



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

CARLOS EDUARDO GONÇALVES MAIA

**ANÁLISE DO POTENCIAL FITOQUÍMICO DE *XIMENIA AMERICANA* E
CAPACIDADE ANTIGLICANTE DA MANGIFERINA E DOS EXTRATOS
METANÓLICOS OBTIDOS DAS FOLHAS DE CAFÉ.**

Fortaleza
2018

CARLOS EDUARDO GONÇALVES MAIA

ANÁLISE DO POTENCIAL FITOQUÍMICO DE *XIMENIA AMERICANA* E
CAPACIDADE ANTIGLICANTE DA MANGIFERINA E DOS EXTRATOS
METANÓLICOS OBTIDOS DAS FOLHAS DE CAFÉ.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química Orgânica.

Orientador: Profa. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan.

Coorientador: Robert Wyn Owen

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M185a Maia, Carlos Eduardo Gonçalves.

Análise do potencial fitoquímico de *Ximenia americana* e capacidade antiglicante da mangiferina e dos extratos metanólicos obtidos das folhas de café. / Carlos Eduardo Gonçalves Maia. – 2018.

97 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2018.

Orientação: Profa. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan.

Coorientação: Prof. Dr. Robert Wyn Owen.

1. Produtos de glicação avançada.. 2. Captura de compostos dicarbonílicos.. 3. *Ximenia americana*.. 4. Potencial antioxidante.. 5. Acetilcolinesterase.. I. Título.

CDD 572

CARLOS EDUARDO GONÇALVES MAIA

ANÁLISE DO POTENCIAL FITOQUÍMICO DE *XIMENIA AMERICANA* E
CAPACIDADE ANTIGLICANTE DA MANGIFERINA E DOS EXTRATOS
METANÓLICOS OBTIDOS DAS FOLHAS DE CAFÉ.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química Orgânica.

Orientador: Profa. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan.

Coorientador: Robert Wyn Owen

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo.
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço tudo a essa onda eletromagnética chamada DEUS, que sempre me dá força e me impulsiona no caminho da resolução das problemáticas que tentam me afrontar.

Aos meus pais, Vicente de Paulo Maia Silva, meu “gordinho” e Estelina Gonçalves Maia, minha “baixinha”, pelos fundamentos de respeito, educação, perseverança e amor que foram e ainda são repassados.

A todos os meus professores que, com muito empenho e dedicação, me deram a orientação e a motivação para continuar sempre em busca do ganho de conhecimento.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan, pela oportunidade, orientação e confiança depositada em mim .

Aos meus coorientadores, Dra. Írila Ricarte e Prof. Dr. Samuel Pedro Dantas. Sem eles, esse trabalho não teria sido executada com tanto primor.

Ao Professor Dr. Robert Wyn Owen, pela realização de alguns experimentos no laboratório de sua chefia, o DKFZ, na Alemanha;

Às minhas amigas Denise (“a lôra”) e Ana Maria por toda a dedicação que tiveram por mim tanto nos momentos de maior aperreio quanto nos momentos de descontração.

À Banca Examinadora, pelos comentários e pelas melhorias deste trabalho;
Agradeço às instituições financiadoras UFC, CNPq, CAPES/PDSE, DKFZ/NCT e EMBRAPA.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O presente trabalho apresenta a avaliação de algumas propriedades farmacológicas e composição química dos extratos metanólicos e hexânicos de folhas, caule e raiz de *Ximenia americana* (*X. americana*), como também, a avaliação da capacidade antiglicante de extratos metanólicos de folhas de café e de um de seus constituintes, a mangiferina. No que se refere às propriedades farmacológicas de *X. americana*, foi verificado uma ação antioxidante promissora dos extratos metanólicos da raiz e do caule em relação aos ensaios de combate aos radicais DPPH e ABTS. O ensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase, que está relacionado com uma possível ação farmacológica no tratamento da doença de Alzheimer, revelou um potencial significativo para os extratos metanólicos das folhas, tendo em vista que apresentou tamanho de halo igual ao padrão eserina. Os dados acerca da constituição química dos extratos metanólicos de todas as partes avaliadas desta planta demonstraram uma composição bastante diversificada de compostos polifenólicos (flavonóides, ácidos fenólicos e etc), sendo esta a primeira vez que a maioria dessas substâncias foram identificadas nessa espécie e estão sendo relatadas na literatura. Foram identificados um total de 19 compostos, que são: ácido gálico, quinato de ácido gálico, ácido 3,4-di-hidroxibenzoico, procianidina B1, (+)-catequina, ácido clorogênico, procianidina B2, (-)-epicatequina, procianidina C1, procianidina tetrâmera, procianidina pentâmera, 3 compostos isômeros de posição da quercetina arabnosídeo, quercetina ramnosídeo, 3 compostos isômeros de posição do canferol arabnosídeo e o canferol ramnosídeo. Da análise quantitativa dos extratos metanólicos das folhas, caule e raiz, realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência, obteve-se a quercetina ramnosídeo como composto majoritário nas folhas, com um teor de 17,998 g/kg de folhas secas. Já nos extratos do caule e da raiz, os compostos majoritários foram a (+)-catequina, com 12,581 g/Kg e (-)-epicatequina, com 8,547 g/Kg de massa seca, respectivamente. A avaliação da capacidade antiglicante dos extratos metanólicos de café apresentou um resultado satisfatório apenas para uma das amostras de espécies de café avaliadas. A mangiferina, presente nos extratos das folhas de café avaliados, demonstrou ser uma substância com elevada capacidade antiglicante, ou seja, capaz de impedir a formação dos Produtos de Glicação Avançada (AGE's). Tal capacidade é justificada pela formação de adutos oriundos da reação entre a mangiferina e espécies carbonílicas reativas

(RCS), tais como glicoxal (GO) e metilglicoxal (MG). Foram propostos os mecanismos de formação dos adutos.

Palavras-chave: Produtos de glicação avançada. Captura de compostos dicarbonílicos. *Ximenia americana*. Potencial antioxidante. Acetilcolinesterase.

ABSTRACT

The present work presents the evaluation of some pharmacological properties and chemical composition of *Ximenia americana* (*X. americana*) leaf, stem and root extracts, as well as the evaluation of the antiglycant capacity of methanolic extracts of coffee leaves and one of its constituents, the mangiferin. With respect to the pharmacological properties of *X. americana*, a promising antioxidant action of the root and stem methanolic extracts was verified in relation to the radicals DPPH and ABTS. The acetylcholinesterase enzyme inhibition assay, which is related to a possible pharmacological action in the treatment of Alzheimer's disease, revealed a significant potential for the methanolic extracts of the leaves, considering that it had a halo size equal to the eserine pattern. Data on the chemical constitution of methanolic extracts from all evaluated parts of this plant demonstrated a very diverse composition of polyphenolic compounds (flavonoids, phenolic acids and the like), being the first time that most of these substances were identified in this species and are being reported in the literature. A total of 19 compounds have been identified: gallic acid, gallic acid quinate, 3,4-dihydroxybenzoic acid, procyanidin B1, (+) - catechin, chlorogenic acid, procyanidin B2, (-) - epicatechin, procyanidin C1, tetrameric procyanidin, pentameric procyanidin, 3 position isomer compounds of quercetin arabinoside, quercetin rhamnoside, 3 position isomer compounds of kaempferol arabinoside, and kaempferol rhamnoside. From the quantitative analysis of the leaves, stem and root methanolic extracts performed by high performance liquid chromatography, quercetin rhamnoside was obtained as the major compound in the leaves, with a content of 17,998 g / kg of dry leaves. In the stem and root extracts, the major compounds were (+) - catechin, with 12,581 g / kg and (-) - epicatechin, with 8.547 g / kg dry mass, respectively. The evaluation of the antiglycan capacity of the methanolic extracts of coffee presented a satisfactory result only for one of the samples of evaluated coffee species. The mangiferin, present in the extracts of the evaluated coffee leaves, has been shown to be a substance with a high anti-glycation, that is, capable of preventing the formation of Advanced Glycation Products (AGEs). This ability is justified by the formation of adducts from the reaction between mangiferin and reactive carbonyl species (RCS), such as glyoxal (GO) and methylglyoxal (MG). The mechanisms of adduction were proposed.

Keywords: Advanced glycation products. Capture of dicarbonyl compounds. *Ximenia americana*. Potential antioxidant. Acetylcholinesterase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Diferentes partes constituintes de <i>Ximenia americana</i> . (A) Hábitat; (B) Folhas; (C) Caule lenhoso; (D) Flor e espinho; (E) Fruto.	15
Figura 02 - Passos a serem realizados para a realização de extração por soxhlet.	21
Figura 03 - Estabilização do radical DPPH; indicação da cor de cada uma das espécies, seus respectivos comprimentos de onda de absorção e suas intensidades.	22
Figura 04 - Estabilização do radical ABTS ^{•+} por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.	23
Figura 05 - Formação do ânion amarelo 5-tio-2-nitrobenzoato proveniente da reação entre a tiocolina e o íon 5,5'- ditiobis-2-nitrobenzoato.	24
Figura 06 - Estrutura do ácido tânico.....	25
Figura 07 - Preparo do tampão fosfato.	28
Figura 08 - Cromatogramas do extrato metanólico das folhas de <i>Ximenia americana</i> nos comprimentos de onda 257, 278 e 340 nm, respectivamente.....	38
Figura 09 - Cromatogramas do extrato metanólico do caule de <i>Ximenia americana</i> nos comprimentos de onda 257, 278 e 340 nm, respectivamente.....	39
Figura 10 - Cromatogramas do extrato metanólico da raiz de <i>Ximenia americana</i> nos comprimentos de onda 257, 278 e 340 nm, respectivamente.	40
Figura 11 – Estruturas dos compostos identificados nos extratos metanólicos das folhas, caule e raiz de <i>X. americana</i>	42
Figura 12 - Espectro de massa da substância I.....	46
Figura 13 - Espectro de DAD da substância I.	46
Figura 14 - Espectro de massa da substância II.	47
Figura 15 - Espectro de DAD da substância II.	47
Figura 16 - Fluorescência dos ensaios de extratos metanólicos das folhas de café com glicose.	50
Figura 17 - Fluorescência dos ensaios de extratos metanólicos das folhas de café com MG.	51

Figura 18 - Combate à formação dos AGE's utilizando diferentes concentrações de mangiferina (37 °C) em diferentes períodos de incubação em tampão fosfato puro (pH= 6,6). (18-a) procedimentos clássicos (18-b) procedimento com XO.....	53
Figura 19 - Combate à formação dos AGE's utilizando diferentes concentrações de mangiferina (37 °C) na presença da enzima XO em tampão fosfato puro (pH= 6,6); procedimento com glicose (24 e 48 horas).	54
Figura 20 - Combate a formação dos AGE's utilizando diferentes concentrações de mangiferina (37 °C) na presença da enzima XO em tampão fosfato puro (pH= 6,6), procedimento com MG e GO (3 horas).	55
Figura 21 - Flourescência intrínseca em diferentes concentrações de tampão fosfato puro (pH= 6,6) para metilglioxal (MG) e glioxal (GO).	56
Figura 22 - Estrutura dos compostos dicarbonílicos.	57
Figura 23 - Estrutura da mangiferina.	58
Figura 24 - Estruturas de ressonância do intermediário formado pela reação da mangiferina mangiferina, através de C4, com MG (carbocátion formado possui 6 estruturas de ressonância).	59
Figura 25 - Estruturas de ressonância do intermediário formado pela reação da mangiferina mangiferina, através de C5, com MG (carbocátion formado possui 5 estruturas de ressonância).	60
Figura 26 - Estruturas de ressonância do intermediário formado pela reação da mangiferina mangiferina, através de C8, com MG (carbocátion formado possui 4 estruturas de ressonância).	61
Figura 27 - Espectro de massa do aduto isolado.	62
Figura 28 - Espectro de RMN ¹ H da mangiferina.	64
Figura 29 - Espectro de RMN ¹ H do aduto isolado.	65
Figura 30 - Espectro de HSQC da mangiferina.	66
Figura 31 - Espectro de HSQC da mangiferina (ampliado).	66
Figura 32 - Espectro HSQC 1 do aduto isolado.....	67
Figura 33 - Espectro de ¹³ C da mangiferina com a identificação de todos os carbonos associado-os aos seus respectivos deslocamento químicos.	68
Figura 34 - Espectro de ¹³ C do aduto com a identificação de todos os carbonos associado-os aos seus respectivos deslocamento químicos.	69

Figura 35 - Espectro HMBC do aduto.	70
Figura 36 - Espectro HSQC 2 do aduto.	71
Figura 37 - Reação de mangiferina com MG e formação de adutos mono, di e trissubstituídos.	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Concentração de mangiferina nas folhas e nos extratos metanólicos das folhas.	30
Tabela 02 - Resultados do potencial antioxidante de <i>X. americana</i> (extração via soxhlet)	33
Tabela 03 - Resultados de inibição da enzima acetilcolinesterase por meio dos extratos de <i>X. americana</i> (extração via soxhlet).	36
Tabela 04 - Resultados sobre determinação dos compostos fenólicos totais.	38
Tabela 05 - Compostos polifenólicos identificados em CLAE-ESI-MS no modo negativo nos extratos metanólicos de <i>X. americana</i>	41
Tabela 06 - Quantificação dos compostos identificados no extrato metanólico das folhas de <i>Ximenia americana</i>	48
Tabela 07 - Quantificação dos compostos fenólicos identificados no extrato metanólico do caule de <i>Ximenia americana</i>	48
Tabela 08 - Quantificação dos compostos fenólicos identificados no extrato metanólico da raiz de <i>Ximenia americana</i>	49
Tabela 09 - Dados de RMN ¹ H e ¹³ C para mangiferina e aduto isolado; deslocamentos químicos em ppm relativos ao TMS (multiplicidade, constante de acoplamento em Hz).	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAT	Atividade antioxidante total
ABTS ^{•+}	Radical 2,2'- azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
AGE's	Produtos de Glicação Avançada
BHT	Butylated hydroxytoluene (inglês) ou 2,6-di- <i>terc</i> -butil-4- metilfenol
BSA	Albumina de Soro Bovino
DKFZ	Centro Alemão de Pesquisa do Câncer
DPPH	1,2-difenil picril-hidrazil
EC	Concentração equivalente a Trolox
GO	Glioxal
GC/MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas
HPLC-IES-MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com ionização por "eletrospray"
HSA	Albumina de Soro Humano
IC ₅₀	Concentração de cada amostra (mg/L) em que 50% do radical DPPH é capturado.
MG	Metilglioxal
m/z	Relação massa carga
RCS	Espécies carbonílicas reativas
RCS Trapping	Capturadores de RCS
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1
TEAC	Atividade antioxidante em equivalente de Trolox, expresso em μ M trolox/g de extrato metanólico \pm desvio padrão em 6 minutos (ABTS).
XA	<i>Ximenia americana</i>
XO	Enzima xantina oxidase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	18
2.1	Geral	18
2.2	Específicos	18
3	METODOLOGIA	19
3.1	Análise química de <i>X. americana</i>	19
3.1.1	<i>Material Botânico (coleta, identificação e processamento)</i>	19
3.1.2	<i>Preparo dos extrato (extração via soxhlet)</i>	20
3.1.3	<i>Avaliação do Potencial Farmacológico dos extratos de <i>X. americana</i></i>	21
3.1.3.1	<i>Determinação da atividade antioxidante pela captura do radical livre DPPH</i>	21
3.1.3.2	<i>Determinação da atividade antioxidante pela Captura do Radical Livre ABTS^{°+}</i>	22
3.1.4	<i>Ensaio para inibição da enzima acetilcolinesterase</i>	23
3.1.5	<i>Determinação dos fenóis totais nos extratos</i>	25
3.1.6	<i>Análise qualitativa dos compostos polifenólicos em <i>X. americana</i></i>	26
3.1.7	<i>Quantificação dos compostos polifenólicos em <i>X. americana</i></i>	26
3.2	Capacidade antiglicante dos extratos metanólicos das folhas de café e da mangiferina	27
3.2.1	<i>Descrição geral dos métodos de formação do AGE's para avaliação da capacidade antiglicante</i>	27
3.2.2	<i>Material antiglicante – mangiferina e folhas de café (coleta, obtenção dos extratos e soluções metanólicas)</i>	29
3.2.3	<i>Avaliação da capacidade antiglicante das folhas de café (CF₁ e CF₂)</i>	30
3.2.4	<i>Avaliação da capacidade antiglicante da Mangiferina</i>	31

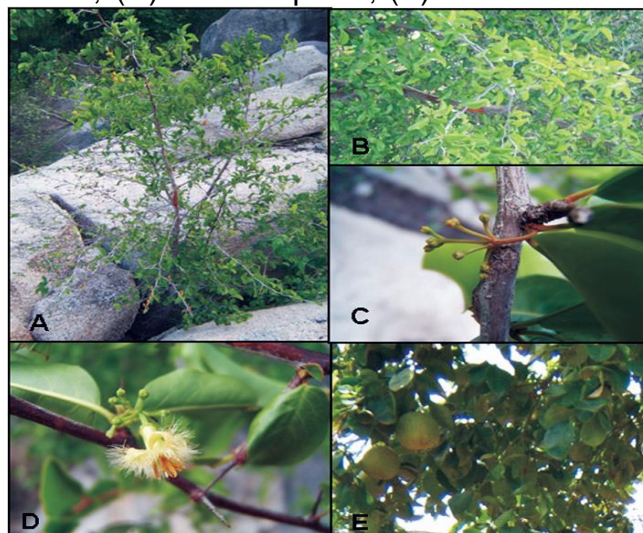
3.2.5	<i>Aquisição de espectros de RMN para a verificação de reação entre mangiferina e metilglioxal.</i>	31
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1	Avaliação química de <i>X. americana</i>.	33
4.1.1	<i>Potencial antioxidante</i>	33
4.1.2	<i>Inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE)</i>	36
4.1.3	<i>Fenólicos totais</i>	37
4.1.4	<i>Análise qualitativa e quantitativa de <i>X. americana</i></i>	38
4.2	Capacidade antiglicante	49
4.2.1	<i>Inibição da formação dos AGE's usando extratos metanólicos das folhas de Café.</i>	49
4.2.2	<i>Inibição da formação dos AGE's usando Mangiferina.</i>	52
5	CONCLUSÕES	73
	REFERÊNCIAS	75
	ANEXO A – ESPECTROS DE MASSA DOS COMPOSTOS DE <i>X. AMERICANA</i>	78
	ANEXO B – ESPECTROS DE DAD DOS COMPOSTOS DE <i>X. AMERICANA</i>	88

1 INTRODUÇÃO

A *Ximenia americana* (XA), popularmente conhecida como ameixa brava, ameixa do mato, ameixa da baía e por vários outros nomes, corresponde a uma planta arbustiva e espinhosa de porte relativamente pequeno, tendo de 3 a 4 metros de altura. Apresenta uma casca de cor avermelhada, fina e lisa ou com alguma rugosidade. Possui folhas inteiras, simples, pecioladas e flores branco-amareladas e aromáticas. Tem frutos de odor característico do tipo drupa de cor amarelada com uma única semente (MATOS 2007) e uma polpa de sabor adocicado (EROMOSELE; EROMOSELE, 2002).

Pertence à família das Olacacea, que possui um grande número de espécies, das quais é a mais comum (JOLY, 2002; SOUZA; LORENZI, 2005). Pode ser encontrada nos continentes asiático, americano, africano e na oceania. Além disso, é muito comum encontrá-la nas regiões tropicais silvestres, incluindo os tabuleiros litorâneos do nordeste do Brasil (MATOS, 2007). É utilizada na medicina popular brasileira no tratamento de várias enfermidades como sífilis, reumatismo, infecções da boca, câncer e dor no estômago (MWANGI et al., 1994). Além do Brasil, muitos países africanos, como a Nigéria, também fazem uso dessa planta em ações medicinais. (OGUNLEYE; IBITOYE, 2003).

Figura 01 - Diferentes partes constituintes de *Ximenia americana*. (A) Hábitat; (B) Folhas; (C) Caule lenhoso; (D) Flor e espinho; (E) Fruto.



Fonte: Veras; Morais, 2004.

A casca de *X. americana* apresenta diversas atividades terapêuticas, sendo muito usada no tratamento de lepra, malária, dor-de-cabeça, infecções da pele e de enfermidades inflamatórias (cicatrização, hemorroidas e inflamações das mucosas). Veras e Morais (2004) atribuem a ação cicatrizante à presença de taninos.

O fruto de *X. americana* é rico em vitamina C, indicando que pode apresentar uma boa ação antioxidante e ser enquadrado como componente da dieta, sendo ingerido puro ou na forma de geleias ou sucos (REZANKA; SIGLER, 2007). Da sua raiz foram extraídos e identificados óleos contendo ácidos graxos acetilênicos (MATOS, 2007).

Das folhas de *X. americana* foi obtido o óleo volátil. O estudo deste óleo utilizando cromatografia gasosa (GC-MS) identificou 33 componentes, dos quais 69% eram de compostos aromáticos, 12,5% de compostos lipídicos e 13% de terpenos (MEVY et al., 2006).

Além disso, a partir de extratos das folhas de *X. americana* proveniente do oeste e do leste da África subsaariana, foram encontrados fitoquímicos bioativos, cuja investigação levou à identificação de sambunigrin, ácido gálico e quercetina (LE et al., 2012)

Microorganismos patogênicos como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Escherischia coli*, *Shigella flexneri* e *Klebsiella pneumoniae* foram utilizados para avaliar a atividade antimicrobiana de extratos aquosos e metanólicos da *X. americana*. Verificou-se uma atividade mais pronunciada do extrato metanólico da raiz frente à *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* (JAMES et al., 2007).

Com base nas ações medicinais mencionadas, concluímos que essa planta apresenta um grande potencial para a obtenção de fármacos. Dessa forma, justifica-se a realização de outros estudos visando demonstrar a ação desta planta em novas aplicações terapêuticas bem como identificar as espécies químicas responsáveis por agir nessas ações.

Dentro deste contexto, infusões de folhas de café são utilizadas pelo homem ao longo de vários séculos para o tratamento de enfermidades. Pesquisas mais recentes comprovam a utilização das mesmas como fitoterápico, devido, principalmente, à presença de uma grande variedade de compostos polifenólicos, com inúmeras aplicações farmacológicas já comprovadas (CHANG, 2015).

Inúmeros estudos demonstram que o consumo de chá das folhas de café apresentam a capacidade de prevenir algumas doenças. Os autores atribuem esta

capacidade à presença de inúmeros compostos polifenólicos. Entre estes compostos, a mangiferina apresenta-se como uma substância promissora no que se refere à capacidade quimiopreventiva. A mangiferina (1,3,6,7-tetra-hidroxixantona-C2- β -D-glucosídeo) é uma xantona glicosilada, presente em inúmeras espécies do reino vegetal (VYAS et al, 2012).

Nas duas últimas décadas, as pesquisas visando identificar substâncias que possam combater os chamados **Produtos de Glicação Avançada** (AGE's) vêm ganhando bastante interesse da comunidade científica. Os AGE's são formados pela reação entre as proteínas e açúcares redutores (ou compostos dicarbonílicos-RCS). Esta reação inicialmente origina as bases de Schiff, que conduzem à formação dos produtos de Amadori e posterior formação dos AGE's (BARBOSA et al, 2016).

Os AGE's também podem se originar a partir da reação entre as proteínas e compostos α -dicarbonílicos, tais como o glioxal (GO) e metilglioxal (MG). Os AGE's são adutos, fluorescentes ou não-fluorescentes, e inúmeros estudos vêm demonstrando uma relação crucial entre o processo de glicação das proteínas com diversas enfermidades relacionadas à idade, tais como diabetes, aterosclerose, doenças renais e doenças neurodegenerativas (YU; WANG; SUN, 2014; LOSSO, 2016).

Diversos autores propuseram metodologias de combate à formação dos AGE's, analisando a capacidade de compostos químicos naturais e sintéticos em atuarem como capturadores de espécies α -dicarbonílicas (capturadores de RCS) e assim minimizarem o stress dicarbonílico (HU et al., 2012; WANG; HO, 2012; TANG et al., 2013; KAZI et al., 2017; MARQUES, 2017). Apesar disto, a capacidade de plantas e compostos naturais em combater os AGE's permanece ainda bastante inexplorada.

Portanto, considerando o exposto, este estudo pretende analisar a composição química e as ações terapêuticas dos extratos de folha, caule e raiz de *X. americana*, bem como, analisar a capacidade antiglicante da mangiferina e dos extratos metanólicos das folhas de café.

2 OBJETIVOS

Nesta seção são apresentados os objetivos deste trabalho.

2.1 Geral

Estudar a composição química e a ação terapêutica dos extratos de folha, caule e raiz de *Ximenia americana* (XA) e avaliar a capacidade antiglicante da mangiferina e de extratos de folhas de café.

2.2 Específicos

- Coletar, identificar e tratar o material botânico para preparo de extratos de folha, caule e raiz.
- Preparar os extratos hexânicos e metanólicos de folha, caule e raiz de *X. americana* por extração soxhlet.
- Analisar a composição química dos extratos metanólicos das folhas, caule e raiz de *Ximenia americana*;
- Avaliar a capacidade antioxidante dos extratos metanólicos das folhas, caule e raiz de *X. americana* em ensaios químicos na captura dos radicais DPPH e ABTS;
- Verificar o poder inibitório dos extratos metanólicos das folhas, caule e raiz frente à enzima acetilcolinesterase com relação à doença de Alzheimer;
- Avaliar a capacidade antiglicante da mangiferina e dos extratos metanólicos das folhas de café.

3 METODOLOGIA

Este estudo foi baseado na análise dos constituintes químicos de folhas, caule e raiz de *X. americana*, conhecida popularmente como “ameixa brava” e na capacidade antiglicante dos extratos metanólicos das folhas de café e de um de seus constituintes, a mangiferina.

Esta pesquisa está subdividida em duas partes. A primeira, indicada em (3.1), refere-se a algumas das propriedades farmacológicas e constituição química dos extratos metanólicos das folhas, caule e raiz de *X. americana*, enquanto a segunda, indicada em (3.2), versa acerca dos processos desenvolvidos para avaliar a capacidade antiglicante da mangiferina e dos extratos metanólicos das folhas de café.

A obtenção dos extratos hexânicos e metanólicos, quantificação dos fenólicos totais, ensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase e capacidade antioxidante (DPPH e ABTS), foram realizadas no Laboratório de Produtos Naturais e Biotecnologia (LPNBio). Os procedimentos de identificação da composição química de *X. americana* e capacidade antiglicante ocorreram no Centro Alemão de pesquisa do Câncer (DKFZ) localizado na cidade de Heidelberg-Alemanha através da colaboração do Prof. Dr. Robert Wyn Owen, chefe de departamento do mencionado instituto.

3.1 Análise química de *X. americana*

Neste tópico descrevemos todas as ações realizadas com as folhas, caule e raiz de *X. americana*.

3.1.1 Material Botânico (coleta, identificação e processamento)

O administrador rural aposentado (IDEMA-RN), Armando Marques Júnior, coletou amostras de folhas (500 g), caule (700 g) e raízes (1,26 Kg) em 10 de abril de 2016, na fazenda Pitanga, propriedade do governador Robinson Farias, comunidade Cacimbinhas, localizada no município de Monte Alegre, distrito rural de Timbaúba. O

material coletado foi georreferenciado por um transceptor GPS e está localizado nas seguintes coordenadas geográficas: latitude -6,07739 e longitude -35,36013.

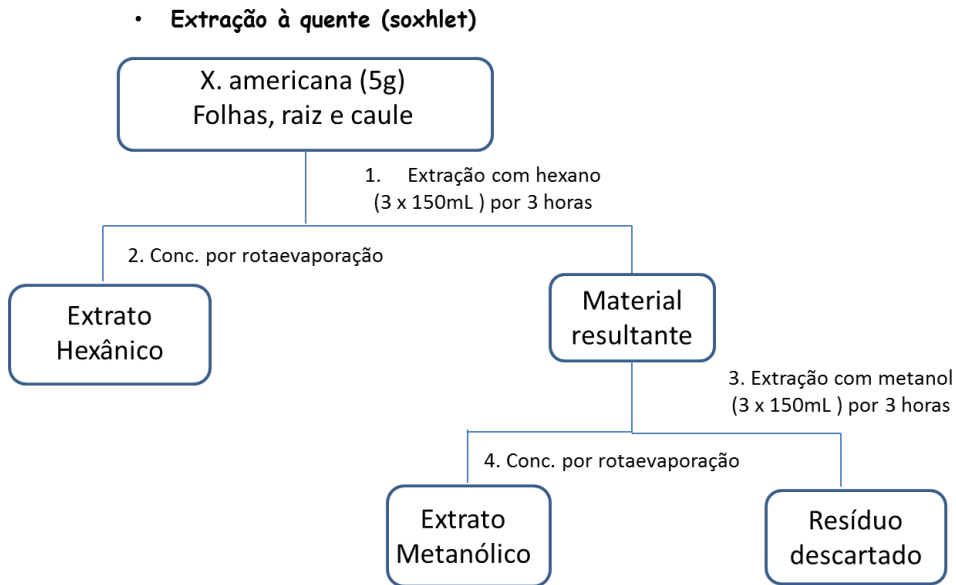
A identificação e numeração do material vegetal colhido está depositado no Herbário Prisco Bezerra pertencente a Universidade Federal do Ceará (UFC), sob número de exsicata: 60233. A identificação foi realizada pelo técnico Luiz Wilson Lima-Verde, pertencente ao Departamento de Biologia da UFC, em 27/01/2017.

Os materiais botânicos foram secos à temperatura ambiente e em local de sombra durante o período de 30 a 40 dias. Foi realizada ainda uma triagem do material coletado com posterior moagem das folhas e caule em um processador de lâminas, enquanto a raiz foi moída em um ralador metálico.

3.1.2 Preparo dos extrato (extração via soxhlet)

Os extratos das folhas, caule e raiz foram obtidos utilizando um sistema soxhlet (100 mL). Neste, adicionou-se 5 gramas do material botânico seco e triturado a um tubo de celulose (25 x 100 mm), que foi inserido no extrator que se encontrava conectado a um balão de fundo redondo contendo inicialmente 150 mL de hexano (Sigma-Aldrich). O balão de fundo redondo foi aquecido com a utilização de uma manta aquecedora. O sistema permaneceu em funcionamento por 3 horas. Logo após, o solvente foi removido em evaporador rotativo sob pressão reduzida e posteriormente seco em liofilizador conforme metodologia descrita por Owen et al., (2000). Para cada uma das amostras de material botânico, o procedimento foi repetido por três vezes com hexano e em seguida realizado da mesma maneira com metanol (Sigma-Aldrich), sendo então obtidos os extratos hexânicos e metanólicos das folhas, caule e raiz de *X. americana*. Após a secagem total dos extratos foram calculados os rendimentos.

Figura 02 - Passos a serem realizados para a realização de extração por soxhlet.



Fonte: o autor

3.1.3 Avaliação do Potencial Farmacológico dos extratos de *X. americana*.

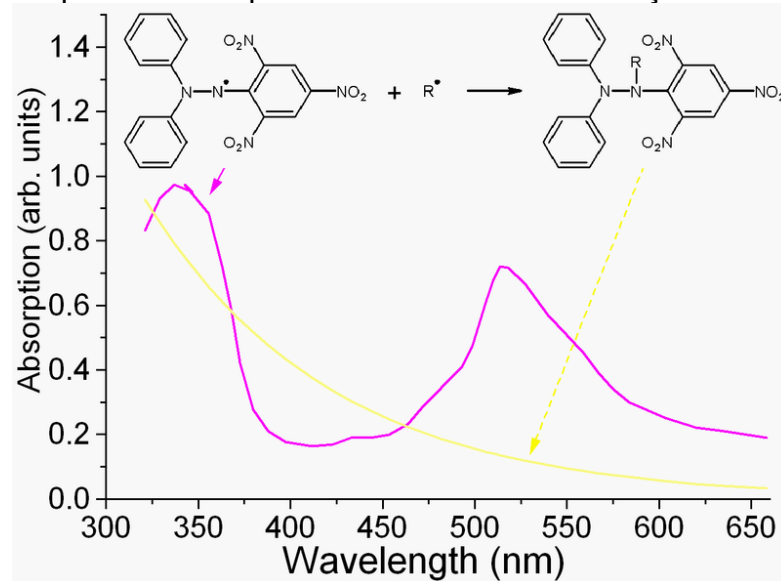
Nesta seção indicaremos os procedimentos associados à verificação do potencial farmacológico dos extratos de *X. americana*.

3.1.3.1 Determinação da atividade antioxidante pela captura do radical livre DPPH.

O potencial antioxidante dos extratos foi avaliado através da capacidade de sequestro do radical DPPH, de acordo com o procedimento descrito por Brand-Willians et al. (1995). Adicionaram-se em tubos de ensaio uma alíquota de 0,1 mL da solução dos extratos, cujas concentrações variaram de 25 a 1000 ppm, dependendo do material em estudo.

Misturou-se às soluções dos extratos 3,9 mL da solução metanólica de DPPH 0,06 mM. A mistura foi agitada vigorosamente, protegida da luz e posta em repouso à temperatura ambiente. A evolução do processo de captura do radical DPPH foi verificada após 10 minutos de início da reação por meio da medição da absorbância das soluções. A absorbância de cada solução foi medida em um espectrofotômetro FEMTO 700 Plus a 515nm.

Figura 03 - Estabilização do radical DPPH; indicação da cor de cada uma das espécies, seus respectivos comprimentos de onda de absorção e suas intensidades.



Fonte: <https://en.wikipedia.org/wiki/DPPH>

A capacidade antioxidante foi calculada de acordo com a equação: DPPH (%) = $[(A_0 - A_t)/A_0] \times 100$, em que A_0 indica a absorbância da solução metanólica de DPPH e A_t , a absorbância na presença da solução do extrato. Os resultados foram plotados em um gráfico de inibição versus concentração e os valores de IC_{50} foram estimados de acordo com a equação da curva baseada em modelo sigmoidal utilizando-se do programa *Jardel Scientific, Table Curvetm Windows v1.0*.

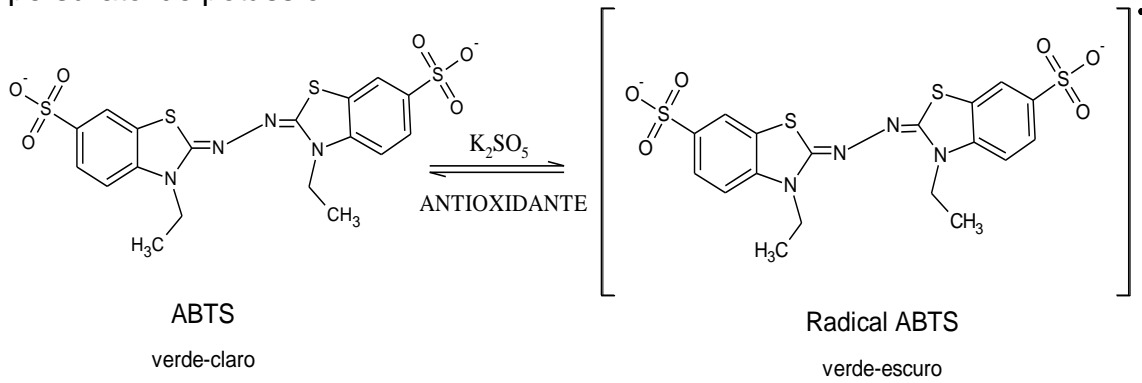
O mesmo procedimento foi realizado com solução de BHT, um dos conservantes artificiais mais utilizados na indústria alimentícia. O BHT serviu como padrão para posterior comparação e visualização da eficiência dos extratos. As análises foram realizadas em triplicatas.

