

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

PADRONIZAÇÃO DE SOLUÇÃO EXTRATIVA VISANDO ATIVIDADE INIBITÓRIA
DA ENZIMA α – GLICOSIDASE

PIB – S/0012/2008

Bolsista: Isis Costa Rodrigues, CNPq

MANAUS

2009

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

RELATÓRIO FINAL
PADRONIZAÇÃO DE SOLUÇÃO EXTRATIVA VISANDO ATIVIDADE INIBITÓRIA
DA ENZIMA α – GLICOSIDASE

PIB – S/0012/2008

Bolsista: Isis Costa Rodrigues, CNPq

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

MANAUS

2009

APRESENTAÇÃO

Este trabalho é uma compilação das atividades realizadas entre os meses de agosto de 2008 a junho de 2009. O conteúdo do trabalho engloba uma introdução, através da qual se justifica a importância da pesquisa, objetivos pretendidos com o estudo, revisão da literatura sobre o tema, descrição detalhada da metodologia empregada, resultados obtidos com a discussão dos mesmos e, bibliografia consultada.

RESUMO

A utilização de plantas está cada vez mais difundida, devido ao potencial terapêutico demonstrado pelas mesmas. No entanto, observam-se problemas freqüentes com relação à substituição da droga vegetal, adulteração e não uniformidade da composição química, podendo causar alterações nas propriedades farmacológicas da planta medicinal. A espécie escolhida para estudo é a *Caesalpinia ferrea* Mart., conhecida popularmente como Jucá ou Pau-Ferro, uma árvore leguminosa largamente distribuída nas regiões norte e nordeste do Brasil e, amplamente utilizada na medicina popular como antiinflamatório, cicatrizante e auxiliar no tratamento da anemia. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo a caracterização da matéria-prima vegetal constituída por vagens de *C. ferrea*, visando o estabelecimento de parâmetros que sirvam para identificação e determinação das propriedades físico-químicas das matérias-primas vegetais, assim como, o desenvolvimento de uma solução extrativa otimizada e padronizada com atividade biológica e constituição química definida. Para isso, a matéria-prima vegetal, foi caracterizada através de perda por dessecação, teor extrativo e análise granulométrica por tamisação, utilizando técnicas descritas na Farmacopéia Brasileira e códigos oficiais. A solução extrativa foi otimizada e padronizada considerando os resultados de um planejamento fatorial 3^2 , onde foi investigada a influência dos fatores relação droga:solvente m/V (5,0 ; 7,5 ; 10 %) e concentração de etanol (00,0; 50,0; 100,0%) sobre o resíduo seco e o teor de taninos totais das soluções extrativas obtidas. Para todas as soluções extrativas foi avaliada a capacidade de inibição da enzima α -glucosidase. O experimento foi analisado estatisticamente através de ANOVA multivariada. Os resultados demonstraram que tanto o percentual de droga vegetal como a concentração de etanol foram fatores significantes sobre o resíduo seco e teor de taninos totais. Com relação ao resíduo seco as soluções extrativas obtidas com 50% de etanol apresentaram maiores teores de sólidos solúveis, enquanto que as obtidas com 100% de etanol originaram maiores teores de taninos totais. Com relação à atividade biológica de inibição da enzima α -glucosidase, a solução extrativa que apresentou maior percentual de inibição foi a obtida com 7,5% de droga vegetal e 50% de etanol. Sendo assim, pode ser concluído que essas são as condições para padronização de uma solução extrativa com atividade de inibição da enzima α -glucosidase.

Palavras Chaves: Jucá, solução extrativa, inibidor da α -glucosidase

ABSTRACT

The use of plants is becoming more widespread due to the therapeutic potential demonstrated for them. However, there are frequent problems related to vegetable drug substitution, adulteration and no uniformity of chemical composition, may cause changes in pharmacological properties of medicinal plant. The specie chosen for study is *Caesalpinia ferrea* Mart., popularly known as Jucá or Pau-Ferro, a leguminous tree widely distributed in the north and northeastern of Brazil, and widely used in folk medicine as anti-inflammatory, healing and help in the treatment of anemia. Thus, the aim of this work was characterize the raw material of pods of *C. ferrea* to the establishment of parameters to be used in identification and determination of physico-chemical properties of vegetable raw materials, as well as the development of an extractive solution optimized and standardized with biological activity and chemical constitution defined. The raw material was characterized by loss of dry, content extraction and analysis size particle, using techniques described in the Brazilian Pharmacopoeia and codes official. The extractive solution was optimized and standardized considering the results of a factorial design 3^2 , which was investigated the influence of drug proportions m/V (5.0, 7.5, 10%) and concentration of ethanol (00.0 , 50.0, 100.0%) on the dry residue and total content of tannin extraction from the solutions obtained. It was evaluated the ability of inhibition of the enzyme α -glucosidase by all extractions solutions. The experiment was statistically analyzed by multivariate ANOVA. The results showed that both the percentage of drug plant and the concentration of ethanol were significant factors on the dry residue and total content of tannin. Concerning to the dry residue the extractive solution obtained with 50% ethanol presented higher soluble solids content, while those obtained with 100% ethanol resulted in higher levels of total tannins. Regarding the biological activity of inhibition of the enzyme α -glucosidase, the extractive solution that presented higher percentage of inhibition was obtained with 7.5% of drug and 50% of ethanol. Thus, it can be concluded that these are the conditions for standardization of an extractive solution with activity of inhibition of the enzyme α -glucosidase.

Keywords: Jucá, extractive solution, inhibitor of α -glucosidase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Caesalpinia ferrea</i> Martius.....	14
Figura 2 - Histograma de distribuição granulométrica.....	28
Figura 3 – Curva de retenção e passagem da MPV	29
Figura 4 : Gráfico de Pareto para resíduo seco	31
Figura 5 : Superfície de resposta para o resíduo seco	32
Figura 6 : Curva de calibração do ácido gálico	33
Figura 7 : Gráfico de Pareto para teor de taninos totais	37
Figura 8 : superfície de resposta para o resíduo seco.....	37
Figura 9 : Percentual de inibição dos extratos.....	38
Figura 10 : Concentração do extrato inibitória de 50% da atividade da enzima	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Matriz do planejamento fatorial 3^2	22
Tabela 2 – Caracterização da matéria-prima vegetal	27
Tabela 3: Resíduo seco (RS%) nas diferentes soluções extrativas	30
Tabela 4: Análise de Variância (ANOVA) para o resíduo seco das soluções extrativas	31
Tabela 5: Parâmetros da curva de calibração do ácido gálico.	33
Tabela 6: Teor de polifenóis totais	34
Tabela 7: Teor de Taninos totais	35
Tabela 8: Análise de Variância (ANOVA) para o teor de taninos nos extratos secos	36

SUMÁRIO

Apresentação	3
Resumo	4
Abstract.....	5
Lista de figuras	6
Lista de tabelas	7
1. Introdução	10
2. Objetivos.....	13
3. Revisão bibliográfica	
3.1.1. <i>Caesalpinia ferrea</i>	14
3.1.2. Aspectos etnofarmacológicos e pré-clínicos	15
3.1.3. Caracterização físico-química	16
3.1.4. Caracterização de Matéria Prima Vegetal (MPV)	17
4. Metodologia	
4.1. Material Vegetal	20
4.2. Tratamento do material vegetal e obtenção da Matéria-prima vegetal	20
4.3. Caracterização da matéria-prima vegetal	20
4.3.1. Determinação de perda por dessecação	20
4.3.2. Teor de extrativos.....	20
4.3.3. Análise granulométrica por tamisação	21

4.4. Desenvolvimento e otimização da solução extrativa	21
4.4.1.. Determinação de resíduo seco	22
4.4.2. Determinação de taninos totais	23
4.4.3 Avaliação da inibição da atividade da enzima α -glucosidase	22
4.4.4. Análise estatística.....	22
5. Resultados e discussão.....	27
5.1. Caracterização da Matéria-Prima Vegetal (MPV).....	27
5.2. Resíduo seco.....	29
5.3. Curva de calibração	33
5.4. Taninos totais	34
5.5. Avaliação da inibição da atividade de enzima α -glucosidase	38
6. Conclusão.....	40
7. Referências	41
8. Cronograma.....	44

1. Introdução

Estima-se que o mercado mundial de fitoterápicos gira em torno dos 22 bilhões de dólares (YUNES et al., 2001). Porém, apesar do Brasil apresentar um papel privilegiado, dado sua extensa e diversificada flora, não tem ocupado uma posição destacada neste setor, ficando inclusive atrás de países menos desenvolvidos tecnologicamente (YUNES et al., 2001). Entre os fatores que favorecem esse cenário nacional destaca-se a carência de estudos tecnológicos, capazes de transformar as plantas medicinais, com potencial terapêutico, em um produto que possa ser utilizado com exatidão de dosagem, garantindo eficácia e segurança clínica ao paciente. Além disso, o desconhecimento das características físico-químicas e a inexistência de especificações de qualidade para a maioria das drogas vegetais utilizadas no Brasil contribuem para as distorções, usos equivocados e, principalmente, a comercialização irracional de produtos de origem vegetal (FARIAS et al. 1985).

