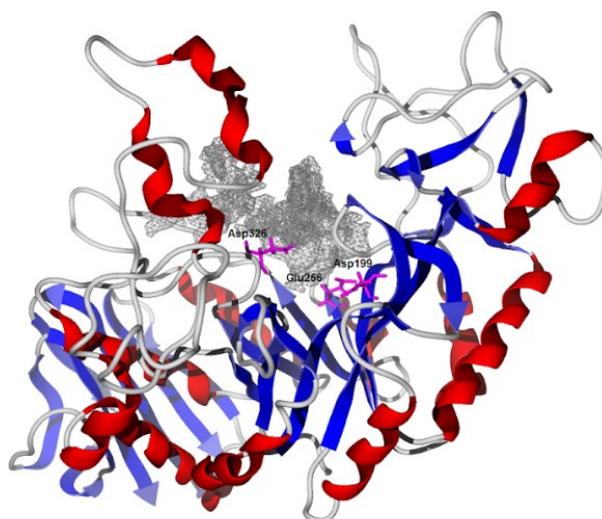
Esse resultado pode estar relacionado a um possível sinergismo entre seus diversos compostos químicos, mostrando que, nem sempre, o composto majoritário é o responsável pela atividade farmacológica. Alguns estudos já concluíram que os componentes, em menor proporção, são críticos e podem ter um efeito sinérgico ou influência potencializadora na atividade (BURT, 2004). Como ocorre na espécie *Cordia verbenacea* (BRANDÃO et al., 2017; QUEIROZ et al., 2016) em que o composto com ação farmacológica não é o majoritário.

No intuito de avaliar as interações do verbascosídeo com a α -glicosidase, foi realizado um estudo teórico de ancoramento molecular. Essa abordagem prediz a conformação de um ligante, no local ativo de um receptor e o modo de ligação, com menos energia entre o complexo ligante-receptor (FREITAS et al., 2019).

Como ainda não há disponível no banco de dados de proteínas a estrutura cristalográfica da α -glicosidase do *Bacillus stearothermophilus*, um modelo tridimensional foi construído, por meio da modelagem por homologia. Após uma pesquisa por moldes, a enzima do *Bacillus* sp. foi escolhida com 96,22% (PDB:2ZE0) de identidade.

Após a construção da estrutura tridimensional da enzima glicosidase do *Bacillus stearothermophilus* (FIGURA 3) foi determinado o sítio catalítico (Asp199, Glu256 e Asp326) e o volume da cavidade ($639,5 \text{ \AA}^3$). Para o estudo de ancoramento molecular, cinco moléculas foram utilizadas: acarbose, acarbose_hexa, miglitol, verbascosídeo e isoverbascosídeo. Na Tabela 5, estão apresentados os valores de energia obtidos. Pode-se observar que o verbascosídeo forma um complexo mais estável com a enzima, quando comparado a acarbose e ao miglitol. Além disso, o verbascosídeo apresentou energia de interação do tipo ligação de hidrogênio similar a acarbose e superior ao miglitol. Isso, porque o verbascosídeo interage, por meio de ligação hidrogênio com Ala59, Tyr63, Asp98, Gln167, Asp199, Asn258, Asn324, Asp326 e Arg415, enquanto que o miglitol interage somente com His103, Gln167, Arg197, Glu256, Asp326.

Figura 3 - Estrutura tridimensional da enzima α -glicosidase de *Bacillus stearothermophilus*. A cavidade está representada em cinza e os três resíduos catalíticos em rosa. As α -hélices estão em vermelho e as folhas- β em azul.



Fonte: Cunha (2020).

Tabela 5 - Valores de energia total do complexo proteína-ligante, energia intermolecular, energia intramolecular e energia de ligação hidrogênio.

Ligante	Escore de energia (kcal mol ⁻¹)	Energia intermolecular (kcal mol ⁻¹)	Energia intramolecular (kcal mol ⁻¹)	Energia de ligação de hidrogênio (kcal mol ⁻¹)
Acarbose_hexa	-167,33	-229,28	61,95	-26,25
Isoverbascosídeo	-145,58	-200,48	54,89	-18,13
Verbascosídeo	-139,54	-198,42	58,88	-12,08
Acarbose	-100,21	-153,22	53,00	-12,71
Miglitol	-64,88	-81,56	16,69	-10,68

Fonte: Cunha (2020).

Muita atenção tem sido dada à prospecção de moléculas de fontes naturais que sejam abundantes e eficazes na inibição da α -glicosidase com a abordagem terapêutica de reduzir a hiperglicemia pós-prandial (KIM; WANG; RHEE, 2004; MOGALE et al., 2011; NGUYEN; WANG, 2017; PEREIRA et al., 2012; THANAKOSAI; PHUWAPRAISRISAN, 2013; TUNDIS; LOIZZO; MENICHINI, 2010; YOUSSEF et al., 2017). Nos estudos de prospecção são empregadas diversas fontes de α -glicosidases, sendo as principais as α -glicosidases de intestino de mamíferos, *Saccharomyces cerevisiae* (levedura); *Bacillus stearothermophilus* (bactéria) e a α -glicosidase de arroz tipo 4.