3.1.3.2 Determinação da atividade antioxidante pela Captura do Radical Livre $ABTS^{\circ+}$

A atividade antioxidante total (AAT) foi determinada por meio de ensaio com o radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (radical livre $ABTS^{\circ+}$) obtido pela reação de 5mL de ABTS (7 mmol.L^{-1}) com 88mL de persulfato de potássio ($2,45 \text{ mmol.L}^{-1}$). O sistema foi mantido em repouso à temperatura ambiente (25°C) durante 16 horas na ausência de luz. Uma vez formado o radical $ABTS^{\circ+}$, o mesmo

foi diluído com etanol P.A. e realizada a leitura da absorbância até se obter um valor de $0,70 \pm 0,05$ nm sob um comprimento de onda de 734 nm.

Figura 04 - Estabilização do radical ABTS^{•+} por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.



Fonte: Autor, 2018.

Foram preparadas, em triplicata, soluções de cada um dos extratos obtidos de *X. americana* com quatro concentrações diferentes. Adicionou-se em tubos de ensaio alíquotas de 30 μ L do extrato, cujas concentrações variaram de 25 a 500 ppm. Em ambiente escuro, adicionaram-se aos tubos de ensaio 3mL da solução (radical ABTS^{•+} + etanol P.A.), com absorbância previamente ajustada para 0,70, na ausência de luz, sendo os tubos agitados para homogeneização da mistura. As curvas padrões de Trolox foram expressas em TEAC (antioxidante equivalente a Trolox) em μ M TEAC g^{-1} . As leituras foram feitas em espectrofotômetro FEMTO 700 Plus a 734 nm, após seis minutos da adição do radical. Usou-se álcool etílico P.A. como branco e os resultados foram expressos em TEAC (antioxidante equivalente a Trolox) em mM TEAC g^{-1} amostra.

Neste ensaio, também foi realizada a verificação da ação antioxidante do BHT com o intuito de se fazer uma comparação e termos uma noção da eficiência dos extratos.

3.1.4 Ensaio para inibição da enzima acetilcolinesterase

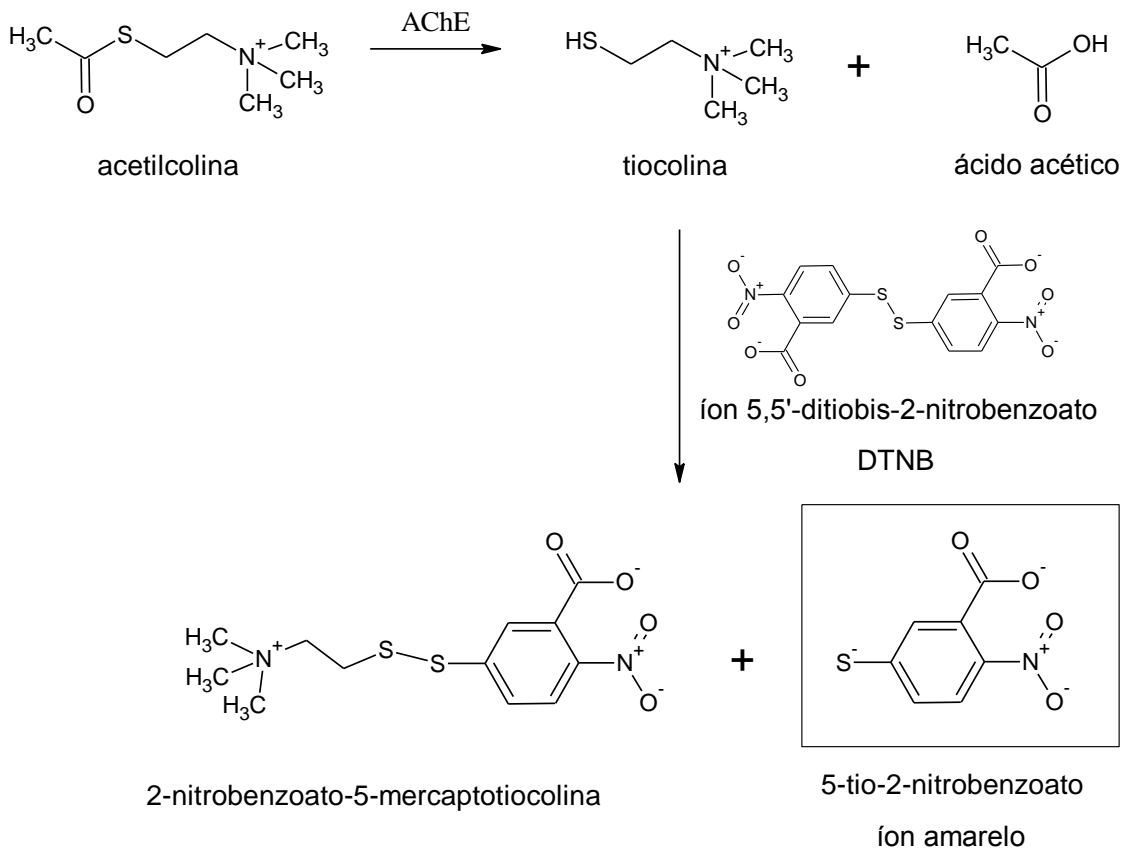
Este ensaio é baseado no procedimento descrito por Ellman et al.(1961), adaptado para CCD por Rhee et al. (2001). É considerado um método colorimétrico e que pode ser utilizado de forma qualitativa e quantitativa, mas nesse trabalho foi

utilizada somente a forma qualitativa. É um método rápido e sensível para a seleção de amostras com ação anticolinesterásica.

Utilizou-se uma alíquota de 5µl dos extratos com concentração 10 mg/mL e aplicou-se em uma cromatoplaça (DC-Alufolien, Silicagel 60 F254, 0,2 mm Merck). Após a completa evaporação do solvente, borrifou-se uma mistura (1:1) de iodeto de acetilcolina (ATCI) 1mmol.L⁻¹ com o reagente de Ellman (ácido 5,5' – Ditiobis- (2 – nitrobenzóico, DTNB, 1 mmol.L⁻¹), deixando a placa em repouso por 3 minutos para a secagem. Em seguida borrifou-se a enzima acetilcolinesterase (3U/ml). Após 10 minutos, ocorreu o surgimento de uma coloração amarela, porém, onde ocorreu inibição da enzima, observou-se a formação de um halo branco em torno dos “spots” onde foram aplicadas as amostras. Em 20-30 minutos a coloração desapareceu.

Como controle positivo, foi utilizada a solução do padrão de sal Eserina (2mg/ml) e como controle negativo, os solventes utilizados para a diluição.

Figura 05 - Formação do ânion amarelo 5-tio-2-nitrobenzoato proveniente da reação entre a tiocolina e o íon 5,5'- ditiobis-2-nitrobenzoato.

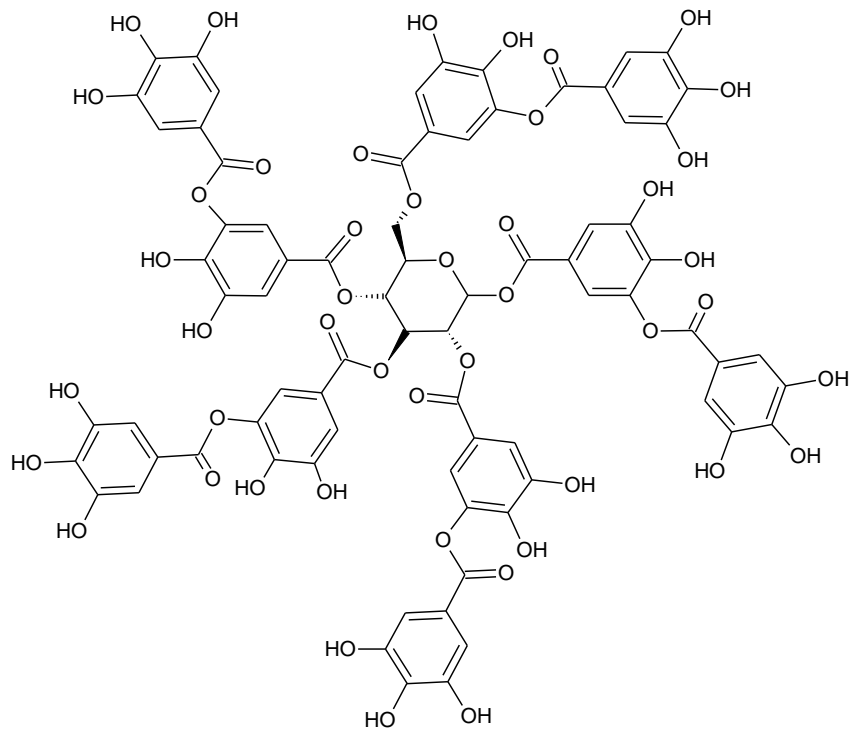


Fonte: Autor, 2018.

3.1.5 Determinação dos fenóis totais nos extratos

A determinação dos compostos fenólicos totais de cada um dos extratos foi realizada pelo método Folin-Ciocalteu. A curva padrão para fenóis foi feita utilizando-se a solução de ácido tânico (MERCK), que se trata de um ácido composto de glicose e ácidos fenólicos, cuja fórmula molecular é $C_{76}H_{52}O_{46}$, como se observa na figura 06.

Figura 06 - Estrutura do ácido tânico



Fonte: Autor, 2018.

A hidrólise dos ésteres presentes no ácido tânico origina moléculas de ácido gálico, substância usada como padrão para a quantificação de fenol em diversos analitos pelo método citado.

A determinação dos fenóis totais consistiu em adicionar 50 μL do extrato a 450 μL de água destilada, adicionando-se 250 μL do reagente Folin-Ciocalteu (1 mol/L) da MERCK e 1,25 mL de solução de carbonato de sódio (20%). Essa solução foi agitada adequadamente e depois mantida em repouso por 40 minutos. Após esse período, a absorbância foi determinada no comprimento de 725 nm. O mesmo procedimento foi adotado para as soluções-padrões de ácido tânico (FOLIN; CIOCALTEAU, 1927; MUELLER; HARVEY, 2001).

3.1.6 Análise qualitativa dos compostos polifenólicos em *X. americana*.

As amostras foram analisadas qualitativamente em um cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado à espectrometria de massas com ionização por *eletrospray* (CLAE-IES-EM) Hewlett Packard série 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha), equipado com coluna de fase reversa (C-18) com dimensões de 25 × 0,46 cm (Phenomenex Ltd, Aschaffenberg, Alemanha) acoplada a um espectrômetro de massas de quadrupolo simples Hewlett Packard série 1101 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha).

Os espectros de massas no modo de ionização negativo foram gerados sob as seguintes condições: voltagem do fragmentador = 100 V, voltagem do capilar = 2.500 V, pressão do nebulizador = 30 psi, temperatura do gás secante = 350°C, faixa de detecção de massas 100 – 1500 D, pressão máxima de 400 bar. A taxa de fluxo de solvente foi 1 mL/min e injeção de 10 µL, tendo sido detectados nos comprimentos de onda no UV a 257, 278 e 340 nm, à temperatura ambiente. O gradiente de eluição consistiu de uma fase móvel de 2% de ácido acético em água (solvente A) e acetonitrila (solvente B) seguindo o seguinte perfil de gradiente: inicialmente 95% de A por 10 min; para 90% de A durante 1min; para 60% de A durante 9 min; para 80% de A durante 10min; para 60% de A durante 10 min; para 0% de A durante 5 min e continuando com 0% de até o final do experimento.

3.1.7 Quantificação dos compostos polifenólicos em *X. americana*.

Para a análise de quantificação dos polifenólicos, foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado à espectrometria de massas com ionização por *eletrospray* (HPLC-ESI-MS), com as mesmas especificações descritas no item 3.1.6. As amostras foram dissolvidas em metanol, os espectros ESI foram obtidos em um espectrômetro triploquadrupolo Finningan MAT TSQ 7000 (Finningan, San Jose, Califórnia, EUA) equipado com uma fonte “nano-electrospray” (EMBL, Heidelberg, Alemanha), utilizando ambos os negativos e positivos modos de íons. Argônio foi utilizado como gás de colisão a uma pressão de 2,5 mTorr (1 Torr=133,3 Pa). As amostras foram pulverizadas a partir de capilares de vidro.

Os compostos foram quantificados a partir de curvas analíticas construídas com padrões autênticos puros: procianidina *B1*, procianidina *B2*, epicatequina, ácido 3,4-di-hidroxibenzoico, ácido clorogênico, ácido gálico, canferol e quercetina.

As curvas analíticas foram obtidas por regressão linear e pelo método dos mínimos quadrados com seis diferentes concentrações, que variavam de 0.025-1000 μM , e os dados foram plotados em programas gráficos – as áreas *versus* a concentração (em $\mu\text{g/mL}$). Os resultados foram expressos em mg/g do extrato total e g/kg de material botânico seco.

3.2 Capacidade antiglicante dos extratos metanólicos das folhas de café e da mangiferina

Os procedimentos relativos à capacidade antiglicante foram realizados no Centro Alemão de pesquisa do Câncer (DKFZ-Alemanha), sendo realizados pelo Prof. Dr. Robert Wyn Owen e pela Prof. Dr. Maria Teresa Salles Trevisan.

3.2.1 Descrição geral dos métodos de formação do AGE's para avaliação da capacidade antiglicante

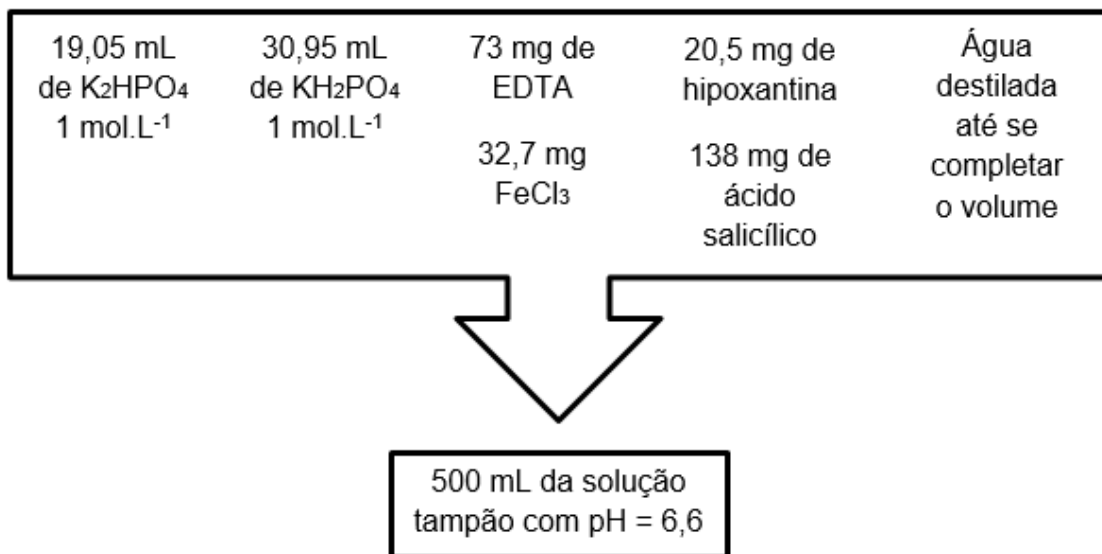
Para verificar a eficiência da mangiferina e dos extratos metanólicos das folhas de café em atuar como agente capturador de espécies dicarbonílicas (RCS-Trapping), minimizando o stress dicarbonílico (combate à formação dos AGE's), diferentes métodos disponíveis na literatura foram adaptados e aplicados (VINSON; HOWARD, 1996; MARQUES, 2017).

Nestas metodologias, a formação dos AGE's é obtida através da reação entre proteínas (ou aminoácidos) com açúcares ou compostos dicarbonílicos, em tampão (geralmente fosfato) com pH próximo do fisiológico. O indicativo da formação dos AGE's pode ser demonstrado pelo aumento da intensidade de fluorescência, enquanto a avaliação da capacidade antiglicante de um determinado material (extratos, compostos puros, etc) pode ser avaliada pela redução desta intensidade, comparada a um controle sem a presença do mesmo. Portanto, quanto maior for a diminuição da intensidade de fluorescência provocada pela ação da substância

testada, maior será a sua capacidade em combater a formação dos AGE's (JOGLEKAR; PANASKAR; ARVINDEKAR, 2014).

Em todos os métodos testados, promoveu-se a reação entre açúcar (D-glicose- Sigma Aldrich) ou espécies α -dicarbonílicas (metilglioxal/glioxal – Sigma Aldrich) com solução protéica de albumina de soro bovino (BSA-Sigma Aldrich) em tampão fosfato como meio reacional (pH 6,6)*. Esse tampão foi preparado conforme apresentado na figura 07.

Figura 07 - Preparo do tampão fosfato.



Fonte: Autor, 2018.

Os procedimentos que utilizam vias não enzimáticas, conhecidos como métodos clássicos, utilizam-se de períodos de incubação de até 4 semanas. Neste trabalho, para reproduzir tais métodos, utilizou-se períodos de incubação com 1, 2 e 3 semanas. Para geração dos AGE's, foi adicionado em eppendorfs de 2,0 mL previamente identificados, a mistura reacional formada por 93,75 μ L de BSA de concentração 16 mg/mL, 25 μ L de solução D-glicose de concentração 300 mg/mL e 881,75 μ L do tampão fosfato de pH 6,6. Todos os reagentes mencionados foram dissolvidos no tampão fosfato e as amostras produzidas em duplicata.

A incubação ocorreu na ausência de luz, a 37 °C, sob agitação constante a 450 rpm durante 1, 2 e 3 semanas. A medida da intensidade da fluorescência total dos AGE's foi realizada pela leitura de microplacas em um espectrofotômetro de fluorescência Cytoflour (Perspective Biosystems, Minnesota, USA) com excitação e

emissão máxima em 360 e 460 nm, respectivamente. A mensuração da fluorescência foi realizada em triplicata para cada amostra. Todas as amostras foram centrifugadas (13000 rpm for 5 minutos) antes da determinação da fluorescência.

O mesmo procedimento descrito foi repetido em diferentes períodos de incubação (1, 2 e 3 semanas e 24, 48 horas), porém adicionando-se 5 µL da enzima xantina oxidase (XO) (18mU-Sigma Aldrich) ao sistema, para promover a formação de AGE's em um ambiente com excesso de radicais livres, que aceleram a formação dos AGE's. Antes da determinação da fluorescência a reação foi finalizada pela adição de 10 µL de ácido clorídrico concentrado (Roth) para desnaturação da enzima.

Posteriormente, substituiu-se os 25 µL da solução de D-glicose (300 mg/mL) por igual quantidade de soluções de glioxal (GO) ou metilglioxal (MG) em diferentes concentrações (4, 40 e 200 mg/mL), utilizando-se períodos de incubação de 3, 24 e 48 horas.

A capacidade antiglicante foi avaliada reproduzindo os métodos de obtenção de AGE's descritos, porém produzindo controles contendo diferentes concentrações das espécies testadas neste trabalho (mangiferina e extratos de folhas de café).

3.2.2 Material antiglicante – mangiferina e folhas de café (coleta, obtenção dos extratos e soluções metanólicas)

Foram obtidas folhas de café coletadas diretamente de dois diferentes cultivares no Brasil (cafeeiros). A amostra 1 (CF₁), de cultivo tradicional, é oriunda de um cultivar localizado no município de Perdões, Minas Gerais - Comunidade de Machado. A amostra 2 (CF₂) pertence à variedade Caturra Vermelho e foi fornecida pelo Centro de Café Alcides Carvalho, localizado na cidade de Campinas, São Paulo. Os materiais colhidos foram secos em uma estufa ventilada a 50°C, por 96 h e passaram por uma triagem, com posterior moagem em processador de lâminas.

Os extratos hexânicos e metanólicos das folhas das duas variedades de café analisadas foram obtidos utilizando-se um sistema soxhlet (100 mL). 10 gramas das folhas secas passaram por 3 extrações com hexano (150 mL-Sigma Aldrich) e posteriormente por 3 extrações com metanol, sendo 3 horas o tempo de cada extração. Em seguida, o solvente foi removido por liofilização. Após obtenção dos

extratos, foram calculadas as concentrações de mangiferina nas folhas e extratos metanólicos obtidos. Os valores das concentrações estão apresentados na Tabela 01.

Tabela 01 - Concentração de mangiferina nas folhas e nos extratos metanólicos das folhas.

AMOSTRA	Concentração de mangiferina nas folhas de café (g/Kg)	Concentração de mangiferina no extrato metanólico das folhas ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)
CF₁	9,71	681,9
CF₂	10,31	764,8

Fonte: Autor, 2018.

Após secagem do solvente, os procedimentos utilizando D-glicose (300 mg/mL) e metilglioxal (4 mg/mL) foram realizados, utilizando 48 horas de incubação. Em todos os casos foram produzidos controles sem a presença de XO para verificação da fluorescência basal (intrínseca). A finalização e determinação da fluorescência ocorreu como citado no item 3.2.1.

Mangiferina com 98% de pureza foi obtida da Sigma Aldrich e preparadas soluções metanólicas em diferentes concentrações.

3.2.3 Avaliação da capacidade antiglicante das folhas de café (CF₁ e CF₂)

A determinação da capacidade antiglicante dos extratos metanólicos das folhas de café obtidos via extração soxhlet (CF₁ e CF₂), foi realizada utilizando os métodos com a presença em excesso de radicais livres (reação com XO).

Assim, foram produzidas amostras contendo 2,5 e 5,0 mg dos extratos, com posterior adição da mistura reacional ao sistema (BSA + Açúcar ou espécies carbonílicas + solução tampão + XO). A inserção dos extratos nos eppendorfs foi realizada a partir de soluções metanólicas dos mesmos, sendo o solvente evaporado em centrífuga a vácuo.

3.2.4 Avaliação da capacidade antiglicante da Mangiferina

Para a verificação da eficiência de mangiferina em atuar como agente capturador de espécies dicarbonílicas (RCS-Trapping), foram produzidas amostras contendo a mesma, obtidas a partir de soluções metanólicas em diferentes concentrações (500, 1000 μM), sendo a evaporação do solvente realizada em centrífuga a vácuo.

Inicialmente foi avaliado o método clássico (1-3 semanas de incubação), na presença e ausência da enzima XO, utilizando a reação de BSA (16 mg/mL) com solução de D-glicose (300 mg/mL) e o tampão fosfato. Em seguida, repetiu-se o procedimento com a enzima XO por 48 e 24 horas. Em todas as condições avaliadas, adicionou-se a mangiferina nas concentrações de 500 e 1000 μM .

Em seguida, realizou-se 2 novos experimentos. No primeiro, substituiu-se a glicose por MG (40 e 200 mg/mL) e, no segundo, substituiu-se a glicose por GO (40 e 200 mg/mL). O período de incubação aplicado foi de 3 horas e as concentrações da mangiferina adicionada foram de 500 e 2500 μM .

Voltando-se as atenções para as avaliações da capacidade antiglicante da mangiferina em reação com o MG, observou-se, em todas as reações, a formação de um aduto principal. Ao final, todas as soluções utilizadas nesse processo foram reunidas. Posteriormente, promoveu-se o isolamento e a caracterização estrutural do aduto.

Em todos os métodos avaliados (com glicose, MG ou GO) foram produzidos controles, na presença e ausência da enzima XO, para verificação da fluorescência basal (meio reacional) e intrínseca (mangiferina 500 e 2500 μM). A finalização da reação e a determinação da fluorescência ocorreram como citado no item 3.2.1.

3.2.5 Aquisição de espectros de RMN para a verificação de reação entre mangiferina e metilglioxal.

Os dados técnicos e as condições operacionais sobre os espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C unidimensionais e bidimensionais foram obtidos no Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais da Embrapa Agroindústria Tropical - Fortaleza/CE

Para a análise de RMN ^1H , adicionou-se 300 μL de DMSO e 300 μL de MeOD a 10 mg da amostra. Os Experimentos de RMN ^1H foram realizados em um espectrômetro Agilent de 600 MHz equipado com uma sonda de detecção inversa de 5mm (H-F / ^{15}N - ^{31}P) One Probe TM, em 298 K. Os espectros de RMN ^1H foram obtidos com um tempo de relaxação de 2 s, FID 32 com 32 K pontos de dados em uma faixa espectral de 9615,4 Hz e um tempo de aquisição de 3,33 s. A identificação do constituinte presente na amostra foi realizada através da leitura dos espectros ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC e ^1H - ^{13}C HMBC e avaliações de relatórios existentes. O espectro ^1H - ^1H COSY foi obtido em uma faixa espectral de 18.028,1 Hz para ambas as dimensões em uma matriz de dados de 1442 x 200, com 32 varreduras e tempo de relaxação de 1,0 s. Os experimentos ^1H - ^{13}C HSQC foram adquiridos com 64 varreduras, em uma faixa espectral de 9,615.4 Hz para f2 e 30,165,9 Hz para f1 numa matriz de dados de 1442 x 200 e tempo de relaxação de 1,0 s com $^1J_{(\text{C-H})}$ de 145 Hz. Os experimentos ^1H - ^{13}C HMBC foram obtidos com a realização de 90 varreduras, faixa espectral de 9,615.4 Hz para f2 e 30,165,9 Hz para f1, numa matriz de dados de 1442 x 240, com tempo de relaxação de 1,0 s e $^nJ_{(\text{C-H})}$ de 10 Hz.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Da mesma forma que na metodologia, a discussão dos resultados foi dividida em duas partes, indicadas em 4.1 e 4.2. A primeira parte trata dos resultados acerca da avaliação química de *X. americana*, enquanto a segunda, sobre a capacidade antiglicante da mangiferina e dos extratos das folhas de café.

4.1 Avaliação química de *X. americana*

Neste tópico, indicaremos todos os ensaios associados à avaliação química dos extratos de *X. americana*.

4.1.1 Potencial antioxidante

O potencial antioxidante do extrato metanólico das folhas, do caule e da raiz de *X. americana* foi avaliado através de duas técnicas: DPPH e ABTS. Os valores de IC₅₀ e EC, que indica a concentração equivalente a Trolox, para os extratos mencionados estão apresentados na Tabela 02. Os extratos testados foram obtidos por extração soxhlet, conforme metodologia descrita, e os mesmos tiveram suas ações antioxidantes comparadas com a ação do antioxidante sintético BHT.

Tabela 02 - Resultados do potencial antioxidante de *X. americana* (extração via soxhlet)

Material	DPPH IC ₅₀ (mg/L)	ABTS EC (TEACg ⁻¹)
Folhas	258,50	179,55 ± 5,38
Caule	123,56	387,75 ± 0,56
Raiz	93,97	436,33 ± 6,54
BHT	289,17	350,83 ± 7.18

Fonte: Autor, 2018.

BHT - Butylated hydroxytoluene (inglês) ou 2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol

Os valores de **EC** referem-se à média aritmética de três determinações ± desvio padrão

IC₅₀: concentração de cada amostra (mg/L) em que 50% do radical DPPH é capturado.

TEAC: atividade antioxidante em equivalente de Trolox, expresso em µM trolox / g de extrato metanólico ± desvio padrão em 6 minutos (ABTS).

Conforme mencionado, a avaliação da capacidade antioxidante frente ao radical livre DPPH tem como princípio a capacidade de uma determinada substância em sequestrar estes radicais oriundos de uma fonte sintética. Tal capacidade é determinada pela diminuição da absorvância do radical DPPH causada pela redução do mesmo por ação de uma espécie antioxidante. Assim, os dados obtidos indicaram que todas as partes estudadas de *X. americana* apresentaram atividade antioxidante, inclusive com valores de IC₅₀ inferiores ao antioxidante sintético BHT, um dos conservantes mais utilizados na indústria alimentícia, revelando um significativo potencial antioxidante desta espécie.

Vale ressaltar mais uma vez que a informação acerca da ação antioxidante do BHT na captura do DPPH serve, simplesmente, para podermos comparar a ação dos extratos da planta e verificarmos a eficiência relativa dos mesmos.

O extrato metanólico das folhas foi o que apresentou a menor capacidade antioxidante em relação ao ensaio de captura do radical DPPH. Porém, observamos que o valor de IC₅₀ apresentado pelo mesmo foi ainda menor do que o valor para o BHT.

Já os extratos metanólicos do caule e da raiz apresentaram valores de IC₅₀ bastante significativos, 123,56 mg.L⁻¹ e 93,97 mg.L⁻¹, respectivamente, o que indica um potencial bastante promissor. Quando comparamos os dados do caule com os valores associados ao BHT, verificamos uma redução de 57,27% do valor de IC₅₀. Para a raiz, o valor verificado mostrou-se ainda mais eficiente, já que para esse extrato, verificou-se uma redução de 67,5 % do valor de IC₅₀ em relação ao BHT. Esse resultado corrobora com o que foi evidenciado no trabalho de Uchôa et al (2016), no qual evidencia que a capacidade antioxidante frente ao radical DPPH dos extratos etanólicos da casca do caule apresentam uma ação maior do que os extratos das folhas.

Outras plantas estudadas por integrantes do grupo do Laboratório de Produtos Naturais e Biotecnologia - LPNBio, como a *Hancornia speciosa* Gomes e 4 espécies do gênero *Senna* (*S. gardneri*, *S. georgica*, *S. macranthera* e *S. splendida*) também tiveram seus extratos metanólicos submetidos à ação de captura do radical DPPH. Para os extratos das folhas dessas plantas, percebeu-se que a *X. americana* apresentou o terceiro melhor resultado, com valor de IC₅₀ igual a 258,50 mg/L, sendo

encontrados melhores valores para as espécies de *S. gardneri*, igual 59,82 mg/L, e de *S. macranthera*, 63,04 mg/L (OLIVEIRA, 2015). O valor de IC₅₀ para o extrato das folhas de *Hancornia speciosa* Gomes foi igual a 285,49 mg/L, valor compatível ao encontrado para as folhas de *X. americana* (MARQUES, 2017).

Em relação aos extratos metanólicos do caule dessas plantas, a *X. americana* apresentou o melhor resultado (123,56 mg/L). Das espécies de *Senna*, a que apresentou o menor de valor de IC₅₀ foi a *S. splendia* (199,56 mg/L) (OLIVEIRA, 2015). Já a *Hancornia speciosa* Gomes apresentou IC₅₀ igual a 264,81 mg/L (MARQUES, 2017).

Para a ação antioxidante dos extratos da raiz, a *S. macranthera* (91,59 mg/L) teve uma ação equiparada à *X. americana* (93,97 mg/L) (OLIVEIRA, 2015).

Assim, com base nesses resultados e comparações, é importante dar continuidade aos estudos sobre a ação antioxidante e outras possíveis potencialidades de *X. americana*.

No que se refere aos resultados obtidos no ensaio de captura do radical ABTS⁰⁺, verificou-se novamente que os extratos de todas as partes avaliadas da planta apresentaram capacidade antioxidante. Para este ensaio, quanto menor o valor obtido para EC, medido em TEAC.g⁻¹, mais massa de extrato é necessária para realizar a captura do radical ABTS⁰⁺ em relação ao padrão Trolox. Sendo assim, da mesma forma que foi observado no ensaio DPPH, as folhas foram as que se mostraram com menor eficiência, tendo em vista que o valor de EC para o extrato desta parte da planta foi de 179,55 TEACg⁻¹. A título de comparação, percebeu-se que os extratos metanólicos das folhas apresentaram uma ação aproximadamente 50% menor do que uma mesma massa do antioxidante industrial BHT.

Já a raiz foi a parte da planta que apresentou o melhor resultado, tendo um valor de EC igual a 436,33 ± 6,54. Isso indica que, a título de comparação, os extratos metanólicos da raiz apresentaram uma ação aproximadamente 25% maior do que uma mesma massa do antioxidante industrial BHT.

Por fim, verificamos que o extrato do caule mostrou EC praticamente igual ao valor apresentado pelo BHT.

4.1.2 Inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE)

Esta metodologia possibilita a verificação de forma qualitativa do potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase, que está relacionada ao tratamento da doença de Alzheimer. A verificação da inibição da enzima AChE ocorre pela formação de um halo branco em torno dos “spots”. Quanto maior o tamanho do halo verificado, maior será a inibição frente à enzima AChE.

A Tabela 03 mostra os resultados obtidos para os extratos metanólicos e hexânicos de folha, caule e raiz da *X. americana*, de concentração 10 mg/mL cada um, bem como o tamanho dos halos em milímetros em comparação com o padrão positivo utilizado (solução de sal de eserina).

Tabela 03 - Resultados de inibição da enzima acetilcolinesterase por meio dos extratos de *X. americana* (extração via soxhlet).

Amostras	Resultado	Tamanho do halo (mm)
Padrão positivo (Eserina)	Positivo	14
Padrão negativo (Metanol)	Negativo	**
Ameixa Folha (Hexano)	Positivo	12
Ameixa Folha (Metanol)	Positivo	14
Ameixa Caule (Hexano)	Positivo	11
Ameixa Caule (Metanol)	Positivo	12
Ameixa Raiz (Hexano)	Positivo	05
Ameixa Raiz (Metanol)	Negativo	**

** Não ocorreu formação de halo branco
Fonte: Autor, 2018.

Considerando todos os extratos avaliados (Tabela 03) observou-se que o extrato metanólico da raiz não apresentou inibição de AChE. Porém, todas as outras partes avaliadas mostraram-se ativas frente a esse ensaio. O extrato hexânico da raiz mostrou-se ativo, apesar de ter promovido a formação de um halo com apenas 05 mm, valor bem inferior ao padrão positivo.

Os extratos do caule (hexânico e metanólico) demonstraram halos praticamente com o mesmo tamanho (11mm e 12mm, respectivamente). Já as amostras das folhas foram aquelas mais ativas, tendo em vista os tamanhos dos halos

observados, sendo a inibição de AChE provocada pelo extrato metanólico das folhas igual ao padrão positivo.

Ao se analisar a capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase pelos extratos hexânicos e metanólicos das outras plantas estudadas em nosso grupo, *Hancornia speciosa* Gomes e 4 espécies do gênero *Senna* (*S. gardneri*, *S. geórgica*, *S. macranthera* e *S. splendida*), percebeu-se que a maioria dos extratos de *Hancornia speciosa* Gomes apresentaram resultado igual ao padrão eserina. Apenas o extrato hexânico do caule desta planta apresentou um resultado superior ao da eserina (MARQUES, 2017). Para as espécies de *Senna* estudadas, apenas os extratos hexânicos e metanólicos de *S. georgica* apresentou um resultado comparável ao padrão eserina (OLIVEIRA, 2015).