Caesalpinia ferrea Mart., conhecida popularmente como Jucá ou Pau-Ferro, é uma árvore leguminosa largamente distribuída nas regiões norte e nordeste do Brasil e, amplamente utilizada na medicina popular como antiinflamatório, cicatrizante e auxiliar no tratamento da anemia (CARVALHO et al., 2006). Alguns estudos farmacológicos têm sido realizados no sentido de comprovar a atividade terapêutica desta espécie vegetal, destacando-se a atividade anti-úlceras e anti-diabética (BACHI et al., 1995; UEDA et al., 2001), tais pesquisas demonstram que extratos obtidos a partir dos frutos da *C. ferrea* apresentam marcante atividade antiinflamatória dose-dependente e capacidade de inibição da aldose-redutase, importante enzima no metabolismo de diabéticos (BACHI et al., 1995; UEDA et al., 2001). Além dessas propriedades, a literatura relata resultados promissores no tratamento de câncer de pele (NAKAMURA et al., 2002).

Dentre os constituintes químicos descritos na literatura destaca-se a presença de polifenóis, onde ácido gálico e ácido elágico podem ser as possíveis substâncias químicas responsáveis por parte da atividade biológica dos frutos da *C. ferrea* (UEDA et al., 2004).

O diabetes mellitus é um distúrbio endócrino muito comum e afeta mais de cem milhões de pessoas em todo o mundo (cerca de 6% da população) e estima-se

que nos próximos dez anos afetará cerca de cinco vezes mais pessoas. Mundialmente, tem sido um dos principais problemas de saúde pública no que se refere tanto ao número de pessoas afetadas quanto ao elevado investimento dos governos para o controle e tratamento de suas complicações. Muitas espécies de plantas têm sido usadas etnofarmacologicamente ou experimentalmente para tratar dos sintomas do diabetes mellitus. Grande parte das plantas que são utilizadas como antidiabéticas demonstraram, ao serem avaliadas farmacologicamente, possuir atividade hipoglicemiante e constituintes químicos que podem ser utilizados como modelos para novos agentes hipoglicemiantes. Nesse contexto encontra-se a espécie vegetal *Caesalpinia ferrea* (BACHI et al., 1995; UEDA et al., 2001).

Considerando que *Caesalpinia ferrea* é uma espécie, amplamente, utilizada pela população com algumas atividades biológicas comprovadas cientificamente, é imprescindível a sua caracterização visando o estabelecimento de parâmetros que sirvam para identificação e determinação das propriedades físico-químicas das matérias-primas vegetais, assim como, o desenvolvimento de uma solução extrativa otimizada e padronizada com atividade biológica e constituição química definida.

No banco de teses da CAPES, há registro de 35 trabalhos (teses e ou dissertações) sobre a *C. ferrea*. No entanto, a maioria relacionada com estudos farmacológicos e agrônômicos, porém carecendo de pesquisas relacionadas à padronização de produtos derivados e métodos analíticos para identificação de marcadores químicos e controle de qualidade da matéria-prima vegetal. Dessa forma os estudos existentes fornecem subsídios e destacam essa espécie vegetal como bastante promissora para o desenvolvimento de produtos derivados, considerando a comprovada atividade biológica e viabilidade de cultivo da espécie vegetal.

A utilização de plantas medicinais e o mercado de fitoterápicos estão em contínua expansão, não demonstrando sinais de enfraquecimento. Aliás, o crescimento de sua utilização deixou de restringir-se apenas aos países do terceiro mundo. Na Alemanha, por exemplo, o consumo de fitoterápicos aumentou entre 1970 e 1997 de 4% para 92% dependendo da patologia (BLUMENTHAL, 2000). Tal fato pode ser justificado pelos benefícios desses medicamentos associado ao reduzido efeito colateral, quando elaborado de forma controlada e padronizada de forma a garantir a eficácia e segurança terapêutica.

No entanto, a transformação segura de uma planta medicinal em um produto acabado não é tarefa fácil, uma vez que envolve operações relacionadas à extração das substâncias ativas; garantia de estabilidade das mesmas durante o processo de fabricação e período de armazenamento, mediante tecnologia de produção; determinação da forma farmacêutica mais adequada e obtenção de um produto padronizado (MARTINS, 1998).

A elaboração de um medicamento fitoterápico inicia-se com a obtenção de uma solução extrativa, a qual deve ser padronizada a fim de se manter a maior homogeneidade possível na composição, e para isso, algumas características tecnológicas são relevantes, tais como tamanho de partícula da droga vegetal, seleção do método de extração e do líquido extrator, condições de concentração, processos de purificação, adição de adjuvantes e condições de estocagem, que influenciam inevitavelmente na qualidade do produto acabado (BONATI, 1991).

Considerando que a espécie vegetal *Caesalpinia ferrea*, amplamente utilizada na medicina tradicional, apresenta estudos que indicam promissora atividade hipoglicemiante (UEDA et al., 2001), o presente trabalho é justificado pela carência na literatura de estudos relacionado ao desenvolvimento de produtos padronizados com atividade biológica definida que possam ser utilizados futuramente para a elaboração de fitoterápicos.

Estudos iniciados, por grupo de pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, com as vagens da espécie *C. ferrea* identificaram alguns parâmetros físico-químicos e tecnológicos para o controle de qualidade desta matéria-prima vegetal, bem como o melhor método de extração para alcançar um maior teor de taninos totais e concentração de sólidos solúveis na solução extrativa (dados ainda não publicados). No entanto, maiores estudos devem ser realizados a fim de otimizar o processo extrativo, considerando a relação droga:solvente e o tipo de solvente empregado, a fim de incrementar as propriedades químicas, tecnológicas e atividade biológica da solução extrativa derivada.

2. Objetivos

GERAL:

Padronizar uma solução extrativa de *Caesalpinia ferrea* Mart. com atividade inibitória da enzima α -glucosidase.

ESPECÍFICOS:

- Caracterizar a matéria-prima vegetal;
- Otimizar processo extrativo de *Caesalpinia ferrea*, com auxílio de ferramentas estatísticas;
- Avaliar atividade inibitória da α -glucosidase pelas soluções extrativas de *C. ferrea*.

3. Revisão bibliográfica

3.1. *Caesalpinia ferrea*

Caesalpinia ferrea é uma árvore de grande porte pertencente à família Fabaceae Caesalpinioideae (Fig. 1), a qual compreende uma das maiores famílias dentre as dicotiledôneas, com cerca de 650 gêneros que reúnem mais de 18000 espécies. A subfamília Caesalpinioideae consiste de aproximadamente 150 gêneros e 2200 espécies, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais (CRONQUIST, 1981).

Árvore de grande porte podendo atingir até 30 metros de altura, de tronco linheiro, cilíndrico, com casca lisa com grandes manchas brancas sobre fundo escuro (PENNA, 1946). Tem um crescimento rápido, copa arredondada e folhas pequenas e de persistência caduca. Sua floração ocorre na época de outubro a janeiro e obedece a uma coloração amarela, sua frutificação é do tipo vagem, secos e pesados, que se estendem dos meses de agosto a outubro (LORENZI, 1990).

A triagem fitoquímica preliminar dos extratos hidroalcoólicos da casca do caule e folhas demonstraram a presença de flavonóides, saponinas, taninos, cumarinas, esteróides e fenólicos compostos (GONZALEZ, 2005).



Figura 1: *Caesalpinia ferrea* Martius

3.1.1. Estudos Etnofarmacológicos e Pré-clínicos

A *Caesalpinia ferrea* Martius é uma árvore nativa do Brasil, empregada na medicina popular para o tratamento de afecções bronco-pulmonares e distúrbios gastrintestinais. Experimentos em animais indicaram atividade analgésica, antiinflamatória e antiúlcera para extratos dos frutos e caule da planta (BACCHI, 1996).

Esta espécie vegetal é amplamente utilizada na medicina tradicional para o tratamento de problemas hepáticos, respiratórios e, em especial, distúrbios gastrintestinais e de cicatrização. A literatura registra alguns estudos farmacológicos visando à comprovação dos usos pela medicina popular (NAKAMURA *et al.*, 2002; UEDA *et al.*, 2004; CARVALHO *et al.*, 2006).

Os frutos secos de *Caesalpinia ferrea* Mart. são usados para o tratamento de diabetes (HASHIMOTO, 1996). Na diabetes, o aumento da disponibilidade de glicose resulta na formação de sorbitol através da via poliol em tecidos insulino-sensíveis, retina, nervos e nos rins (KOTANI *et al.*, 1997). Sorbitol acumulado a altos níveis nas células resulta em uma perda da integridade osmótica e dano celular. Esta reação conduz ao desenvolvimento de complicações crônicas do diabetes. Sorbitol é desidrogenado a frutose pela sorbitol desidrogenase, que é convertida em frutose-3-fosfato (Fru-3-P), por uma 3-fosfoquinase, possivelmente no percurso polioxetilado. Fru-3-P é um potente agente de ligação cruzada na glicosilação e uma fonte potencial de 3-deoxiglucosano (3DG). 3DG também é produzido pela reação de Amadori, e pode ser o mais importante contribuinte para a glicosilação *in vivo*. Extratos etanólicos (80%) de *C. ferrea* demonstraram atividade inibitória para aldose redutase, portanto, benefícios no tratamento de Diabetes (UEDA *et al.*, 2001).

