

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

DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DE PRODUTO SECO POR
ASPERSÃO DE *Eugenia punicifolia*.

Bolsista: Fernanda Sampaio Jamel, CNPq.

Manaus

2011

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

RELATÓRIO FINAL
DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DE PRODUTO SECO POR
ASPERSÃO DE *Eugenia punicifolia*.
PIB-S/0041/2010

Bolsista: Fernanda Sampaio Jamel, CNPq.

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

Manaus
2011

APRESENTAÇÃO

Neste trabalho são descritas as atividades realizadas no período que corresponde a agosto de 2010 até julho de 2011.

O trabalho contém introdução, objetivos do estudo, revisão bibliográfica sobre o tema, descrição da metodologia empregada, resultados e discussão e as referências consultadas.

RESUMO

No Brasil, especificamente na Amazônia existem várias espécies vegetais com grande potencial terapêutico, dentre a qual se destaca *Eugenia punicifolia*, conhecida popularmente como pedra-ume-caá, amplamente utilizada pela medicina popular contra distúrbios hiperglicemiantes, principalmente no combate da diabetes. Estudos estão sendo realizados nos laboratórios da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas para comprovar sua eficácia terapêutica. Dessa forma, o trabalho tem por objetivo desenvolver um produto seco por aspersão a partir de *Eugenia punicifolia* e avaliar a atividade inibitória da enzima alfa-glucosidase. A matéria-prima vegetal, constituída por folhas de *E. punicifolia* foi caracterizada através da perda por dessecação, teor extrativo e análise granulométrica por tamisação. As soluções extrativas foram elaboradas seguindo um planejamento fatorial 2x2 onde foram avaliadas como variáveis independentes a relação droga:solvente (2,5% e 7,5%) e o tempo (5 min e 15 min) e como variáveis dependentes o teor de resíduo seco e o teor de taninos totais. Os resultados dos experimentos foram analisados estatisticamente através de ANOVA multivariada. Os resultados obtidos mostram que a solução extrativa possuindo 7,5% de droga vegetal em 15 minutos de infusão apresentou melhor atividade inibitória da α -glucosidase e melhor teor de resíduo seco. Portanto, conclui-se que os extratos secos obtidos de *E. punicifolia* apresentam atividade inibitória da enzima estudada, porém, é necessário mais estudos para melhorar a estabilidade dos produtos secos e, assim, empregá-los em formulações farmacêuticas.

Palavras-chave: *Eugenia punicifolia*, produto seco por aspersão, inibição da enzima alfa-glucosidase.

ABSTRACT

In Brazil, specifically the Amazon, there are several plant species have great therapeutic potential, among which stands out *Eugenia punicifolia*, popularly known as pedra-caá, widely used in folk medicine against hyperglycemic disorders especially in combating diabetes. Studies are being conducted in the laboratories of the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Amazonas terapêutica. Thus, the study aims to develop a spray dried extract from *Eugenia punicifolia* and evaluate the inhibitory activity of the enzyme alpha-glucosidase. The vegetable raw material, consisting of sheets of *E.punicifolia* was characterized by loss on drying, extractive content and particle size analysis by sieving. The extractive solutions were prepared according to a 2x2 factorial design where the independent variables were evaluated as the ratio drug: solvent (2.5% and 7.5%) and time (5 min and 15 min) and as dependent on the content of the dry and total tannins. The results of the experiments were statistically analyzed using multivariate ANOVA. The results show that the extraction solution having 7.5% drug plant in 15 minutes infusion showed better inhibitory activity of α -glucosidase and better content dry. Therefore, it is concluded that the dry extracts obtained from *E.punicifolia* show inhibitory activity of the enzyme studied, however, more research is needed to improve the stability of dry and thus employ them in pharmaceutical formulations.

Keywords: *Eugenia punicifolia*, spray drier extract, inhibiting the enzyme alpha-glucosidase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - <i>Eugenia punicifolia</i> (EMBRAPA 2011)	14
Figura 02 – Histograma de distribuição da matéria-prima vegetal de <i>E.punicifolia</i>	24
Figura 03 – Gráfico de Pareto para resíduo seco.....	25
Figura 04 – Interação AB para o resíduo seco	25
Figura 05 - Gráfico de Pareto para o teor de taninos totais	27
Figura 06 – Interação AB para o teor de taninos totais	27
Figura 07 – Gráfico da taxa de inibição do extrato com adjuvante	30

LISTA DE TABELA

Tabela 01 –Modelo fatorial para avaliação de parâmetros extrativos.....	19
Tabela 02 –Caracterização da matéria-prima vegetal(MPV).....	23
Tabela 03 – Resíduo seco das SE de <i>E.punicifolia</i>	24
Tabela 04 – Taninos totais das SE de <i>E.punicifolia</i>	26
Tabela 05 – Densidade e pH das SE de <i>E.punicifolia</i>	27
Tabela 06 – Inibição da atividade α -glucosidade nas SE de <i>E.punicifolia</i>	28
Tabela 07 – Comparação dos extrato sem e com adjuvante	29
Tabela 08 - Inibição da atividade da α -glucosidade no produto seco por aspersão (PSA).....	30