4.1.3 Fenólicos totais

A partir dos extratos metanólicos de folha, caule e raiz de *X. americana* foi realizada, por meio do procedimento indicado, a determinação dos compostos fenólicos totais. Observamos, com base nos resultados da Tabela 04, a presença de substâncias fenólicas nos extratos metanólicos das três partes estudadas da planta. O extrato das folhas apresentou os menores teores de compostos fenólicos. Já o extrato da raiz foi aquele que apresentou o maior teor de compostos fenólicos, correspondendo a quase o dobro do valor encontrado no extrato das folhas. O extrato do caule apresentou valor intermediário em relação aos outros extratos.

De acordo com Halliwell (1996), os efeitos defensivos de antioxidantes hidrofílicos naturais em vegetais estão relacionados diretamente com a presença de compostos fenólicos. Sendo assim, com base no que já foi atestado pela literatura e nos resultados obtidos na ação antioxidante desses extratos frente aos radicais DPPH e ABTS, verificamos a consonância dos resultados. Como os extratos da raiz correspondem àqueles que apresentam um maior teor de fenólicos, são eles, também, que apresentam as melhores ações antioxidantes frente aos radicais estudados.

Tabela 04 - Resultados sobre determinação dos compostos fenólicos totais.

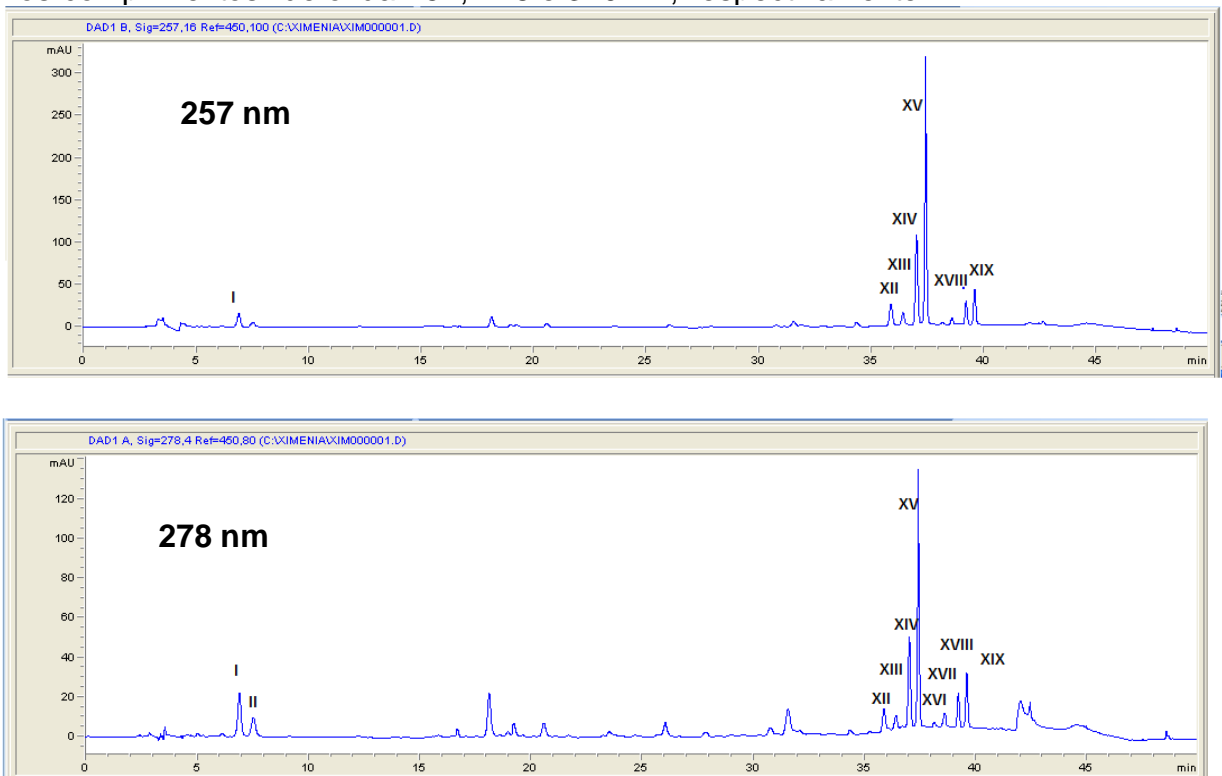
Material Botânico	Concentração média (mg/L)	Desvio padrão
Folhas de <i>X. americana</i>	64,04	2,31
Caule de <i>X. americana</i>	105,45	9,61
Raiz de <i>X. americana</i>	130,31	1,12

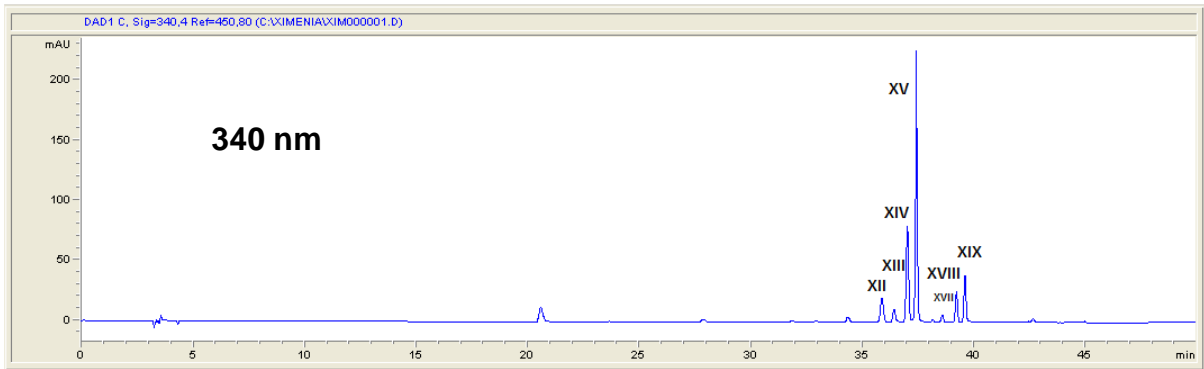
Fonte: Autor, 2018.

4.1.4 Análise qualitativa e quantitativa de *X. americana*

Através de experimentos de HPLC-MS realizados no laboratório DKFZ, na Alemanha, com os extratos metanólicos de folha, caule e raiz de *X. americana*, foram detectados e identificados vários compostos polifenólicos. A partir dos cromatogramas apresentados nas figuras 08, 09 e 10, foi possível montar a Tabela 05, que nos informa quais compostos estão presentes nos extratos indicados. As estruturas dos mesmos foram apresentadas na Figura 11.

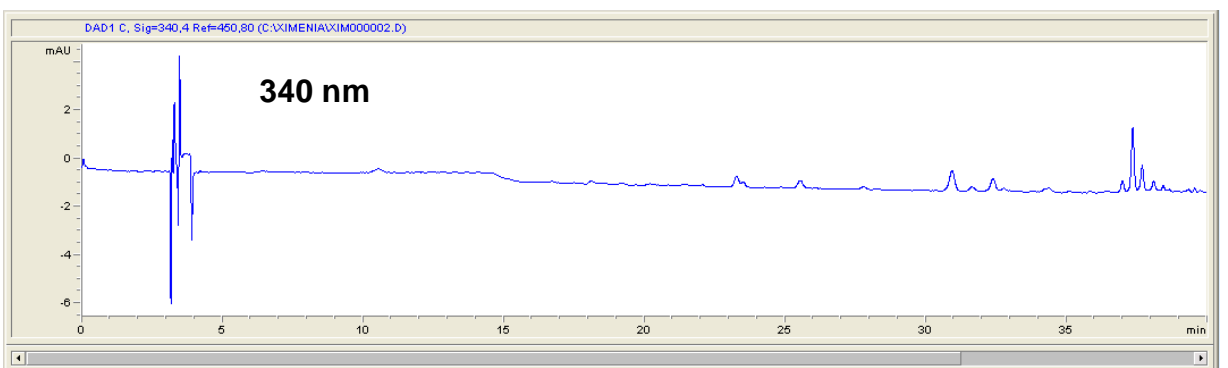
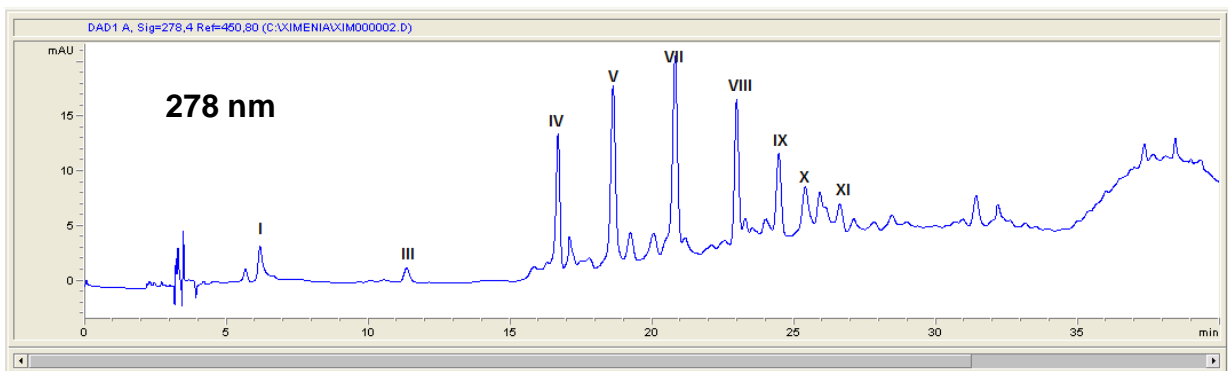
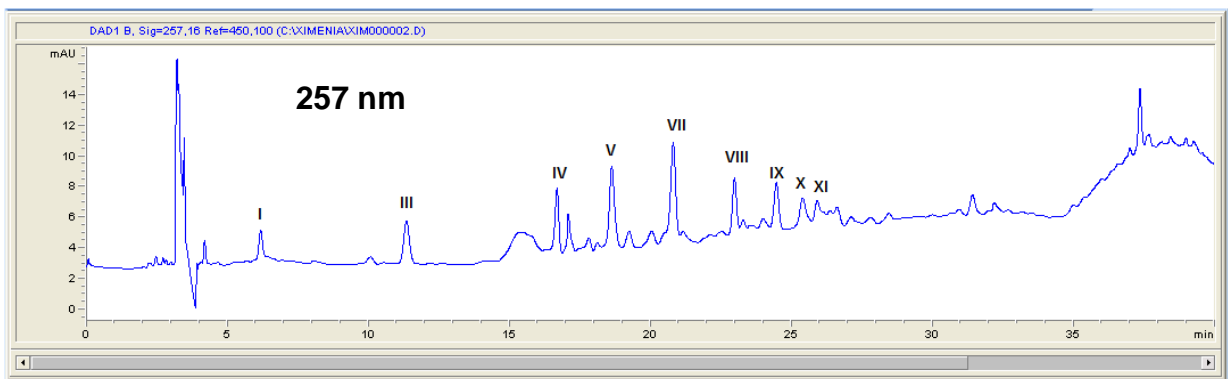
Figura 08 - Cromatogramas do extrato metanólico das folhas de *Ximenia americana* nos comprimentos de onda 257, 278 e 340 nm, respectivamente.





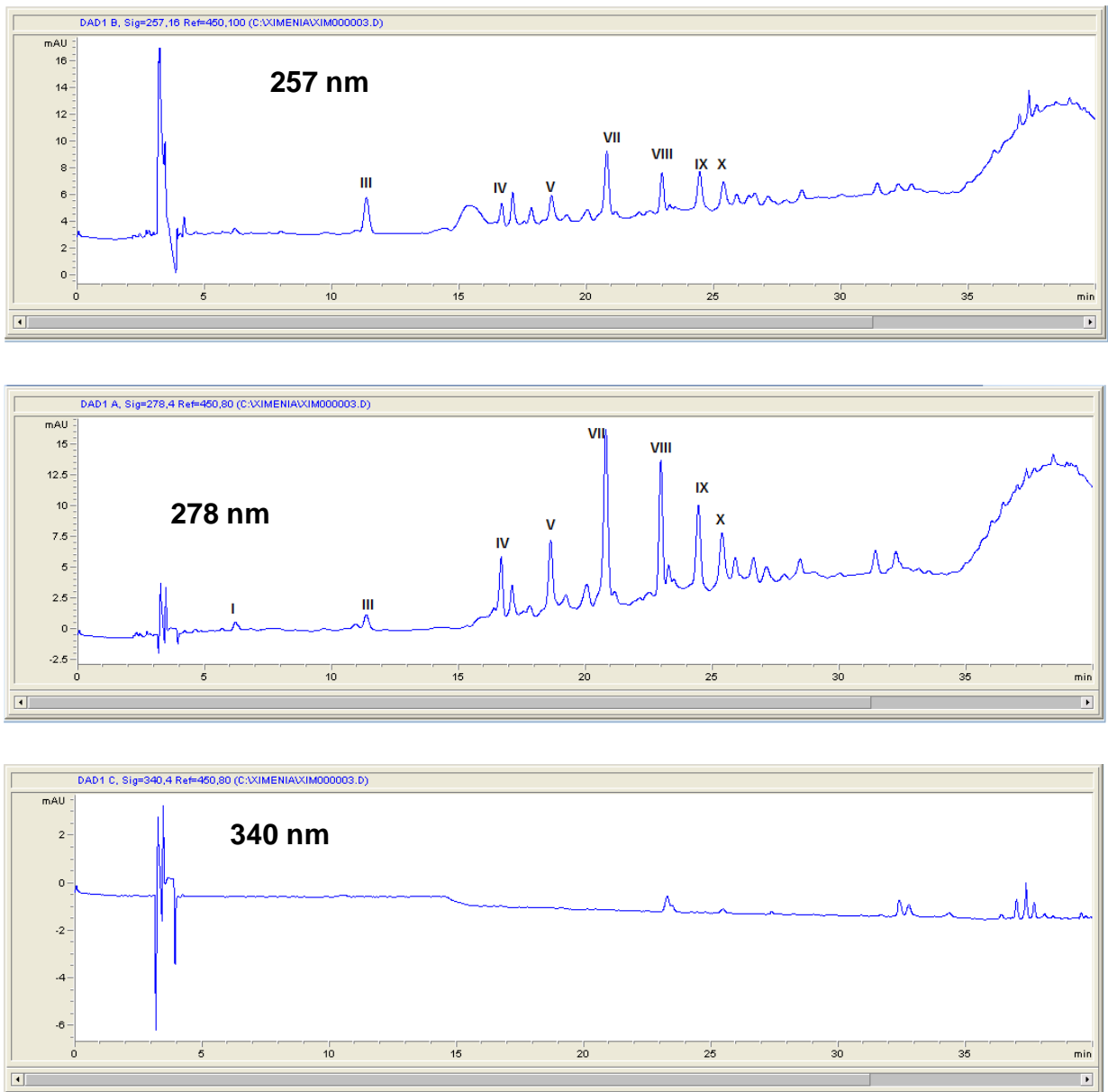
Fonte: Autor, 2018.

Figura 09 - Cromatogramas do extrato metanólico do caule de *Ximenia americana* nos comprimentos de onda 257, 278 e 340 nm, respectivamente.



Fonte: Autor, 2018.

Figura 10 - Cromatogramas do extrato metanólico da raiz de *Ximenia americana* nos comprimentos de onda 257, 278 e 340 nm, respectivamente.



Fonte: Autor, 2018.

No extrato metanólico das folhas foram detectados compostos em todos os comprimentos de onda utilizados para a análise. Não foram detectados compostos nos extratos metanólicos de caule e raiz quando o comprimento de onda de detecção foi 340nm.

Tabela 05 - Compostos polifenólicos identificados em CLAE-ESI-MS no modo negativo nos extratos metanólicos de *X. americana*.

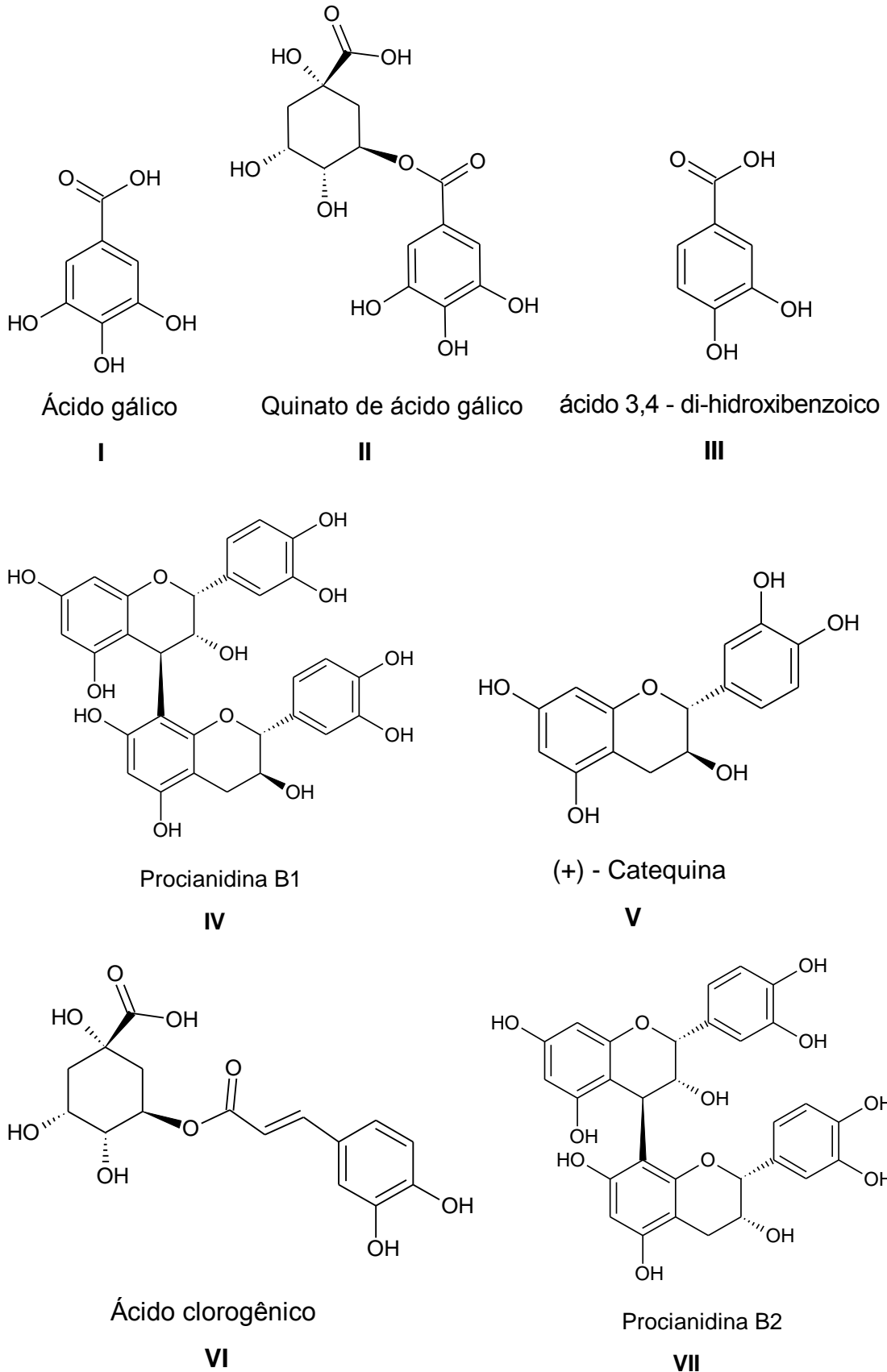
N°	Tempo de retenção	Composto	Fórmula	HPLC-ESI-MS		Parte da planta	DAD $\lambda_{\text{Máxima}}$
				[M-H] ⁻	[2M-H] ⁻		
I	6.16	Ácido gálico	C ₇ H ₆ O ₅	169.0; 339.0		Folhas, caule e raiz	230; 275
II	7.51	Quinato de ácido gálico	C ₁₄ H ₁₆ O ₁₀	343.1; 687.2		Folhas	230; 275
III	11.32	Ácido 3,4-Di-hidro xiben zoico	C ₇ H ₆ O ₄	153.1; 307.1		Caule e raiz	230; 275
IV	16.66	Procianidina B1	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	577.2; 1155.4		Caule e raiz	235; 280
V	18.63	(+)-Catequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.1; 579.2		Caule e raiz	235; 280
VI	20.58	Ácido clorogênico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.1; 707.1		Folhas	230; 330
VII	20.80	Procianidina B2	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	577; 1155.2		Caule e raiz	235; 280
VIII	22.99	(-)-Epicatequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.1; 579.1		Caule e raiz	230; 280
IX	24.45	Procianidina C1	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	865.1		Raiz e caule	235; 280
X	25.38	Procianidina tetrâmera	C ₆₀ H ₅₀ O ₂₄	1155.036		Raiz e caule	235; 280
XI	26.60	Procianidina pentâmera	C ₇₅ H ₆₂ O ₃₀	1441.1		Caule	235; 280
XII	35.87	Quercetina arabinosídeo-1 *	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	433.1; 867.2		Folhas	260; 360
XIII	36.41	Quercetina arabinosídeo-2 *	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	433.1; 867.2		Folhas	260; 360
XIV	37.02	Quercetina arabinosídeo-3 *	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	433.1; 867.2		Folhas	260; 360
XV	37.41	Quercetina ramosídeo	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448.38		Folhas	260; 360
XVI	38.16	Canferol arabinosídeo-1 **	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₀	417.4; 835		Folhas	270; 350
XVII	38.56	Canferol arabinosídeo-2 **	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₀	417.4; 835		Folhas	270; 350
XVIII	39.19	Canferol arabinosídeo-3 **	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₀	417.4; 835		Folhas	270; 350
XIX	39.59	Canferol ramosídeo	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	431.373		Folhas	270; 350

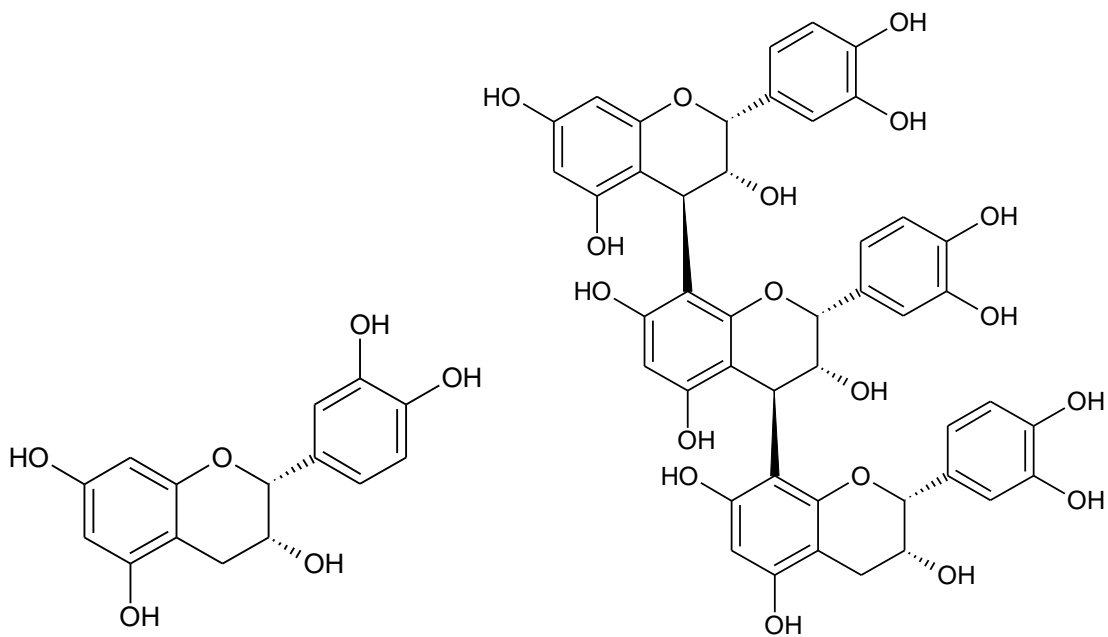
(*) – Compostos isômeros em que não se tem a posição exata da arabinose.

(**) – Compostos isômeros em que não se tem a posição exata da arabinose.

Fonte: Autor, 2018.

Figura 11 – Estruturas dos compostos identificados nos extratos metanólicos das folhas, caule e raiz de *X. americana*.

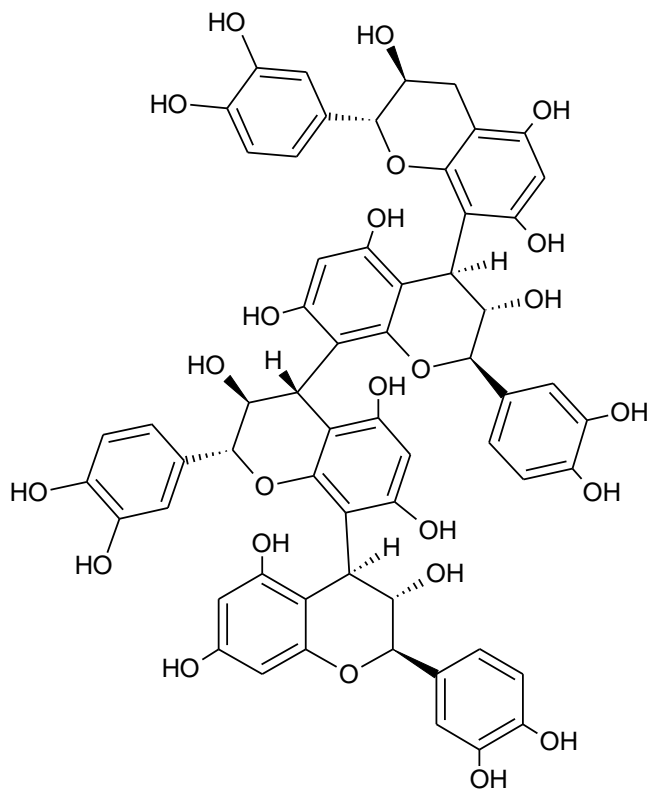




(-) - Epicatequina

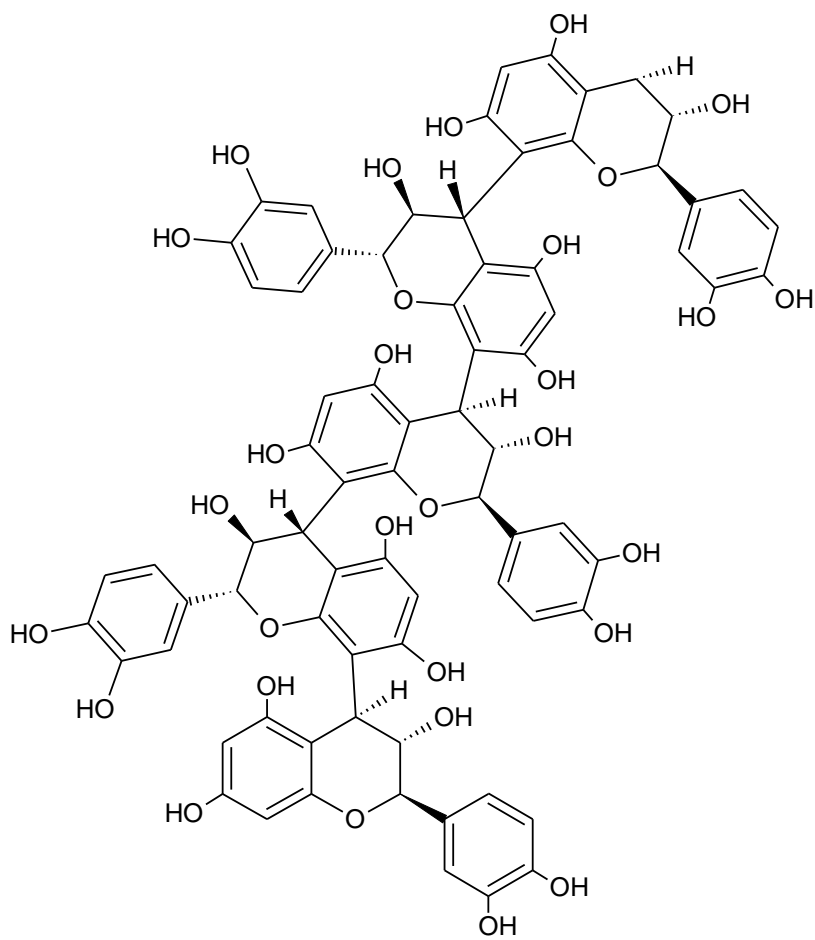
VIII

Procianidina C1

IX

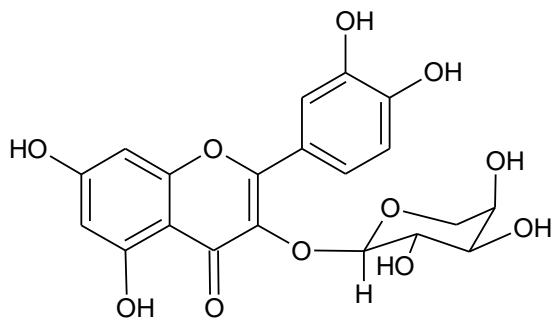
Procianidina tetrâmera

X

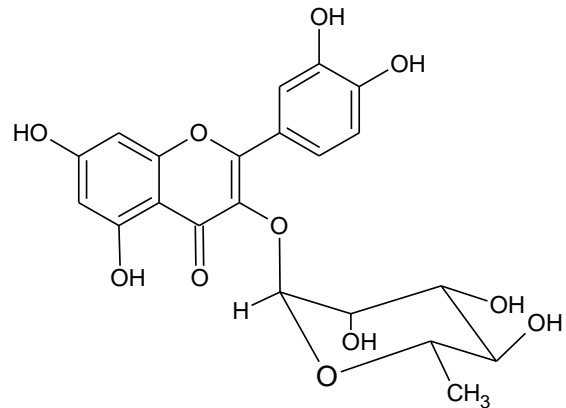


Procianidina pentâmera

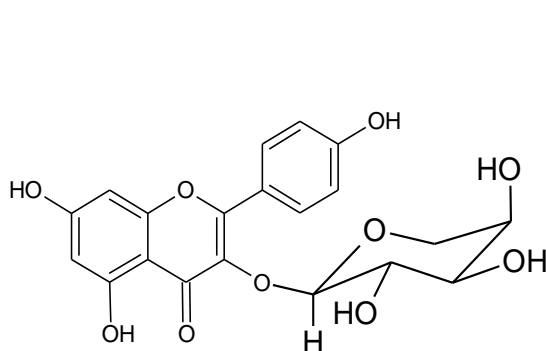
XI



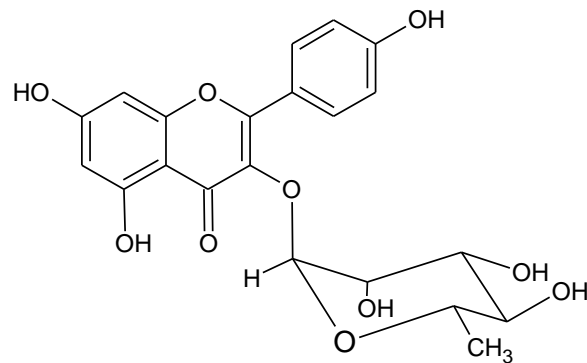
Quercetina arabinosídeo (1, 2, 3)

XII / XIII / XIV

Quercetina ramnosídeo

XV

Canferol arabinosídeo (1, 2, 3)

XVI / XVII / XVIII

Canferol ramnosídeo

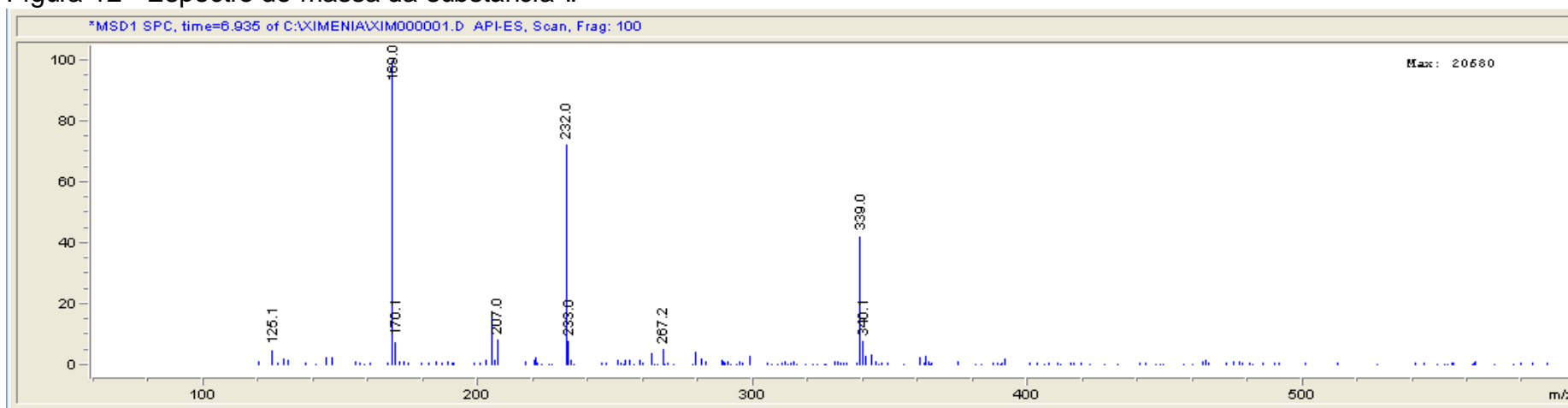
XIX

Fonte: Autor, 2018.

Dois desses compostos encontrados e apresentados neste trabalho, a quercetina e a (-) – epicatequina, já foram relatados e isolados por Uchôa et al (2016), reforçando a ocorrência das mesmas nessa espécie.