Estudos recentes demonstram que a *C. ferrea* apresenta uma molécula chamada paufferol (uma chalcona trimérica fundida a um anel ciclobutano), que tem demonstrado ser um potente inibidor da topoisomerase II. Mostrou também ser uma potente indutora da apoptose na leucemia mielóide humana, contra as células HL 60. Um extrato de acetona do caule de *C. ferrea* apresentou potente atividade

inibitória contra topo II e proliferação celular em células HL60. Portanto, apresenta-se como, um possível, agente anticancerígeno (NOZAKI et al., 2007).

Estudos demonstram que *C. ferrea* induz hipotensão associada à taquicardia em ratos normotensos, porém, em dose de 40 mg/kg, induz transitória bradiarritmias. Além disso, induz a vasodilatação na artéria mesentérica em ratos que parece ser principalmente mediado pelo sistema de abertura dos canais K⁺ de ATP-sensíveis. Esta planta parece ter um potencial de utilização clínica de doenças cardiovasculares, no entanto, mais estudos são necessários para avaliar a sua segurança e a margem terapêutica antes do uso humano (MENEZES et al., 2007).

A raiz tem sido usada como um agente antipirético. Uma infusão de casca do caule foi usada para tratar diarreia e enterocolite (BALBACH, 1972).

Suas ações analgésicas e antiinflamatórias foram comparadas com substâncias que são consideradas normais para essas atividades. Com base nos resultados obtidos, o extrato aquoso bruto de frutos de *C. ferrea* apresentou propriedades antiinflamatórias que apoiam a sua utilização no tratamento popular de algumas doenças (CARVALHO et al., 2006).

O estudo de citotoxicidade foi feito em ratos do tipo Wistar, nos quais foi administrado o extrato aquoso do fruto de *Caesalpinia ferrea* em três concentrações diferentes, 500, 1000 e 1500 mg/kg de extrato e ciclofosfamida 30 mg/Kg. Após 24h da administração, células dos ossos dos ratos foram coletadas e nenhuma alteração significativa foi observada quanto a aberrações cromossômicas ou mutações durante a mitose nos ratos em estudo quando comparados com o grupo controle tratados apenas com água, sendo assim o estudo sugere que o extrato testado não possui citotoxicidade (SOUZA et al., 2006).

3.1.2. Caracterização físico-química

Com o objetivo de determinar parâmetros para o controle de qualidade foram realizados ensaios de caracterização do caule de *C. ferrea*, considerando sua eventual inclusão na Farmacopéia Brasileira. Os resultados demonstraram um teor de cinzas insolúveis em ácido de 0,153% ou 1,53 mg/Kg e 5,31% de cinzas totais. O

teor de água e de substâncias voláteis foi de 5,54%, encontrando-se abaixo dos limites gerais preconizados pela Farmacopéia. O índice de intumescimento foi de 1,5 mL, o que sugere a presença de mucilagem ou goma no material vegetal. Na determinação de taninos, através da determinação de polifenóis totais (PT = 0,0764%) e polifenóis não-absorventes (PNA = 0,0556%), foram encontrados baixos teores de taninos totais (FRASSON, 2003).

3.1.3. Caracterização de Matéria Prima Vegetal (MPV)

A primeira etapa para a boa qualidade de uma MPV é garantir a idoneidade da espécie vegetal desejada. Nesse sentido, é essencial a obtenção, logo após a coleta, de uma exsicata para identificação botânica do material. Além disso, a coleta deve ser feita com cuidado, evitando a retirada de partes do vegetal afetadas por doenças, parasitas e também materiais estranhos, tais como outras plantas ou mesmo partes da própria planta que não sejam de interesse para a investigação, uma vez que esses materiais irão afetar a composição química da MPV e favorecer a proliferação de microrganismos (MATTOS, 1988).

Logo após a coleta, o material deve ser submetido à secagem que tem por finalidade a retirada de água e, com isso, impedir reações de hidrólise e de crescimento microbiano. A umidade residual dependerá do tipo de órgão que constitui o material vegetal (BACCHI, 1996). De forma geral, o ideal é que o teor de umidade da droga vegetal esteja abaixo de 14 % (LIST, SCHIMDT, 1989).

A operação de secagem caracteriza-se pela exposição do material a temperaturas relativamente baixas, normalmente inferiores a 60 °C e a longo tempo de contato, geralmente sete dias. Tal procedimento visa à manutenção dos constituintes químicos presentes no vegetal. A secagem será um tanto mais rápida, quanto mais dividido estiver o material vegetal a secar, pois, deste modo, oferecerá uma maior superfície de evaporação e, pelo mesmo motivo, o material deverá ser disposto em camadas finas. A secagem pode ser feita em temperatura ambiente ou com utilização de ar quente, em estufas com circulação de ar. Preferencialmente, deverá ser feita a sombra, já que a irradiação solar poderá causar uma modificação

em alguns constituintes do vegetal (MATTOS, 1988).

A moagem tem por finalidade reduzir, mecanicamente, o material vegetal a fragmentos de pequenas dimensões, preparando-o assim para a próxima etapa, a extração. O aumento da área de contato entre o material sólido e o líquido extrator torna mais eficiente a operação. A escolha pelas dimensões mais apropriadas depende também do órgão em questão, quanto mais sólido for, maior será o grau de divisão necessário (SIMÕES, 1999).

O conteúdo de umidade é um dos fatores mais importantes que afetam a qualidade de grãos e sementes. Uma vez que favorece a atividade de insetos e proliferação de fungos, durante o armazenamento. A ação prejudicial destas pragas destrutivas dos grãos e sementes aumenta à medida que o conteúdo de umidade também aumenta. Além disso, os grãos são vendidos tendo o peso como base, do qual a água faz parte (LIST, SCHIMDT, 1989; SIMÕES, 1999).

É desejável determinar o conteúdo de umidade de um produto em diferentes situações, por exemplo, na colheita, durante a secagem e durante as operações de compra e venda, quando o risco de adulteração com água pode estar presente, se as diferenças de preço estiverem relacionadas com o peso. Vários fatores, além do conteúdo de umidade, têm efeitos sobre a estabilidade da matéria-prima durante o armazenamento, no entanto o conteúdo de umidade é um dos principais fatores que governa a manutenção da qualidade dos grãos (LIST; SCHIMDT, 1989).

Outra operação importante para se caracterizar uma MPV é a determinação de cinza. Resíduo por incineração ou cinzas é o nome dado ao resíduo obtido por aquecimento de um produto em temperatura próxima a 550-570°C. Nem sempre este resíduo determina toda substância inorgânica presente na amostra, pois alguns sais podem sofrer redução ou volatilização nesse aquecimento (COSTA, 2000).

A análise granulométrica da MPV fornece a distribuição percentual, em peso, dos tamanhos dos grãos que constituem a matéria-prima. Essa caracterização é essencial para os processos físicos voltados para a extração das substâncias químicas de interesse. Ou seja, a análise granulométrica permite

identificar o tamanho e a distribuição dos grãos, o que influenciará diretamente na eficiência do processo extrativo (LIST; SCHIMDT, 1989).

A multiplicidade dos constituintes químicos presentes nas plantas associada à ocorrência de pequenas quantidades de compostos interessantes, juntamente com grandes quantidades de compostos conhecidos e comuns em várias outras espécies, dificulta a identificação dos princípios imediatos desejados. Algumas dessas dificuldades estão condicionadas à própria natureza da planta como ser vivo em constante dinamismo químico, outras, com o grau de precisão das técnicas utilizadas pelo pesquisador. No primeiro caso, estão as variações de composição devido à influência das mudanças estacionais, do clima, do solo, e algumas vezes até na duração da iluminação solar, como é o caso da maioria dos glicosídeos, cuja concentração nas folhas aumenta durante o dia com a fotossíntese e diminui durante a noite ou, por exemplo, o caso de constituintes hidrossolúveis que podem ser retirados das folhas pela chuva, o que poderia falsear um resultado em uma planta coletada em tais condições; ou ainda, a presença de compostos que apresentam propriedades físicas muito próximas, homólogos e isômeros, como muitas vezes ocorre em misturas de triterpenóis e seus derivados que necessitam de métodos analíticos muito sofisticados para sua identificação. Por todas essas razões torna-se praticamente impossível um mapeamento completo e exato dos constituintes fitoquímicos de uma planta (MATTOS, 1988).

4. Metodologia

4.1. Material Vegetal

Vagens, sem as sementes, de *Caesalpinia ferrea* obtidas de cultivo experimental do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônica (INPA).