SUMÁRIO

Apresentação	III
Resumo.....	IV
Abstract	V
Lista de figuras.....	VI
Lista de tabelas.....	VII
1. Introdução.....	10
2. Objetivos.....	12
3. Revisão bibliográfica	
3.1 Espécie Vegetal.....	13
3.2 Aspectos etnofarmacológicos e pré-clínicos	14
3.3 Secagem por aspersão.....	15
3.4 Enzima alfa-glucosidase	16
4. Metodologia	
4.1 Material Vegetal	17
4.2 Tratamento e preparação da matéria-prima vegetal	17
4.3 Caracterização da matéria-prima vegetal	17
4.3.1 Determinação da perda por dessecação	17
4.3.2 Análise granulométrica por tamisação	18
4.3.3 Teor de extrativos	18
4.4 Desenvolvimento da solução extrativa	
4.4.1 Avaliação de parâmetros extrativos para obtenção da solução extrativa	19
4.5 Caracterização da solução extrativa padronizada	19
4.5.1 Resíduo seco	19
4.5.2 Densidade	20
4.5.3 pH	20
4.5.4 Análise quantitativa de taninos	20
4.6 Avaliação da inibição da atividade de enzima α -glucosidase	21

4.7 Desenvolvimento de produto seco por aspersão.....	22
4.8 Análise Estatística	22
5. Resultados	
5.1 Caracterização da matéria-prima vegetal.....	23
5.2 Obtenção e caracterização das soluções extrativas.....	24
5.3 Produto seco por aspersão	29
6. Conclusão.....	31
7. Cronograma.....	33
8. Referências bibliográficas.....	34

1. Introdução

A população mundial apresenta uma tendência crescente ao consumo de agentes terapêuticos de origem vegetal. As pesquisas nesta área demonstram estudos promissores que têm conduzido à reavaliação das plantas medicinais e seus produtos derivados como válidos agentes terapêuticos (YUNES *et al.*, 2001). E, nesse sentido, é cada vez maior o número de investigações científicas direcionadas para o isolamento e identificação dos principais constituintes de plantas usadas na medicina tradicional, assim como aos estudos farmacológicos a fim da determinação da atividade terapêutica das mesmas.

O mercado mundial de fitoterápicos gira em torno de aproximadamente 22 bilhões de dólares, no entanto, o Brasil, e em destaque a Amazônia, apesar da diversificada flora, detentor de cerca de um terço da flora mundial, não apresenta uma atuação destacada na produção e desenvolvimento de fitoterápicos (YUNES *et al.*, 2001).

Dentre as diversas espécies vegetais presente na flora Amazônica, com grande potencial terapêutico, destaca-se a *Eugenia punicifolia*, conhecida popularmente como pedra-ume-caá, amplamente utilizada pela medicina popular contra distúrbios hiperglicemiantes principalmente no combate da diabetes (REVILLA, 2001; BORRÁS, 2003). No entanto, são poucos os estudos existentes sobre essa espécie vegetal, há carência de comprovação terapêutica e de critérios para o controle de qualidade da matéria-prima vegetal e produtos derivados. Sobre a constituição química da mesma, 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 (BELTRAME *et al.*, 2001; 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). Além disso, a literatura registra que algumas espécies do gênero *Eugenia* sp. apresentam compostos químicos com grande potencial antiinflamatório e antimicrobiano (GARCIA *et al.*, 1999; BELTRAME *et al.*, 2001). O uso de partes da planta, através de infusão, é

muito comum pela população Amazônica (REVILLA, 2001; BORRÁS, 2003) e nesse sentido o desenvolvimento de uma forma farmacêutica com comprovada atividade farmacológica seria de relevada importância, pois a elaboração de um medicamento é essencial ao paciente, e dentre todas as vantagens que conduz, destaca-se a garantia de dose dos constituintes químicos.

Os extratos são as mais simples e tradicionais formas de derivados de plantas medicinais (BONATI, 1991). Extratos líquidos, apesar de sua simplicidade tecnológica, apresentam frequentemente sérios problemas de manutenção da qualidade. A eliminação do meio solvente, através de operação de secagem, parcial ou total, representa uma alternativa para contornar este aspecto. Produtos secos possuem, portanto, um grande número de vantagens, sobretudo considerando os diversos aspectos práticos quando utilizados como forma intermediária. Entre as técnicas de secagem empregadas na preparação de produtos secos, a secagem por aspersão (nebulização) tem sido empregada com sucesso na indústria de fitoterápicos, principalmente, pelas características físicas, químicas e tecnológicas que conferem ao produto final, destacando a propriedade de reconstituição instantânea em água, característica, frequentemente, ausente em produtos secos obtidos por outro meio de secagem (MASTERS, 1978; NIELSEN, 1982; JACOB *et al.*, 1984; BRODHEAD *et al.*, 1992).

A utilização de adjuvantes tecnológicos na secagem pode melhorar as condições de obtenção dos produtos secos, principalmente, no que se referem ao rendimento, propriedades reológicas e conservação frente à umidade (SOUZA *et al.*, 2009). Porém, tanto a operação de secagem quanto a adição de adjuvantes podem interferir nas propriedades biológicas dos produtos obtidos (CARVALHO *et al.*, 1997).

Sendo assim, a elaboração de um produto seco por aspersão a partir de uma solução extrativa de *Eugenia punicifolia* é importante tanto para viabilizar a avaliação da atividade biológica do extrato, bem como porque representa a obtenção de um produto intermediário tecnologicamente elaborado com características definidas e reprodutíveis.

2. OBJETIVOS

GERAL:

Desenvolver um produto seco por aspersão a partir de *Eugenia punicifolia* e avaliar a atividade inibitória da enzima alfa-glucosidase.

ESPECÍFICOS:

- Caracterizar a matéria-prima vegetal;
- Avaliar a influência de fatores extrativos sobre o teor de sólidos solúveis nas soluções extrativas;
- Obter um produto seco através da secagem por aspersão;
- Avaliar a atividade inibitória da alfa-glucosidase.