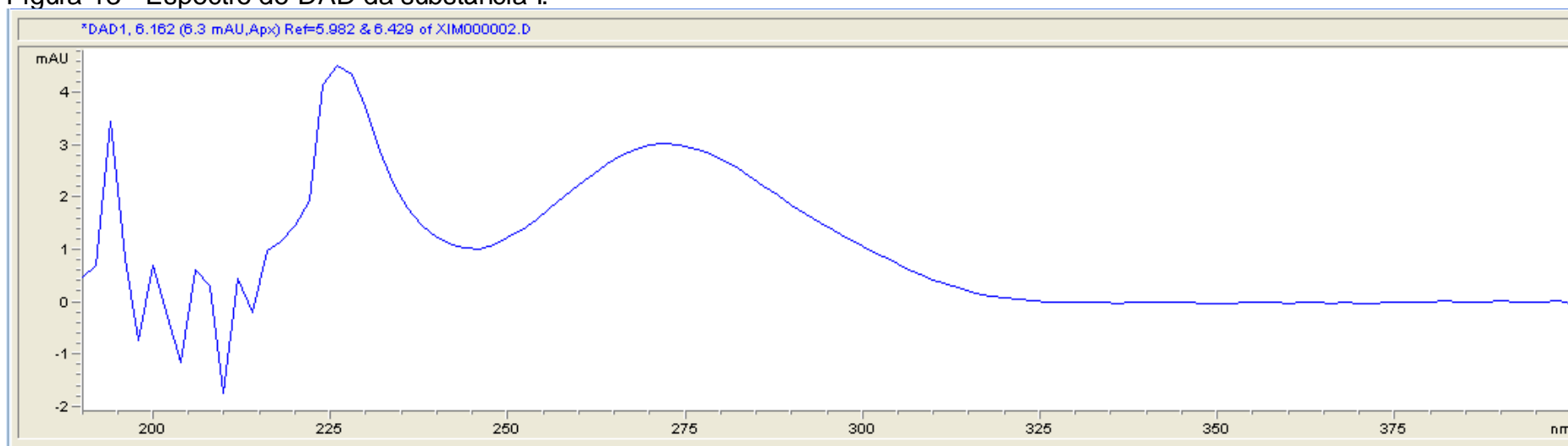
Para comprovar a presença e identificação das substâncias com as estruturas apresentadas nos extratos metanólicos da raiz, caule e folhas de *X. americana*, foram apresentados os espectros de massa e espectros de DAD de cada uma delas. Devido ao grande número de compostos, nesta parte do trabalho, serão apresentados apenas os espectros dos compostos I e II. Todos os espectros de massa e DAD dessas substâncias se encontram nos anexos A e B, respectivamente.

Figura 12 - Espectro de massa da substância I.



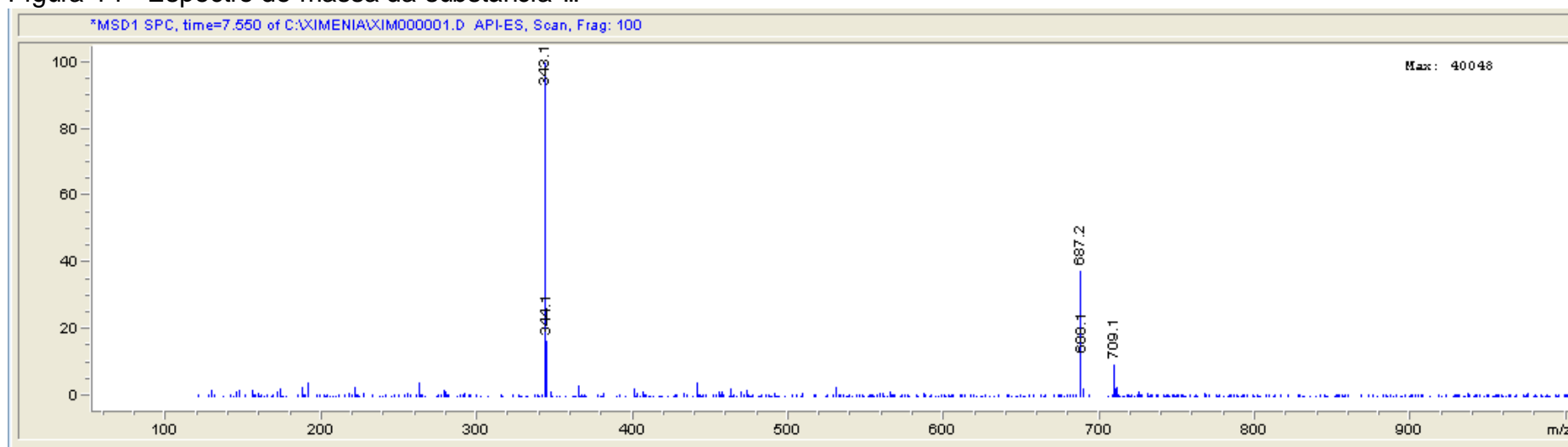
Fonte: Autor, 2018.

Figura 13 - Espectro de DAD da substância I.



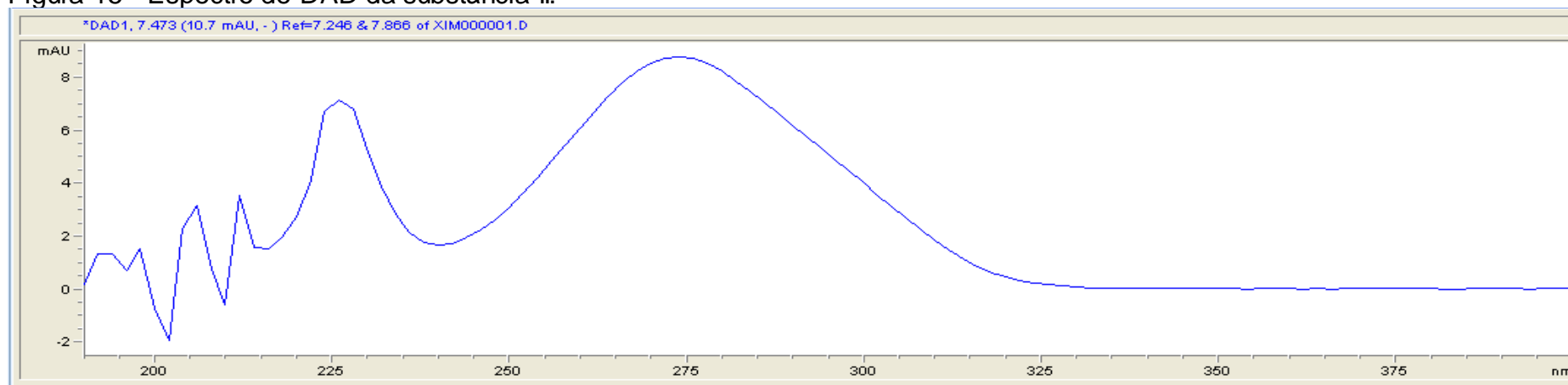
Fonte: Autor, 2018.

Figura 14 - Espectro de massa da substância II.



Fonte: Autor, 2018.

Figura 15 - Espectro de DAD da substância II.



Fonte: Autor, 2018.

A partir dos espectros de HPLC-MS, do valor da área de pico associada a cada um dos compostos e suas respectivas curvas de calibração, já padronizadas, foi possível realizar a quantificação de cada um desses compostos, como se visualizam nas Tabelas 06, 07 e 08.

Tabela 06 - Quantificação dos compostos identificados no extrato metanólico das folhas de *Ximenia americana*

Tempo (TR)	Compostos identificados e quantificados X. <i>americana</i>	Área do pico (AU)	Teor do composto em relação ao extrato total (mg/g)	Teor do composto em relação a massa seca (g/kg)	Equação da reta
6,16	Ácido gálico	273	23,991	4,791	$3,6203x + 7,8571$
7,51	Quinato de ácido gálico ^a	185	16,029	3,201	
20,58	Ácido clorogênico	184	10,038	2,004	
35,87	Quercetina arabinosídeo-1 ^b	179,325	11,149	2,226	$5,8056x - 18,271$
36,41	Quercetina arabinosídeo-2 ^b	86,473	5,910	1,180	
37,02	Quercetina arabinosídeo-3 ^b	572,459	33,332	6,656	
37,41	Quercetina ramnosídeo ^b	1579,123	90,133	17,998	
38,16	Canferol arabinosídeo-1c	234	1,654	0,330	$12,828x + 169,22$
38,56	Canferol arabinosídeo-2 ^c	215	1,169	0,233	
39,19	Canferol arabinosídeo-3 ^c	392	5,689	1,136	
39,59	Canferol rhamnosídeo ^c	576	10,388	2,074	

(a) Composto quantificado com o ácido gálico na forma livre.

(b) Compostos que foram quantificados com a quercetina na forma livre.

(c) Compostos que foram quantificados com o canferol na forma livre.

Fonte: Autor, 2018.

Tabela 07 - Quantificação dos compostos fenólicos identificados no extrato metanólico do caule de *Ximenia americana*.

Tempo de retenção (min.)	Compostos identificados e quantificados em X. <i>americana</i>	Área do pico (AU)	Teor do composto mg/g do extrato total (mg/g)	Teor do composto fenólico em (g) /kg de massa seca	Equação da reta
6,16	Ácido gálico	41	2,528	0,501	$3,6203x + 7,8571$
11,32	3,4-DHBA	41	1,733	0,344	$3,6833x + 7,886$
16,66	Procianidina B1	162	18,670	3,700	$2,4354x - 2,6571$
18,63	(+)-Catequina	301	63,479	12,581	$1,2985x + 2,5$
20,8	Procianidina B2	370	42,972	8,517	$2,406x - 4,4143$
22,99	(-)-Epicatequina	237	41,319	8,189	$1,5691x + 2,2143$
24,46	Procianidina C1	260	*	*	*
25,39	Procianidina tetrâmera	154	*	*	*
26,6	Procianidina pentâmera	178	*	*	*

(*) Compostos que não foram quantificados por falta de sua curva de calibração.

Fonte: Autor, 2018.

Tabela 08 - Quantificação dos compostos fenólicos identificados no extrato metanólico da raiz de *Ximenia americana*.

Tempo (TR)	Compostos identificados e quantificados em <i>X. americana</i>	Área do pico (AU)	Quantidade do composto (mg) / 1,7474g extrato	Quantidade do composto (g) / kg de massa seca	Equação da reta
6,16	Ácido gálico	9	0,110	0,022	$3,6203x + 7,8571$
11,35	3,4-DHBA	39	2,003	0,399	$3,6833x + 7,886$
16,66	Procianidina B1	73	10,857	2,161	$2,4354x - 2,6571$
18,64	(+)-Catequina	159	42,121	8,384	$1,2985x + 2,5$
20,8	Procianidina B2	287	42,329	8,426	$2,406x - 4,4143$
22,99	(-)-Epicatequina	195	42,938	8,547	$1,5691x + 2,2143$
24,45	Procianidina C1	318	*	*	*
25,38	Procianidina tetrâmera	253	*	*	*

(*) Compostos que não foram quantificados por falta de sua curva de calibração.

Fonte: Autor, 2018.

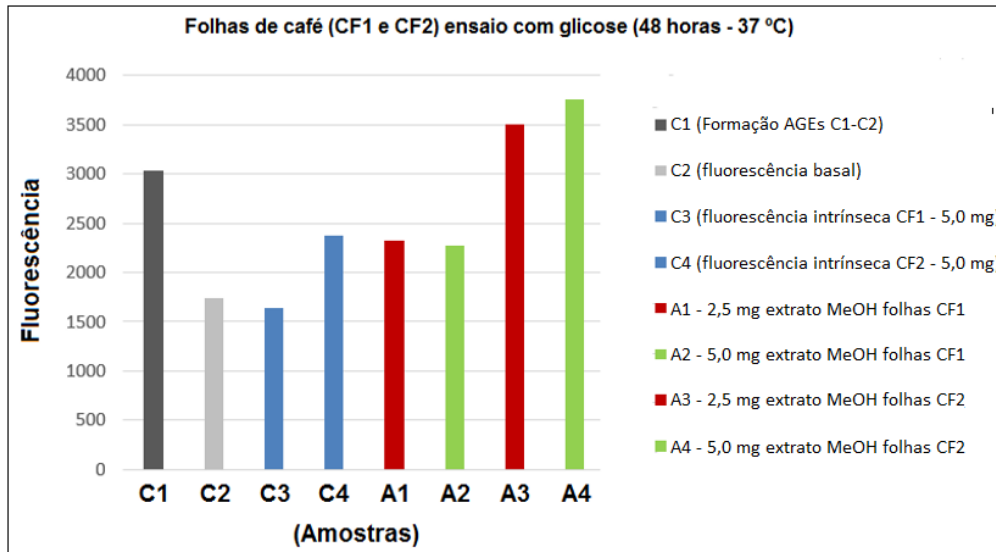
4.2 CAPACIDADE ANTIGLICANTE

Neste tópico, apresentaremos os resultados sobre os ensaios associados à ação antiglicante dos extratos metanólicos das folhas de café e da mangiferina.

4.2.1 Inibição da formação dos AGE's usando extratos metanólicos das folhas de Café.

As figuras 16 e 17 apresentam os resultados obtidos para análise da ação antiglicante dos extratos metanólicos das folhas de café (CF1 e CF2), utilizando glicose e metilglioxal, respectivamente, com 48 horas de incubação. As colunas referentes aos controles C2 destas figuras indicam a fluorescência basal do meio reacional (açúcar ou espécies dicarbonílicas + BSA + solução tampão) sem a presença da enzima xantina oxidase, ou seja, a intensidade de fluorescência correspondente apenas à mistura e a uma quantidade muito pequena de AGE's formados.

Figura 16 - Fluorescência dos ensaios de extratos metanólicos das folhas de café com glicose.



Fonte: Autor, 2018.

Os controles C1 demonstram as intensidades de fluorescência das amostras as quais se adicionaram a enzima xantina oxidase, que de maneira indireta, acelera a reação de formação dos AGE's. A rápida formação dos AGE's neste meio ocorre devido à presença de radicais livres hidroxila, originados no processo de oxidação da hipoxantina (presente no tampão) a ácido úrico, catalisado pela enzima (MARQUES, 2017). Ao se comparar os valores de C1 com C2, verifica-se um aumento da fluorescência em C1, indicando a formação dos AGE's neste controle em ambos os ensaios (glicose e metilglioxal).

As amostras identificadas como controles C3 e C4 indicam respectivamente a fluorescência para o meio basal contendo 5,0 mg dos extratos metanólicos das folhas de café dos tipos CF1 e CF2, sem a presença de XO (fluorescência intrínseca dos extratos). Ao se comparar a intensidade de fluorescência destes controles com a fluorescência basal (C2), observa-se que apenas CF2 apresenta fluorescência intrínseca significativa (aumento em relação a C2). Assim, sabendo que o período de 48 horas, na ausência de XO, não é suficiente para obtenção dos AGE's, supõe-se a elevação de fluorescência observada em C4, à presença de espécies com esta característica na constituição química do extrato de CF2.

As colunas A1, A2, A3 e A4 representam os sistemas nos quais foram adicionados os extratos metanólicos das folhas de café (2,5 e 5,0 mg), contendo XO, para determinação de sua possível ação antiglicante. Esta capacidade é indicada ao

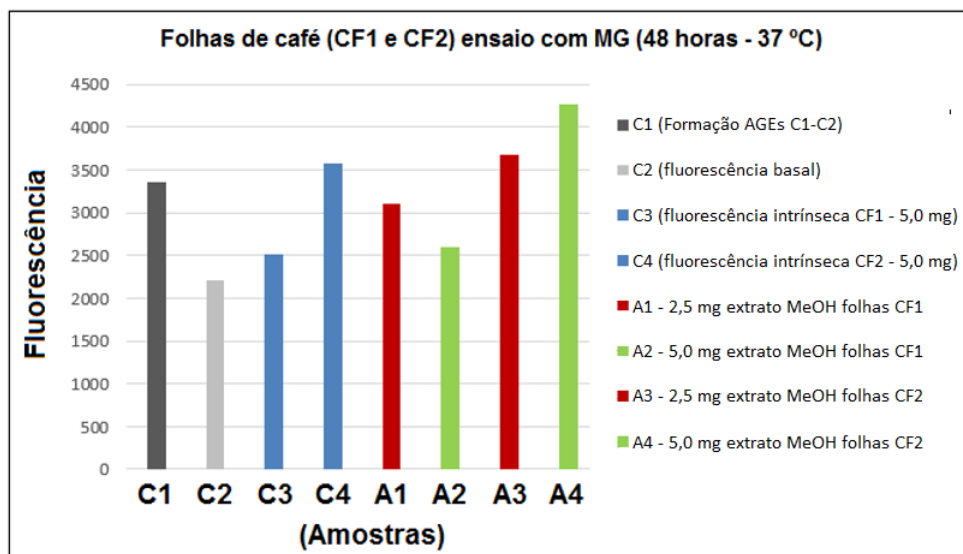
se verificar redução da fluorescência destas amostras em relação ao controle C1, no qual a formação dos AGE's ocorre na ausência dos extratos. A extensão desta diminuição, indica a eficácia da espécie testada em combater a formação dos AGE's.

Portanto os dados indicam que apenas as amostras contendo CF1 (A1 e A2), apresentaram intensidades de fluorescência inferiores a C1, demonstrando sua ação antiglicante. Ainda é possível perceber que ao dobrar a massa do extrato CF1 (A2), não obtem-se uma redução significativa da fluorescência quando comparado a 2,5 mg (A1).

Conforme mencionado, o extrato CF2 apresenta elevada fluorescência intrínseca. Tal evidência é verificada novamente ao se confrontar as maiores intensidades de fluorescência das amostras A3 e A4 (2,5 e 5,0 mg de CF2) quando comparadas ao controle no qual ocorre a formação dos AGE's sem a presença do extrato (C1). Portanto devido as interferências de fluorescência dos compostos existentes em CF2, não é possível afirmar que o mesmo possui ação antiglicante considerando o método avaliado.

Ressalta-se que toda a discussão apresentada neste tópico ocorre de maneira equivalente quando se compara os ensaios da glicose e MG (figuras 16 e 17 respectivamente), demonstrando a reprodutibilidade dos métodos.

Figura 17 - Fluorescência dos ensaios de extratos metanólicos das folhas de café com MG.



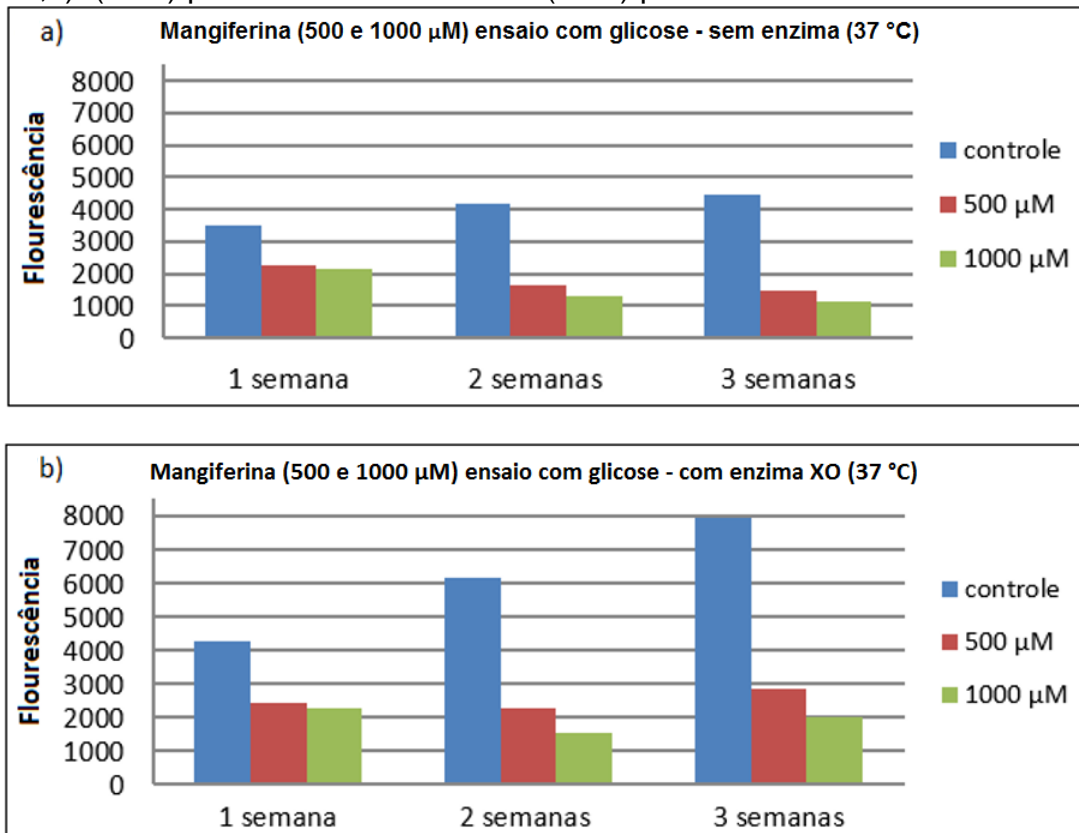
Fonte: Autor, 2018.

4.2.2 Inibição da formação dos AGE's usando Mangiferina.

Os dados referentes à capacidade da mangiferina em atuar como agente antiglicante nos experimentos utilizando via não enzimática (métodos clássicos), demonstram uma significativa eficácia (figura 18-a). Nos controles, aos quais não se adicionou mangiferina, verifica-se a formação gradativa dos AGE's através do aumento da intensidade da fluorescência. Dessa forma, à medida em que o período de incubação aumenta, a quantidade de AGE's torna-se cada vez maior. Porém, a adição de 1 mL de solução 500 μ M de mangiferina provoca diminuição acentuada (aproximadamente 45% em 1 semana; 65% em 2 e 3 semanas) da intensidade de fluorescência observada, quando comparada com os controles sem mangiferina. A figura 18-a) indica ainda que a utilização do mesmo volume de uma solução com o dobro da concentração de mangiferina, 1000 μ M, não produz redução muito mais significativa quando comparada à solução de 500 μ M.

Comparando-se os resultados via métodos clássicos com os procedimentos nos quais se utilizou o meio rico em radicais livres (adição da enzima XO; figura 18-b), nota-se a maior formação de AGE's nos controles (intensidade de fluorescência) em todos os períodos de incubação avaliados (1, 2 e 3 semanas), demonstrando que a glicação das proteínas é favorecida pela presença daquelas espécies. Apesar da maior intensidade de fluorescência apresentada para as amostras com XO, o gradiente de diminuição da fluorescência observado é o mesmo quando comparado ao método clássico (figura 18-a), no qual apenas 500 μ M de mangiferina já é suficiente para reduzir mais da metade da intensidade de fluorescência.

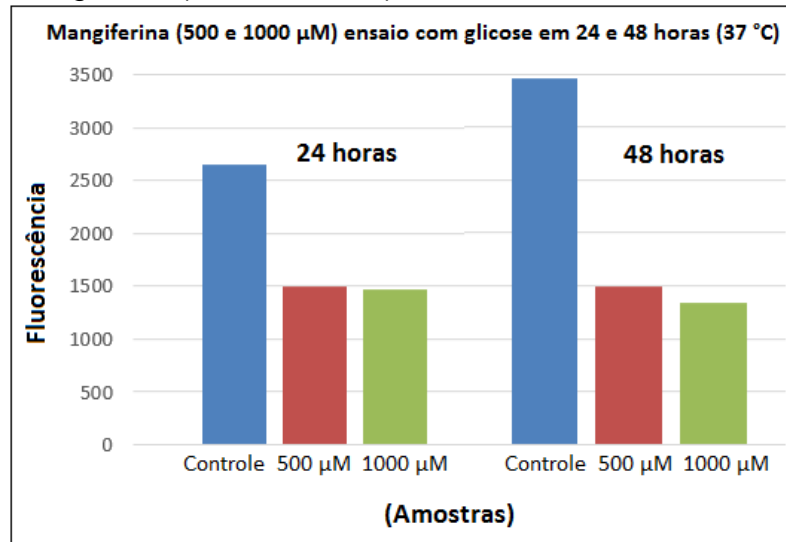
Figura 18 - Combate à formação dos AGE's utilizando diferentes concentrações de mangiferina (37 °C) em diferentes períodos de incubação em tampão fosfato puro (pH= 6,6). (18-a) procedimentos clássicos (18-b) procedimento com XO.



Fonte: Autor, 2018.

Nos ensaios utilizando 24 e 48 horas de incubação (figura 19), obteve-se o mesmo perfil dos ensaios que utilizaram 1, 2 e 3 semanas (com e sem enzima). Percebe-se a formação dos AGE's nos dois controles, sendo que naquele com período de incubação maior, tem-se uma maior quantidade de AGE's (maior valor de fluorescência). A utilização de 1mL da solução de concentração de 500 µM de mangiferina foi suficiente para reduzir aproximadamente em 42% a fluorescência do controle no período de incubação de 24 horas e, aproximadamente, em 57% com 48 horas. A solução de mangiferina de concentração igual a 1000µM evidenciou uma ação antiglicante quase equivalente à solução de concentração igual a 500 µM.

Figura 19 - Combate à formação dos AGE's utilizando diferentes concentrações de mangiferina (37 °C) na presença da enzima XO em tampão fosfato puro (pH= 6,6); procedimento com glicose (24 e 48 horas).



Fonte: Autor, 2018.

A figura 20 apresenta os resultados obtidos para as metodologias realizadas nas quais se substituiu a solução de açúcar (D-glicose) por igual quantidade de compostos dicarbonílicos (MG e GO), na presença (C1) e na ausência (C2) da enzima XO, utilizando incubação de apenas 3 horas. Os valores de fluorescência referentes aos controles C2 (fluorescência basal), em todas as situações apresentadas na figura 20 (20-a, 20-b, 20-c, 20-d), demonstraram intensidades de fluorescência relativamente altas para sistemas que não apresentam a enzima XO (sem formação de AGE's). Estes valores podem ser justificados pelo fato dos compostos dicarbonílicos, GO e MG, apresentarem elevada fluorescência intrínseca, principalmente MG, conforme indicado na figura 21. Porém, as intensidades de fluorescência referentes aos controles C1, em todas as condições estudadas, são sempre maiores, quando comparadas aos valores dos controles C2 correspondentes em cada gráfico, o que comprova a formação de AGE's em todos os controles C1.

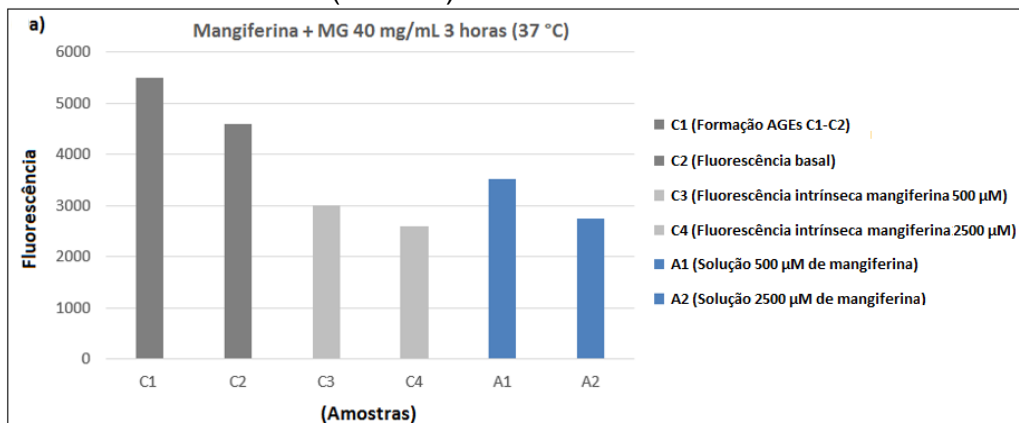
A análise da intensidade da fluorescência para as amostras nas quais se adicionaram as soluções de mangiferina (A1 e A2), demonstra uma diminuição significativa da mesma em relação a C1, devido à capacidade antiglicante da substância citada. Em todos os testes apresentados na figura 20 foi verificado o mesmo padrão de diminuição, no qual a ação da solução de concentração 500µM (A1) reduz mais de 50% da fluorescência. O aumento da concentração da mangiferina não provocou uma alteração significativa nos valores da fluorescência (A2).

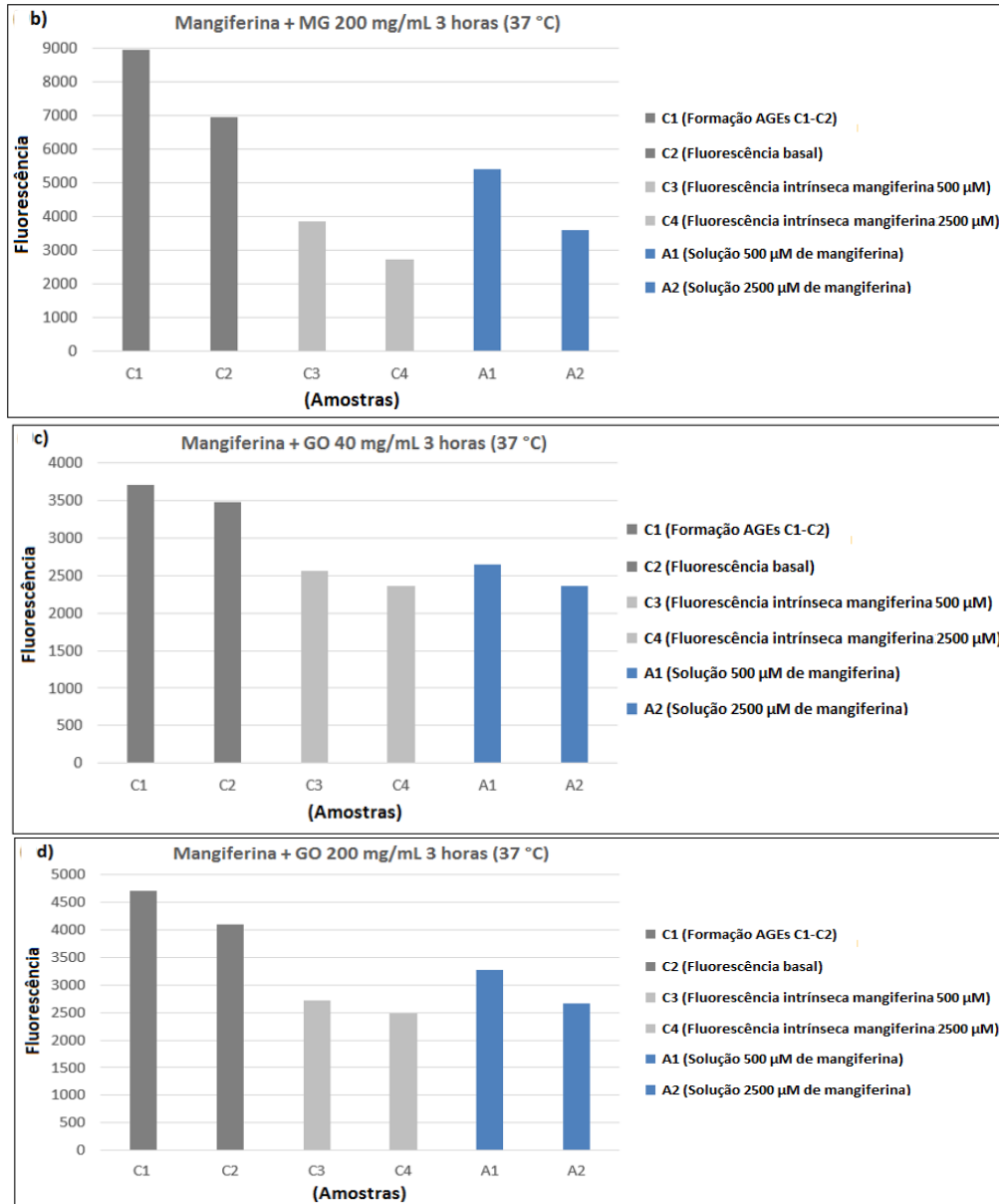
Provavelmente, isso ocorre devido à estequiometria da reação de captura dos compostos dicarbonílicos, MG e GO, usados em cada um dos experimentos. Esse fato também pode ser percebido nos gráficos das figuras 18 e 19.

Ao se adicionar as soluções de mangiferina às condições do meio basal, esperava-se encontrar um possível valor de fluorescência intrínseca atribuída a tal substância. Porém, na verdade, verificou-se um valor de fluorescência inferior ao valor referente ao meio basal (C2) em todas as condições apresentadas na figura 20, indicando que a reação da mangiferina com MG e GO presentes na solução efetivamente ocorre, mesmo sem a formação dos AGE's.

Ao se confrontar os gráficos 20-a e 20-b, verifica-se que a diferença na composição dos dois sistemas se refere à concentração de MG (40 e 200mg/mL), sendo a razão destas igual a 5. É nítido que a fluorescência da coluna A1 do gráfico 20-a é aproximadamente igual ao valor da coluna A2 do gráfico 20-b. Nota-se que a razão das concentrações das soluções de mangiferina também é 5. Esta relação também é verificada ao se comparar C3 do gráfico 20-a com C4 do gráfico 20-b. O mesmo evento acontece quando se comparam as mesmas colunas citadas nos gráficos 20-c e 20-d. Com isso, podemos conjecturar que existe um padrão bem definido de reação da mangiferina com MG e GO. Um aumento de fator 5 na concentração dos compostos dicarbonílicos requereu um aumento do mesmo fator na concentração da solução de mangiferina para a obtenção do mesmo valor de fluorescência.

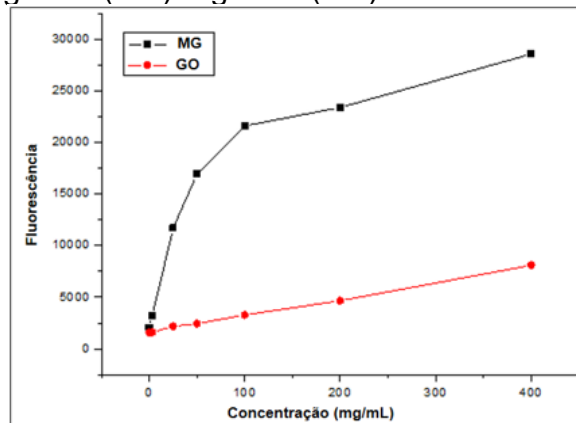
Figura 20 - Combate a formação dos AGE's utilizando diferentes concentrações de mangiferina (37 °C) na presença da enzima XO em tampão fosfato puro (pH= 6,6), procedimento com MG e GO (3 horas).





Fonte: Autor, 2018.

Figura 21 - Fluorescência intrínseca em diferentes concentrações de tampão fosfato puro (pH= 6,6) para metilglioxal (MG) e glioxal (GO).



Fonte: Autor, 2018.

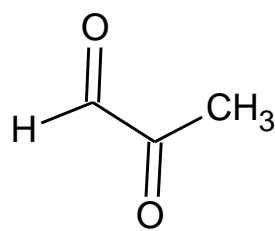
Logo, as figuras 18, 19 e 20, evidenciam nitidamente a elevada capacidade antiglicante da mangiferina, tendo em vista que considerando todos os ensaios realizados, apenas 500 μM da mesma provoca redução superior a 50% da intensidade da fluorescência quando comparadas aos controles (sem mangiferina).

A capacidade antiglicante de algumas classes funcionais (flavonóides, guanidinas, curcuminas) foi anteriormente demonstrada, em trabalhos utilizando os procedimentos clássicos (incubação de até 4 semanas). A ação antiglicante destas espécies é atribuída, pelos autores, devido a capacidade destas em atuar como agentes capturadores de compostos α -dicarbonílicos (capturadores de RCS), originando a formação de adutos mono e dissustituídos. Rutina, reverastrol, aminoguanidina, catequina são algumas das substâncias que se mostraram ativas (THORNALLEY, 2003; SANG et al., 2007).

