

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO REITORIA DE PESQUISA E GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

OBTENÇÃO DE FRAÇÕES BIOATIVAS A PARTIR DE *Eugenia
punicifolia* COM ATIVIDADE INIBIDORA DA ENZIMA

ALFA-GLUCOSIDASE

Bolsista: Carolina Campos Pessoa Linhares, CNPQ

Manaus

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

PIB /S 0054-2010

OBTENÇÃO DE FRAÇÕES BIOATIVAS A PARTIR DE *Eugenia
punicifolia* COM ATIVIDADE INIBIDORA DA ENZIMA ALFA-
GLUCOSIDASE

Bolsista: Carolina Campos Pessoa Linhares, CNPQ

Orientadora: Prof^a Dr^a Tatiane Pereira de Souza

RESUMO

Eugenia punicifolia, mais conhecida com “pedra-ume-caá”, é uma espécie distribuída pela América central e do sul e principalmente na flora amazônica, apresenta grande potencial terapêutico principalmente como hipoglicemiante (REVILLA, 2001; BORRÁS, 2003). Sendo assim, este trabalho teve por objetivo obter frações bioativas com atividade inibidora da enzima alfa-glucosidase. A matéria-prima vegetal, constituída por folhas de *E. punicifolia*, foi caracterizada através da perda por dessecação, teor extrativos e análise granulométrica por tamisação. As soluções extrativas foram preparadas seguindo um planejamento fatorial 2², onde os fatores estudados foram o tipo de solvente (água e solução hidroalcoólica 50:50 v/v) e o método de extração (decoção e maceração em ultrassom). Todas as soluções foram obtidas com uma proporção de droga vegetal de 7,5% (m/V) e um tempo de extração de 15 minutos. Na análise do planejamento fatorial foi considerada como variável dependente o resíduo seco do extrato e teor de taninos totais. A melhor solução extrativa foi fracionada através de separação líquido-líquido, utilizando-se eluentes de diferentes polaridades (hexano, clorofórmio e acetato de etila). Após a realização da separação líquido – líquido foram obtidas 4 frações em diferentes fases: fase hexânica, fase clorofórmica, fase acetato de etila e fase aquosa, que foram submetidas ao ensaio *in vitro* da alfa-glucosidase, utilizando a arcabose como droga padrão. A maioria das frações de *E. punicifolia* apresentou uma grande capacidade de inibição da alfa-glucosidase, na concentração de 25 mg/mL a fração aquosa, clorofórmica e hexânica apresentaram, respectivamente, inibição (%) para alfa-glucosidase de 93,12±1,56; 93,60±1,21; 95,65±0,10 e concentração capaz de inibir 50% da atividade enzimática - CI50 (mg/mL) para alfa-glucosidase foi de 3,47±0,04; 4,02±0,08; 4,98±0,09, respectivamente. A fração acetato de etila não obteve resultado satisfatório.

Palavras-chave: *Eugenia punicifolia*, frações bioativas e alfa-glucosidase.

ABSTRACT

Eugenia punicifolia, it is further known as "pedra-ume-caá", it is a species distributed through Central and South America and mainly in the Amazonian flora, has great therapeutic potential, especially as hypoglycemic (REVILLA, 2001; BORRÁS, 2003). Therefore, this study aimed to obtain bioactive fractions with inhibitory activity of the alpha-glucosidase enzyme. The vegetable raw material, consisting of leaves of *E.punicifolia* was characterized by loss on drying, extractive content and particle size analysis by sieving. The extractive solutions were prepared on a 2² factorial design, where the factors studied were the type of solvent (water and water-alcohol solution 50:50 v / v) and extraction method (decoction mashing and ultrasound). All solutions were obtained with a proportion of vegetable drug of 7.5% (m / V) and an extraction time of 15 minutes. In the analysis of factorial design were considered as dependent variable the residue dry and tannins totals. If eluents of different polarities (hexane, chloroform and ethyl acetate).—The best solution extract was fractionated by liquid-liquid separation using Upon completion of the separation liquid - liquid fractions were obtained in four different phases: hexane, chloroform phase, phase ethyl acetate and the aqueous phase, which were subjected to in vitro alpha-glucosidase using the arcabose as standard drug. Most of the fractions of *E. punicifolia* showed a great capacity to inhibit alpha-glucosidase at a concentration of 25 mg / mL aqueous fraction, chloroform and hexane showed, respectively, inhibition (%) for alpha-glucosidase of 93.12 ± 1.56 , 93.60 ± 1.21 , 95.65 ± 0.10 and concentration to inhibit 50% enzyme activity - IC₅₀ (mg / mL) for alpha-glucosidase was 3.47 ± 0.04 , 4.02 ± 0.08 , 4.98 ± 0.09 . The ethyl acetate fraction did not get satisfactory results.

