

FABIELLE MELISSA ZORZIN

Avaliação da atividade de inibição de alfa-amilase e padronização do extrato aquoso  
da folha de *Eugenia dysenterica*

BRASILIA, 2014

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Avaliação da atividade de inibição de alfa-amilase e padronização do extrato aquoso  
da folha de *Eugenia dysenterica*

FABIELLE MELISSA ZORZIN

Dissertação apresentada como requisito  
parcial para a obtenção do Título de Mestre  
em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-  
Graduação em Ciências da Saúde da  
Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista

Brasília

2014

FABIELLE MELISSA ZORZIN

Avaliação da atividade de inibição de alfa-amilase e padronização do extrato aquoso  
da folha de *Eugenia dysenterica*

Dissertação apresentada como requisito  
parcial para a obtenção do Título de Mestre  
em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-  
Graduação em Ciências da Saúde da  
Universidade de Brasília

BANCA EXAMINADORA

Profa. Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista Faculdade de Ciências da Saúde  
da Universidade de Brasília – UnB

Presidente

Profa. Dâmaris Silveira Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília  
– UnB

Prof. Mauricio Homem de Mello Ciências Farmacêuticas da Universidade de Brasília  
– UnB

## AGRADECIMENTOS

À Professora Pérola pela orientação, amizade, aprendizado e estímulo, além da compreensão e apoio que foram de extrema importância.

À minha mãe, ao meu pai e aos meus irmãos pelo incentivo, pelas preocupações e por sempre apoiarem minhas decisões.

À Professora Dâmaris Silveira, do Laboratório de Controle da Qualidade, pela colaboração no projeto, pelos ensinamentos, apoio e atenção.

Ao Professor Maurício Homem de Mello pelos ensinamentos, paciência, apoio e colaboração.

À Professora Yris Fonseca, do Laboratório de Controle da Qualidade, pelos ensinamentos e colaboração.

Ao Professor Edivaldo Ximenes Ferreira Filho do Instituto de Ciências Biológicas por disponibilizar o uso dos equipamentos do Laboratório de Enzimologia.

Ao Professor Elton Clementino da Silva por disponibilizar os extratos da espécie vegetal *Eugenia dysenterica*.

À Professora Eliete Neves Silva Guerra, do Laboratório de Histopatologia Bucal, pela colaboração.

Aos colegas de pós-graduação pela amizade companheirismo e troca de experiências que foram muito valiosas.

À FAPDF e ao CNPq pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa. À CAPES pela bolsa de pesquisa e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e a Universidade de Brasília.

## RESUMO

O Diabetes Mellitus é uma doença metabólica crônica, de etiologia múltipla, caracterizada por hiperglicemia resultando na deficiência da secreção ou incapacidade da insulina exercer seus efeitos adequadamente, provocando alterações no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. A procura por substância ativa presente em plantas que possa inibir a enzima  $\alpha$ -amilase, chave neste processo metabólico, com ação mais seletiva e menos efeitos indesejáveis, tem sido o alvo de pesquisas. O Brasil ocupa o topo dos países mais ricos em biodiversidade do mundo, possui cerca de 20% do total das espécies do planeta e pelo menos metade destas espécies possuem alguma propriedade terapêutica. No entanto, menos de 1% desta diversidade tem sido alvo de estudos apropriados, principalmente como inibidores enzimáticos, o que inclui as espécies vegetais do Cerrado, segundo maior bioma brasileiro. Assim, este projeto propôs avaliar a espécie vegetal *Eugenia dysenterica*, presente no bioma Cerrado, quanto à atividade de inibição da enzima  $\alpha$ -amilase, padronizar e caracterizar o extrato bruto aquoso das folhas desta planta. Para atingir o objetivo proposto, o extrato aquoso bruto foi padronizado de acordo com a presença do marcador químico catequina, fracionado e avaliado quanto a sua ação inibitória sobre a atividade da  $\alpha$ -amilase. O extrato aquoso bruto apresentou 47,51 mg de catequina por grama de extrato. As frações com potencial atividade de inibição sobre a  $\alpha$ -amilase foram as frações isopropanólica e suas subfrações I8, I16, I17, I20 e I21, além do extrato aquoso bruto. Foi identificado a presença de ácido elágico na subfração com maior potencial inibitório (I8). Os valores de  $IC_{50}$  do extrato bruto e da fração isopropanólica (14,92, e 8,06  $\mu\text{g/mL}$ ), respectivamente, foram próximos ao  $IC_{50}$  do controle positivo de inibição Acarbose (5,58  $\mu\text{g/mL}$ ). As subfrações apresentaram valores de  $IC_{50}$  maiores que o controle. Não foi observada citotoxicidade para o extrato aquoso bruto e fração isopropanólica em concentrações próximas aos valores de  $IC_{50}$  para  $\alpha$ -amilase. Foi desenvolvido um método cromatográfico rápido e confiável para determinação do flavonóide catequina no extrato bruto, pois foi observada ampla faixa de linearidade e excelente precisão. Além disso, o método foi robusto e exato informando corretamente seu limite de detecção e quantificação.

Palavras-chave: inibição enzimática;  $\alpha$ -amilase; padronização; *Eugenia dysenterica*.

## ABSTRACT

Diabetes Mellitus is a chronic metabolic disorder of multiple aetiology characterized by hyperglycemia resulting in deficiency of insulin secretion or inability to exert its effects properly, causing changes in the metabolism of carbohydrates, lipids and proteins. The search for active substance in plants that can inhibit the enzyme  $\alpha$ -amylase, key in this metabolic process, with more selective action and less side effects, has been the target of research. Brazil topped the richest countries in biodiversity in the world, has about 20% of the planet's species and at least half of these species have some therapeutic properties. However, less than 1% of this diversity has been the subject of appropriate studies, primarily as enzyme inhibitors, which includes the plant species of the Savanna, second largest brazilian biome. This project proposed to evaluate the plant species *Eugenia dysenterica*, present in the Savanna biome, as for the inhibitory activity of the enzyme  $\alpha$ -amylase, standardize and characterize the crude aqueous extract of the leaves of this plant. To achieve the proposed goal, the crude aqueous extract was standardized according to the presence of the chemical marker catechin, fractionated and evaluated for its inhibitory effect on the activity of  $\alpha$ -amylase. The crude aqueous extract showed 47.51 mg of catechin per gram of extract. The fractions with potential inhibitory activity on  $\alpha$ -amylase were isopropanolic fractions and its subfractions I8 , I16 , I17 , I20 and I21, besides the crude aqueous extract. The presence of ellagic acid in the subfraction with highest inhibitory potential (I8) was identified. The  $IC_{50}$  values of crude extract and isopropanolic fraction (14.92 and 8.06  $\mu$ g/mL, respectively), were close to the  $IC_{50}$  inhibition positive control acarbose (5.58  $\mu$ g/mL). The subfractions showed  $IC_{50}$  values greater than control. No cytotoxicity was observed for the crude aqueous extract and isopropanolic fraction in concentrations near the  $IC_{50}$  values for  $\alpha$ -amylase. A fast and reliable chromatographic method for determination of flavonoid catechin in the crude extract was developed because wide range of linearity and excellent accuracy were observed. Moreover, the method was robust and accurate, properly informing its limit of detection and quantification.

Keywords: enzyme inhibition;  $\alpha$ -amylase; standardization; *Eugenia dysenterica*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura tridimensional da $\alpha$ -amilase. O domínio A está representado em azul escuro (hélices) e azul claro (folhas $\beta$ e espirais aleatórias), o domínio B em amarelo e domínio C em verde. A seta aponta para o sítio ativo fenda entre os domínios A e B .....	21
Figura 2. Estruturas básicas a- flavonois, b- antocianinas, c- flavononas, d- catequinas, e- chalconas .....	25
Figura 3. Esquema de obtenção do extrato aquoso bruto liofilizado de <i>E. dysenterica</i> .....	30
Figura 4. Esquema de obtenção da fração isopropanólica .....	32
Figura 5. Obtenção das subfrações isopropanólicas .....	35
Figura 6. Reação do DNS com o açúcar redutor .....	37
Figura 7. Curva padrão com as absorbâncias obtidas com concentrações crescentes de ácido gálico ( $\mu\text{g/mL}$ ). Cada ponto representa a média $\pm$ desvio padrão em triplicata .....	45
Figura 8. Reação de formação do complexo flavonóide-Al .....	46
Figura 9. Curva padrão com as absorbâncias obtidas com concentrações crescentes de quercetina ( $\mu\text{g/mL}$ ). Cada ponto representa a média $\pm$ desvio padrão em triplicata .....	47
Figura 10. Atividade redutora do BHT no método de fosfomolibdênio. Curva padrão com as absorbâncias obtidas em três experimentos com concentrações crescentes de BHT ( $\text{mg/mL}$ ). Cada ponto representa a média $\pm$ desvio padrão em triplicata. ....	50
Figura 11. Atividade redutora da quercetina no método de fosfomolibdênio. Curva padrão com as absorbâncias obtidas em três experimentos com concentrações crescentes de quercetina ( $\text{mg/mL}$ ). Cada ponto representa a média $\pm$ desvio padrão em triplicata .....	50
Figura 12. Porcentagem de resíduos sólidos em cada extração.....	54
Figura 13. Porcentagem de umidade em cada extração após liofilização .....	55

Figura. 14 a: Perfil da CCD, da fluorescência por UV do extrato aquoso (1), fração isopropanólica (2) de folhas de <i>E. dysenterica</i> comparado aos padrões de catequina (3) e epicatequina (4) .....	57
Figura 14 b: perfil da CCD, após revelação com solução de Vanilina/Ácido do extrato aquoso (1), fração isopropanólica (2) de folhas de <i>E. dysenterica</i> comparado aos padrões de catequina (3) e epicatequina (4) .....	57
Figura 15. Valores de IC <sub>50</sub> do ensaio de inibição de amilase. 1) Acarbose (controle); 2) extrato aquoso; 3) fração isopropanólica; 4) subfração I8; 5) subfração I16; 6) subfração I17; 7) subfração I20; 8) subfração I21.....	60
Figura. 16 a) Perfil cromatográfico de extrato bruto aquoso de <i>E. dysenterica</i> por CLAE a 280 nm. ....	63
Figura. 16 b) Espectro UV do pico catequina. Picos: 1-catequina; 2-epicatequina .....	63
Figura. 17 a) Perfil cromatográfico da fração isopropanólica por CLAE a 280 nm. Picos: 1-catequina; 2-epicatequina .....	64
Figura. 17 b) Espectro UV do pico catequina da fração isopropanólica .....	64
Figura 18. Perfil cromatográfico da subfração I20 <i>E. dysenterica</i> por CLAE a 280 nm. ....	65
Figura 19. Perfil cromatográfico da subfração isopropanólica I21 <i>E. dysenterica</i> por CLAE a 280 nm. ....	66
Figura. 20 a) Perfil cromatográfico da fração I8 <i>E. dysenterica</i> por CLAE a 254 nm. Picos: 1-ácido elágico .....	67
Figura. 20 b) Espectro UV da subfração I8. ....	67
Figura. 21 a) Perfil cromatográfico do padrão de ácido elágico por CLAE a 254 nm. Picos: 1-ácido elágico .....	68
Figura. 21 b) Espectro UV do padrão ácido elágico .....	68



Figura 22. Estrutura molecular do ácido elágico .....	69
Figura. 23 a) Perfil cromatográfico do extrato aquoso bruto de <i>E. dysenterica</i> em CLAE a 280 nm. Onde, a = Extrato aquoso bruto (1 mg/mL) .....	70
Figura. 23 b) Perfil cromatográfico do padrão de catequina (50 µg/mL) em CLAE a 280 nm. ....	71
Figura 24. Perfil cromatográfico de extrato aquoso bruto de <i>E. dysenterica</i> por CLAE a 280 nm. ....	72
Figura 25. Perfil cromatográfico do extrato aquoso após hidrólise ácida a 280 nm .....	73
Figura 26. Perfil cromatográfico do extrato aquoso após hidrólise básica a 280 nm .....	74
Figura 27. Curva de regressão linear de catequina .....	76
Figura 28. Curva da medida da atividade doadora de H <sup>•</sup> ao radical DPPH <sup>•</sup> para o extrato de <i>E. dysenterica</i> . Os resultados representam a média de três determinações ± EPM .....	82
Figura 29 a) Ensaio de citotoxicidade em linhagens de células queratinócitos (HaCat) e fibroblastos (L-929). Células tratadas com extratos na concentração de 500 µg/mL. Os resultados representam a média de três experimentos independentes, cada um em triplicada. O tratamento foi realizado durante 24h. Controle normalizado para 100%. *p 0,05 vs controle. Onde: EDa = <i>E. dysenterica</i> extrato aquoso bruto; EDI = <i>E. dysenterica</i> fração isopropanólica .....	83
Figura 29 b) Ensaio de citotoxicidade em linhagens de células queratinócitos (HaCat) e fibroblastos (L-929). Células tratadas com extratos na concentração com valores de IC <sub>50</sub> . Os resultados representam a média de três experimentos independentes, cada um em triplicada. O tratamento foi realizado durante 24h. Controle normalizado para 100%. *p 0,05 vs controle. Onde: EDa = <i>E. dysenterica</i> extrato aquoso bruto; EDI = <i>E. dysenterica</i> fração isopropanólica .....	84

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Gradiente de eluição na análise por CLAE .....	36
Tabela 2 - Gradiente de eluição na análise por CLAE .....	40
Tabela 3 - Concentração teórica de <i>E. dysenterica</i> para a análise de exatidão .....	43
Tabela 4. Valores obtidos de sólidos totais e umidade polifenóis nos estudos de reprodutibilidade do processo de obtenção do extrato aquoso bruto de <i>E. dysenterica</i> .....	56
Tabela 5. Extrato aquoso e frações obtidas e potencial de inibição em $\alpha$ -amilase ..	58
Tabela 6 - Degradação por hidrólise ácida (HCL 1M) e básica (NaOH 1M) do extrato aquoso de <i>E. dysenterica</i> .....	75
Tabela 7 - Linearidade de catequina, limite de detecção e limite de quantificação de catequina na análise do método por CLAE .....	76
Tabela 8 - Precisão do método para quantificação de catequina em <i>E. dysenterica</i> .....	77
Tabela 9 - Exatidão do método por CLAE .....	78
Tabela 10 - Resultados da variação de comprimento de onda no ensaio robustez ..	78
Tabela 11 - Resultados da variação de temperatura no ensaio de robustez .....	79
Tabela 12 - Resultados da variação de fluxo no ensaio robustez .....	79
Tabela 13 - Equivalência do extrato bruto de <i>E. dysenterica</i> em relação a quercetina e BHT .....	81

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHT	Butilhidroxitolueno
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNS	Ácido dinitrosalicílico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EQ	Equivalentes de quercetina
CCDAE	Cromatografia em camada delgada de alta eficiência.
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC50	Concentração capaz de inibir 50% a atividade máxima
OMS	Organização Mundial de Saúde
MTT	Brometo de (3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio)
RAM	Reações Adversas a Medicamentos
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
UB	Herbário da Universidade de Brasília
UV	Ultra-Violeta
$\lambda$	Comprimento de onda

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>17</b>
2.1 DIABETES MELLITUS .....	17
2.2 $\alpha$ -AMILASE .....	19
2.3 INIBIDORES DA $\alpha$ -AMILASE EXTRAIDOS DE PLANTAS .....	21
2.5. PADRONIZAÇÃO DE EXTRATOS .....	26
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>29</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
4.1 MÉTODOS GERAIS .....	30
<b>4.1.1 Material botânico</b> .....	30
<b>4.1.2 Obtenção do extrato bruto</b> .....	30
4.1.2.1 Rendimento.....	31
4.1.2.2 Teor de sólidos totais.....	31
4.1.2.3 Teor de umidade.....	31
4.1.2.4 Reprodutibilidade do processo de obtenção do extrato aquoso bruto de <i>E. dysenterica</i> .....	31
4.1.2.5 Obtenção das frações.....	31
<b>4.1.2 Preparo das soluções</b> .....	32
4.1.2.1 Soluções de extrato .....	32
4.1.2.2 Solução Tampão fosfato de sódio 20 mM pH 6,9 .....	32
4.1.2.3 Solução de $\alpha$ -amilase 40 U/mL .....	33
4.1.2.4 Solução de amido 1,0% .....	33
4.1.2.5 Solução reagente de ácido dinitrosalicílico (DNS).....	33
4.1.2.6 Solução de acarbose 1,0 mg/mL .....	33
4.1.3.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	33
4.1.3.1.1 <i>Fase estacionária (FE)</i> .....	34
4.1.3.1.2 <i>Fase móvel</i> .....	34
4.1.3.2 Cromatografia em coluna de exclusão em gel de Sephadex LH 20 ..	35
4.1.3.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	35
4.1.4.1 Ensaio da atividade enzimática da $\alpha$ -amilase.....	36

