

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO OESTE – CEO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

RENATA LARIZ KAVALEK

PERFIL FITOQUÍMICO E EFEITOS INIBITÓRIOS DE EXTRATOS DAS
FOLHAS DE *Campomanesia xanthocarpa* OBTIDOS POR MEIO DAS
EXTRAÇÕES ENZIMÁTICA E POR ULTRASSOM: ESTUDOS *IN SILICO* E *IN*
VITRO

PINHALZINHO

2022

PINHALZINHO, 2021
RENATA LARIZ KAVALEK

**PERFIL FITOQUÍMICO E EFEITOS INIBITÓRIOS DE
EXTRATOS DAS FOLHAS DE *Campomanesia xanthocarpa*
OBTIDOS POR MEIO DAS EXTRAÇÕES ENZIMÁTICA E
POR ULTRASSOM: ESTUDOS *IN SÍLICO* E *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Anielia Pinto Kempka

Coorientador: Prof^º. Dr^º. Aleksandro Schafer da Silva

Pinhalzinho

2021

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com auxílio do programa de geração automática da Biblioteca Setorial do CEO/UEDESC

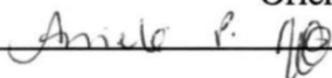
RENATA LARIZ KAVALEK

PERFIL FITOQUÍMICO E EFEITOS INIBITÓRIOS DE EXTRATOS DAS FOLHAS DE *Campomanesia xanthocarpa* OBTIDOS POR MEIO DAS EXTRAÇÕES ENZIMÁTICA E POR ULTRASSOM: ESTUDOS *IN SILICO* E *IN VITRO*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

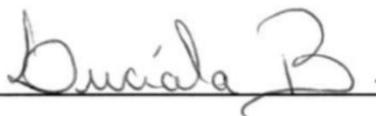
Banca examinadora:

Orientadora:

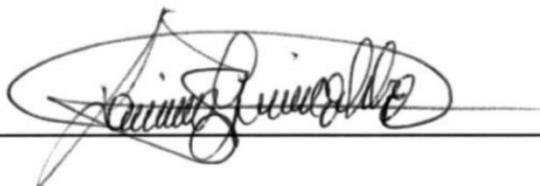


Prof.^a Dr.^a Anieli Pinto Kempka (UDESC-SC)

Membros:



Prof.^a Dra. Lucíola Bagatini (UDESC)



Prof. Dr. Clevison Luiz Giacobbo (UFFS – Chapecó).

Pinhalzinho, 08/12/2021

AGRADECIMENTOS

Quero começar agradecendo a Deus, parece clichê, mas sem ele nada seria possível. Ele me mostrou que com paciência e resiliência nossos sonhos são alcançados, sempre no tempo certo. Ele colocou pessoas incríveis no meu caminho para que essa jornada fosse repleta de ensinamentos e felicidade.

Agradeço imensamente a minha família, que sempre me apoiou e vibrou por cada conquista, cada etapa concluída, em especial aos meus pais, Estela Mari Kavalek e Renato Kavalek, que nunca deixaram de me incentivar e me mostrar que o estudo é a base para todos os meus sonhos, eles fizeram o melhor deles para que eu pudesse estar onde estou e devo muito a eles, sei que estar concluindo o mestrado é um sonho realizado para minha mãe. Ao meu esposo Cassio Rotava, que desde o início abraçou esse sonho junto comigo, que não pensou duas vezes em colocar seus sonhos em segundo plano para que eu pudesse realizar o meu. As minhas irmãs Merloni Mari Kavalek e Catherine Mari Kavalek que me deram muita força, de inúmeras maneiras.

E por fim, mas não menos importante a minha filha, Isabela Kavalek Rotava, que veio para a minha vida durante o mestrado, me mostrando o quanto sou capaz e forte, me impulsionou ainda mais para correr atrás dos meus sonhos e agora mais do que nunca quero alcançá-los por você. Filha, você é a minha luz.

Tenho imensa gratidão pela minha orientadora Aniela Pinto Kempka. Não existem palavras para mencionar e agradecer toda a sua paciência e resiliência, por todos os ensinamentos transmitidos. Muito obrigada por acreditar em mim.

A família do meu esposo, que sempre estiveram disponíveis para ajudar no que fosse necessário.

Aos colegas de aula, em especial Bruna G. Silveira e Luiz Gustavo Conde, por tonar todo o processo mais leve, com toda certeza se tornaram mais que colegas, uma amizade para a vida.

Aos colegas do laboratório BIOLAB da UDESC-CEO, em especial Eduarda Sumny, Eduarda Paglia e Felipe T. Borsoi, que sempre estiveram disponíveis para me ajudar no que fosse preciso, fosse com conhecimento, ajuda nas análises, conversas, conselhos, caronas ... sou muito grata a vocês. Quero agradecer aqui também as minhas professoras que sempre estiveram disponíveis para ajudar, em especial a professora Liziane Schittler Moroni e toda sua equipe do Laboratório de Microbiologia, que me auxiliaram muito nas análises para a minha dissertação.

Também não poderia deixar de agradecer aos meus amigos que sempre torceram por mim e sempre tiveram palavras de incentivo e motivação. A minha amiga e mentora Fabiana Casarin, que sempre esteve comigo e nunca deixou de acreditar no meu potencial.

A Fundação de Amparo a Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina pelo aporte financeiro.

A Universidade do Estado de Santa Catarina, por meio do Programa de Bolsas de Monitoria de Pós-graduação, pela concessão da bolsa ao longo da permanência no Programa.

Agradeço também a todos os parceiros que estiveram disponíveis para me auxiliar com análises fora da UDESC.

A todos vocês, meu Muito Obrigado.

*“A persistência é o menor
caminho do êxito”.*

(Charles Chaplin)

RESUMO

Extratos das folhas da Guabirobeira (*Campomanesia xantocarpa*) foram obtidos por meio das extrações assistida por enzimas (celulases), denominada WE, e por ultrassom, denominada WU, caracterizando ao perfil fitoquímico e efeitos inibitórios contra bactérias patogênicas vinculadas a indústria de alimentos e contra enzimas vinculadas ao Diabetes Mellitus tipo 2. O perfil fitoquímico foi obtido por cromatografia líquida de alta eficiência e os efeitos inibitórios por testes *in vitro* e *in silico*. Os testes *in vitro*, para determinação do efeito inibitório contra bactérias patogênicas, foram realizados com uso do método de difusão em disco e o método da concentração mínima inibitória (MIC), contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Os testes *in vitro*, para determinação do efeito inibitório dos extratos contra enzimas vinculadas ao Diabetes, foram realizados através da inibição da α -amilase e α -glucosidase. Realizou-se o estudo *in silico* por acoplamento molecular dos compostos do perfil fitoquímico, denominados ligantes, e proteínas-alvo. As proteínas-alvo utilizadas para o estudo de inibição de bactérias foram a diidrofolato redutase, a DNA girase B e a heptaprenil difosfato sintase, alvos importantes nos estudos com novos antibióticos. Para a inibição de enzimas vinculadas ao Diabetes, as mesmas enzimas do estudo *in vitro*, foram utilizadas no estudo *in silico*. O perfil fitoquímico demonstrou que os compostos presentes em maior quantidade foram o ácido benzóico, ácido protocateuico, ácido gálico e isoquercetina, contudo, vários outros compostos importantes foram quantificados. Nos testes de difusão em disco, os extratos WE e WU foram classificados como parcialmente ativos, com base no tamanho dos halos de inibição, contra *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Salmonella* Enteritidis. Nos testes de MIC, WE e WU foram classificados na faixa significativa para *L. monocytogenes* e *E. coli* e na faixa moderada para *Salmonella* Enteritidis. Sem inibição para *S. aureus*. No estudo *in silico*, os destaques por apresentarem os menores valores de energia de ligação com as proteínas-alvo, foram a isoquercetrina, a quercetina, o kaempferol, a catequina, a isorhamnetina, o ácido clorogênico, a epicatequina e a rutina, e estes, foram encontrados nos extratos em concentrações que variam de 1 a 50 mg Kg⁻¹. Para a determinação *in vitro* da inibição da α -amilase e da α -glucosidase, obteve-se inibições máximas para α -amilase de 98,13% para WE, e 43,12% para WU. Para a α -glucosidase, não houve diferença nas inibições promovidas pelos extratos WE e WU, com valor médio de 25,41% para WE e 45,50% para WU. Os extratos foram mais eficientes na inibição da α -amilase. No estudo *in silico*, os compostos que se destacaram foram a isorhamnetina, o kaempferol, a rutina, a quercetina, a catequina e a isoquercetrina, com concentrações nos

extratos que variam de 1 a 50 mg Kg⁻¹. Para os dois estudos de inibição, o acoplamento molecular demonstrou potencial de ligação entre os compostos dos extratos e as proteínas-alvo. Para algumas proteínas-alvo, a ligação ocorreu em diferentes posições da molécula, demonstrando que a inibição pode ocorrer por ligação no sítio catalítico principal da enzima, ou região secundária. Os resultados demonstram o potencial bioativo e farmacológico das folhas desta fruta nativa brasileira, a guabiroba.

Palavras-chaves: extratos de ervas, bactérias patogênicas, α -amilase, α -glucosidase, acoplamento molecular.

ABSTRACT

Extracts from the leaves of Guabirobeira (*Campomanesia xantocarpa*) were obtained through extractions assisted by enzymes (cellulases) - WE, and by ultrasound - WU, featuring the phytochemical profile and inhibitory effects against pathogenic bacteria linked to the food industry and against enzymes linked to type 2 Diabetes Mellitus. The phytochemical profile was obtained by high performance liquid chromatography and the inhibitory effects by *in vitro* and *in silico* tests. To determine the inhibitory effect against pathogenic bacteria were performed using the disk diffusion method and the minimum inhibitory concentration (MIC) method against Gram-positive and Gram-negative bacteria, for the *in vitro* testes. Also, to determine the inhibitory effect of extracts against enzymes linked to Diabetes, *in vitro* tests were performed through inhibition of α -amylase and α -glucosidase. *In silico* study was done by molecular coupling of compounds of the phytochemical profile, called ligands, and target proteins. The target proteins used for the study of bacterial inhibition were dihydrofolate reductase, DNA gyrase B and heptaprenyl diphosphate synthase, which are important compounds in studies with new antibiotics. For the inhibition of enzymes linked to Diabetes, the same enzymes from the *in vitro* study were used in the *in silico* study. The phytochemical profile showed that the compounds present in greater quantity were benzoic acid, protocateuic acid, gallic acid and isoquercetin, however, several other important compounds were quantified. In disk diffusion tests, the WE and WU extracts were classified as partially active, based on the size of the inhibition halos, against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* and *Salmonella Enteritidis*. In the MIC tests, WE and WU were classified in the significant range for *L. monocytogenes* and *E. coli* and, in the moderate range for *Salmonella Enteritidis*. No inhibition for *S. aureus*. in the *in silico* study was noticed. Main compounds for presenting the lowest binding energy values with the target proteins were isoquercetrin, quercetin, kaempferol, catechin, isorhamnetin, chlorogenic acid, epicatechin and rutin, which were found in extracts in concentrations ranging from 1 to 50 mg Kg⁻¹. For the *in vitro* determination of α -amylase and α -glucosidase inhibition, maximum inhibitions for α -amylase of 98.13% for WE and 43.12% for WU were obtained. For α -glucosidase, there was no difference in the inhibitions promoted by WE and WU extracts, with an average value of 25.41% for WE and 45.50% for WU. The extracts were more efficient in inhibiting α -amylase. In the *in silico* study, the compounds that stood out were isorhamnetin, kaempferol, rutin, quercetin, catechin and isoquercetrin, with concentrations in the extracts ranging from 1

to 50 mg Kg⁻¹. For both inhibition studies, molecular coupling demonstrated binding potential between extract compounds and target proteins. For some target proteins, binding occurred at different positions on the molecule, which means that inhibition can occur by binding to the enzyme's main catalytic site, or secondary region. The results demonstrate the bioactive and pharmacological potential of the leaves of this native Brazilian fruit: guabiroba.

Keywords: herbal extracts, pathogenic bacteria, α -amylase, α -glucosidase, molecular docking.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Relação entre o metabolismo primário e secundário de plantas.....	23
Figura 2- Classificação dos Compostos Fenólicos.....	24
Figura 3- Aspecto visual da árvore (a) e folhas (b) da <i>Campomanesia xanthocarpa</i>	35
Figura 4- Microscopias, com aumento de 150X, da folha (a), resíduo da extração assistida por enzimas, (b) e resíduo da extração por ultrassom (c).	43
Figura 5 - Representação visual do docking molecular com menor energia de ligação	51
Figura 6- Representação visual de docking molecular com menor energia livre de ligação ...	53
Figura 7- Representação visual de docking molecular com menor energia livre de ligação ...	55
Figura 8- Inibição da alfa-amilase in vitro por extratos de folhas de <i>Campomanesia xanthocarpa</i> obtidos por extração enzimática (WE) e extração por ultrassom (WU).	56
Figura 9- Inibição da alfa-glicosidase in vitro por extratos de folhas de <i>Campomanesia xanthocarpa</i> obtidos por extração enzimática (WE) e extração por ultrassom (WU).	57
Figura 10- Representação visual de docking molecular com menor energia livre de ligação .	62
Figura 11- Representação visual de docking molecular com menor energia livre de ligação .	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espécies de Guabirobeira registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.	20
Tabela 2: Proteínas-alvo utilizadas no estudo in-silico da inibição de enzimas digestivas e bacterianas por compostos fenólicos presentes em extratos de folhas de Campomanesia xanthocarpa.....	38
Tabela 3: Perfil fitoquímico do extrato aquoso das folhas de Campomanesia xanthocarpa obtido por extração enzimática (WE) e extração ultrassônica (WU).	41
Tabela 4: Energia livre de interação de ligação de compostos fenólicos (ligantes) de extratos de folhas de Campomanesia xanthocarpa com proteínas-alvo associadas à inibição do crescimento bacteriano.	47
Tabela 5: Classificação (dez primeiros) dos compostos fenólicos (ligantes) dos extratos das folhas de Campomanesia xanthocarpa com menor energia livre de ligação nas proteínas alvo associada à inibição do crescimento bacteriano.	48
Tabela 6: Energia livre de interação de ligação de compostos fenólicos (ligantes) de extratos de folhas de Campomanesia xanthocarpa com proteínas-alvo associadas à inibição de enzimas digestivas.	58
Tabela 7: Classificação (dez primeiros) dos compostos fenólicos (ligantes) dos extratos de folhas de Campomanesia xanthocarpa com menor energia livre de ligação nas proteínas alvo associada à inibição de enzimas digestivas.	59

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	16
2. OBJETIVOS DA PESQUISA	19
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos	19
CAPÍTULO I.....	20
3. GUABIROBA, SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS E COMPOSTOS BIOATIVOS	20
3.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	20
3.1.1 Guabirobeira (<i>Campomanesia xanthocarpa</i>).....	20
3.1.2 Compostos Bioativos	23
3.1.3 Propriedades biológicas das substâncias bioativas.....	25
3.1.4 Substâncias bioativas e propriedades biológicas da Guabirobeira.....	29
3.1.5 Extrações de substâncias bioativas.....	30
3.2 Acoplamento molecular e estudos <i>in silico</i>	31
CAPÍTULO II.....	32
Artigo: Perfil fitoquímico e efeitos inibitórios de extratos das folhas de <i>Campomanesia xanthocarpa</i> obtidos por meio das extrações assistida por enzimas e por ultrassom: estudos <i>in vitro</i> e <i>in silico</i>	32
1. Introdução	33
2. Material e Métodos.....	34
2.1 Coleta e preparação das folhas.....	34
2.2 Obtenção dos extratos aquosos	35
2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	36
2.4 Análise cromatográfica dos compostos fenólicos (LC-MS/MS).....	36
2.5 Efeitos inibitórios <i>in vitro</i>	36
2.6 Efeitos inibitórios <i>in silico</i>	38
2.7 Análise estatística	39
3. Resultados e Discussão.....	40

3.1 Perfil fitoquímico e MEV	40
3.2 Inibição do crescimento de bactérias pelos extratos WE e WU	43
3.3 Inibição da α -amilase e da α -glucosidase pelos extratos WE e WU.....	55
4. CONCLUSÃO	64
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é considerado um dos países com maior biodiversidade biológica do mundo. É conhecido pelas suas florestas tropicais, que são ecossistemas que abrigam inúmeras variedades da fauna e flora, atingindo cerca de dois terços do total de espécies existentes no planeta (ALMEIDA, 2016). Existem diferentes tipos de solo e climas que resultam em uma grande diversidade de espécies de frutas distribuídas nos seis biomas (Floresta Amazônica, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal e Pampa) que representam importância econômica com potencial para contribuir com os setores alimentício, farmacêutico e agroindustrial (NERI-NUMA et al., 2018).

Mesmo com ótimas características geográficas e de clima, favoráveis para a produção de frutas, a maioria da vegetação nativa não é explorada. A caracterização físico-química e a quantificação de compostos de frutos, folhas e sementes da flora da Mata Atlântica, presente em Santa Catarina, são importantes para entender seu valor nutricional, a fim de melhorar a qualidade e agregar valor à produtos que possam ser desenvolvidos. (SCHIASSI et al., 2017)

O estudo do uso de medicamentos e suplementos de ervas provenientes da natureza aumentou, cerca de 80%, nas últimas três décadas, visando diminuir o uso de sintéticos químicos, que além de prejudicar a saúde, possuem alto custo, sendo muitas vezes inacessíveis para a maioria da população. Assim, a fitoterapia é usada com a expectativa de promover uma vida mais saudável e para diminuir os riscos de doenças crônicas, como hipertensão, diabetes, câncer, hipercolesterolemia, anemia e agregação das plaquetas (BAILÃO et al., 2015).

Estudos revelam que, aproximadamente, 25% dos fármacos industrializados nos dias de hoje provem de forma direta ou indiretamente de produtos naturais, que representam a principal fonte de agentes terapêuticos utilizados para doenças infecciosas e câncer. A maiorias das plantas, além de oferecer os nutrientes necessários ao organismo humano, apresentam compostos químicos que exercem uma alta atividade biológica, sendo conhecidos como composto bioativos (R. S. OLIVEIRA et al., 2018). Esses produtos derivados dos alimentos naturais são indicados para inibir a α -amilase e α -glucosidade, enzimas vinculadas ao *Diabetes melittus* tipo 2, apresentando ainda outros efeitos adicionais, como o anti-hipertensivo, o antioxidante, o antimicrobiano e o antiproliferativo (RAMADHAN et al., 2017).

Os compostos biativos são amplamente encontrados no reino vegetal, como nos legumes, grãos de cereais, frutas e folhas, e também nos seus subprodutos, onde o seu consumo é indicado como prevenção de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas,

diabetes tipo II, certos tipos de câncer, contra o envelhecimento celular. Todas essas prevenções ocorrem devido a seus vários mecanismos de ação como antioxidante, antimicrobiano, auxiliam na pressão sanguínea e atuando no metabolismo de combate aos lipídeos (VELDERRAIN-RODRIGUEZ et al., 2014; BABBAR et al., 2012; HITZ et al., 2018).

A extração é o estágio inicial e um dos passos mais importantes em estudos que envolvem a obtenção de compostos bioativos a partir de plantas, pois desempenha um papel significativo e crucial no rendimento do processo de extração e na obtenção de compostos de qualidade. Ao longo dos anos, diversas técnicas foram criadas e melhoradas para facilitar a recuperação de compostos bioativos de matrizes alimentares. Dentre eles, métodos não convencionais, como a extração assistida por enzimas e por ultrassom têm ganhado destaque, uma vez que são considerados como extração limpa, e livre de solventes orgânicos (AZMIR et al., 2013).

A extração assistida por enzimas apresenta mais vantagens em relação aos métodos de extração convencionais, por possuir apelo ecológico, já que nesta técnica não são utilizados solventes orgânicos, apresenta maior rendimento e menor gasto de tempo na extração, o produto apresenta maior qualidade devido à ausência de resíduos de solventes e baixo consumo de energia. Para a eficiência do processo, é necessário compreender parâmetros bioquímicos relacionados às enzimas, como modo de ação, propriedade catalítica, condições ótimas de atuação e quais enzimas ou combinação delas são mais adequadas para a obtenção dos compostos de interesse (PURI et al., 2012).

O ultrassom, processo que utiliza a energia de ondas sonoras geradas em frequência superior à capacidade auditiva do ser humano, exerce um efeito mecânico, permitindo uma maior penetração do solvente na matriz, aumentando a área de superfície de contato entre a fase sólida e líquida. Estas ondas aumentam a permeabilidade das paredes celulares e produzem a cavitação (PANDEY et al., 2013), processo que ocasiona o rompimento das células vegetais e facilita a difusão do solvente para o interior da matriz. Neste processo, há liberação de calor, aumento da solubilidade dos analitos e da eficiência da extração. Alguns fatores como o solvente utilizado, a temperatura, o tempo de extração, proporção entre líquido e sólido e o tipo da matéria prima, podem influenciar significativamente no resultado (DE LIMA FRANZEN et al., 2018).

Uma planta nativa da família Myrtaceae que vem apresentando potencial para o fornecimento de compostos bioativos é a guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa*). Esta planta é conhecida por suas propriedades anti-inflamatória, antioxidante, anti-ulcerogênica e

propriedade de redução dos níveis de colesterol e obesidade, porém, por apresentar um fruto perecível, seu uso é preferencialmente para o consumo *in natura* e suas folhas usadas na medicina natural como relaxante muscular (KLAFKE et al., 2010). Estas propriedades são determinadas através de estudos *in vitro* e *in vivo*.

Aliado aos estudos *in vitro*, temos a abordagem *in silico*, onde traz as perspectivas de modelagem e acoplamento molecular, que por sua vez são procedimentos computacionais utilizados para a compreensão das interações moleculares entre ligante e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo das principais enzimas (PEREIRA et al., 2020). A quantidade de energia necessária para que uma molécula se ligue a um determinado alvo molecular reflete na atividade biológica desta molécula, pois quanto mais fácil for a interação entre o composto e o alvo, ou seja, quanto mais estável for o complexo formado, menor será a energia necessária para que esta interação ocorra (GUIDO et al., 2012). Desta forma, aliar as abordagens *in vitro* e *in silico* faz com que se tenha um melhor entendimento dos processos que envolvem as atividades biológicas dos compostos presentes em extratos de plantas.

Esta dissertação é composta por dois capítulos, sendo: Capítulo 1 – a Revisão Bibliográfica, que busca fazer um apanhado geral do estado da arte que envolve a pesquisa e; Capítulo 2 – Artigo científico gerado a partir dos estudos *in vitro* e *in silico*.

2. OBJETIVOS DA PESQUISA

2.1 Objetivo geral

Determinar o perfil fitoquímico de extratos das folhas de Guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) obtidos por meio das extrações assistida por enzimas e por ultrassom e determinar seu efeito inibitório contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e contra enzimas vinculadas a digestão de amido e associadas ao *Diabetes Mellitus* tipo 2, utilizando abordagens *in vitro* e *in silico*.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar o perfil fitoquímico de extratos das folhas de Guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) obtidos por meio das extrações assistida por enzimas e por ultrassom;
- Determinar, *in vitro*, o efeito inibitório dos extratos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas;
- Determinar, *in vitro*, o efeito inibitório dos extratos contra a α -amilase e a α -glucosidase;
- Determinar, *in silico*, a energia livre de ligação entre os compostos fitoquímicos identificados e enzimas vinculadas à inibição de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas;
- Determinar, *in silico*, a energia livre de ligação entre os compostos fitoquímicos identificados e a α -amilase e a α -glucosidase;
- Demonstrar os possíveis locais de ligação entre os compostos fitoquímicos (ligantes) e as enzimas (proteínas-alvo).

CAPÍTULO I

3. GUABIROBA, SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS E COMPOSTOS BIOATIVOS

3.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1.1 Guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa*)

A família Myrtaceae é considerada, taxonomicamente, uma das mais complexas das angiospermas. É considerada uma das famílias de maior representatividade nas diferentes formações florestais do Brasil, correspondendo a 1,32% do total de angiospermas conhecidas, o que é bastante representativo (HASTON et al., 2009). Possui distribuição tropical e subtropical. Devido a essa complexidade, bem como à dificuldade da sua taxonomia. Existem cerca de 4.000 espécies, organizadas em 130 gêneros e 5.800, distribuídas em 140 gêneros. No Brasil, são encontrados 23 gêneros com 4.791 espécies; destas, 791 são endêmicas com distribuição por todo o território brasileiro e maior representatividade nos biomas Mata Atlântica, Cerrado e Amazônia (SOBRAL et al. 2015).

A guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa*) que pertencente à família Myrtaceae, é uma árvore frutífera e nativa do Brasil encontrada na região sul, sudeste e centro oeste, mas também é encontrada no Paraguai, Uruguai e nordeste da Argentina. Seu consumo é de grande maioria *in natura*, ou na preparação de doces, geleias, sorvetes, sucos e licores. caseiros (NAPOLI et al., 2011; LUCKMANN et al., 2015).

O nome *Campomanesia* foi uma homenagem *in memoriam* ao naturalista espanhol Pedro Rodrigues de Campomanes e a palavra *xanthocarpa* vem do grego, que significa fruto (carpos) amarelo (xanthos). O nome comum guabirobeira deriva do indígena “wa’birob” e significa fruto amargo. É originária da América do Sul, e no Brasil, a espécie ocorre de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul, em quase todas as formações florestais (SARMENTO et al., 2012). No Brasil, espécies de *Campomanesia* são conhecidas por vários sinônimos, variando em cada região, são chamadas de gabiroba, guabiroba, guabiroba-do-campo, guariroba e guavira (ARANTES et al., 2011).

No Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) existem 11 espécies de Guabirobeira registradas (Tabela1) (MAPA, 2009).

Tabela 1: Espécies de Guabirobeira registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Espécies de Gabiroba			
Nome Comum	Nome científico	Nº	Data do

		registro	registro
Gabiroba-adamantium	<i>Campomanesia adamantium</i> O.Berg	23633	25/06/2008
Gabiroba do amazonas	<i>Campomanesia eugenioïdes</i> (Cambess) D Legrand	23634	25/06/2008
Gabiroba capoteira	<i>Campomanesia eugenioïdes</i> (Cambess) O.Berg	23635	25/06/2008
Gabiroba laurifólia	<i>Campomanesia laurifolia</i> Gardner	23636	25/06/2008
Gabiroba da folha fina	<i>Campomanesia lineatifolia</i> Ruiz & Pav	23637	25/06/2008
Gabiroba branca	<i>Campomanesia neriflora</i> (O.Berg) Nied	23638	25/06/2008
Gabiroba cambuci	<i>Campomanesia phaea</i> (O.Berg) Landrum	23639	25/06/2008
Gabiroba pilosa ou peluda	<i>Campomanesia pubescens</i> (DC) O.Berg	23640	25/06/2008
Gabiroba da grada	<i>Campomanesia reitziane</i> D.Legrand	23641	25/06/2008
Gabiroba do campo	<i>Campomanesia schlehtendahiliana</i> (O.Berg) Nied	23642	25/06/2008
Gabiroba de árvore	<i>Campomanesia xanthocarpa</i> O. Berg	23643	25/06/2008

Fonte: MAPA, 2009.

3.1.1.1 Morfologia, fenologia e ecologia da planta

A *Campomanesia xanthocarpa* apresenta duas variedades distintas, sendo a *C. littoralis*, com altura variando entre 0,2 e 1,5 m, com arbustivo e a *C. xanthocarpa* Berg medindo até 20 metros de altura, de copa densa e arredondada, com ramificações irregulares, tronco com casca de coloração parda acinzentada. Os ramos jovens são glabros e as folhas são verdes e opostas, simples, membranáceas, ovalado-oblongas, medindo de 4 a 10 cm de comprimento por 3 a 4,5 cm de largura, verde acinzentadas na natureza e castanho-arroxeadas em material herborizado (VALLILO et al., 2008). As flores são esbranquiçadas, consideradas melíferas, com sépala(s) ovada(s), botão-floral aberto(s) com cinco lobos(s); e cinco pétalas(s), com bractéola(s) ou profilo triangular (es) caducas(s) no botão-floral, seus frutos têm cor verde quando imaturos e amarelos quando maduros (LORENZI et al., 2009). Suas árvores são consideradas como espécie arbórea, heliófita, sendo recomendadas para plantio em pomares domésticos, praças, parques e na recuperação de áreas degradadas (LUKMANN et al., 2015).

O fruto é do tipo baga, composto por 7% de cálice, 16% de sementes, 17% de casca e 60% de polpa, que envolve a semente (M. SANTOS et al, 2012), de coloração que varia do verde ao amarelo, dependendo do seu estágio de maturação (KLAFKE et al., 2016). De modo geral, os frutos da guabirobeira possuem uma vida útil reduzida, devido ao seu alto teor de umidade (75,9%) e um rápido metabolismo, onde pode ser aproveitado até 7 dias depois de colhido e armazenado sobre refrigeração (M. SANTOS et al., 2012).

Essa planta floresce nos meses de setembro a novembro e seus frutos amadurecem no período de novembro a dezembro. É uma planta pouco exigente com os nutrientes presentes no solo, ou seja, conseguem nascer e se desenvolver em solos pobres, em clima tropicais de baixo índice pluviométrico, com bastante incidência de sol (VALLILO et al., 2006).

3.1.1.2 Composição nutricional

O fruto guabirobeira possui valor nutricional com grande potencial, com ótima fonte de minerais como, magnésio, fósforo, potássio, ferro, cobre, cálcio e zinco, presença de vitaminas B2 e C, e baixo valor calórico, por apresentar poucas concentrações de lipídeos (0,7 a 1,9%), porém, possuem altas concentrações de carboidratos (7,8 a 10,2%), água (81,4%) e de fibra alimentar (4,1 a 9,8%), e uma pequena quantidade de proteína (1,0 a 1,1%) (NAPOLI et al., 2011; NASCIMENTO et al., 2019; ARCARI et al., 2017). Devido a altos índices desses nutrientes e por apresentar compostos fenólicos, é considerado um alimento funcional (ARCARI et al., 2017).

Alguns estudos foram realizados abordando diferentes tecnologias para o uso da guabiroba na indústria de alimentos. Ao testar a guabiroba para fazer geleias, ficou demonstrado que o alimento processado ainda apresenta altos níveis de vitamina C, compostos fenólicos, carotenóides, bem como um bom conteúdo de β -caroteno. Além disso, a fruta contém diferentes tipos de pectinas que permitem a elaboração de diversos produtos, destacando a planta como um recurso nativo com potencial para a tecnologia e a economia (ARCARI et al., 2017).

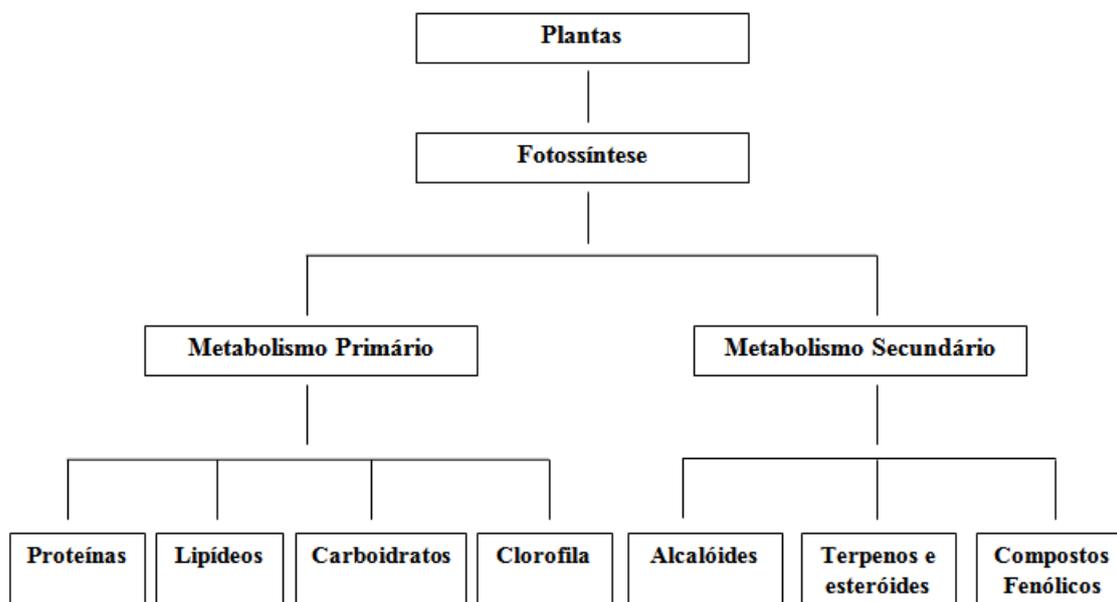
Por outro lado, a busca por substâncias naturais, biologicamente ativas e de baixo custo, tem elevado o número de pesquisas com as partes não aproveitadas da planta, como cascas, sementes e folhas que são considerados fontes potenciais de nutrientes. É possível afirmar, com dados obtidos de pesquisas que a concentração de nutrientes nas partes não industrializadas da planta é maior do que na polpa da fruta, parte de maior interesse industrialmente. Os compostos presentes nas frutas e em seus resíduos, principalmente

àqueles com ação antioxidante, e dentre eles estão os compostos fenólicos (ALVES et al., 2013).

3.1.2 Compostos Bioativos

Durante o desenvolvimento das plantas, são produzidos metabolitos primários e secundários. Os metabólitos primários, como carboidratos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, são responsáveis pela estrutura de crescimento, desenvolvimento e reprodução. Os metabólitos secundários não estão envolvidos diretamente no desenvolvimento da planta, mas sim, na sua manutenção e na sua proteção contra herbívoros, microrganismos, radiação UV, além de auxiliar na atração de polinizadores e/ou animais dispersores de sementes (N. MARTINS et al., 2016; M. SILVA et al., 2010). Na Figura 1 é encontrada a relação entre o metabolismo primário e secundário, bem como suas produções.

Figura 1- Relação entre o metabolismo primário e secundário de plantas.



Fonte Martins et al., 2016; S. Silva et al., 2010; Adaptado.:

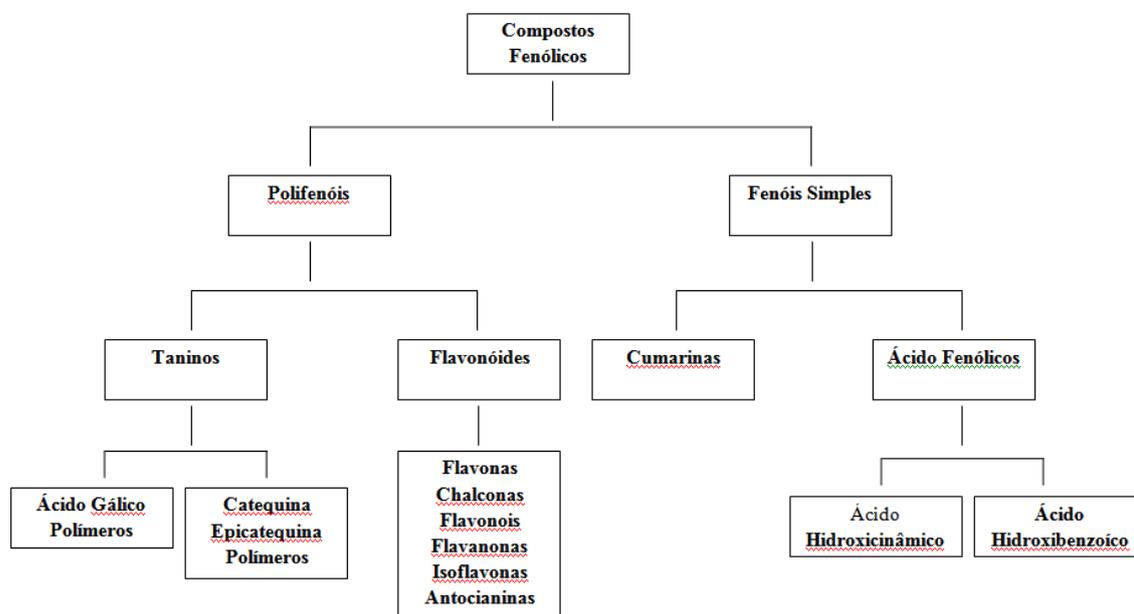
Os compostos encontrados no metabolismo secundário são conhecidos por apresentarem estruturas complexas, com baixa massa molecular e atividades biológicas marcantes. São encontrados em baixas concentrações e variam em cada planta, pela interferência do clima, solo e região, diferentemente dos compostos primários que são encontrados em grandes quantidades nas plantas. Sendo assim são compostos biologicamente

capazes de interferir nas moléculas presentes no organismo humano, com grande potencial de atividade farmacológica para a melhoria da saúde (MARTINS et al., 2016). Informações provenientes da Organização Mundial da Saúde sugerem que, cerca de 80% da população mundial, utiliza medicamentos naturais que são encontrados nas plantas nativas de cada região (ARULSELVAN et al., 2016).

3.1.2.1. Compostos Fenólicos

São substâncias que apresentam grupos benzênicos que possuem, no mínimo, um de seus hidrogênios substituídos por grupamentos hidroxila. Em plantas, já foram identificados mais de 8.000 compostos fenólicos. Na natureza, são encontrados em quantidades significativas e abrangem desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização. A finalidade destes compostos está associada com inibição ou ativação de uma vasta diversidade de sistemas enzimáticos, como quelantes de metais ou podendo sequestrar radicais livres (DAÍ et al., 2010). Na Figura 2 pode-se observar a classificação dos compostos fenólicos.

Figura 2- Classificação dos Compostos Fenólicos.



Fonte: Schafranski, 2019;

Essas substâncias, devido aos seus vários usos que proporcionam efeitos biológicos, tais como antioxidante, anti-inflamatório, hipolipidêmico e anticancerígeno, têm contribuído significativamente para estudos referentes à saúde humana, portanto, se faz importante ter o conhecimento da composição dos alimentos consumidos pelo ser humano bem como quais

compostos fenólicos se tem mais acesso e quais podem ser introduzidos através de extratos de plantas (TRABELSI et al., 2013).

Os flavonóides, ácidos fenólicos e taninos são os compostos de maior concentração nas plantas, sendo antioxidantes naturais, capazes de inibir a ação de radicais livres, que são responsáveis por causar danos às células de DNA através do estresse oxidativo, implicando na destruição de células saudáveis (NASCIMENTO et al., 2019). Os flavonóides correspondem à classe fenólica mais importante e variada entre os produtos de origem vegetal. Estão relacionados com uma grande variedade de atividades biológicas, destacando-se a ação antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, antialérgica, antiviral, dentre outras. A ação antioxidante dos flavonóides se dá pela sua capacidade de sequestrar radicais livres e quelar íons metálicos. Os flavonóides doam átomos de hidrogênio, protegendo assim os tecidos das reações provocadas por radicais livres e da peroxidação lipídica (SAVI et al., 2017). Geralmente, flavonóides encontrados nas folhas podem ser diferentes daqueles presentes nas flores, nos galhos, raízes e frutos, no geral, são compostos relativamente estáveis, pois resistem à oxidação, altas temperaturas e moderadas variações de acidez (SILVA et al., 2018). Os ácidos fenólicos são encontrados mais facilmente em frutas e vegetais, ou em formas conjugadas como em grãos e sementes, onde representam a maior parte dos compostos fenólicos. São clivados por hidrólise ácida ou alcalina e, também por ação de enzimas. Amplamente distribuídos no reino vegetal (apesar de alguns também serem produzidos por fungos) e imensamente importantes nas interações entre plantas e microrganismos, agindo como moléculas de sinalização e de defesa (ARNOSO et al. 2018).

3.1.3 Propriedades biológicas das substâncias bioativas

3.1.3.1 Atividade antidiabética

O *Diabetes Mellitus* (DM) é uma doença crônica, classificada em DM tipo 1, quando o pâncreas não secreta mais o suficiente de insulina, e DM tipo 2, quando o organismo não usa de forma correta toda a insulina produzida, causando uma desordem nas quantidades geradas (CASTRO et al., 2021)

O Diabetes é responsável por atingir cerca de 422 milhões de pessoas no mundo todo, sem intervenções, haverá 629 milhões de pessoas diabéticas até 2045, essa doença é caracterizada como uma pandemia mundial (CASTRO et al., 2021). Nos países desenvolvidos, o Diabetes geralmente se manifesta em pessoas idosas e nos países em desenvolvimento, os mais atingidos são os adultos entre 35 e 64 anos de idade. A principal

causa de desenvolvimento desta doença é a falta de hábitos saudáveis na alimentação, com a maior ingestão de produtos industrializados, ricos em carboidratos e gorduras. (ROSA et al., 2016)

O DM tipo 2 é o mais comum entre a população e o mais grave. Assim, muitos estudos são focados em desenvolver e ou encontrar opções naturais para o tratamento. A diversidade de plantas que podem apresentar uma solução fitoterápica para o tratamento do DM tipo 2 no Brasil vem aumentando, com destaque para os flavonóides como a rutina, quercetina e quercetina-3-O-xilósido (SHAKTHI et al., 2014).

Nesse contexto, alvos moleculares como enzimas e receptores tem sido estudados para a busca de medicamentos baseados no mecanismo de inibição enzimática que ocasiona alterações benéficas no metabolismo e o uso no tratamento de doenças (PEREIRA et al., 2010). Como enzimas alvo dos estudos, por serem as principais envolvidas na digestão de amido e associadas ao *Diabetes mellitus* tipo 2, temos a α -amilase e a α -glucosidase.

A α -amilase (1,4- α -Dglucanohidrolase, EC 3.2.1.1, enzima dextrinizante) pode atacar as cadeias dos componentes do amido em qualquer ponto no interior da cadeia linear. Isto equivale dizer que a α -amilase é uma endoenzima que hidrolisa ligações O-glicosídicas $\alpha(1-4)$, produzindo oligossacarídeos que contêm ligações $\alpha(1-6)$, além de glicose e maltose (SANTOS et al., 2010; MORAES et al., 2009).

A α -glucosidase (α -D-glicosideo glicohidrolase EC 3.2.1.20), é uma exoamilase que catalisa, preferencialmente, a hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 de sacarídeos curtos, e libera unidades de α -D-glicose. Algumas dessas enzimas também hidrolisam as ligações - 1,1, -1,2, -1,3 e -1,6 presentes em outros oligossacarídeos não derivados do amido (OTA et al., 2009; VAN DER MAAREL et al., 2002).

Sendo assim, por serem responsáveis pelo processamento de carboidratos provenientes da dieta, as enzimas α -amilase e α -glucosidase, atuam na quebra do amido e na absorção de monossacarídeos pelos enterócitos. Dessa forma, inibidores dessas enzimas, presentes em plantas, oferecem uma estratégia promissora para o controle da hiperglicemia associada ao Diabetes tipo 2, obesidade e hipertensão através da redução da quebra do amido e da absorção da glicose no intestino (PERREIRA et al., 2010).

Em estudos com os frutos e sementes provenientes do Araçá, planta da família Myrtaceae, foram encontrados valores significativos de compostos fenólicos, onde foi observada uma menor capacidade de inibição da α -glucosidase dos extratos das sementes, quando comparados com os extratos da polpa para a mesma concentração testada. Este resultado evidencia que a polpa possui compostos com maior atividade inibitória desta enzima

que a semente (PEREIRA et al., 2016). Resultado semelhante foi demonstrado por Adefegha et al. (2015), que avaliaram a inibição da α -glicosidase pelas diferentes partes do fruto de graviola, obtendo maior inibição pelo pericarpo, seguido da polpa e semente. Esta diferença pode estar associada ao conteúdo e a natureza dos compostos presentes nas diferentes partes dos frutos. Por fim, em uma avaliação das ações dos compostos fenólicos presentes em vinhos e folhas de chá, foi encontrado uma maior inibição das enzimas α -amilase e α -glucosidases pelos extratos provenientes das folhas do chá preto. Essa inibição tem sido relacionada com a presença de compostos fenólicos nos chás, devido à característica estrutural comum a todos eles que é a presença de um anel aromático hidroxilado, que interage com as proteínas causando complexação (PEREIRA et al., 2010).

3.1.3.2 Atividade Antimicrobiana

As infecções bacterianas e fúngicas, em um âmbito geral, são consideradas um grande problema de saúde pública em todo o mundo e afetam milhões de pessoas (PADOVEZE et al., 2014). Para tratamento destas, é necessário lançar mão de terapias antimicrobianas, onde os fármacos têm a função de eliminar os microrganismos causadores e ao mesmo tempo preservar a saúde do indivíduo acometido, porém, com uso muitas vezes de altas doses desses antibióticos, os microrganismos desenvolvem resistência (GUIMARÃES et al., 2010).

Algumas doenças microbianas são infecções normalmente causadas por bactérias patogênicas, que por suscetibilidade, atacam seus hospedeiros causando variadas doenças. As bactérias patogênicas podem somente colonizar e/ou podem causar doenças oportunistas se estiverem fora de seu *habitat* ou por desequilíbrios metabólicos, como por exemplo, colonização exacerbada e baixa da imunidade (NOGUEIRA et al., 2010).

Alguns estudos mostram que as plantas da família Myrtaceae têm em sua composição uma alta concentração de terpenos que são muitos usados em tratamentos ou para o auxílio no combate a distúrbios gastrintestinais, doenças infecciosas e hemorrágicas, tendo como partes comumente utilizadas as cascas, folhas e frutos (DE QUEIROZ et al., 2015; KESZEI et al., 2010). Essas plantas agem tanto contra bactérias Gram-positivas, caracterizadas quando existe uma camada espessa de peptidoglicano e Gram-negativas, que possuem uma camada de peptidoglicano que é delgada, mas apresenta uma porção externa de lipopolissacarídeo e lipoproteínas (ALAVIJEH et al., 2012). Dentre as bactérias que possuem maior interesse para a indústria de alimentos, estão as: *Staphylococcus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e a *Salmonella*, sendo que a ação antimicrobiana dos ácidos fenólicos se dá pela facilidade em atravessar a membrana plasmática desses microrganismos, e quando em citoplasma

bacteriano, se dissociam, diminuindo o pH interno, o que leva a inativação de muitas vias metabólicas (MIYAKE et al., 2015).

O *S. aureus*, possui formato de coco e pertence ao grupo das Gram-positivas, com tamanho que varia de 0,5 a 1,5 µm de diâmetro. São imóveis, pois não possuem flagelos e não esporulados. Várias características morfológicas, fisiológicas e químicas contribuem para a virulência do *S. aureus*. Possuem vários mecanismos de virulência e estratégias para escapar do sistema imunológico humano, incluindo uma série de proteínas de superfície, enzimas segregadas e toxinas que danificam a membrana por ação citolítica. Tais mecanismos podem causar desde simples afecções como espinhas, furúnculos e impetigo até infecções mais graves como meningite, pericardite, bacteremia, intoxicação alimentar e síndrome do choque tóxico (LIMA et al., 2015).

A *L. monocytogenes*, tem como formato um coco-bacilo, é uma Gram-positiva, não possui esporos e é anaeróbia-facultativa, catalase positiva, psicrotrófica, móvel à temperatura de 25°C e tolerante a NaCl. Esse micro-organismo é responsável pela causa de muitos surtos alimentares, onde os principais alimentos envolvidos no caso de listeriose são carnes, frangos, vegetais, superfície de processamento de alimentos, plantas de processamento de laticínios em leite cru e pasteurizado e queijos (H. SILVA et al., 2016).

O gênero *Escherichia* pertence à família *Enterobacteriaceae*, cuja espécie mais conhecida é a *E. coli*, devido à sua importância para a saúde pública e à sua recorrência em doenças entéricas envolvendo alimentos. É uma bactéria Gram-negativa, anaeróbica facultativa, presente no trato intestinal de animais de sangue quente e de seres humanos. É comensal, ou seja, habita o intestino sem causar doenças, porém, cerca de 10% dessa espécie podem causar infecções intestinais (DRUMOND et al., 2018).

A *Salmonella spp.* pertencente à família “*Enterobacteriaceae*”, são bactérias Gram-negativas, anaeróbicas facultativas, que se apresentam na forma em bastonetes. Não fermentam lactose e sua movimentação se dá pela presença de flagelos peritríquios (DOMINGOS et al., 2015). São consideradas a principal causa de doença transmitida por alimentos no mundo, por meio do consumo de alimentos de origem animal contaminados, principalmente a carne, aves, ovos e leite (FORTES et al., 2012).

Sendo assim, a família *Myrtaceae* representa um grupo de plantas que apresenta em sua composição compostos bioativos com atividade antimicrobiana e analisando-se diferentes estudos realizados nota-se que tanto extratos vegetais quanto óleos essenciais deste gênero apresentam ação antimicrobiana com diferentes graus de atividade (moderada, forte ou inativa) contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas dependendo da espécie vegetal

avaliada, sendo que alguns possuem tal atividade exclusivamente contra Gram-negativas ou Gram-positivas (SIMONETTI et al., 2016).

Estudos provenientes dos extratos de alecrim, comprovaram a ação antimicrobiana dos compostos fenólicos presentes contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Listeria monocitogenes* (SILVA et al., 2008).