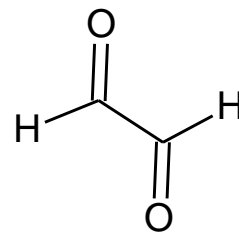
Analisando o possível mecanismo da reação entre a mangiferina e os compostos dicarbonílicos, tais como MG e GO, algumas considerações são importantes:

I. A carbonila dos compostos dicarbonílicos corresponde ao seu sítio ativo de reação, devido ao seu caráter eletrofílico;

Figura 22 - Estrutura dos compostos dicarbonílicos.



metilglioxal (MG)

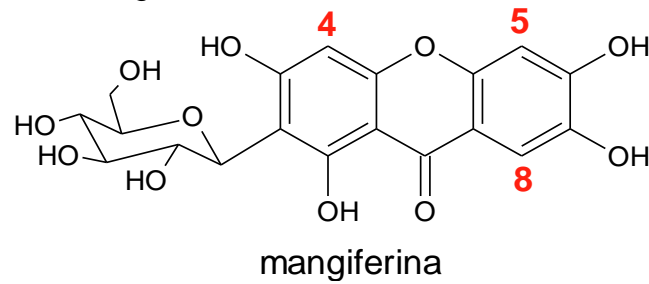


glioxal (GO)

Fonte: Autor, 2018.

II. A estrutura da mangiferina possui dois tipos de sítios que podem funcionar como nucleófilos para promover o ataque à carbonila de MG ou GO: os átomos de oxigênios das funções fenol e éter e os carbonos de números 4, 5 e 8 da nimeração oficial de sua cadeia carbônica, indicados na figura 23.

Figura 23 - Estrutura da mangiferina.

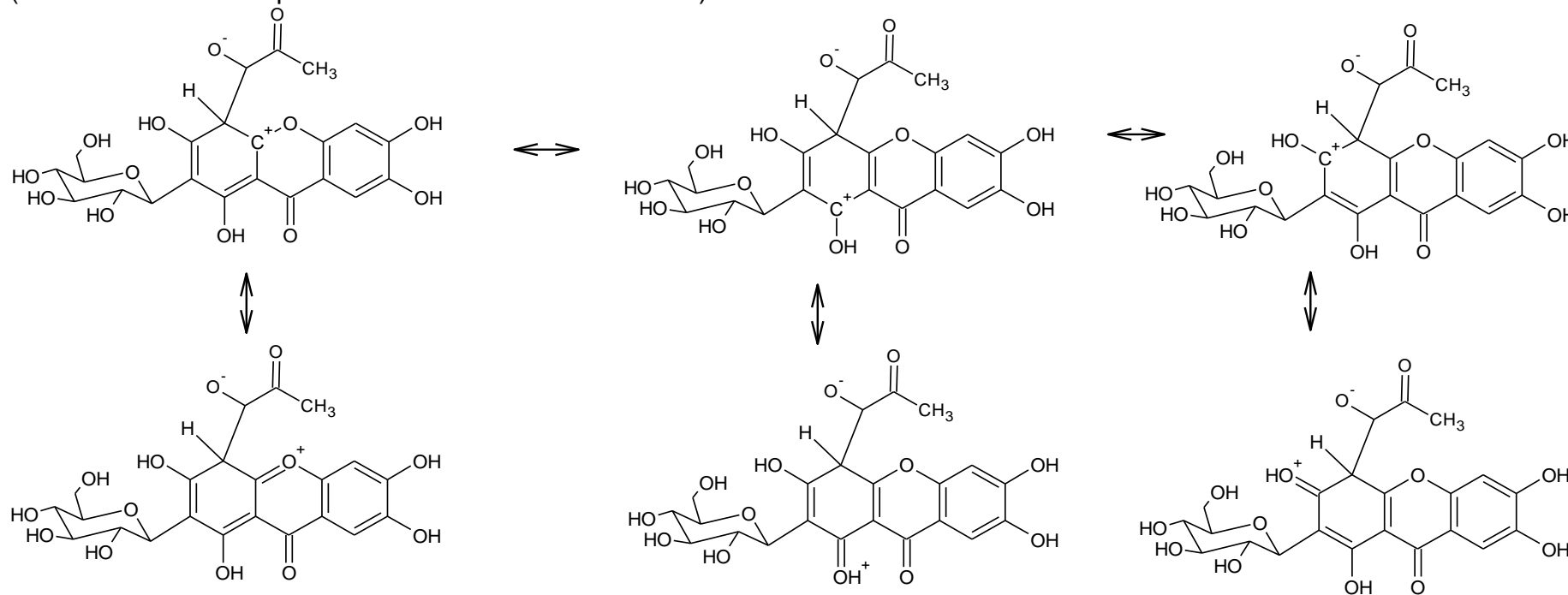


Fonte: Autor, 2018.

É possível afirmar que os átomos de oxigênio citados apresentam uma ação nucleofílica relativamente baixa, em decorrência ao fato de seus pares de elétrons não-ligantes estarem envolvidos no fenômeno da ressonância dos anéis benzênicos presentes em sua estrutura, dificultando o ataque à carbonila de MG ou GO.

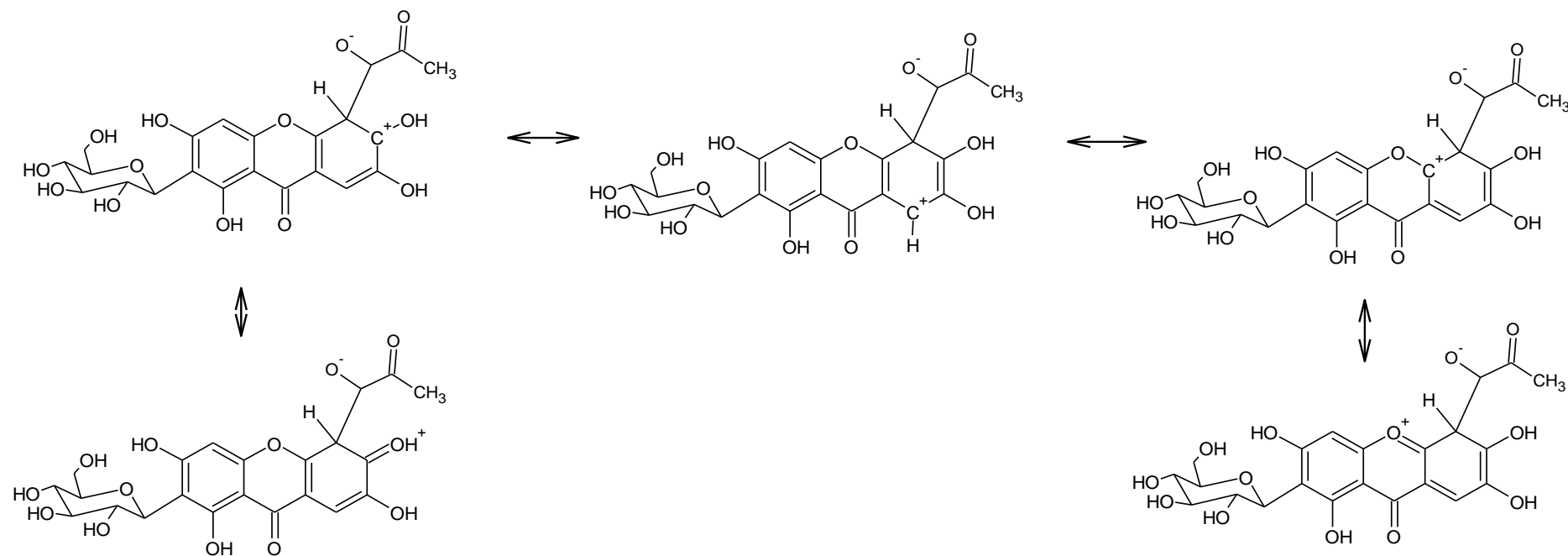
De maneira oposta, os átomos de carbonos dos anéis benzênicos, indicados na figura 23, C-4, C-5 e C-8, atuam como melhores centros nucleofílicos. Tal afirmação ancora-se no fato de que ao se utilizar uma ligação π do anel benzênico para atacar a carbonila, forma-se um carbocátion, que é estabilizado por ressonância. As figuras 24, 25 e 26 apresentam as estruturas de ressonância estabilizadoras dos carbocátions formados, considerando os carbonos C-4, C-5 e C-8, respectivamente.

Figura 24 - Estruturas de ressonância do intermediário formado pela reação da mangiferina mangiferina, através de C4, com MG (carbocátion formado possui 6 estruturas de ressonância).



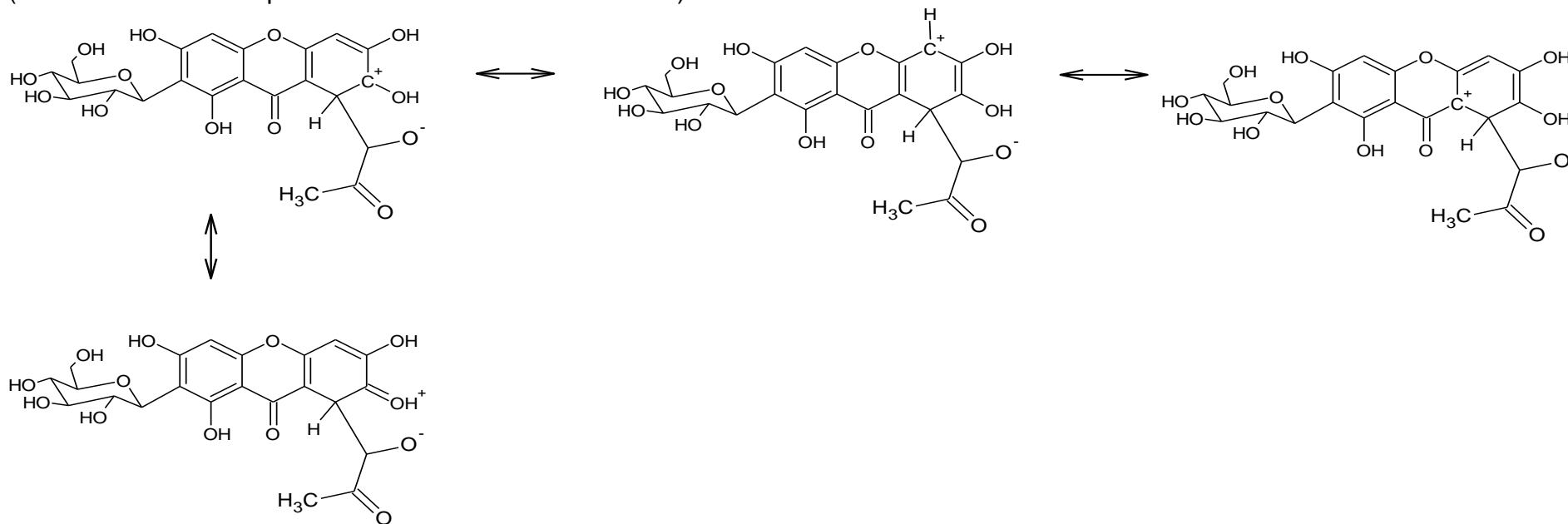
Fonte: Autor, 2018.

Figura 25 - Estruturas de ressonância do intermediário formado pela reação da mangiferina mangiferina, através de C5, com MG (carbocátion formado possui 5 estruturas de ressonância).



Fonte: Autor, 2018.

Figura 26 - Estruturas de ressonância do intermediário formado pela reação da mangiferina mangiferina, através de C8, com MG (carbocátion formado possui 4 estruturas de ressonância).

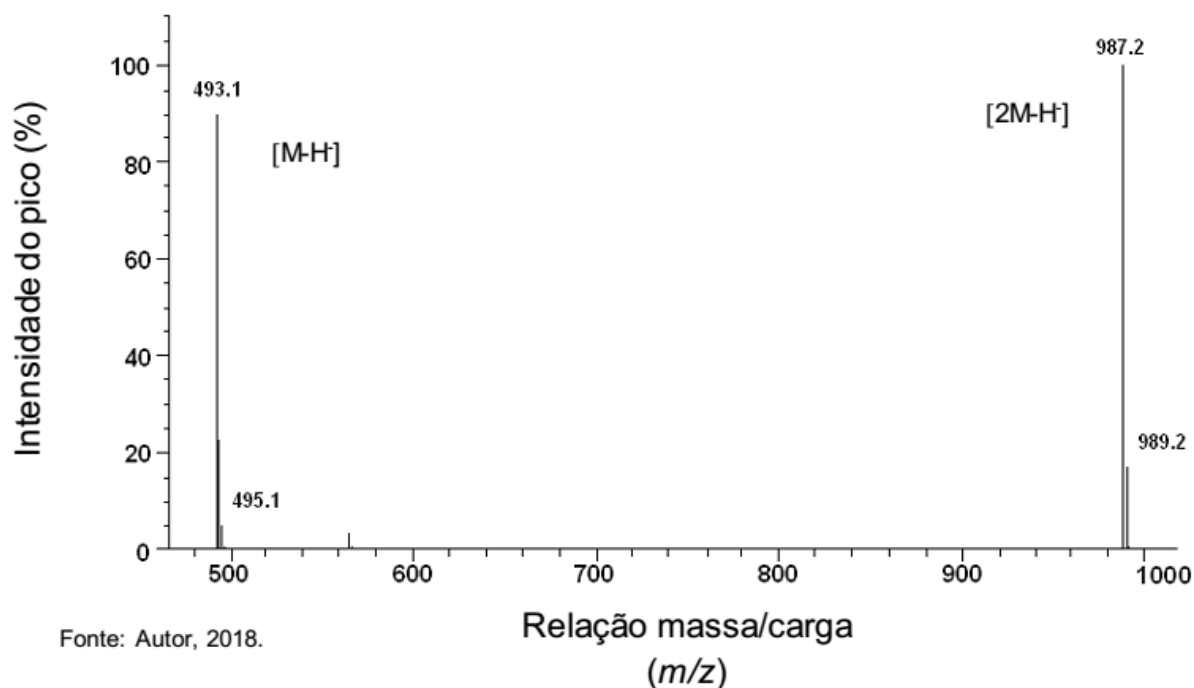


Fonte: Autor, 2018.

Tendo em vista os carbocátions originados em cada um dos casos, verifica-se que aquele formado pela reação do MG com o C-4 da mangiferina apresenta um maior número de estruturas de ressonância, sendo assim, mais estável. Dessa forma, propõe-se a seguinte ordem de reatividade para os carbonos nucleofílicos: C-4 > C-5 > C-8.

A reação entre mangiferina e metilglioxal foi realizada no laboratório DKFZ na Alemanha. Desta reação, foi obtido um produto, um aduto, de massa molar igual a 494 g/mol, que corresponde à incorporação de uma unidade de metilglioxal à estrutura da mangiferina. Seu espectro de massa é apresentado na figura 27. Tanto a mangiferina quanto o aduto obtido, que foi isolado, foram caracterizados por meio de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). Vale salientar que não é objetivo deste trabalho realizar a verificação de quantos adutos são formados nem a determinação dos aspectos quantitativos (rendimento) desta reação. Isso será realizado em trabalhos futuros.

Figura 27 - Espectro de massa do aduto isolado.



Tanto a mangiferina quanto o aduto obtido, que foi isolado, foram caracterizados por meio de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). Os deslocamentos químicos associados aos carbonos e hidrogênios tanto da mangiferina quanto do aduto isolado se encontram na tabela 09 e os respectivos espectros se apresentam no decorrer do texto.

Tabela 09 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C para mangiferina e aduto isolado; deslocamentos químicos em ppm relativos ao TMS (multiplicidade, constante de acoplamento em Hz).

posição	MANGIFERINA		ADUTO	
	Deslocamento químico ^{13}C (ppm)	Deslocamento químico ^1H (ppm)	Deslocamento químico ^{13}C (ppm)	Deslocamento químico ^1H (ppm)
1	162.36		152.756	
2	107.85		(**)	
3	164.42		155.892	
4	94.26	6.472	95.939	(*)
4 ^a	157.51		155.846	
5	103.19	6.945	104.067	6.994
6	154.56		152.756	
7	144.26		145.395	
8	108.81	7.517	109.495	7.525
8 ^a	112.95		113.582	
9	180.18		181.118	
9 ^a	102.35		100.1	
10 ^a	151.96		152.725	
1'	74.25	4.855	(**)	(**)
2'	71.48	4.077	72.047	(**)
3'	79.53	3.438	80.244	3.452
4'	71.19	3.407	72.047	3.438
5'	82.07	3.396	82.720	3.402
6'a	62.13	3.671	63.053	3.663
6'b		3.874		3.874
CD3OD	48.29	3.309	49.151	3.312
DMSO-d6	39.53	2.655	40.188	2.658
TMS	0.00	0.000	0.000	0.000
Carbonila oriunda do MG			174.869	
Metila do MG			21.778	2.019

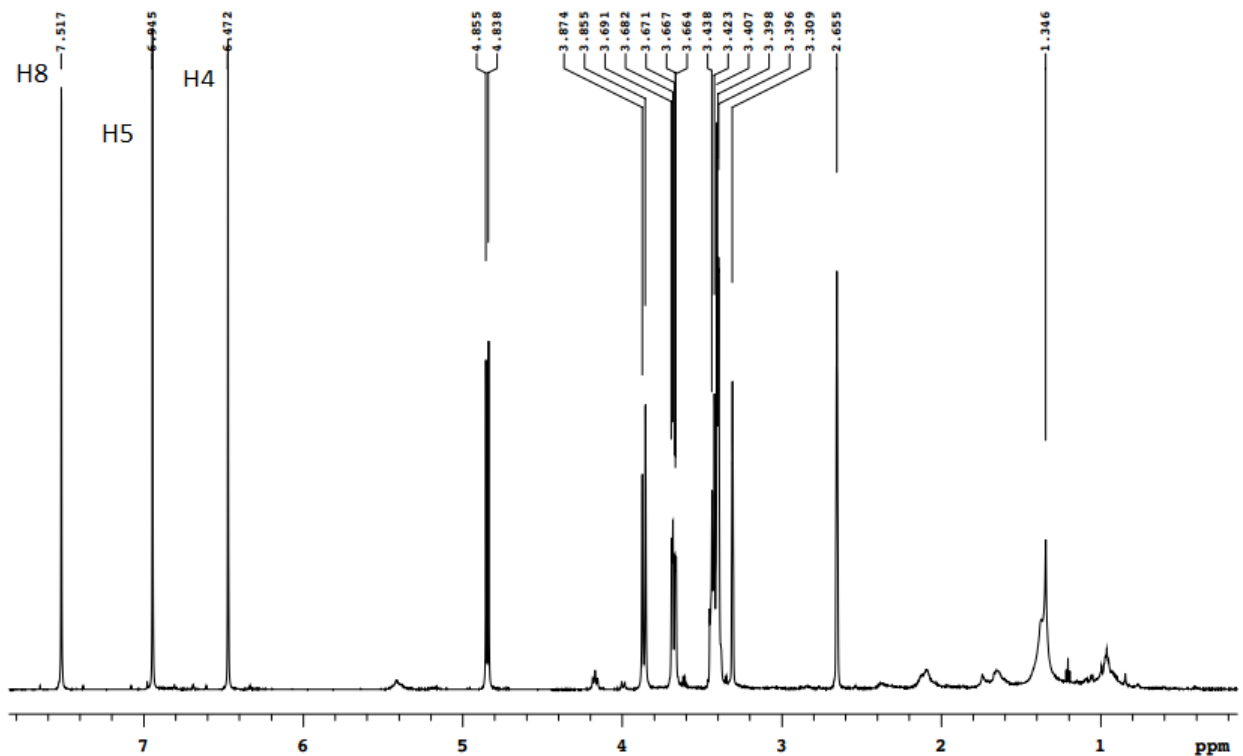
(*) Ausência de sinal. Indica que H-4 não se encontra na estrutura do aduto.

(**) sinal com intensidade muito baixa e, por isso, com valor não identificado.

Fonte: Autor, 2018.

No espectro de RMN ^1H da mangiferina, figura 28, os sinais com deslocamentos químicos de 7.517 ppm, 6.945 ppm e 6.472 ppm se referem aos três hidrogênios ligados diretamente a um anel benzênico. A sequência de sinais apresentada está associada aos hidrogênios ligados aos carbonos 8, 5 e 4, respectivamente, da numeração oficial da cadeia carbônica da mangiferina (figura 23). Essas atribuições se devem aos efeitos eletrônicos de proteção e desproteção provocados pela ressonância existente na estrutura da mangiferina. O hidrogênio 4, H-4, é considerado o mais protegido por se encontrar ligado ao carbono (C-4) que apresenta uma densidade eletrônica maior do que os outros dois átomos de carbono (C-5 e C-8). Isso é verificado por meio da análise das estruturas de ressonância do intermediário formado ao se reagir a mangiferina com o MG, figuras 24, 25 e 26. Quando a reação ocorre através do ataque nucleofílico de C-4 ao carbono carbonílico do MG, figura 24, o intermediário formado é o que possui o maior número de estruturas de ressonância. Conseqüentemente, este é o mais estável, indicando que C-4 é o mais nucleofílico dentre os três carbonos avaliados e H-4 é o hidrogênio mais protegido.

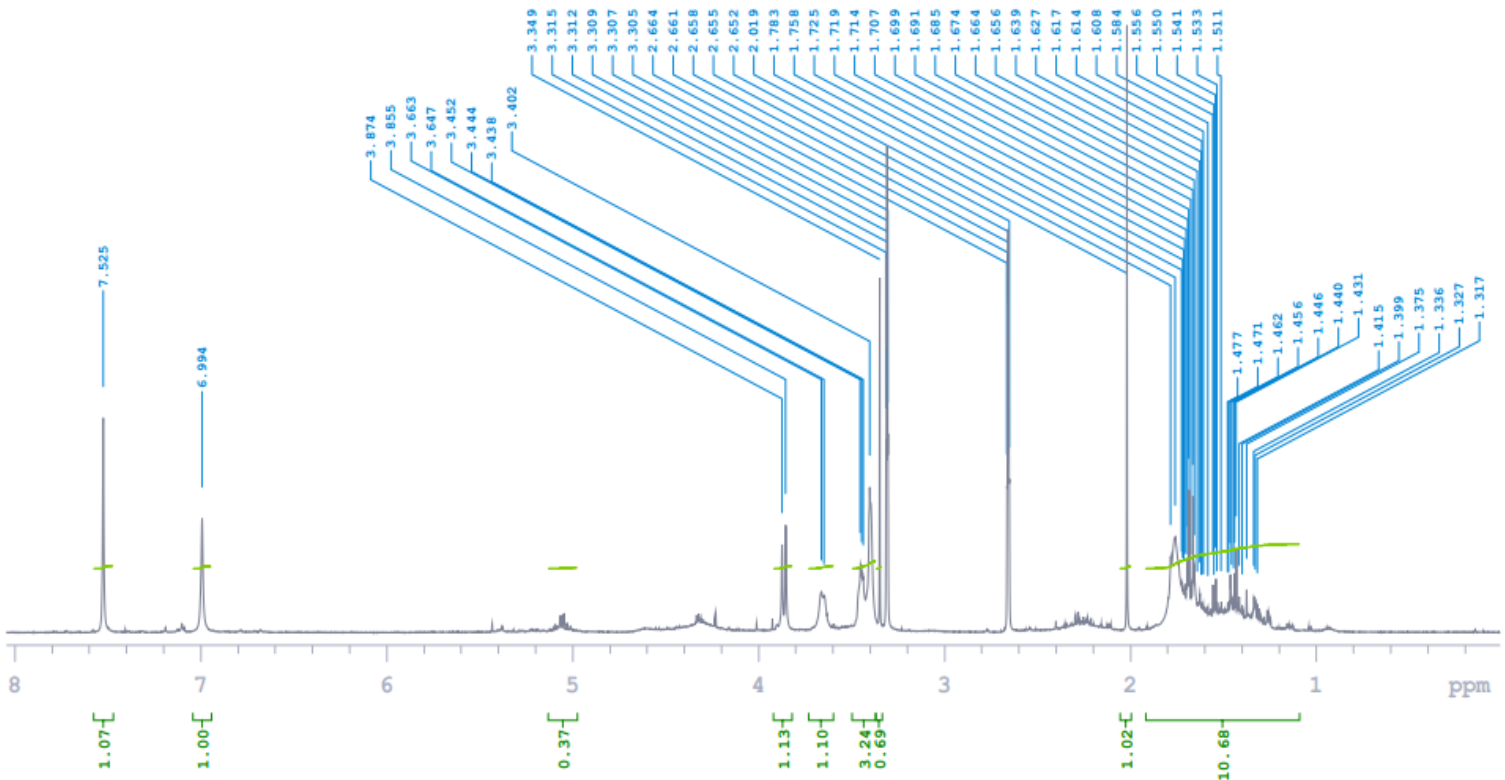
Figura 28 - Espectro de RMN ^1H da mangiferina.



Fonte: Autor, 2018.

No espectro de RMN ^1H do aduto, figura 29, o sinal referente ao hidrogênio ligado ao carbono 4 não apareceu. Dessa forma, conclui-se que a reação entre a mangiferina e o metilglioxal ocorreu por meio da saída do hidrogênio ligado ao carbono 4.

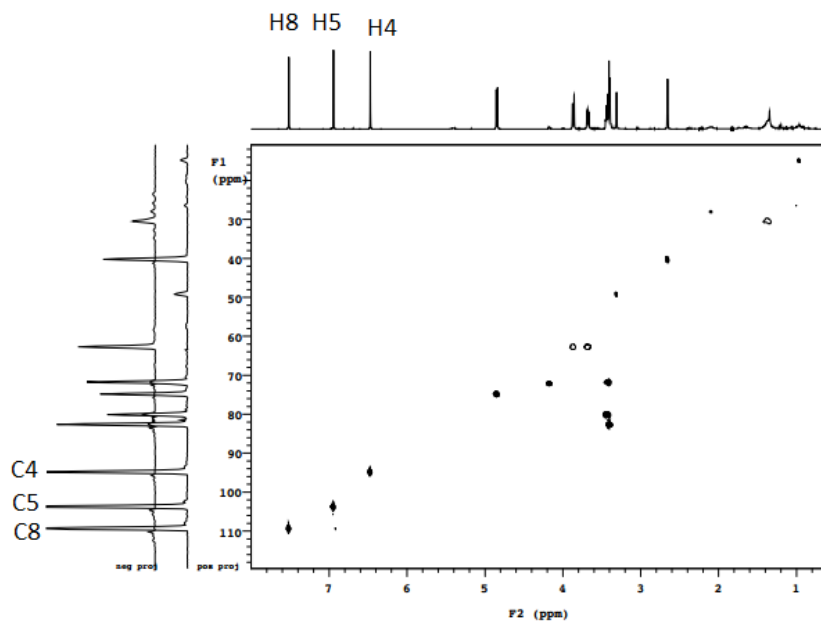
Figura 29 - Espectro de RMN ^1H do aduto isolado.



Fonte: Autor, 2018.

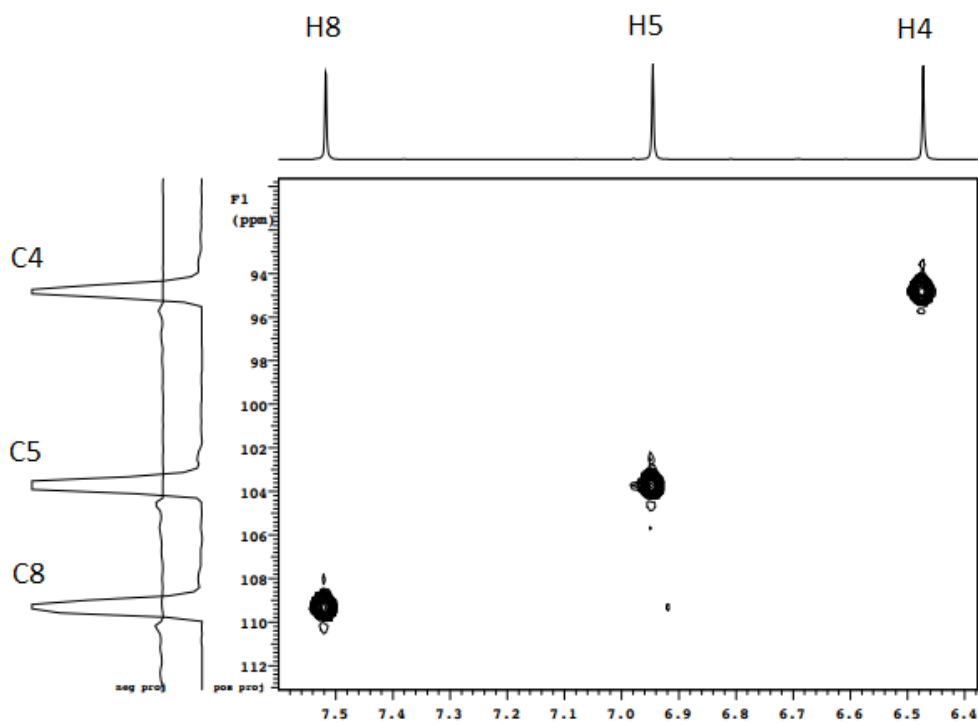
Além dessa análise, pode-se fazer a comparação do espectro HSQC da mangiferina, figura 30, com o o espectro HSQC 1 do aduto, figura 32. No primeiro, percebe-se a existência de uma correlação entre o hidrogênio 4 e o carbono 4, correlção que não se verifica mais no espectro HSQC do aduto, figura 32.

Figura 30 - Espectro de HSQC da mangiferina.



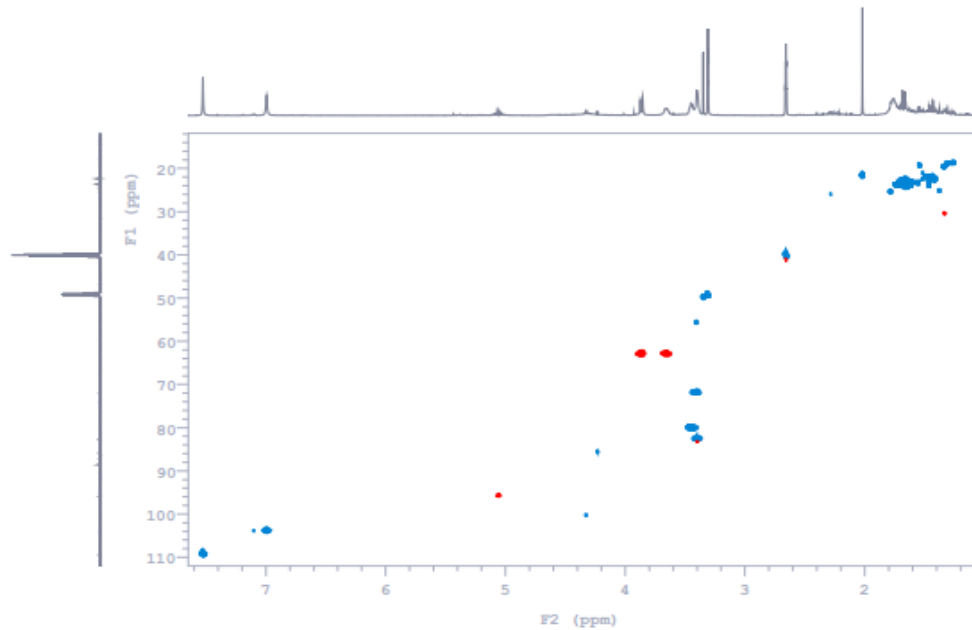
Fonte: Autor, 2018.

Figura 31 - Espectro de HSQC da mangiferina (ampliado).



Fonte: Autor, 2018.

Figura 32 - Espectro HSQC 1 do aduto isolado.

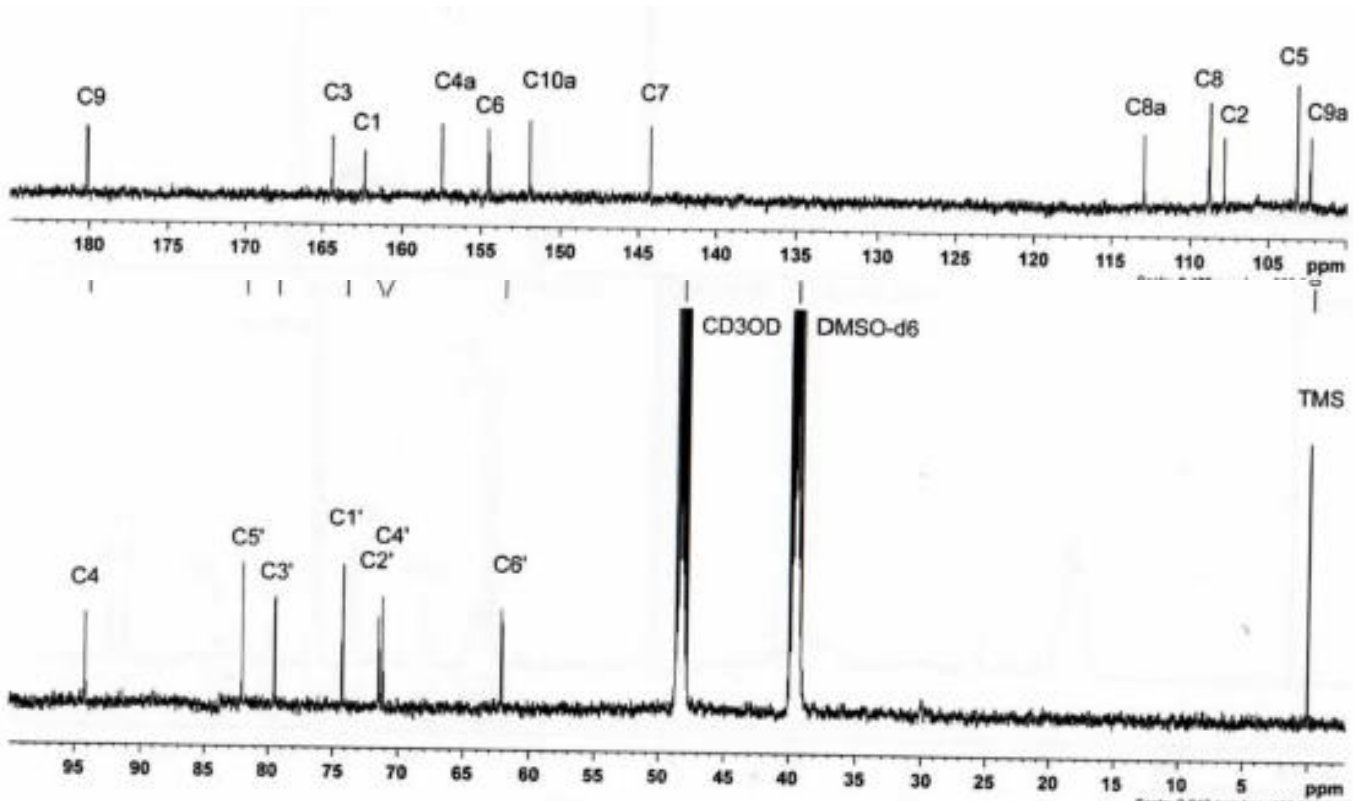


Fonte: Autor, 2018.