4.1.4.2 Controle positivo para a atividade de inibição sobre a $\alpha$ -amilase.....	37
4.1.4.3 Determinação da porcentagem de inibição enzimática .....	38
4.1.4.5 Determinação dos valores de IC50 dos extratos vegetais.....	38
4.1.4.6 Análise estatística .....	39
4.1.5.1 Avaliação do perfil cromatográfico por CLAE e determinação teor de catequina .....	39
4.1.5.2 Validação da metodologia de determinação do teor de catequina no extrato aquoso de <i>E. dysenterica</i> por CLAE.....	40
4.1.5.2.1 Seletividade.....	40
4.1.5.2.2 Linearidade.....	41
4.1.5.2.2.3 Precisão .....	41
4.1.5.2.2.4 Limite de Detecção (LD).....	41
4.1.5.2.2.5 Limite de Quantificação (LQ).....	42
4.1.5.2.2.6 Exatidão .....	42
4.1.5.2.2.7 Robustez .....	43
4.1.5.2.2.8 Análise estatística dos resultados.....	43
4.1.6.1 Determinação de compostos fenólicos totais .....	44
4.1.6.2 Determinação de flavonoides totais.....	46
4.1.6.3. Atividade antioxidante.....	48
4.1.6.3.1 Método de Redução do Complexo Fosfomolibdênio .....	48
4.1.6.3.2. Método de Atividade doadora de H• ao radical DPPH •.....	51
4.1.6.4 Teste de citotoxicidade celular (MTT).....	51
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>5.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO BRUTO DE <i>E. dysenterica</i>.....</b>	<b>54</b>
5.1.1 Rendimento.....	54
5.1.2 Teor de resíduos sólidos totais.....	54
5.1.3 Teor de Umidade .....	55
5.1.4 Reprodutibilidade do processo de obtenção do extrato aquoso bruto de <i>E. dysenterica</i> .....	55
5.1.5 Avaliação fitoquímica da <i>E. dysenterica</i> .....	56
5.1.5.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	56
5.1.5.2 Obtenção das subfrações isopropanólicas.....	57
5.1.6 Determinação da atividade de inibição de $\alpha$ -amilase.....	58

5.1.6.1 Cromatografia Líquida de Alta eficiência (CLAE) .....	62
<b>5.2 PADRONIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE <i>E. dysenterica</i> .....</b>	<b>70</b>
<b>5.2.1 Avaliação do perfil cromatográfico e teor de catequina por CLAE .....</b>	<b>70</b>
<b>5.2.2 Validação do método de determinação do teor de catequina no extrato aquoso bruto de <i>E. dysenterica</i> por CLAE .....</b>	<b>72</b>
5.2.2.3 Seletividade .....	72
5.2.2.4. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) .....	74
5.2.2.5 Lineareidade .....	74
5.2.2.6 Precisão .....	77
5.2.2.7 Exatidão .....	77
5.2.2.8 Robustez .....	78
<b>5.3 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE <i>E. dysenterica</i> .....</b>	<b>79</b>
<b>5.3.1 Determinação de Fenólicos .....</b>	<b>79</b>
<b>5.3.2 Determinação de Flavonoides .....</b>	<b>80</b>
<b>5.3.4 Atividade Antioxidante .....</b>	<b>80</b>
5.3.5 Ensaio de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) .....	81
<b>5.4 Citotoxicidade celular (MTT) .....</b>	<b>82</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>85</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>87</b>

---

## 1 INTRODUÇÃO

---

O uso de medicamentos fitoterápicos nos países em desenvolvimento é de grande relevância. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) cerca de 80% da população dos países em desenvolvimento usa algum tipo de medicina tradicional em cuidados primários de saúde, enfatizando o uso de produtos fitoterápicos (1). Até 1985, dos 119 produtos químicos extraídos a partir de plantas e utilizados na medicina, 74% tiveram como origem o conhecimento popular e cerca de 50% dos medicamentos desenvolvidos entre 1981 e 2002 foram obtidos a partir de produtos naturais, semissintéticos, ou compostos sintéticos semelhantes aos produtos naturais. Além disso, aproximadamente 25% dos medicamentos prescritos foram obtidos direta ou indiretamente de plantas (2, 3). Alguns dos medicamentos relevantes que foram desenvolvidos a partir de plantas são a aspirina a partir da *Filipendula ulmar*, a morfina a partir de *Papaver somniferum* e a efedrina a partir de plantas do gênero *Ephedra* (4).

Neste contexto, o Brasil possui um papel relevante, pois é conhecido por sua rica diversidade biológica e pela vasta utilização de suas plantas pela população para tratar diferentes doenças (5). Ocupa o topo entre os 17 países mais ricos em biodiversidade do mundo, possuindo cerca de 20% do total de espécies do planeta (2). A abundância de espécies de plantas, animais e micro-organismos no ecossistema brasileiro, representa, sem dúvida, um importante diferencial no desenvolvimento de medicamentos (2).

Alguns autores afirmam que pelo menos metade das espécies existentes no Brasil possuem alguma propriedade terapêutica, no entanto menos de 1% desta diversidade tem sido objeto de estudos apropriados (6).

Muitas plantas de ecossistemas brasileiros, como do Cerrado e das florestas Atlântica e Amazônica são utilizadas na medicina tradicional. Vários estudos têm demonstrado uma forte correlação entre o uso popular e atividade farmacológica experimentalmente demonstrada (3). Muitas plantas são importantes fontes de composto bioativos com propriedades de promoção da saúde, tais como antihiperlipidêmico, antioxidante, antiinflamatória, antimicrobiana entre outras (5).

A *Eugenia dysenterica* DC. popularmente conhecida como cagaita ou cagaiteira, é uma árvore frutífera da família Myrtaceae, nativa do Cerrado brasileiro.

Em geral, suas folhas são usadas como antidiarréicos enquanto seus frutos possuem propriedades laxantes de acordo com o uso popular (5, 7). Além disso, o chá de suas folhas é popularmente utilizado para o tratamento de diabetes e icterícia e o chá das flores é utilizado para tratar infecções renais e da bexiga (8). Nas folhas de *E. dysenterica* encontram-se elevados níveis de compostos fenólicos, tais como flavonoides e taninos o que confere atividade antihelmíntica e moluscicida (5). Estudos anteriores realizados por este grupo de pesquisa, revelou que dentre os extratos etanólico, hexânico e aquoso de *E. dysenterica* o extrato aquoso apresentou significativo potencial de inibição para a enzima  $\alpha$ -amilase, quando comparado a inibição exercida pela substância Acarbose (padrão Sigma Aldrich para inibição de  $\alpha$ -amilase) (9).

Desta mesma forma, muitos outros estudos têm sido desenvolvidos buscando plantas medicinais com atividade biológica. Por exemplo, fármacos que inibem seletivamente enzimas chave, em diferentes processos metabólicos, e com menores efeitos adversos, tem despertado interesse para a indústria farmacêutica.

No entanto, esses medicamentos à base de plantas sofrem grandes desvantagens, como a má aceitação, pela falta de padronização dos extratos, falta de controle de qualidade e dados insuficientes sobre estudos clínicos (10). Consequentemente, o ceticismo em relação à sua eficácia não pode ser descartado. A padronização dos extratos que garante um nível mínimo de ingrediente ativo pertencente a uma espécie vegetal é, portanto, essencial e de extrema importância (10).

Neste sentido, a padronização do extrato aquoso de *E. dysenterica* e a sequência dos estudos para identificação do composto com atividade inibitória da enzima  $\alpha$ -amilase, poderá contribuir para o desenvolvimento de novos medicamentos, melhorando a qualidade de vida dos pacientes com diabetes.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

### 2.1 DIABETES MELLITUS

O diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica crônica, de etiologia múltipla, caracterizada fundamentalmente por hiperglicemia resultando na deficiência da secreção de insulina, ou na incapacidade da insulina exercer seus efeitos adequadamente, ou ambos, e provocando alterações no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas (11-13).

O paciente com diabetes, após alguns anos pode apresentar complicações como retinopatia, a nefropatia, a neuropatia, a micro-angiopatia e risco aumentado de doenças cardiovasculares (12). Há relatos de que os indivíduos afetados por diabetes tipo 2 associam aos fatores de risco já citados a hipertensão, dislipidemia e obesidade (14).

Diabetes mellitus, como uma das doenças comuns globais, está associada a uma redução da qualidade de vida e aumento do risco de mortalidade e morbidade. A prevalência de diabéticos em todo o mundo aumentou drasticamente nos últimos 40 anos, devido ao estilo de vida moderno, crescimento e envelhecimento da população, urbanização e ao aumento do consumo de dietas ricas em carboidratos (15). Segundo a OMS é estimado que atualmente mais de 180 milhões de pessoas no mundo tenham diabetes e é provável que este número dobre até 2030. O que torna o DM um problema de saúde pública global (13, 14, 16). Em 1998, o Brasil tinha aproximadamente 4,9 milhões de adultos com diabetes. Estima-se que em 2025 esse número chegue a 11,6 milhões de diabéticos (17, 18).

O diabetes pode se apresentar de duas formas. O diabetes tipo 1, causado pela destruição das células  $\beta$ -pancreáticas, representa 5 a 10% de todos os casos de diabetes no mundo. Neste tipo de DM os pacientes fazem uso de insulina exógena, pois ocorre uma deficiência total de insulina, evitando assim a cetoacidose e níveis elevados de glicemia (19, 20).

O diabetes tipo 2 é a forma mais comum de diabetes, representando cerca de 90% de todos os casos. Esta desordem metabólica crônica é caracterizada principalmente pela resistência à insulina, relativa deficiência de insulina, e um aumento anormal do açúcar no sangue logo após uma refeição (hiperglicemia pós-

prandial) (11). Está associada com comorbidades como obesidade, hipertensão e doenças cardiovasculares (21). Uma boa abordagem para a hiperglicemia pós-prandial é suprimir ou retardar a digestão e absorção de carboidratos na dieta (15). A digestão do amido ocorre principalmente no intestino delgado com a ação de enzimas pancreáticas como a  $\alpha$ -amilase, que degrada os carboidratos em oligossacarídeos e dissacarídeos. E pelas  $\alpha$ -glicosidases na membrana de células intestinais, que hidrolisam esses oligo e dissacarídeos em monossacarídeos. Uma estratégia eficaz para o controle do diabetes tipo 2 tem sido através da inibição destas enzimas (11, 12, 15).

As estratégias terapêuticas para o tratamento de diabetes tipo 2 incluem a redução da demanda de insulina, a estimulação da secreção endógena de insulina, o aumento da ação da insulina nos tecidos alvo, a inibição da degradação de oligo e dissacarídeos, e os medicamentos comumente usados na clínica para tratar ou controlar diabetes são a insulina, sulfoniluréias, biguanidas, inibidores da glicosidase, tiazolidinadionas (12). No entanto, cada uma destas terapias provoca reações adversas a medicamentos (RAM) que reduzem a qualidade de vida dos pacientes (22).

O DM tipo 2 tem sido tratado com sulfoniluréias por quase 50 anos, é muito comum o uso desta classe de medicamentos, como linha secundária no tratamento e controle de diabetes. Cerca de 35% dos pacientes de DM tipo 2 fazem uso desta classe de medicamentos em mono terapia ou em associação com metformina e/ou tiazolidinadionas. Porém, a hipoglicemia induzida por sulfoniluréia é frequente. Um estudo prospectivo realizado no Reino Unido mostrou que 11 a 17,7% destes pacientes experimentam a hipoglicemia, que pode resultar em hospitalização ou morte. Sendo que, eventos hipoglicêmicos graves ocorrem em 1,2% dos pacientes (23). Alguns estudos mostram que falta de seletividade pelos receptores SUR (receptores de sulfoniluréia) pode levar a interações com o coração e com vasos sanguíneos, aumentando a mortalidade por doenças cardiovasculares (24).

As biguanidas são conhecidas como sensibilizadores de insulina utilizados em casos de hiperglicemia pós prandial. Após décadas de estudos persistiu apenas a metformina por se comprovar que a utilização das outras biguanidas apresentavam risco de acidose láctica. Apesar de não apresentar um mecanismo de ação totalmente elucidado, é a classe mais prescrita no mundo. A acidose láctica é um fator limitante para a prescrição deste medicamento, razão pela qual seu uso é

contra indicado para indivíduos com insuficiência renal, hepática ou cardíaca. Outros possíveis efeitos adversos são os transtornos gastrointestinais como: vômitos, diarreia e anorexia (24).

A acarbose é um pseudotetrassacarídeo isolado de fungos do gênero *Actinoplanes* sp., com atividade de inibição competitiva e reversível sobre a  $\alpha$ -amilase (25). O miglitol é o primeiro pseudomonossacarídeo, análogo da glicose, derivado de desoxinojirimicina inibidor de  $\alpha$ -glicosidase. É absorvido na porção superior do intestino delgado, resultando na ineficácia da  $\alpha$ -glicosidase na porção inferior do intestino delgado, o que permite a supressão precoce da elevação da glicose pós-prandial, devido a baixa absorção dos carboidratos. (26-28).

Estudos preliminares com fármacos que atuam como agonistas dos receptores PPAR  $\alpha/\gamma$  mostraram decréscimo no colesterol LDL com aumento no colesterol HDL, bem como um decréscimo nos triglicérides. No entanto, no ano de 2006 foram publicados estudos que associavam estes fármacos ao aumento da incidência de eventos cardiovasculares (24, 29). O muraglitazar, fármaco representante desta classe terapêutica, foi o primeiro a ter sua produção descontinuada na Europa e Estados Unidos, seguido pela proibição determinada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) da rosiglitazona no Brasil (24, 30, 31).

## 2.2 $\alpha$ -AMILASE

A  $\alpha$ -amilase ( $\alpha$ -1-4-4-glucano-glucanohidrolase; EC 3.2.1.1), principal produto de secreção do pâncreas e das glândulas salivares, pertence à família das endo-amilases (glicosil hidrolases) que são responsáveis por catalisar a hidrólise inicial de amido em oligossacarídeos mais curtos a partir da clivagem de ligações  $\alpha$ -D-(1-4) glicosídicas. Os produtos finais da ação da  $\alpha$ -amilase são oligossacarídeos de diversos tamanhos em uma configuração anomérica  $\alpha$  e dextrinas limites, na qual constituem uma mistura de maltose, maltotriose, e oligossacarídeos de 6-8 unidades de glicose que contém ligações  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6 (12, 32, 33). Outras enzimas amilolíticas participam do processo de hidrólise do amido, porém a  $\alpha$ -amilase é considerada a enzima chave no sistema digestivo, pré-requisito para o início do processo (12). A degradação do amido presente na dieta prossegue rapidamente e conduz a hiperglicemia pós-prandial elevada. Tem sido demonstrado que a atividade

do eixo pancreático humano  $\alpha$ -amilase (HPA), no intestino delgado, se correlaciona com um aumento nos níveis de glicose pós-prandial, o controle do qual é, portanto, um aspecto importante no tratamento da diabetes de tipo 2 (34) .

A  $\alpha$ -amilase é uma proteína monomérica, cálcio dependente, com aproximadamente 50kDa, composta por 512 aminoácidos e com três domínios estruturais A, B e C (Figura 1). O sítio ativo da  $\alpha$ -amilase está situado em uma fenda longa entre os domínios A e B. O cofator ( $\text{Ca}^{2+}$ ) se liga a enzima na fenda entre os domínios A e B, pode atuar estabilizando a estrutura tridimensional e como ativador alostérico. O domínio B está inserido entre os domínios A e C e está ligado ao domínio A por ligação dissulfeto. O domínio C apresenta-se em estrutura de folha  $\beta$ , parece ser independente e está ligado ao domínio A por uma simples cadeia polipeptídica (35). Além da ligação com o cálcio, a enzima possui um sítio ligante de cloro no domínio A, próximo ao sítio ativo. O sítio de ligação ao substrato contém 5 subsítios com o sítio catalítico posicionado no subsítio 3. A  $\alpha$ -amilase cliva preferencialmente as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 presentes no interior da molécula (35, 36).

Fisiologicamente, a  $\alpha$ -amilase apresenta um papel importante na digestão do amido proveniente da dieta (36). Portanto, o retardo da digestão do amido através da inibição de enzimas, como a amilase desempenha um papel chave no controlo da diabetes. Inibidores da  $\alpha$ -amilase pancreática leva ao atraso da digestão de carboidratos, conseqüentemente causa uma redução na taxa de absorção de glicose e, assim baixam-se os níveis de glicose pós-prandial no sangue. Alguns inibidores atualmente em uso clínico são a acarbose, voglibose e miglitol que inibem glicosidases como por exemplo  $\alpha$ -glicosidase e  $\alpha$ -amilase em pacientes com diabetes tipo 2. No entanto, estes inibidores não específicos causam efeitos secundários, tais como distensão abdominal, flatulência, meteorismo, diarreia por causa do excesso de inibição de  $\alpha$ -amilase. Assim os esforços têm sido dirigidos para encontrar inibidores naturais e seguros de  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase com o mínimo de efeitos secundários (11, 21, 34, 37).