4.2. Tratamento do Material Vegetal e Obtenção da Matéria-Prima vegetal

O material vegetal, após coleta, foi colocado para secar a temperatura ambiente por 48 horas, a sombra, em lugar seco e arejado. Após prévia secagem, o material vegetal foi selecionado manualmente, sendo separadas as vagens das sementes, para tratamento individual das vagens. Após a seleção, as vagens foram pesadas e amostras retiradas para a análise do teor de umidade. Todo o material com valor de umidade acima de 12% foi submetido à secagem em estufa de ar circulante, à temperatura de $45\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, até estabilização da umidade residual. Após a secagem, as vagens foram submetidas à moagem em moinho de facas. O material cominuído resultante foi misturado, constituindo assim a matéria-prima vegetal.

4.3. Caracterização Matéria-Prima vegetal

4.3.1. Determinação de perda por dessecação (F. Bras. IV,1988)

Cerca de 0,5 g, exatamente pesados, da amostra foram colocados em pesa-filtro, previamente tarado, e levados para estufa a $105\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ 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. Depois disto foi calculada a diferença de peso entre a amostra inicial e a final determinando-se a perda por dessecação. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.3.2. Análise granulométrica por tamisação (VOIGT, 2000)

Cerca de 50 g da matéria-prima vegetal, exatamente pesados, foram submetidos à passagem através de tamises com abertura de malha de 1,00; 0,800; 0,710; 0,600; 0,500; 0,400; 0,330 e 0,250 mm. A tamisação foi realizada, em tamisador, a 60 vibrações por segundo durante 15 min. As frações retidas nos tamises e coletor foram pesadas e os dados analisados por método gráfico. Foram construídas curvas de retenção e passagem, e histograma de distribuição, a fim de se obter o diâmetro médio de partículas do pó. Os resultados expressam a média de três determinações.

4.3.3. Teor de extrativos (BUNDESVEREINIGUNG, 1986)

Cerca de 1 g da matéria-prima vegetal foi colocada em erlemeyer adicionado de 100 mL de água destilada, pesado o conjunto, e submetido à extração por decocção durante 10 minutos. Após resfriamento, pesou-se novamente o conjunto reconstitui-se a massa inicial com água destilada, filtrou-se desprezando os primeiros 20 mL do filtrado. Cerca de 20 g do filtrado, pesados, foram colocados em pesa-filtro, previamente tarado, e evaporados à secura em banho-maria, com agitação ocasional. Após a evaporação, o pesa-filtro, contendo a amostra, foi levado à estufa 105 °C ± 2 °C até peso constante, calculando-se o teor de sólidos. O resultado foi expresso pela média de três determinações e o teor extrativo foi calculado segundo a equação abaixo:

$$TE = (gxFDx100)/(m-pd)$$

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

4.4. Desenvolvimento e otimização da solução extrativa

A solução extrativa foi desenvolvida a partir de um planejamento fatorial 3², com quatro pontos centrais, onde foram avaliadas as variáveis independentes relação droga:solvente % (m/v) e concentração etanólica % sobre as variáveis

dependentes resíduo seco (g%) e teor de taninos totais (g%) (tabela 1). As soluções extrativas foram obtidas através de decocção, sob refluxo, por um período de extração de 15 minutos.

Fator A (codificado)	Fator B (codificado)	Relação droga:solvente % (m/v)	Concentração de etanol % (v/v)
-1	-1	5,0	00,0
-1	0	5,0	50,0
-1	1	5,0	100,0
0	-1	7,5	00,0
0	0	7,5	50,0
0	1	7,5	100,0
1	-1	10,0	00,0
1	0	10,0	50,0
1	1	10,0	100,0
0	0	7,5	50,0
0	0	7,5	50,0
0	0	7,5	50,0
0	0	7,5	50,0

Tabela 1: matriz do planejamento fatorial 3²

Todas as soluções extrativas foram secas (extrato seco) através de secagem por aspensão em equipamento *Spray-dry* (modelo MSD 1.0 Labmaq).

4.4.1. Determinação de resíduo seco (BUNDESVEREINIGUNG, 1986)

Foi realizado através de método gravimétrico, com auxílio de banho de água para evaporação do solvente, em estufa a temperatura de 105 °C, até peso constante. A análise foi realizada em triplicata.

Alíquota de 20,0 mL da solução extrativa foi exatamente pesada, diretamente, em pesa-filtro, previamente tarado, e evaporada até secura em banho de água, sob agitação ocasional. Após evaporação da solução extrativa, o pesa-filtro contendo o resíduo foi levado à estufa 105 °C ± 2 °C até peso constante. O resultado foi expresso pela média e desvio-padrão de três determinações.

4.4.2. Determinação do teor de taninos totais (SOARES, 2002)

A determinação quantitativa do teor de taninos totais foi realizada diretamente pela diferença entre os teores de polifenóis totais e fração não-tanante presentes na solução extrativa. Os doseamentos foram realizados através de medição direta em espectrofotômetro de varredura considerando o máximo de absorção da solução extrativa, detectada através de varredura. Foi utilizada caseína como agente precipitante dos taninos e ácido gálico como substância de referência. Foram utilizadas as equações abaixo para a determinação do teor de taninos totais.

$$PFT = \frac{A1 \cdot FD}{A_{1cm}^{ \% } \cdot (m - p)} \quad FNT = \frac{A2 \cdot FD}{A_{1cm}^{ \% } \cdot (m - p)}$$

$$TT = PFT - FNT$$

onde: PFT = polifenóis totais (g%); FNT = fração não-tanante (g%); TT = taninos totais (g%); A1 = absorbância de polifenóis totais; A2 = absorbância da fração não-tanante; FD = fator de diluição; m = massa de matéria-prima vegetal (g); p = perda por dessecação de matéria-prima vegetal (g); $A_{1cm}^{ \% }$ = coeficiente de absorção específica do ácido gálico.

- Determinação do coeficiente de extinção molar ($A_{1cm}^{\%}$) do padrão de ácido gálico

Foi determinado a partir da curva de calibração do ácido gálico. A absorção foi medida no mesmo comprimento de onda máximo da solução extrativa, determinada através de ensaio de varredura (264 nm). O cálculo do coeficiente de extinção molar foi realizado de acordo com a equação abaixo:

$$A_{1cm}^{\%} = (Ax10)/(cxb)$$

onde: c= concentração da solução ($\mu\text{g/L}$), A= absorbância (U.A), b= caminho óptico (cm)

- Curva de calibração do ácido gálico

A curva de calibração foi obtida através da realização de leitura direta de soluções aquosas de ácido gálico nas concentrações 4,8; 6,4; 8,0; 9,6 e 12,8 e 16 $\mu\text{g/mL}$ em comprimento de onda de 264 nm. As absorbâncias foram determinadas utilizando água destilada como branco.

- Determinação de polifenóis totais (PT)

Preparou-se uma solução-mãe utilizando-se 0,01g de extrato seco diluído em 100 mL de água, em seguida transferiu-se uma alíquota de 5 mL dessa solução para um balão de 25 mL de completou-se o volume com água destilada, então realizou-se a leitura da absorbância em comprimento de onda a 264 nm. O ensaio foi realizado em triplicata.

- Determinação da fração não-tanante (FNT)

150 mg de caseína foi adicionado a 10,0 mL da solução-mãe. A mistura foi agitada em agitador magnético, durante uma hora e, em seguida, filtrada com papel filtro. 5,0 mL do filtrado foi transferido para um balão volumétrico de 25 mL e o

volume completado com água destilada, sendo realizada leitura da absorbância em comprimento de onda a 264 nm. O ensaio foi realizado em triplicata.

- Determinação do teor de taninos totais (TT)

Os teores de polifenóis totais, fração não-tanante e de taninos totais foram calculados através das equações abaixo.

$$PFT = \frac{A1 \cdot FD}{A_{1cm}^{1\%} \cdot (m - p)} \qquad FNT = \frac{A2 \cdot FD}{A_{1cm}^{1\%} \cdot (m - p)}$$

$$TT = PFT - FNT$$

Onde: PFT = polifenóis totais (g%); FNT = fração não-tanante (g%); TT = taninos totais; A1 = absorbância de polifenóis totais; A2 = absorbância da fração não-tanante; FD = fator de diluição; m = massa de matéria-prima vegetal (g); p = perda por dessecação de matéria-prima vegetal (g); $A_{1cm}^{1\%}$ = coeficiente de absorção específica do ácido gálico.

4.4.3. Avaliação da inibição da atividade de enzima α -glucosidase

Preparo dos reagentes:

- Tampão Fosfato (10mM) pH 6,9: Pesou-se 1,36 g de fosfato de potássio e dissolveu-se em 1000 mL de água mili-Q. Ajustou-se o pH para 6,9 adicionando-se HCl ou NaOH.
- Solução da enzima: Pesou-se 0,002 g da enzima e dissolveu-se em 20 mL do tampão.
- Reagente de cor: Pesou-se 0,1510 g do reagente sigma N1377 e dissolveu-se em 100 mL do tampão.