Dessa forma, está comprovado que a reação da mangiferina com metilglioxal ocorreu na posição que havia sido citada como a mais propícia para realizar o ataque nucleofílico a um carbono carbonílico, com formação prioritária de um aduto monossustituído. A estrutura do aduto isolado se encontra na figura 37, composto A.

No espectro de RMN ^{13}C da mangiferina, figura 33, verifica-se a presença de um sinal com deslocamento químico igual a 180.18 ppm. Esse sinal é referente ao carbono da carbonila da mangiferina, o carbono 9 (figura 23).

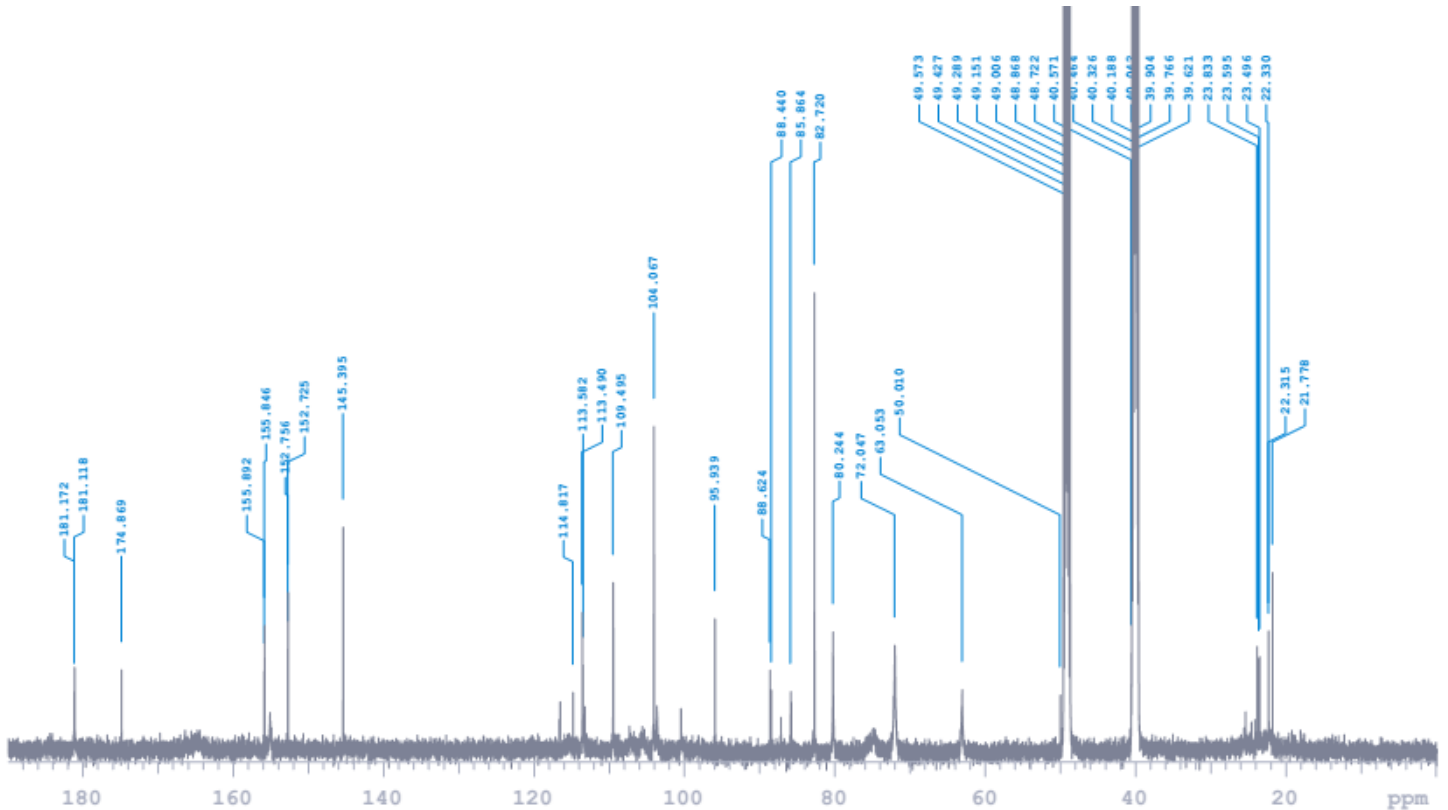
Figura 33 - Espectro de ^{13}C da mangiferina com a identificação de todos os carbonos associado-os aos seus respectivos deslocamento químicos.



Fonte: Autor, 2018.

No espectro de RMN ^{13}C do aduto, figura 34, verifica-se, além desse sinal, um outro sinal com deslocamento químico igual a 174.869 ppm. Esse sinal é atribuído ao carbono da carbonila existente no aduto proveniente da inserção do metilgloxal (carbonila cetônica).

Figura 34 - Espectro de ^{13}C do aduto com a identificação de todos os carbonos associado-os aos seus respectivos deslocamento químicos.

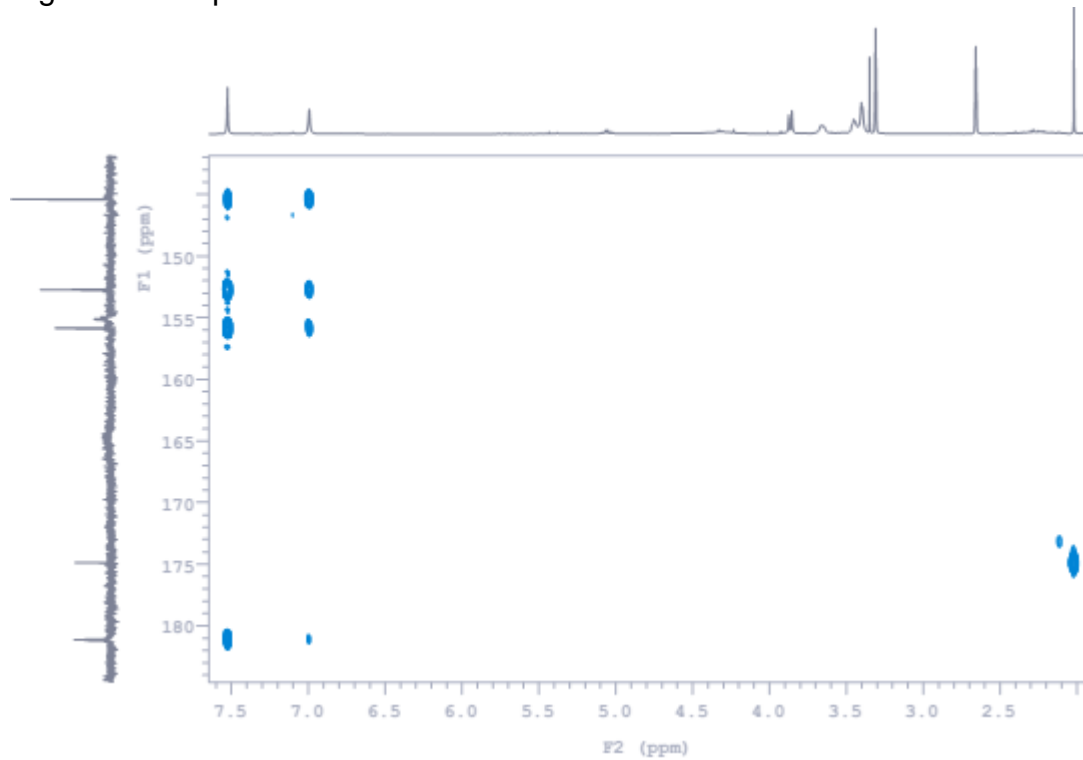


Fonte: Autor, 2018.

No espectro de ^1H da mangiferina, figura 28, não existe sinal com deslocamento químico próximo a 2 ppm, sinal que se verifica no espectro de RMN ^1H do aduto, figura 29.

Através do espectro HMBC do aduto, figura 35, verifica-se que o sinal do hidrogênio com deslocamento químico 2 ppm se correlaciona com o carbono com deslocamento químico em 174.864 ppm. Dessa forma, pode-se concluir que este sinal próximo a 2 ppm no espectro de ^1H do aduto é referente aos hidrogênios da metila ligada à carbonila oriunda do metilglioxal.

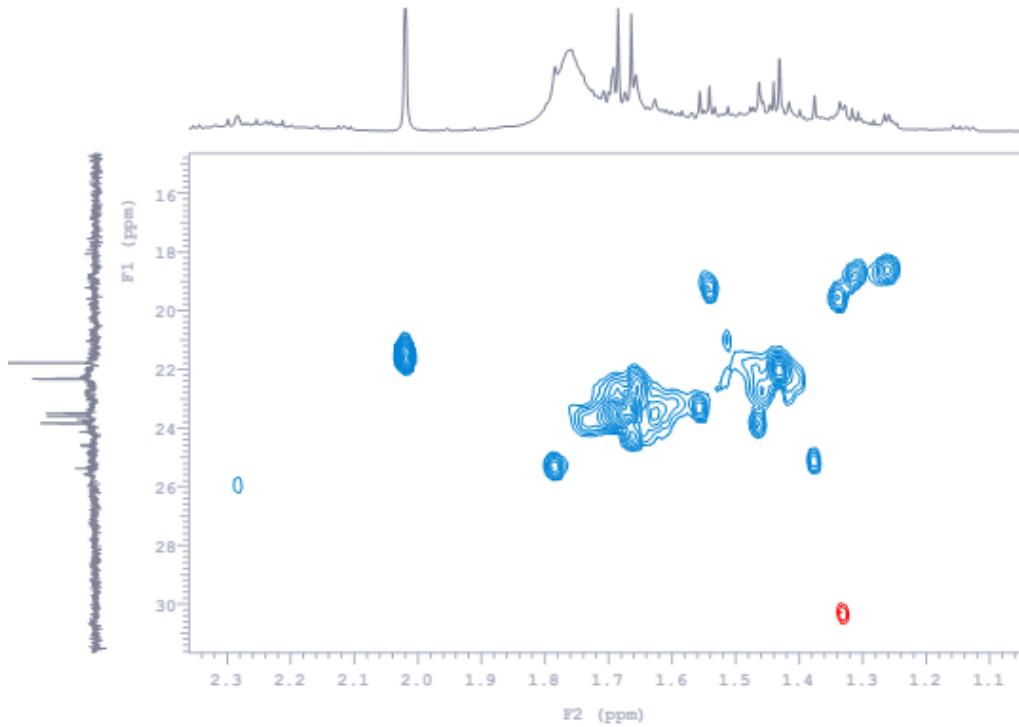
Figura 35 - Espectro HMBC do aduto.



Fonte: Autor, 2018.

Por meio do HSQC 2 do aduto, figura 36, verifica-se uma correlação entre os hidrogênios com deslocamento químico próximo a 2 ppm com um carbono com sinal próximo a 22 ppm, que se trata de um carbono alquílico. Esse sinal, que se encontra exatamente em 21.778 ppm, aparece no espectro de RMN ^{13}C do aduto, mas não se encontra no espectro de RMN ^{13}C da mangiferina. Logo, trata-se da metila existente no aduto oriunda do metilglioxal.

Figura 36 - Espectro HSQC 2 do aduto.

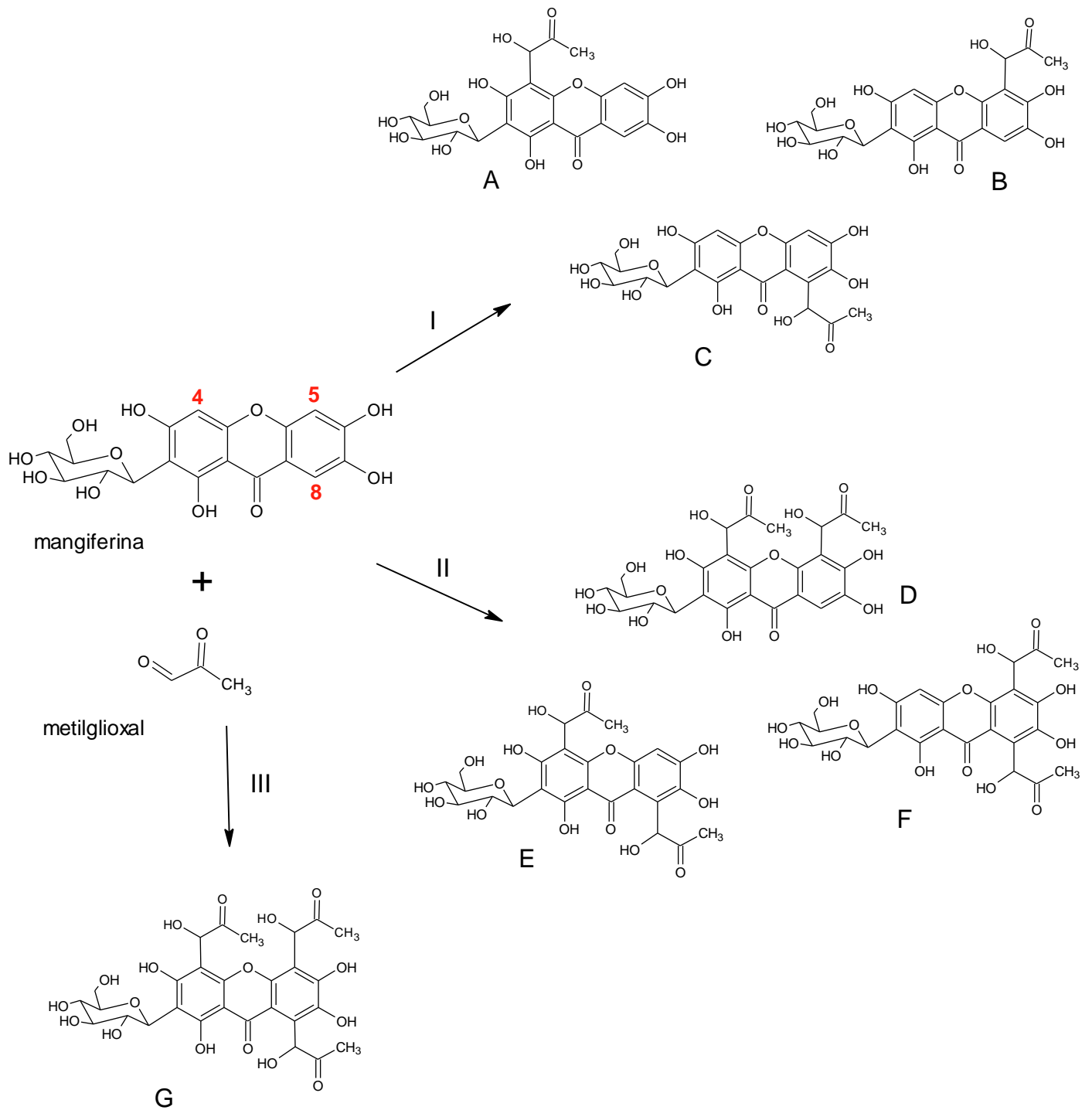


Fonte: Autor, 2018.

Assim, com base no exposto, comprova-se que foi realmente o metilgloxal que provocou a substituição do hidrogênio da mangiferina que estava ligado ao carbono 4.

Porém, mesmo que remota, a formação de adutos dissustituídos ou trissustituídos não deve ser desconsiderada. A figura 37 evidencia as estruturas dos adutos que seriam formados caso ocorresse uma di ou trissustituição na mangiferina.

Figura 37 - Reação de mangiferina com MG e formação de adutos mono, di e trissubstituídos.



Fonte: Autor, 2018.

5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos em relação à composição e ao potencial farmacológico dos extratos metanólicos das folhas, caule e raiz de *X. americana*, conclui-se que todos os extratos metanólicos produzidos apresentam ação antioxidante, sendo o extrato metanólico da raiz o de maior potencial e o extrato metanólico das folhas, o de menor potencial. Com base nos resultados obtidos em relação ao teor de fenólicos totais presentes em cada um dos extratos, verificou-se que a raiz apresenta os maiores valores, o que justifica o maior potencial antioxidante deste extrato.

Diferentemente do observado para a ação antioxidante, o extrato metanólico das folhas foi o que apresentou o melhor resultado em relação ao ensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase, sendo sua ação igual ao valor do padrão positivo. Somente o extrato metanólico da raiz não apresentou atividade para o ensaio. Todos os outros extratos apresentaram uma atividade ligeiramente menor em relação ao padrão eserina.

Em relação à ação antiglicante dos extratos metanólicos das duas amostras de folhas de café, CF1 e CF2, conclui-se que as amostras de CF1 têm a capacidade de combater a formação de AGE's e essa ação pode ser verificada utilizando-se a análise de fluorescência. Já com as amostras de CF2, o método de detecção não é útil na avaliação de sua ação antiglicante, pois a presença de substâncias fluorescentes nas amostras CF2 não nos permite verificar a fluorescência correta associada à sua possível ação antiglicante.

Para o processo de criação de AGE's, conclui-se que a utilização do sistema enzimático hipoxantina/xantinaoxidase, responsável por criar um ambiente rico em radicais livres é, realmente, bastante promissor, visto que o período de incubação necessário para se perceber a produção dos AGE's, de apenas 3 horas em alguns casos, é bem menor do que o verificado quando se utilizam os métodos clássicos.

Em relação ao potencial antiglicante da mangiferina, conclui-se que se trata de uma substância com alto potencial para tal fim. A sua reação com o MG produziu um aduto monossustituído, que foi isolado e caracterizado por espectrometria de massa e espectroscopia de ^1H e ^{13}C . A interpretação destes espectros confirmou a

proposta apresentada, em que a reação ocorreria no carbono 4 da cadeia carbônica da mangiferina.

Assim, promover o aprofundamento dos estudos sobre as potencialidades farmacológicas da *X. americana*, bem como desenvolver novas metodologias para se verificar a ação antiglicante de substâncias ou extratos, se faz necessário.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, J. H. P.; SOUZA, I. T.; SANTANA, A. E. G.; GOULART, M. O. F. A determinação dos produtos avançados de glicação (AGE's) e de lipoxidação (ALEs) em alimentos e em sistemas biológicos: avanços, desafios e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 39, n. 5, p. 608-620, 2016.
- CHANG, K. World tea production and trade: current and future development. **Food and agriculture organization the United nations**. 1. ed. Roma, 2015.
- ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V. J. R.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, Kansas City, v. 7, n. 2, p. 88-95, 1961.
- EROMOSELE, C.O.; EROMOSELE, I.C. Fatty acid compositions of seed oils of *Haemastaphis barteri* and *Ximenia americana*. **Bioresource Technology**, [S.], v. 82, n. 3, p. 303-304, 2002.
- HU, T. Y.; LIU, C. L.; CHYAU, C. C.; HU, M. L. Trapping of methylglyoxal by curcumin in cell-free system and in human umbilical vein endothelial cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S.], v. 60, n. 33, p. 8190-8196, 2012.
- JAMES, D.B.; ABU, E.A.; WUROCHEKKE, A.U.; ORJI, G.N. Phytochemical and antimicrobial investigation of the aqueous and methanolic extracts of *Ximenia americana*. **Journal Medicinal Science**, [S.], v. 7, n. 2, p. 284-288, 2007.
- JOGLEKAR, M. M; PANASKAR, S. N; ARVINDEKAR, A. U. Inhibition of advanced glycation end product formation by cymene—A common food constituent. **Journal of Functional Foods**, [S.], v. 6, p. 107–115, 2014
- JOLY, A.B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. 13. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002
- KAZI, R. S.; BANARJEE, R. M.; DESHMUKH, A. B.; PATIL, G. V.; JAGADEESHAPRASAD, M. G.; KULKARNI, M. J. Glycation inhibitors extend yeast chronological lifespan by reducing advanced glycation end products and by back regulation of proteins involved in mitochondrial respiration. **Journal of Proteomics**, [S.], v. 156, p. 104–112, 2017.
- LE, N. H. T.; MALTERUD, K. E. D; DIALLO, B. S; PAULSEN, C. S.; NERGARD, H.; WANGENSTEEN, H. Bioactive polyphenols in *Ximenia americana* and the traditional use among Malian healers, **Journal of Ethnopharmacology**, [S.], v. 139, n. 3, p. 858-862, 2012.
- LOSSO, J. N. **The maillard reaction reconsidered**: cooking and eating for health. New York: CRC Press, 2016. 438 p
- MARQUES, S. P. D. M. **Nova proposta para rápida formação/combate dos Produtos de Glicação Avançada (AGE's) e propriedades farmacológicas de *Hancornia speciosa* Gomes**. 2017. 161p. Tese (Doutorado - Área de concentração:

Química) - Departamento de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais: guia de seleção e emprego das plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil**. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2007. p. 122-124.

MEVY, J.P.; BESSIERE, J.M.; GREFF, S.; ZOMBRE, G.; VIANO, J. Composition of the volatile oil from the leaves of *Ximenia americana* L. **Biochemistry System Ecology**, [S.], v. 34, p. 549- 553, 2006.

MWANGI, J.W.; MALII, P.; GATHU, L.; TANAKA, T.; NONAKA, G. Polyphenols of *Ximenia americana* var. Caffra. **Fitoterapia**, [S.], v. 65, p. 185, 1994.

OGUNLEYE, D.S.; IBITOYE, S.F. Studies of antimicrobial activity and chemical constituents of *Ximenia americana*. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, Benin City, v. 2, n. 2, p. 239-241, 2003.

OLIVEIRA, I. R. **Estudo da variabilidade química e do potencial farmacológico de espécies de Senna do Nordeste**. 2015. 212p. Tese (Doutorado - Área de concentração: Química Orgânica) - Departamento de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

OWEN, R. W.; GIACOSA, A.; HULL, W. E.; HAUBNER, R.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. **European Journal of Cancer**, [S.], v. 36, n. 10, p.1235-1247, 2000.

REZANKA, T.; SIGLER, K. Identification of very long chain unsaturated fatty acids from *Ximenia* oil by atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography-mass spectroscopy. **Phytochemistry**, [S.], v. 68, n. 6, p. 925-934, 2007.

SANG, S.; SHAO, X.; BAI, N.; LO, C. Y.; YANG, C. S.; HO, C. T. Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate: a new trapping agent of reactive dicarbonyl species. **Chemical Research in Toxicology**, [S.], v. 20, n. 12, p. 1862-1870, 2007.

SOUZA, V.C. & LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 640p, 2005.

TANG, D.; ZHU, J. X.; WU, A. G.; XU, Y. H.; DUAN, T. T.; ZHENG, Z. G.; WANG, R. S.; LI, D.; ZHU, Q. Pre-column incubation followed by fast liquid chromatography analysis for rapid screening of natural methylglyoxal scavengers directly from herbal medicines: case study of *Polygonum cuspidatum*. **Journal of Chromatography A**, [S.], v. 1286, p. 102–110, 2013.

THORNALLEY, P. J. Use of aminoguanidine (pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S.], v. 419, n. 1, p. 31-40, 2003.

Uchôa, V. T., Sousa, C. M. M., Carvalho, A. A., Sant'Ana, A. E. G., & Chaves, M. H. Free radical scavenging ability of *Ximenia americana* L. stem bark and leaf extracts.

Journal of Applied Pharmaceutical Science, [S.l.], v. 6, n. 02, p. 091-096, February, 2016.

VINSON, J. A.; HOWARD, T. B. Inhibition of protein glycation and advanced glycation end products by ascorbic acid and other vitamins and nutrients. **Journal Nutritional Biochemistry**, [S.l.], v. 7, n. 12, p. 659-663, 1996.

VERAS, A. O. M.; MORAIS, S. M. Análise dos Constituintes químicos de *Ximenia americana* Linn. **Anais da 9ª Semana Universitária e Anais do 13º Encontro de Iniciação Científica da Universidade Estadual do Ceará**, 2004.

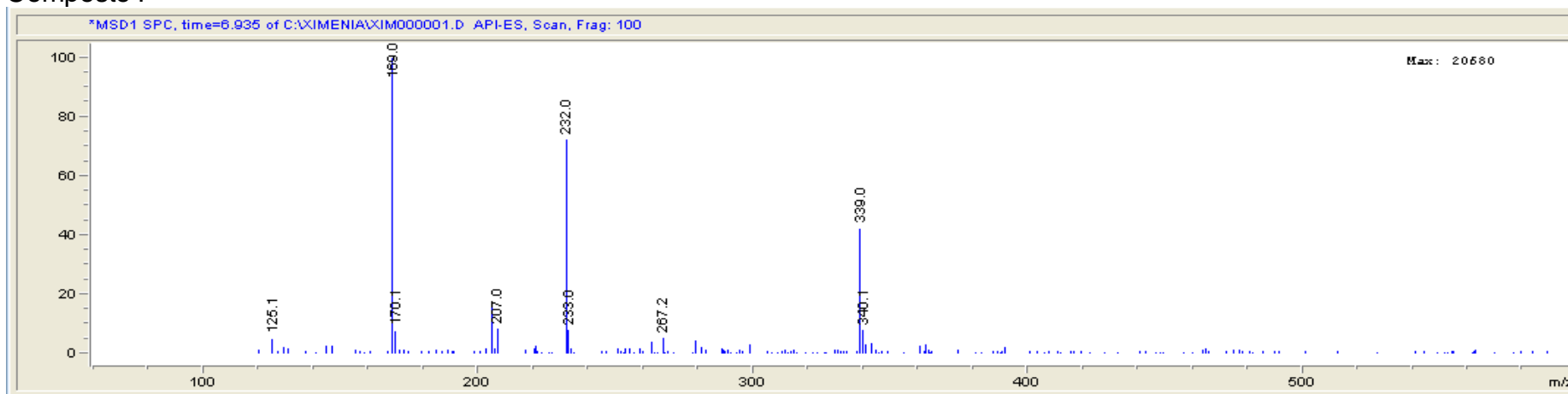
VYAS, A.; SYEDA, K.; AHMAD, A.; PADHYE, S.: SARKAR, F. H. Perspectives on medicinal properties of mangiferin. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, [S.l.], v.12, n.5, p.412-425, 2012.

WANG, Y.; HO, C. T. Flavour chemistry of methylglyoxal and glyoxal. **Chemical Society Reviews**, [S.l.], v. 41, n. 11, p. 4140-4149, 2012.

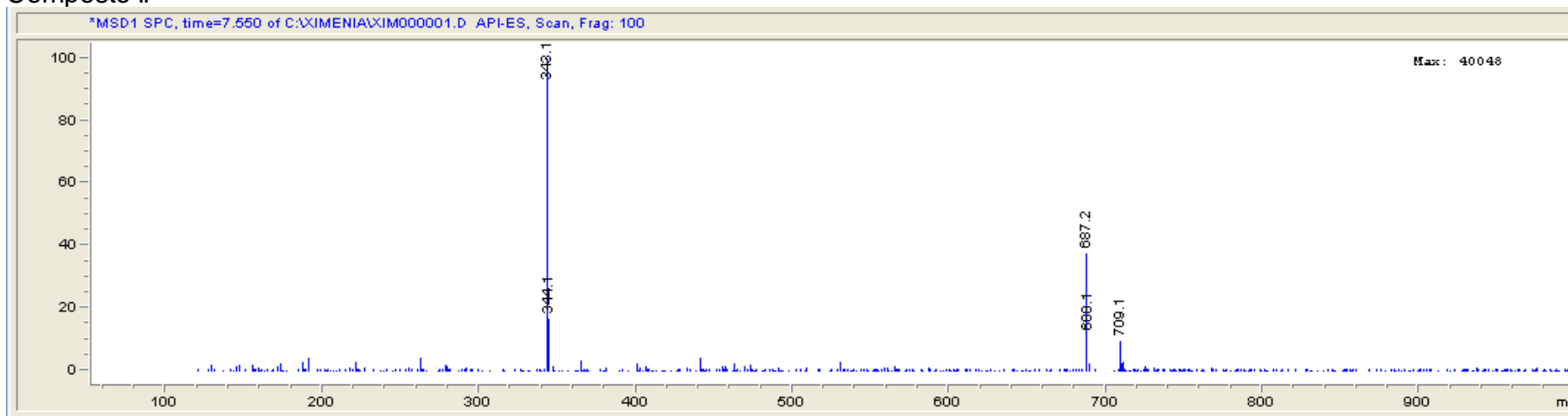
YU, L. L.; WANG, S.; SUN, B. G. **Food Safety Chemistry: toxicant occurrence, analysis and mitigation**. New York: CRC press, 2014.