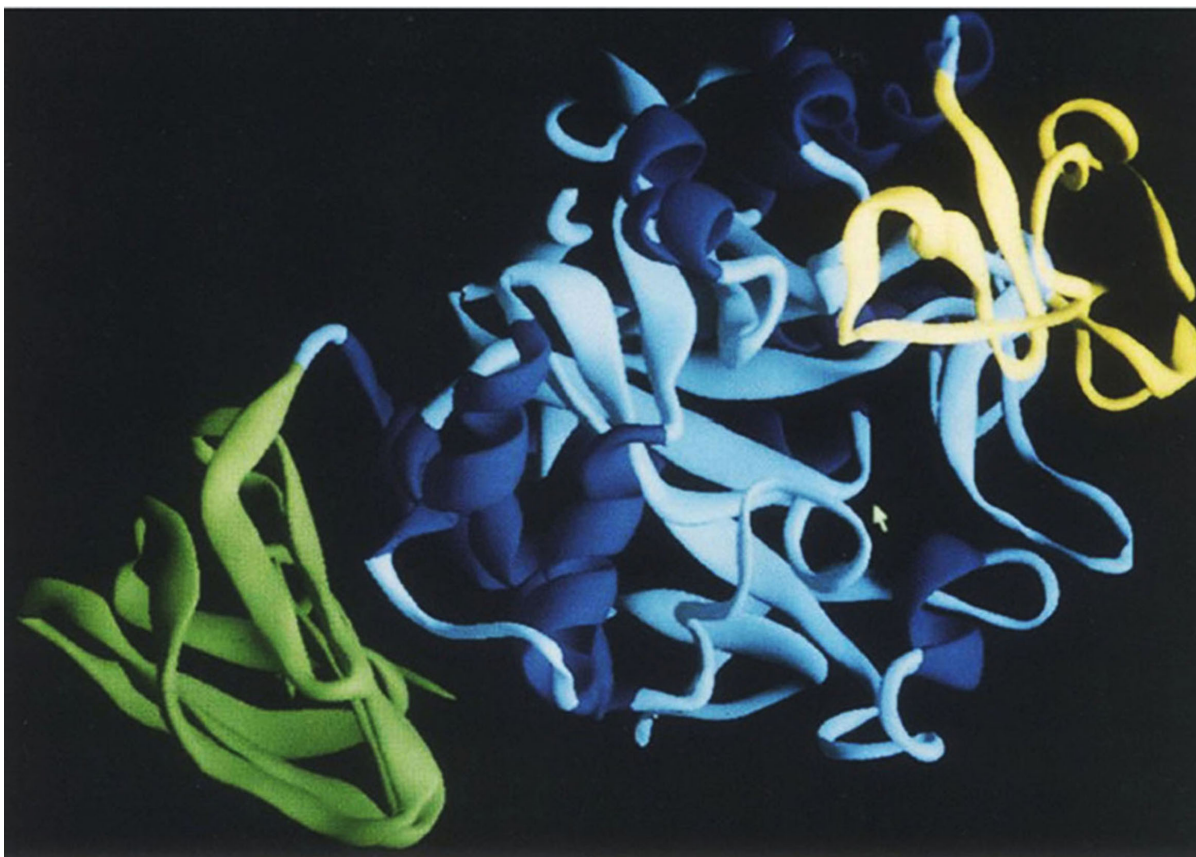


Figura 1. Estrutura tridimensional da  $\alpha$ -amilase (Buisson et. al. 1987) . O domínio A está representado em azul escuro (hélices) e azul claro (folhas  $\beta$  e bobinas aleatórias), o domínio B em amarelo e domínio C em verde. A seta aponta para o sítio ativo fenda entre os domínios A e B (38).

### 2.3 INIBIDORES DA $\alpha$ -AMILASE EXTRAIDOS DE PLANTAS

Alimentos de origem vegetal podem ser boas fontes de inibidores das glicosidases, devido ao baixo custo e relativa segurança. Frações polifenólicas de plantas mostraram inibir a atividade de  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase, permitindo assim um controle mais rígido da glicose sanguínea (37). Compostos ricos em flavonoides e polifenóis, como extratos de semente de uva e chá verde têm sido de grande interesse devido as suas propriedades antidiabéticas. O chá verde é abundante em catequinas, a quem são atribuídos os benefícios antidiabéticos do consumo deste (39, 40). O extrato de semente de uva contém não apenas catequinas, mas também flavonoides oligoméricos, como as procianidinas que são uma subclasse da proantocianidinas. Estas são os flavonoides em maior porcentagem no extrato de

sementes de uva. Ambos, flavonoides monoméricos e oligoméricos interagem com as enzimas glicosidase e podem atuar como inibidores eficazes de  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase (37).

Pinto et. al (2010) testaram duas soluções aquosas de pós de Cramberry como inibidores de  $\alpha$ -amilase e ambos apresentaram atividade de inibição, com  $IC_{50}$  muito próximos dos valores da Acarbose (14).

Extratos aquoso bruto, metanólico bruto e frações acetato de etila de *Antidesma madagascariense* e *Faujasiopsis senacia* foram testados e apresentaram atividade inibitória significativa ( $p < 0,05$ ) sobre a  $\alpha$ -amilase, de forma dose dependente. As concentrações dos extratos e frações variaram entre 62,5 a 2000  $\mu\text{g/mL}$ . As frações acetato de etila de *Antidesma madagascariense* e *Faujasiopsis senacia* em concentração de 2000  $\mu\text{g/mL}$  tiveram ação inibitória de 95,26%, e 87,54%, com valores de  $IC_{50}$  igual a 61,52  $\mu\text{g/mL}$  e 27,36  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. Apresentando valores inferiores ao padrão acarbose, neste estudo (41).

O extrato bruto do fruto de maqui (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz), arbustos nativos chilenos muito utilizados na medicina popular para tratar distúrbios digestivos como diarreia e disenteria, apresentou atividade inibitória da  $\alpha$ -amilase com  $IC_{50}$  (41,5mg / L). O que pode ser explicado pelo conteúdo de polifenóis de 73% no fruto. Pois, o teor de polifenóis e a atividade inibitória de  $\alpha$ -amílase mostrou uma forte correlação (coeficiente de correlação 0,854) (42).

A *Syzygium cumini* (*Eugenia jambolana*), uma espécie da família Myrtaceae, bastante estudada apresentou uma redução significativa dos níveis de glicose no sangue de ratos com a utilização de extratos das sementes do fruto. Outro estudo que demonstrou uma alta inibição sobre a atividade da  $\alpha$ -amilase identificou os compostos ácido betulínico e uma flavonona no extrato aquoso da semente dessa espécie (43).

Galeno et. al. (2013) em seus estudos com *Eugenia puniceifolia* (Kunth) DC., outra espécie da família Myrtaceae, observou que esta planta apresenta inibição sobre a  $\alpha$ -amilase com melhores valores de  $IC_{50}$  que os valores da quercetina 0,60 mg/mL neste estudo (44).

Um *screening* com plantas do Cerrado brasileiro foi realizado por Souza et. al. (2012) no qual o extrato aquoso bruto de *E. dysenterica* apresentou alto potencial de inibição de  $\alpha$ -amilase com  $IC_{50}$  igual a 14,93  $\mu\text{g/mL}$  (43).

## 2.4 O CERRADO

O Brasil é dotado com a maior diversidade vegetal do planeta, com mais de 40.000 espécies de plantas diferentes, distribuídos em diversos ecossistemas: Mata Atlântica, Floresta Amazônica, Cerrado, Caatinga, Pantanal e Pampas. Representando 20% da flora do mundo (45-47). Além disso, o país também tem uma enorme diversidade cultural o que reflete os diferentes usos dos seus recursos naturais. Essa imensa diversidade vegetal e cultural tem favorecido a diversificação de uma farmacopéia popular, com base em plantas medicinais (47). Os “raizeiros” (médicos raiz) descritos pelos antropólogos, na segunda metade do século 20, ainda podem ser encontrados em muitos lugares no Brasil. No entanto, a biodiversidade do país ainda não foi totalmente elucidada, uma vez que muitas espécies de plantas continuam a ser investigadas (48).

As savanas estão espalhadas em todo o mundo, especialmente em regiões tropicais, cobrindo cerca de um quinto da superfície terrestre global, e 45% da América do Sul. No Brasil, a formação Cerrado constitui o segundo maior bioma, ocupa cerca de um quarto do território brasileiro, o que corresponde a cerca de 2 milhões de quilômetros quadrados (IBGE, 2004), ficando atrás somente da Amazônia (49, 50).

O Cerrado é caracterizado por um mosaico de vegetação, variando de pastagens a formações florestais, com árvores e arbustos de até 8-20 m de altura. É comum a ocorrência de fogo e a distribuição sazonal de chuvas, o que proporciona solos altamente intemperizados e com baixo teor de nutrientes, influenciando assim a seleção das espécies com alta retenção de nutrientes e a diversidade química presente em sua vegetação (49, 51). Frente às necessidades primordiais, às pressões sofridas por micro-organismos patogênicos presentes no ambiente, às atividades aliadas a segurança, adaptação e interação das plantas com o meio ambiente, estas fornecem múltiplos compostos vegetais. Dentre estes compostos encontram-se os metabólitos secundários (substâncias biotransformadas) (52, 53), que podem ser distribuídos de forma heterogênea na planta e seus teores podem ser instáveis, dependendo da sazonalidade, temperatura, umidade, tipo de solo, período da coleta, forma de uso (*in natura* ou desidratado), dentre outras características (54, 55). A produção de metabólitos secundários pelas plantas, além de promover adaptações evolutivas, exercendo a proteção da espécie promove o

restabelecimento da saúde humana (54, 56). Muitas bioatividades como antioxidante, anticancerígena e antihiperlipidêmica são atribuídas aos metabólitos secundários. Estas propriedades são propiciadas por compostos fenólicos como flavonoides, terpenos, alcalóides e taninos (57, 58). Os flavonoides são metabólitos secundários presentes em quase todas as fases de crescimento das plantas. São o pigmento vegetal mais abundante, juntamente com clorofila e carotenóides. Sua estrutura básica é composta por dois anéis aromáticos ligados por uma estrutura de três carbonos. Os flavonoides podem ser agrupados em diferentes classes, como os flavonóis, antocianinas, flavononas, catequinas e chalconas. Suas estruturas estão apresentadas na Figura 2 (59). As plantas do Cerrado brasileiro são de grande valor terapêutico, tendo algumas atividades biológicas confirmadas por estudos científicos. Há uma estimativa de 160 mil espécies de plantas, animais e fungos no “Bioma de Cerrado” (Savana). (60).

Diferentes plantas do Cerrado brasileiro têm sido amplamente utilizadas na medicina popular (61, 62). Dentro da biodiversidade do Cerrado destacam-se as espécies da família Myrtaceae, uma das mais importantes famílias da flora brasileira, com 129 gêneros e cerca de 4620 espécies. *Eugenia* é o gênero em destaque no uso medicinal com aproximadamente 500 espécies (63). O gênero *Eugenia* destaca-se também por ser alvo de estudos quanto ao potencial antihiperlipidêmico.

A espécie *Eugenia uniflora* além de ser utilizada como antitérmico, antiinflamatório e para baixar os níveis de glicose no sangue tem sido investigada quanto a sua eficácia no tratamento de doenças digestivas (64). Vários grupos de estudo tem relatado o potencial antihiperlipidêmico e anti-diabético de frações ricas em flavonoides do extrato de semente de *Eugenia jambolana*. Estas propriedades são atribuídas a sua capacidade de modular as enzimas metabolizadoras de carboidratos e lipídios de ratos diabéticos, bem como atenuar a diferenciação de adipócitos *in vitro* (65, 66). No Brasil, os frutos e folhas da espécie *E. malaccensis* L., conhecida como jambo vermelho, são popularmente utilizados como adstringentes e estimulantes do apetite, como diuréticos e no combate a anemias. Em várias partes do mundo, esta espécie é empregada, na medicina popular, como antiinflamatório, anti-diabético e como diurético.



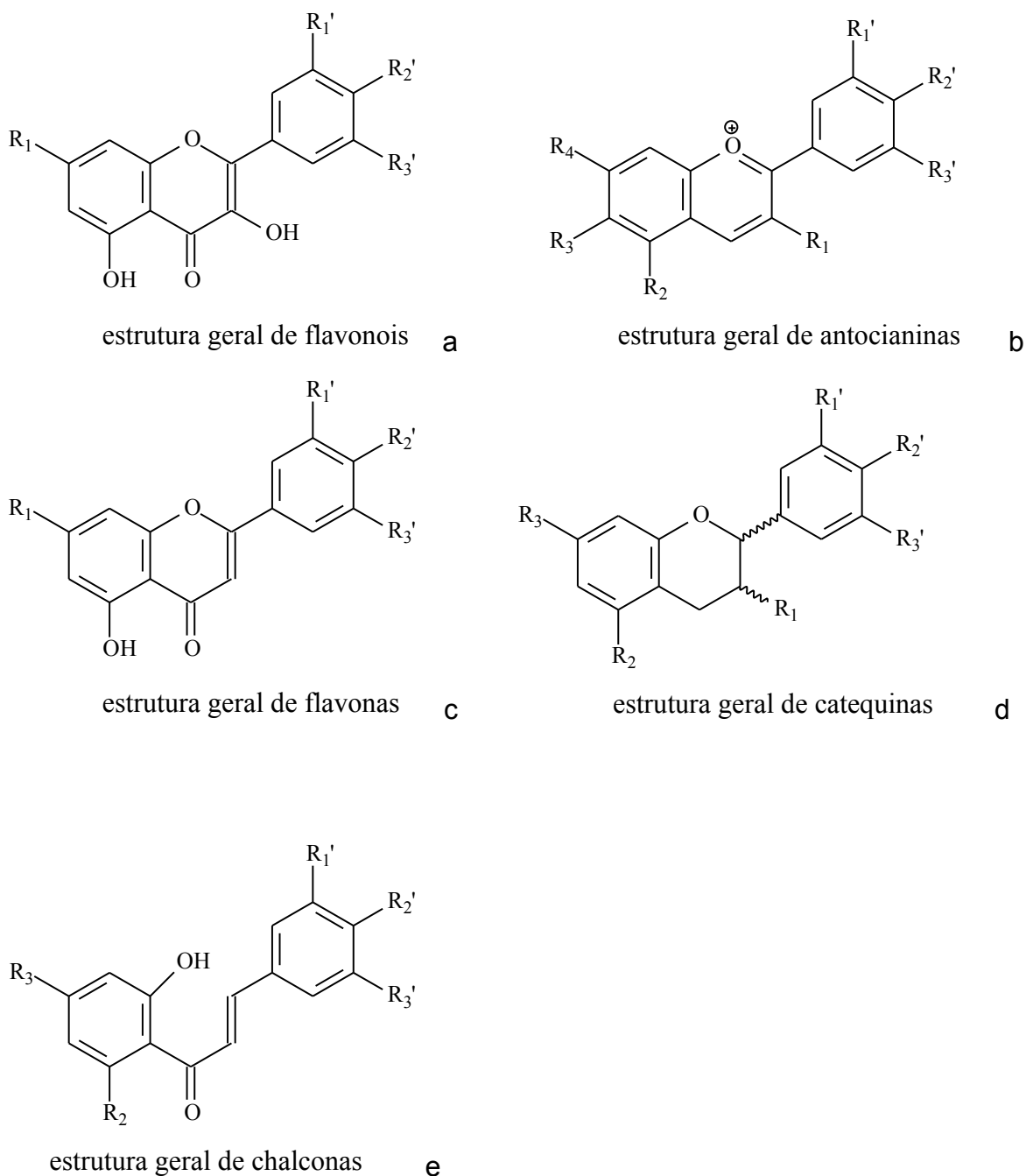


Figura 2. Estruturas básicas a- flavonóis, b- antocianinas, c- flavonas, d-catequinas, e- chalconas.

Estudos demonstram que o extrato aquoso das folhas inibiu fortemente as bactérias *Staphylococcus aureus* e do *Streptococcus pyogenes* (67).

A *Eugenia dysenterica* DC, conhecida como cagaita ou cagaiteira, é outra representante da família Myrtaceae, uma espécie frutífera nativa do Cerrado e amplamente utilizada pela população local como alimento (frutos) e tratamento de várias doenças (flores e frutos) como: diarreia, diabetes, icterícia, infecções renais e

de bexiga e como laxante (8, 62). Costa et. al. (2000), comprovaram em seus estudos a atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial de folhas de cagaiteira sobre *Cryptococcus neoformans* (61, 68). Extratos etanólico e aquoso de polpa, semente e cascas de *E. dysenterica* foram avaliados quanto ao potencial em sequestrar radicais livres por meio do modelo DPPH e apresentaram grande potencial antioxidante. Sendo que o extrato etanólico das sementes apresentou os melhores resultados com valor de IC<sub>50</sub> igual a 14,15 µg/mL (69). Cardoso et. al. (2011), determinaram a presença dos carotenóides pró-vitamina A (α e β-caroteno) e o teor de vitamina C em concentrações de 0,77 mg/100mg de polpa e 34,11 mg/100mg de polpa (70).

Recentes estudos realizados com a cagaiteira, reportaram sua ação inibidora para a atividade de enzimas como a tirosinase e α-amilsase, no entanto, o metabolito responsável por esta atividade ainda não havia sido elucidado (9, 43).

Porém, mesmo o Cerrado tendo uma alta riqueza de espécies (incluindo muitas espécies endêmicas) e sendo considerado um *hotspot* de biodiversidade, apenas 2,2% de sua área tem um *status* de proteção legal, o que aponta para a pouca atenção que este bioma recebe em relação a floresta tropical. Tem sido desmatado severamente nas últimas 4-5 décadas para os cultivos e criação de gado (49, 71).

Assim, considerando a grande diversidade de plantas do Cerrado, e as prováveis atividades biológicas dessas espécies, a cagaita foi selecionada para este estudo, em virtude de sua pluralidade de usos e da escassez de trabalhos científicos a seu respeito. O que torna relevante o estudo dessa espécie para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

## 2.5. PADRONIZAÇÃO DE EXTRATOS

O uso de ervas na medicina é a mais antiga forma de cuidados de saúde conhecida pela humanidade e tem sido empregado em todas as culturas ao longo da história. Aprendeu-se a distinguir plantas úteis das tóxicas por tentativa e erro, bem como as combinações e métodos de processamento que levassem a bons e consistentes resultados. Estima-se que cerca de 25% dos medicamentos modernos derivem direta ou indiretamente de plantas superiores. Geralmente, todos os medicamentos, sejam eles sintéticos ou de origem vegetal, deve cumprir os

requisitos básicos de segurança e eficácia (72).