Entretanto, a atividade inibitória de uma molécula é dependente das diferenças estruturais das enzimas de diferentes fontes. Kim, Wang e Rhee (2004) demonstraram que o extrato etanólico a 70% das cascas de *Pinus densiflora* inibiu fortemente as enzimas *S.*

cerevisiae e *B. stearothermophilus*, entretanto, uma atividade inibidora moderada foi observada para a α -glicosidase de tecido de mamífero. Os autores explicaram que as diferenças observadas na atividade inibidora da α -glicosidase consistiram nas diferenças estruturais da enzima da levedura *S. cerevisiae* (tipo I) e da fonte dos mamíferos (tipo II).

Resultados similares foram observados por Nguyen e Wang (2017), ao avaliarem a atividade inibidora sobre diferentes fontes de α -glicosidase de moléculas isoladas de um caldo nutriente fermentado. A adenina apresentou uma eficiente inibição da α -glicosidase de levedura e, inibição fraca contra α -glicosidase bacteriana e nenhum efeito nas α -glicosidases de rato e arroz. Por outro lado, o ácido nicotínico apresentou inibição de 97% da α -glicosidase intestinal de rato e inibições de 47% e 52% das α -glicosidases de *S. cerevisiae* and *B. stearothermophilus*.

Lippia dulcis tem indicativos de dupla funcionalidade para o controle da glicemia pós-prandial em pacientes diabéticos. Além de seu chá conferir um sabor adocicado que, conseqüentemente, poderia ser utilizado como substituto de açúcares na preparação de bebidas na alimentação, a planta também possui indicativos de atuar como um inibidor da α -glicosidase intestinal. No entanto, tais resultados não podem ser confirmados por este trabalho, em decorrência da baixa homologia entre a enzima utilizada e a enzima digestiva humana.

4 CONCLUSÃO

Neste estudo, confirmamos que o EE e as frações de *Lippia dulcis* apresentam atividade inibidora da α -glicosidase de *Bacillus stearothermophilus*. As frações mais purificadas apresentam os efeitos mais potentes, independente da concentração de verbascosídeo nas frações. No entanto, após a simulação do fluído gástrico houve uma significativa diminuição na atividade inibitória da α -glicosidase dessas frações, demonstrando que o pH é um importante fator que contribui na atividade inibitória da α -glicosidase. Estudos teóricos de ancoramento molecular do verbascosídeo com a enzima α -glicosidase de *Bacillus stearothermophilus* foram consistentes com a atividade inibitória verificada nos estudos de bancada. Estudos *in vitro* de atividade inibidora da α -glicosidase isolada de mamífero e estudos pré-clínicos em animais para de avaliação dos efeitos hipoglicêmicos agudo e crônico, a fim de explorar o potencial de *L. dulcis* no controle do diabetes fazem-se necessários.

REFERÊNCIAS

- ABE, F. et al. Antiproliferative constituents in plants 9. Aerial Parts of *Lippia dulcis* and *Lippia canescens*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 25, p. 920-922, 2002.
- ATTIA, M. et al. Molecular cloning and characterization of (+)-epi-a-bisabolol synthase, catalyzing the first step in the biosynthesis of the natural sweetener, hernandulcin, in *Lippia dulcis*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 527, p. 37-44, 2012.
- BOUDJELAL, A. et al. Compositional analysis and in vivo anti-diabetic activity of wild Algerian *Marrubium vulgare* L. infusion. **Fitoterapia**, Milano, v. 83, p. 286-292, 2012.
- BRANDÃO, D. S. et al. Growing of tropical black sage and chemical composition of the essential oil. **Revista de Ciências Agrárias**, Recife, v. 40, p. 823-829, 2017.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, p. 223-253, 2004.
- COMPADRE, C. M. et al. Hernandulcin: an intensely sweet compound discovered by review of ancient literature. **Science**, New York, v. 227, p. 417-419, 1985.
- COMPADRE, C. M.; ROBBINS, E. F.; KINGHORN, A. D. The intensely sweet herb, *Lippia dulcis* Trev.: historical uses, field inquiries, and constituents. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 15, p. 89-106, 1986.
- FERRIER, J. et al. Traditional medicines used by Q'eqchi' Maya to treat diabetic symptoms and their antiglycation potential. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 224, p. 504-511, 2018.
- FREITAS, T. C. de et al. Identification of bioactive compounds and analysis of inhibitory potential of the digestive enzymes from *Syzygium* sp. extracts. **Journal of Chemistry**, London, v. 2019, p. 1-10, 2019.
- GERMANO, C. M. **Phytochemistry and evaluation of the antidiabetic and antioxidant potential of phyla betulifolia (kunth) greene (VERBENACEAE)**. 2019. 94 p. Tese (Doutorado em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2019.
- GRANADOS-GUZMÁN, G. et al. Optimization and validation of a microscale in vitro method to Assess α -Glucosidase inhibition activity. **Current Analytical Chemistry**, Sharjah, v. 14, p. 458-464, 2018.
- HAWKINS, P. C. D.; SKILLMAN, A. G.; NICHOLLS, A. Comparison of shape-matching and docking as virtual screening tools. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 50, n. 1, p. 74-82, Jan. 2007.
- IANNICELLI, J. et al. Traditional uses, conservation status and biotechnological advances for a group of aromatic/medicinal native plants from America. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, Santiago, v. 17, p. 453-491, 2018.