ANEXO A – ESPECTROS DE MASSA DOS COMPOSTOS DE X. AMERICANA

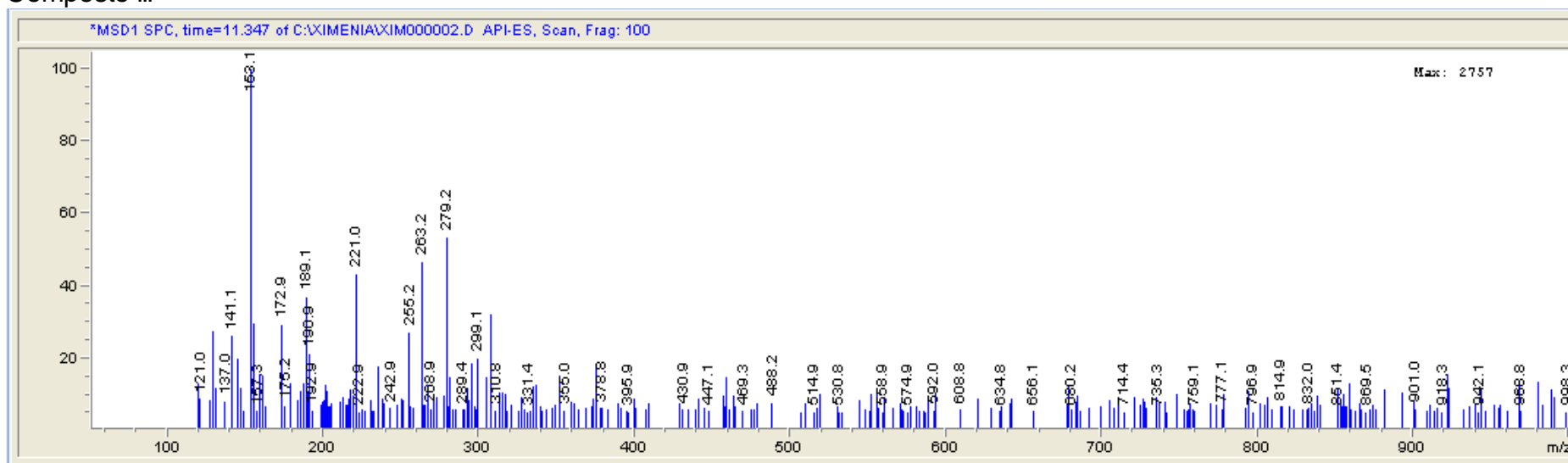
Composto I



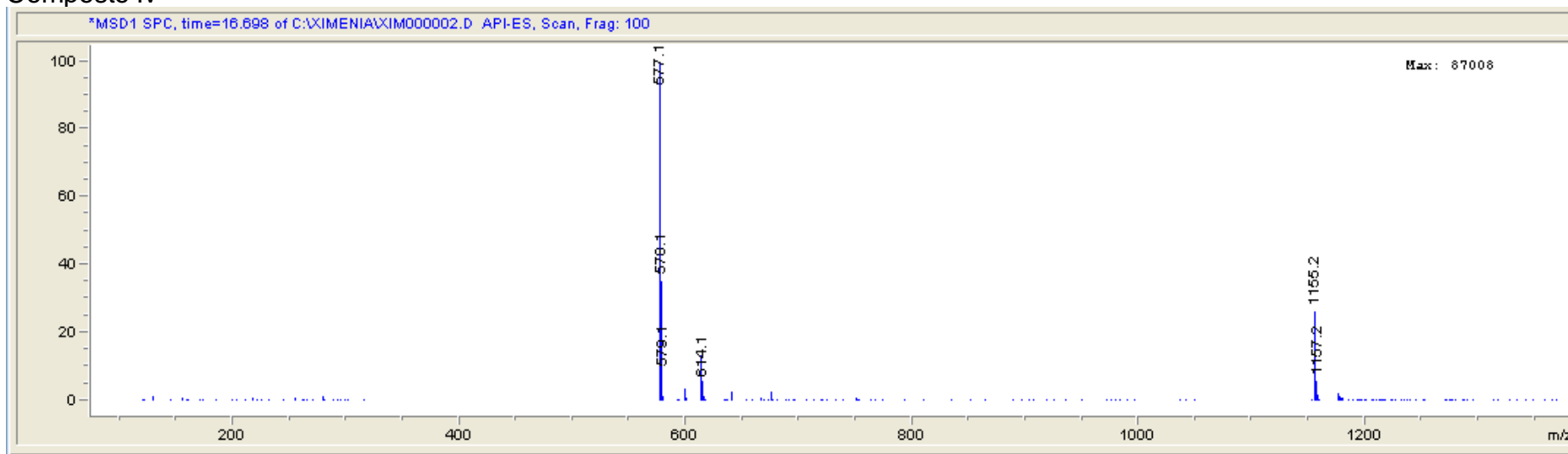
Composto II



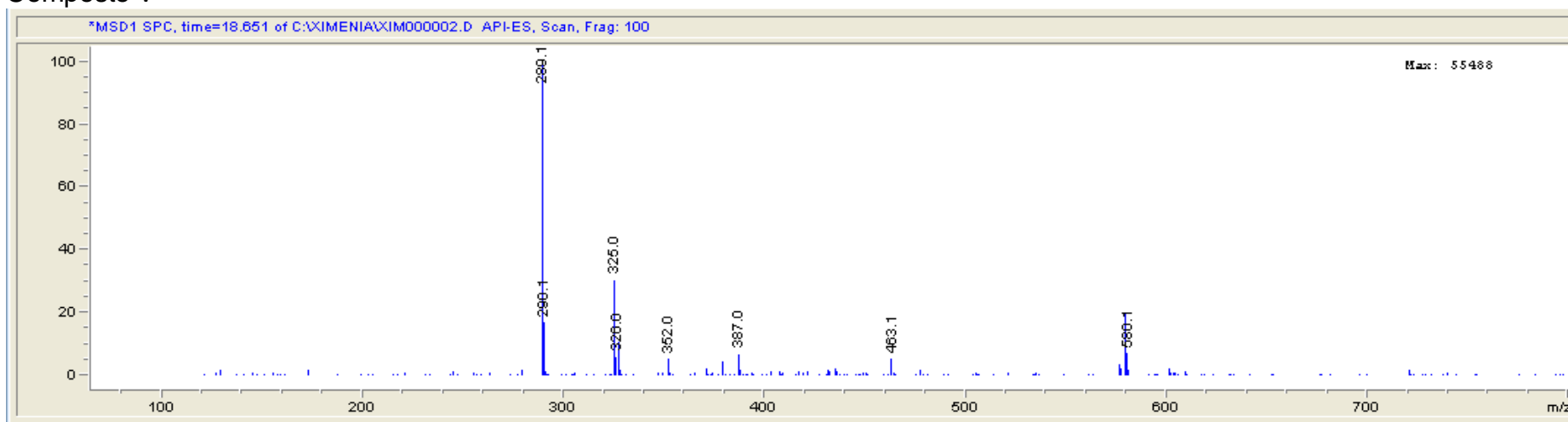
Composto III



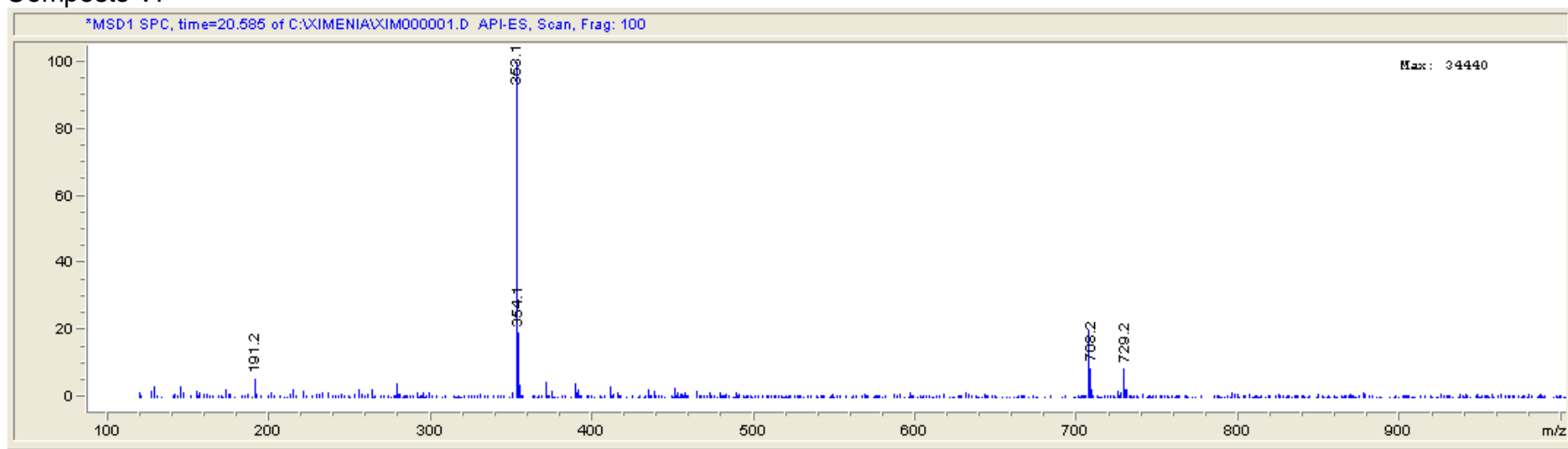
Composto IV



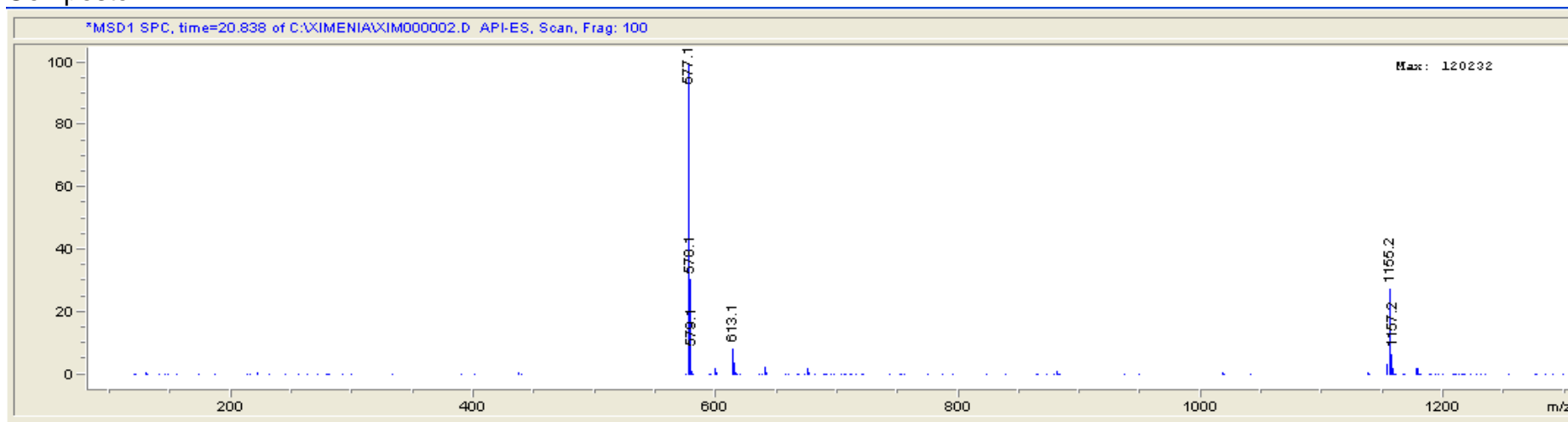
Composto V



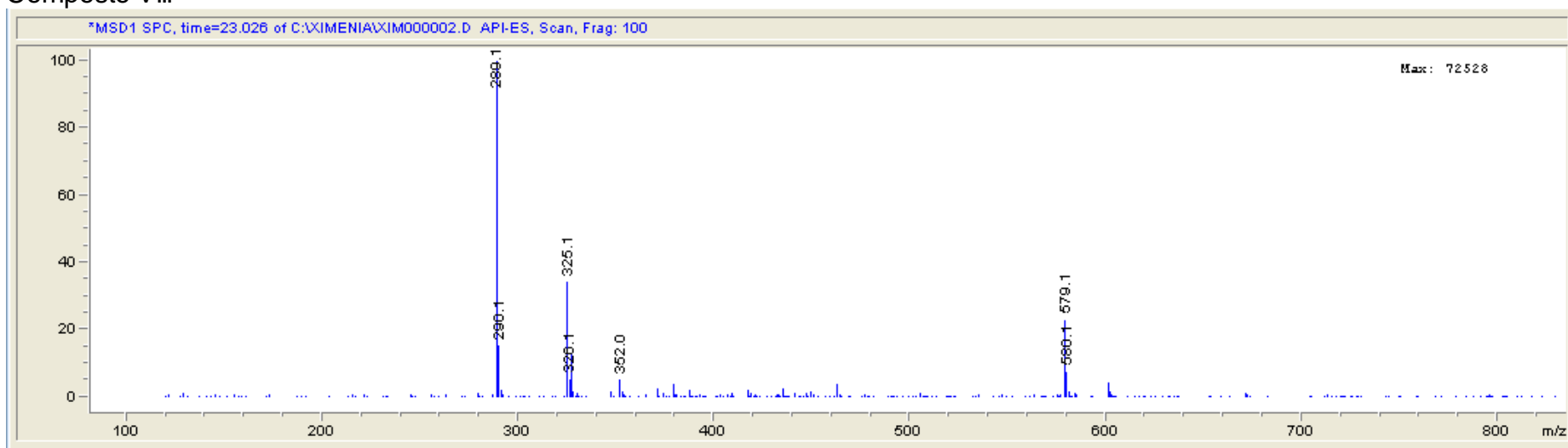
Composto VI



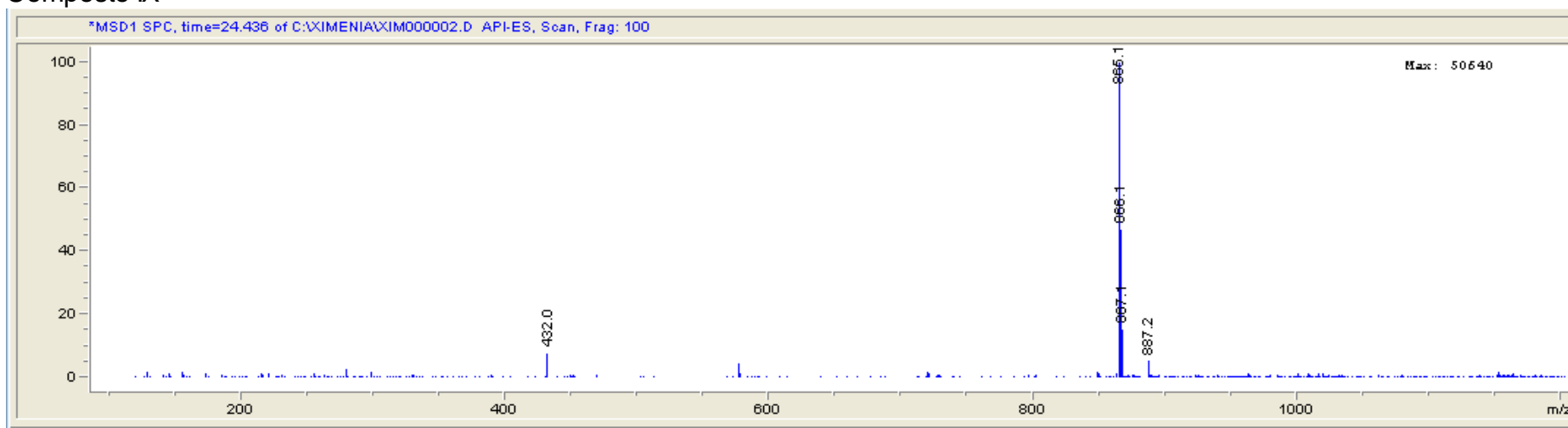
Composto VII



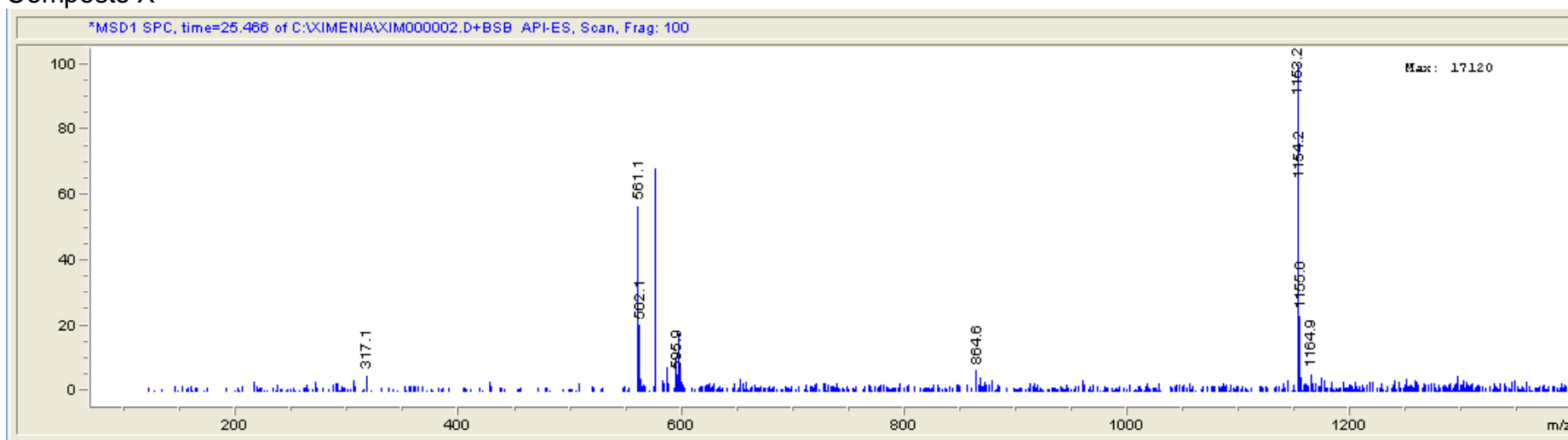
Composto VIII



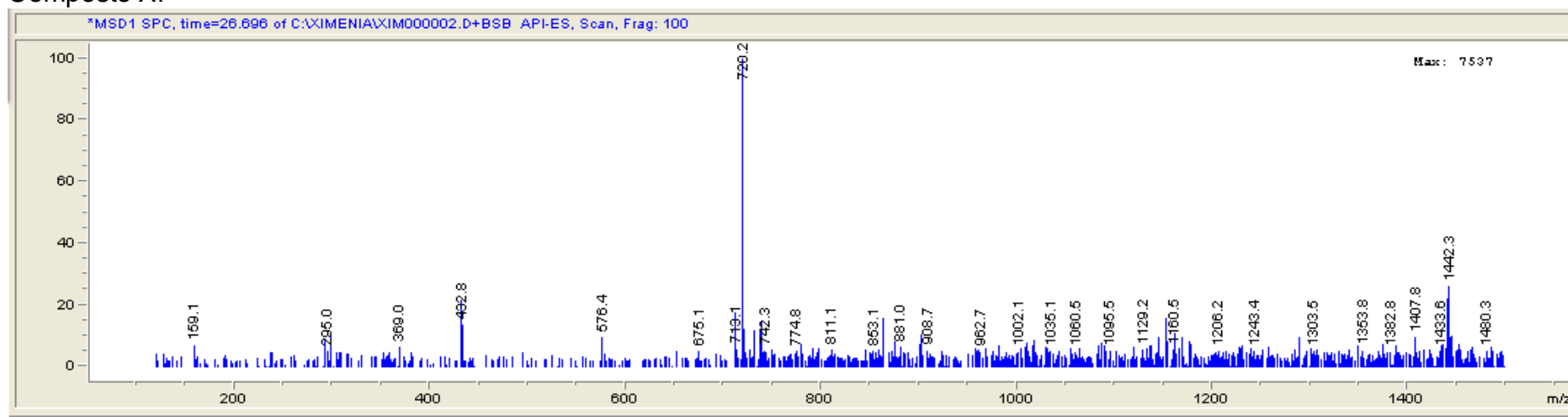
Composto IX



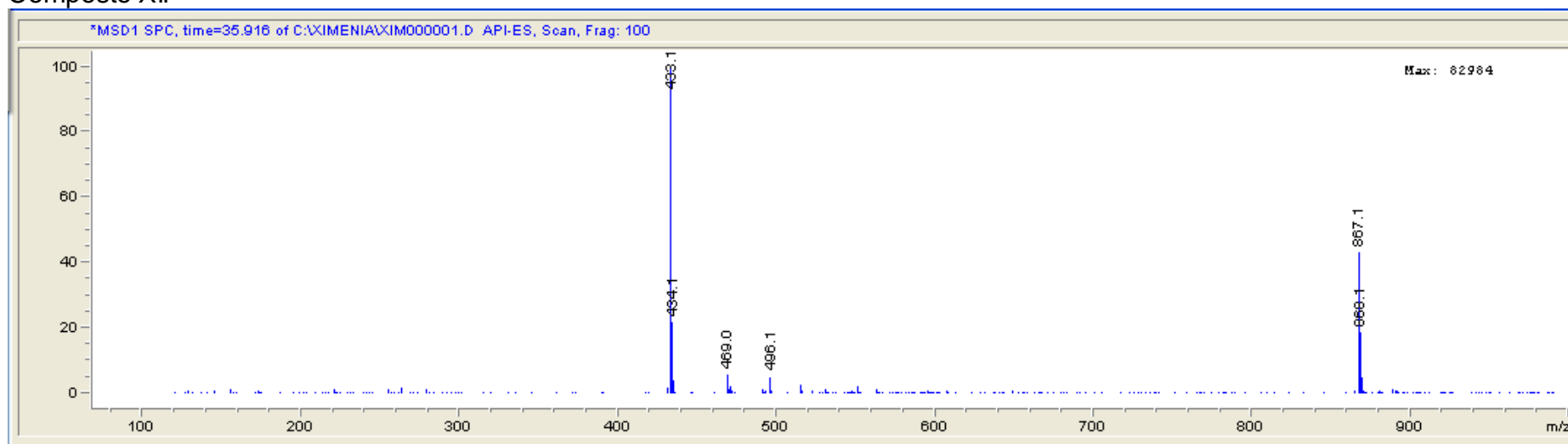
Composto X



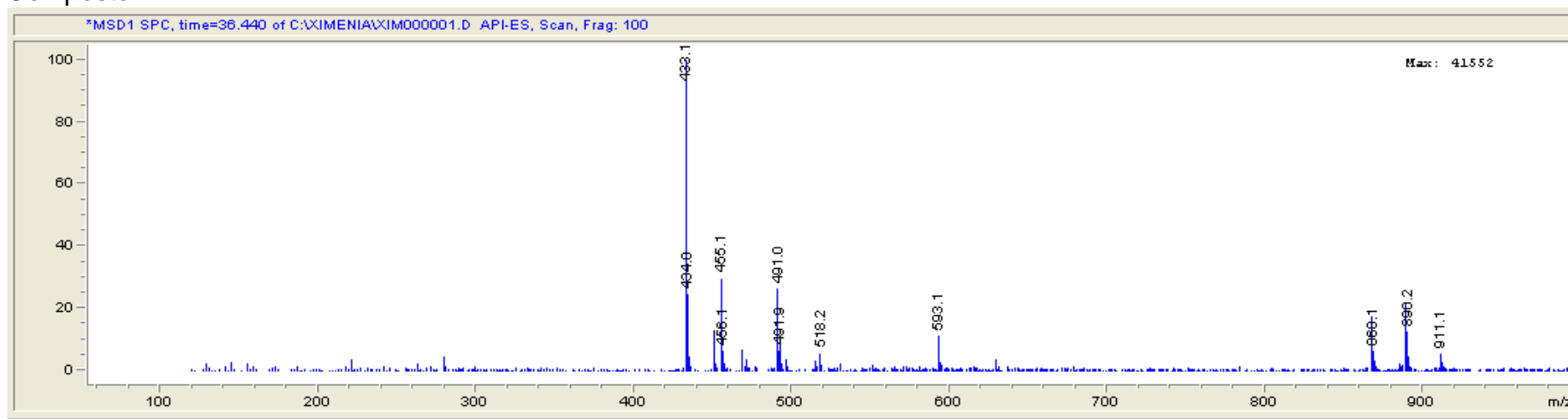
Composto XI



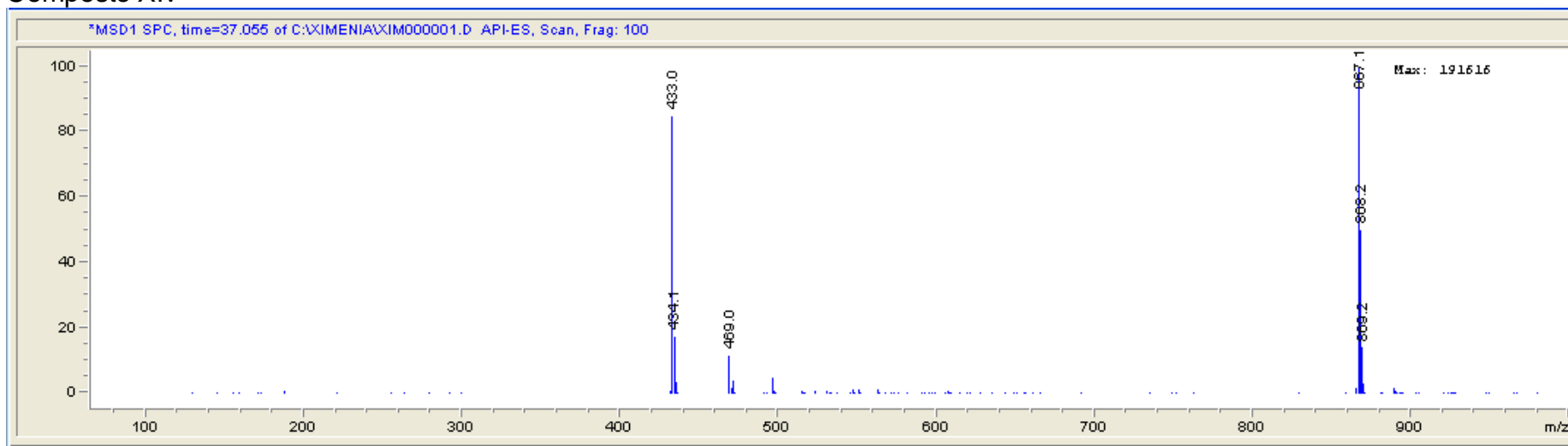
Composto XII



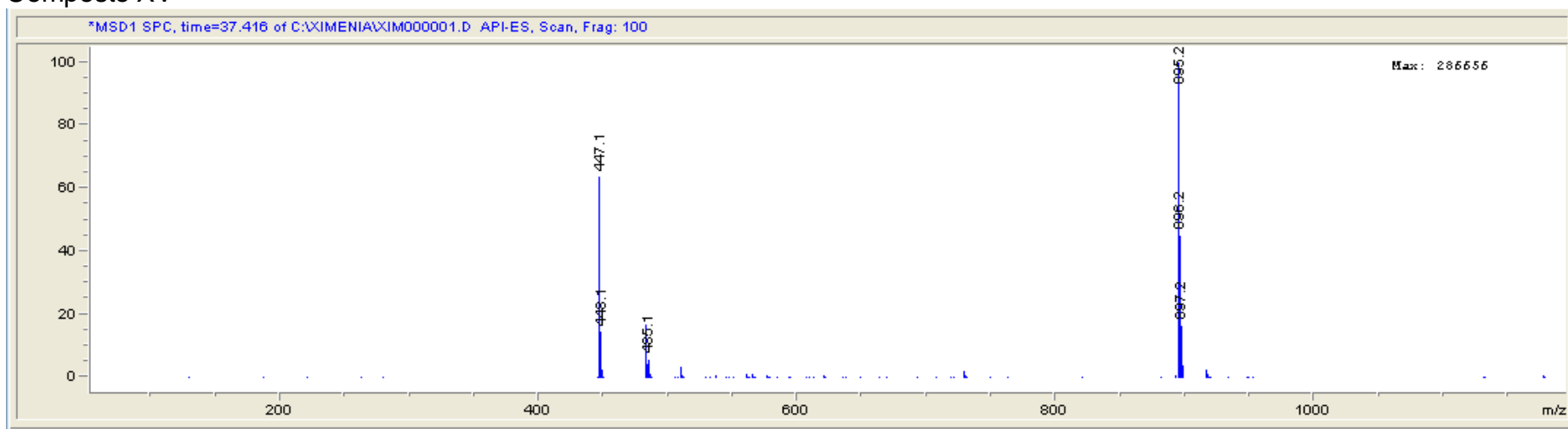
Composto XIII



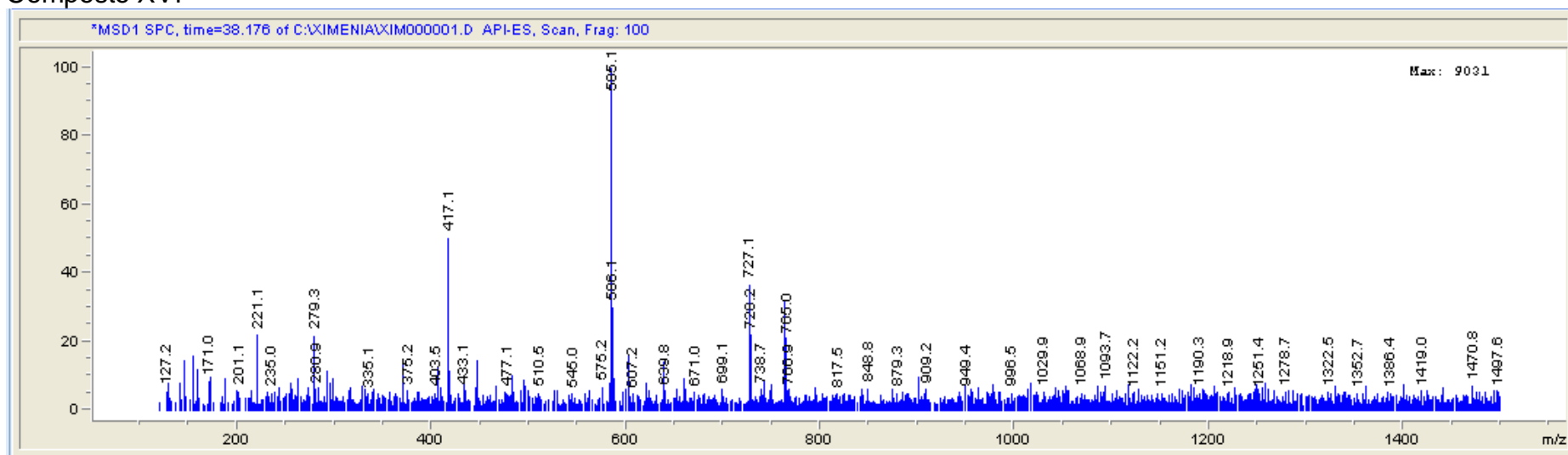
Composto XIV



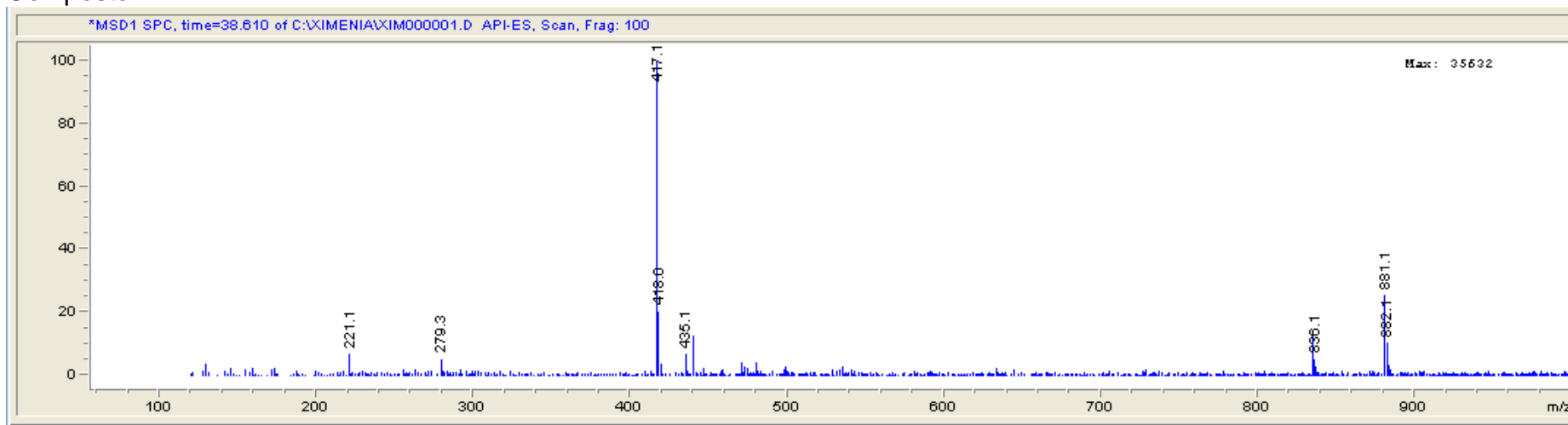
Composto XV



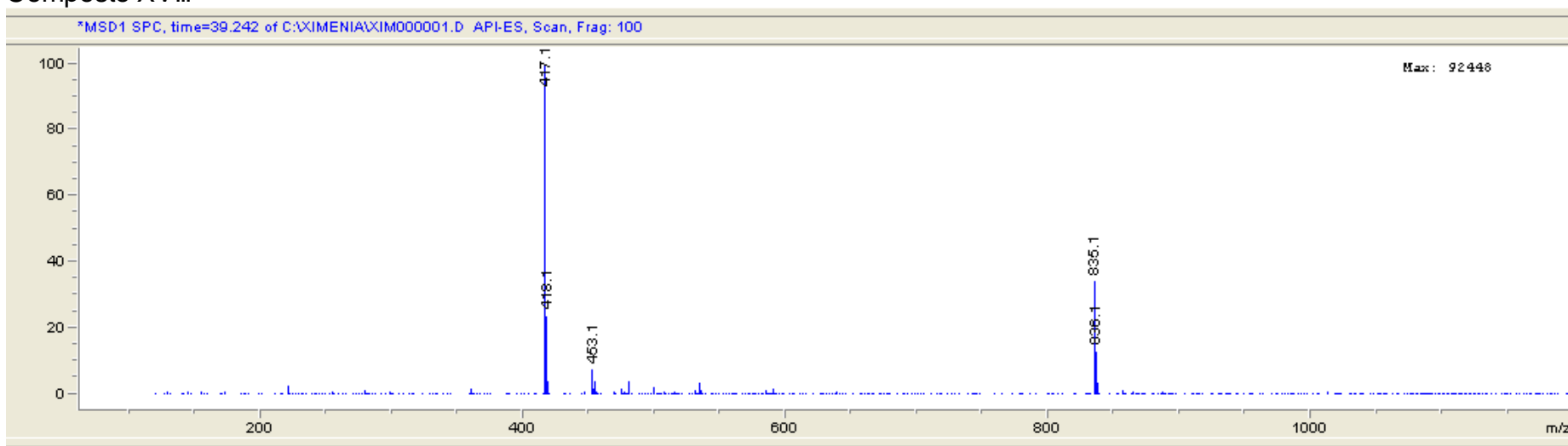
Composto XVI



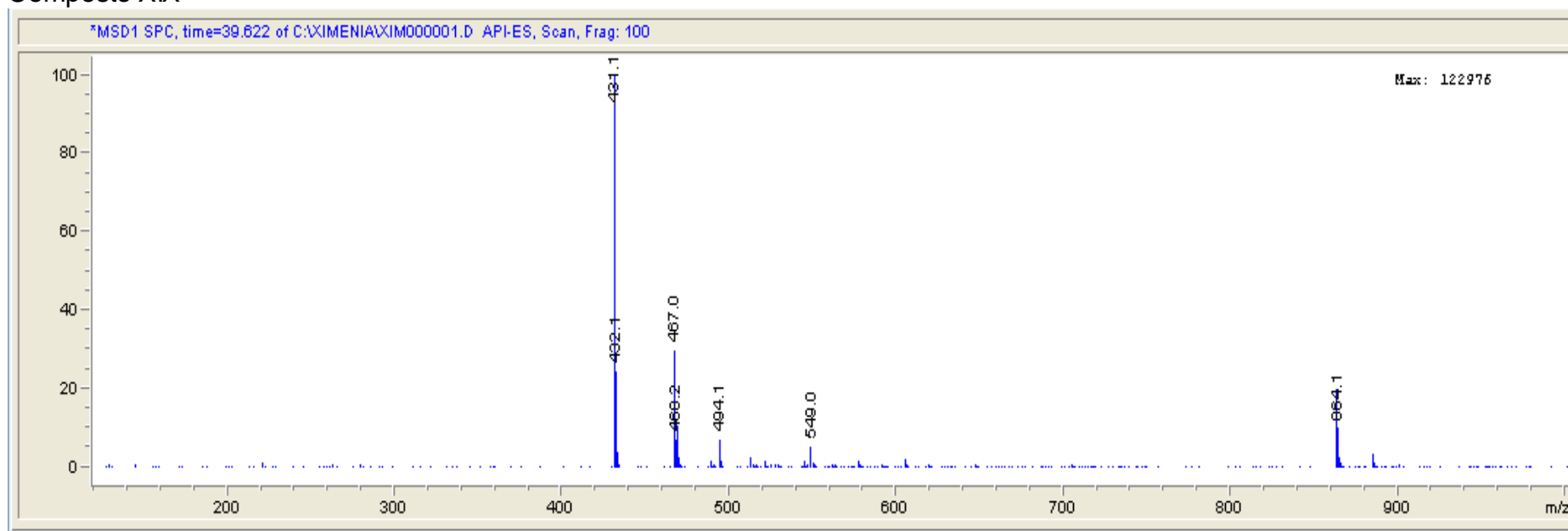
Composto XVII



Composto XVIII

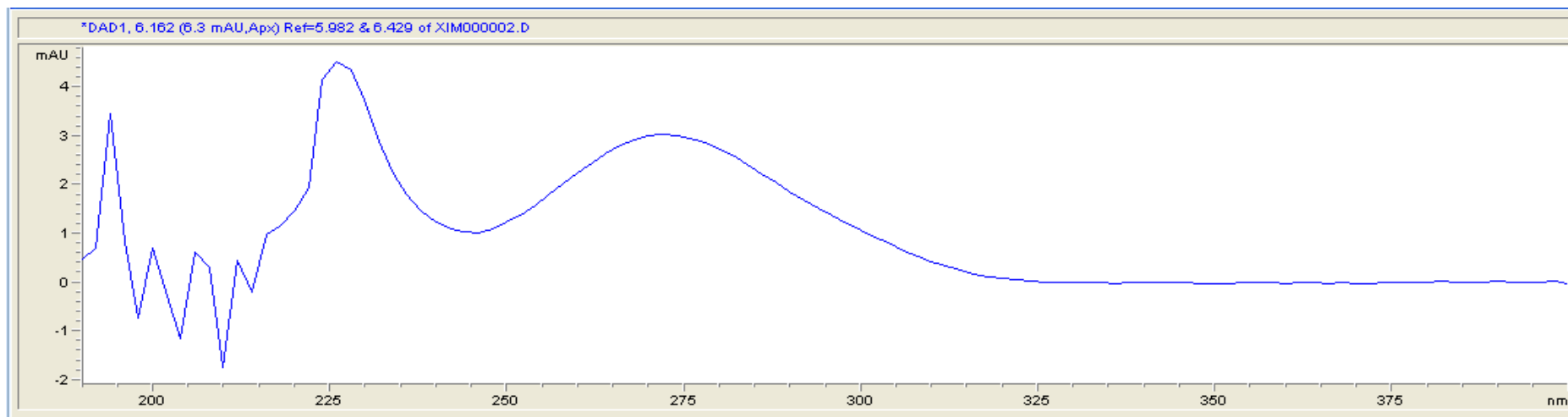


Composto XIX

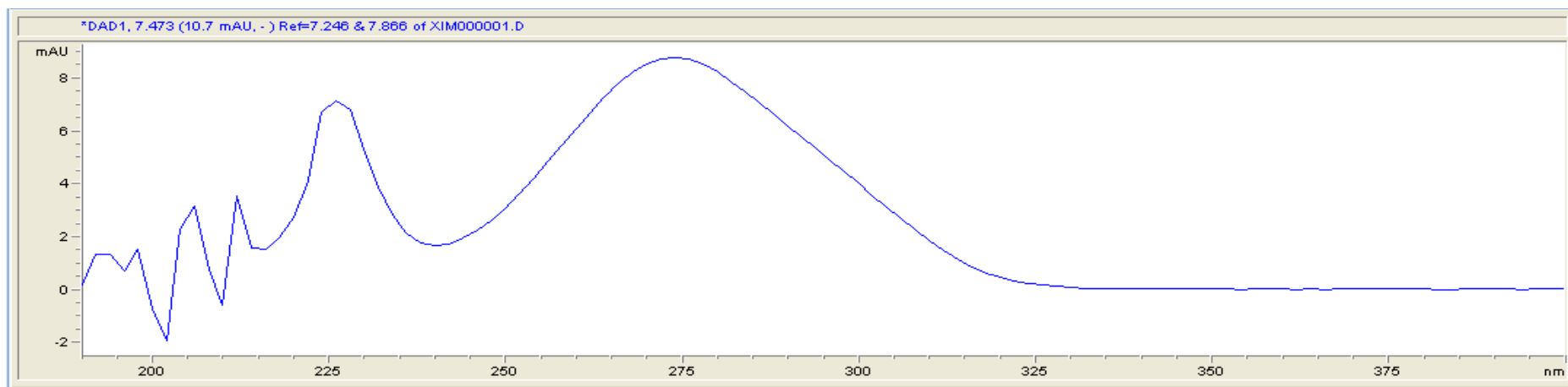


ANEXO B – ESPECTROS DE DAD DOS COMPOSTOS DE X. AMERICANA.