3. Revisão bibliográfica

3.1 Espécie Vegetal

Eugenia puniceifolia é uma espécie perene, geralmente de porte arbustivo pertencente à família Myrtaceae, a qual compreende 130 gêneros e cerca de 3.000 espécies. *Eugenia*, com cerca de 1.000 espécies, é um dos maiores gêneros dessa família, com distribuição principalmente nas Américas Central e do Sul (MERWEET et al. 2004) e está inserida na subfamília Myrtoideae que inclui todos os gêneros de Myrtaceae que apresentam frutos carnosos (LUGHADHA & PROENÇA, 1996). Encontrada em cerrados, campos ruprestes e campos sujos (NOGAO et al. 2003).

A espécie *Eugenia puniceifolia* apresenta a seguinte sinonímia (SILVA et al., 1994): *Eugenia fruticulosa* DC., *Eugenia glareosa* Berg, *Eugenia kunthiana* DC., *Eugenia polyphylla* Berg, *Eugenia rhombocarpa* Berg, *Eugenia romana* Berg.

Essa espécie apresenta a seguinte classificação taxonômica (SILVA et al., 1994):

Divisão: **Magnoliophyta**

Classe: **Magnoliopsida**

Subclasse: **Rosidae**

Ordem: **Myrtales**

Família: **Myrtaceae**

Gênero: **Eugenia**

A *Eugenia puniceifolia* é conhecida popularmente como pedra-ume-caá; insulina vegetal, pedra hume caa (REVILLA, 2001). É um arbusto muito ramificado com flores brancas, folhas decíduas pequenas e largas, o fruto roxo, se configura como uma baga globosa. Além de ser bastante abundante em áreas de capinarana e de capoeira com solos arenosos, preferem terrenos áridos, onde encontra terra e ambiente que se adaptam perfeitamente a sua natureza específica.

Encontrada na região Amazônica, principalmente no estado do Pará, tem preferência por clima tropical úmido e solos arenosos e areno-argilosos (REVILLA, 2001).



Figura 01. *Eugenia Punicifolia* (EMBRAPA,2011)

Um estudo fitoquímico preliminar dos extratos da raiz e das folhas demonstrou a presença de flavonóides, taninos e ácido fenólicos (BELTRAME *et al.*, 2001; GRANJEIRO *et al.*, 2006). Além disso, no óleo essencial extraído das folhas é possível detectar monortepeno oxigenado, linalol e β -cariofileno (CAMARA *et al.*, 2005).

3.2 Estudos Etnofarmacológicos e Pré-clínicos

A *Eugenia Punicifolia* é uma planta arbustiva e lenhosa presente na Amazônia, empregada na medicina popular contra distúrbios hiperglicemiantes principalmente no combate da diabetes (REVILLA, 2001; BORRÁS, 2003).

As folhas e raízes de *E. puniceifolias* são usadas contra febres, resfriados, diabetes e males no fígado (RIBEIRO *et al.*, 1999).

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.*, 1997). Estudos recentes demonstram que estudos realizados com extratos a partir de folhas de *E. puniceifolia* revelam uma possível atividade antagonista de receptores colinérgicos (GRANJEIRO *et al.*, 2006). Além disso, a literatura registra que algumas espécies do gênero *Eugenia* apresentam compostos químicos com grande potencial antiinflamatório e antimicrobiano (GARCIA *et al.*, 1999; BELTRAME *et al.*, 2001).

Recentemente demonstramos que o extrato aquoso de *E. puniceifolia* foi capaz de influenciar a neurotransmissão colinérgica no diafragma de ratos. Estudos estão sendo elaborados para verificar a atividade antioxidante do extrato hexânico (EH) de *E. puniceifolia*, já que o estresse oxidativo pode estar associado a ocorrência de diversas doenças degenerativas (BIRCHAL, *et al.*, 2009).

3.3 Secagem por aspersão – “spray-drying”

A secagem por aspersão é muito utilizada em diversos segmentos industriais, incluindo o farmacêutico e o alimentício. Apesar de necessitar de altos investimentos em instalações e operação, muitas são as vantagens que justificam sua aplicabilidade. Estas vantagens incluem a produção de partículas de qualidade consistente, a facilidade em relação ao uso contínuo, a viabilidade da técnica em materiais termossensíveis e termorresistentes, a capacidade de processar diversos tipos de matérias-primas. No entanto, para aplicabilidade adequada desta técnica, existem diversos aspectos que devem ser considerados. Dentre eles estão a avaliação das características do produto e ou da formulação a secar, dos parâmetros de processo e o tipo específico de partícula a ser produzida (WENDEL, CELIC, 1998).

Secagem por aspersão ou secagem por nebulização é a transformação de líquidos de baixa ou alta viscosidade, mesmo aqueles que são quase pastosos, em produto seco e pulverizado em uma única operação. O líquido ou pasta são atomizados usando-se um sistema centrífugo ou de alta pressão, onde as gotículas atomizadas entram em contato, imediatamente, com um fluxo de ar quente. A rápida evaporação permite manter baixa a temperatura do produto. A transferência de calor e de massa é realizada pelo contato

direto entre o gás quente e as gotículas dispersas. As partículas finas são separadas do gás em ciclones externos ou em mangas coletoras. (MASTERS, 1985).