Ensaio: Preparou-se as diluições dos extratos secos começando com a concentração de 1mg/mL. Adicionou-se 20 µL das diluições nos poços da placa (em triplicata). Fez-se controle. Adicionou-se 180 µL (com pipeta automática) da solução de enzima diluída 1:10 com o tampão. Incubou-se a 37°C por 2 minutos. Adicionou-se 150 µL do reagente de cor. Leu-se a placa imediatamente no método glucosidase no leitor ELISA (anotou-se os valores de A1). Leu-se novamente a absorbância após 15 minutos de incubação a 37°C na estufa (anotou-se os valores A2). Os cálculos foram realizados através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = 100 - [(A2 \text{ da amostra} - A1)/(A2 \text{ do controle} - A1 \text{ do controle})] * 100$$

4.4.4. Análise Estatística

Os resultados dos experimentos foram expressos através de média aritmética e desvio padrão. Os resultados do planejamento fatorial foram analisados através de ANOVA multivariada (MONTGOMERY, 1991). A análise estatística foi realizada com o programa Statistica v. 6.0®.

5. Resultados e discussão

5.1. Caracterização da Matéria-Prima Vegetal (MPV)

Para caracterização da MPV foram analisados alguns parâmetros físico-químicos: o teor de umidade, pois o seu excesso no material vegetal pode promover o crescimento microbiano, a presença de fungos ou insetos e a deterioração de substâncias por hidrólise; o teor extrativo que auxilia na verificação da quantidade de sólidos solúveis presente na droga vegetal (WHO, 1998; LIST e SCHMIDT, 1998); e a determinação do diâmetro médio de partícula, importante para garantir a reprodutibilidade do processo extrativo, uma vez que a superfície de contato entre o líquido extrator e a droga vegetal influencia na extração (LIST e SCHMIDT, 1989).

Os resultados para caracterização encontram-se na tabela abaixo.

Ensaio	Resultado Atual⁽¹⁾ X ± s	MARINHO (2008)⁽²⁾ X ± s
PD (g%)	11,38 ± 0,16762	12,08 ± 0,090
TE (g%)	38,71 ± 0,20502	34,37 ± 0,460
Dm (µm)	550,2 ± 9,2	559,9

PD= perda por dessecação; TE = teor extrativo; Dm = diâmetro médio. ⁽¹⁾coleta em 2009; ⁽²⁾coleta em 2007.

Tabela 2: Caracterização da matéria-prima vegetal

MARINHO et al (2008) verificou resultados de caracterização da MPV diferentes entre si, dependendo da origem da mesma, ou seja, do local onde o material foi coletado. No entanto, o presente trabalho demonstra que a MPV coletada em anos diferentes, mas com a mesma origem apresentou resultados muito semelhantes, o que pode nortear uma futura especificação para o controle de qualidade da droga vegetal.

Pode ser observado que a amostra apresentou perda por dessecação abaixo de 11,5%, indicando que a operação de secagem foi eficiente em eliminar o conteúdo de umidade e, também, que a umidade residual está apropriada para o armazenamento, ou seja, abaixo de 14%, evitando, assim, o desenvolvimento de microorganismo que possam comprometer a estabilidade e contaminar os produtos elaborados a partir da MPV (LIST e SCHMIDT, 1989).

O ensaio de teor extrativo descreve a quantidade de sólidos solúvel presentes na matéria-prima vegetal e, também, a eficiência da água em extrair as substâncias presentes nas células vegetais (LIST e SCMIDT, 1989). Encontrando-se um teor extrativo significativo de 38,71% para MPV estudada.

O ensaio de análise granulométrica é importante para identificação da distribuição de tamanho de partícula da matéria-prima vegetal, uma vez que a granulometria da matéria-prima é um dos fatores de grande influência no processo extrativo, exigindo assim, uma padronização (LIST e SCMIDT, 1989; SIMÕES et al., 1999). A padronização da granulometria das matérias-primas vegetais parece ser interessante do ponto de vista tecnológico, uma vez que partículas muito grandes e muito reduzidas costumam diminuir a eficiência do processo extrativo (LIST e SCHMIDT, 1989), sendo assim, um diâmetro médio em torno de 500 μm é bastante favorável para a extração dos componentes químicos.

Na Figura 2 está descrito o histograma de distribuição de distribuição granulométrica, demonstrando uma ampla faixa de distribuição granulométrica onde, aproximadamente 33% das partículas encontram-se na faixa de menor tamanho, ou seja, menor que 250 μm .

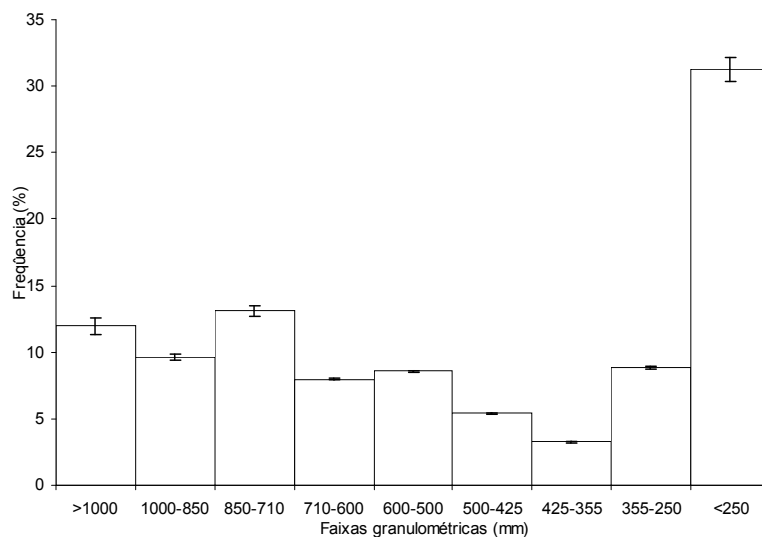


Figura 2: Histograma de distribuição granulométrica

Através do gráfico de retenção e passagem (Figura 3), obtida a partir da distribuição granulométrica dos pós, é possível determinar o tamanho médio das partículas que foi de 550,2 μm , apresentando-se como um tamanho adequado para o processo extrativo, uma vez que a superfície de contato entre o líquido extrator e a droga vegetal influencia no processo extrativo.

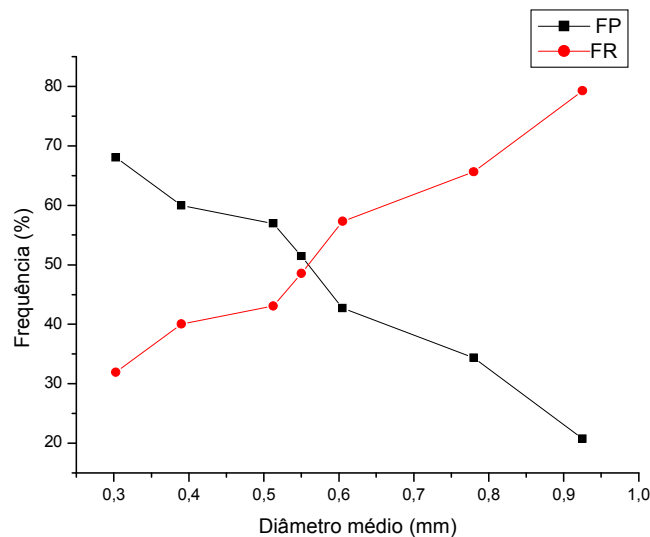


Figura 3: Curva de retenção e passagem da matéria-prima vegetal

5.2. Resíduo seco

O resíduo seco é um ensaio onde se determina a quantidade de sólidos solúveis extraída da droga vegetal pelo solvente, o qual depois é utilizado para avaliação do rendimento operacional num processo de secagem da solução extrativa. Na tabela 3, encontram-se os valores de resíduo seco das soluções extrativas obtidas seguindo o planejamento fatorial 2^3 .

De acordo com a Tabela 3, pode-se observar que a solução preparada utilizando-se 10% de matéria prima vegetal com 50% de etanol, apresentou o melhor resíduo seco.

Droga:Solvente % (m/v)	Concentração de etanol % (v/v)	RS% X ± s
5	0	1,57 ± 0,03
5	50	2,16 ± 0,02
5	100	0,96± 0,02
7,5	0	2,32 ± 0,04
7,5	50	2,80 ± 0,77
7,5	100	1,37 ± 0,04
10	0	2,99 ± 0,01
10	50	4,00 ± 0,01
10	100	1,96 ± 0,02
7,5	50	2,70 ± 0,02
7,5	50	2,55 ± 0,00
7,5	50	2,43 ± 0,28
7,5	50	2,43 ± 0,02

Tabela 3: Resíduo seco (RS%) nas diferentes soluções extrativas

A análise estatística dos resultados (Tabela 4), ANOVA, demonstrou que, para a MPV estudada, tanto a relação droga:solvente como a concentração de etanol são fatores estatisticamente significativos ($p < 0,000$) sobre o teor dos constituintes químicos (resíduo seco) das soluções extrativas obtidas, na figura 4.

O gráfico de Pareto (figura 4) demonstra os efeitos estimados dos fatores principais e interação. Pode ser visualizado que, tanto a proporção de droga de vegetal quanto a concentração de etanol tem magnitudes de efeitos muito

semelhantes sobre o resíduo seco, no entanto, a proporção de etanol tem um efeito negativo. Além disso, pode ser verificado que apenas as interações linear x linear e quadrática x linear não foram significativas.