3.1.4 Substâncias bioativas e propriedades biológicas da Guabirobeira

Alguns compostos como os terpenos, os compostos fenólicos e os alcalóides, são encontrados em diversas partes da planta (flor, folha, caule, semente, raiz), podendo possuir aplicabilidade nos tratamentos de endemias populares na forma de chás, pós, extratos, óleos fixos e óleos essenciais. Estes compostos estão se tornando uma opção de suporte alternativo para o tratamento de doenças. Assim mostra-se a importância de conhecer os compostos químicos presentes nas partes das plantas, como caule, folhas, frutos e raízes (TENORIO, 2018; SANT'ANNA et al., 2017).

Os frutos da guabirobeira são geralmente consumidos *in natura* ou como geleia e doces, suas folhas e raízes utilizadas popularmente, em infusões, para prevenção e tratamento de diversas enfermidades, como diabetes, dislipidemias, efeitos antiplaquetários, efeitos antiulcerogênicos, para redução peso corporal (FERREIRA et al., 2013; PALOZZA et al., 2012) e como relaxante muscular (VALLILO et al., 2006).

Outros estudos reforçam a presença de compostos bioativos, com atividades antidiarreica, depurativa, antirreumática, indicada para redução do nível de colesterol no sangue, evitando o surgimento de trombozes, ganhando destaque também como anti-inflamatória e antisséptica das vias urinárias. Tais estudos com as folhas indicaram atividade antioxidante, principalmente presentes na composição do óleo essencial das folhas, onde os componentes com valores significativos foram: geraniol (18,1%), espatulenol (6,5%) e globulol (4,7%). Além disso, as folhas das *Campomanesia* apresentam potencial antidiabético (LUCKMANN et al., 2015; SANT'ANA et al., 2017). Possuem também atividade antiproliferativa contra as células do câncer de próstata, diminuindo a expressão de NFκB1 e indução de apoptose (CAMPOS et al., 2017). Contém a presença de flavonóides e taninos, reforçando os efeitos antioxidantes da folha (NAPOLI et al., 2014).

Os extratos das folhas também foram avaliados com relação à ação antimicrobiana, provando apresentar ação contra *S. aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella*

Typhimurium (ARCARI et al., 2020; CAMPOS et al., 2017). O seu extrato lipofílico ganhou destaque, pois, são conhecidos por suas propriedades medicinais como anti-inflamatório, antioxidante, antiulcerogênicos e propriedade de redução dos níveis de colesterol e obesidade (KLAFKE et al., 2016).

No entanto, maiores investigações são necessárias sobre os efeitos da *Campomanesia* em diferentes doenças, bem como suas concentrações e identificação dos compostos bioativos presentes na planta, responsáveis por tais efeitos (ESPINDOLA et al., 2016).

3.1.5 Extrações de substâncias bioativas

A escolha do melhor método de extração que deve ser aplicado para extrair compostos bioativos deve levar em consideração vários fatores, analisando vantagens e desvantagens de cada processo, deve ser o mais simples possível, a fim de evitar procedimentos desnecessários, gastos elevados e devem ser possíveis de se realizar em grande escala. As especificidades da amostra também devem ser levadas em consideração, tais como a natureza do vegetal, os tamanhos das partículas, o tempo de contato entre o solvente e o material vegetal, a temperatura ideal, entre outros (RODRÍGUEZ-PÉREZ et al., 2015; VONGSAK et al., 2013).

Os processos de extrações até então mais comuns são os chamados de extração convencional, onde envolvem o uso de solventes na extração dos compostos, porém, pesquisas com solventes “verdes” vêm sendo desenvolvidas visando à substituição do hexano, por exemplo, por alternativas menos prejudiciais ao ambiente. Entretanto, nos últimos anos, alguns trabalhos revelaram que mesmo os solventes considerados inofensivos, como são o caso do etanol, apresentavam níveis de toxicidade, sendo justificados estudos com novas tecnologias de extração (CARVALHO et al., 2018) em meio aquoso.

3.1.5.1 Extração não convencional

Os métodos que se destacam na extração de compostos bioativos não convencionais são: utilização de solventes não convencionais, extração por pressão negativa, extração supercrítica com CO₂, extração líquida pressurizada, extração com água subcrítica, extração assistida por ultrassom, extração enzimática e extração por membranas filtrantes (CARVALHO et al., 2018).

Os métodos aplicados nesse estudo foram a extração por ultrassom e a extração assistida por enzimas. A extração por ultrassom utiliza a energia das ondas ultrassônicas (mecânicas) que são transmitidas em frequência superior ao limite audível do limite humano, numa frequência acima de 20khz. Estas ondas sonoras criam uma única vibração, que causa

variação na pressão do meio líquido, gerando cavitação. A ciência do ultrassom se divide em duas áreas: alta e baixa potência. A extração assistida por ultrassom, possibilita a extração, por colapsar as paredes celulares e facilitar a penetração do solvente, resultando em concentrações mais altas de polifenóis e melhor atividade antioxidante, quando comparada com a métodos convencionais (PORTO et al., 2013). O rendimento da extração assistida por ultrassom pode variar de acordo com tempo, intensidade das ondas ultrassônicas e temperatura. O ultrassom é uma alternativa para ser utilizado em extrações com matérias-primas de baixo custo, por aumentar o rendimento da extração em até 60%, em condições com menos solvente e tempo (GOULA et al., 2013).

A extração assistida por enzimas, tem como premissa a hidrólise do material vegetal, considerando a especificidade da enzima pelo substrato, neste caso, a matriz vegetal. Há pouca probabilidade de ocorrer reações indesejadas que resultem na formação de produtos tóxicos, além da extração ser conduzida em condições mais brandas (SARMADI et al., 2010). A produção de materiais solúveis que constituem o produto da hidrólise depende de diversos fatores, tais como, reagentes químicos, tipo de enzima, substrato, pH, temperatura, tempo de incubação e concentração da enzima (MARTINS et al., 2009). A enzima utilizada precisa estar no pH ótimo para não prejudicar o processo de hidrólise, para assim obter um produto de qualidade e com rendimento satisfatório (BENÍTEZ et al., 2008).

As celulasas, são enzimas que constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares. Esse complexo é composto por: endoglucanases que clivam as ligações internas das fibras celulares, as exoglucanases, que atuam na região externa da celulose e a β -glicosidades que são responsáveis pela hidrólise de oligossacarídeos solúveis em glicose, por ser um complexo de enzima, cada enzima atua na parte de maior afinidade da planta, realizando as clivagens (GAETE et al., 2020).

3.2 Acoplamento molecular e estudos *in silico*

O acoplamento molecular, *docking* molecular ou simplesmente *docking*, é o processo de encontrar o melhor ajuste para o encaixe entre duas moléculas. Inicialmente esta busca era realizada visualizando as moléculas em programas gráficos, onde se tentava manualmente obter o melhor ajuste para as duas formarem um complexo (VEJA-TEJIDO et al., 2006). Nos processos atuais, há vários programas e plataformas que permitem realizar essa busca de forma mais automatizada. Normalmente uma molécula é chamada de receptor (proteínas, enzimas, DNA, etc.) e a outra molécula é chamada de ligante (em geral, uma pequena

molécula). O *docking* é um método de simulação computacional no qual se pretende avaliar a formação de complexos receptor-ligante. Os cálculos de *docking* têm sido utilizados tendo como objetivos fazer *screening* virtual e/ou se entender mecanismos de reação (CUNHA et al., 2006; CARACELLI et al., 2017). O processo de *docking* pode ser dividido em quatro etapas. A primeira delas é o planejamento do experimento *in silico*, ou seja, a escolha dos receptores e ligantes a serem empregados no estudo. A segunda etapa é a seleção do sítio de ligação e raio da esfera de trabalho, que serão essenciais para determinar a região específica em que a melhor colocação do ligante deverá ser buscada. A terceira etapa envolve a realização do experimento computacional com objetivo de formar complexos entre ligante e proteína. Para a validação do experimento, ou seja, para a determinação dos parâmetros a serem utilizados nos cálculos, se realiza o procedimento conhecido como redocking, que é a reprodução da estrutura do complexo cristalográfico ligante-proteína utilizando o *docking* molecular. Por fim, na quarta etapa, avaliam-se os resultados obtidos no experimento, levando em conta as poses em tela gráfica, os escores resultantes dos cálculos, mas fundamentalmente, o pesquisador deverá fazer uma análise detalhada das interações receptor-ligante, utilizando telas gráficas, e sua correlação com dados experimentais (CARACELLI et al., 2017).

Portanto no *docking* molecular, possíveis moléculas bioativas são testadas para um determinado alvo molecular a fim de estabelecer qual, ou quais, delas apresentam melhor acomodação ao sítio ativo do alvo. Os resultados obtidos nos ensaios computacionais são dados em termos da energia de ligação necessária para que a provável molécula bioativa se ligue ao sítio ativo do alvo molecular selecionado. Dessa forma, a molécula que apresentar menor quantidade de energia necessária para se ligar ao sítio ativo, será aquela que, teoricamente, apresentará melhor resultado de atividade biológica (GUIDO et al., 2012).

CAPÍTULO II

Artigo: Perfil fitoquímico e efeitos inibitórios de extratos das folhas de *Campomanesia xanthocarpa* obtidos por meio das extrações assistida por enzimas e por ultrassom: estudos *in vitro* e *in silico*.

1. Introdução

Campomanesia xanthocarpa Berg. (Myrtaceae), popularmente conhecida como “guabiroba”, “gabiroba”, “guabirova”, “guavirova”, “gavirova”, “araçá-congonha” ou “gabiraba”, é uma espécie comum de florestas das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, e encontrada na Argentina, Paraguai e Uruguai. Suas folhas são utilizadas tradicionalmente na forma de infusão, para uma série de enfermidades, como no manejo do *Diabetes mellitus* tipo 2 (KLAFKE et al., 2010; CZAIKOSKI et al., 2015) diarreias, reumatismo e para baixar os níveis de colesterol no sangue. Populações indígenas e rurais usam folhas e frutos de guabirobeira para tratar problemas do trato urinário, devido a atividade antimicrobiana (RAPHAELLI et al., 2021). Essa planta tem considerável potencial como fonte alternativa de vitamina C e compostos fenólicos (ANZOLLIN et al., 2021). Estudos químicos das folhas de *C. xanthocarpa* relataram o isolamento de quercetina, miricetina, quercitrina e rutina (MARKMAN et al., 2004).

Até o início do século XX, praticamente todos os medicamentos eram derivados de fontes naturais, na maioria das vezes de plantas, que continuam a servir como fontes de novos medicamentos e a fornecer compostos para o desenvolvimento de drogas (SETZER et al., 2016). A atividade antimicrobiana e o manejo do *Diabetes mellitus* tipo 2, já extensivamente relatados na literatura para a *C. xanthocarpa* Berg., ainda carecem de informações mais específicas. Estas informações podem ser obtidas por meio da associação de abordagens de estudo, como estudos *in vitro* e *in silico*. A predição *in silico* e estudos de acoplamento molecular, dos principais constituintes químicos, são realizados para apoiar os resultados experimentais (ALSARAF et al., 2020).

O surgimento de microrganismos patogênicos com maior resistência aos antibióticos já existentes, motiva estudos para descoberta de novos agentes antimicrobianos. Na descoberta de agentes antibacterianos complementares, fitoquímicos que mostram atividade antibacteriana podem ser examinados quanto à inibição potencial de proteínas-alvo (SETZER et al., 2016). A diidrofolato redutase é a enzima responsável pela redução dependente de NADPH de 5,6-diidrofolato a 5,6,7,8-tetraidrofolato, um cofator essencial na síntese de purinas, timidilato, metionina e outros metabólitos importantes. Devido à sua importância em múltiplas funções celulares, esta enzima é estudada em muitas pesquisas envolvendo antibacterianos e antimicrobianos (HEASLET et al., 2009). A DNA girase B pertence ao grupo das topoisomerasas do tipo IIA, que clivam e religam o DNA para regular a topologia do DNA e são uma classe importante de alvos de drogas antibacterianas e anticâncer (BAX et

al., 2010). A heptaprenil difosfato sintase é a proteína envolvida na formação da menaquinona, um importante transportador de elétrons em muitas bactérias, incluindo patógenos, portanto, sua estrutura é de interesse no contexto do desenvolvimento de inibidores da biossíntese de menaquinona como potenciais antibióticos (DESAI et al., 2016).

O *Diabetes mellitus* (DM) é um grupo de distúrbios metabólicos causados por complexas interações entre fatores genéticos e de estilo de vida ou ambientais (CHEN et al., 2019). Em 2019, de acordo com a Federação Internacional de Diabetes, cerca de 4,2 milhões de mortes foram atribuídas aos altos níveis de glicose no sangue. Portanto, o uso terapêutico de antioxidantes no tratamento e prevenção de complicações diabéticas tem sido considerado (MISSIOUI et al., 2021). Uma das estratégias eficazes para o controle do Diabetes tipo 2 é a inibição da hidrólise de polissacarídeos complexos pela α -amilase pancreática e a limitação da absorção de glicose pela inibição da enzima α -glucosidase intestinal (STOJKOVIC et al., 2019). Muitos estudos têm procurado inibidores eficazes e seguros de α -amilase e α -glucosidase (MISSIOUI et al., 2021), a partir de extratos de plantas. Os medicamentos usados atualmente como inibidores reversíveis de α -amilase e α -glucosidase para o tratamento de pacientes diabéticos apresentam efeitos colaterais como distensão abdominal, flatulência e diarreia (STOJKOVIC et al., 2019).

Portanto, o objetivo com a pesquisa foi apresentar o perfil fitoquímico de extratos das folhas de Guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa*) obtidos por meio das extrações assistida por enzimas e por ultrassom e determinar seu efeito inibitório contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e contra enzimas vinculadas a digestão de amido e associadas ao *Diabetes mellitus* tipo 2, utilizando abordagens *in vitro* e *in silico*.

2. Material e Métodos

2.1 Coleta e preparação das folhas

As folhas da guabirobeira (*C. xanthocarpa*) foram coletadas, no mês de agosto de 2019 (inverno no hemisfério Sul), no município de Chapecó (Latitude: -27.0968, Longitude: -52.6186, 27° 5' 48" Sul, 52° 37' 7" Oeste), do Estado de Santa Catarina, Brasil) em uma única planta. A planta se encontra em área urbana (Fig. 3a) em solo do tipo vermelho escuro sem uso de nutrição, possui altura de, aproximadamente, três metros e 10 anos de idade, estando completamente exposta a insolação diária (céu aberto). As folhas selecionadas das partes internas e externas dos galhos, sendo que os galhos usados foram da copa e ao longo do tronco, passaram por um processo de pré-seleção manual, sendo descartadas as folhas

danificadas, com coloração diferenciada e com patologias, ficando apenas uma amostra uniforme. As folhas (Fig. 3b) foram lavadas com água destilada e secas em estufa de circulação de ar a 21°C durante 72 h, moídas em liquidificador industrial, peneiradas (abertura de malha de 20 Mesh) e armazenadas sob refrigeração (10°C) e no escuro, para posterior obtenção dos extratos aquosos. Uma amostra está armazenada no Herbário Lages da Universidade do Estado de Santa Catarina (LUSC).

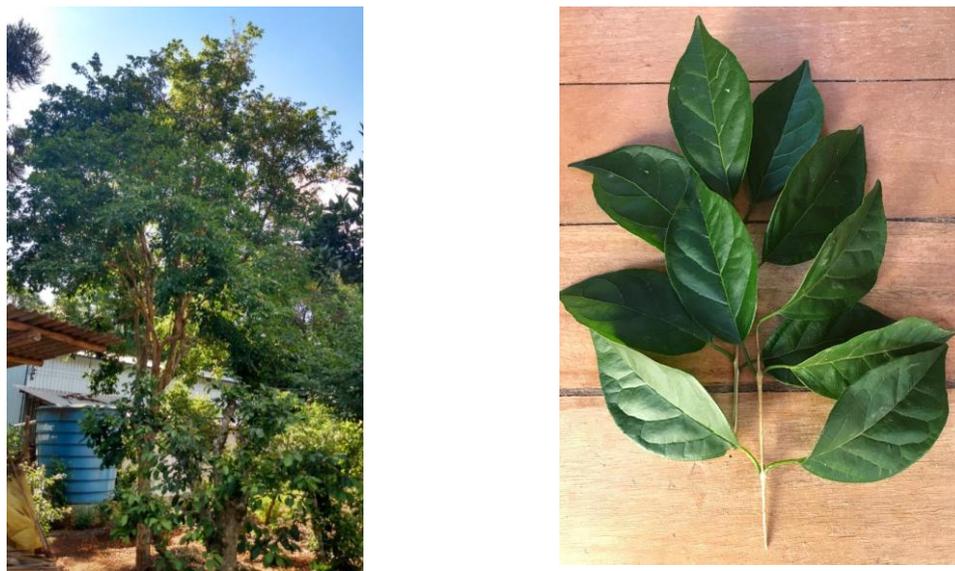


Figura 3- Aspecto visual da árvore (a) e folhas (b) da *Campomanesia xanthocarpa*.

2.2 Obtenção dos extratos aquosos

A extração assistida por enzimas e a extração por ultrassom foram utilizadas para a obtenção dos extratos aquosos das folhas de *C. xanthocarpa*, de acordo com Dacoreggio et al. (2019), com modificações nas quantidades, a partir de testes prévios. Para a obtenção dos extratos pela extração assistida por enzimas, foi utilizado um complexo de celulases (NS 22086, Novozymes®, 1,000 BHU (2) g⁻¹). O meio reacional (pH 5,55), foi composto por 15 g das folhas moídas e peneiradas, 100 mL de água destilada e 5% (m v⁻¹) do complexo de enzimas. O meio foi incubado a 45°C e 100 rpm, por 2 h. Para a obtenção dos extratos pela extração por ultrassom, o meio, foi composto de 15 g das folhas moídas e peneiradas e 100 mL de água destilada, sendo levadas?? ao ultrassom de baixa frequência (70 W) por 6 h. Ambas as extrações foram conduzidas ao abrigo da luz, e, após os processos de extração, os meios foram centrifugados a 4.000 rpm por 6 min. Os sobrenadantes foram chamados de WE e WU, que correspondem aos extratos obtidos por meio da extração assistida por enzimas e por meio da extração com ultrassom, respectivamente. WE e WU foram liofilizados -60 °C e

0,05 mTorr por 28 h. Os liofilizados oriundos das extrações foram diluídos em água destilada, de acordo com a concentração desejada, para a cada ensaio.

2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para verificar o rompimento da estrutura da folha da Guabirobeira pelo complexo de enzimas e pelo ultrassom, os sólidos derivados das extrações (obtidos na etapa de centrifugação) foram previamente secos por liofilização a $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 0,05 mTorr, por 48 h. Foram obtidas fotomicrografias por microscopia eletrônica de varredura (Microscópio Philips, modelo XL30). O ouro recoberto foi obtido com o sistema de aspersão BAL-TEC Sputter Coater, modelo SCD 005, por 120s. O revestimento em ouro foi realizado em um sistema de revestimento por aspersão BAL-TEC Sputter Coater, modelo SCD 005, por 120s.

2.4 Análise cromatográfica dos compostos fenólicos (LC-MS/MS)

As análises quantitativas dos compostos fenólicos foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Seraglio et al. (2016). As determinações de *cromatografia líquida* acoplada à *espectrometria de massas em Tandem* (LC-ESI-MS/MS) foram realizadas em um sistema cromatográfico Agilent 1290 series (Agilent Technologies, Wilmington, DE, EUA) acoplado a um espectrômetro de massa de armadilha iônica quadrupolo híbrido QTRAP 5500 (Sciex, Foster City, CA) equipado com uma fonte de ionização por electrospray (ESI). A separação cromatográfica foi obtida usando uma coluna VENUSIL C18 (100 mm \times 2,1 mm; diâmetros de partícula de 3 μm ; Bona Angela Technologies, Wilmington, DE, EUA). A vazão adotada foi de 300 $\mu\text{L min}^{-1}$, e um volume de 5 μL foi injetado para todas as soluções padrão e de amostra. A fase móvel foi composta pelo solvente A (água com 0,1% FA) e solvente B (ACN com 0,1% FA). O gradiente de fase móvel foi programado da seguinte forma: 98% A (v v^{-1}) de 0 a 4 min, 98-80% A (v v^{-1}) de 4 a 7 min, 80-10% A (v v^{-1}) de 7 a 14 min, 10% A (v v^{-1}) de 14 a 15 min, 10-98% A (v v^{-1}) de 15 a 17 min. O tempo total de execução foi de 17 min, e o tempo de equilíbrio da coluna entre cada execução foi de 4 min. A coluna foi mantida a 40°C .

2.5 Efeitos inibitórios *in vitro*

2.5.1 Efeito inibitório contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas

Quatro cepas de bactérias, duas Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 2592 e *Listeria monocytogenes* Scott A) e duas Gram-negativas (*Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 e *Escherichia coli* ATCC 25922) foram usadas como indicadores para avaliar o efeito inibitório dos extratos no crescimento dos microrganismos, segundo Ostrosky et al. (2008) e

B. Oliveira et al. (2016). As culturas patogênicas foram recuperadas em caldo BHI e incubadas a 36°C, *over night*. As culturas foram padronizadas na concentração de 0,5 da escala de McFarland (equivalente a 10^8 unidades formadoras de colônias por mililitro – CFU mL⁻¹) e diluídas em água peptonada de caseína até a concentração de 10^5 CFU mL⁻¹. Foram utilizadas duas metodologias: difusão em disco e concentração inibitória mínima (MIC).

Para a difusão em disco, os microrganismos foram inoculados, por meio de *swabs*, em placas contendo Ágar Müller-Hinton. Em seguida, três discos estéreis de papel de filtro Whatmann de 6 mm de diâmetro foram adicionados a cada placa. Nos discos de papel foram adicionados 15 µL dos extratos WE e WU, em separado. Para o controle negativo, foi utilizada água destilada estéril. As placas foram incubadas durante 24 h a $35 \pm 1^\circ\text{C}$. Os diâmetros dos halos de inibição foram medidos com paquímetro e o resultado expresso em milímetros (mm). Quanto maior a atividade antimicrobiana, maior efeito inibitório exerce o extrato e maior será o halo de inibição contra os microrganismos testados.

Os extratos que apresentaram inibição do crescimento, ou seja, halo de inibição, foram submetidos à determinação da MIC, em placa estéril de 96 poços. Diluições seriadas dos extratos foram realizadas em caldo BHI e 100 µL de uma suspensão bacteriana em BHI foram adicionados a cada poço. Poços de controle negativo (contendo o BHI e 200 µl de extrato sem a suspensão bacteriana) e poços de controle positivo (contendo o BHI e a suspensão bacteriana) e também foram preparados. As placas foram incubadas durante 18 h a 37°C, sem agitação. Passado o tempo, 10 µL de resazurina a 3% foram adicionados e deixados por mais 2h na incubadora a 37°C. A MIC foi definida como a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento visível das bactérias. Todos os testes foram realizados em triplicata.

2.5.2 Efeito inibitório contra α -amilase e α -glucosidase (enzimas digestivas)

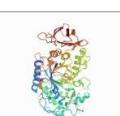
O ensaio inibidor da α -amilase (tipo IX-A, em pó, atividade de 1,000-3,000 U mg⁻¹, Sigma-Aldrich) foi realizado de acordo com o método de Ademiluyi et al. (2013), com modificações. Em tubos de ensaio, foram adicionados 125 µL de WE ou WU em diferentes concentrações (5, 25, 50, 100, 250 e 500 µg mL⁻¹) e em separado, e 125 µL da solução de α -amilase (0,5 mg mL⁻¹) preparada em tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 6,9). O conteúdo de cada tubo foi pré-incubado a 25°C por 10 min. Foram adicionados 125 µL de solução de amido de milho a 1% em tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 6,9) e as misturas reacionais foram incubadas a 25°C durante 10 min. A reação foi interrompida pela adição de 250 µL do reagente DNS e, posteriormente, incubada em água fervente por 5 min e resfriada à

temperatura ambiente. O conteúdo de cada tubo de ensaio foi diluído em 2,5 mL de água destilada e a absorbância lida a 540 nm em espectrofotômetro. O controle foi preparado usando o mesmo procedimento, com a substituição do extrato pelo tampão fosfato de sódio. O ensaio inibidor da α -glucosidase (de *Saccharomyces cerevisiae*, Tipo I, em pó, atividade ≥ 10 U mg^{-1} utilizando p-nitrofenil- α -D-glucosídeo como substrato, Sigma-Aldrich) foi realizado de acordo com o método descrito por Apostolidis et al. (2007). Foram misturados 50 μL de WE e WU em diferentes concentrações (5, 25, 50, 100, 250 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e em separado, com 100 μL de enzima (1 U mL^{-1} em tampão fosfato de sódio a 0,1 M pH 6,9) e incubados durante 10 min., a 25°C. Foram adicionados 50 μL de pNPG (5 mM) e as amostras foram incubadas durante 5 min a 25°C. A absorbância foi lida a 405 nm em espectrofotômetro. O controle continha 50 μL de solução tampão no lugar do extrato. As inibições da α -amilase e a da α -glucosidase, foram expressas em % de inibição, e calculadas pela diferença entre a absorbância do controle e absorbância da amostra dividida pela absorbância do controle, vezes cem.