Neste tipo de operação, o aquecimento e a transferência de massa durante a secagem ocorrem com filmes de ar e vapor ao redor das gotículas. Esta proteção do vapor mantém a partícula na temperatura de saturação. Como a partícula não se torna seca, a evaporação continua acontecendo e a temperatura dos sólidos não se aproxima da temperatura da saída da secagem. Devido a isto, produtos sensíveis podem ser secos em temperaturas relativamente altas. O formato da maior parte das partículas atomizadas é esférico, que garante boa fluidez ao material particulado obtido (LINDEN, et.al. 2003).

Com objetivo de obter produtos intermediários com melhores características tecnológicas, esse processo tem gerado resultados satisfatórios no desenvolvimento de produtos farmacêuticos oriundos de plantas medicinais. (BASSANI *et al.*, 2005). Fatores como umidade e atividade de água são de grande importância no estudo do produto obtido.

3.4 Enzima alfa-glucosidase

A alfa-glucosidase é uma enzima que retarda a liberação de glicose a partir de oligossacarídeos por ser capaz de hidrolisar ligações 1,6-alfa-glucosídicas quando a próxima ligação da seqüência é 1,4. A alfa-amilase, produzida por animais, vegetais e microrganismos, é uma enzima que hidrolisa ligações alfa-glicosídicas produzindo mono ou oligossacarídeos alfa-anoméricos (hidrólise) formando ligações glicosídicas alfa-1,4 ou alfa-1,6 (transglicosilação).

Uma das principais enzimas que permite a absorção de glicose no sangue é a alfa-glicosidase (ABESUNDARA *et al.*, 2004). Esta enzima está no revestimento do intestino delgado e sua eficiência é parcialmente bloqueada por estes medicamentos. Em consequência, a glicose é absorvida mais lentamente e parte dela pode nem ser absorvida, mas digerida por bactérias encontradas mais abaixo no intestino.

4. METODOLOGIA

4.1 Material vegetal

A droga vegetal, constituída por folhas de *Eugenia punicifolia*, foi coletada no campo de plantação experimental da EMBRAPA/AM no mês de dezembro de 2010. 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

O material vegetal recebido foi selecionado manualmente, sendo separadas partes desconhecidas e colocados para secar a temperatura ambiente por 48 horas, a sombra, em lugar seco e arejado. Em seguida foi colocado para secar em estufa de ar circulante, a temperatura de $40\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ por 7 dias até a estabilização da umidade residual em valor abaixo de 12%. Após a secagem, o material vegetal foi submetido à moagem em moinhos de facas. O material cominuído resultante foi misturado, constituindo assim a matéria-prima vegetal.

4.3 Caracterização da matéria-prima vegetal (MPV)

O material vegetal foi caracterizado através dos ensaios descritos abaixo:

4.3.1 Determinação de perda por dessecação (F.Bras.V, 2010).

Cerca de 0,5g, exatamente pesados, da amostra foram colocados em pesa-filtros, 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. O ensaio foi realizado em quadruplicata.

4.3.2 Análise granulométrica por tamisação (VOIGT, 2000).

Foi pesado cerca de 50g da matéria-prima vegetal para serem submetidos à 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 coletor foram pesadas e os dados analisados em gráfico. Foi construído histograma de distribuição, a fim de se obter a amplitude granulométrica do pó. Os resultados expressarão a média de três determinações.

4.3.3 Teor de extrativos (BUNDESVEREINIGUNG, 1986)

Foi pesando cerca de 1,5 g da matéria prima vegetal triturada e colocada em erlenmyer adicionando 150 mL de água destilada, pesado o conjunto e submetido à extração por decocção durante 10 minutos. Após resfriamento, pesou-se novamente o conjunto reconstituiu-se o peso inicial com adição de massa de água correspondente àquela evaporada. A solução foi filtrada, desprezando-se os 20 mL iniciais. Foram pesados exatamente cerca de 20,0 g do restante do filtrado, em pesa-filtro, previamente tarado, evaporando-se até a secura em banho de água fervente. O resíduo foi colocado na estufa à temperatura de 105°C por 2 horas. Em seguida, foi resfriado em dessecador por 20 minutos e pesado, este procedimento foi realizado até a obtenção do peso constante do resíduo. Após a obtenção do peso constante do resíduo, o teor extrativo foi calculado como percentual ponderal pela 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 Desenvolvimento da solução extrativa

4.4.1 Avaliação de parâmetros extrativos para obtenção da solução extrativa

As soluções extrativas foram elaboradas seguindo um planejamento fatorial 2^2 , replicado, onde as variáveis independentes foram: relação droga: solvente e tempo de extração (tabela 1), e a variável dependente foi o resíduo seco. Inicialmente, as soluções extrativas foram preparadas utilizando água como solvente e infusão como método de extração.

Tabela 01: modelo fatorial para avaliação de parâmetros extrativos

Fatores	Níveis
A) Droga:solvente	2,5% (-)
	7,5% (+)
B) Tempo	5 min (-)
	15 mim (+)

4.5 Caracterização da solução extrativa padronizada

A solução extrativa foi caracterizada através da determinação de:

4.5.1 Resíduo seco (BUNDESVEREINIGUNG, 1986)

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 $105^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ até peso constante. O resultado foi expresso pela média e desvio-padrão de três determinações.

4.5.2 Densidade (F. Bras. IV, 1988)

Foi realizada em picnômetro de 25 ml, previamente calibrado através da aferição do mesmo vazio e contendo água. Em seguida foi determinada a massa do picnômetro contendo a solução extrativa. A densidade foi expressa pela média e desvio-padrão de três determinações e calculada segundo a equação abaixo.

$$D_{25}^{25} = m_{se}/m_{H_2O}$$

Onde: D_{25}^{25} = densidade relativa; m_{se} =massa da solução extrativa; m_{H_2O} =massa da água.