A RDC nº 17/10 (BRASIL, 2010) denomina fitoterápico o medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança são validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos, de utilização, documentações tecnocientíficas ou evidências clínicas. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais (73).

Os medicamentos fitoterápicos são preparados a partir de matérias de origem vegetal, que são propensas à contaminação, deterioração e variação na composição (74). Fitomedicamentos apresentam também problemas inerentes à sua própria origem, como o local de plantio, a coleta e o processamento da matéria-prima. A complexidade de sua composição e a variabilidade na qualidade das drogas obtidas a partir da mesma espécie vegetal, levam a variações nas drogas vegetais, o que justifica a necessidade da padronização desses produtos (75). Muitos dos problemas que influenciam a qualidade dos medicamentos fitoterápicos não se aplicam aos medicamentos sintéticos. Por exemplo as misturas de eletivos, principio ativo desconhecido, métodos analíticos não disponíveis comercialmente, vegetais quimicamente diferentes, origem e qualidade da matéria prima (72).

A padronização de medicamentos fitoterápicos é um processo que envolve um conjunto de normas ou características inerentes, parâmetros constantes, valores qualitativos e quantitativos definidos que carregam uma garantia de qualidade, eficácia, segurança e reprodutibilidade. Vários métodos cromatográficos e espectrofotométricos podem ser experimentados para a identificação da presença de constituintes químicos diferentes. Sempre que possível, os métodos podem ser aplicados para a estimativa quantitativa do grupo bioativo dos compostos como alcalóides, flavonoides, componentes polifenólicos ou estimativa de um composto particular. Extratos feitos diretamente de material vegetal bruto mostram uma variação substancial na composição, qualidade e efeitos terapêuticos.

Extratos padronizados são extratos de alta qualidade contendo níveis consistentes de compostos especificados e são submetidos a rigorosos controles de qualidade durante todas as etapas e processos de fabricação. Quando os princípios

ativos são desconhecidos, devem ser estabelecidas substâncias marcadoras para fins analíticos e de normalização. Substâncias marcadoras são constituintes de um medicamento à base de plantas, que são importantes para a qualidade do produto acabado, quimicamente definido. Idealmente, os marcadores químicos escolhidos também seriam os compostos que são responsáveis pelos efeitos farmacológicos no corpo (72).

A padronização pode ser feita de duas formas. Na primeira, normalização verdadeira, um fitoquímico ou um grupo de componentes químicos é conhecido por ter a atividade, são considerados fitofármacos, altamente concentrados o que os torna mais eficazes do que a planta toda. O segundo tipo de normalização baseia-se na presença de uma percentagem de compostos marcadores que não são indicadores de atividade terapêutica ou de qualidade da erva (72).

Como exemplo de padronização de extratos temos o estudo realizado por Teh et. al. (2011) que padronizaram o extrato metanólico de *Eurycoma longifolia* a partir de cinco marcadores químicos (13  $\alpha$ -(21)-epoxieuricomano, euricomanol, euricomanol-2-O- $\beta$ -d-glucopiranosídeo e 13,21-diidroeuricomano) os quais também foram quantificados (76). O extrato hidroalcoólico de *Berberis aristata* teve o conteúdo de berberina determinado através da técnica de cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HTPLC). A análise quantitativa mostrou que o extrato apresenta 13,7% de berberina. Os autores avaliaram e apresentaram a padronização fitoquímica do extrato hidroalcoólico de *Berberis aristata*. O que torna esta informação útil como um padrão no futuro para identificação de adulterantes e diferenciação de outras espécies relacionadas de berberis (77). Extrato clorofórmico de *Tecomella undulata* foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa e padronizado em relação ao marcador químico quercetina (0,03% m/m) (78).

### 3 OBJETIVOS

---

O objetivo deste trabalho foi avaliar o extrato bruto e frações de *E. dysenterica*, quanto à atividade de inibição da enzima  $\alpha$ -amilase. Para que o objetivo proposto fosse alcançado, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

- ❖ Obter o extrato aquoso bruto de *E. dysenterica* e frações;
- ❖ Avaliar a capacidade de inibição da enzima  $\alpha$ -amilase pelo extrato aquoso bruto e frações da *E. dysenterica*;
- ❖ Determinar a concentração capaz de inibir 50% da atividade enzimática máxima do extrato e frações (IC50);
- ❖ Identificar os compostos químicos ativos na inibição da enzima  $\alpha$ -amilase pelo extrato aquoso bruto e frações da *E. dysenterica*.
- ❖ Padronizar do extrato aquoso bruto de *E. dysenterica*;
- ❖ Caracterizar o extrato padronizado de *E. dysenterica*;
- ❖ Determinar o potencial antioxidante do extrato aquoso bruto
- ❖ Avaliar a citotoxicidade do extrato aquoso bruto e frações de *E. dysenterica*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

---

### 4.1 MÉTODOS GERAIS

#### 4.1.1 Material botânico

As folhas de *E. dysenterica*, planta nativa do bioma Cerrado, foram coletadas no bioma Cerrado, na Universidade de Brasília, campus Darcy Ribeiro, Brasília, Distrito Federal e as exsiccatas foram depositadas no Herbário da UnB (UB 914) para assegurar a autenticidade da espécie coletada.

#### 4.1.2 Obtenção do extrato bruto

Depois de seco em estufa a 40 °C, pulverizado e passado em tamiz nº 0,01 *mesh* o extrato aquoso foi obtido por infusão do material botânico (100 g) em água destilada (500 mL) a aproximadamente 70 °C. A mistura foi deixada arrefecer até aproximadamente 40 °C, sendo então submetida à filtração. A solução extrativa resultante foi mantida a -30 °C e submetida ao processo de liofilização (Figura 3). O extrato bruto obtido foi conservado em baixa temperatura (-30 °C), até sua utilização nos ensaios biológicos.

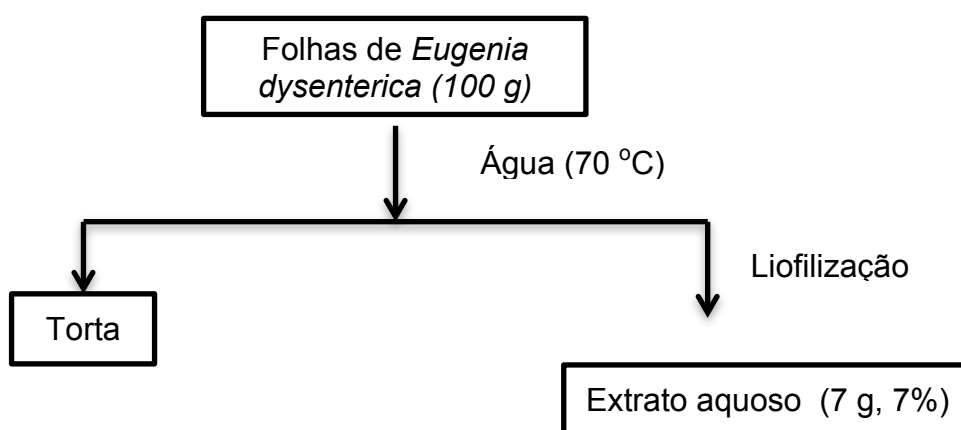


Figura 3. Esquema de obtenção do extrato aquoso bruto liofilizado de *E. dysenterica*.

#### 4.1.2.1 Rendimento

O rendimento dos extratos obtidos foi calculado pela relação do peso do extrato seco obtido pelo peso total do material botânico utilizado no início do processo de extração. Utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Rendimento} = \frac{pf}{pi} \times 100$$

Onde,  $pf$  = peso final e  $pi$  = peso inicial.

#### 4.1.2.2 Teor de sólidos totais

O teor de sólidos totais foi avaliado pelo método gravimétrico (79).

#### 4.1.2.3 Teor de umidade

Após a liofilização do extrato aquoso bruto o teor de umidade foi avaliado segundo o método gravimétrico.

#### 4.1.2.4 Reprodutibilidade do processo de obtenção do extrato aquoso bruto de *E. dysenterica*

Para avaliar a reprodutibilidade do método de extração, sete extrações diferentes foram processadas, seguindo as condições pré-estabelecidas. Nesta etapa, foram avaliados os seguintes parâmetros: teor de sólidos totais antes da liofilização do extrato, umidade após liofilização e concentração de catequina por CLAE.

#### 4.1.2.5 Obtenção das frações

O extrato aquoso bruto de *E. dysenterica* (7 g) foi lavado com 30 mL de isopropanol sucessivas vezes até esgotamento, filtrado e mantido em banho-maria para a evaporação do solvente (Figura 4). O precipitado de cor marrom foi armazenado a baixas temperaturas ( $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) até a utilização.

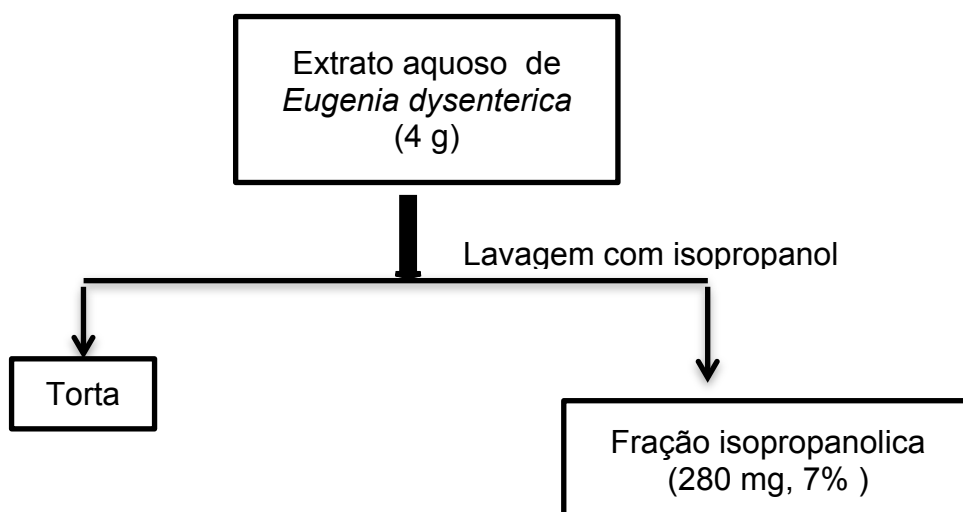


Figura 4. Esquema de obtenção da fração isopropanólica

#### 4.1.2 Preparo das soluções

##### 4.1.2.1 Soluções de extrato

O extrato para a validação do método bioanalítico e para a cromatografia líquida de alta eficiência foi preparado em balão volumétrico. Foram pesados 5,0 mg de extrato aquoso liofilizado de *E. dysenterica* e adicionado de metanol quantidade suficiente para 5 mL.

O extrato aquoso e as frações utilizados nos testes de inibição foram preparados em água destilada e metanol/DMSO (3:1) respectivamente. A concentração da solução-mãe do extrato e frações foram ajustadas para uma concentração final no ensaio de 1,0 mg/mL.

##### 4.1.2.2 Solução Tampão fosfato de sódio 20 mM pH 6,9

Foi adicionado em balão volumétrico 1,25 g de fosfato de sódio monobásico, 2,95 g de fosfato de sódio dibásico, 0,388 g de NaCl e o volume completado com água destilada quantidade suficiente para 1000 mL.



#### 4.1.2.3 Solução de $\alpha$ -amilase 40 U/mL

Em balão volumétrico foram adicionados 15 mg de  $\alpha$ -amilase pancreática de porco (Tipo VI, Sigma Aldrich) e completado o volume com tampão fosfato de sódio 20 mM pH 6,9 quantidade suficiente para 10 mL.

#### 4.1.2.4 Solução de amido 1,0%

Foi utilizado 0,2 g de amido (Sigma-Aldrich) em 20 mL de tampão fosfato de sódio 20 mM pH 6,9.

#### 4.1.2.5 Solução reagente de ácido dinitrosalicílico (DNS)

Em balão volumétrico foram adicionados 10,6 g de Ácido 3,5-dinitrosalicílico, 306,0 g tartarato de potássio de sódio, 19,8 g de NaOH e 8,3 g de bissulfito de sódio e o volume corrigido com água destilada em quantidade suficiente para 1400 mL.

#### 4.1.2.6 Solução de acarbose 1,0 mg/mL

Foi adicionado em balão volumétrico 10 mg de Acarbose (Sigma Aldrich) e completado o volume com tampão fosfato de sódio 20 mM pH 6,9 quantidade suficiente para 10 mL.

### 4.1.3 Análises Cromatográficas

#### 4.1.3.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

O extrato aquoso bruto, a fração isopropanólica e suas subfrações obtidas foram eluídas em CCD.

#### 4.1.3.1.1 Fase estacionária (FE):

- Placas de sílica gel 60G (Merck), preparadas em suporte de vidro, com 0,25 mm de espessura (analítica) previamente ativadas a 105 °C.
- Placas de sílica gel 0,2 mm Kieselgel 60 ALUGRAM SIL G. (MARCHÉREY-NAGEL).

#### 4.1.3.1.2 Fase móvel:

##### Reveladores

##### a- Solução ácida de anisaldeído

Reagente para detecção de esteroides, prostaglandinas, carboidratos, fenóis, glicosídeos, terpenos de modo geral (óleos essenciais), antibióticos, micotoxinas.

Solução A: Solução de anisaldeído em ácido acético 2,0%.

Solução B: Solução etanólica de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20%.

A cromatoplaça foi borrifada com a solução A, em seguida, com a solução B e foi então aquecida à temperatura de 100°C. Revelador geral.

##### b- Reagente NP/PEG

Reagente para detecção de flavonoides e outras substâncias fenólicas pela intensificação da fluorescência.

Solução A: solução metanólica de difenilboriloxietilamina 2,0%.

Solução B: solução etanólica de polietilenoglicol-400 (PEG 400) 5,0%.

A cromatoplaça foi borrifada com a solução A, em seguida com a solução B e observada sob luz ultravioleta ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ ).

##### c) Reagente Vanilina

Reagente universal, detecta todas as substâncias presentes.

Solução A: solução etanólica de vanilina (1,0%).

Solução B: solução etanólica de ácido sulfúrico (5,0%).

A cromatoplaça foi borrifada com a solução A, em seguida com a solução B e aquecida.

#### 4.1.3.2 Cromatografia em coluna de exclusão em gel de Sephadex LH

O gel (Sephadex<sup>R</sup> LH-20 SIGMA-ALDRICH) foi suspenso em metanol, mesmo solvente utilizado como fase móvel, mantido em repouso por 24 horas e empacotado em coluna de vidro (altura = 14 cm; diâmetro = 3,5 cm) até total decantação do gel. A coluna foi mantida em repouso por 24 horas. A alíquota de 150 mg de amostra (fração isopropanólica) foi dissolvida em quantidade suficiente do eluente (metanol) e então aplicada no topo da coluna que foi, em seguida, eluída até completo esgotamento. Este processo foi realizado duas vezes (Figura 5).

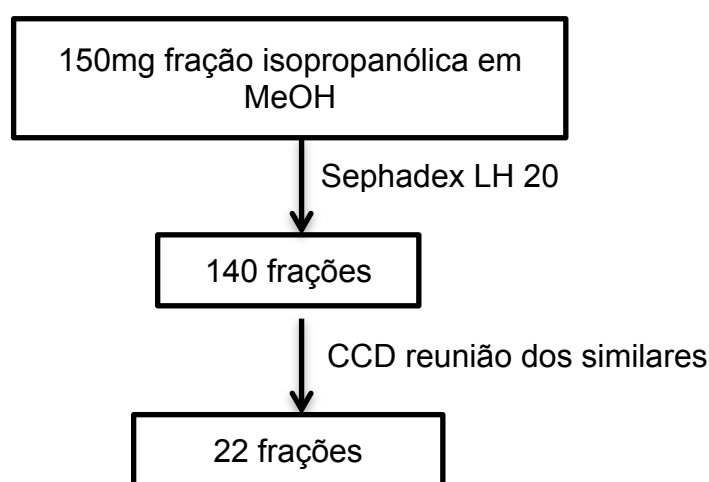


Figura 5. Obtenção das subfrações isopropanólicas.

#### 4.1.3.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O extrato aquoso bruto de *E. dysenterica*, a fração isopropanólica e as subfrações isopropanólicas foram analisadas nas seguintes condições cromatográficas: equipamento da marca VWR Hitachi Elite LaChrom e utilizados os detectores arranjo de diodos (DAD). As amostras foram dissolvidas em solvente apropriado e filtradas. CLAE: coluna: LichroCART 150-4,6 Purospher STAR RP 18e (5 µm); pré- coluna: LichroCART 4-46 Purospher STAR RP 18e (5 µm); fluxo: 0,6 mL/min; eluente: bomba A (água, acidificada com 1% de solução de ácido fosfórico 0,1 M), bomba B (acetonitrila), sendo o gradiente de eluição demonstrado na Tabela 1; detector: DAD; intervalo de análise: 230-400 nm; sistema de eluição gradiente.