2.6 Efeitos inibitórios *in silico*

O estudo *in silico* dos efeitos inibitórios contra bactérias patogênicas e enzimas digestivas dos compostos fenólicos identificados nos extratos WE e WU foi realizado por meio do acoplamento molecular. As proteínas alvo (**Tab.2**), estruturas de enzimas específicas, foram obtidas do *Protein Data Bank* (www.pdb.org), sendo especificados os seus respectivos códigos: PDB:num. Para a inibição contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, foram selecionados três alvos antibacterianos e para inibição contra enzimas vinculadas a digestão de amido e associadas ao *Diabetes mellitus* tipo 2, foram selecionados dois alvos. O acoplamento molecular foi realizado por *docking* rígido contra as moléculas alvo por meio do DockThor (<https://www.dockthor.lncc.br/v2/>).

Tabela 2: Proteínas-alvo utilizadas no estudo in-silico da inibição de enzimas digestivas e bacterianas por compostos fenólicos presentes em extratos de folhas de *Campomanesia xanthocarpa*.

efeito inibitório	Enzima/Proteína Alvo	Código PDB	Classificação	Peso da Estrutura (kDa)	Organismo	Estrutura 3D	Referência
Bactéria Gram-positiva e Gram-negativa	Diidrofolato redutase	2W9T	Oxidoredutase	37	<i>Staphylococcus aureus</i>		Heaslet et al. (2009)
	DNA girase B	4KTN	Isomerase	24.25	<i>Enterococcus faecalis V583</i>		Bensen et al. (2013)
	Heptaprenil difosfato sintase	5H9D	Transferase	121.34	<i>Staphylococcus aureus</i>		Desai et al. (2016)
Enzimas Digestivas	α -amilase	1C8Q	Hydrolase	56.03	<i>Homo sapiens</i>		Ramasubbu et al. (2001)
	α -glucosidase	2QMJ	Hydrolase	101.02	<i>Homo sapiens</i>		Sim et al. (2008)

A energia total de ligação foi estudada, excluindo apenas a região hidrofóbica e a ligações fracas. Não foram utilizados cofatores. Os ligantes foram preparados sem e com a adição de hidrogênio. Os parâmetros fixados para a análise do resultado do acoplamento foram RMSD para confirmadores de cluster igual a 2 e números de modo de ligação igual a 3. Os ligantes mais adequados foram selecionados com base em sua energia de ligação (SINGH et al. 2021), sendo apresentada a menor energia de livre ligação (kcal mol^{-1}). As melhores dez respostas de acoplamento, tomando como base as menores energias livres de ligação, foram apresentadas em ordem de classificação da menor energia livre de ligação (melhor resposta) para a maior energia livre de ligação. As figuras correspondentes à melhor resposta de acoplamento (proteína alvo e ligante), ou seja, da menor energia livre de ligação, foram apresentadas demonstrando a região da proteína alvo ligante melhor se acopla.

2.7 Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando o Statistica® 13.3, realizando as análises de variância (ANOVA) e a diferença entre as médias foi avaliada utilizando o teste de Tukey, com 95% de confiabilidade ($P < 0.05$).

3. Resultados e Discussão

3.1 Perfil fitoquímico e MEV

O perfil fitoquímico dos extratos das folhas *C. xanthocarpa* (**Tab.3**) mostra que os compostos fenólicos em maior quantidade, para ambos os extratos, são do grupo dos ácidos fenólicos (ácido benzóico, ácido protocatecuico, ácido gálico, ácido clorogênico e ácido 2,5-dihidroxibenzoico) e do grupo dos flavonóides, subgrupo flavonóis (isoquercetina, rutina, quercetina e o kaempferol). Para a maioria dos compostos, os quantitativos de WE são superiores e diferentes, estatisticamente ($P < 0,05$) quando comparados a WU, demonstrando que o processo de extração, pode afetar no conteúdo individual de cada componente. Células vegetais possuem uma parede rígida, composta basicamente de celulose associada a outros polissacarídeos como hemicelulose e pectina. A hidrólise enzimática pode ter sido mais efetiva na ruptura desta estrutura, o que facilita a transferência dos compostos intracelulares (RADICE et al., 2016). Na extração realizada nesta pesquisa, foi utilizado um complexo de celulasas composto por endoglucanase, exoglucanase e β -glucanase (ZHOU et al., 2021), o que pode favorecer a maior liquefação da celulose e a maior disponibilização de compostos fenólicos no meio reacional. O ultrassom, no que se refere às extrações em tecidos vegetais, pode facilitar a dilatação e hidratação do material e causar alargamento dos poros da parede celular, e, ocasionalmente, romper a parede celular (R. OLIVEIRA et al., 2016), o que pode justificar as menores concentrações obtidas para alguns compostos, comparados a extração assistida por enzimas.

Tabela 3: Perfil fitoquímico do extrato aquoso das folhas de *Campomanesia xanthocarpa* obtido por extração enzimática (WE) e extração ultrassônica (WU).

Composto Fenólico	Nome na IUPAC	CIDPubChem	Fórmula Molecular	Concentração ± SD (mg Kg ⁻¹)	
				WE	WU
2,5-DHBA	2,5-Dihydroxybenzoic acid	3469	C ₇ H ₆ O ₄	34.23 ± 1.646 ^A	23.84 ± 3.143 ^B
3,4-DHB	(2,3-dihydroxy-4-methylsulfonyloxybutyl) methanesulfonate	9296	C ₆ H ₁₄ O ₈ S ₂	13.61 ± 0.113 ^A	10.04 ± 0.887 ^B
Ácido Cafeíco	(E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)prop-2-enoic acid	689043	C ₉ H ₈ O ₄	3.98 ± 0.147 ^A	1.87 ± 0.191 ^B
Ácido Clorogênico	(1S,3R,4R,5R)-3-[(E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)prop-2-enoyl]oxy-1,4,5-trihydroxycyclohexane-1-carboxylic acid	1794427	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	39.65 ± 0.977 ^A	35.59 ± 0.252 ^A
Ácido Gálico	3,4,5-trihydroxybenzoic acid	370	C ₇ H ₆ O ₅	63.80 ± 3.363 ^A	69.72 ± 14.871 ^A
Ácido Protocatecuico	3,4-dihydroxybenzoic acid	72	C ₇ H ₆ O ₄	150.0 ± 0.0019 ^A	102.5 ± 0.0044 ^B
Ácido Sinápico	(E)-3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)prop-2-enoic acid	637775	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	0.41 ± 0.094 ^A	0.38 ± 0.069 ^A
Ácido Siringico	4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoic acid	10742	C ₉ H ₁₀ O ₅	0.32 ± 0.094 ^A	0.20 ± 0.051 ^B
Ácido Benzóico	Benzoic acid	243	C ₇ H ₆ O ₂	271.90 ± 24.260 ^A	3.87 ± 0.289 ^B
Ácido Salicílico	2-hydroxybenzoic acid	338	C ₇ H ₆ O ₃	4.04 ± 0.375 ^A	2.64 ± 0.189 ^B
Ácido Ferulico	(E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)prop-2-enoic acid	445858	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	4.30 ± 0.393 ^A	2.81 ± 0.222 ^B
Apigenina	5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chromen-4-one	5280443	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	0.07 ± 0.007 ^A	0.06 ± 0.003 ^B
Catequina	(2R,3S)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-chromene-3,5,7-triol	9064	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	1.13 ± 0.084 ^A	1.16 ± 0.129 ^A
Coniferaldeído	(E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)prop-2-enal	5280536	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	0.08 ± 0.032 ^A	0.05 ± 0.009 ^B
Cumarina	Chromen-2-one	323	C ₉ H ₆ O ₂	0.04 ± 0.015 ^A	0.02 ± 0.012 ^B
Epicatequina	(2R,3R)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-chromene-3,5,7-triol	72276	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	1.20 ± 0.077 ^A	1.29 ± 0.196 ^A
Galangina	3,5,7-trihydroxy-2-phenylchromen-4-one	5281616	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	0.07 ± 0.007 ^A	0.06 ± 0.002 ^B
Galato de Epigolocatequina	[(2R, 3R) -5,7-dihidroxi-2- (3,4,5-trihidroxifenil) -3,4-dihidro-2H-cromen-3-il] 3,4,5-trihidroxibenzoato	65064	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁	0.21 ± 0.101 ^A	0.20 ± 0.066 ^A
Isoquercetrina	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxochromen-4-one	5280804	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	57.75 ± 0.935 ^A	56.59 ± 1.8246 ^A

Isorhamnetina	3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)chromen-4-one	5281654	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	3.45 ± 0.581 ^A	2.59 ± 0.106 ^B
Kaempferol	3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chromen-4-one	5280863	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	18.55 ± 1.013 ^A	14.23 ± 2.723 ^A
Luteolina	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxychromen-4-one	5280445	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	0.01 ± 0.002 ^A	0.01 ± 0.005 ^A
Naringina	(2 <i>S</i>)-7-[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)-3- [(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxyoxan-2- yl]oxy-5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-2,3-dihydrochromen-4-one	442428	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	0.05 ± 0.001 ^A	0.05 ± 0.002 ^A
Ácido p-cumárico	(<i>E</i>)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoic acid	637542	C ₉ H ₈ O ₃	7.67 ± 0.240 ^A	2.01 ± 0.028 ^B
Pinocembrina	(2 <i>S</i>)-5,7-dihidroxi-2-fenil-2,3-dihidrocromen-4-ona	68071	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	0.56 ± 0.064 ^A	0.59 ± 0.133 ^A
Quercetina	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-one	5280343	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	21.31 ± 0.745 ^A	17.72 ± 2.530 ^A
Rutina	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3-[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5- trihydroxy-6-[[<i>(2R,3R,4R,5R,6S)</i> -3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan- 2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxychromen-4-one	5280805	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	39.12 ± 1.363 ^A	34.43 ± 3.603 ^A
Sinaldeído	(<i>E</i>)-3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)prop-2-enal	5280802	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	0.56 ± 0.117 ^B	0.62 ± 0.063 ^A
Siringaldeído	4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde	8655	C ₉ H ₁₀ O ₄	0.28 ± 0.046	0.28 ± 0.015
Taxifolina	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-2,3- dihydrochromen-4-one	439533	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	0.26 ± 0.029	<LD
Ácido -Aminobenzoico	4-Aminobenzoic acid	978	C ₇ H ₇ NO ₂	0.14 ± 0.064	<LD
Hesperidina	(2 <i>S</i>)-5-hydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-7- [(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-[[<i>(2R,3R,4R,5R,6S)</i> -3,4,5- trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxy-2,3- dihydrochromen-4-one	10621	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	<LD	0.17 ± 0.052
4-metilumbeliferona	7-hydroxy-4-methylchromen-2-one	5280567	C ₁₀ H ₈ O ₃	<LD	<LD
Ácido Vanílico	4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid	8468	C ₈ H ₈ O ₄	<LD	<LD
3,5-DNB	<i>N</i> -[2-(4-methoxyphenoxy)ethyl]-3,5-dinitrobenzamide	580264	C ₁₆ H ₁₅ N ₃ O ₇	<LD	<LD
2,4-DHBA	2,4-dihydroxybenzoic acid	1491	C ₇ H ₆ O ₄	<LD	<LD
Crisina	5,7-dihidroxi-2-fenilcromen-4-ona	5281607	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	<LD	<LD
Pinobanksina	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-3,5,7-trihydroxy-2-phenyl-2,3-dihydrochromen-4-one	73202	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	<LD	<LD
Naringenina	5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-2,3-dihydrochromen-4-one	932	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	<LD	<LD

SD = Desvio Padrão. As médias seguidas de letras diferentes, na linha, diferem estatisticamente, com nível de confiança de 95%..

A microscopias das amostras das folhas, e dos resíduos sólidos obtidos após as extrações assistida por enzimas e por ultrassom (Fig.4) mostram que houve uma alteração na estrutura foliar com as extrações. Na imagem (a), verifica-se a existência das nervuras em rede, o que já não é visualizado nas imagens (b) e (c). Ainda, comparando as últimas, observa-se também que a estrutura da folha advinda da extração assistida por enzimas está menor e com as extremidades com aspecto caracterizado pela hidrólise, ou seja, com várias regiões irregulares onde é visível a ação enzimática. Na imagem (c), verifica-se que a estrutura está mais próxima a imagem de (a), porém sem as nervuras aparentes, o que demonstra que houve ação do ultrassom nesta amostra.

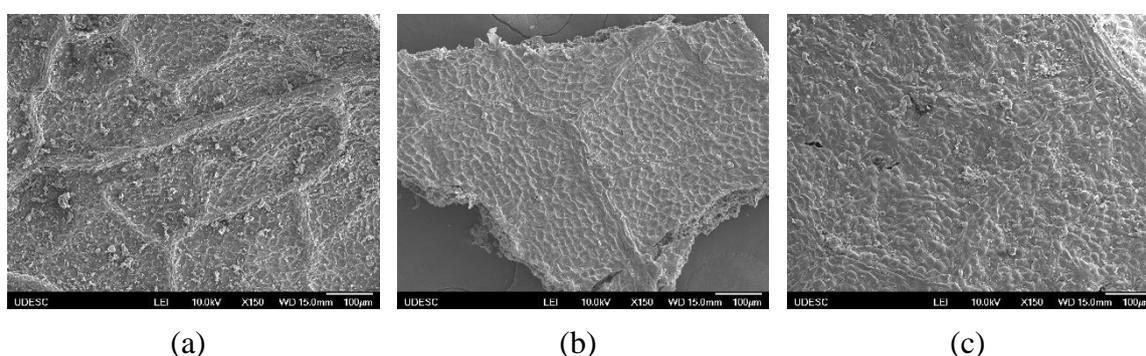


Figura 4- Microscopias, com aumento de 150X, da folha (a), resíduo da extração assistida por enzimas, (b) e resíduo da extração por ultrassom (c).

3.2 Inibição do crescimento de bactérias pelos extratos WE e WU

A crescente preocupação com a resistência microbiana, frente aos antimicrobianos já existentes, vêm motivando estudos que demonstram que frações de inúmeras plantas, como as da família Myrtaceae, podem apresentar atividade antimicrobiana (SIMONETTI et., 2016). Para o estudo *in vitro*, os extratos WE e WU das folhas de *C. xanthocarpa* levaram à inibição do crescimento de *Salmonella* Enteritidis (halos médios de inibição de 11,5 cm para WE e 12 cm para WU), *L. monocytogenes* (halos médios de inibição de 11,5 cm para WE e 11,7 cm para WU) e *E. coli* (halos médios de inibição de 10 cm para WE e 12 cm para WU). Para a *L. monocytogenes* e *E. coli*, a concentração inibitória mínima foi de $9,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ e para a *Salmonella* Enteritidis, foi de $125 \mu\text{g mL}^{-1}$. Não houve diferença estatística entre as respostas obtidas com o uso dos extratos WE e WU, portanto, neste caso, o método de extração não influenciou na inibição do crescimento bacteriano, indicando que a

diferença quantitativa obtida para alguns compostos dos extratos não afeta esta resposta. A classificação estabelece que os extratos com halos de inibição < 9 mm são classificados como inativos; de 9 a 12 mm são parcialmente ativos, de 13 a 18 mm são ativos e, > 18 mm são muito ativos (B. OLIVEIRA et al., 2016), estando WE e WU classificados como parcialmente ativos, com base no tamanho do halo. Com relação aos valores do MIC, atividade antibacteriana de extratos de plantas pode ser considerada significativa quando os valores de MIC são inferiores a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, moderada quando $\text{MIC} < \mu\text{g mL}^{-1}$ e baixa quando $\text{MIC} > \mu\text{g mL}^{-1}$ (TCHINDA et al., 2017), estando WE e WU na faixa significativa para *L. monocytogenes* e *E. coli* e na faixa moderada para *Salmonella* Enteritidis. Resultado semelhante foi relatado por Dacoreggio et al. (2019), onde as atividades antimicrobianas para *L. monocytogenes* e *E. coli* não apresentaram diferença quando utilizados os extratos das folhas de inverno de *Psidium cattleianum* sabine, obtidos por meio da extração assistida por enzimas e da extração por ultrassom. Diversos são os estudos constantes na literatura a respeito dos compostos extraídos de partes de plantas da família Myrtaceae, principalmente das folhas e frutos, sendo a atividade antimicrobiana, uma das principais atividades determinadas. Muitos extratos vegetais que possuem atividade antimicrobiana têm este potencial atribuído à presença de compostos fenólicos que podem reagir com a membrana celular bacteriana, inativando enzimas essenciais para o metabolismo da célula (MEDINA et al., 2011).

A capacidade antimicrobiana das catequinas e seus derivados, presentes em WE e WU, ocorre sobre a membrana bacteriana, devido a estes compostos serem adsorvidos na superfície da membrana, o que causa sua deterioração e sua ruptura. A ação das catequinas sobre bactérias Gram-positivas, pode estar relacionada com o aumento da carga negativa no exterior da membrana externa (KAJIYA et al., 2004). Uma catequina de grande importância, sob o ponto de vista médico, é a galato de epigallocatequina (EGCG) que vem apresentando um forte poder anti-inflamatório, antioxidante, anti-carcinogênico, elevado poder antimicrobiano (combatendo e prevenindo infecções), e demonstrando sinergismo com vários antibióticos (DAS et al., 2014; ABDOULMAGD et al., 2011). A EGCG, que é carregada negativamente, se liga à membrana celular de bactérias, que é carregada positivamente, impossibilitando a ligação da bactéria em células hospedeiras ou em outras bactérias, impedindo a formação de biofilme e liberação de toxinas, levando à lise celular (STAPLETON et al., 2007; REYGAERT, 2018). O Kampeferol e a Quercetina exerceram atividade inibitória compatível contra os radicais hidroxila, este resultado implica que di-OH no anel benzóico torna os

compostos mais potentes como inibidores de explosões oxidativas. Números maiores ou menores de frações OH diminuiriam a atividade, esse fato pode ser explicado devido aos efeitos combinatórios, incluindo a inibição da atividade da NADPH oxidase e eliminação de radicais livres (WANG et al, 2006).

Os compostos fitoquímicos identificados nos extratos foram utilizados no estudo *in silico*, visando verificar quais poderiam estar vinculados a inibição ocorrida no estudo *in vitro*. Pode ser visto na Tabela 4 os valores de energia livre de ligação dos compostos fenólicos (ligantes) presentes nos extratos de folhas de *C. xanthocarpa* com as proteínas-alvo associadas à inibição do crescimento bacteriano, com e sem a adição de hidrogênio à molécula do ligante. Observa-se que todos os ligantes, apresentaram baixos valores de energia de ligação, o que significa que ocorre uma interação entre a enzima (proteína-alvo) e a molécula fitoquímica. Contudo, os valores variam de, aproximadamente, -8 a -5 kcal mol⁻¹, indicando que algumas moléculas possuem maior afinidade de ligação pela proteína-alvo, mas que todas podem ter contribuído para a inibição *in vitro*, uma vez que os resultados obtidos na sua totalidade podem ser considerados satisfatórios.

O efeito dos compostos fenólicos na atividade enzimática está positivamente correlacionado com sua afinidade de ligação à enzima. Como as enzimas são proteínas, sua composição em aminoácidos, tamanho molecular, bem como sua estrutura são os principais determinantes da afinidade enzimática aos compostos fenólicos. Em geral, a ligação do composto fenólico pode afrouxar ou estabilizar a estrutura da enzima e, dessa forma, pode alterar sua atividade. A perturbação da estrutura da proteína pode ser esperada particularmente no caso de compostos fenólicos com estrutura volumosa, como taninos ou glicosídeos de compostos fenólicos. O afrouxamento da estrutura da enzima pode, por um lado, desestabilizar a conformação da enzima e a posição/orientação adequada da ligação ao substrato/resíduos catalíticos, resultando na inibição da enzima. Também os compostos fenólicos podem atuar como reguladores alostéricos da atividade enzimática. Além disso, a ligação do composto fenólico pode dificultar o sítio de ligação ao substrato, sítio catalítico ou ambos, reduzindo, portanto, sua atividade proteolítica (VELICKOVIC et al., 2017).

A Tabela 5 mostra os dez melhores resultados, em termos de menor energia livre de ligação, com destaque em rosa para os compostos que apresentaram concentrações entre 10 e 50 mg Kg⁻¹ e em verde para os compostos que apresentaram concentrações entre 1 e 10 mg Kg⁻¹, na determinação do perfil fitoquímico. Considerando o

quantitativo presente nos extratos e a energia de ligação, para a *Dihydrofolate reductase* (2W9T), cabe destacar a isoquercetrina, a quercetina, o kaempferol, a catequina, a isorhamnetina, o ácido clorogênico, e a epicatequina. Para a *DNA gyrase B* (4KTN), os destaques são a isorhamnetina, a epicatequina, a quercetina e a catequina. Para a *Heptaprenyl diphosphate synthase* (5H9D), destacam-se a rutina, o ácido clorogênico, o kaempferol, a isoquercetrina e a catequina. Outros compostos constantes na Tabela 4 mostram uma afinidade de ligação com as proteínas-alvo, com destaque para a naringina, o galato de epigalocatequina e a luteolina, contudo, a sua concentração nos extratos WE e WU foram quantificadas como menores do que 1 mg Kg^{-1} .

Tabela 4: Energia livre de interação de ligação de compostos fenólicos (ligantes) de extratos de folhas de *Campomanesia xanthocarpa* com proteínas-alvo associadas à inibição do crescimento bacteriano.

<i>Energia livre de ligação (kcal mol⁻¹) - ligante e proteína alvo</i>													
Ligantes - PubChem CID	Enzima – proteína alvo						Ligantes - PubChem CID	Enzima – proteína alvo					
	2W9T		4KTN		5H9D			2W9T		4KTN		5H9D	
	Sem H adiciona do	Com H adiciona do	Sem H adiciona do	Com H adiciona do	Sem H adiciona do	Com H adiciona do		Sem H adiciona do	Com H adiciona do	Sem H adiciona do	Com H adiciona do	Sem H adiciona do	Com H adiciona do
3469	-5.975	-6.397	-6.606	-5.886	-5.719	-6.060	72276	-7.035	-7.179	-7.594	-7.633	-6.199	-6.417
9296	-6.400	-6.394	-6.416	-6.367	-6.123	-5.983	5281616	-7.356	-7.205	-8.309	-8.250	-7.087	-6.665
689043	-6.725	-6.113	-6.819	-6.300	-5.941	-5.524	65064	-7.108	-7.297	-8.390	-8.460	-7.442	-6.874
1794427	-7.022	-7.420	-7.369	-7.383	-7.172	-7.239	5280804	-7.577	-7.445	-6.942	-7.182	-6.580	-7.029
370	-5.995	-6.384	-7.013	-6.117	-6.008	-6.071	5281654	-7.483	-7.282	-7.783	-8.231	-6.745	-6.663
72	-6.094	-6.394	-6.969	-6.701	-6.251	-6.052	5280863	-7.280	-7.169	-7.515	-7.518	-6.482	-7.102
637775	-6.826	-6.502	-7.004	-6.662	-6.354	-6.736	5280445	-7.176	-7.170	-7.809	-8.460	-6.884	-6.926
10742	-6.621	-7.443	-7.329	-6.538	-6.433	-6.314	442428	-7.939	-7.487	-7.652	-8.337	-7.186	-7.923
243	-6.316	-6.329	-6.608	-6.072	-6.084	-6.126	637542	-6.406	-6.832	-5.986	-6.570	-6.067	-6.358
338	-6.432	-6.327	-6.635	-6.379	-5.982	-6.073	68071	-6.966	-7.099	-7.806	-7.733	-6.913	-6.852
445858	-6.655	-6.603	-6.839	-7.052	-6.144	-6.470	5280343	-7.341	-6.940	-7.589	-7.680	-6.499	-6.490
5280443	-6.784	-6.789	-7.590	-7.515	-6.943	-6.898	5280805	-6.766	-6.457	-7.498	-6.739	-7.343	-7.068
9064	-7.402	-7.417	-7.426	-7.553	-6.322	-6.738	5280802	-6.885	-6.748	-7.770	-7.801	-7.043	-6.433
5280536	-6.651	-6.640	-7.491	-7.496	-6.825	-6.053	8655	-7.316	-7.446	-7.445	-7.409	-6.356	-6.397
323	-6.707	-6.722	-7.319	-7.327	-6.637	-6.641							

Tabela 5: Classificação (dez primeiros) dos compostos fenólicos (ligantes) dos extratos das folhas de *Campomanesia xanthocarpa* com menor energia livre de ligação nas proteínas alvo associada à inibição do crescimento bacteriano.