Keywords: *Eugenia punicifolia*, bioactive fractions and alpha-glucosidase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	5
2 OBJETIVOS	7
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
3.1 Eugenia punicifolia	8
3.2 Estudos Etnofarmacológicos	8
3.3 Aspectos Fitoquímicos.....	9
3.4 Alfa-glucosidase	10
3.5 Estudo morfo-anatômico.....	11
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	12
4.1 Material vegetal	12
4.2 Tratamento da droga e preparação da matéria-prima vegetal	12
4.3 Caracterização da matéria-prima vegetal	13
4.4 Estudo morfo-anatômico	14
4.5 Obtenção dos extratos brutos.....	14
4.6 Fracionamento do extrato.....	15
4.7 Avaliação da inibição da atividade de enzima α -glucosidase	16
4.8 Análise estatística	16
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	17
6 CONCLUSÃO	26
7 REFERÊNCIAS	27
8 CRONOGRAMA DE ATIVIDADES	31

1. INTRODUÇÃO

As plantas representaram, durante séculos, a única fonte de agentes terapêuticos. No início do século XIX, com o desenvolvimento da química farmacêutica, as plantas passaram a representar a primeira fonte de substâncias para o desenvolvimento de medicamentos. Assim, apesar do grande desenvolvimento da síntese orgânica e de novos processos biotecnológicos, 25% dos medicamentos prescritos nos países industrializados são originários de plantas (HOSTETTMAN *et al.*, 2003).

O estudo do princípio ativo de uma planta pode auxiliar na obtenção de novos medicamentos (Di STASI; HIRUMA-LIMA, 2002), porém são necessários estudos fitoquímicos para conhecer quais tipos de compostos estão em atividade na planta e ainda qual órgão vegetal é responsável pela maior produção dos mesmos.

A região amazônica abriga uma das mais fantásticas riquezas naturais do planeta (CAPOBIANCO, 2001), constituindo-se numa preciosa biblioteca genética, na qual apenas uma pequena parte de seus componentes foi adequadamente estudada e cujos benefícios futuros ainda não são conhecidos (GUERRA; NODARI, 1999).

Eugenia punicifolia, espécie nativa da flora amazônica e conhecida popularmente como pedra-ume-caá, apresenta grande potencial terapêutico principalmente como hipoglicemiante (REVILLA, 2001; BORRÁS, 2003). Sobre a constituição química dessa espécie vegetal, está descrita na literatura, a presença de flavonóides, taninos e ácido fenólicos, sendo possivelmente esses compostos os responsáveis pela atividade hipoglicemiante relatada pela medicina popular (GRANJEIRO *et al.*, 2006). Estudos realizados com extratos a partir de folhas de *E. punicifolia* revelam uma possível atividade antagonista de receptores colinérgicos (GRANJEIRO *et al.*, 2006).

Considerando a importância desta espécie vegetal, pelas suas propriedades terapêuticas e pelo seu uso tão extenso em diversas patologias, ascendeu à necessidade do desenvolvimento de parâmetros de controle de qualidade, e padronização de soluções extrativas e avaliação da atividade inibitória da enzima alfa-glucosidase em frações oriundas dessa espécie com o intuito de auxiliar na busca por novos ativos capazes de curar ou amenizar determinadas patologias e gerar incentivos para a região amazônica, beneficiando também a ciência e a população local.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral:

Obter frações bioativas de *Eugenia punicifolia* com atividade biológica inibidora da alfa-glucosidase

2.2 Específicos:

- Realizar estudo morfoanatômico da droga vegetal e caracterizar botanicamente a droga vegetal;
- Obter extratos brutos (aquoso e etanólico) a partir da droga vegetal;
- Fracionar os extratos brutos a fim de se obter frações com maior atividade biológica;
- Avaliar a atividade inibidora da alfa-glucosidase, *in vitro*, dos extratos brutos e fracionados.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Eugenia punicifolia*

A *Eugenia punicifolia* também conhecida como pedra-ume-caá, pedra-hume-caá, insulina vegetal e murta (JORGE *et al.*, 2000) possui um aspecto arbustivo, podendo ser até arbóreo, chega a atingir até 3 metros de altura (figura1) (SILVA; PINHEIRO, 2007). De acordo com McVaugh (1958) a *E. punicifolia* é uma espécie amplamente distribuída, ocorrendo no Caribe, leste da América do Sul e Andes, Brasil e sudeste da Bolívia.



Figura 1 - Arbusto *Eugenia punicifolia*

3.2 Estudos Etnofarmacológicos

De acordo com o conhecimento empírico o decocto ou a infusão de *E. punicifolia* são utilizados, principalmente, como hipoglicemiante, antiinflamatório e antigripais (VIEIRA & MARTINS, 2000; RIBEIRO *et al.*, 1999).

No levantamento bibliográfico também foi encontrado um estudo indicando que a atividade antioxidante do extrato hexânico (EH) de *E. puniceifolia* (GONZAGA *et al.*, 2007).

Granjeiro *et al.* (2006) observaram que o extrato aquoso de *E. puniceifolia* foi capaz influenciar a neurotransmissão colinérgica no diafragma ratos.

3.3 Aspectos fitoquímicos

Diversos ensaios biológicos simples vêm sendo realizados no intuito de selecionar e monitorar o estudo fitoquímico de extratos de plantas, na procura de substâncias bioativas (HAMBURGER & HOSTETTMANN, 1991).

Segundo Freitas *et al.* (2004) a biossíntese de metabolitos secundários em plantas aromáticas e medicinais depende de diversos fatores, sendo importante avaliá-los devido a influência das concentrações dos princípios ativos que determinam a eficácia terapêutica.