KANEDA, N. et al. (+)-4P-hydroxyhernandulcina, new sweet sesquiterpene from the leaves and flowers of *Lippia dulcis*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 55, n. 8, p. 1130-1141, 1992.

KIM, Y. M.; WANG, M. H.; RHEE, H. I. A novel α -glucosidase inhibitor from pine bark. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 339, p. 715-717, 2004.

KUUSK, S.; VÄLJAMÄE, P. When substrate inhibits and inhibitor activates: implications of β -glucosidases. **Biotechnology Biofuels**, London, v. 10, p. 2-15, 2017.

KWON, Y. I.; APOSTOLIDIS, E.; SHETTY, K. Inhibitory potential of wine and tea against α -amylase and α -glucosidase for management of hyperglycemia linked to type 2 diabetes. **Journal of Food Biochemistry**, Westport, v. 32, p. 15-31, 2008.

KWON, Y. I.; VATTEM, D. A.; SHETTY, K. Evaluation of clonal herbs of Lamiaceae species for management of diabetes and hypertension. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, Victoria, v. 15, p. 107-118, 2006.

LIU, Q. et al. Diterpenoids and phenylethanoid glycosides from the roots of *Clerodendrum bungei* and their inhibitory effects against angiotensin converting enzyme and α -glucosidase. **Phytochemistry**, Oxford, v. 103, p. 196-202, 2014.

LO PIPARO, E. et al. Flavonoids for controlling starch digestion: structural requirements for inhibiting human α -amylase. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 51, p. 3555-3561, 2008.

MOGALE, M. A. et al. α -Amylase and α -glucosidase inhibitory effects of *Sclerocarya birrea* [(A. Rich.) Hochst.] subspecies *caffra* (Sond) Kokwaro (Anacardiaceae) stem-bark extracts. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, p. 15033-15039, 2011.

MORIKAWA, T. et al. Acylated phenylethanoid glycosides, echinacoside and acteoside from *Cistanche tubulosa*, improve glucose tolerance in mice. **Journal of Natural Medicines**, Berlin, v. 68, p. 561-566, 2014.

NGUYEN, V. B.; WANG, S. L. New novel α -glucosidase inhibitors produced by microbial conversion. **Process Biochemistry**, London, v. 65, p. 228-232, 2017.

OLIVIER, D. K. et al. Phenylethanoid glycosides from *Lippia javanica*. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 76, p. 58-63, 2010.

ONO, M. et al. New bisabolane-type sesquiterpenes from the aerial parts of *Lippia dulcis*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 53, p. 1175-1177, 2005.

PEREIRA, A. C. et al. Inhibition of α -Glucosidase and Hypoglycemic Effect of Stilbenes from the Amazonian Plant *Deguelia rufescens* var. *urucu* (Ducke) A.M.G. Azevedo (Leguminosae). **Planta Medica**, Stuttgart, v. 78, p. 36-38, 2012.

PEREIRA, C. A. et al. Inibição de enzimas digestivas por extratos de pó comercial de *Hoodia gordonii* utilizado no tratamento da obesidade. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 9, n. 3, p. 265-269, jul./set. 2011.

QUEIROZ, T. B. et al. Teor e composição química do óleo essencial de erva-baleeira (*Varronia curassavica* Jacq.) em função dos horários de coleta. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 18, p. 356-362, 2016.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, p. 2-10, 2004.

SAJID, M. et al. Antidiabetic and antioxidant potential of *Alnus nitida* leaves in alloxan induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 251, p. 112544, 2020.

SPÍNOLA, V.; CASTILHO, P. C. Madeira moneywort (*Sibthorpia peregrina* L.) as a new source of verbascoside and its derivatives with potential phyto-pharmaceutical applications. **Natural Product Research**, Abingdon, v. 33, p. 3321-33325, 2018.

THANAKOSAI, W.; PHUWAPRAISIRISAN, P. First identification of α -glucosidase inhibitors from okra (*Abelmoschus esculentus*) seeds. **Natural Product Communications**, London, v. 8, p. 1085-1088, 2013.

THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. H. MolDock: a new technique for high accuracy molecular docking. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 49, n. 11, p. 3315-3321, June 2006.

TUNDIS, R.; LOIZZO, M. R.; MENICHINI, F. Natural products as -Amylase and -Glucosidase inhibitors and their Hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: an update. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, Beijing, v. 10, p. 315-331, 2010.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. **The national formulary NF 18:** pharmacopeial convention ing. Rockvile, 1995.

YOUSSEF, F. S. et al. Antihyperglycaemic activity of the methanol extract from leaves of *Eremophila maculata* (Scrophulariaceae) in streptozotocininduced diabetic rats. **Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 69, p. 733-742, 2017.