Classificação	Os dez principais compostos fenólicos (ligantes)*					
	2W9T		4KTN		5H9D	
	Sem adição de H	Com adição de H	Sem adição de H	Com adição de H	Sem adição de H	Com adição de H
1°	Naringina (442428)	Naringina (442428)	Galato de epigallocatequina (65064)	Luteolina (5280445)	Galato de epigallocatequina (65064)	Naringina (442428)
2°	Isoquercetrina (5280804)	Siringaldeído (8655)	Galangina (5281616)	Galato de epigallocatequina (65064)	Rutina (5280805)	Ácido Clorogênico (1794427)
3°	Isorhamnetina (5281654)	Isoquercetrina (5280804)	Luteolina (5280445)	Naringina (442428)	Naringina (442428)	Kaempferol (5280863)
4°	Catequina (9064)	Ácido siríngico (10742)	Pinocembrina (68071)	Galangina (5281616)	Ácido clorogênico (1794427)	Rutina (5280805)
5°	Galangina (5281616)	Ácido clorogênico (1794427)	Isorhamnetina (5281654)	Isorhamnetina (5281654)	Galangina (5281616)	Isoquercetrina (5280804)
6°	Quercetina (5280343)	Catequina (9064)	Sinapaldeído (5280802)	Sinapaldeído (5280802)	Sinapaldeído (5280802)	Luteolina (5280445)
7°	Siringaldeído (8655)	Galato de epigallocatequina (65064)	Naringina (442428)	Pinocembrina (68071)	Apigenina (5280443)	Apigenina (5280443)
8°	Kaempferol (5280863)	Isorhamnetina (5281654)	Epicatequina (72276)	Quercetina (5280343)	Pinocembrina (68071)	Galato de epigallocatequina (65064)
9°	Luteolina (5280445)	Galangina (5281616)	Apigenina (5280443)	Epicatequina (72276)	Luteolina (5280445)	Pinocembrina (68071)
10°	Galato de epigallocatequina (65064)	Epicatequina (72276)	Quercetina (5280343)	Catequina (9064)	Coniferal-deído (5280536)	Catequina (9064)

*Os compostos fenólicos marcados em **rosa**, correspondem aos compostos que estão presentes nos extratos em concentrações entre 10 e 50 mg Kg⁻¹; os compostos fenólicos marcados em **verde**, correspondem aos compostos que estão presentes nos extratos em concentrações entre 1 e 10 mg Kg⁻¹.

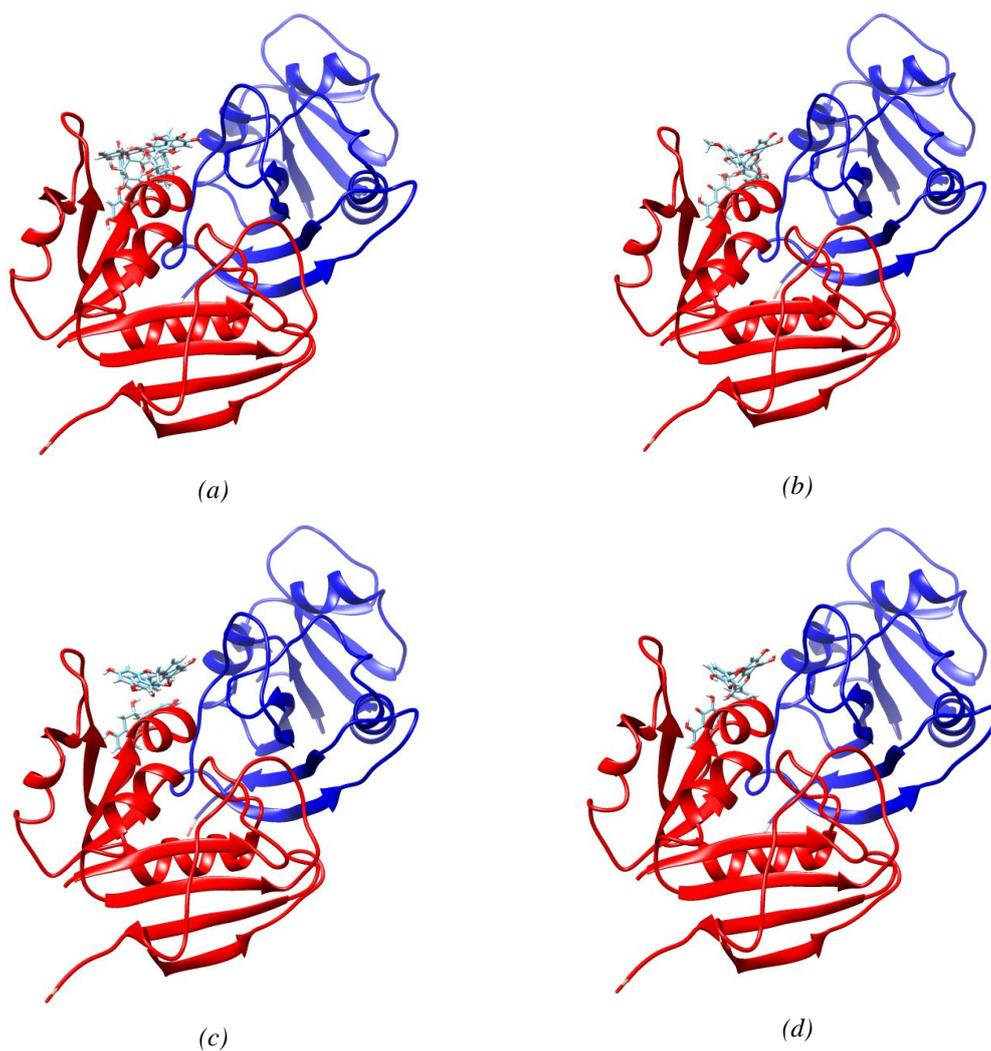
Na representação visual dos acoplamentos moleculares com as menores energias livres de ligação, considerando as moléculas quantificadas com 1 a 50 mg Kg⁻¹, verifica-se que os ligantes (compostos fenólicos) podem se ligar as proteínas-alvo em diferentes locais e/ou diferentes conformações (Fig.5, Fig.6 e Fig.7).

A *Dihydrofolate reductase* (DHFR) está presente em todas as células e é necessária para a manutenção de folato intracelular em um estado reduzido bioquimicamente ativo, sendo alvo atraente para o estudo de novos agentes antibacterianos e antitumorais (SONI et al. 2019). As ligações à DHFR (2W9T) (Fig.5) ocorreram para diferentes conformações dos ligantes e na mesma região da proteína-alvo, com exceção para o ácido clorogênico (1794427) (Fig.5g), que se ligou em outra região da molécula. Assim, entende-se que o comportamento de ligação entre o ligante e a proteína-alvo, neste caso, segue uma similaridade. A DHFR possui dois locais de ligação heterotropicamente associados, um para o substrato A (DHF) e um para o cofator B (NADPH). Ambos os locais também podem acomodar um terceiro ligante, o inibidor I (composto fitoquímico), competitivamente (SPINA et al., 2008). DHFR é composta principalmente de α -hélices e folhas- β pregueadas. Esta proteína pode ser classificada em dois subdomínios: o domínio de ligação ao substrato e o domínio de ligação NADPH (cofator). O sítio ativo está localizado no domínio de ligação do substrato. Os inibidores de DHFR são fortemente ligados por ligações de hidrogênio, interações de empilhamento π - π (π - π), interações hidrofóbicas e forças de van der Waals com os resíduos do sítio ativo (HE et al., 2020). Spina et al. (2008) relatam que existe uma tendência de ligação lenta entre compostos de fontes biológicas e a DHFR, e uma inibição dependente da incubação, visualizada quando utilizado o ligante EGCG. Este comportamento pode também justificar os resultados das inibições *in vitro* obtida neste estudo. Ainda, os autores propõem um modelo que ilustra o mecanismo de inibição de DHFR de *E. coli* por EGCG, onde o EGCG é capaz de se ligar a enzima no local B (local do substrato, formando um complexo denominado E-IB) e no local A (local do cofator, formando um complexo denominado E-IA), antes da adição de NADPH saturante. Este mecanismo pode ser semelhante para os demais ligantes e a DHFR (Fig.5), com exceção para o ácido clorogênico.

A mesma similaridade de ligação entre o ligante e *DNA gyrase B* (4KTN) (Fig.6) é observada, havendo a região específica na proteína-alvo onde os compostos fenólicos possuem afinidade de ligação, mesmo que estejam em diferentes conformações. As topoisomerases de DNA, como a *DNA gyrase B*, são alvos atraentes para a pesquisa de antibióticos. Estas enzimas controlam o estado topológico e estão envolvidas na transcrição e na replicação do DNA e, portanto, são essenciais para a viabilidade celular (LUBBERS et al., 2007). Dois mecanismos já foram propostos para a quercetina e a *DNA gyrase B*: 1- a quercetina tem um mecanismo pelo qual se liga ao

DNA, estabiliza o complexo DNA-girase e induz a clivagem do DNA; 2 - a quercetina inibe o superenrolamento do DNA por meio da inibição competitiva, ou seja, se ligando ao local específico de ligação do ATP da subunidade B da *DNA gyrase B* (REMPE et al., 2017). Acredita-se que neste estudo, o comportamento dos ligantes está relacionado ao mecanismo 2.

Para a *Heptaprenyl diphosphate synthase* (SaHepPPS) é uma proteína que contém uma subunidade catalítica e uma pequena subunidade reguladora e funciona apenas como heterodímero (DESAI et al., 2016). Para a 5H9D (Fig.7), observa-se duas regiões de ligação, que alternam de acordo com o ligante, sendo uma mais central à proteína-alvo e uma mais externa. Altas concentrações dos substratos, difosfato de isopentenila e difosfato de farnesila, inibem a enzima, que também é potentemente inibida pelos bifosfonatos. Como a enzima contém uma subunidade catalítica, rica em Asp (denominada SARM) (DESAI et al., 2016), verificou-se que a ligação dos compostos fenólicos não ocorreu nesta região, o que pode justificar a não inibição do crescimento do *S. aureus* nos testes *in vitro*.



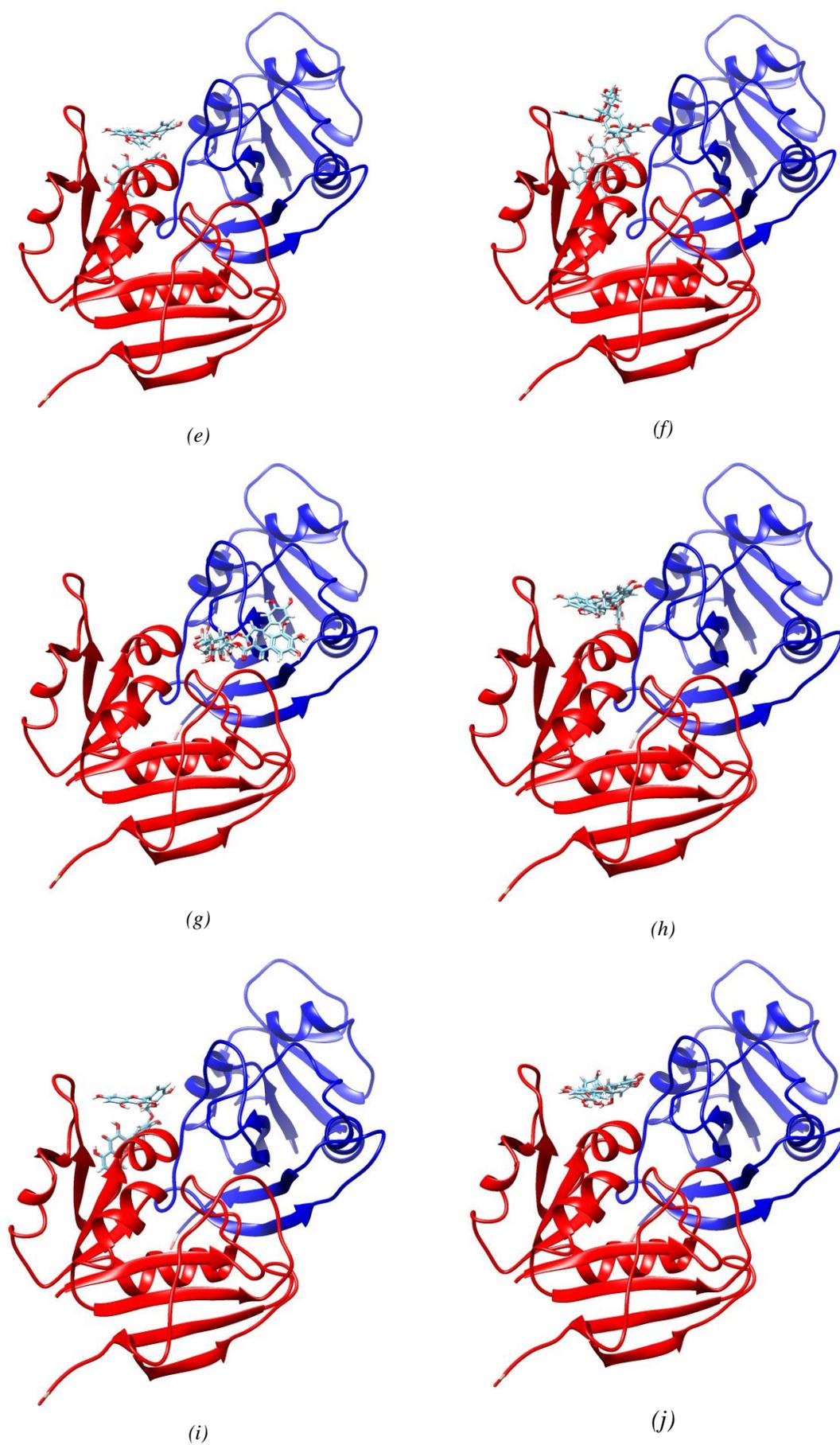
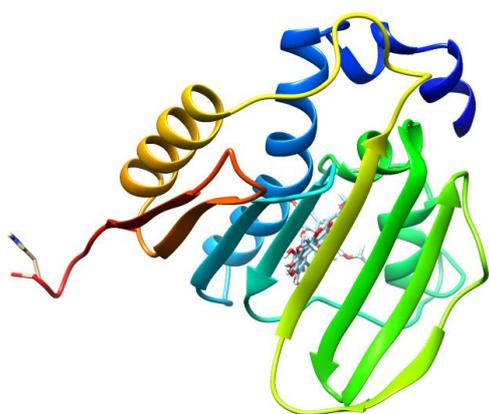
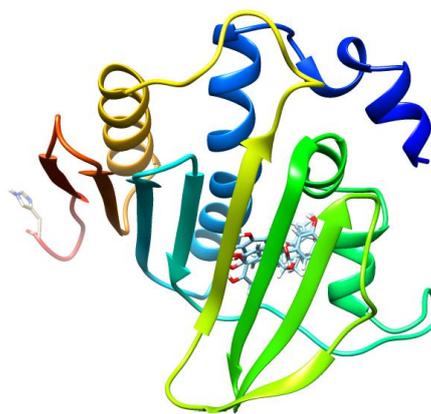


Figura 5 - Representação visual do docking molecular com menor energia de ligação (a) proteína alvo 2W9T, sem adição de hidrogênio e ligante **Isoquercetrina** (5280804); (b) proteína alvo 2W9T, sem adição

de hidrogênio e ligante de **isorhamnetina** (5281654); (c) proteína alvo 2W9T, sem adição de hidrogênio e ligante **Catequina** (9064); (d) proteína alvo 2W9T, sem adição de hidrogênio e ligante de **quercetina** (5280343); (e) proteína alvo 2W9T, sem adição de hidrogênio e ligante **Kaempferol** (5280863); (f) proteína alvo 2W9T, com adição de hidrogênio e ligante **Isoquercetrina** (5280804); (g) proteína alvo 2W9T, com adição de hidrogênio e ligante de ácido clorogênico (1794427); (h) proteína alvo 2W9T, com adição de hidrogênio e ligante **Catequina** (9064); (i) proteína alvo 2W9T, com adição de hidrogênio e ligante de **isorhamnetina** (5281654); (j) proteína alvo 2W9T, com adição de hidrogênio e ligante **epicatequina** (72276).



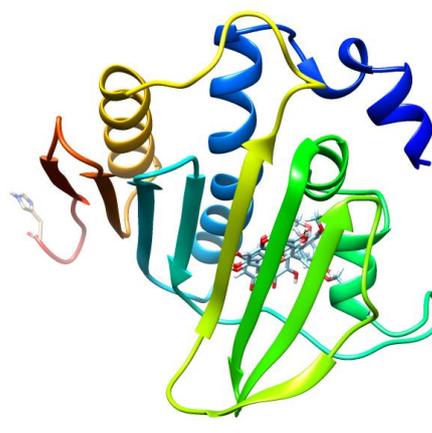
(a)



(b)



(c)



(d)

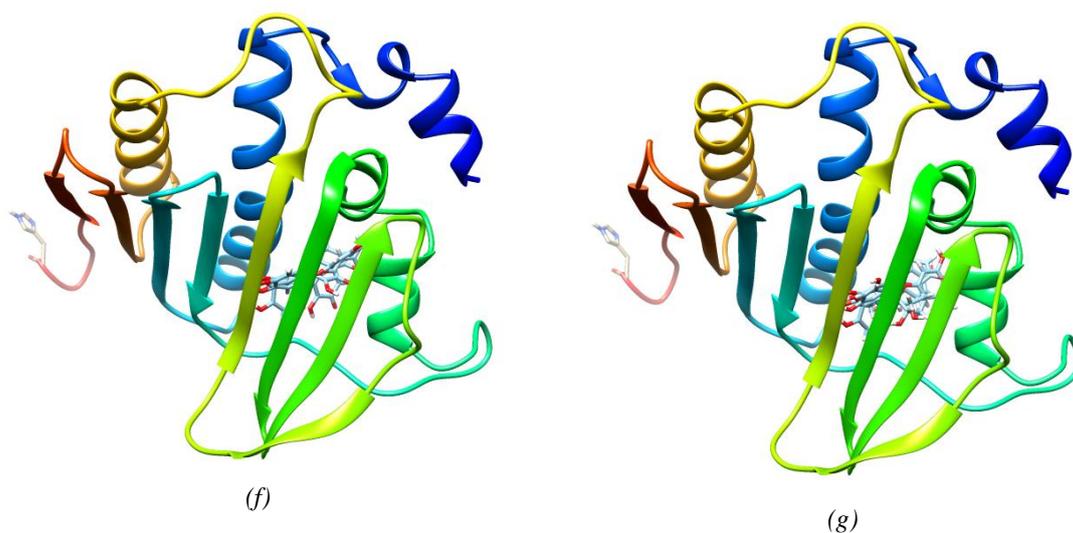
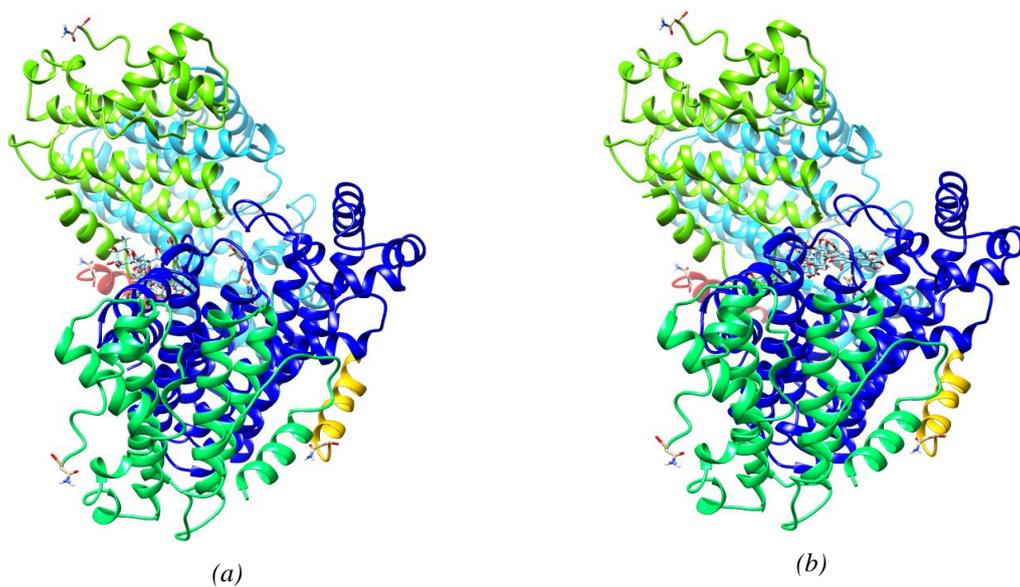
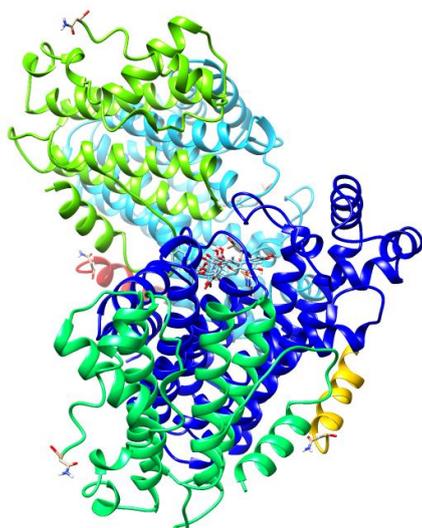
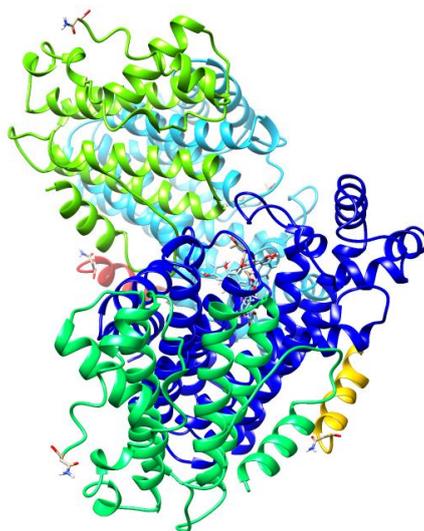


Figura 6- Representação visual de docking molecular com menor energia livre de ligação (a) proteína alvo 4KTN, sem adição de hidrogênio e ligante de **isorhamnetina** (5281654); (b) proteína alvo 4KTN, sem adição de hidrogênio e ligante de **epicatequina** (72276); (c) proteína alvo 4KTN, sem adição de hidrogênio e ligante de **quercetina** (5280343); (d) proteína alvo 4KTN, com adição de hidrogênio e ligante de **isorhamnetina** (5281654); (e) proteína alvo 4KTN, sem adição de hidrogênio e ligante de **quercetina** (5280343); (f) proteína alvo 4KTN, com adição de hidrogênio e ligante de **epicatequina** (72276); (g) proteína alvo 4KTN, com adição de hidrogênio e ligante **Catequina** (9064).