As plantas medicinais apresentam grandes quantidades de substâncias, as quais podem constituir metabolitos secundários nos vegetais, tais como, alcalóides, taninos, terpenos, flavonóides, ácidos fenólicos e esteróides (SILVA, 2007), sendo predominante na *E. puniceifolia* os flavonóides, taninos, óleos essenciais e ácido fenólicos (GRANJEIRO *et al.*, 2006).

3.3.1 Polifenóis

3.3.1.1 Flavonóides

São definidos como uma classe de metabolitos secundários das plantas. Derivam da condensação de uma molécula de ácido cinâmico com três grupos malonil-CoA². Eles são pigmentos naturais presentes nos vegetais e servem como antioxidantes, também são bons agentes terapêuticos em várias patologias.

Neste grupo podemos encontrar as antocianidinas, flavonas, flavonóis e, com menor frequência, as auronas, calconas e isoflavonas.

3.3.1.2 Ácidos fenólicos

Caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes, sendo, por isso, indicados para o tratamento e prevenção do câncer, doenças cardiovasculares e outras doenças (KERRY & ABBEY, 1997; BRAVO, 1998; CROFT, 1998; FERGUSON & HARRIS, 1999).

3.3.1.3 Taninos

Substâncias fenólicas que apresentam solubilidade em água e peso molecular compreendido entre 500 e 3000 Dalton, formam complexos insolúveis em água com proteínas, gelatinas e alcalóides. Podem ser classificados em hidrolisáveis e condensados. Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina popular no tratamento de diarreia, hipertensão arterial, hemorragias, processos inflamatórios e outras moléstias (MELLO, 2001).

3.4 Enzima alfa-glucosidase

É um enzima de grande interesse terapêutico por conseguir retardar a liberação de glicose a partir de oligossacarídeos, através da sua capacidade de hidrolisar ligações, transformando-os em monossacarídeos (CARLOS *et. al.*, 2009). Podem estar associados a defeitos ou deficiências genéticas, levando a graves desordens do metabolismo de carboidratos, como diabetes e obesidade. A família das glucosidases, em particular,

participa de processos bioquímicos fundamentais do metabolismo, como processamento de oligossacarídeos provenientes da alimentação, tornando disponíveis unidades monossacarídicas de glucose para geração de glicogênio e glicoproteínas celulares, biossíntese e modificação de glicosfingolipídios e catabolismo de peptidoglicanos e outros glicoconjugados. Adicionalmente, estas enzimas promovem alterações de paredes celulares bacterianas e vegetais e hidrólise de polissacarídeos estruturais altamente insolúveis, como quitina e celulose (GANEM, 1996).

3.5 Estudo morfo-anatômico

A análise ou estudo morfo-anatômico busca prover elementos para o controle de qualidade botânico da matéria prima vegetal, determinando-se, assim, parâmetros morfológicos que possam diferenciar as espécies vegetais (BRITO, 1996).

Di Stasi (1996) assinala a importância da análise morfo-anatômica para o controle de qualidade da matéria-prima vegetal na indústria farmacêutica, justificando que esta análise fornece subsídios que contribuem na padronização dos insumos, permitindo a diferenciação inclusive entre espécies botanicamente próximas. Dentre os ensaios anatômicos destacam-se os referentes a histoquímica, pois auxiliam na caracterização de drogas e no monitoramento de análises fitoquímicas, bem como no aproveitamento racional da droga vegetal

A indústria farmacêutica tem dado ênfase na obtenção de padrões macro e microscópico de drogas vegetais, devido o baixo custo e o tempo reduzido dos ensaios, que apresentam alto grau de reprodutibilidade. Esta prática contempla as resoluções que instituíram e normatizaram, desde a década de 90 (Marques, 1999), estes procedimentos no controle de qualidade das drogas utilizadas para a produção de fitoterápicos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

A droga vegetal, constituída por folhas de *Eugenia punicifolia*, foi coletada no campo de plantação experimental da EMBRAPA/AM. O material vegetal foi identificado por botânicos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

4.2 Tratamento da droga e preparação da matéria-prima vegetal

A matéria prima vegetal foi coletada na EMBRAPA no dia 20 de Novembro de 2011 e ficou 5 dias secando em temperatura ambiente (figura 2). Após esse período foram separadas as folhas dos galhos, e as folhas ficaram mais 7 dias em uma estufa de ar circulante.

Após a secagem, o material foi submetido à moagem em moinho de facas. O material cominuído resultante foi misturado, constituindo assim a matéria-prima vegetal.



Figura 2 - *E. punicifolia* secando à temperatura ambiente na EMBRAPA.

4.3 Caracterização da matéria-prima vegetal (MPV)

O material vegetal foi caracterizado através dos ensaios descritos abaixo:

- Determinação de perda por dessecação (F. Bras. IV, 1988). – Em cada pesa-filtro pesou-se cerca de 0,5g da amostra. Os pesa-filtros com as amostras foram levados para estufa a $105^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por um período de 2 horas, em seguida os pesa-filtros foram resfriados em dessecador por 20 minutos e pesados. Este procedimento foi repetido até peso constante. O ensaio foi realizado em quadruplicata.