Tabela 1 - Gradiente de eluição na análise por CLAE

<b>Tempo (min)</b>	<b>Bomba A(%)</b>	<b>Bomba B(%)</b>
0	90	10
40	70	30
50	50	50
55	90	10

Eluentes: Bomba A (água, acidificada com 1% de solução de ácido fosfórico 0,1 M), Bomba B (acetonitrila).

#### **4.1.4 Determinação da atividade de inibição sobre a $\alpha$ -amilase**

##### **4.1.4.1 Ensaio da atividade enzimática da $\alpha$ -amilase**

Estão disponíveis na literatura muitas técnicas de análise para a determinação da atividade da  $\alpha$ -amilase. Geralmente os procedimentos quantitativos utilizados envolvem a quantificação de açúcares redutores formados a partir da hidrólise amilolítica do amido. Dentre esses métodos, o que utiliza o DNS é o mais comumente descrito devido à sua confiabilidade e simplicidade (80). Neste ensaio, avalia-se a atividade da  $\alpha$ -amilase através da sua ação sobre o amido presente no meio, que resultará em maltose. A maltose, um dissacarídeo formado por duas moléculas de glicose, reduz o DNS formando um produto de cor alaranjada característica cuja absorbância é determinada a 540nm. A reação envolvida no ensaio é a redução do DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico) para ácido 3-amino-5-nitrosálico, enquanto que os grupos aldeídos da maltose são oxidados para grupos carboxílicos (Figura 5) (81). Neste estudo, para a verificação da atividade da enzima  $\alpha$ -amilase, optou-se pela utilização de amido solúvel como substrato e DNS como reagente cromogênico.

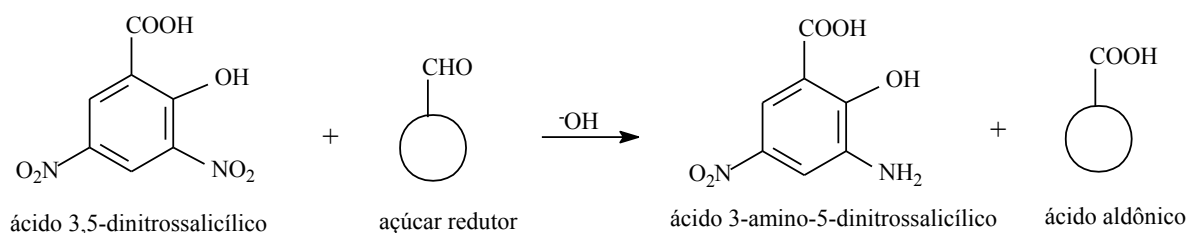


Figura 6. Reação do DNS com o açúcar redutor (82).

A atividade de inibição da  $\alpha$ -amilase foi determinada segundo o método descrito por Bernfeld (1955), com adaptações (83). A  $\alpha$ -amilase pancreática suína (EC 3.2.1.1, tipo VI, Sigma) foi dissolvida em tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 6,9) contendo cloreto de sódio 6,7 mM para obter uma solução com concentração de 40 U/mL. Um total de 40  $\mu$ L de solução do extrato em solvente apropriado, 100  $\mu$ L da solução da enzima foram incubados em banho-maria por 30 min a 25 °C. Após a pré-incubação, 500  $\mu$ L do pré-incubado foram misturados com 1 mL de amido 1% em tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 6,9). A mistura de reação foi então incubada por 20 min a 40 °C em banho-maria. A reação foi interrompida com a adição de 1 mL de solução do reagente DNS. As amostras foram então aquecidas em ebulição por 5 min e resfriadas a temperatura ambiente. A mistura de reação foi diluída adicionando 9 mL de água destilada. A atividade da amilase foi determinada baseada na absorbância em espectrofotômetro a 540 nm (Shimadzu, UV-1601).

Foram preparadas soluções denominadas branco do extrato, contendo solução de amido, extrato vegetal e DNS, visando eliminar variações relacionadas à coloração característica do extrato vegetal, além da possibilidade de atividade amilolítica do mesmo ou o teor de maltose e açúcares redutores presentes no extrato antes do experimento. Soluções contendo DNS e tampão foram utilizadas para zerar o aparelho antes da leitura da absorbância das amostras.

#### 4.1.4.2 Controle positivo para a atividade de inibição sobre a $\alpha$ -amilase

Como controle positivo de inibição da  $\alpha$ -amilase foi utilizado o inibidor acarbose. A acarbose é um inibidor desta enzima atualmente comercializado como medicamento em diferentes concentrações, recomendado como padrão de inibição pela Sigma Aldrich. A curva dose-resposta para acarbose foi construída com

concentrações variando entre 1 e 80 µg/mL.

#### 4.1.4.3 Determinação da porcentagem de inibição enzimática

As porcentagens de inibição sobre a enzima foram calculadas comparando-se a absorbância das amostras (ensaio contendo extrato + enzima + substrato) com a do controle da enzima (ensaio contendo tampão + enzima + substrato). Os valores correspondentes à absorbância do controle da enzima forneceram o referencial da atividade máxima da enzima utilizada para a realização dos experimentos, ou seja, refere-se à capacidade máxima da enzima para a formação dos produtos a partir dos seus substratos, tendo sido considerada a atividade da enzima igual a 100%. Dessa forma, as porcentagens de inibição das amostras foram calculadas de acordo com a seguinte equação: % Inibição =  $[(C-A) \times 100]/C$ , onde: C representa a absorbância do controle da enzima, subtraída do branco do substrato e A representa a absorbância da amostra subtraída do branco do extrato (extrato vegetal + substrato + tampão).

#### 4.1.4.5 Determinação dos valores de IC<sub>50</sub> dos extratos vegetais

O potencial de inibição foi avaliado em diluições seriadas do extrato aquoso bruto e das frações de *E. dysenterica*. Foi construída uma curva dose-resposta para o extrato aquoso bruto e frações, determinando-se o valor do IC<sub>50</sub>. A concentração capaz de inibir a metade da inibição máxima (IC<sub>50</sub>) é a medida da eficácia de um composto na função biológica ou bioquímica de inibição. As soluções para o ensaio foram preparadas diluindo a solução mãe no solvente. Cada diluição foi analisada em triplicata e a porcentagem de inibição foi calculada.

A curva de inibição foi obtida construindo um gráfico com a % de inibição versus o logaritmo da concentração do inibidor (extrato vegetal ou controle positivo). Os parâmetros de regressão não-linear foram traçados para a curva e os valores de IC<sub>50</sub> foram obtidos utilizando o software GraphPad Prism 5.0.

#### 4.1.4.6 Análise estatística

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados obtidos foram apresentados na forma de média e desvios padrão. Os valores encontrados foram comparados ao controle com o uso de um teste paramétrico t de Student bicaudal, utilizando como hipótese nula a diferença entre as médias. Ou seja, o teste busca identificar se as médias encontradas para a amostra e para o controle são significativamente diferentes. O limite de significância para todas as análises estatísticas foi de  $p < 0,05$ , resultando, portanto em um intervalo de confiança de 95%.

#### 4.1.5 Padronização do extrato aquoso bruto de *E. dysenterica*

##### 4.1.5.1 Avaliação do perfil cromatográfico por CLAE e determinação teor de catequina

Condições cromatográficas: as análises foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) Dionex UltiMate 3000, mantido a 25 °C e detector L2455 DAD. O detector foi ajustado para coletar dados na faixa de 230 nm e 400 nm, sendo extraído um cromatograma em 280 nm. Constituiu-se a fase móvel com solução de ácido fosfórico 1% (Bomba A) e metanol (Bomba B), gradiente de eluição está demonstrado na Tabela 2. O fluxo de fase móvel foi 1,3 mL/min, o volume injetado foi de 10 µL e a detecção foi realizada no comprimento de onda de 280 nm.. A coluna utilizada foi PurospherStar RP C18 (150 x 4,6 mm, 5 mm, Merck, Germany) (Part. n°945681), acoplada a uma pré-coluna de mesmas características (4 x 4; 5 mm particlesize, Merck, Germany). Os dados foram adquiridos por Chromeleon® 7 software (version 7.1.2.1541 Thermo Fisher Scientific).

Tabela 2 - Gradiente de eluição na análise por CLAE

Tempo (min)	Bomba A(%)	Bomba B(%)
0	10	90
18	30	70
19	50	50
20	10	90
25	10	90

Eluentes: Bomba A (água, acidificada com 1% de solução de ácido fosfórico 0,1 M), Bomba B (metanol).

#### 4.1.5.2 Validação da metodologia de determinação do teor de catequina no extrato aquoso de *E. dysenterica* por CLAE

A metodologia analítica descrita foi validada de acordo com as especificações do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos RE n° 899, de 29 de maio de 2003 e pelo guia internacional para o setor industrial, Q2B validação de procedimentos analíticos (84, 85).

##### 4.1.5.2.1 Seletividade

A seletividade do método, capacidade de medir exatamente um composto em presença de outros componentes, foi verificada pela análise de produtos de degradação da amostra por indução de hidrólise ácida/básica. Assim, para a hidrólise ácida foram pesados 25 mg de extrato aquoso de *E. dysenterica* e solubilizado em 1,4 mL de HCl 1M e para a hidrólise básica 25 mg foram solubilizado em 1,4 mL de NaOH 1M. Essas soluções foram incubadas a 60 °C durante 60 minutos. Após resfriamento, as soluções foram neutralizadas com 1,4 mL de NaOH 1M e HCl 1M, respectivamente e adicionado metanol quantidade suficiente para 25 mL (1 mg/mL). Da mesma forma, foram preparadas amostras de extrato sem qualquer indução. Realizou-se a análise por CLAE em triplicata (3n), comparou-



se o tempo de retenção (TR), e as áreas obtidas do pico referente a catequina, nas amostras preparadas sem indução de hidrólise acida/básica, com amostras após a indução de hidrólise ácida/básica.

#### 4.1.5.2.2 Linearidade

A linearidade é o processo que busca demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra dentro de um intervalo especificado. Esta foi avaliada através do método de regressão linear de 3 (três) curvas de calibração autênticas. Para isso, usou-se 6 (seis) concentrações ( 1; 2; 5; 10; 25; 50 µg/mL). Determinou-se o coeficiente de correlação (*r*), intercepta, inclinação e desvio padrão relativo. O flavonoide catequina (Sigma-Aldrich) foi empregado nos ensaios de linearidade.

#### 4.1.5.2.2.3 Precisão

Na repetibilidade, 6 (seis) replicatas de extrato aquoso de *E. dysenterica*, foram analisadas por CLAE no mesmo dia. A precisão interdia foi determinada em triplicata e analisada em três dias diferentes com o mesmo analista e mesma instrumentação. Desta forma, 25 mg de extrato aquoso liofilizado de *Eugenia* foram diluídos em 25 mL de metanol. Esta foi filtrada com o auxílio de algodão e 10 µL foram injetados em cromatógrafo líquido, seguindo as condições analíticas descritas anteriormente, item 4.2.6. Sendo a repetibilidade e precisão interdia expressas como desvio padrão relativo (DPR). Determinado pela equação:

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

Onde: DP= Desvio padrão; CMD= Concentração média determinada.

#### 4.1.5.2.2.4 Limite de Detecção (LD)

Determina-se LD a menor quantidade do analito (catequina) presente em uma amostra que pode ser detectado. A estimativa do LD foi feita com base no desvio padrão da resposta e da inclinação. Determinado pela equação:

$$LD = \frac{3,3\sigma}{IC}$$

Onde:  $\sigma$  = desvio padrão do y-intercepta, de 3 curvas de calibração

IC = inclinação da curva de calibração.

#### 4.1.5.2.2.5 Limite de Quantificação (LQ)

Determina-se LQ como a menor quantidade de catequina que pode ser quantificada na análise por CLAE no extrato aquoso de *E. dysenterica*. Esta determinação foi feita com base no desvio padrão da resposta e da inclinação. Determinada pela equação:

$$LQ = \frac{10\sigma}{IC}$$

Onde:  $\sigma$  é o desvio padrão do y-intercepta, de 3 curvas de calibração;

IC é a inclinação da curva de calibração.

#### 4.1.5.2.2.6 Exatidão

A exatidão foi avaliada a partir da análise de 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento. Avaliando 3 (três) concentrações, baixa, média e alta (80, 100, 120% respectivamente), com 3 (três) réplicas cada. A relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, expressa a exatidão.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

A exatidão do procedimento analítico foi verificada pelo método de adição de padrão. Assim, para obtenção dos valores teóricos, foi calculada a concentração final da amostra a 100% (17  $\mu\text{g/mL}$ ) e posteriormente 80% e 120% (13,6 e 20,4  $\mu\text{g/mL}$ ), alcançadas com 500  $\mu\text{L}$  do extrato a 100% (17  $\mu\text{g/mL}$ ) somadas as concentrações variadas do padrão catequina, como mostra a Tabela 3.

Tabela 3 - Concentração teórica de *E. dysenterica* para a análise de exatidão

Concentração (%)	Extrato ( $\mu\text{g/mL}$ )	Catequina adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentração Final ( $\mu\text{g/mL}$ )
<b>80</b>	20	5,1	13,6
<b>100</b>	20	8,5	17,0
<b>120</b>	20	11,9	20,4

Os valores da catequina foram obtidos com solução mãe do padrão (200  $\mu\text{g/mL}$ ), deste retirado 25,5, 42,5 e 59,5  $\mu\text{L}$ , e acrescido metanol até o volume de 500  $\mu\text{L}$ . A esta solução foi adicionado 500  $\mu\text{L}$  de extrato a 100%.

Após a adição de padrão às amostras, as soluções foram filtradas e 10  $\mu\text{L}$  foram injetados em cromatógrafo líquido, seguindo as condições analíticas descritas anteriormente, item 4.1.5.1 .

#### 4.1.5.2.2.7 Robustez

O método cromatográfico foi avaliado quanto a sua robustez pela análise das amostras sob diferentes condições, como a variação de comprimento de onda (280-354 nm), fluxo (1,0-1,5 mL/min) e temperature (20-30). Observados, então os efeitos ocorridos nos parâmetros tempo de retenção e áreas dos picos.

#### 4.1.5.2.2.8 Análise estatística dos resultados

A análise estatística dos resultados foi realizada pelo programa de estatística GraphPadPrism® . Os resultados foram expressos pela média com os respectivos desvios padrão. Os valores encontrados foram comparados ao controle com o uso de um teste paramétrico t de Student bicaudal, utilizando como hipótese nula a diferença entre as médias. Ou seja, o teste busca identificar se as médias encontradas para a amostra e para o controle são significativamente diferentes. O limite de significância para todas as análises estatísticas foi de  $p < 0,05$ , resultando,

portanto em um intervalo de confiança de 95%.

#### **4.1.6 Caracterização do extrato aquoso bruto de *E. dysenterica***

##### **4.1.6.1 Determinação de compostos fenólicos totais**

Compostos fenólicos são metabólitos secundários que ocorrem em todas as espécies de plantas, sua síntese depende de numerosas enzimas envolvidas em vias metabólicas diferentes e seu metabolismo está completamente integrado aos padrões reguladores morfológicos e bioquímicos das plantas. A biossíntese dos compostos fenólicos é afetada pelo mecanismo de defesa das plantas, em resposta a diferentes tipos de estresse causado por patógenos ou condições adversas do ambiente (86). Em geral, estes compostos comportam-se como antioxidantes, contra radicais livres, doando um átomo de hidrogênio a partir da hidroxila de sua estrutura aromática; quelando metais de transição como o  $\text{Fe}^{+2}$  e o  $\text{Cu}^{+}$ ; interrompendo a reação de propagação de radicais livres na oxidação lipídica e modificando o potencial redox do meio reparando os danos nas moléculas atacadas por radicais livres. Sendo assim, são compostos capazes de bloquear a ação de enzimas específicas que causam inflamação, modificar as vias metabólicas de prostaglandinas, perturbar a agregação plaquetária e inibir a ativação de carcinógenos (87)

A determinação do teor de fenóis totais presentes nas folhas de *E. dysenterica* foi feita utilizando o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu com modificações (88). A análise é baseada em reação redox entre agentes redutores e os ácidos fosfomolibdico e fosfotungstico presentes no reagente. Durante a reação, forma-se o molibdênio azul e tungstênio azul cuja coloração permite determinar a concentração das substâncias redutoras não necessariamente de natureza fenólica (88, 89). Foi construída curva padrão utilizando ácido gálico como fenólico de referência. Os dados de absorvância foram registrados em espectrofotômetro Shimadzu (UV-1800).

- Obtenção da curva padrão

Foram preparadas soluções metanólicas do padrão ácido gálico em concentrações entre 0,5 a 32,5 µg/mL. Em tubos de ensaio de 5 mL foram adicionados 65 µL da solução padrão nas concentrações avaliadas, 250 µL de solução aquosa de carbonato de sódio Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (10%) e 250 µL do reagente Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich). Em seguida o volume foi completado para 2500 µL com água destilada e homogeneizado. O conjunto foi mantido à temperatura ambiente e as absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800) a 700 nm após 1 hora de incubação. Foi preparado um branco com 65 µL de metanol no lugar da amostra utilizado para zerar o equipamento.

- Preparo da amostra

O extrato aquoso foi dissolvido em metanol na concentração de 2 mg/mL para uma concentração final na reação de 52 µg/mL.