4.5.3 pH (F. Bras. IV, 1988)

O pH foi determinado utilizando 10 ml da solução extrativa, em potenciômetro, previamente calibrado. O resultado foi expresso pela média de três determinações.

4.5.4 Análise quantitativa de taninos totais (BÖHME e HARTKE 1976, modificado por SOARES, 2002; PACHECO, 2010).

Determinação de polifenóis totais (PFT):

Para as soluções a 7,5% (m/V) - Uma alíquota de 10 ml da solução extrativa foi transferida para um balão volumétrico de 100 ml e o volume completado com água destilada (solução-mãe), depois 20 ml da solução-mãe foi transferida para um balão volumétrico de 100ml e o volume completado com água destilada. 5 ml dessa solução foi transferido para um balão volumétrico de 25 ml e completado com água destilada.

Para soluções de 2,5% (m/V) - Foi realizada o mesmo protocolo descrito acima com diluições apropriadas a leitura em espectrofotômetro U/V

Determinação de fração não-tanante (FNT):

Cerca de 0,15g de polivinilpirrolidona (PVP) foi adicionado a 10 ml de solução-mãe. A mistura foi agitada em agitador magnético durante uma hora e em seguida, filtrada com papel filtro e retirado a mesma quantidade usada na determinação de PFT.

Em seguida, as amostras diluídas (PFT e FNT) foram analisadas em espectrofotômetro UV/VIS com comprimento de onda de 270nm.

Determinação de taninos totais:

O teor de taninos totais foi calculado através da diferença entre o teor de polifenóis totais e da fração não-tanante, conforme equações abaixo:

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

$$TT = PFT - FNT$$

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

4.6 Avaliação da inibição da atividade de enzima α -glucosidase

A avaliação da ação das soluções extrativas sobre a inibição da enzima α -glucosidase foi realizada através de ensaio “in vitro”, utilizando arcabose como fármaco padrão (ABESUNDARA *et al.*, 2004). As soluções extrativas avaliadas foram, previamente secas em sistema de secagem por aspersão em equipamento Mini Spray Dryer modelo MSD 1,0 da Labmaq ou liofilizadas.

4.7 Desenvolvimento de produto seco por aspersão

O produto seco por aspersão foi produzido a partir da solução extrativa que demonstrou maior teor de resíduo seco e atividade biológica, através da incorporação na solução extrativa de adjuvante farmacêutico. Foi avaliado o Dióxido de Silício Coloidal como adjuvantes de secagem, o qual foi incorporado na solução extrativa na proporção de 30% sobre o resíduo seco da mesma.

O produto seco por aspersão obtido foi avaliado através do rendimento da operação de secagem e atividade inibitória da alfa-glicosidase conforme descrito no item 4.6.

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 DISCUSSÃO

5.1. Caracterização da Matéria-Prima Vegetal (MPV)

Na tabela 2 estão descritos os ensaios de caracterização da Matéria-prima vegetal.

Tabela 02: Caracterização da MPV

Ensaio	Resultados $X \pm s$
Perda por dessecação (g%)	7,943489 \pm 1,134878
Teor extrativo (g%)	25,42305 \pm 7,39163

A perda por dessecação da amostra foi de 7,94%, indicando que a operação de secagem foi eficiente em eliminar o conteúdo de umidade. Isso demonstra também, que a umidade residual está apropriada para o armazenamento, ou seja, abaixo de 12%, evitando, assim, o desenvolvimento de microorganismo que possam comprometer a estabilidade e contaminar os produtos elaborados a partir da matéria-prima vegetal.

O teor extrativo descreve a quantidade de sólidos solúveis presentes na matéria-prima vegetal e, também, a eficiência da água em extrair as substâncias presentes na célula vegetal (LIST;SCMIDT,1989). O Resultado encontrado de 25,42% demonstra que a matéria-prima vegetal estudada tem um teor extrativo baixo.

A análise granulométrica da matéria-prima influencia no processo extrativo, sendo necessária uma padronização, através da identificação da distribuição do tamanho de partículas, uma vez que, que partículas muito grandes e muito reduzidas costumam

diminuir a eficiência do processo extrativo (LIST e SCHMIDT, 1989). O histograma de distribuição das partículas da *Eugenia punicifolia* (figura 4) demonstra uma ampla faixa e distribuição situada a partir de 850 μm .

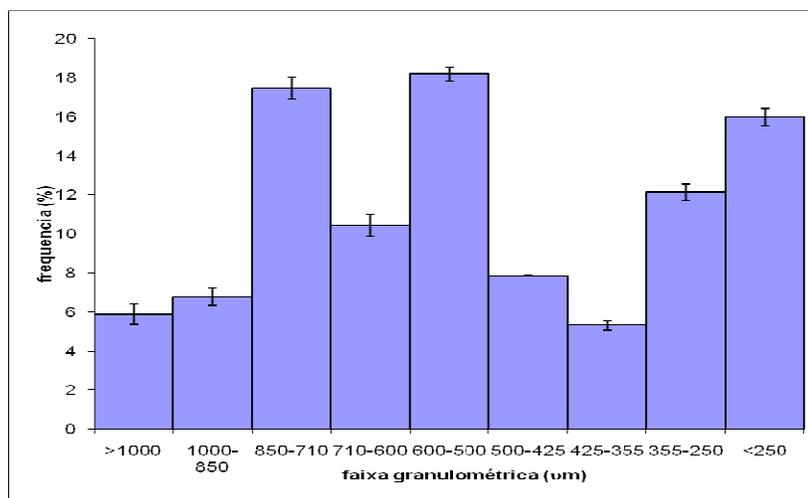


Figura 02: histograma de distribuição da matéria-prima vegetal de *E.punicifolia*

5.2 Obtenção e caracterização das soluções extrativas

O resíduo seco avalia a quantidade de sólidos existentes no produto e influência na avaliação do rendimento no processo de secagem da solução extrativa.