- Análise granulométrica por tamisação (VOIGT, 2000) – Foi pesado, aproximadamente, 50g da matéria-prima vegetal que foi submetido á passagem através de tamises com abertura de malha de 1,00; 0,800; 0,710; 0,600; 0,500; 0,400; 0,300 e 0,250 mm. A tamisação foi realizada a 60 vibrações por segundo durante 15 minutos. As frações retidas nos tamises e no coletor foram pesadas e os dados analisados em gráfico. O histograma de distribuição foi realizado, a fim de se a amplitude granulométrica do pó. A análise foi realizada em triplicata.

- Teor de extrativos – (BUNDESVEREINIGUNG, 1986) – Foi utilizado cerca de 1,5 g de droga vegetal triturada, essa droga vegetal foi colocada em erlenmyer adicionando-se 150 mL de água destilada, o conjunto foi pesado e submetido á extração por decocção durante 10 minutos. Após resfriamento o conjunto foi pesado e foi reposta a quantidade de água evaporada com água destilada para reconstituir o seu peso inicial. A solução foi filtrada, e seus os 20 mL iniciais foram desprezados. Utilizando-se 4 pesa-filtros foram pesados cerca de 20,0 g da solução em cada um. Os pesa-filtros foram levados à Banho Maria até a evaporação completa da água restando somente o resíduo seco. Foi realizado a perda por dessecação desse resíduo Após a obtenção do peso constante do resíduo, foi calculado o percentual ponderal através da média de três determinações segundo a equação:

$$TE = (g \times FD \times 100) / (m - (m \times pd))$$

Onde: TE = Teor de extrativos (% m/m); g = massa do resíduo seco (g); FD = constante (FD = 5); m = massa da amostra inicial (g); pd = perda por dessecação da amostra (% m/m).

4.4 Estudo morfo-anatômico

Para a análise morfo-anatômica foram empregados fragmentos da droga vegetal (folha), que foram seccionados à mão livre, após amolecimento em água destilada (KRAUS, 1997). Os cortes foram diafanizados em solução de hipoclorito de sódio (30%) e corados com safranina (DOP; GUAUTÍE, 1998).

4.5 Obtenção dos extratos brutos

Os extratos brutos foram obtidos através de planejamento fatorial 2^2 , onde os fatores estudados foram o tipo de solvente (água e solução hidroalcoólica 50:50 v/v) e o método de extração (decoção e maceração em ultrassom). Todas as soluções foram obtidas com uma proporção de droga vegetal de 7,5% (m/V) e um tempo de extração de 15 minutos.

Na análise do planejamento fatorial foi considerada como variável dependente o resíduo seco dos extratos e o teor de taninos totais.

Fatores	Níveis
Tipo de solvente	Água (+)
	solução hidroalcoólica 50:50 v/v (-)
Método de extração	Decocção (+)
	Maceração (-)

Tabela 1: matriz do experimento fatorial

A determinação do resíduo seco foi realizada por método gravimétrico (BUNDESVEREINIGUNG, 1986) e de taninos totais por espectrofotometria UV/vis (BÖHME e HARTKE 1976, modificado por SOARES, 2002; PACHECO, 2010).

4.6 Fracionamento do extrato

O extrato bruto, selecionado através do planejamento fatorial, foi seco em spray-drier. Para o fracionamento através de separação líquido-líquido foi utilizado cerca de 0,25g do extrato seco. Esse extrato seco foi solubilizado em 25ml água destilada. A solução aquosa foi agitada com 25ml dos solventes orgânicos selecionados (hexano, clorofórmio e acetato de etila). O procedimento é repetido três vezes para cada solvente. No final foram obtidas 4 frações: fase hexânica, fase clorofórmica, fase acetato de etila e fase aquosa. As frações resultantes do fracionamento foram submetidas ao ensaio *in vitro*.

4.7 Avaliação da inibição da atividade de enzima α -glucosidase

A avaliação da ação sobre a inibição da enzima α -glucosidase foi realizada através de ensaio “in vitro”, utilizando arcabose como fármaco padrão (ABESUNDARA *et al.*, 2004).

4.8 Análise estatística

Os resultados dos experimentos foram expressos através de média aritmética e desvio padrão e os dados analisados estatisticamente através de ANOVA *two-way* (MONTGOMERY, 1991).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Caracterização da matéria prima vegetal

5.1.1 Perda por dessecação

A Farmacopéia Brasileira IV preconiza um teor máximo de 14% de umidade na matéria prima vegetal, a espécie *E. puniceifolia* apresentou média de 8,06 g% na determinação da perda por dessecação, se enquadrando nos parâmetros exigidos pela Farmacopéia Brasileira.

5.1.2 Análise granulométrica por Tamisação

Os resultados obtidos na análise granulométrica demonstraram que grande parte das partículas de *E. puniceifolia* está situada na faixa 600-500 μ m (Figura 3). Tal resultado é importante no que tange a determinação de eficiência de processos extrativos com a referida espécie.