O ensaio foi conduzido em triplicata nas mesmas condições do padrão. O teor de fenóis totais na amostra foi determinado por interpolação da absorbância da amostra contra uma curva de calibração construída (Figura 7) com padrões de ácido gálico (0,5 a 32,5 µg/mL) e expressos como µg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por mg de extrato.

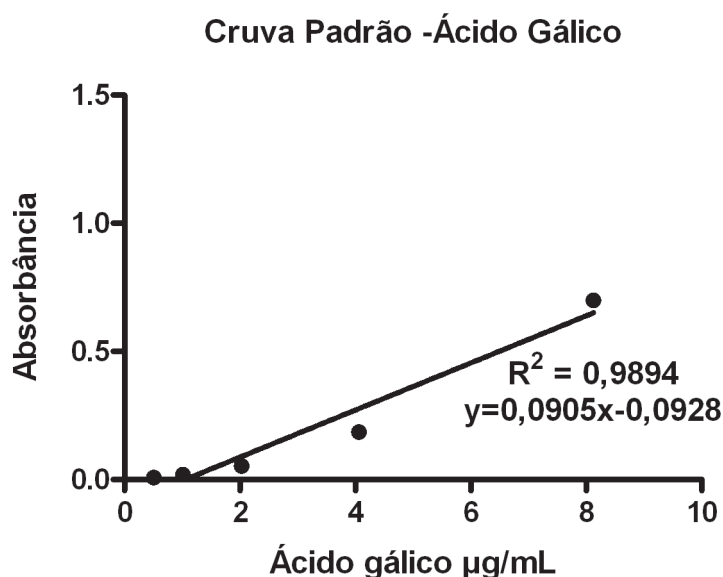


Figura 7. Curva padrão com as absorbâncias obtidas com concentrações crescentes de ácido gálico (µg/mL). Cada ponto representa a média ± desvio padrão em triplicata.

#### 4.1.6.2 Determinação de flavonoides totais

Os flavonoides são metabólitos secundários presentes em quase todas as fases de crescimento das plantas. São o pigmento vegetal mais abundante, juntamente com clorofila e carotenóides. Sua estrutura básica é composta por dois anéis aromáticos ligados por uma estrutura de três carbonos. Os flavonoides podem ser agrupados em diferentes classes, como os flavonóis, antocianinas, flavononas, catequinas e chalconas. Os flavonoides proporcionam vários efeitos benéficos à saúde humana, tais como a redução de vários tipos de doenças crônicas, efeitos antioxidantes e anti-bacterianos (90).

O teor de flavonoides totais presentes nas folhas de *E. dysenterica* foi determinado por método colorimétrico descrito por Woisky & Salatino (1998) (91, 92), com alterações. A análise é baseada na formação de complexos estáveis entre os flavonoides e o cátion  $\text{Al}^{3+}$  em meio alcalino formando quelatos vermelhos. O complexo vermelho indica a presença de flavonoides. A figura 8 apresenta a reação de formação do complexo flavonoide-Al (93) As absorvâncias foram registradas em espectrofotômetro Shimadzu (1800) a 425 nm. Foi construída uma curva padrão utilizando a quercetina como referência.

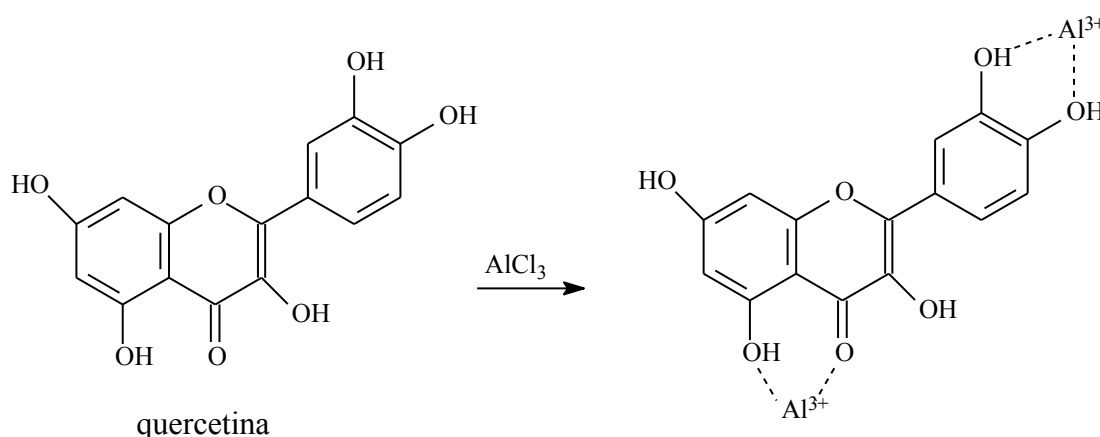


Figura 8. Reação de formação do complexo flavonoide-Al (94).

#### - Obtenção da curva padrão

Foram preparadas soluções metanólicas de quercetina em concentrações entre 0,5 a 32,5  $\mu\text{g/mL}$ . Em tubos de ensaio de 5 mL foram adicionados 250  $\mu\text{L}$  da solução padrão nas concentrações avaliadas, 125  $\mu\text{L}$  de solução metanólica de

cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) (5%). Em seguida o volume foi completado para 2500  $\mu\text{L}$  com água destilada e homogeneizado. O conjunto foi mantido à temperatura ambiente e as absorvâncias foram medidas em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800) a 425 nm após 1 hora de incubação. Foi preparado um branco com 125  $\mu\text{L}$  de metanol no lugar da amostra utilizado para zerar o equipamento.

- Preparo da amostra

O extrato aquoso foi dissolvido em metanol na concentração de 2 mg/mL para uma concentração final na reação de 200  $\mu\text{g/mL}$ .

O ensaio foi conduzido em triplicata nas mesmas condições do padrão. O teor de flavonoides totais na amostra foi determinado por interpolação da absorvância da amostra contra uma curva de calibração construída com padrões de quercetina (0,5 a 32,5  $\mu\text{g/mL}$ ) e expressos como  $\mu\text{g}$  de EQ (equivalentes de quercetina) por mg de extrato (Figura 9).

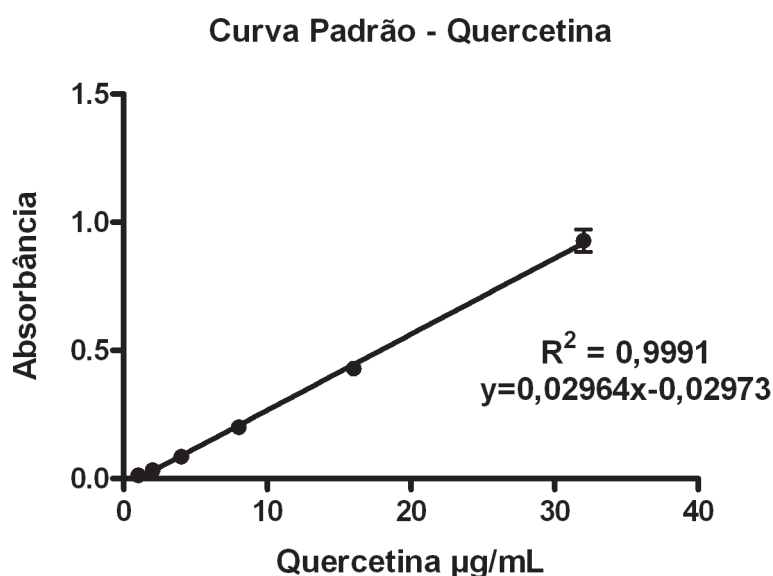


Figura 9. Curva padrão com as absorvâncias obtidas com concentrações crescentes de quercetina ( $\mu\text{g/mL}$ ). Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão em triplicata.

#### 4.1.6.3. Atividade antioxidante

##### 4.1.6.3.1 Método de Redução do Complexo Fosfomolibdênio

Antioxidante biológico tem sido definido como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em comparação com as de um substrato oxidável, atrasa significativamente ou evita a oxidação do referido substrato. Isto é importante porque danos oxidativos estão relacionados com muitas doenças, como cancro, doenças do fígado doença de Alzheimer, artrite, doenças inflamatórias, diabetes, doença de Parkinson, e aterosclerose (95).

A verificação *in vitro* da atividade antioxidante do extrato vegetal foi realizada pelo método descrito por Prieto (1999) (96) com adaptações. A análise é baseada na capacidade redutora do complexo fosfomolibdênio, em meio ácido, em comparação com compostos de atividade antioxidante conhecida. Foram construídas curvas padrão utilizando material antioxidante de referência. Os dados de absorbância foram registrados em espectrofotômetro Shimadzu (UV-1800).

##### - Preparo do Reagente

Foram preparados 0,025 L de solução aquosa de fosfato de sódio ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , 28 mM), 0,025 L de solução aquosa de molibdato de amônio tetrahidratado [ $(\text{N}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 4 mM,] e 0.025 L de solução aquosa de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 0,6 M), separadamente. Em seguida as três soluções foram reunidas no momento do uso.

##### - Preparo das Substâncias de Referência (padrões):

As substâncias de referência foram BHT (2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenol) (Synth) e quercetina.

Foram preparadas soluções estoque a 1 mg/mL de BHT e quercetina, em etanol. A partir das soluções estoque foram preparadas soluções diluídas, em etanol, a 0,2; 0,4; 0,6; 0,9 mg/mL de cada padrão a ser testado.

##### - Obtenção das curvas padrão

Em tubos de ensaio de 5 mL foram adicionados 1 mL da solução reagente, 0,1 mL da solução padrão nas concentrações avaliadas. Foi preparado um branco



com 1 mL da solução reagente e 0,1 mL de etanol, que foi utilizado para zerar o equipamento de leitura. Para cada diluição, a análise foi feita em triplicata.

- Análise realizada

Os tubos foram tampados e mantidos em banho-maria a 95 °C por 90 min. Após o período definido, as amostras foram deixadas a arrefecer até a temperatura ambiente. O conteúdo de cada um dos tubos foi transferido para cubetas de plástico e analisado sob o comprimento de onda 695 nm em espectrofotômetro Shimadzu, contra um branco (1 mL do reagente e 0,1 mL de etanol).

Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o programa GraphPad Prism 5 e curvas-padrão foram construídas.

- Teste de atividade antioxidante

A amostra foi analisada sob as mesmas condições dos padrões de referência aqui adotados. O extrato aquoso foi solubilizado em etanol na concentração de 1 mg/mL e uma alíquota de 0,1 mL das soluções foram adicionados a 1 mL do reagente.

Para calcular a equivalência do composto analisado com relação aos padrões testados foram utilizadas as equações da reta obtidas de BHT (Figura 10) e quercetina (Figura 11), às quais foram aplicadas as absorbâncias lidas a 695 nm. Desta forma, foram obtidas as concentrações relativas aos controles. A equivalência foi calculada dividindo a concentração obtida para o padrão pela concentração usada para os compostos analisados. O resultado é dado em equivalentes de BHT e quercetina.

As substâncias utilizadas como padrões resultaram em curvas com boa linearidade, como mostram os resultados obtidos.

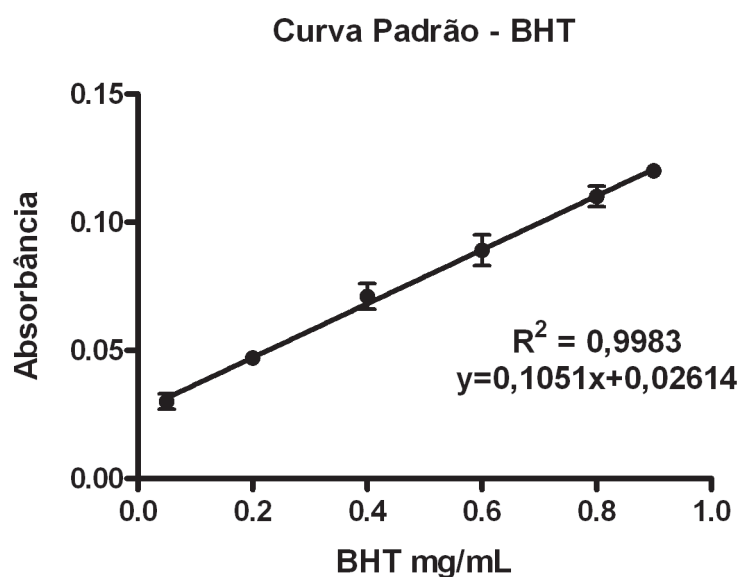


Figura 10. Atividade redutora do BHT no método de fosfomolibdênio. Curva padrão com as absorbâncias obtidas em três experimentos com concentrações crescentes de BHT (mg/mL). Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão em triplicata.

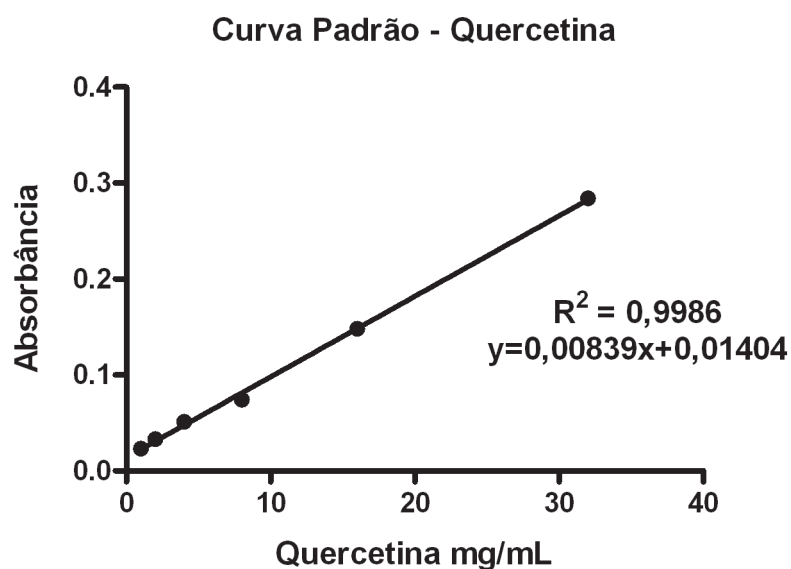


Figura 11. Atividade redutora da quercetina no método de fosfomolibdênio. Curva padrão com as absorbâncias obtidas em três experimentos com concentrações crescentes de quercetina (mg/mL). Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão em triplicata.

#### 4.1.6.3.2. Método de Atividade doadora de H• ao radical DPPH •

A atividade antioxidante do extrato aquoso bruto de *E. dysenterica* foi avaliada de acordo com o método descrito por Blois (1958) com algumas modificações (97). O extrato foi diluído em etanol para obtenção de uma solução 1 mg/mL. Foi feita uma diluição seriada desta solução para a obtenção de soluções com concentrações de 0,04 a 0,2 mg/mL. Em seguida, 100 µL destas diluições foram adicionados 1 mL de tampão acetato de sódio (100 mM) pH 5,5 e 500 µL de solução etanólica de DPPH. Após 10 minutos foi realizada leitura em 507 nm em espectrofotômetro Shimadzu. Foram feitas soluções denominadas controle (tampão acetato, DPPH e Etanol) e branco (tampão e etanol). As análises foram realizadas em triplicata e a porcentagem de inibição foi estabelecida pela fórmula: % inibição = (resposta da amostra X 100 / resposta do controle) – 100. A atividade antioxidante foi determinada pela porcentagem de inibição versus a concentração do extrato.

Foi construído um gráfico com a % de redução de radicais livres versus a concentração do inibidor. Os parâmetros de regressão não-linear foram traçados para a curva e os valores de IC<sub>50</sub> foram obtidos utilizando o software GraphPad Prism 5.0.

#### 4.1.6.4 Teste de citotoxicidade celular (MTT)

A citotoxicidade celular foi aferida pelo teste de avaliação da atividade mitocondrial das células. Os testes foram realizados em colaboração com o laboratório de Histopatologia Bucal coordenado pela Profa Ana Carolina Acevedo. Esta colaboração tem gerado resultados importantes para o nosso grupo e para o grupo coordenado pela profa Eliete Neves Silva Guerra.

O teste de avaliação da atividade mitocondrial das células, avalia a capacidade das enzimas mitocondriais, das células tratadas, em reduzir MTT (brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio) em formazam. Assim, somente as células viáveis têm a capacidade de fazer essa redução e por isso a absorbância medida corresponde às células viáveis, ou às células que não sofreram toxicidade suficiente para reduzir sua atividade mitocondrial. O produto de formazam apresenta uma coloração arroxeada diferente da cor inicial dos sais de tetrazólio que, após serem diluídos em solvente de veículo alcoólico, podem ter sua

absorbância aferida em uma leitora de microplaca (Thermo Plate TP reader) a 570 nm e comparada à absorbância dos devidos controles.

Para a realização desse experimento todas as linhagens foram plaqueadas em placas de 96 poços (TPP) na concentração de 5.000 células por poço e mantidas em incubadora em condições ideais por 24 horas. Após esse período as células foram tratadas com o extrato de *E. dysenterica* aquoso bruto e com a fração isopropanólica. Os extratos foram diluídos em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) para obter uma concentração final de 500 µg/mL e 11,88 µg/mL e 66,83 µg/mL, concentrações semelhantes ao IC<sub>50</sub> obtido no ensaio de inibição da enzima α-amilase. As células também foram tratadas com os devidos controles negativos (água milliQ, para o extrato aquoso e DMSO/Etanol na proporção de 2:3 para a fração isopropanolica). Após 24 horas de tratamento as células foram retiradas da incubadora e para cada 100 µL de meio com extrato foi adicionado 10 µL de solução MTT. As placas foram recobertas com papel alumínio e retornavam a incubadora. Após 4 horas era aspirado o meio de cultura com a solução de MTT e acrescentado 100 µL de isopropanol acidificado (25 mL de isopropanol + 104 µL de HCl 100%). As placas foram agitadas em vortex por 10 minutos a velocidade média. Finalmente a absorbância das células foi verificada em uma leitora de microplaca a 570 nm. Para obter a citotoxicidade induzida pelo tratamento a absorbância das células foi comparada a absorbância de seu devido controle negativo que foi sempre estabilizado como 100% de células viáveis.