Tabela 03: Resíduo seco das SE de *E. punicifolia*

Soluções extrativas	Média (X)	Desvio Padrão (DP)	Coefficiente de Variação (CV%)
2,5% em 5min	0,579727	0,01075	1,85435
2,5% em 15 min	0,598097	0,007026	1,174686
7,5% em 5 min	1,591446	0,0043993	0,276437
7,5% em 15 min	1,738693	0,004348	0,250089

De acordo com a tabela 3 a solução extrativa com melhor resíduo seco foi a produzida com 7,5% de droga vegetal em 15 minutos de infusão, pois apresenta o coeficiente de variação menor que as outras soluções e maior teor de sólidos solúveis.

A análise de estatística realizada através da ANOVA demonstrou que todos os fatores estudados influenciam significativamente ($\alpha = 0,05$) sobre o resíduo seco das soluções extrativas (figura 4), apresentando inclusive interação positiva significativa ($\alpha = 0,05$), pois maior resíduo seco é obtido quando todos os fatores estão no nível superior (figura 5)

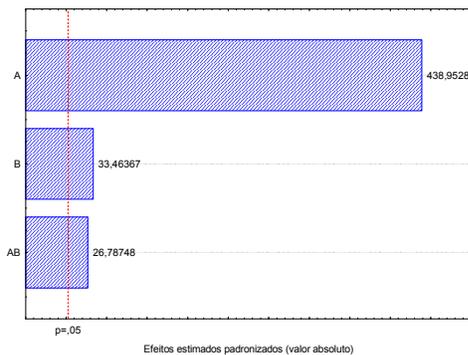


Figura 03: Gráfico de Pareto para o resíduo seco

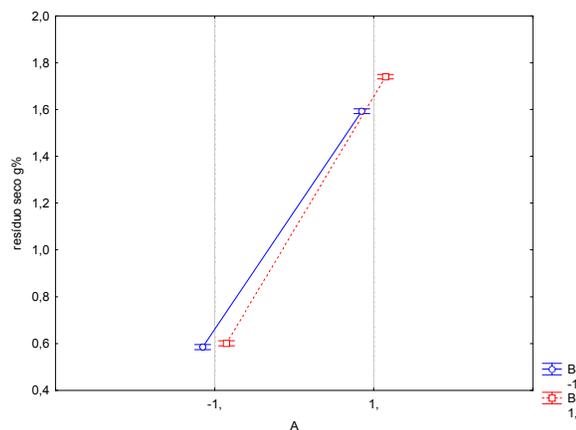


Figura 04: Interação AB

Por outro lado, na avaliação dos taninos totais a SE 7,5% em 15 minutos apresentou menor teor dessas substâncias (tabela 4), talvez devido a elevada quantidade de droga vegetal causar uma saturação do solvente e diminuir a extração.

Tabela 04: Taninos Totais das SE de *E. punicifolia*

Soluções extrativas	Média (X)	Desvio Padrão (DP)	Coefficiente de Variação (CV%)
2,5% em 5min	39,48439	3,073156	7,783218
2,5% em 15 min	47,77658	3,785671	7,923695
7,5% em 5 min	14,51807	0,607213	4,182462
7,5% em 15 min	12,77707	0,141327	1,106098

A análise estatística revelou que sobre este parâmetro todos os fatores também foram significativos ($\alpha = 0,05$) com interação negativa, ou seja, melhor teor de taninos é encontrado na solução extrativa obtida com todos os fatores no nível inferior (figuras 6 e 7)

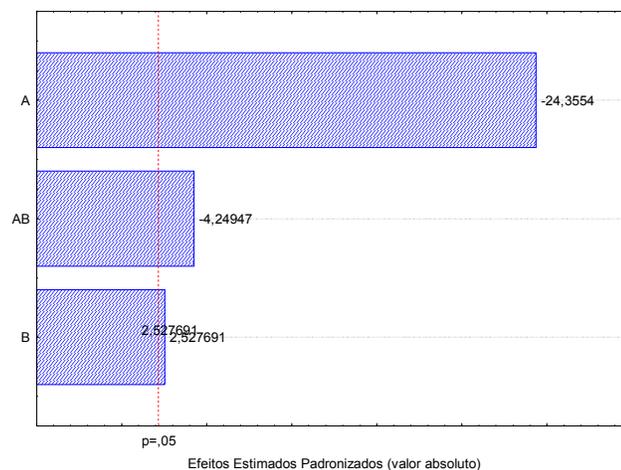


Figura 05: Gráfico de Pareto para o teor de taninos Totais

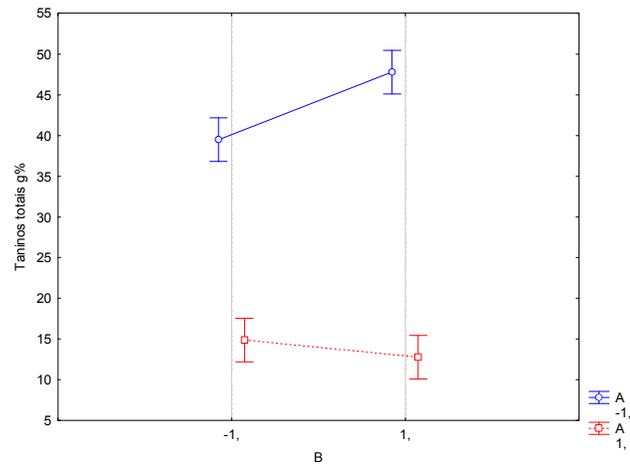


Figura 06: Interação AB para o teor de taninos Totais

Quanto a análise da densidade e do pH, pode ser observado na tabela 5 que todas as soluções extrativas apresentaram densidade próxima de um, semelhante a densidade da água, o que é justificado pelo o solvente utilizado ser a água, bem como pH em torno de 5,0, demonstrando o caráter ácido das soluções devido ao alto teor de constituintes polifenólicos.