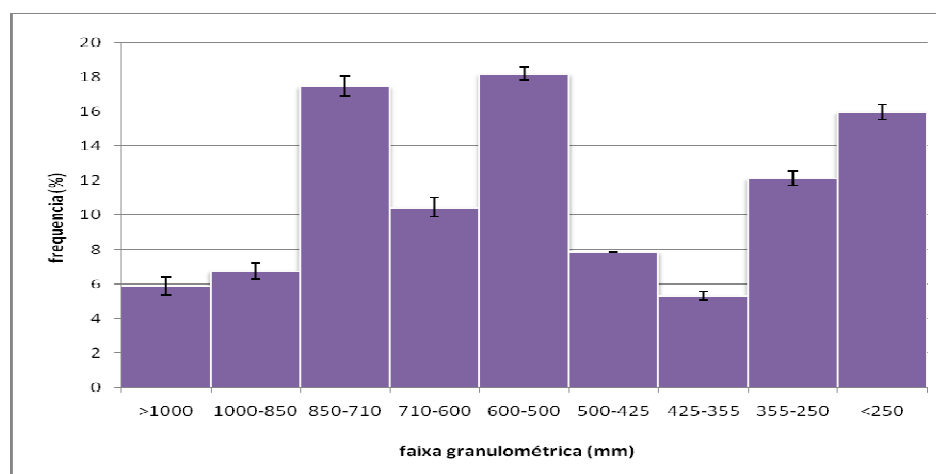


Figura 3 - Distribuição da matéria-prima vegetal.

5.1.3 Teor de extrativos

Na matéria prima vegetal estudada o rendimento extrativo encontrado foi de $25,45 \pm 1,93\%$ (CV %= 7,59) demonstrando assim que a água parece ser um excelente solvente para a preparação de soluções extrativas desta espécie vegetal.

5.2 Estudo morfo-anatômico

A partir dos cortes paradérmicos das folhas de *E. puniceifolia* foram observadas células epidérmicas de parede sinuosa, estômatos do tipo anomocíticos ou ranunculáceo, além de numerosas e volumosas drusas de oxalato de cálcio (figura 4), assim como cristais prismáticos (figura 5). No corte transversal foi possível a visualização da cutícula estriada, da epiderme (em camada única), do mesófilo heterogêneo assimétrico, das duas camadas de parênquima paliçádico (figura 6) e alguns tricomas tectores simples. Também observamos a presença de várias glândulas esquizógenas com óleo essencial em seu interior.

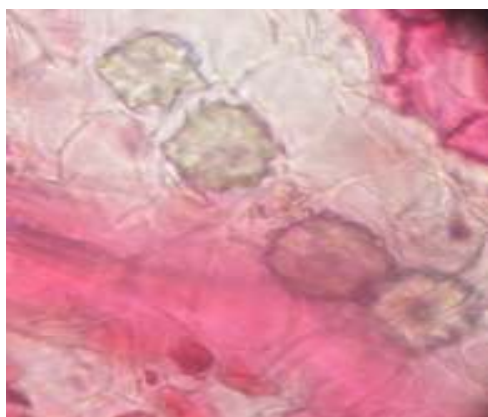


Figura 4 - Drusas de Oxalato de Cálcio



Figura 5 - Cristal prismático



Figura 6 - Cutícula estriada e parênquima paliádico duplo

5.3 Resíduo seco dos extratos brutos

Pode ser observado, na tabela 2 que os extratos hidroalcoólicos, independente do método de extração que foram obtidos, apresentaram uma maior quantidade de resíduo seco, ou seja, maior teor de substâncias, indicando assim que este tipo de solvente foi mais eficiente na extração das substâncias presentes nas folhas de *E. puniceifolia*, da mesma forma pode ser verificados que o método de decocção foi mais eficiente.

Extratos brutos	Resíduo Seco (g%)	
	Média	Desvio Padrão
Água/Decocção	1,5887	0,009514
Água/Maceração	1,2760	0,004947
	2	
hidroalcoólico/Decocção	2,56659	0,017312
hidroalcoólico /Maceração	2,27775	0,016476

Tabela 2 - Resíduo Seco de extratos brutos obtidos com diferentes solventes e métodos de extração de *Eugenia puniceifolia*.

A análise estatística dos resultados demonstrou que ambos os fatores influenciaram significativamente ($\alpha=0,05$) o resíduo seco das soluções extrativas (figura 7), no entanto, não houve interação significativa entre os mesmos, como pode ser observado na figura 8 pelo paralelismo das retas.