As linhas celulares, sendo uma linha humana queratinócito célula (HaCat), e uma linha de células de fibroblasto (L-929) foram cultivadas como monocamadas em uma mistura de meio de Eagle modificado por Dulbecco e enriquecido com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina - estreptomicina). As células foram mantidas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Para todas as experiências, as células foram descoladas com tripsina (0,25%) / EDTA (1 mM). Todos os reagentes de cultura celular foram adquiridos de Sigma-Aldrich (ET. Louis, MO). As linhagens celulares utilizadas estão descritas na ATCC (American Type Culture Collection).

Cada concentração de cada amostra foi analisada em triplicata e os resultados obtidos foram apresentados na forma de média ponderada, com os respectivos desvios padrão. Os valores encontrados foram comparados ao controle com o uso de Oneway ANOVA seguido pelo teste de análise de Tukey. Ou seja, o teste busca identificar se as médias encontradas para a amostra e para o controle

são significativamente diferentes. O limite de significância para todas as análises estatísticas foi de  $p < 0,05$ , resultando, portanto em um intervalo de confiança.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

### 5.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO BRUTO DE *E. dysenterica*

#### 5.1.1 Rendimento

O rendimento do extrato aquoso liofilizado ao final do processo foi em média 7%, este resultado está próximo ao encontrado no estudo de Sreelatha e Padma (2009), no qual foi obtido um rendimento médio de 10% utilizando 100 g de folhas em 600 mL de água (98).

#### 5.1.2 Teor de resíduos sólidos totais

A porcentagem de sólidos totais foi determinada para cada extração com o uso da balança termogravimétrica. Os valores encontrados estão apresentados na Figura 12.

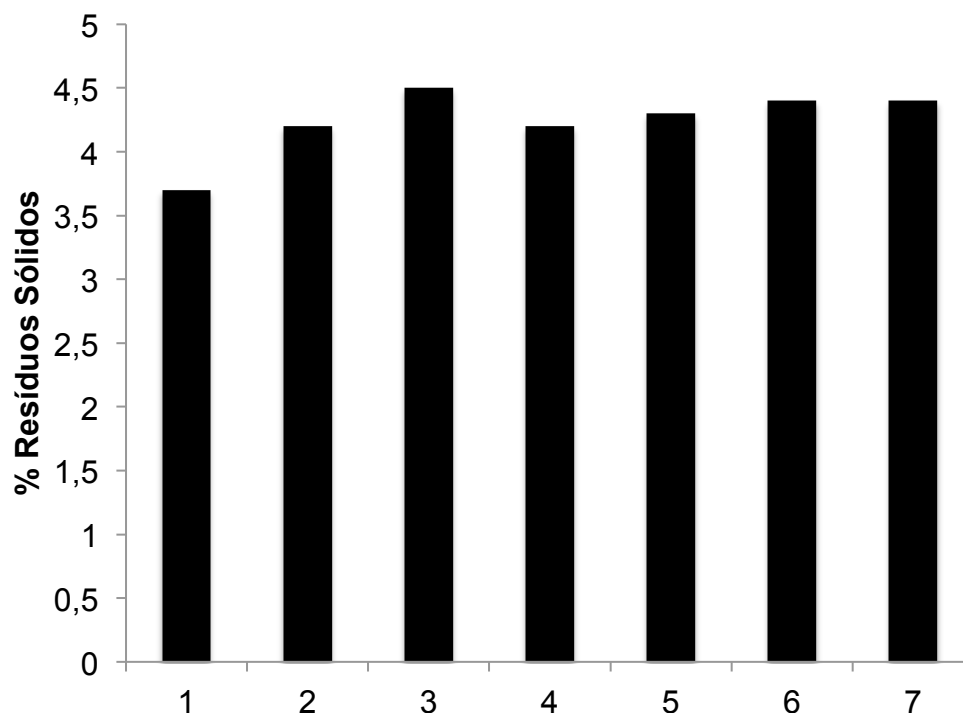


Figura 12. Porcentagem de resíduos sólidos em cada extração.

### 5.1.3 Teor de Umidade

Os extratos liofilizados preparados foram analisados quanto ao percentual de umidade em balança termogravimétrica. Os valores de umidade estão apresentados na Figura 13.

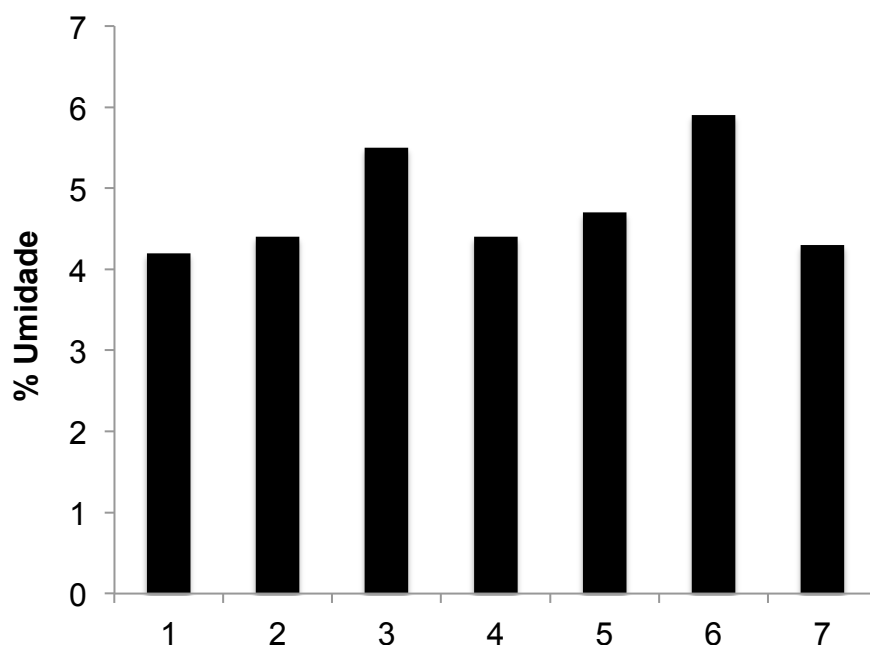


Figura 13. Porcentagem de umidade em cada extração após liofilização.

### 5.1.4 Reprodutibilidade do processo de obtenção do extrato aquoso bruto de *E. dysenterica*

Foram realizadas sete extrações diferentes, de acordo com as condições pré-estabelecidas (100 g folhas/500mL água) para avaliar a reprodutibilidade do método de extração. Os parâmetros avaliados foram teor de sólidos no extrato aquoso antes da liofilização e o teor de umidade no extrato liofilizado. A variação destes pode ser observada na Tabela 4. Como a variação dos parâmetros analisados para as sete extrações foi considerada pequena o método de obtenção do extrato aquoso bruto de *E. dysenterica* demonstrou ter boa reprodutibilidade.

Tabela 4. Valores obtidos de sólidos totais e umidade polifenóis nos estudos de reprodutibilidade do processo de obtenção do extrato aquoso bruto de *E. dysenterica*

<b>Parâmetro</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>DPR (%)</b>
Teor de sólidos	4,24	0,26	6,21
Teor de umidade	4,77	0,66	13,89

Onde, DPR = Desvio padrão realtivo

### **5.1.5 Avaliação fitoquímica da *E. dysenterica***

Para identificar os metabolitos secundários, estabeleceu-se como padrão a combinação de cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta performance (CLAE-DAD).

#### **5.1.5.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)**

O extrato aquoso bruto das folhas de *E. dysenterica*, sua fração e subfrações foram analisadas quanto à presença de polifenóis, principalmente flavonoides, utilizando-se diferentes reveladores.

As subfrações obtidas a partir da fração isopropanólica apresentaram-se como um sólido amarelo pastoso. A análise das CCDs sob luz ultravioleta (365 nm) do extrato bruto e das frações mostrou a presença de flavonoides (Figuras 14a e 14b) pelas manchas emitindo fluorescência alaranjada pela ação dos reveladores (99). O extrato aquoso bruto e as frações foram testados e comparados com diferentes classes de metabólitos secundários para determinar a presença do composto ativo. As avaliações por CCD e CLAE-DAD do extrato aquoso de *E. dysenterica* mostraram que os compostos majoritários nesta espécie são as catequinas e epicatequinas. A partir destas análises pode-se reunir as subfrações semelhantes e selecioná-las para a avaliação de inibição enzimática, uma vez que a inibição de  $\alpha$ -amilase pelo extrato aquoso bruto confirmada neste trabalho indo ao encontro dos resultados obtidos por Souza et. al. 2011 (9).



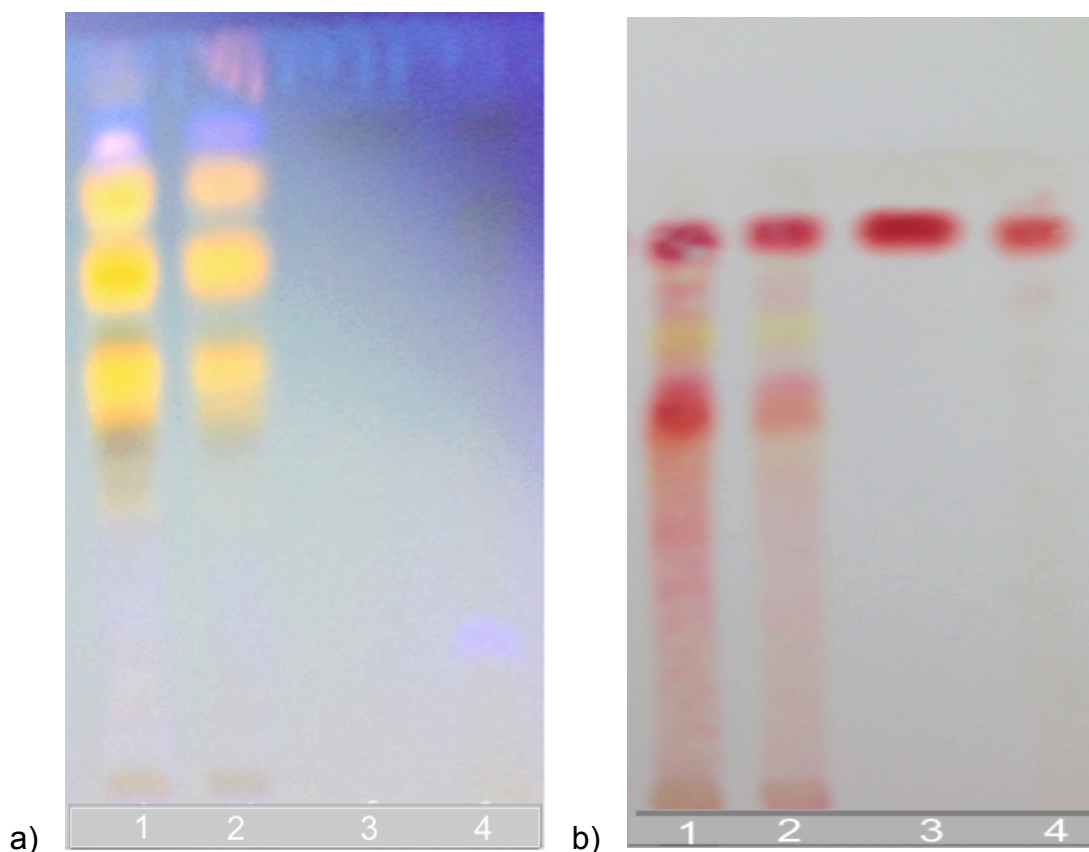


Figura 14a: Perfil da CCD, da fluorescência por UV do extrato aquoso (1), fração isopropanólica (2) de folhas de *E. dysenterica* comparado aos padrões de catequina (3) e epicatequina (4); b: perfil da CCD, após revelação com solução de Vanilina/Ácido do extrato aquoso (1), fração isopropanólica (2) de folhas de *E. dysenterica* comparado aos padrões de catequina (3) e epicatequina (4).

#### 5.1.5.2 Obtenção das subfrações isopropanólicas

Amostras da fração isopropanólica de *E. dysenterica* foram eluídas em cromatográfica de exclusão em gel Sephadex LH20 duas vezes fornecendo 144 frações de 5 mL cada. Com as análises por CCD das subfrações pode-se reunir as frações similares resultando em 22 frações que foram submetidas aos testes de inibição enzimática.

Com o propósito de investigar a presença de outros metabólitos secundários no extrato e frações foi utilizado cromatógrafo de alta eficiência. Este método de análise fornece informações com uma acurácia afinada (100).

A comparação do extrato e frações com padrões de referência certificados confirmou a presença de flavonoides inicialmente verificada nas CCDs. Os componentes majoritários no extrato aquoso de *E. dysenterica* identificados por

CLAE foram catequina e epicatequina com tempos de retenção em 14 minutos e 18 minutos respectivamente.

### 5.1.6 Determinação da atividade de inibição de $\alpha$ -amilase

A atividade de inibição de  $\alpha$ -amilase pela *E. dysenterica* foi avaliada e os resultados mostraram que tanto o extrato bruto como algumas frações foram capazes de influenciar na atividade da enzima. Sendo que o extrato bruto a fração isopropanólica e 15 subfrações apresentaram inibição relevante sobre a  $\alpha$ -amilase, superior a 50%. As porcentagens de inibição do extrato bruto, da fração isobporpanólica, suas subfrações e do controle positivo estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5. Extrato aquoso e frações obtidas e potencial de inibição em  $\alpha$ -amilase.

Fração	% Inibição	Fração2	% Inibição3
<b>Extrato bruto</b>	87	<b>I 11</b>	34
<b>Fração isopropanólica</b>	94	<b>I 12</b>	0
<b>I 1</b>	0	<b>I 13</b>	30
<b>I 2</b>	52	<b>I 14</b>	59
<b>I 3</b>	42	<b>I 15</b>	87
<b>I 4</b>	6	<b>I 16</b>	85
<b>I 5</b>	36	<b>I 17</b>	84
<b>I 6</b>	29	<b>I 18</b>	89
<b>I 7</b>	78	<b>I 19</b>	84
<b>I 8</b>	95	<b>I 20</b>	90
<b>I 9</b>	84	<b>I 21</b>	93
<b>I 10</b>	87	<b>I 22</b>	87
<b>Acarbose <sup>a</sup></b>	87		

<sup>a</sup> Controle positivo

O extrato bruto de *E. dysenterica*, a fração isopropanólica e as subfrações I8, I9, I10, I15, I16, I17, I18, I19, I20, I21 e I22 apresentam grande inibição da atividade de  $\alpha$ -amilase (entre 80 e 95%). A literatura relata que espécies do gênero *Eugenia* possuem em sua composição, principalmente, flavonoides, taninos, terpenóides e

óleos essenciais (7). Estudos mostram também que vários flavonoides são capazes de inibir a atividade da enzima  $\alpha$ -amilase, o que nos permite correlacionar alguns destes compostos com a atividade de inibição da fração, das subfrações e do extrato bruto de *E. dysenterica* (101).

Muitos estudos são realizados pesquisando a atividade de inibição enzimática por plantas, muitas delas da família Myrtaceae. Como exemplo o estudo com extrato de sementes de *Eugenia jambolana*, que apresentaram frações ricas em flavonoides e demonstraram possuir propriedades hipoglicêmicas, hipolipemiantes, e propriedades antidiabéticas. Estas propriedades foram atribuídas à sua capacidade de modular o metabolismo de carboidratos e enzimas lipídicas em ratos diabéticos e atenuar a diferenciação de adipócitos in vitro (65). Outro estudo com farelo de sorgo (sumac e negro) demonstrou que os flavonoides presentes nas duas espécies de sorgo apresentaram atividade de inibição frente a enzima alfa amilase, sendo que o sorgo sumac foi mais eficaz (102). Pesquisas realizadas com *Callistemon rigidus*, espécie oriunda da Austrália e classificada como Myrtaceae, tem reportado flavonóides e triterpenóides como constituintes de suas folhas e que o extrato metanólico de casca do caule apresentou 83% de inibição dose-dependente de  $\alpha$ -amilase isolada do plasma sanguíneo de ratos com uma concentração de 300  $\mu\text{g/mL}$  ao final da reação e  $\text{IC}_{50}$  igual a 81,1  $\mu\text{g/mL}$  (103). Outros flavonoides derivados de plantas como a quercetina têm sido estudados como inibidores eficazes de  $\alpha$ -amilase salivar humana. Da mesma forma os compostos ativos (-)-3-O-galoilepicatequina e (-)-3-O-galoilcatequina isolados a partir de uma erva medicinal *Nepalesa pakhanbhed* (bergenia ciliados) revelou ter atividade inibidora contra  $\alpha$ -amilase salivar e pancreática (104).