Fatores	SQ	gl	MQ	F	p
A = Droga % (L)	2,982232	1	2,982232	216,4448	0,000124**
A = Droga % (Q)	0,127747	1	0,127747	9,2716	0,038217*
B = Etanol % (L)	1,152561	1	1,152561	83,6507	0,000793**
B = Etanol % (Q)	2,669671	1	2,669671	193,7597	0,000154**
AxB (L x L)	0,037696	1	0,037696	2,7359	0,173460
AxB (L x Q)	0,128721	1	0,128721	9,3423	0,037786*
AxB (Q x L)	0,004578	1	0,004578	0,3323	0,595201
AxB (Q x Q)	0,164212	1	0,164212	11,9182	0,026000*
Erro	0,055113	4	0,013778		
Total	7,066152	12			

L = linear, Q = quadrático. *significativo $\alpha < 0,05$; **significativo $\alpha < 0,01$

Tabela 4: Análise de Variância (ANOVA) para o resíduo seco das soluções extrativas

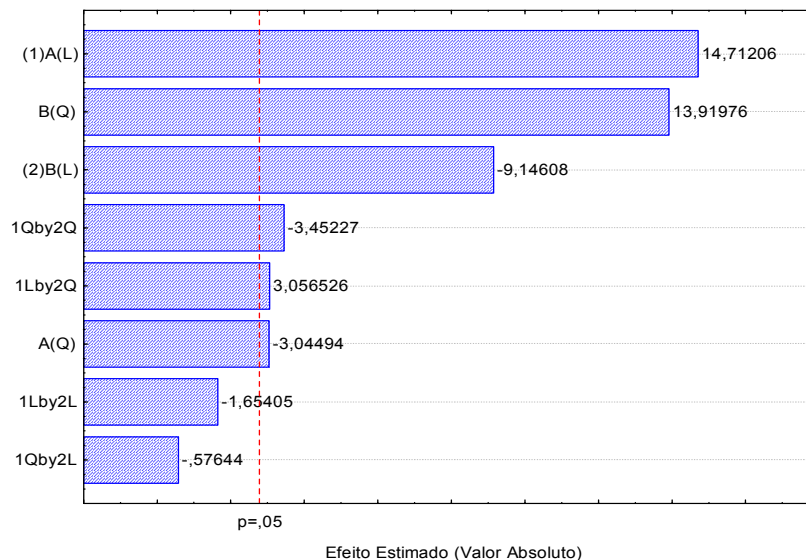


Figura 4: Gráfico de Pareto para resíduo seco

O gráfico de Pareto (figura 4) demonstra que a concentração de etanol tem uma maior influência quadrática sobre o resíduo seco, onde a melhor proporção foi de 50%. Com relação à proporção de droga vegetal, verificou-se uma maior influência linear, onde o resíduo seco aumenta com o aumento da proporção da droga vegetal.

De acordo com o gráfico de superfície de resposta (figura 5), pode-se verificar que a concentração de etanol intermediária (50%) proporcionou maior resíduo seco, este que aumenta de acordo com o aumento da proporção de droga vegetal, efeito que não pode ser verificado em relação à concentração de etanol, visto que as soluções aquosas apresentaram resíduo seco razoável e as completamente etanólicas apresentaram o menor teor de resíduo seco.

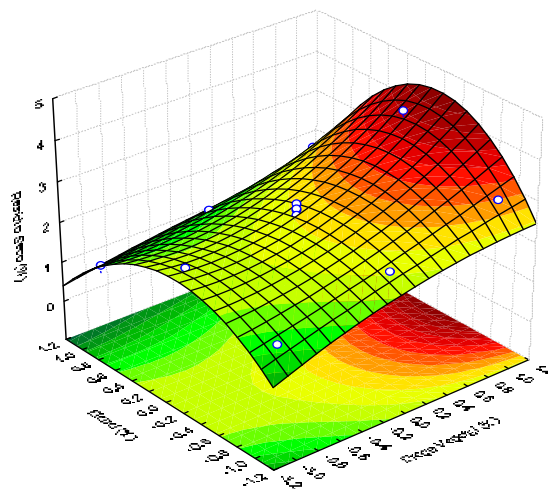


Figura 5: Superfície de resposta para o resíduo seco

O modelo matemático proposto pela análise estatística é capaz de descrever 99,22 % dos experimentos ($r = 0,9922$), sendo o seguinte:

$$RS = 2,53 + 0,91 \cdot D + 0,55 \cdot D^2 - 0,48 \cdot A - 0,72 \cdot A^2 - 0,097 \cdot D \cdot A - 0,31 \cdot D \cdot A^2 + 0,058 \cdot D^2 \cdot A - 0,48 \cdot D^2 \cdot A^2$$

Onde: RS = resíduo seco; D = proporção de droga vegetal % e A = concentração de etanol %

5.3. Curva de calibração

A curva de calibração, obtida a fim de verificar a viabilidade da utilização do ácido gálico como uma substância de referência adequada para a quantificação dos taninos, apresentou linearidade (Figura 6). Os parâmetros de regressão estão descritos na tabela 5.

Parâmetros da regressão	$\lambda = 264 \text{ nm}$
Interseção	0,055
Inclinação	0,015
R^2	0,999*

*significativo $p < 0,000$

Tabela 5: Parâmetros da curva de calibração do ácido gálico.

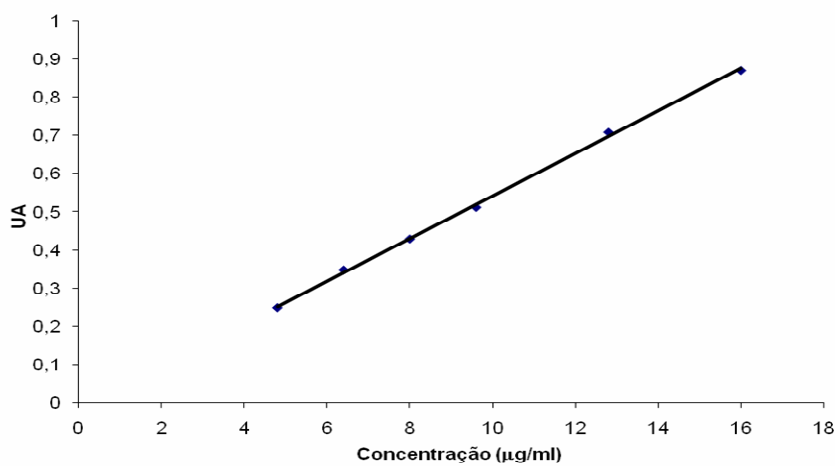


Figura 6: Curva de calibração do ácido gálico

5.4. Taninos totais

De acordo com a metodologia utilizada, para determinar o teor de taninos totais, é necessário primeiramente determinar a quantidade de polifenóis totais, cujos resultados estão expressos na tabela 10. Os elevados teores encontrados demonstram que além de taninos a espécie vegetal estudada possui outros componentes fenólicos, podendo estes terem influência em sua ação terapêutica.

Extrato seco	Polifenóis totais (g%)
	X ± s
5% m/V, 0% etanol	36,55 ± 0,62
5% m/V, 50% etanol	40,49 ± 1,81
5% m/V, 100% etanol	51,15 ± 0,44
7,5% m/V, 0% etanol	35,19 ± 0,59
7,5% m/V, 50% etanol	47,32 ± 3,28
7,5% m/V, 100% etanol	52,16 ± 1,20
10% m/V, 0% etanol	38,67 ± 1,31
10% m/V, 50% etanol	43,05 ± 0,81
10% m/V, 100% etanol	50,71 ± 1,18
7,5% m/V, 50% etanol	50,27 ± 1,62
7,5% m/V, 50% etanol	49,09 ± 1,68
7,5% m/V, 50% etanol	49,20 ± 0,85
7,5% m/V, 50% etanol	50,08 ± 0,80

Tabela 6: Teor de polifenóis totais

Na tabela 7 estão descritos os teores de taninos totais obtidos dos extratos secos preparados:

Extrato seco	Taninos totais (g%)
	X ± s
5% m/V, 0% etanol	5,38 ± 1,82
5% m/V, 50% etanol	16,04 ± 0,84
5% m/V, 100% etanol	24,42 ± 0,47
7,5% m/V, 0% etanol	11,05 ± 0,91
7,5% m/V, 50% etanol	22,79 ± 2,82
7,5% m/V, 100% etanol	22,64 ± 1,72
10% m/V, 0% etanol	12,64 ± 1,05
10% m/V, 50% etanol	17,37 ± 0,13
10% m/V, 100% etanol	17,56± 1,82
7,5% m/V, 50% etanol	21,18± 0,80
7,5% m/V, 50% etanol	20,09 ± 0,64
7,5% m/V, 50% etanol	19,36 ± 0,46
7,5% m/V, 50% etanol	19,36 ± 0,11

Tabela 7: Teor de Taninos totais

A ANOVA dos resultados (Tabela 8) demonstrou que a proporção de droga vegetal e a concentração de etanol são fatores significantes para o teor de taninos nos extratos secos, assim como a interação linear dos dois fatores.