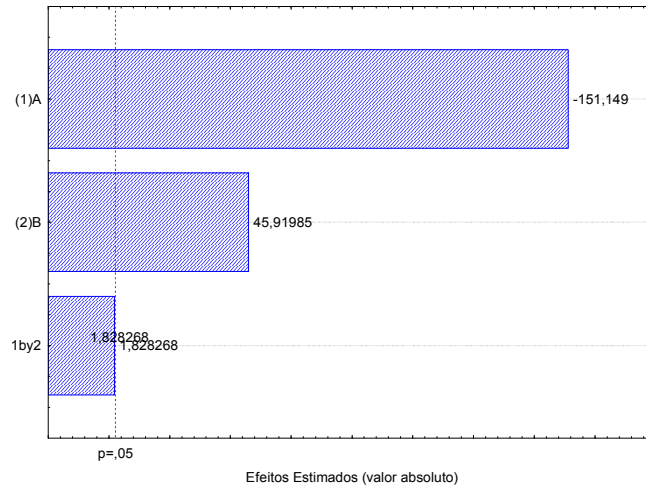


Figura 7: Gráfico de Pareto para o resíduo seco

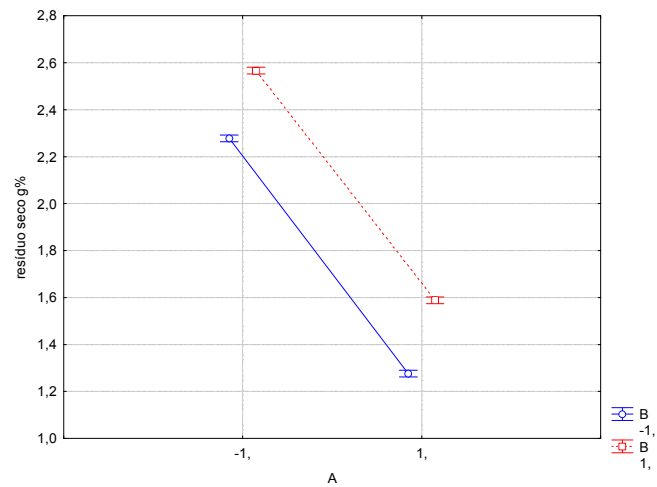


Figura 8: Interação AB para o resíduo seco

5.4 Taninos Totais

Na avaliação dos taninos totais a SE hidroalcoólica/decocção apresentou menor média, ou seja, possui maior quantidade de substâncias responsáveis pela atividade farmacologia da planta.

Soluções extrativas	Média	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação
Decocção água	17,48354	0,252156	1,44225
Maceração água	16,12494	0,289132	1,793071
Hidroalcoólico/Decocção	13,41851	0,656111	4,889595
Hidroalcoólico/Maceração	15,78779	0,136342	0,863594

Tabela 3 - Taninos Totais das SE de *Eugênia punicifolia*

A análise estatística (figuras 9 e 10) demonstrou que ambos os fatores estudados são significativamente ($\alpha=0,05$) influentes sobre o teor de taninos totais das soluções extrativas, apresentando inclusive interação positiva onde a melhor resposta é obtida quando ambos os fatores estão no nível superior (decocção e água).

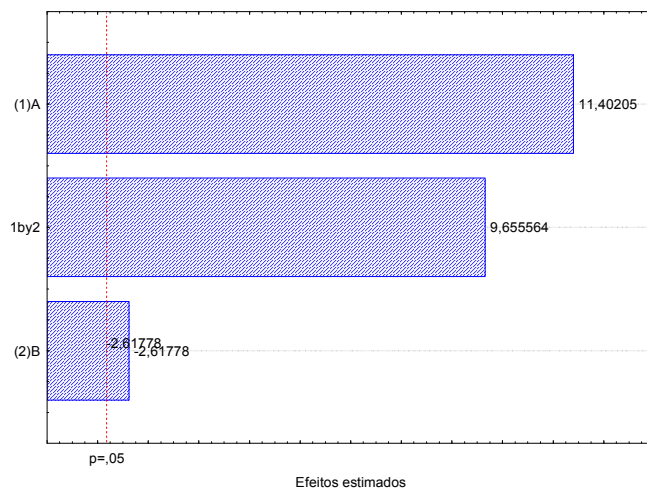


Figura 9: Gráfico de Pareto para taninos totais

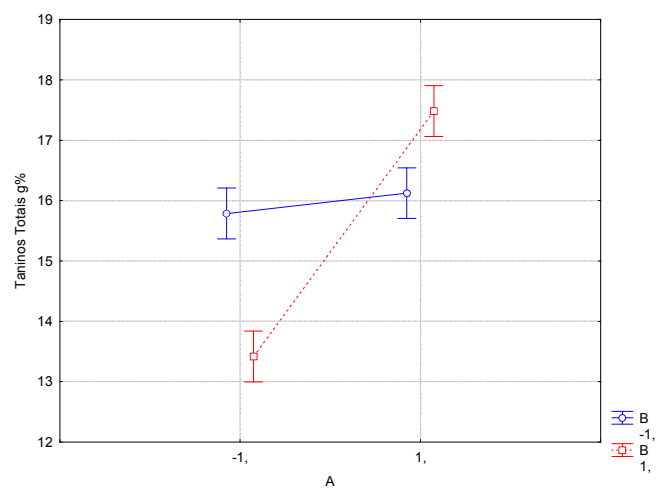


Figura 10: Interação AB para taninos totais

5.5 Inibição da Alfa-glucosidase

Todos os extratos de *E. puniceifolia* inibiram de maneira significativa a alfa-glucosidase. No entanto o extrato que melhor inibiu a alfa-glucosidase nas diferentes concentrações foi o extrato aquoso preparado por maceração, sendo este escolhido para o fracionamento (Tabela 4).

Amostra	Concentração (µg/mL)	Inibição (%) X ±S	CI50 X ±S
Decocção/ água	10	97,47±0,08	
	1	93,90±0,48	
	0,1	29,69±2,15	0,21±0,04
	0,01	6,22±0,59	
	0,001	6,21±0,57	
Maceração/água	10	98,86±0,42	
	1	96,05±0,81	0,21±0,04
	0,1	41,81±0,95	
	0,01	36,57±3,19	
Decocção 50:50 (etanol: água)	10	97,31±0,31	
	1	87,15±1,56	
	0,1	18,45±0,74	0,53±0,07
	0,01	14,70±0,77	
Maceração 50:50 (etanol: água)	10	97,28±0,08	
	1	95,70±0,71	
	0,1	21,55±0,96	0,26±0,02
	0,01	3,66±0,72	

Tabela 4- Resultado da avaliação de inibição da alfa-glucosidase.