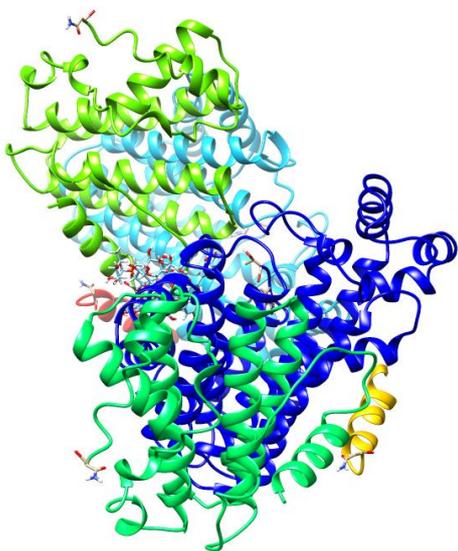




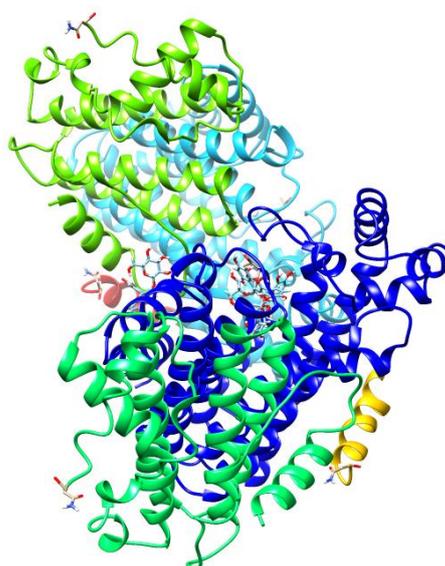
(c)



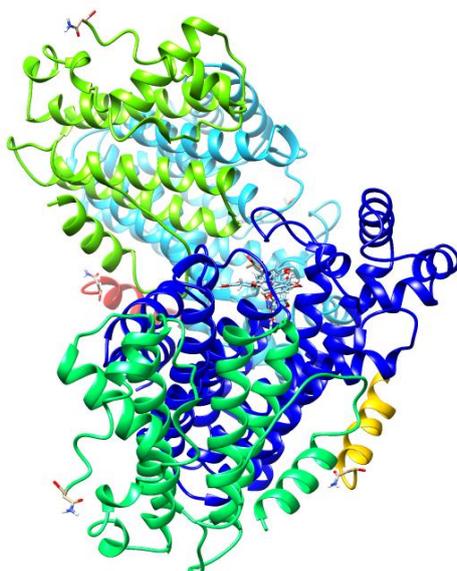
(d)



(e)



(f)



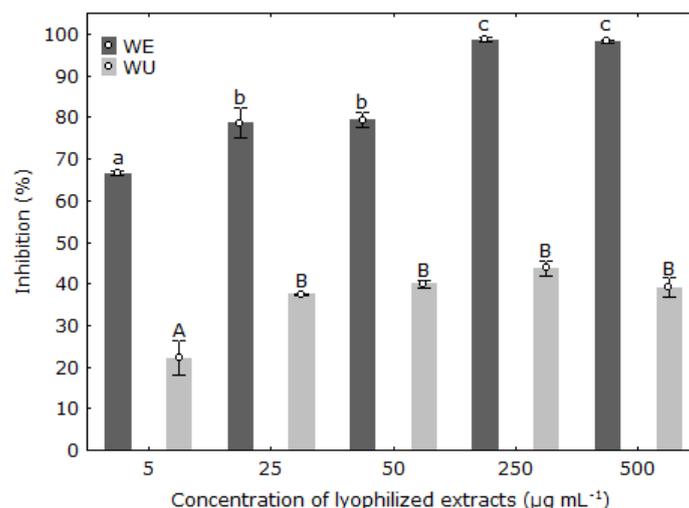
(g)

Figura 7- Representação visual de docking molecular com menor energia livre de ligação (a) proteína alvo 5H9D, sem adição de hidrogênio e ligante **Rutina** (5280805); (b) proteína alvo 5H9D, sem adição de hidrogênio e **ácido clorogênico** (1794427); (c) proteína alvo 5H9D, com adição de hidrogênio e **ácido clorogênico** (1794427); (d) proteína alvo 5H9D, com adição de hidrogênio e **Kaempferol** (5280863); (e) proteína alvo 5H9D, com adição de hidrogênio e ligante Rutina (5280805); (f) proteína alvo 5H9D, com adição de hidrogênio e ligante **Isoquercetrina** (5280804); (g) proteína alvo 5H9D, com adição de hidrogênio e ligante **Catequina** (9064).

3.3 Inibição da α -amilase e da α -glucosidase pelos extratos WE e WU

As enzimas α -amilase e α -glucosidase são responsáveis pelo processamento de carboidratos provenientes da dieta, atuando na hidrólise do amido e na geração de monossacarídeos, que serão absorvidos pelos enterócitos. A inibição destas enzimas pode retardar ou prolongar a digestão dos carboidratos no organismo, reduzindo a quantidade de glicose absorvida e, por consequência, evitando o aumento brusco da glicemia e insulinemia pós-prandial. Inibidores, presentes em plantas, oferecem uma estratégia promissora para o controle da hiperglicemia associada ao Diabetes tipo 2 (PEREIRA et al., 2011; DE SALES et al., 2012).

Os extratos WE e WU promoveram a inibição da α -amilase (Fig.8) contudo, com percentuais superiores e diferentes estatisticamente ($P < 0,05$) quando utilizado WE. Os valores de inibição para WE variaram de $66,47 \pm 0,28\%$ (extrato de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$) a $98,38 \pm 0,42\%$ (extrato de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$). Os resultados dos percentuais de inibição da α -amilase quando utilizados os extratos nas concentrações de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($98,13 \pm 0,20\%$), não diferiram estatisticamente entre si ($P > 0,05$). Os resultados dos percentuais de inibição da α -amilase quando utilizados os extratos nas concentrações de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($78,61 \pm 1,85\%$) e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($78,30 \pm 2,04\%$) também não diferiram estatisticamente entre si ($P > 0,05$). Para WU, os percentuais de inibição da α -amilase variaram de $22,20 \pm 2,14 \%$ (extrato de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$) a $43,12 \pm 2,38\%$ (extrato de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$), e estes foram diferentes estatisticamente ($P < 0,05$). Contudo, cabe salientar que resultados dos percentuais de inibição da α -amilase quando utilizados os extratos nas concentrações de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($36,12 \pm 2,23\%$), $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($40,00 \pm 0,45 \%$), $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($38,17 \pm 1,88\%$) não diferiram estatisticamente entre si ($P > 0,05$).



Diferentes letras minúsculas diferem em um nível de confiança de 95% ao comparar os resultados de inibição para WE. Diferentes letras maiúsculas diferem em um nível de confiança de 95% ao comparar os resultados de inibição para WU.

Figura 8- Inibição da alfa-amilase in vitro por extratos de folhas de *Campomanesia xanthocarpa* obtidos por extração enzimática (WE) e extração por ultrassom (WU).

Os extratos WE e WU também promoveram a inibição da α -glucosidase (Fig. 9), com a maioria dos percentuais iguais estatisticamente ($P < 0,05$) entre si, o que demonstra, neste caso, que o método de extração não interferiu nos resultados. O único percentual de inibição que diferiu dos demais e foi superior, foi obtido quando utilizado WU na concentração de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($45,50 \pm 1,04\%$). Percebe-se que o valor de inibição máximo obtido foi a metade do valor máximo obtido para a inibição da α -amilase, o que demonstra a proteína-alvo (α -glucosidase) e os compostos fenólicos de WE e WU, possuem uma menor afinidade de ligação, ou seja, os extratos são mais eficientes na inibição de α -amilase.

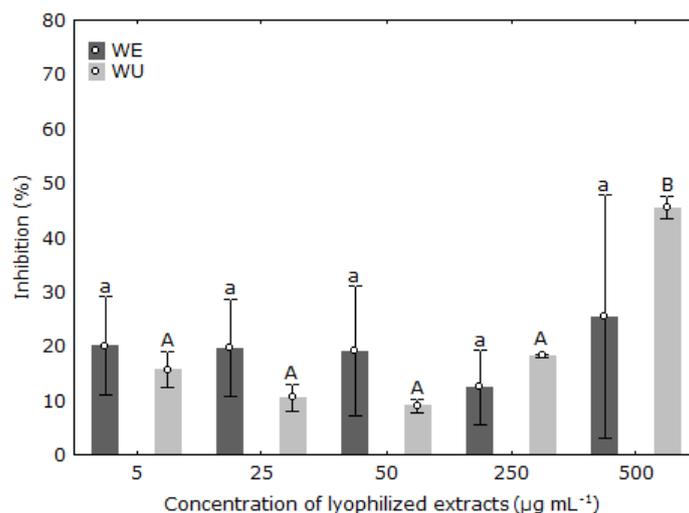


Figura 9- Inibição da alfa-glicosidase in vitro por extratos de folhas de *Campomanesia xanthocarpa* obtidos por extração enzimática (WE) e extração por ultrassom (WU).

Estudos com extratos vegetais de plantas da família *Myrtaceae* demonstram a presença de alguns compostos em comum com os extratos WE e WU, obtidos das folhas de *C. xanthocarpa*. BAILÃO et al. (2015) identificaram, em extratos de *Myrciaria cauliflora*/jaboticaba também da família da Myrtaceae, a quercetina, o ácido elágico, o ácido gálico, a isoquercetina e a luteína, com significativos valores de inibição das principais enzimas envolvidas na digestão de carboidratos, como a α -glucosidase e α -amilase. SANT'ANA et al. (2017) identificaram a quercetina, o ácido gálico e o ácido clorogênico, em extratos de *Campomanesia xanthocarpa*. Análises estruturais por meio de algoritmos de encaixe revelaram que entre os compostos ancorados, a catequina, o kaempferol e a hesperetina, mostraram alta afinidade de ligação com o sítio ativo da α -amilase. Para a α -glucosidase, o ácido cafeico, epicatequina, ácido ferúlico e a quercetina, mostraram alta afinidade de ligação com o sítio ativo (RASOULI et al., 2017). Estes compostos foram detectados nos extratos WE e WU, sendo o kaempferol e a quercetina com concentrações próximas a 20 mg Kg⁻¹, a catequina, ácido cafeico, epicatequina e ácido ferúlico com concentrações médias entre 1 e 5 mg Kg⁻¹.

Os polifenóis podem, não só reduzir a absorção de açúcares, mas também aumentar a captação de glicose pelo músculo esquelético e tecido adiposo, contribuindo para a redução dos níveis de glicose no sangue (SALLES et al., 2020). Encontrar um equilíbrio entre a inibição da α -amilase e α -glucosidase torna-se essencial para limitar os efeitos gastrointestinais do amido não digerido quando atinge o colón humano. Durante a ingestão dos compostos fenólicos, podem ocorrer processos metabólicos que

poderiam limitar a ação eficaz dos extratos na inibição destas enzimas (WHITSON et al., 2010; GONÇALVES et al., 2011).

Os compostos fitoquímicos identificados nos extratos foram utilizados no estudo *in silico*, visando verificar quais poderiam estar vinculados as inibições da α -amilase e da α -glucosidase ocorridas no estudo *in vitro*. A Tabela 6 mostra dos valores de energia livre de ligação dos compostos fenólicos (ligantes) presentes nos extratos de folhas de *C. xanthocarpa* com as proteínas-alvo (α -amilase e da α -glucosidase), com e sem a adição de hidrogênio à molécula do ligante. Observa-se que todos os ligantes, apresentaram baixos valores de energia de ligação, o que significa que ocorre uma interação entre a enzima (proteína-alvo) e a molécula fitoquímica. Os valores variam de, aproximadamente, -8 a -5 kcal mol⁻¹, indicando que algumas moléculas possuem maior afinidade de ligação pela proteína-alvo, mas que todas podem ter contribuído para a inibição *in vitro*, uma vez que os resultados obtidos, na sua totalidade, podem ser considerados satisfatórios.

Tabela 6: Energia livre de interação de ligação de compostos fenólicos (ligantes) de extratos de folhas de *Campomanesia xanthocarpa* com proteínas-alvo associadas à inibição de enzimas digestivas.

<i>Energia livre de ligação (kcal mol⁻¹) - ligante e proteína alvo</i>									
Ligantes - PubChem CID	Enzima – proteína alvo				Ligantes - PubChem CID	Enzima – proteína alvo			
	1C8Q		2QMJ			1C8Q		2QMJ	
	sem	Com	sem	Com		sem	Com	sem	Com
	adição de	adição de	adição de	adição de		adição de	adição de	adição de	adição de
	H	H	H	H		H	H	H	H
3469	-6.620	-5.878	-6.301	-6.572	72276	-7.167	-7.041	-6.017	-6.267
9296	-6.492	-6.149	-6.716	-6.592	5281616	-7.302	-7.302	-8.026	-7.711
689043	-6.455	-6.196	-7.320	-6.631	65064	-6.990	-6.772	-8.685	-5.998
1794427	-7.016	-6.901	-6.636	-6.449	5280804	-7.208	-7.757	-7.403	-7.382
370	-6.145	-5.846	-6.515	-6.556	5281654	-8.198	-8.186	-8.358	-7.897
72	-6.653	-5.694	-6.655	-6.485	5280863	-7.927	-7.289	-6.596	-7.766
637775	-7.095	-6.487	-6.312	-6.921	5280445	-7.611	-7.841	-7.255	-6.336
10742	-7.579	-6.440	-7.229	-6.591	442428	-7.230	-7.100	-7.809	-7.438
243	-6.479	-6.834	-6.613	-6.425	637542	-6.440	-6.341	-7.282	-6.695
338	-6.412	-6.319	-6.282	-6.512	68071	-7.243	-7.240	-7.232	-7.262
445858	-6.609	-6.372	-5.920	-7.046	5280343	-7.640	-7.607	-6.353	-7.664
5280443	-7.796	-8.079	-7.801	-6.717	5280805	-7.856	-7.537	-6.502	-7.604
9064	-7.156	-7.826	-6.618	-6.541	5280802	-6.786	-7.039	-7.952	-7.874
5280536	-6.768	-6.909	-7.712	-7.640	8655	-6.423	-6.317	-7.462	-6.176
323	-7.388	-7.352	-7.658	-7.670					

A Tabela 7 mostra os dez melhores resultados, em termos de menor energia livre de ligação, com destaque em rosa para os compostos que apresentaram concentrações

entre 10 e 50 mg Kg⁻¹ e em verde para os compostos que apresentaram concentrações entre 1 e 10 mg Kg⁻¹, na determinação do perfil fitoquímico. Considerando o quantitativo presente nos extratos e a energia de ligação, para 1C8Q, cabe destacar a isorhamnetina, o kaempferol, a rutina, a quercetina, a catequina e a isoquercetrina. Para 2QMJ, os destaques são a isorhamnetina, a isoquercetrina, o kaempferol, a quercetina e a rutina. Outros compostos constantes na Tabela 6 mostram uma afinidade de ligação com as proteínas-alvo, contudo, a sua concentração nos extratos WE e WU foram quantificadas como menores do que 1 mg Kg⁻¹.

Pesquisas com o foco na inibição da α -amilase e da α -glucosidase dor flavonóides, destacam a quercetina (50% e 28% de inibição, respectivamente), a luteolina (19% de inibição para ambas) e o galato de epigallocatequina (21% e 32% de inibição, respectivamente), podendo ser consideradas altas atividades inibitórias para as duas enzimas (TADERA et al., 2006). Estas moléculas estão presentes nos extratos WE e WU, e constam dentre as dez melhores energias livres de ligação para as duas enzimas. Para a α -amilase, outros compostos fenólicos promovem inibições medianas, como a apigenina (21%) e o kaempferol (18%), e com inibições baixas, como a catequina (4%) e a naringenina (5%). Para a α -glucosidase, os compostos com menor efeito inibitório foram naringenina (1%), kaempferol (8%), apeginina (3%) e catequina (1%) (TADERA et al., 2006). Mesmo com potenciais de inibição medianos ou baixos, cabe destacar que estas moléculas também foram quantificadas nos extratos WE e WU e constam dentre as dez melhores energias livres de ligação, podendo contribuir para o percentual total de inibição da α -amilase e da α -glucosidase obtidos nos testes *in vitro*.

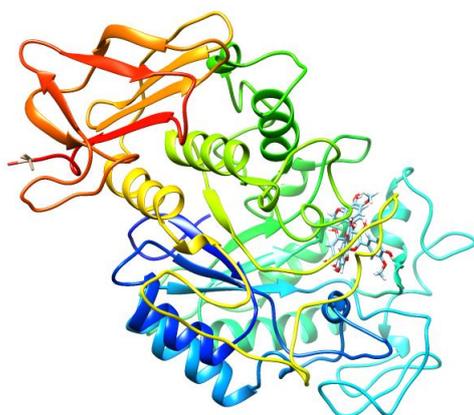
Tabela 7: Classificação (dez primeiros) dos compostos fenólicos (ligantes) dos extratos de folhas de Campomanesia xanthocarpa com menor energia livre de ligação nas proteínas alvo associada à inibição de enzimas digestivas.

Classificação	Os dez principais compostos fenólicos (ligantes)			
	1C8Q		2QMJ	
	sem adição de H	Com adição de H	Sem adição de H	Com adição de H
1°	Isorhamnetina (5281654)	Isorhamnetina (5281654)	Galato de epigallocatequina (65064)	Isorhamnetina (5281654)
2°	Kaempferol (5280863)	Apigenina (5280443)	Isorhamnetina (5281654)	Sinapaldeído (5280802)
3°	Rutina (5280805)	Luteolina (5280445)	Galangin (5281616)	Kaempferol (5280863)
4°	Apigenina	Catequina	Sinapaldeído	Galangina

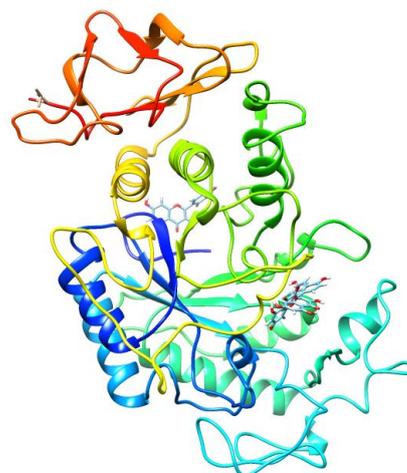
	(5280443)	(9064)	(5280802)	(5281616)
5°	Quercetina (5280343)	Isoquercetrina (5280804)	Naringina (442428)	Cumarina (323)
6°	Luteolina (5280445)	Quercetina (5280343)	Apigenina (5280443)	Quercetina (5280343)
7°	Ácido siringíco (10742)	Rutina (5280805)	Coniferaldeído (5280536)	Coniferaldeído (5280536)
8°	Cumarina (323)	Cumarina (323)	Cumarina (323)	Rutina (5280805)
9°	Galangina (5281616)	Galangina (5281616)	Syringaldeído (8655)	Naringina (442428)
10°	Pinocembrina (68071)	Kaempferol (5280863)	Isoquercetrina (5280804)	Isoquercetrina (5280804)

*Os compostos fenólicos marcados em **rosa**, correspondem aos compostos que estão presentes nos extratos em concentrações entre 10 e 50 mg Kg⁻¹; os compostos fenólicos marcados em **verde**, correspondem aos compostos que estão presentes nos extratos em concentrações entre 1 e 10 mg Kg⁻¹.

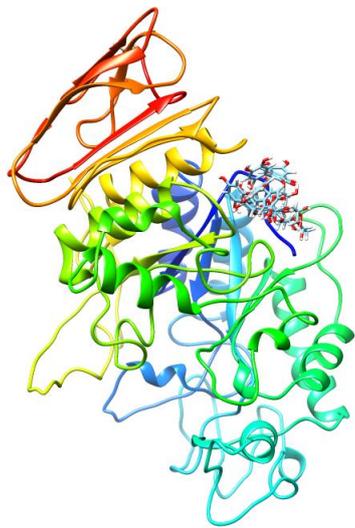
Na representação visual dos acoplamentos moleculares com as menores energias livres de ligação, considerando as moléculas quantificadas com 1 a 50 mg Kg⁻¹, verifica-se que o ligante (composto fenólico) pode se ligar em diferentes conformações e diferentes regiões α -amilase - 1C8Q (Fig. 10) e da α -glucosidase - 2QMJ (Fig.11), ocasionando inibições competitiva (quando a ligação ocorre no sítio ativo da enzima) ou incompetitiva (quando a ligação ocorre em outra região e não no sítio-ativo), havendo com que não ocorra a reação entre a enzima amilolítica e o substrato (amido). Verifica-se que um mesmo ligante pode ter afinidade de ligação por mais de uma região da proteína-alvo (Fig.10b, Fig.10h, Fig.10j, Fig.11a, Fig.11c, Fig.11d e Fig.11e).



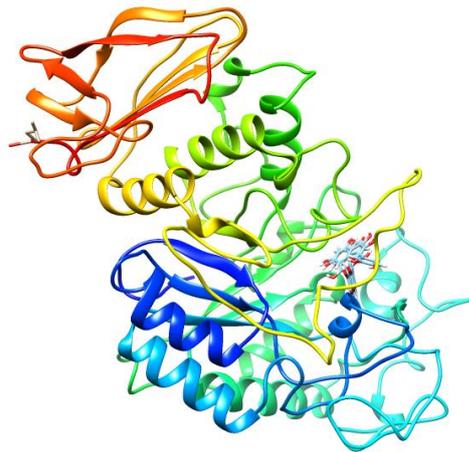
(a)



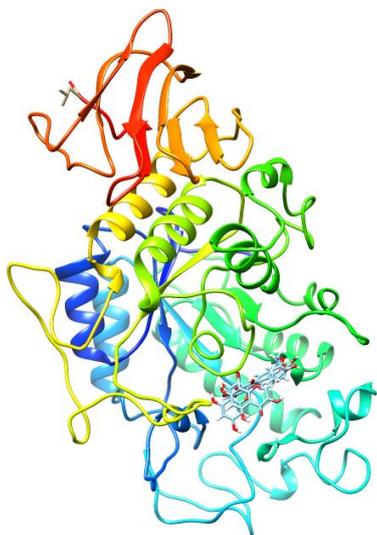
(b)



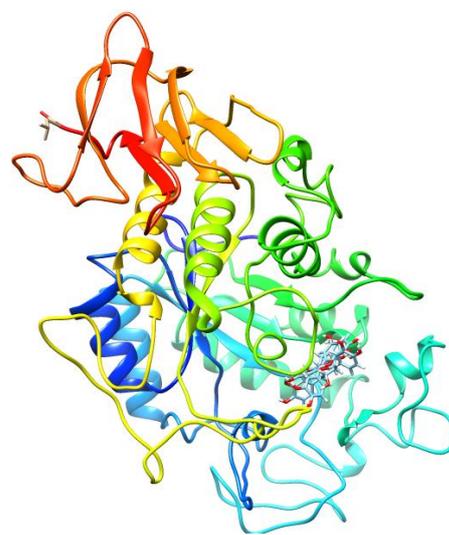
(c)



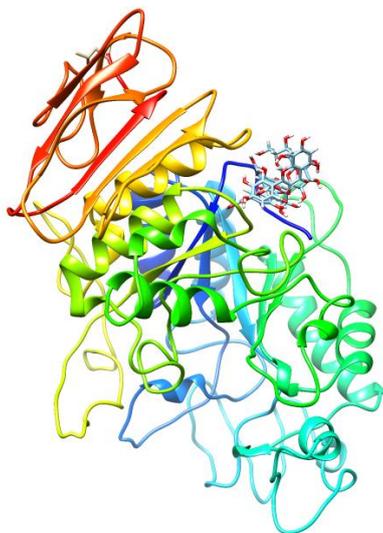
(d)



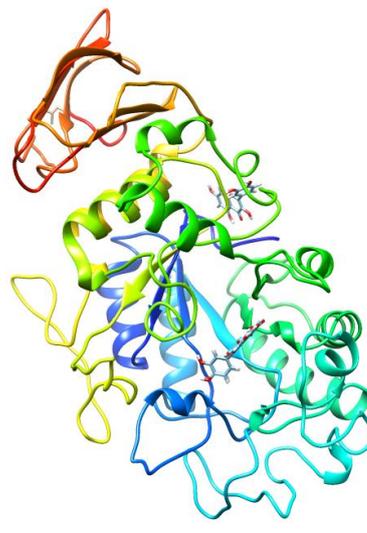
(e)



(f)



(g)



(h)

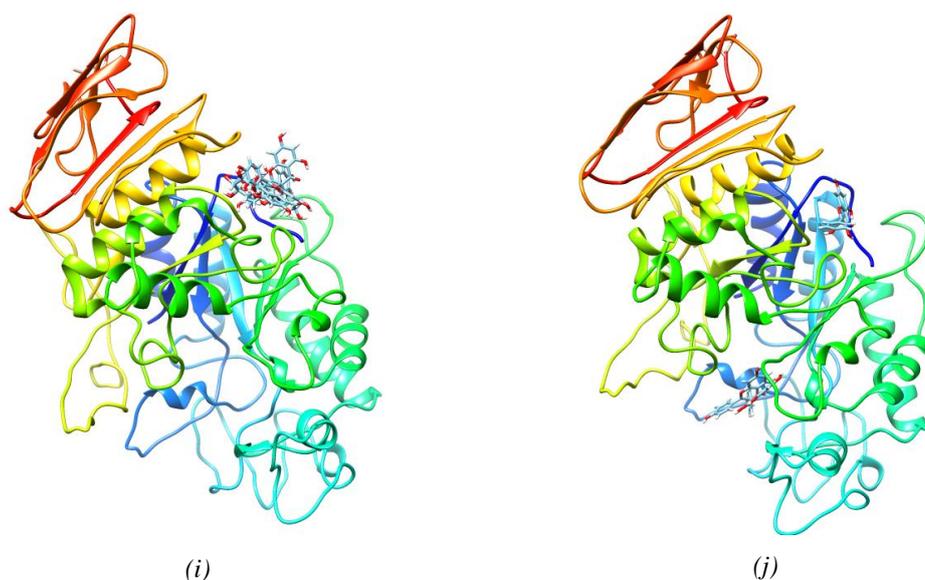
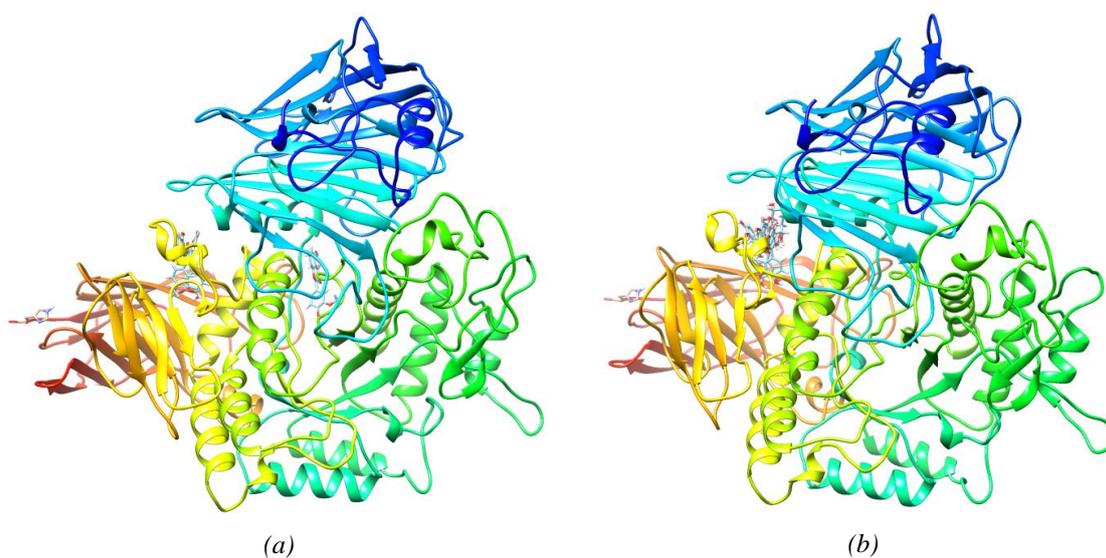


Figura 10- Representação visual de docking molecular com menor energia livre de ligação (a) proteína alvo 1C8Q, sem adição de hidrogênio e ligante **Isorhamnetina** (5281654); (b) proteína alvo 1C8Q, sem adição de hidrogênio e ligante **Kaempferol** (5280863); (c) proteína alvo 1C8Q, sem adição de hidrogênio e ligante **Rutina** (5280805); (d) proteína alvo 1C8Q, sem adição de hidrogênio e ligante de **quercetina** (5280343); (e) proteína alvo 1C8Q, com adição de hidrogênio e ligante de **Isorhamnetina** (5281654); (f) proteína alvo 1C8Q, com adição de hidrogênio e ligante **Catequina** (9064); (g) proteína alvo 1C8Q, com adição de hidrogênio e ligante **Isoquercetrina** (5280804); (h) proteína alvo 1C8Q, com adição de hidrogênio e ligante de **quercetina** (5280343); (i) proteína alvo 1C8Q, com adição de hidrogênio e ligante **Rutina** (5280805); (j) proteína alvo 1C8Q, com adição de hidrogênio e **Kaempferol** (5280863).