O gráfico de Pareto (Figura 7) demonstra que a concentração de etanol é o fator de maior significância sobre o teor de taninos totais nos extratos, enquanto que a proporção de droga vegetal tem um pequeno efeito quadrático.

Os resultados revelam que o líquido extrator etanol foi mais eficiente na extração dos taninos, uma vez que as soluções extrativas preparadas com etanol resultaram em maior teor de taninos, variando de 17 a 24 g% (Figura 8).

Fatores	SQ	gl	MQ	F	p
A = Droga % (L)	0,499	1	0,499	0,3938	0,574813
A = Droga % (Q)	18,107	1	18,107	14,2767	0,032478*
B = Etanol % (L)	210,637	1	210,637	166,079	0,001008**
B = Etanol % (Q)	16,358	1	16,358	12,8978	0,036988*
AxB (L x L)	49,907	1	49,907	39,3498	0,008179**
AxB (L x Q)	0,429	1	0,429	0,3382	0,601703
AxB (Q x L)	0,049	1	0,049	0,0391	0,855818
AxB (Q x Q)	4,911	1	4,911	3,8718	0,143771
Erro	3,805	3	1,268		
Total	348,685	11			

L = linear, Q = quadrático. *significativo $\alpha < 0,05$; **significativo $\alpha < 0,01$

Tabela 8: Análise de Variância (ANOVA) para o teor de taninos nos extratos secos

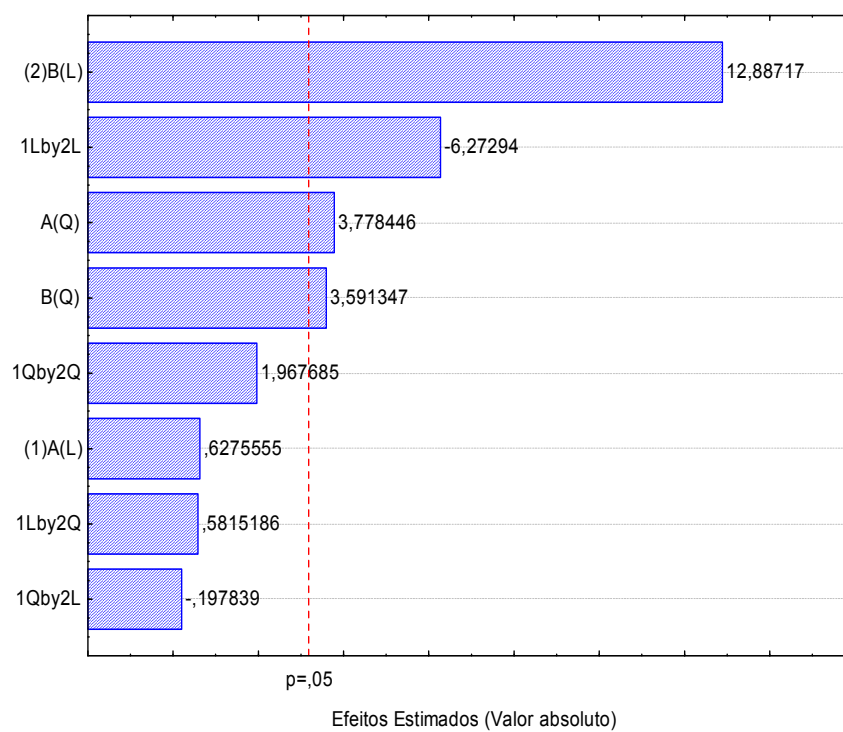


Figura 7: Gráfico de Pareto para teor de taninos totais

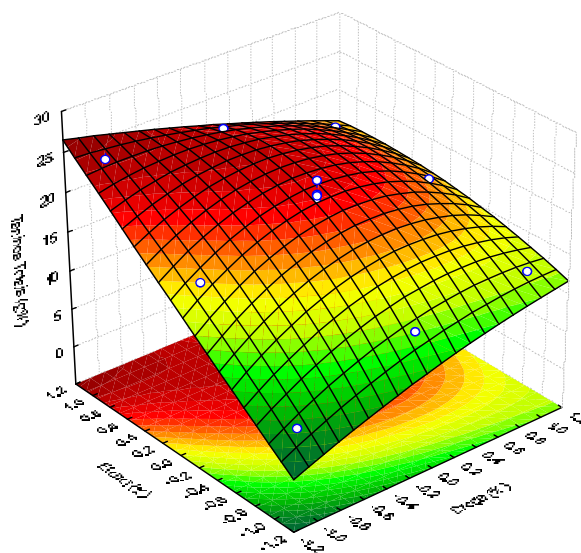


Figura 8: superfície de resposta para o teor de taninos totais.

O modelo matemático proposto, para o teor de taninos totais, é capaz de descrever 98,90% dos experimentos ($r = 0,9890$), sendo a seguinte equação:

$$TT = 21,27 + 0,67 \cdot D - 4,55 \cdot D^2 + 5,80 \cdot A - 4,42 \cdot A^2 - 3,53 \cdot D \cdot A - 0,57 \cdot D \cdot A^2 + 0,2 \cdot D^2 \cdot A + 2,71 \cdot D^2 \cdot A^2$$

Onde: TT – taninos totais; D – proporção de droga vegetal e A – concentração de etanol

5.5. Avaliação da inibição da atividade de enzima α -glucosidase

Na figura 9 encontra-se o resultado do teste “in vitro” de avaliação de inibição da alfa-glucosidase, verificando-se o percentual de inibição pelos extratos secos obtidos, com resultados promissores, visto que alguns extratos inibiram mais de 90% da atividade da α -glucosidase.

Neste sentido, vale ressaltar que o extrato obtido a partir da proporção de 7,5% de droga vegetal com 50% de etanol como solvente, apresentou melhor atividade inibitória.

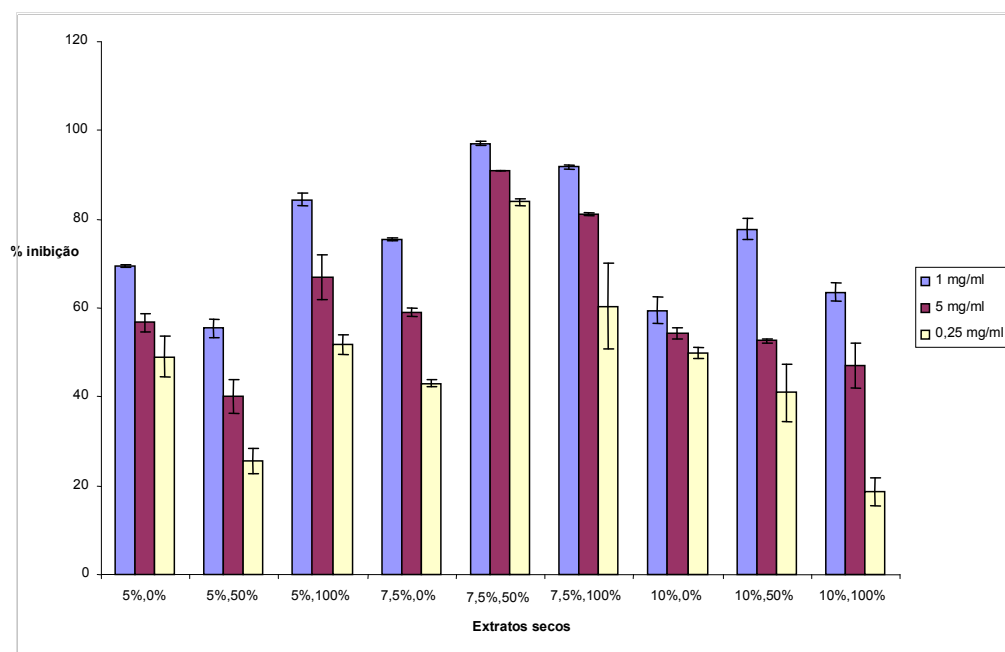


Figura 9: Percentual de inibição dos extratos

Através de diluições sucessivas dos extratos, foi possível calcular a concentração inibitória de 50% da atividade da enzima (Figura 10), verificando também que, o extrato obtido com 7,5% de droga vegetal e 50% de etanol apresentou menor concentração inibitória, sendo, portanto, o melhor para inibir a atividade da α -glucosidase.

Esses resultados de inibição enzimática indicam que as soluções extrativas de *Caesalpinia ferrea* podem viabilizar um produto natural para o tratamento da hiperglicemia. No entanto, estudos “in vivo” devem ser realizados a fim de confirmar os achados “in vitro”.