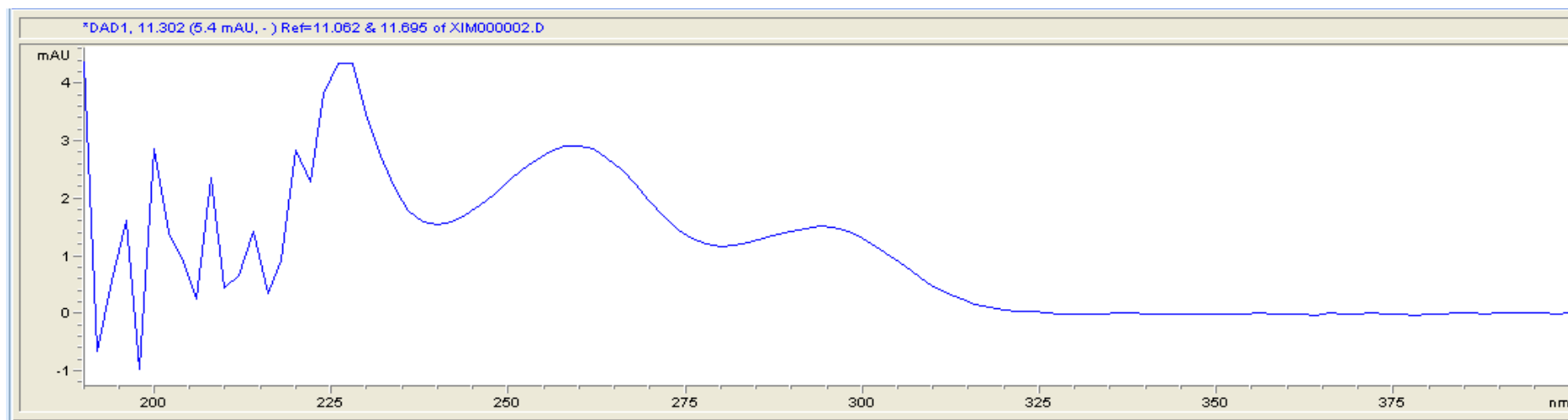
Composto I



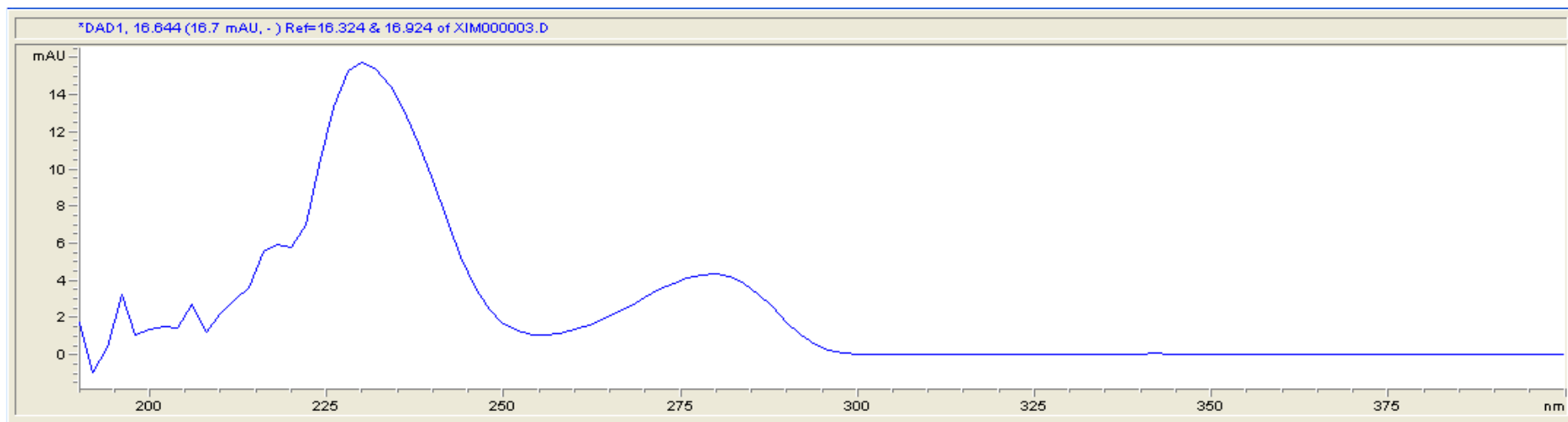
Composto II



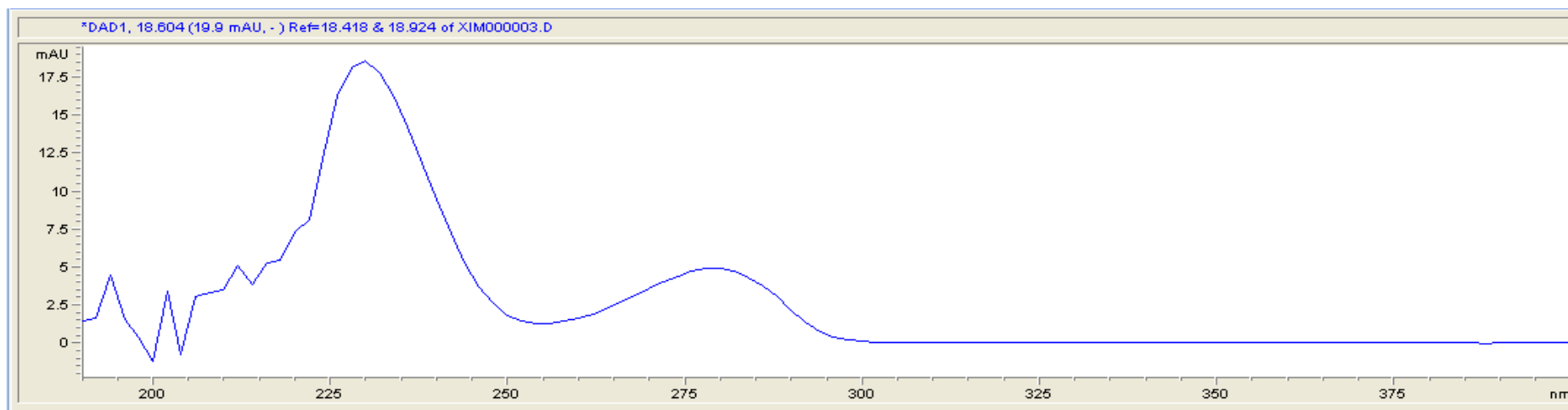
Composto III



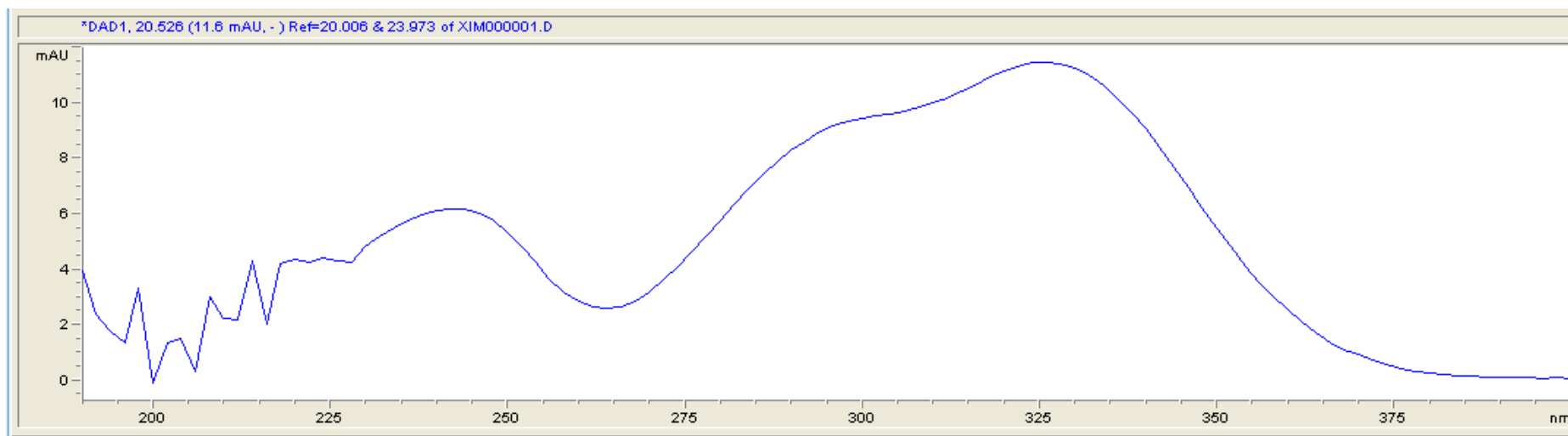
Composto IV



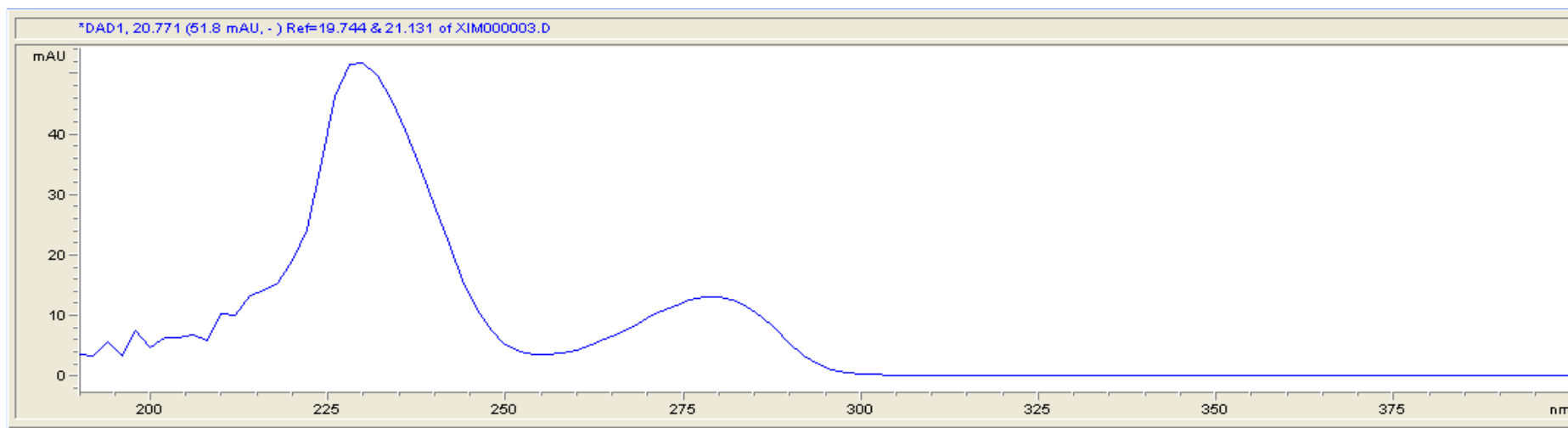
Composto V



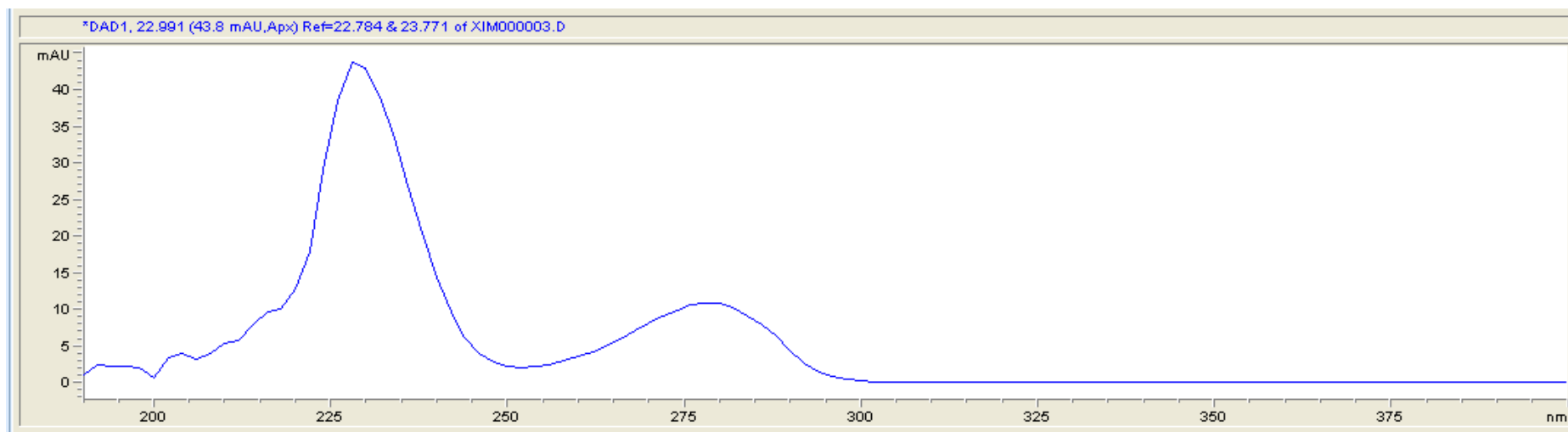
Composto VI



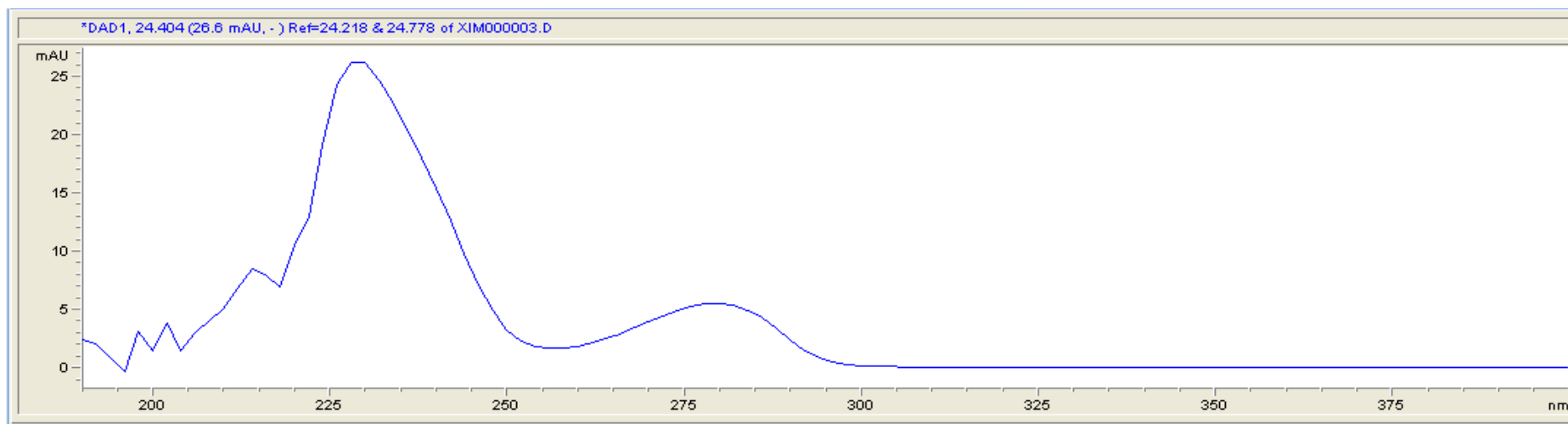
Composto VII



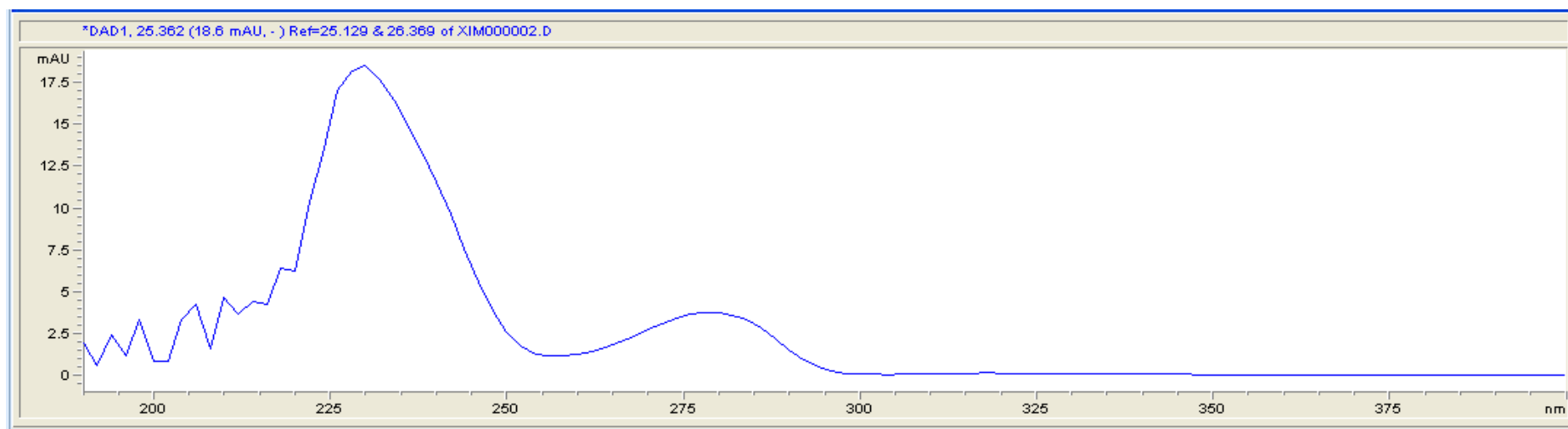
Composto VIII



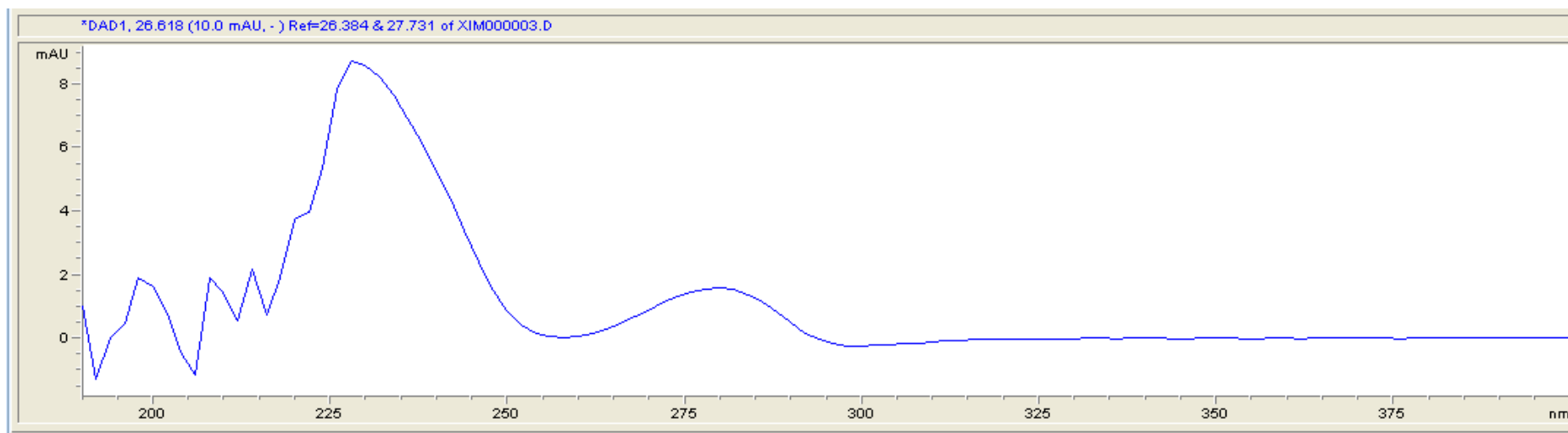
Composto IX



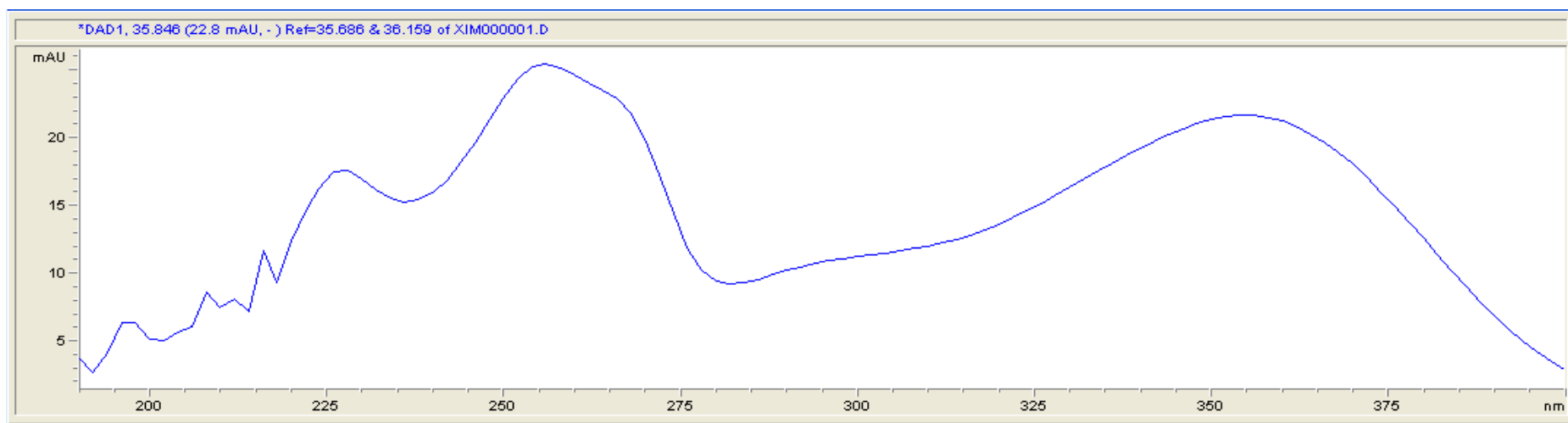
Composto X



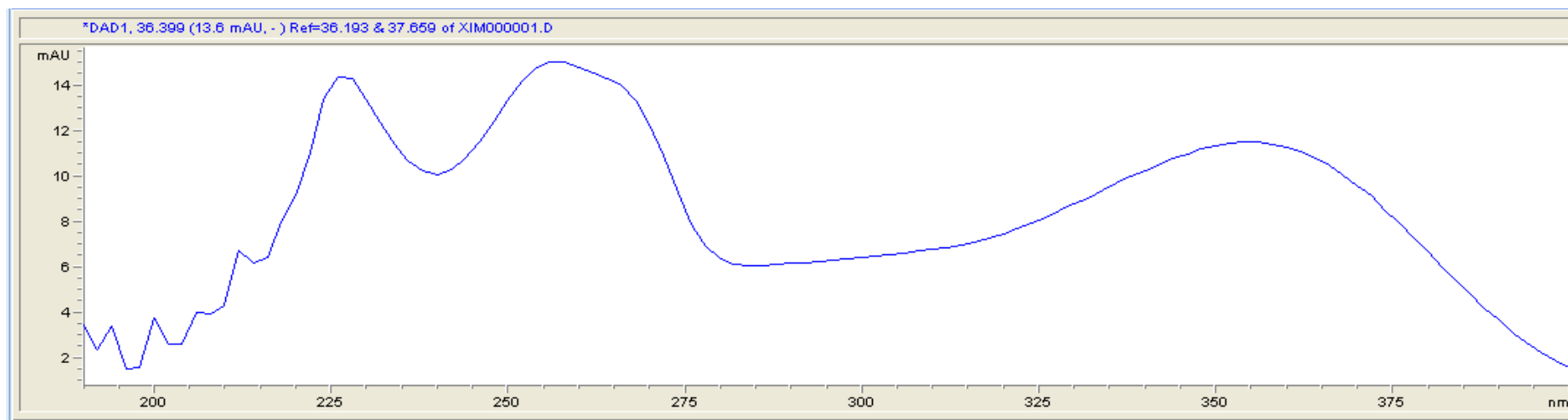
Composto XI



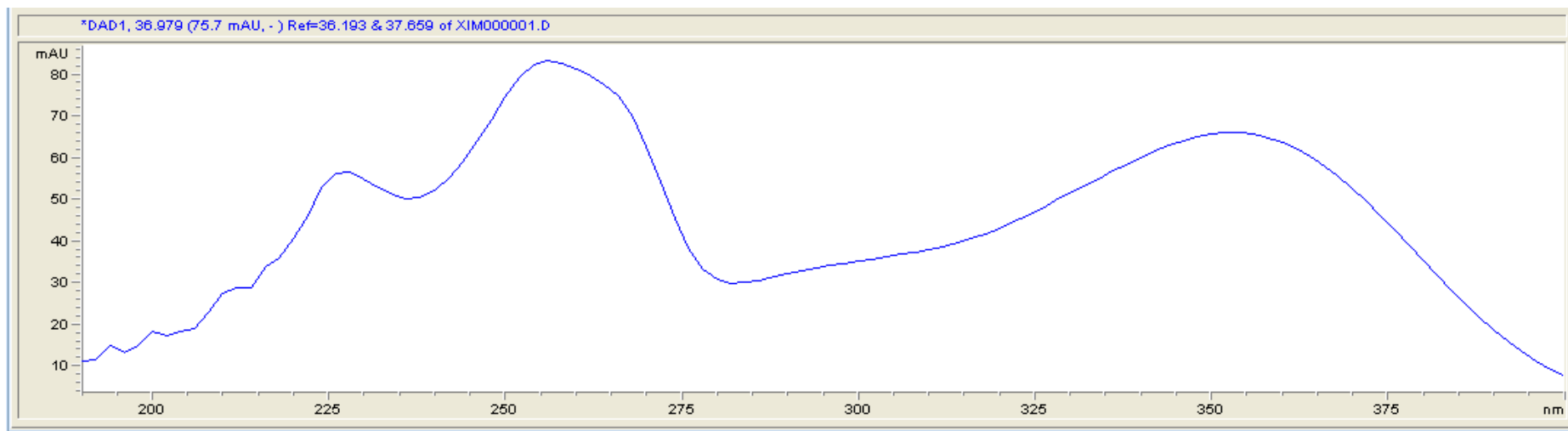
Composto XII



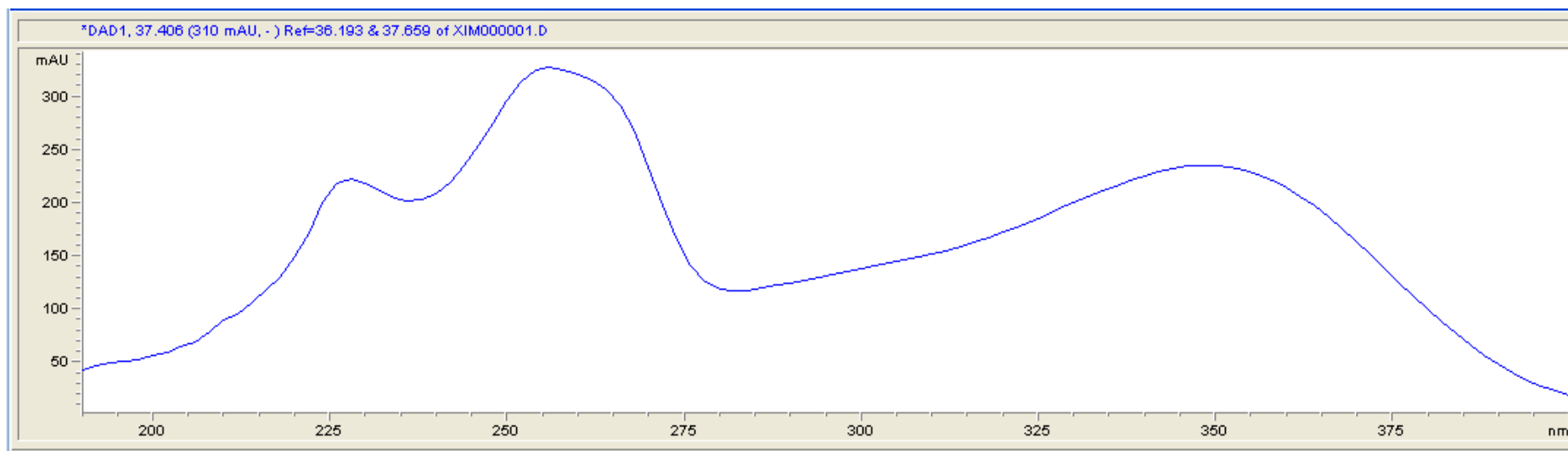
Composto XIII



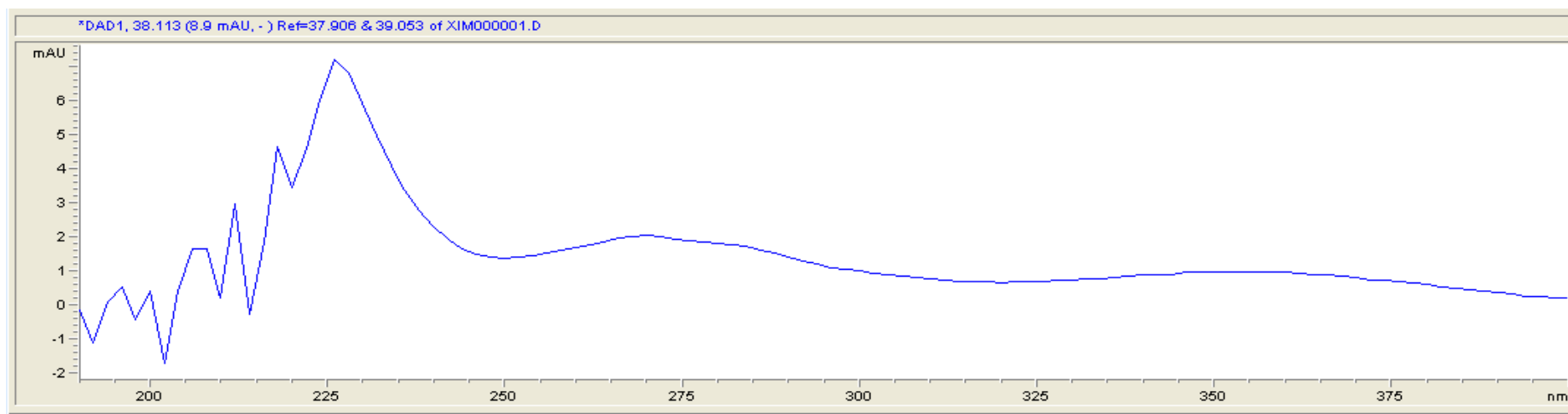
Composto XIV



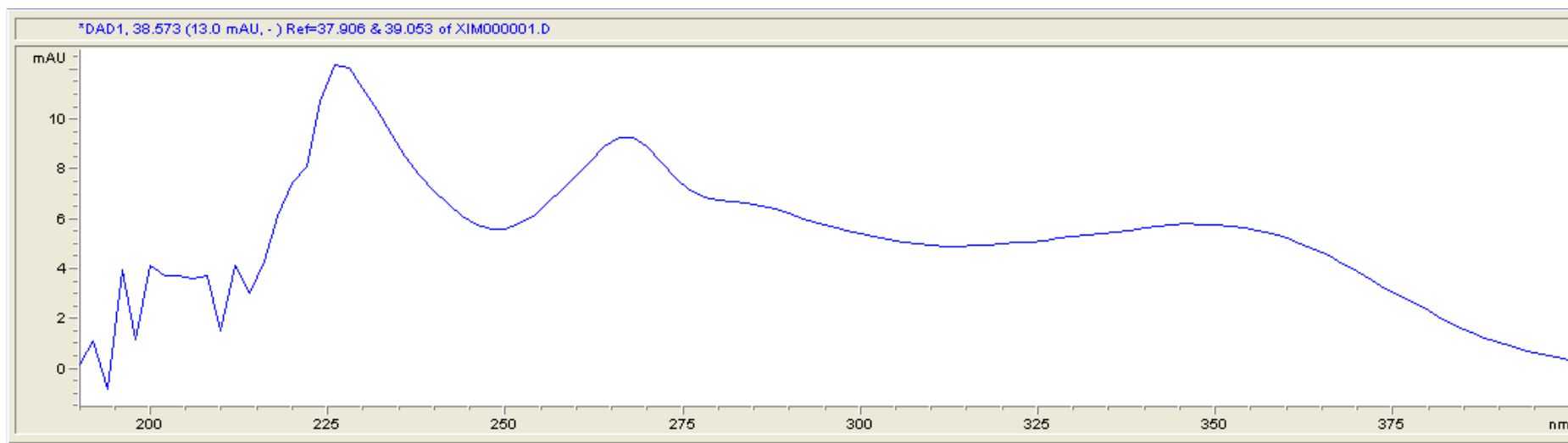
Composto XV



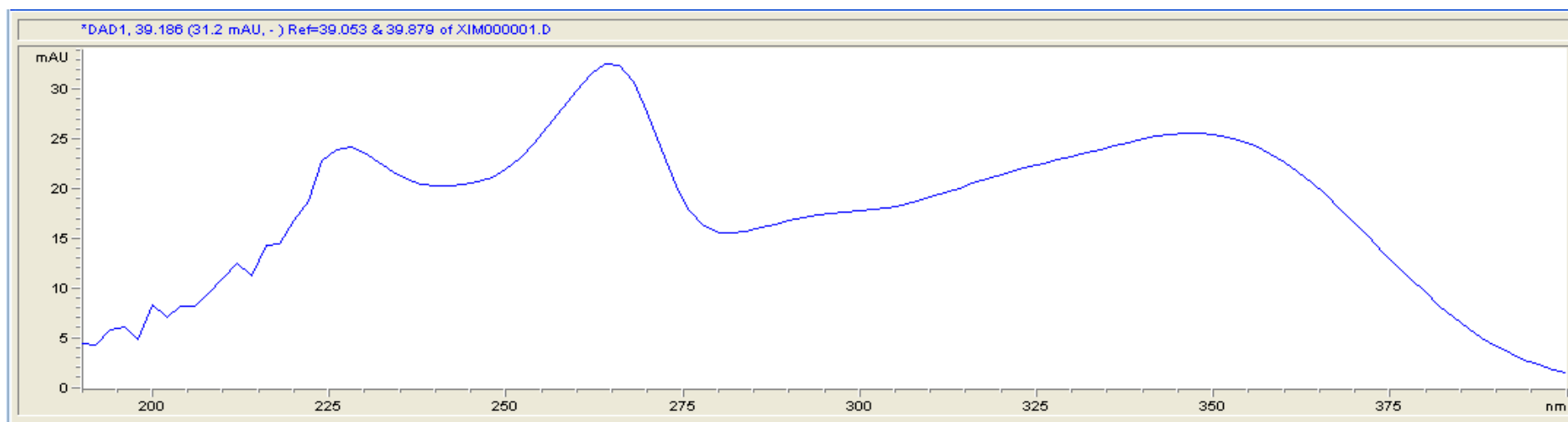
Composto XVI



Composto XVII



Composto XVIII



Composto XIX