5.6 Fracionamento dos extratos brutos

O extrato bruto maceração/água foi submetido a uma separação líquida – líquido através da utilização de 4 solventes de diferentes polaridades. Com o referido procedimento foram obtidas 4 frações: fase hexânica, fase clorofórmica, fase acetato de etila e fase aquosa. Essas frações foram avaliadas *in vitro* através do ensaio de inibição da α -glucosidase

A maioria das frações de *E. puniceifolia* apresentou uma grande capacidade de inibição da alfa-glucosidase, conforme pode ser visualizado na tabela 5.

Amostra	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Inibição (%) $\bar{X} \pm S$	CI ₅₀ $\bar{X} \pm S$
Acetato de etila	100	56,71 \pm 2,65	
	25	93,12 \pm 1,56	
Aquosa	12,5	88,78 \pm 1,26	
	6,25	80,18 \pm 3,91	3,47\pm0,04
	3,125	43,80 \pm 0,41	
Clorofórmica	25	93,60 \pm 1,21	
	12,5	88,27 \pm 1,02	
	6,25	73,89 \pm 2,79	
	3,125	36,22 \pm 2,92	4,02\pm0,08
	1,5625	9,44 \pm 5,71	
Hexânica	25	95,65 \pm 0,10	
	12,5	92,14 \pm 0,07	
	6,25	68,98 \pm 0,73	4,98\pm0,09
	3,125	19,84 \pm 1,58	
	1,5625	3,51\pm0,23	

Tabela 5 - Resultado da avaliação de inibição da alfa-glucosidase das frações do extrato aquoso por maceração.

A fração acetato de etila não obteve resultado relevante, não sendo possível calcular a CI₅₀ (mg/mL). Na concentração de 25 mg/mL a fração aquosa, clorofórmica e hexânica apresentaram, respectivamente, inibição (%) para alfa-glucosidase de 93,12 \pm 1,56; 93,60 \pm 1,21; 95,65 \pm 0,10 e concentração capaz de inibir 50% da atividade enzimática - CI₅₀ (mg/mL) para alfa-glucosidase foi de 3,47 \pm 0,04; 4,02 \pm 0,08; 4,98 \pm 0,09, respectivamente.

Sendo assim, os resultados demonstraram que a maioria das substâncias com capacidade hipoglicemiante localiza-se na fase aquosa, fato que complementa o encontrado com os extratos brutos, onde a utilização de água também foi mais eficaz no percentual de inibição.

6 CONCLUSÃO

Diante do exposto observamos que através da análise morfo-anatômica da folha, foi possível distinguir a *E. puniceifolia* das outras plantas que também são chamadas de “pedra-ume-caá”. Além disso, foi evidenciado que o extrato de *E. puniceifolia* e suas frações apresentam uma excelente atividade inibidora da alfa-glucosidase, indicando que este extrato tem um grande potencial para fins terapêuticos, sendo necessário mais pesquisas, principalmente sobre estudo desse inibição *in vivo*.

7 REFERÊNCIAS

ABESUNDARA, K.J.M.; MATSUI, T.; MATSUMOTO, K. α -Glucosidase inhibitory activity of some sri lanka plant extracts, one of which, *cassia auriculata*, exerts a strong antihyperglycemic effect in rats comparable to the therapeutic drug acarbose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 52, p. 2541-2545, 2004.

ABRANTES, J. S. *Bio(Sócio) diversidade e empreendedorismo ambiental na Amazônia*. Rio de Janeiro: Garamond, 2003

BORRÁS M. R. L. *Plantas da Amazônia: medicinais ou mágicas? Plantas comercializadas no Mercado Municipal Adolpho Lisboa*. Manaus: Editora Valer/Governo de Estado do Amazonas, 2003.

BRITO, A.R.M.S. (1996) In: DI STASI, L.C., E.M. BACCHI, L.C. MING, M.R. FURLAN, M.A.P. Savastano, M.C.M. AMOROSO, M.S. REIS & P.H. FERRI, eds.) *Plantas medicinais: arte e ciência*. São Paulo: UNESP, Cap.13, p.187-197

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. *Nutrition Reviews*, New York, v.56, n.11, p.317-333, 1998.

BUNDESVEREINIGUNG Deutscher Apothekerverbände (Hrsg.). *Deutscher Arzneimittel – Codex*. 1986. Frankfurt: Govi; Stuttgart: Deutscher Apotheker, 1986a. v.1; *Codex – Probe* 4,9.

CARLOS, E. C. L.; LIMA, E. S.; NUNES, C. V.; DOS SANTOS, P. A. Atividade inibitória dos extratos vegetais de *Cecropia purpurascens* sobre as enzimas α -glucosidase e α -amilase. In Reunião Anual da SBPC, 61, 2009, Manaus. Resumo Manaus:Universidade Federal do Amazonas, 2009.