Tabela 05: Densidade e pH das SE de *E. punicifolia*

Soluções extrativas	Densidade	pH
2,5% em 5min	1,001558861	5,16
2,5% em 15 min	1,001907134	5,10
7,5% em 5 min	1,003906256	5,05
7,5% em 15 min	1,003835114	5,11

As soluções extrativas foram secas pelo processo de liofilização e foram avaliadas quanto sua ação na inibição da enzima α -glucosidade, originando resultados descritos na tabela 6.

Tabela 06: Inibição da atividade da α -glucosidade nas SE de *E.punicifolia*.

Amostra	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Inibição $X \pm s$	CI50 $X \pm s$
2,5% em 5 min	100	99,20 \pm 0,67	13,51 \pm 0,24
	50	97,69 \pm 0,07	
	25	95,45 \pm 0,05	
	12,5	30,05 \pm 3,59	
	6,25	8,45 \pm 2,69	
2,5% em 15 min	50	98,25 \pm 0,08	9,61 \pm 0,21
	25	98,41 \pm 0,53	
	12,5	69,86 \pm 1,67	
	6,25	12,47 \pm 2,71	
7,5% em 5 min	50	99,16 \pm 0,24	9,62 \pm 0,22
	25	98,09 \pm 0,09	
	12,5	65,67 \pm 2,21	
	6,25	18,35 \pm 0,28	
	3,125	7,08 \pm 0,63	
7,5% em 15 min	50	98,45 \pm 0,12	8,11 \pm 0,71
	25	97,91 \pm 0,59	
	12,5	82,66 \pm 1,01	
	6,25	22,48 \pm 1,27	
	3,125	7,05 \pm 2,33	

A avaliação da enzima α -glucosidade mostra que a diferença entre as concentrações e tempo de infusão apresenta pouca alteração na atividade biológica da *E. puniceifolia*, ou seja, a inibição da enzima mostrou resultados próximos entre as diferentes soluções extrativas. No entanto, a produzida com 7,5% de droga vegetal em 15 minutos de extração foi a que causou inibição com menor concentração. Dessa forma, essa foi escolhida para a obtenção do produto seco por aspersão.

5.3 Produto seco por aspersão

Em relação ao rendimento da operação de secagem, o extrato seco produzido a partir dessa solução extrativa apresentou rendimento inferior a 50%, que pode ser justificado pelo próprio processo de secagem que gera perdas do produto seco ou ainda por problemas no equipamento de *spray-dryer*. Visando aumentar o rendimento da operação foi utilizado adjuvante de secagem (Aerosil®). Além disso, extratos secos sem adjuvantes apresentam elevado teor de umidade, como demonstrado na tabela 7.

Tabela 07: Comparação dos extratos com e sem Adjuvantes

Resultados da PD% ($X \pm s$)	
Sem adjuvantes	7,943489 \pm 1,134878
Com adjuvante	2,024081 \pm 9,879672

Quanto a atividade de inibição da enzima α -glucosidade, o resultado mostra que a adição do dióxido de silício coloidal no extrato, causou um incremento na resposta, onde uma menor concentração do produto seco por aspersão gerou maior percentual de inibição (tabela 8 e figura 7).

Tabela 08: Inibição da atividade da α -glucosidade no produto seco por aspersão (PSA)

Amostra	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Inibição (%) $\bar{X} \pm s$	CI_{50} $\bar{X} \pm s$
PSA			0,59 \pm 0,01
	4	98,25 \pm 0,14	
	0,8	73,56 \pm 1,03	
	0,16	24,87 \pm 1,09	
	0,032	23,98 \pm 2,04	

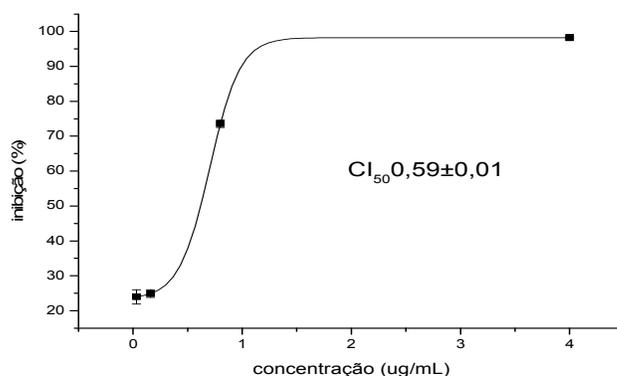


Figura 07: Gráfico da taxa de inibição do extrato com adjuvante.

De acordo com gráfico, observa-se que atividade de inibição da enzima α -glucosidase da solução com adjuvantes tem o valor percentual maior que o encontrado nos extratos sem adjuvante, ou seja, pode-se dizer que adição de dióxido de silício coloidal melhorou a atividade avaliada.