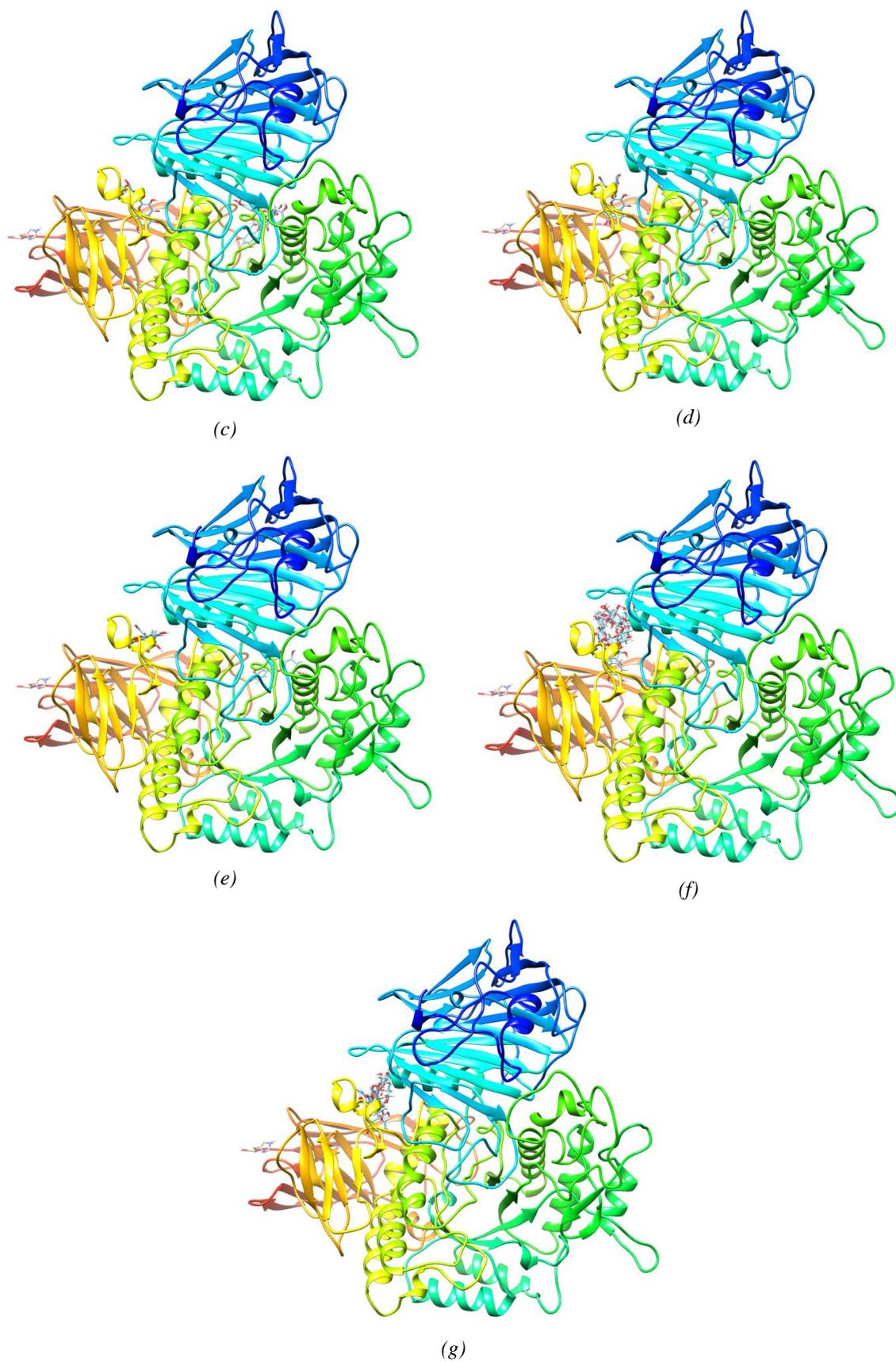


Figura 11- Representação visual de docking molecular com menor energia livre de ligação (a) proteína alvo 2QMJ, sem adição de hidrogênio e ligante **Isorhamnetina** (5281654); (b) proteína alvo 2QMJ, sem adição de hidrogênio e ligante **Isoquercetrina** (5280804); (c) proteína alvo 2QMJ, com adição de

hidrogênio e ligante de **Isorhamnetina** (5281654); (d) proteína alvo 2QMJ, com adição de hidrogênio e **Kaempferol** (5280863); (e) proteína alvo 2QMJ, com adição de hidrogênio e ligante de **quercetina** (5280343); (f) proteína alvo 2QMJ, com adição de hidrogênio e ligante **Rutina** (5280805); (g) proteína alvo 2QMJ, com adição de hidrogênio e ligante **Isoquercetrina** (5280804).

4. CONCLUSÃO

As folhas de *Campomanesia xanthocarpa* apresentaram um conteúdo expressivo de compostos fenólicos, cujos quantitativos variaram conforme o método de extração aplicado, indicando que a metodologia escolhida para a extração pode influenciar na característica fitoquímica do extrato. Os extratos apresentaram efeitos inibitórios, nos testes *in vitro*, contra bactérias e contra as enzimas digestivas vinculadas à digestão do amido. Estes efeitos variaram entre as bactérias avaliadas bem como entre as enzimas digestivas, sendo mais expressivos para *L. monocytogenes* e *E. coli*, e para a α -amilase. Nos testes *in silico*, verificou-se que os compostos quantificados nos extratos entre 1 e 50 mg Kg⁻¹, ficaram entre as melhores energias de ligação obtidas no acoplamento molecular, embora todos os compostos fitoquímicos tenham apresentado energias livre de ligação consideradas satisfatórias. Isto indica que as inativações obtidas, para as enzimas vinculadas ao metabolismo microbiano e as enzimas vinculadas a digestão do amido, podem ter relação direta com estes compostos, sendo os de maior destaque a isoquercetrina, a quercetina, o kaempferol, a catequina, a isorhamnetina, o ácido clorogênico, a epicatequina, e a rutina. Os compostos fitoquímicos apresentaram diferentes comportamentos de ligação na proteína-alvo, demonstrando que pode haver mais do que um local de ligação destes compostos nas enzimas estudadas. As abordagens *in vitro* e *in silico*, quando utilizadas conjuntamente, proporcionam a complementação de informações e, no caso de extratos das folhas de *Campomanesia xanthocarpa*, proporcionaram o encaminhamento de importantes informações que podem ser utilizadas em estudos futuros.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOULMAGD, E.; Al-Mohammed, I.; Al-Badry S. Synergism and postantibiotic effect of green tea extract and imipenem against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol J.* 2011;89–96.

ADEMILUYI, A. O., & Oboh, G. (2013). Aqueous extracts of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) varieties inhibit α -amylase and α -glucosidase activities in vitro. *Journal of medicinal food*, 16(1), 88–93. <https://doi.org/10.1089/jmf.2012.0004>.

ADEFEGHA, S. A., Oyeleye, S. I., & Oboh, G. (2015). Distribution of Phenolic Contents, Antidiabetic Potentials, Antihypertensive Properties, and Antioxidative Effects of Soursop (*Annona muricata* L.) Fruit Parts In Vitro. *Biochemistry research international*, 2015, 347673. <https://doi.org/10.1155/2015/347673>.

ALAVIJEH, Parastoo K. et al. A study of antimicrobial activity of few medicinal herbs. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 2012, 2 (4):496-502. Disponível em: <file:///C:/Users/Renata/Google%20Drive/Mestrado/projeto%20disserta%C3%A7%C3%A3o/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20Renata%20e%20Projeto%20Eduarda/ANTIMICROBIANA.pdf>. Acesso em: 03 de jul. de 2020

ALMEIDA, DS. Introdução. In: *Recuperação ambiental da Mata Atlântica* [online]. 3rd ed. rev. and enl. Ilhéus, BA: Editus, 2016, pp. 10-15. ISBN 978-85-7455-440-2. Available from SciELO Books .antidiabetic peptide from Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*) protein hydrolysate. Disponível em: <https://static.scielo.org/scielobooks/8xvf4/pdf/almeida-9788574554402.pdf>. Acesso em: 16 de jun. de 2020.

ALSARAF, Shahad & Al-Lawati, Wafa & Lawati, Amal & Khan, Shah. (2019). Chemical composition, in vitro antibacterial and antioxidant potential of Omani Thyme Essential Oil along with in silico studies of its major constituent. *Journal of King Saud University - Science*. 32. 10.1016/j.jksus.2019.09.006.

ALVES, Aline Medeiros et al. Caracterização física e química, fenólicos totais e atividade antioxidante da polpa e resíduo de gabioba. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/rbf/a/WbwB3464Br5dbb4vbk9DGwF/?format=pdf&lang=pt>.

Acesso em: 01 de jun de 2021

APOSTOLIDIS, E., Kwon, Y.-I., & Shetty, K. (2007). Potencial inibitório de queijo enriquecido com ervas, frutas e fungos contra as principais enzimas ligadas ao diabetes tipo 2 e hipertensão. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8 (1), 46–54. doi: 10.1016 / j.ifset.2006.06.001

ARANTES, A. A., & Monteiro, R. (2002). A família Myrtaceae na Estação Ecológica do Panga, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. *Lundiana: International Journal of Biodiversity*, 3(2), 111–127. <https://doi.org/10.35699/2675-5327.2002.21804>.

ARCARI, Grutzmann S., Arena K, Kolling J, Rocha P, Dugo P, Mondello L, Cacciola F. Compostos polifenólicos com atividade biológica em frutos de guabiroba (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) Por cromatografia líquida bidimensional abrangente. *Eletroforese*. Out 2020; 41 (20): 1784-1792. doi: 10.1002 / elps.202000170. Epub 2020 19 de agosto. PMID: 32779212.

ARNOSO, Bernardo Junqueira de Moraes et al. Biodisponibilidade e classificação de compostos fenólicos. Disponível em: <https://portalatlanticaeditora.com.br/index.php/nutricaoobrasil/article/view/1432/4971>.

Acesso em: 09 de jun 2021

ARULSELVAN, Palanisamy & Tangestani Fard, Masoumeh & Tan, Woan & Sivapragasam, Gothai & Fakurazi, Sharida & ME, Norhaizan & SureshKumar, S. & Kumar, Suresh. (2016). Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016. 10.1155/2016/5276130.

AZMIR, J., Zaidul, ISM, Rahman, MM, Sharif, KM, Mohamed, A., Sahena, F.,... Omar, AKM (2013). Técnicas de extração de compostos bioativos de materiais vegetais: uma revisão. *Journal of Food Engineering*, 117 (4), 426-436. doi: 10.1016 / j.jfoodeng.2013.01.014

BABBAR, N., Oberoi, HS, Sandhu, SK, & Bhargav, VK (2012). Influência de diferentes solventes na extração de compostos fenólicos de resíduos vegetais e sua avaliação como fontes naturais de antioxidantes. *Jornal de Ciência e Tecnologia de*

Alimentos, 51 (10), 2568-2575. doi: 10.1007 / s13197-012-0754-4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25328197/> .Acesso em:15 de jun. de 2020

BAILÃO, E. F., Devilla, I. A., da Conceição, E. C., & Borges, L. L. (2015). Bioactive Compounds Found in Brazilian Cerrado Fruits. *International journal of molecular sciences*, 16(10), 23760–23783. <https://doi.org/10.3390/ijms161023760>

BAX, B., Chan, P., Eggleston, D. et al. Type IIA topoisomerase inhibition by a new class of antibacterial agents. *Nature* 466, 935–940 (2010). <https://doi.org/10.1038/nature09197>.

BENÍTEZ, Ricardo; Ibarz Ribas, Alberto; Pagan i Gilabert, Jordi. (2008) . Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 2008, vol. 42, núm. 2, p. 227-236. <http://hdl.handle.net/10459.1/49268>.

BENSEN, D. C. et al. Domínio de ligação atp de dna girase de enterococcus faecalis em complexo com um inibidor de molécula pequena ((3S) -1- [2- (PYRIDO [2,3-B] PYRAZIN-7-YLSULFANYL) -9H-PYRIMIDO [4,5-B] INDOL-4-YL] PIRROLIDINA-3-AMINA). Doi:10.2210 / pdb4KTN / pdb. <https://www.rcsb.org/structure/4KTN>.

CAMPOS, JF, Espindola, PP de T., Torquato, HFV, Vital, WD, Justo, GZ, Silva, DB,... dos Santos, EL (2017). Extratos de folhas e raízes de *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) promovem a morte apoptótica de células leucêmicas por meio da ativação de cálcio intracelular e caspase-3. *Frontiers in Pharmacology*, 8. doi:10.3389 / fphar.2017.00466

CARACELLI, I., Maganhi, S. H., de Oliveira Cardoso, J., Cunha, R. L. O. R., Vega-Tejido, M. A., Zukerman Schpector, J., & Tiekink, E. R. T. (2018). Crystallographic and docking (Cathepsins B, K, L and S) studies on bioactive halotelluroxetanes. *Zeitschrift Für Kristallographie - Crystalline Materials*, 233(2), 113–124. doi:10.1515/zkri-2017-2079

CARVALHO, Ana Flávia Azevedo. Purificação e caracterização bioquímica da α -glicosidase termoestável produzida por *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756. 2010. 97

f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2010. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/103951>>.

CASTRO, R. M. F. et al. Diabetes mellitus e suas complicações - uma revisão sistemática e informativa. *Brazilian Journal of Health Review*, Curitiba, v.4, n.1, p.3349-3391 jan./feb. 2021. DOI:10.34119/bjhrv4n1-263

CHEN, L., Gnanaraj, C., Arulselvan, P., El-Seedi, H., & Teng, H. (2019). A review on advanced microencapsulation technology to enhance bioavailability of phenolic compounds: Based on its activity in the treatment of Type 2 Diabetes. *Trends in Food Science & Technology*. doi:10.1016/j.tifs.2018.11.026

CIRKOVIC VELICKOVIC, TD e Stanic-Vucinic, DJ (2017). O papel dos compostos fenólicos da dieta na digestão de proteínas e tecnologias de processamento para melhorar suas propriedades antinutritivas. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17 (1), 82–103. doi: 10.1111 / 1541-4337.12320

CUNHA, R. L. O. R., Zukerman-Schpector, J., Caracelli, I., & Comasseto, J. V. (2006). Revisiting the addition reaction of TeCl₄ to alkynes: The crystal structure and docking studies of 1-chloro-2-trichlorotelluro-3-phenylpropen-2-ol. *Journal of Organometallic Chemistry*, 691(23), 4807–4815. doi:10.1016/j.jorganchem.2006.05

CZAIKOSKI, K., Mesomo. M.C., Kruger, R.L., Queiroga, C.L., Corazza. M.L. 2015. Extraction of *Campomanesia xanthocarpa* fruit using supercritical CO₂ and bioactivity assessments. *The Journal of Supercritical Fluids*. 98: 7985.<http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2015.01.006>

D. SALES, PM, Souza PM, Simeoni LA, Silveira D. α -Amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. *J Pharm Pharm Sci*. 2012;15(1):141-83.doi: 10.18433/j35s3k. PMID: 22365095.

DACOREGGIO, M.V., Moroni, L.S., Kempka, A.P. 2019. Antioxidant, antimicrobial and allelopathi activities and surface disinfection of the extract of *Psidium cattleianum* sabine leaves. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 21(Sep), 101295. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101295>.

DAI, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 15(10), 7313–7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>

DE LIMA FRANZEN, F.; FRIES, L. L. M.; DE OLIVEIRA, M. S. R.; LIDÓRIO, H. F.; MENEGAES, J. F.; LOPES, S. J. Teor e rendimento de extratos de flores obtidos por diferentes métodos e períodos de extração. *Acta Iguazu*, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 9–21, 2018. DOI: 10.48075/actaiguazu.v7i1.16765. Disponível em: <https://e-revista.unioeste.br/index.php/actaiguazu/article/view/16765>. Acesso em: 13 nov. 2021.

DE QUEIROZ, J. M. G. Aspectos populares e científicos do uso de espécies de *Eugenia* como fitoterápico. *Revista Fitos Eletrônica*, v. 9, n. 2, p. 87–100, 2015. Disponível em: <http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/228>. Acesso em: 03 de jul. de 2020

DESAI, J., Liu, Y.L., Wei, H., Liu, W., Ko, T.P., Guo, R.T., Oldfield, E. 2016. Structure, function, and inhibition of *Staphylococcus aureus* heptaprenyl diphosphate synthase. *ChemMedChem* 11: 1915-1923. <http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.201600311>.

DOMINGOS, Isabelle; BRUNELLI, Sandra Regina; BALDOTTO, Suelen Berger. *Salmonella* spp.: uma revisão. *Revista FAIT, Itapeva, São Paulo*, v. 2, n. 3, p. 15, 2015. Disponível em: http://fait.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/q399yynEtu5Lpbn_2015-2-3-15-43-4.pdf. Acesso em: 08 de jul. de 2020

DRUMOND, Sheila Neves et al. Identificação molecular de *Escherichia coli* diarreiogênica na Bacia Hidrográfica do Rio Xopotó na região do Alto Rio Doce. *Eng Sanit Ambient* | v.23 n.3 | maio/jun 2018 | 579-590. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/esa/v23n3/1809-4457-esa-23-03-579.pdf>. Acesso em: 08 de jul. de 2020

ESPINDOLA, P. P. de T., Rocha, P. dos S. da, Carollo, C. A., Schmitz, W. O., Pereira, Z. V., Vieira, M. do C., ... de Picoli Souza, K. (2016). Antioxidant and Antihyperlipidemic Effects of *Campomanesia adamantium* O. Berg Root. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1–8. doi:10.1155/2016/7910340

FERREIRA, L. C., Grabe-Guimarães, A., de Paula, C. A., Michel, M. C., Guimarães, R. G., Rezende, S. A., de Souza Filho, J. D., & Saúde-Guimarães, D. A. (2013). Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Campomanesia adamantium*. *Journal of ethnopharmacology*, 145(1), 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.10.037>.

FORTES, T.P et al. Ilhas de patogenicidade de *Salmonella enterica*: uma revisão. *Rev Inst Adolfo Lutz*. São Paulo, 2012; 71(2):219-27. Disponível em:http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S007398552012002000001&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 08 de jul. 2020

HE, J., An, Q., Yang, T., & Luo, Y. (2020). Inibidores da diidrofolato redutase para uso como agentes antimicrobianos. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 112268. doi: 10.1016 / j.ejmech.2020.112268

GONÇALVES, Rui & Mateus, Nuno & Freitas, Victor. (2011). Inhibition of α -amylase activity by condensed tannins. *Food Chemistry*. 125. 665-672. 10.1016/j.foodchem.2010.09.061.

GOULA, AM (2013). Extração assistida por ultrassom de óleo de semente de romã - Modelagem cinética. *Journal of Food Engineering*, 117 (4), 492–498. doi: 10.1016 / j.jfoodeng.2012.10.009

GUIDO, RVC, Oliva, G., & Andricopulo, AD (2012). Abordagens de desenho de drogas baseadas em estrutura e ligante para doenças tropicais negligenciadas. *Pure and Applied Chemistry*, 84 (9), 1857-1866. doi: 10.1351 / pac-con-11-11-07

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. DA S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422010000300035&script=sci_abstract&tlng=ES. Acesso em: 03 de jul. de 2020

HASTON, E. [et al]. The Linear Angiosperm Phylogeny Group (LAPG) III: a linear sequence of the families in APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*. London. v. 161, n. 2, 2009.

HEASLET, H., Harris, M., Fahnoe, K., Sarver, R., Putz, H., Chang, J., Subramanyam, C., Barreiro, G., Miller, J.R. 2009. Structural comparison of chromosomal and exogenous dihydrofolate reductase from *Staphylococcus aureus* in complex with the potent inhibitor trimethoprim. *Proteins* 76: 706. <http://dx.doi.org/10.1002/prot.22383>.

HITZ, Débora & Barbosa, Marielli & Nezelro, Marina & Mazur, Caryna. (2018). Ação Dos Compostos Fenólicos Na Aterosclerose: Uma Revisão. *Visão Acadêmica*. 19. 10.5380/acd.v19i1.57729. Disponível: https://www.researchgate.net/publication/325437982_acao_dos_compostos_fenolicos_na_a_aterosclerose_uma_revisao. Acesso em: 15 de jun. de 2020

Kajiya, K., Hojo, H., Suzuki, M., Nanjo, F., Kumazawa, S., & Nakayama, T. (2004). Relationship between antibacterial activity of (+)-catechin derivatives and their interaction with a model membrane. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(6), 1514–1519. <https://doi.org/10.1021/jf0350111>.

KESZEI, A. et al . Relações funcionais e evolutivas entre terpenos sintases do Myrtaceae australiano. *Fitoquímica* , v. 71, p. 844-52, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/hoehnea/v42n3/0073-2877-hoehnea-42-03-0497.pdf>. Acesso em: 03 de jul. de 2020

KLAFKE, JZ, da Silva, MA, Panigas, TF, Belli, KC, de Oliveira, MF, Barichello, MM,... Viecili, PRN (2010). Efeitos da *Campomanesia xanthocarpa* em parâmetros bioquímicos, hematológicos e de estresse oxidativo em pacientes hipercolesterolêmicos. *Journal of Ethnopharmacology*, 127 (2), 299-305. doi: 10.1016 / j.jep.2009.11.004

LIMA, Mayara Ingrid Sousa. Desenvolvimento de peptídeos miméticos de antígenos do *M. leprae* e implicações no diagnóstico e prognóstico da hanseníase. 2015. 103 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/15760>. Acesso em: 11/112019.