CORRÊA, A. D. BATISTA, R. S. QUINTAS, L.E.M. *Plantas medicinais do cultivo a terapêutica*. Petrópolis: Vozes, 1997. 18, 19 p.

DI STASI, L. C. *Plantas medicinais: arte e ciência*. São Paulo: UNESP. 230 p. 1996.

DI STASI, L. C. E HIRUMA-LIMA, C. A. Gentianales medicinais. *In: Di Stasi, L. C. e Hiruma-Lima, C. A. 2002. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica*. 2ª ed. rev. e ampl. – São Paulo: Editora UNESP. 604p. 2002.

DOP, P.; GAUTIÉ, A. *Manuel de technique botanique. Histologie et microbie vegetales*. 10 ed. Paris: J. Lamarre éditeur J. Lamarre éditeur, v. 47.1988. p.108-111.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed., São Paulo: Atheneu, 1988.

FERGUSON, L.R., HARRIS, P.J. Protection against cancer by wheat bran: role of dietary fibre and phytochemicals. *European Journal of Cancer Prevention*, Oxford, v.8, n.1, p.17-25, 1999.

FREITAS, M.S.M.; MARTINS, M. A.; VIEIRA, I. J. C. Produção e qualidade de óleos essenciais de *Mentha arvensis* em resposta à inoculação de fungos micorrizicos arbusculares. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 39, n. 9, p. 887-894, 2004.

GONZAGA, D. T. G. ; ROCHA, D. R. ; SOUZA, R. B. ; BRAGA, T. L. ; FERREIRA, V. F. ; SANTOS, W. C. *Atividade Antioxidante do Extrato hexânico de Eugenia Punicifolia (pedra ume caá)*. *In: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia. Livro de Resumos - 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007.*

GANEM, B.; *Acc. Chem. Res.* **1996**, 29, 340; MURRAY, D. K.; GRANNER, D.K.;

MAYES, P. A.; RODWELL, V. W.; Harper: Bioquímica, Atheneu: São Paulo, 1994.

GRANGEIRO MS, CALHEIROS-LIMA AP, MARTINS MF, ARRUDA LF, GARCEZ-DO-CARMO L, SANTOS WC. Pharmacological effects of *Eugenia punicifolia* (Myrtaceae) in cholinergic nicotinic neurotransmission. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 108, p. 26–30, 2006.

HAMBURGER, M; HOSTETTMANN, K.; Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine *Phytochemistry* 1991, 30, 3864

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E.; VIEIRA, P. *Princípios Ativos de Plantas Superiores*. São Carlos: EDUFSCAR, 2003. 152p.

JORGE, L. I. F.; AGUIAR, J. P. L.; SILVA, M. L. P. Anatomia foliar de pedra-hume-caá (*Myrcia sphaerocarpa*, *Myrcia guianenses*, *Eugenia punicifolia* – MYRTACEAE). *Acta Amazônica*, 30(1): 49-57. 2000.

KERRY, N.L., ABBEY, M. Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation *in vitro*. *Atherosclerosis*, Limerick, v.135, n.1, p.93-102, 1997.

KRAUS, J.E.; ARDUIM, M. *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. Seropédica: Universidade Rural, 1997. 198 p.

MARQUES, L. C. 1999. In: SIMÕES, C. *et al.*, *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC. cap. 14. p. 259-289

MELLO, J. P. C.; SANTOS, S. C. Em *Farmacognosia: da planta ao medicamento*; Simões, C. M. O.; Schenckel, E. P., orgs.; Ed. UFSC: Porto Alegre; 3ª ed., 2001.

MONTGOMERY, D.C. *Diseño y análisis de experimentos*. México: Iberoamérica, 1991.

REVILLA J. *Plantas da Amazônia – Oportunidades Econômicas e Sustentáveis*. 2. Ed., Manaus: Programa de Desenvolvimento Empresarial e Tecnológico/SEBRAE, 2001.

RIBEIRO, J.E.L.S.; HOPKINS, M.J.G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C.A.; COSTA, M.A.S.; BRITO, J.M.; SOUZA, M.A.D.; MARTINS, L.H.P.; LOHMANN, L.G.; ASSUNÇÃO, P.A.C.L.; PEREIRA, E.C.; SILVA, C.F.; MESQUITA, M.R.; PROCÓPIO, L.C. *Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central*. Manaus: INPA, 1999. 1, 2 p.

SILVA, A.L.G.; PINHEIRO M.C. B. Biologia floral e da polinização de quatro espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae). *Acta botânica brasileira*. v. 21, n.1, p. 235-247. 2007.

SILVA, C.G.V. Bioatividade de extratos etanólicos de *croton* sobre *plutella xylostella* (l.) E ação fumigante e composição química de óleos essenciais de *croton greviodes* (baill.) Sobre *zabrotes subfasciatus* (bohemian).2007

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5.ed. Florianópolis: Editora da Universidade. 2004.

VIEIRA, R.F.; MARTINS, M.V.M. *Recursos genéticos de plantas medicinais do cerrado: uma compilação de dados*.Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu, V.3, n.1, p.13-26, 2000.

VOIGT, R. *Pharmazeutische Technologie*. 7. überarb., 2000.