6. CONCLUSÃO

No projeto, a caracterização da matéria vegetal foi realizada através da perda por dessecação, na qual foi possível verificar a eficiência do processo de secagem; o teor extrativo, que mostrou baixa eficiência da água em extrair as substâncias presentes nas células vegetais; e também por análise granulométrica que determinou diâmetro da amplitude granulométricas das partículas.

Com relação à obtenção de soluções extrativas, a solução que apresentou melhor teor de resíduo seco e atividade de inibição da α -glucosidase foi a produzida com 7,5% de droga vegetal em 15 minutos de infusão, indicando que essa solução pode ser utilizada para futuras formulações farmacêuticas.

Ambos os fatores estudados (droga vegetal e tempo de extração) influenciaram significativamente sobre as respostas estudadas (resíduo seco e teor de taninos totais).

A atividade de inibição da α -glucosidase, dos extratos obtidos apresentaram ótimo percentagem de inibição, cerca de 98%, indicando que nesta espécie vegetal atividade hipoglicemiante está presente. Porém com a adição de adjuvante de secagem na solução extrativa houve um incremento na resposta farmacológica avaliada.

Dessa forma o produto seco por aspersão padronizado pode ser utilizado para maiores estudos visando o desenvolvimento de uma forma farmacêutica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASSANI, V.L.; ORTEGA, G.G.; PETROVICK, P.R. Desenvolvimento tecnológico de produtos fitoterápicos Revista fitos. São Paulo, V1, n.1, p. 14-17, 2005.

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.

BELTRAME FL, SARTORETTO JL, BAZOTTE RB, CUMAN RN, CORTEZ, DAG. **Estudo fitoquímico e avaliação do potencial antidiabético do *cissus sicyoides* L. (vitaceae).** *Química Nova*. v. 24, n. 6, p. 783-785, 2001

BIRCHAL, V.S.; PASSOS, M.L.; WILDHAGEN, G.R.S.; MUJUMDAR, A.S. **Effect of spray-dryer operating variables on the whole milk powder quality.** *Drying technology*. 23: 611-636, 2005.

BÖHME, H.; HARTKE, K. (Hrsg.). *Europäisches Arzneibuch, Band I und II, Kommentar*. Stuttgart: Wissenschaftliche, p.1114-1118, 1976.

BONATI, A. **How and why should we standardize phytopharmaceutical drugs for clinical validation?** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 32, p. 195-197, 1991.

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

BROADHEAD, J.; ROUAN, S.K.E.; RHODES, C.T. **The Spray-drying of Pharmaceuticals.** *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 18, n. 11-12, p. 1169-1206, 1992.

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

CAMARA,C.A.G;OLIVEIRA,R.N. **Estudo comparativo do óleo essencial de Eugenia Punicifolia de diferentes regiões**.Revista de brasileira de farmacognosia.Recife,Pe,2005.

CARVALHO, E.L.S. *Desenvolvimento de extrato seco nebulizado de Maytenus ilicifolia Martius ex Reiss. (espinheira santa)*. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS. 1997. Dissertação de Mestrado.

GARCIA MD, SAENZ MT, PUERTA R, QUILEZ A, FERNANDEZ MA. **Antibacterial activity of Agave intemixta and Cissus sicyoides**. Fitoterapia. v. 70:71-73, 1999.

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

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.

JACOB, M.; SOETERANO, S.; PUECH, A.; DURU, C.; CAVAILLES, M.L.; PELLECUER, J. **Contribution à l'étude de la stabilité de divers extraits végétaux secs**. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, v. 59, n. 12, p. 335-338, 1984.

LUGHADHA, E.N. & PROENÇA, C. 1996. **A survey of thereproductive biology of the Myrtoideae (Myrtaceae)**.Annals of the Missouri Botanical Garden 83: 480-503.

MASTERS, K. **Spray Drying**. 2 ed. New York: John Wiley, 1978.

MASTERS, K. **Spray drying handbook**. 4.ed. London: Godwin, 1985.

MERWETT, M.M.; WYK, A.E. & BOTHA, A.M. 2004. **Molecular phylogenetic analysis of Eugenia L. (Myrtaceae), with emphasis on southern Africa taxa**. Plant Systematic Evolution. Published online: August 30, 2004.

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

NOGÃO, E.O.; ARAÚJO, S.M.; ATROCH, O.S.; AZEVEDO, D.M.; CALDERANO, T.S. **Desafios para estabilidade in vitro *Eugenia Punicifolia* (H.B e K) D.C., uma espécie amazônica de interesse medicinal**. Universidade do Amazonas, Manaus, 2003.

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.

NIELSEN, F. **Spray-Drying of Pharmaceuticals**. *Manufacture, Chemical, Aerosol News*, v. 53, p. 38-39, 1982.

PACHECO, C.C. **Otimização de metodologia analítica para quantificação de taninos em *eugenia punicifolia*** Manaus: Programa de Iniciação Científica, UFAM. 2010. Relatório Final.

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.; PROCOPIO, L.C. **Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central**. 1ª ed. Manaus: INPA, 1999, 800 p.

SILVA, I. V. **Obtenção de Solução Extrativa a partir de *Eugenia rotundifolia***. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 1994.

SOUZA, T.P. ; GOMEZ-AMOZA, J.L.; MARTINEZ-PACHECO, R. PETROVICK, P.R. **Development of granules from Phyllanthus niruri spray-dried extract.** Brazilian Journal of Pharmaceutical Science. V. 45, n. 4, p. 669-675, 2009.

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.

WENDEL, S.; ÇELIC, M. **Uma visão geral sobre o uso da tecnologia de spray-drying.** *Pharm Technol* 5: 31-43, 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.* v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.