LORENZI H; [et al.]. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil, Nova Odessa, Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2009.

LÜBBERS, T., Angehrn, P., Gmünder, H., & Herzig, S. (2007). Estudos de design, síntese e relação estrutura-atividade de novos inibidores fenólicos da girase do DNA. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17 (16), 4708–4714. doi: 10.1016 / j.bmcl.2006.12.065

LUCKMANN, Daiane. Ocorrência de *Paraulaca dives* (Coleoptera: Chrysomelidae) em *Campomanesia xanthocarpa* (Myrtaceae), no estado do Paraná, Brasil. *Brazilian Journal of Applied Technology for Agricultural Science*, Guarapuava-PR, v.8, n.2, p.99-103, 2015. Disponível em: <https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:hSkXY2pF0kJ:https://revistas.unicentro.br/index.php/repaa/article/download/3628/2911+&cd=1&hl=ptBR&ct=clnk&gl=br>. Acesso em: 08 de jul. de 2020.

MARKMAN, B. E. O., BACCHI, E. M., KATO, E. T. Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 94, p. 55-57, 2004.

MARTINS, N., Petropoulos, S., & Ferreira, I. C. (2016). Chemical composition and bioactive compounds of garlic (*Allium sativum* L.) as affected by pre- and post-harvest conditions: A review. *Food chemistry*, 211, 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.029>.

MARTINS, Vilásia Guimarães. Hidrolisado protéico de pescado obtido por vias químicas e enzimáticas a partir de corvina. 2009. Disponível em: http://quimicanova.s bq.org.br/imagebank/pdf/Vol32No1_61_11-AR07586.pdf. Acesso em: 07/11/2019.

MEDINA, A. L. Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and proliferative effect on human cancer cells. *Food Chemistry*, v. 128, p. 916-922, 2011.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. CULTIVA.WEB. Disponível em: http://marsv103.agricultura.gov.br/proton/cultivarweb/cultivares_registradas.php?acao=pesquisar&postado. Acesso em 15 de jun. de 2020

MISSIOUI, M., Mortada, S., Guerrab, W., Serdaroğlu, G., Kaya, S., Mague, J. T., ... Ramli, Y. (2021). Novel antioxidant quinoxaline derivative: Synthesis, crystal structure, theoretical studies, antidiabetic activity and molecular docking study. *Journal of Molecular Structure*, 1239, 130484. doi:10.1016/j.molstruc.2021.1304

MIYAKE, S., Kim, S., Suda, W., Oshima, K., Nakamura, M., Matsuoka, T., Chihara, N., Tomita, A., Sato, W., Kim, S. W., Morita, H., Hattori, M., & Yamamura, T. (2015). Dysbiosis in the Gut Microbiota of Patients with Multiple Sclerosis, with a Striking Depletion of Species Belonging to Clostridia XIVa and IV Clusters. *PloS one*, 10(9), e0137429. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137429>

MORAES, George Henrique Kling de et al. Perfil enzimático de α -amilase, lipase e tripsina do pâncreas e crescimento do fígado, intestino e pâncreas de frangos de corte na fase de 1 a 21 dias de idade. *Revista Brasileira de Zootecnia* [online]. 2009, v. 38, n. 11 [Acessado 5 Novembro 2021], pp. 2188-2192. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1516-35982009001100017>>. Epub 05 Jan 2010. ISSN 1806-9290. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982009001100017>.

NAPOLI, Bruna et al. Elaboração de geleia tradicional e light de guabiroba. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/108182/1/2014-CrisH-CBF-Elaboracao.pdf>. Acesso em: 08 de maio de 2020.

NASCIMENTO, Sarah Rezende et al. Development and sensorial analysis of bar chocolates added from powder of dehydrated gabioba. *Revista Desafios* – v. 6, Especial, 2019. Disponível em: [file:///C:/Users/Renata/Downloads/6873-Texto%20do%20artigo-32514-1-10-20190616%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Renata/Downloads/6873-Texto%20do%20artigo-32514-1-10-20190616%20(1).pdf). Acesso em: 08 de maio de 2020

NERI-NUMA, I. A., Soriano Sancho, R. A., Pereira, A. P. A., & Pastore, G. M. (2018). Small Brazilian wild fruits: Nutrients, bioactive compounds, health-promotion properties and commercial interest. *Food Research International*, 103, 345–360. doi:10.1016/j.foodres.2017.10.05

NOGUEIRA, J. M. R.; MIGUEL, L.F.S. Bacteriologia. IN: AMENDOEIRA et al. Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratório de Saúde. Vol IV 221-39, 2010. Disponível em: https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/27486/2/jaime_antonio.pdf. Acesso em: 03 de jul. de 2020

NOVOZYMES. Metas para 2020. Disponível em: <https://www.novozymes.com/pt/about-us>. Acesso em: 12/11/2019.

OLIVEIRA, BD, Rodrigues, AC, Cardoso, BMI, Ramos, ALCC, Bertoldi, MC, Taylor, JG,...Pinto, UM (2016). Atividades antioxidante, antimicrobiana e anti-quorum sensing do extratofenólico de *Rubus rosaefolius*. *Industrial Crops and Products*, 84, 59-66. doi: 10.1016 /j.indcrop.2016.01.037

OLIVEIRA, R. da S., Lucas, C. P., Antonucci, G., & da Silva, F. C. (2018). Compostos bioativos naturais: agentes promissores na redução do estresse oxidativo e processos inflamatórios. *South American Journal of Basic Education, Technical and Technological* , 5(2). Recuperado de <https://periodicos.ufac.br/index.php/SAJEBTT/article/view/1643>. Acesso em: 15 de junho de 2020.

OLIVEIRA, Rosilene dos Santos et al. Application of an ultrasound process to extract catechins from green tea wastes. v. 7, n. 3 (2016). Disponível em: <https://periodicos.utfpr.edu.br/rebrapa/article/view/3724>. Acesso em: 07 nov. 2021.

OSTROSKY, Elissa A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia* [online]. 2008, v. 18, n. 2 [Acessado 20 Novembro 2021] , pp. 301-307. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000200026>>. Epub 01 Ago 2008. ISSN 1981-528X. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000200026>.

OTA, Masafumi & Okamoto, Takeshi & Hoshino, Wataru & Wakabayashi, Hidehiko. (2009). Action of alpha-D-glucosidase from *Aspergillus niger* towards dextrin and

starch.Carbohydrate Polymers - CARBOHYD POLYM. 78. 287-291.10.1016/j.carbpol.2009.03.047.

PADOVEZE, MC; Infecções associadas à saúde em FORTALEZA, CMCB:challenges to public health in Brazil. *Revista de Saúde Pública*, v. 48, n. 6, p. 995–1001, 2014. Disponível em: https://www.scielo.br/pdf/rsp/v48n6/pt_0034-8910-rsp-48-6-0995.pdf. Acesso em: 03 de jul. de 2020

PALOZZA, P., Catalano, A., Simone, RE, Mele, MC, & Cittadini, A. (2012). Efeito do Licopeno e Produtos de Tomate no Metabolismo do Colesterol. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 61 (2), 126-134. doi: 10.1159 / 000342077.

PANDEY, A.; TRIPATHI, S. Concept of standardization, extraction and phytochemical screening strategies for herbal drug. *Journal of pharmacy phytochemistry*. v. 2, n. 5, p. 115-9, 2014. Disponível em: <http://www.phytojournal.com/vol2Issue5/11.1.html>. Acesso em: 16 de jun. de 2020.

PEREIRA, A.; Coelho Rodrigues, C.; Luis Gasparotto Denardin, E.; Reisdorfer Paula, F. Estudos de docking molecular para compreensão do mecanismo de ação antiparkinson da apocinina e diapocinina. *Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão*, v. 9, n. 2, 3 mar. 2020.

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. 2011.

PEREIRA, Elisa & Vinholes, Juliana & Vizzotto, Márcia & Dalmazzo, Gabriel & Nora, Leonardo. (2016). Extratos de polpa e de semente de araçá inibem alfa-glicosidase com diferente intensidade. Disponível: https://www.researchgate.net/publication/321109355_Extratos_de_polpa_e_de_semente_de_araca_inibem_alfa-glicosidase_com_diferente_intensidade. Acesso em: 19 nov. 2021.

PEREIRA, L.L.S. et al. Atividade das glicosidases na presença de chá verde e de chá preto. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* [online]. 2010, v. 12, n. 4 [Acessado 19

Novembro 2021] , pp. 516-518. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1516-05722010000400017>>. Epub 14 Jan 2011. ISSN 1983-084X. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722010000400017>.

PETRY, F., Dall'Orsoleta, B. B., Scatolin, M., Morgan, L. V., Alves, B. O., Anzollin, G. S., Zilli, G., Scapinello, J., Danielli, L. J., Soares, K. D., Apel, M., Oliveira, J. V., Magro, J. D., & Müller, L. G. (2021). Anti-Inflammatory Effects of *Campomanesia xanthocarpa* Seed Extract Obtained from Supercritical CO₂. Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM, 2021, 6670544. <https://doi.org/10.1155/2021/6670544>

PORTO, C., Porretto, E., & Decorti, D. (2013). Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. Ultrasonics Sonochemistry, 20(4), 1076–1080. doi:10.1016/j.ultsonch.2012.12.00

PURI, M., Sharma, D., & Barrow, CJ (2012). Extração assistida por enzimas de bioativos de plantas. Trends in Biotechnology, 30 (1), 37-44. doi: 10.1016 / j.tibtech.2011.06.014R., 2008. Methods for evaluation of the antimicrobial activity and determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of plant extracts. Rev. Bras. Farmacogn. 18 (2), 301–307. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000200026>.

RADICE, M. et al. Herbal extracts, lichens and biomolecules as natural photo-protection alternatives to synthetic UV filters. A systematic review. Fitoterapia, [Amsterdam], v. 114, p. 144-162, Oct. 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0367326X1630377X>. Acesso em: 04 de Nov. de 2021.

RAMADHAN, AH, Nawas, T., Zhang, X., Pembe, WM, Xia, W., & Xu, Y. (2017). Purificação e identificação de um novo peptídeo antidiabético do hidrolisado de proteína da salamandra gigante chinesa (*Andrias davidianus*) contra α -amilase e α -glucosidase. International Journal of Food Properties, 20 (sup3), S3360 – S3372. doi: 10.1080 / 10942912.2017.1354885

RAMASUBBU, N. et al. Solução de estrutura e refinamento da amilase salivar humana recombinante. 2001. Doi:10.2210 / pdb1c8q / pdb. <https://www.rcsb.org/structure/1C8Q>

RAPHAELLI, C. O., Pereira, E. dos S., Camargo, T. M., Ribeiro, J. A., Pereira, M. C., Vinholes, J., ... Nora, L. (2021). Biological activity and chemical composition of fruits, seeds and leaves of guabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg – Myrtaceae): A review. *Food Bioscience*, 40, 100899. doi:10.1016/j.fbio.2021.100899

RASOULI, H., Hosseini-Ghazvini, S. M., Adibi, H., & Khodarahmi, R. (2017). Differential α -amylase/ α -glucosidase inhibitory activities of plant-derived phenolic compounds: a virtual screening perspective for the treatment of obesity and diabetes. *Food & function*, 8(5), 1942–1954. <https://doi.org/10.1039/c7fo00220c>

REMPE, CS, Burris, KP, Lenaghan, SC e Stewart, CN (2017). O potencial da biologia de sistemas para descobrir mecanismos antibacterianos de fenólicos de plantas. *Frontiers in Microbiology*, 8. doi: 10.3389 / fmicb.2017.00422

REYGAERT W. C. (2018). Green Tea Catechins: Their Use in Treating and Preventing Infectious Diseases. *BioMed research international*, 2018, 9105261. <https://doi.org/10.1155/2018/9105261>

RODRÍGUEZ-PÉREZ, C., Quirantes-Piné, R., Fernández-Gutiérrez, A., & Segura-Carretero, A. (2015). Optimization of extraction method to obtain a phenolic compounds-rich extract from *Moringa oleifera* Lam leaves. *Industrial Crops and Products*, 66, 246–254. doi:10.1016/j.indcrop.2015.01.002

ROSA, Roger et al. Estimated hospitalizations attributable to Diabetes Mellitus within the public healthcare system in Brazil from 2008 to 2010: study DIAPS 79. *Revista da Associação Médica Brasileira* [online]. 2014, v. 60, n. 3 [Accessed 12 November 2021], pp. 222-230. Available from: <<https://doi.org/10.1590/1806-9282.60.03.010>>. ISSN 1806-9282. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.60.03.010>.

SALLES, B. C. C., Silva, M. A. da, Taniguthi, L., Ferreira, J. N., Quintino da Rocha, C., Vilegas, W., Dias, P. H., Pennacchi, P. C., Maris da Silveira Duarte, S., Rodrigues,

M. R., Lima Brigagão, M. R. P., & Borges de Araújo Paula, F. (2020). Passiflora edulis Leaf Extract: Evidence of antidiabetic and antiplatelet effects in rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 43(1), 169–174. <https://doi.org/10.1248/bpb.b18-00952>.

SAMARDI, Bahareh H. et al. Peptídeos antioxidantes de proteínas alimentares: uma revisão. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.06.020>. Acesso em: 11/11/2019

SANT'ANNA LS, Merlugo L, Ehle CS, Limberger J, Fernandes MB, Santos MC, Mendez ASL, Paula FR, Moreira CM. Composição Química e Efeito Hipotensivo de *Campomanesia xanthocarpa*. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2017; 2017: 1591762. doi: 10.1155 / 2017/1591762. Epub 11 de maio de 2017. PMID: 28584558; PMCID: PMC5443999.

SANTOS, I.J. & Santos, Y.L. & Oliveira, M.G.A. & Silva, P.H.A.. (2010). Expressão Da Alfa E Beta Amilase Durante A Germinação De Cevada. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*. 12. 67-73. 10.15871/1517-8595/rbpa.v12n1p67-73.

SANTOS, Marli da Silva et al. Perfil antioxidante e de ácidos graxos de sementes de gabioba (*Campomanesia Xanthocarpa* Berg). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 32, n. 2, p. 234-238, junho de 2012. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010120612012000200004&lng=en&nrm=iso>. acesso em 16 de junho de 2020. Epub 17 de abril de 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S010120612012005000045>.

SARMENTO, M. B; SILVA, A. C. S.; SILVA, C. S. Recursos genéticos de frutas nativas da família Myrtaceae no Sul do Brasil. *Magistra, Cruz das Almas, Bahia*, v. 24, n. 4, p. 250-262, out./dez. 2012.

SAVI, Patrícia do Rocio Smolinski et al. Análise de flavonoides totais presentes em algumas frutas e hortaliças convencionais e orgânicas mais consumidas na região sul do Brasil. Disponível em: <https://www.epublicacoes.uerj.br/index.php/demetra/article/view/22391>. Acesso em: 09 de jun de 2021

SCHIASSI, MCE, SOUZA, VRd, LAGO, AMT, CAMPOS, LG, QUEIROZ, F. Região do Cerrado Brasileiro: Caracterização Físico-Química, Compostos Bioativos, Atividades Antioxidantes, Avaliação Sensorial e Química dos Alimentos (2017), DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.104>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814617317454?via%3Dih> b. Acesso em: 16 de jun. de 2020

SERAGLIO, S., Valse, A. C., Daguer, H., Bergamo, G., Azevedo, M. S., Gonzaga, L. V., Fett, R., & Costa, A. (2016). Development and validation of a LC-ESI-MS/MS method for the determination of phenolic compounds in honeydew honeys with the diluted-and-shoot approach. *Food research international* (Ottawa, Ont.), 87, 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.06.019>.

Setzer, W. N., , Sharifi-Rad, J., Mnayer, D., Tabanelli, G., Stojanović-radić, Z. Z., Sharifi-Rad, M., Yousaf, Z., Vallone, L., & Iriti, M. (2016). Plants of the genus *Allium* as antibacterial agents: From tradition to pharmacy. *Cellular and Molecular Biology*, 62(9), 57–68. <https://doi.org/10.14715/cmb/2016.62.9.10>

SHAKTHI Deve, A., Sathish kumar, T., Kumaresan, K., & Rapheal, V. S. (2014). Extraction process optimization of polyphenols from Indian *Citrus sinensis* – as novel antiglycative agents in the management of diabetes mellitus. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 13(1), 11. doi:10.1186/2251-6581-13-11

SILVA, Hérica Ribeiro et al. Listeriose: uma doença de origem alimentar pouco conhecida no Brasil. *Higiene Alimentar - Vol.30 - nº 262/263 - Novembro/Dezembro de 2016*. Disponível em: <http://docs.bvsalud.org/biblioref/2017/02/827444/262-263-compressed-17-20.pdf>. Acesso em: 08 de jul. de 2020.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produto vegetais. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, PR, v. 31, n. 3 p. 669-682, jul./set. 2010. Disponível em: <http://andorinha.epagri.sc.gov.br/consultawebsite/busca?b=ad&id=88287&biblioteca=vazio&busca=autoria:%20KOBLITZ,%20M.%20G.%20B.%22&qFacets=autoria:%20KOBLITZ,%20M.%20G.%20B.%22&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1>. Acesso em 05 de out de 2021

SILVA, Manoela de Souza Araújo et al. Atividade antimicrobiana e antiaderente in vitro do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. sobre bactérias orais planctônicas. *Revista Brasileira de Farmacognosia* [online]. 2008, v. 18, n. 2 [Acessado 19 Novembro 2021] , pp. 236-240. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000200017>>. Epub 01 Ago 2008. ISSN 1981-528X. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000200017>.

SILVA, Sheila Gomes da et al. A importância medicinal dos flavonóides na saúde humana, com ênfase na espécie *Arrabidaea chica* (Bonpl.) B. Verl. 2018. Disponível em: <https://revista.ajes.edu.br/revistasnoroeste/index.php/revisajes/article/view/2>. Acesso em: 09 de jun de 2021

SIMONETTI, E. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Eugenia anômala* e *Psidium salutare* (Myrtaceae) frente à *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* [online]. 2016, v. 18, n. 1 [Acessado 19 Novembro 2021] ,pp. 9-18. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1983-084X/15_005>. ISSN 1983-084X. https://doi.org/10.1590/1983-084X/15_005.

SIM,L., Quezada-Calvillo, Sterchi, E. E., Nichols, B.L, Rose, D.R. 2008. Human intestinal maltase glucoamylase: crystal structure of the n-terminal catalytic subunit and basis of inhibition and substrate specificity. *Journal of Molecular Biology*, 375(3): 782-792. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.10.069>.

SINGH, N., Mansoori. A., Jiwani, G., Solanke, A.U., Thakur, T.K., Kumar, R., Chaurasiya, antimicrobial study of *Schefflera vinosa* leaves crude extracts against rice pathogens. *Arabian Journal of Chemistry*, 14: 103243. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103243>

SOBRAL, M.,Proença, C.,Souza, M.,Mazine, F.,Lucas, E. 2015. Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB19830>>.

SPINA, M., Cuccioloni, M., Mozzicafreddo, M., Montecchia, F., Pucciarelli, S., Eleuteri, A. M., ... Angeletti, M. (2008). Mechanism of inhibition of wt-dihydrofolate

reductase from *E. coli* by tea epigallocatechin-gallate. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 72(1), 240–251. doi:10.1002/prot.21914

STAPLETON, P. D., Shah, S., Ehlert, K., Hara, Y., & Taylor, P. W. (2007). The beta-lactam-resistance modifier (-)-epicatechin gallate alters the architecture of the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology (Reading, England)*, 153(Pt 7), 2093–2103. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/007807-0>

STOJKOVIC, D., Smiljkovic, M., Ciric, A., Glamoclija, J., Van Griensven, L., Ferreira, ICFR, & Sokovic, M. (2019). Uma visão sobre as propriedades antidiabéticas de seis cogumelos medicinais e comestíveis: Inibição de α -amilase e α -glucosidase associada ao diabetes tipo 2. *South African Journal of Botany*. doi: 10.1016 / j.sajb.2018.01.007

TADERA, K., Minami, Y., Takamatsu, K., Matsuoka, T. Inhibition of α - glucosidase and α mylase by flavonoids. *Journal of nutritional science and vitaminology*, v. 52, n. 2, p. 149-153, 2006.

TCHINDA, C. F., Voukeng, I. K., Beng, V. P., & Kuete, V. (2017). Antibacterial activities of the methanol extracts of *Albizia adianthifolia*, *Alchornea laxiflora*, *Laportea ovalifolia* and three other Cameroonian plants against multi-drug resistant Gram-negative bacteria. *Saudi journal of biological sciences*, 24(4), 950–955. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.01.033>

TENORIO, Tchiara Margarida Alves. Composição química e atividade acaricida dos óleos essenciais das folhas de *Blepharocalyx salicifolius* (KUNTH) O. BERG e *Campomanesia adamantium* (CAMBSS.) O. BERG contra o ácaro rajado (*Tetranychus urticae* KOCH). Disponível em: https://repository.ufrpe.br/bitstream/123456789/872/1/tcc_tchiamargaridaalvesten%3%B3rio.pdf. Acesso em 29 de maio de 2021

TRABELSI, N.; Waffo-Teguo, P.; Snoussi, M.; Ksouri, R.; Merillon, J. M.; Smaoui, A.; Abdelly, C. Variability of phenolic composition and biological activities of two Tunisian halophyte species from contrasted regions. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 35, n. 3, p. 749–761, 2013.

VALLILO, Maria Isabel et al. Composição química dos frutos de *Campomanesia xanthocarpa* Berg-Myrtaceae. Food Science and Technology [online]. 2008, v. 28, n. suppl [Acessado 11 Novembro 2021] , pp. 231-237. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000500035>>. Epub 26 Fev 2009. ISSN 1678-457X.<https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000500035>.

VALLILO, Maria Isabel; LAMARDO, Leda Conceição Antônia; GABERLOTTI, Maria Lima; OLIVEIRA, Elisabeth de; MORENO, Paulo Roberto Hrihorowitsch. Composição química dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O.Berg. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 26, n. 4, p. 805-810, 2006. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/cta/v26n4/14.pdf> > DOI: 10.1590/s0101-20612006000400015.

VAN DER MAAREL MJ, van der Veen B, Uitdehaag JC, Leemhuis H, Dijkhuizen L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family. J Biotechnol. 2002 Mar 28;94(2):137-55. doi: 10.1016/s0168-1656(01)00407-2. PMID: 11796168.1

VEGA-TEIJIDO, M., Caracelli, I., & Zukerman-Schpector, J. (2006). Conformational analyses and docking studies of a series of 5-nitrofur- and 5-nitrothiophen-semicarbazone derivatives in three possible binding sites of trypanothione and glutathione reductases. Journal of Molecular Graphics and Modelling, 24(5), 349–355. doi:10.1016/j.jm gm.2005.09.008

VELDERRAIN-RODRÍGUEZ, GR, Palafox-Carlos, H., Wall-Medrano, A., Ayala-Zavala, JF, Chen, C.-YO, Robles-Sánchez, M.,... González-Aguilar, GA (2014). Compostos fenólicos: sua jornada após a ingestão. Food Funct., 5 (2), 189–197. doi: 10.1039 / c3fo60361j. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2014/FO/C3FO60361J#!divAbstract>. Acesso em:15 de jun. de 2020

VONGSAK, B., Sithisarn, P., Mangmool, S., Thongpraditchote, S., Wongkrajang, Y., & Gritsanapan, W.(2013). Maximização de fenólicos totais, conteúdo de flavonóides totais e atividade antioxidante do extrato de folhas de *Moringa oleifera* pelo método de

extração apropriado. *Industrial Crops and Products*, 44, 566–571. doi:10.1016 / j.indcrop.2012.09.021

WANG L, Tu YC, Lian TW, Hung JT, Yen JH, Wu MJ. Distinctive antioxidant and antiinflammatory effects of flavonols. *J Agric Food Chem*. 2006 Dec 27;54(26):9798-804.doi: 10.1021/jf0620719. PMID: 17177504.

WHITSON, J. & Mcdougall, Gordon & Ross, H.A. & Lund, Victoria & Hamilton, C.A. & Stewart, Derek. (2010). Bioactive berry components: Potential modulators of health benefits. *Funct. Plant Sci. Biotechnol.*. 4. 34-39.

Zhou, Z. et al. Charge-oriented strategies of tunable substrate affinity based on cellulase and biomass for improving in situ saccharification: A review. *Bioresource Technology*, [Kidlington], v. 319, 124159, Jan. 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852420314334>. Acesso em: 04 de nov. 2021.