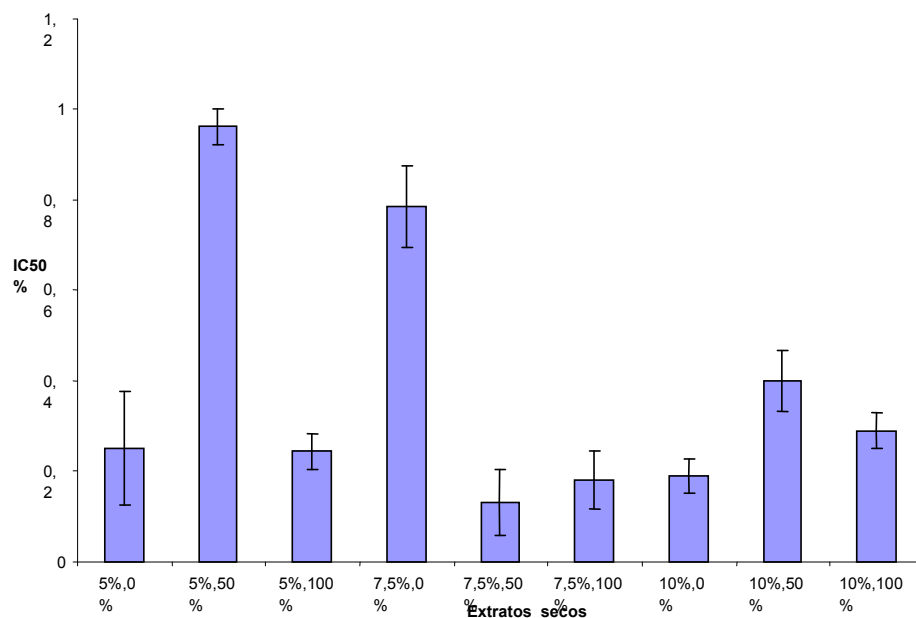


Figura 10: Concentração do extrato inibitória de 50% da atividade da enzima.

6. Conclusão

Através da caracterização da matéria-prima vegetal verifica-se que os parâmetros encontrados podem ser utilizados no estabelecimento de critérios químicos e tecnológicos no controle de qualidade para esta espécie vegetal, através do teor de umidade, teor extrativo, taninos totais e diâmetro médio das partículas.

Os parâmetros extrativos estudados (relação droga:solvente e concentração de etanol) revelaram-se bastante influentes na elaboração da solução extrativa padronizada, visando atividade inibitória da α -glucosidase cujos valores de caracterização podem ser utilizados como critérios de referência para futuras análises.

Observa-se que os melhores parâmetros extrativos visando a atividade inibitória da α -glucosidase foram: relação droga:solvente de 7,5% e concentração etanólica de 50% que apresentaram resultados bastante satisfatórios, chegando a inibir cerca de 90% a atividade da enzima podendo vir a ser potentes hipoglicemiantes a serem utilizados no tratamento ou prevenção do diabetes.

7. Referências Bibliográficas

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.

BACCHI, E.M.; SERTIE, J.A.A.; VILLA. N., KATZ. H. Antiulcer action and toxicity of styrax-camporum and *Caesalpinia ferrea*. *Planta Medica*, v. 61, n.3, p. 204-207, 1995.

BALBACH, A. (1972) *As Plantas que Curare*. Três Press, São Paulo, pp. 302-303.

BONATI, A. How and Why Should we Standardize Phytopharmaceutical Drugs for Clinical Validation? *Journal of Ethnopharmacology*, v.32, p. 195-197, 1991.

BLUMENTHAL, M. The complete German commission and monographs. Therapeutic guide to herbal medicines. Austin, Texas, *Integrative Medicine Communications*. 2000.

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

CARVALHO, J.C.T.; TEIXEIRA, J.S.R.M; PERGENTINO, J.C.; SOUZA C.; JAIRO K. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 53, p.175-178, 2006.

COSTA, A. F., *Farmacognosia experimental*. volume III, ed. *Fundação Calouste Gulbenkian*. 3ª edição, 2002.

CRONQUIST, A. *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia University Press, New York, 1981.

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

FARIAS, M.R.S.; SCHENKEL, E.P.; BERGOLD, A.M.; PETROVICK, P.R. O problema da qualidade dos fitoterápicos. *Caderno de Farmácia*, v. 1, n. 2, p. 73-82, 1985.

FRASSON, A. P. Z; BITTENCOURT, A. C; HEINZMANN, B. M. Caracterização físico-química e biológica do caule de *Caesalpinia ferrea* Martius. *Revista brasileira de Farmacognosia*, V. 13, n. 1, p. 35 – 39, jan – jun. 2003.

GONZALEZ, F. G.: *Estudo farmacognóstico e farmacológico de Caesalpinia ferrea Martius*. Tese. Universidade de São Paulo – USP, 2005.

HASHIMOTO, G. (ed.): *Illustrated Cyclopedia of Brazilian Medicinal Plants*. Aboc-Sha, Kamakura, p. 646, 1996.

KOTANI, T., NAGAKI, Y., ISHII, A., KONISHI, Y., YAGO, H., SUEHIRO, S., KUKADO, N., and OKAMOTO, K. Highly selective aldose reductase inhibitors. 3. Structural diversity of 3-(arylmethyl)- 2,4,5-trioxoimidazolidine-1-acetic acids. *Journal Medical Chemical*, v. 40: 684–694, 1997.

LIST, P.H.; SCHIMDT, P.C. *Phytopharmaceutical Technology*. Boca Raton: CRC, 1989.

LORENZI, H. *Árvores Brasileiras*. vols. 1 e 2, Instituto Plantarum, 1990.

MARINHO, J.V.N.; MENEZES, M.P.; LIMA, E.S; SOUZA, L.A.G.; SOARES, L.A.L.; WANDERLEY, A.G.; DE SOUZA, T.P. *Technological characteristics of fruits of Caesalpinia ferrea as medicinal raw material*. Trabalho de PIBIC – 2008.

MARTINS, A.G. *Influência de fatores tecnológicos na avaliação analítica e farmacológica de extratos secos de Maytenus ilicifolia Martius ex Reiss*. Porto Alegre: Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 1998. Dissertação de Mestrado.

MATOS, F. J. F. *Introdução à fitoquímica experimental*, EUFC, 1988.

MENEZES, I. A.C.; MOREIRA, I. J.A.; CARVALHO, A. A.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, M. R.V. Cardiovascular effects of the aqueous extract from *Caesalpinia ferrea*: Involvement of ATP-sensitive potassium channels. *Vascular Pharmacology*, v. 47, p. 41–47, 2007.

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

NAKAMURA, E.S.; KUROSAKI, U.; ARISAWA, M.; MUKAINAKA, T.; TAKAYASU, J.; OKUDA, M.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; FLORIANO PASTORE, JR. Cancer chemopreventive effects of a Brazilian folk medicine, Juca, on in vivo two-stage skin carcinogenesis. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 81, p.135-137, 2002.

NOZAKI, H.; KEN-ICHIRO, H.; MASAHIRO, K.; KAZUYUKI, K.; SHOGO, I.; NOBUYASU, M.; HIROYUKI, T.; DAISUKE, T.; MUNEKAZU, L.; YUKIHIRO, A. *Paufferol A, a novel chalcone trimer with a cyclobutane ring from Caesalpinia ferrea Mart exhibiting DNA topoisomerase II inhibition and apoptosis-inducing activity*. *Tetrahedron Letters*, v. 48, p. 8290–8292, 2007.

PENNA, J. F. M. *Dicionário brasileiro de plantas medicinais*. 3.ed. Rio de Janeiro: Kosmos, 1946.

SIMÕES, D. E. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 2.^a ed. São Paulo: Atheneu:1999.

SOARES, L. A. L. *Obtenção de comprimidos contendo alto teor de produto seco por aspersão de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex. Reissek – Celastraceae*. Desenvolvimento tecnológico de produtos intermediários e final. 2002. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre. Tese.

SOUZA, A.B.; SOUZA, L.M.S.; CARVALHO, J.C.T.; MAISTRO, E.L. No clastogenic activity of *Caesalpinia ferrea* Mart. (Leguminosae) extract on bone marrow cells of Wistar rats. *Genetics and Molecular Biology* v. 29, n. 2, p. 380-383, 2006.

UEDA, H.; TACHIBANA, Y.; MORIYASU, M.; KAWANISHI AND, K.S.; ALVES, M. Aldose reductase inhibitors from the fruits of *Caesalpinia ferrea* Mart. *Phytomedicine*, v.8, n. 5, p. 377–381, 2001.

UEDA, H.; KAWANISHI, K.; MORIYASU, M. Effects of ellagic acid and 2-(2,3,6-trihydroxy-4-carboxyphenyl) ellagic acid on sorbitol accumulation in vitro and in vivo. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. v. 27, n. 10, p. 1584-1587, 2004.

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

WORLD Health Organization. *Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials*. Geneve: WHO, 1998.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; FILHO, V.C. Fármacos e Fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Química Nova*. 24(1): 147-152, 2001.

8. Cronograma

Atividade	Ago 2008	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2009	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
Levantamento Bibliográfico	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Obtenção da Matéria-prima vegetal		X	X									
Caracterização da Matéria-prima Vegetal		X	X	X								
Obtenção da solução extrativa					X	X	X	X	X			
Realização do planejamento fatorial							X	X				
Avaliação da inibição da enzima Alfa-glucosidase									X	X		
Elaboração de relatório parcial						X						
Elaboração do resumo e relatório final											X	
Preparação da Apresentação final para o Congresso												X

Vermelho – atividades realizadas.