A partir destes resultados, para os extratos que apresentaram uma inibição sobre a  $\alpha$ -amilase superior a 80% e massa suficiente, foram feitas curvas com concentrações entre 0 a 1500  $\mu\text{g/mL}$ , de extrato bruto e 0 a 250  $\mu\text{g/mL}$  para a fração isopropanólica e suas subfrações para determinar o valor de  $\text{IC}_{50}$  sobre a enzima  $\alpha$ -amilase. Sendo assim, foi determinado o valor de  $\text{IC}_{50}$  para o extrato aquoso bruto, fração isopropanólica e para as subfrações I8, I16, I17, I20 e I21.

Como controle positivo nos ensaios de inibição da  $\alpha$ -amilase foi utilizado a acarbose. Assim, foi construída uma curva dose-resposta com as concentrações de acarbose entre 1 e 80  $\mu\text{g/mL}$ , sendo obtida uma atividade de inibição de 87% e um

IC<sub>50</sub> de 5,58 µg/mL.

A partir das sete amostras testadas observou-se que a fração isopropanólica e o extrato bruto aquoso de *E. dysenterica* apresentaram valores de IC<sub>50</sub> menores que as frações com compostos isolados. A fração isopropanólica apresentou um IC<sub>50</sub> semelhante ao controle positivo acarbose (Figura 15).

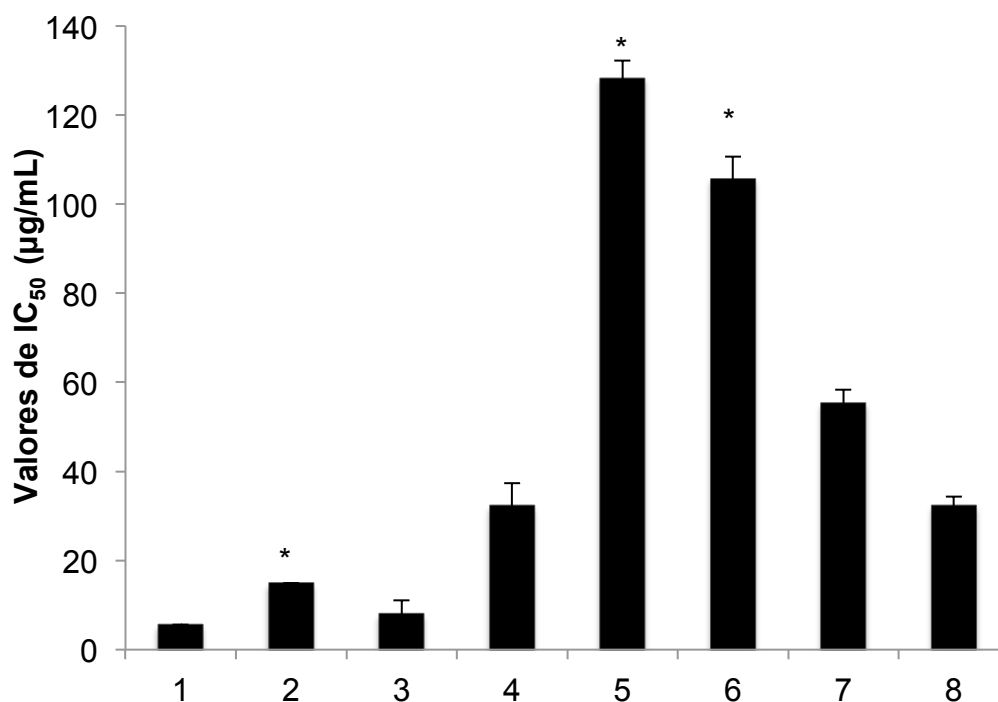


Figura 15. Valores de IC<sub>50</sub> do ensaio de inibição de amilase. 1) Acarbose (controle); 2) extrato aquoso; 3) fração isopropanólica; 4) subfração I8; 5) subfração I16; 6) subfração I17; 7) subfração I20; 8) subfração I21. Controle normalizado para 100%. \*p 0,05 vs controle.

O extrato, frações e subfrações apresentaram forte inibição sobre a  $\alpha$ -amilase, com valores de IC<sub>50</sub> entre 8,06 a 128 µg/mL. O extrato aquoso bruto, as subfrações I16 e I17 apresentaram inibição significativamente diferente da encontrada para a acarbose, apesar do valor da média absoluta calculada para o extrato aquoso bruto ser próximo ao controle. Essa diferença ocorre devido ao pequeno desvio padrão dos resultados calculados para a amostra. Os valores absolutos das médias encontradas para as subfrações I16 e I17 são muito maiores que os calculados para o controle.

O extrato aquoso, fração isopropanólica e a subfração I8 apresentaram forte inibição sobre a  $\alpha$ -amilase. Os valores de IC<sub>50</sub> foram igual a 14,92 µg/mL;

8,06 µg/mL e 32,14 µg/mL respectivamente. Estes valores de IC<sub>50</sub> foram próximos ao valor determinado para a Acarbose 5,58 µg/mL. A atividade de inibição desta espécie pode estar relacionada a presença de compostos fenólicos, que tem demonstrado capacidade de inibição de α-amilase e α-glicosidase. Flavonoides como catequina/epicatequina e canferol, (+/-) inibem eficazmente estas enzimas (105). Estes resultados corroboram com os achados de Sreerama, Sashikala e Pratape que em 2012 realizaram estudos com feijão caupi e farinha de grão de bico onde foi mostrada a relação dose-reposta e valores de IC<sub>50</sub> igual a 108,3 µg/mL para a farinha de grão de bico e 159,1 µg/mL para o feijão caupi e compararam com os IC<sub>50</sub> de extrato metanólico e extrato hexânico de *Merremia emarginata* que foram igual a 104,5 µg/mL e 133,4 µg/mL respectivamente (106). Outro estudo com extratos metanólico, metanólico aquoso e aquoso de *Annona species* apresentaram potente atividade inibidora desta enzima apresentando valores de IC<sub>50</sub> de 35,81, 63,53 e 99,33 µg/mL (107).

Outro estudo de relevância foi realizado por Jong-Sang et. al. (2000), no qual o grupo testou a atividade de inibição para α-amilase e α-glicosidase em 22 flavonoides dentre eles o luteolina e Kaempferol apresentaram forte inibição de alfa amilase pancreática, porém o IC<sub>50</sub> foi de 50 a 500 µg/mL superior a Acarbose 5 a 50 µg/mL (108).

Avaliando a atividade de inibição da enzima α-amilase, pode-se observar que algumas subfrações mostraram-se inativas, enquanto outras apresentaram atividade superior a 80% de inibição. Contudo o potencial de inibição foi maior para o extrato aquoso bruto e para a fração isopropanólica, sugerindo que a atividade de inibição foi reduzida com o fracionamento.

A redução na atividade de extratos após fracionamento já foi elucidada por alguns estudos. O *Zingiber officinalis Roscoe* apresentou interação sinérgica entre seus constituintes em estudo realizado para avaliar sua atividade antiulcerosa. Neste estudo, verificou-se que frações enriquecidas com α-zingibereno [57], β-felandreno [58], bisaboleno [59] e curcumeno [60] foram responsáveis por 97% de sua atividade anti-úlcerosa, quando comparado com os componentes isolados (109).

Da mesma forma foi observada interação sinérgica, *in vitro*, para a mistura de extrato etanólico de *Centella asiatica* e α-tocoferol sobre a atividade antioxidante. Foi verificado maior efeito antioxidante e menores valores de IC<sub>50</sub> quando testados em conjunto, o que indica um efeito sinérgico entre o extrato e o composto α-tocoferol

(110).

Em outro estudo os flavonoides Kaempferol e quercetina foram analisados separadamente e em conjunto em relação aos efeitos sobre a proliferação de células cancerosas do intestino humano (Hutu -80 e Caco -2) e de mama (PMC42). Os resultados mostraram que os flavonoides quando testados em combinação apresentaram efeito anti-proliferativo cinco vezes maior em comparação aos flavonoides avaliados isoladamente (111).

Assim, é provável que os resultados obtidos para o extrato bruto e para a fração isopropanólica sejam decorrentes de um efeito sinérgico entre os compostos presentes. Com o fracionamento estes compostos foram separados levando a redução da potência da capacidade de inibição da enzima  $\alpha$ -amilase.

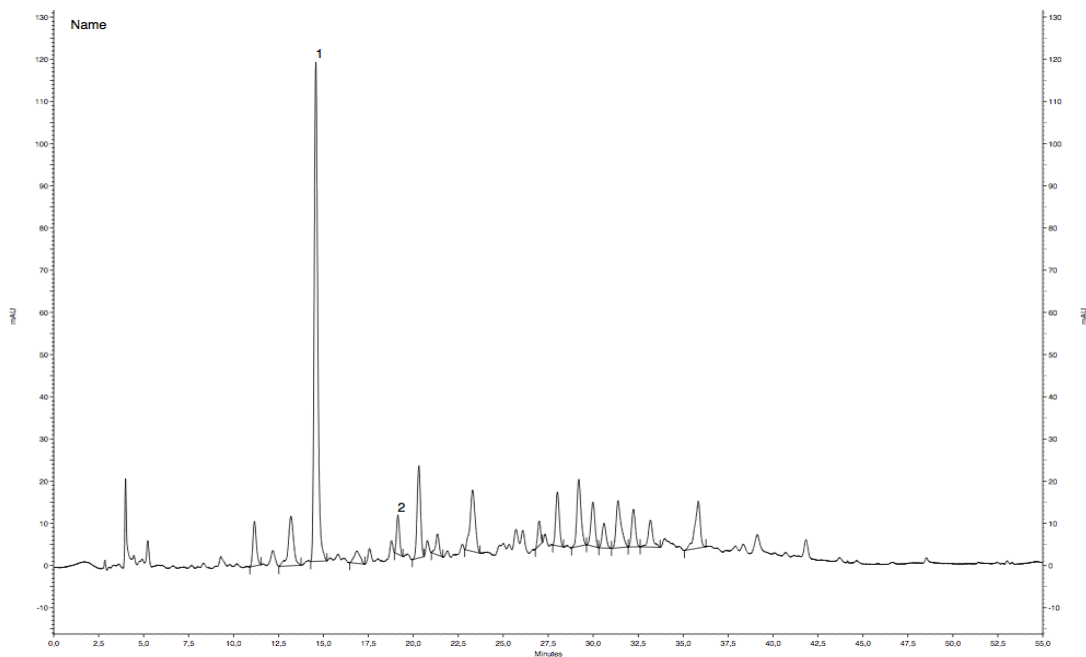
O extrato aquoso bruto e as frações que apresentaram um  $IC_{50}$  inferior a 50  $\mu\text{g/mL}$  foram analisados por CLAE.

#### 5.1.6.1 Cromatografia Líquida de Alta eficiência (CLAE)

Foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência o extrato aquoso bruto de *E. dysenterica*, a fração isopropanólica e as subfrações I 21, I 22 e I 8 (Figuras 16, 17, 18 e 19).

As análises com CLAE confirmaram a presença de flavonoides inicialmente verificadas por CCD. Foram utilizados padrões de referência para comparar os tempos de retenção do extrato e da fração isopropanólica de *E. dysenterica*. Sendo assim, os componentes majoritários presentes foram catequina (14 min) e epicatequina (18 min) (Figuras 16 e 17), compostos reconhecidamente bioativos. Pode-se observar que o perfil cromatográfico não apresentou variação significativa entre o extrato aquoso bruto e a fração isopropanólica. Porém, ao observar os cromatogramas obtidos por CCD (Figura 14 pag. 57) verificam-se diferenças nos perfis mesmo que sutis, o que pode explicar o aumento dos valores de  $IC_{50}$  nas subfrações e conseqüentemente a diminuição do potencial inibitório.

a



b

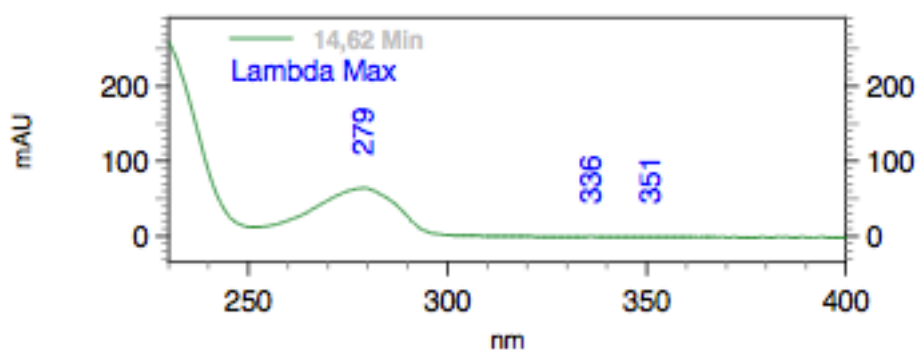
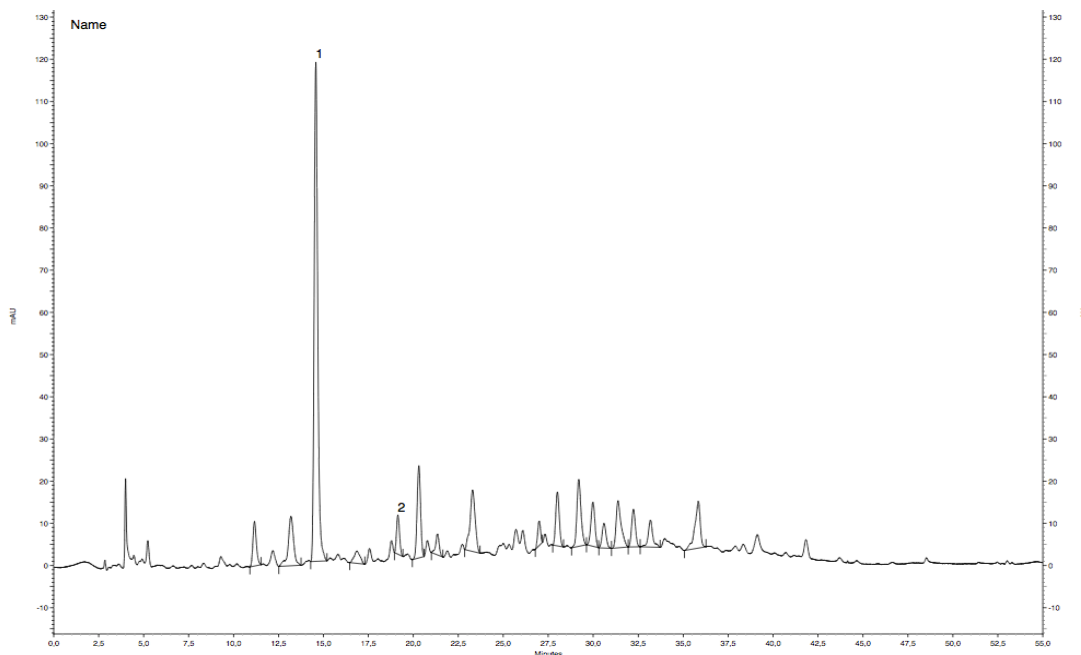


Figura 16. a) Perfil cromatográfico de extrato bruto aquoso de *E. dysenterica* por CLAE a 280 nm. Picos: 1-catequina; 2-epicatequina. b) Espectro UV do pico catequina.

a



b

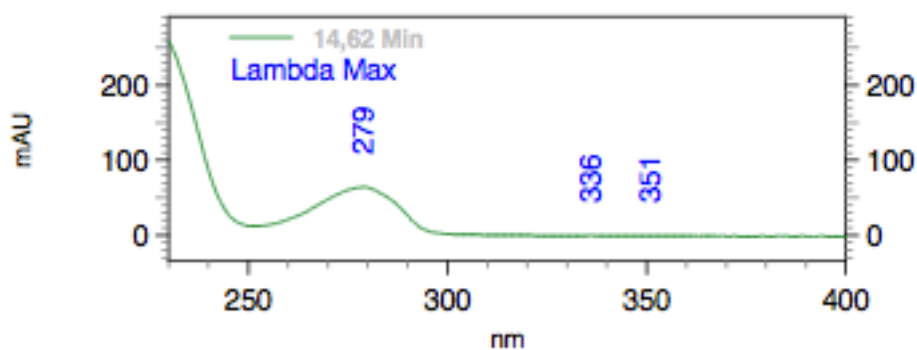


Figura 17. a) Perfil cromatográfico da fração isopropanólica por CLAE a 280 nm. Picos: 1-catequina; 2-epicatequina. b) Espectro UV do pico catequina da fração isopropanólica.

Estes resultados corroboram com estudos realizados por Bellostaa et. al. (2003) que ao analisar extrato metanólico de casca de *Tristanopsis calobuxus* pertencente a família Myrtaceae isolou catequina e galocatequina entre outros compostos (112). Bem como, no estudo de Barboni et. al. (2010) que identificou com HPLC-DAD 14 compostos fenólicos em bagas de *Myrtus communis* L, outra espécie da família Myrtaceae, dentre eles catequina, epicatequina e epigallocatequina (113).

Foram submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência somente as



frações que apresentaram  $IC_{50}$  abaixo de  $50 \mu\text{g/mL}$ . O espectro de CLAE das frações I 20 e I 21 não apresentou picos puros, o que impossibilitou a identificação dos compostos (Figuras 18 e 19). A fração I 8 quando eluída em CLAE-DAD CH2 254 nm apresentou um pico de retenção no tempo 27,853 minutos e  $\lambda_{\text{máximo}}$  do pico identificado igual a 252 nm sugerindo a presença de ácido elágico, conforme Figuras 20 e 21.

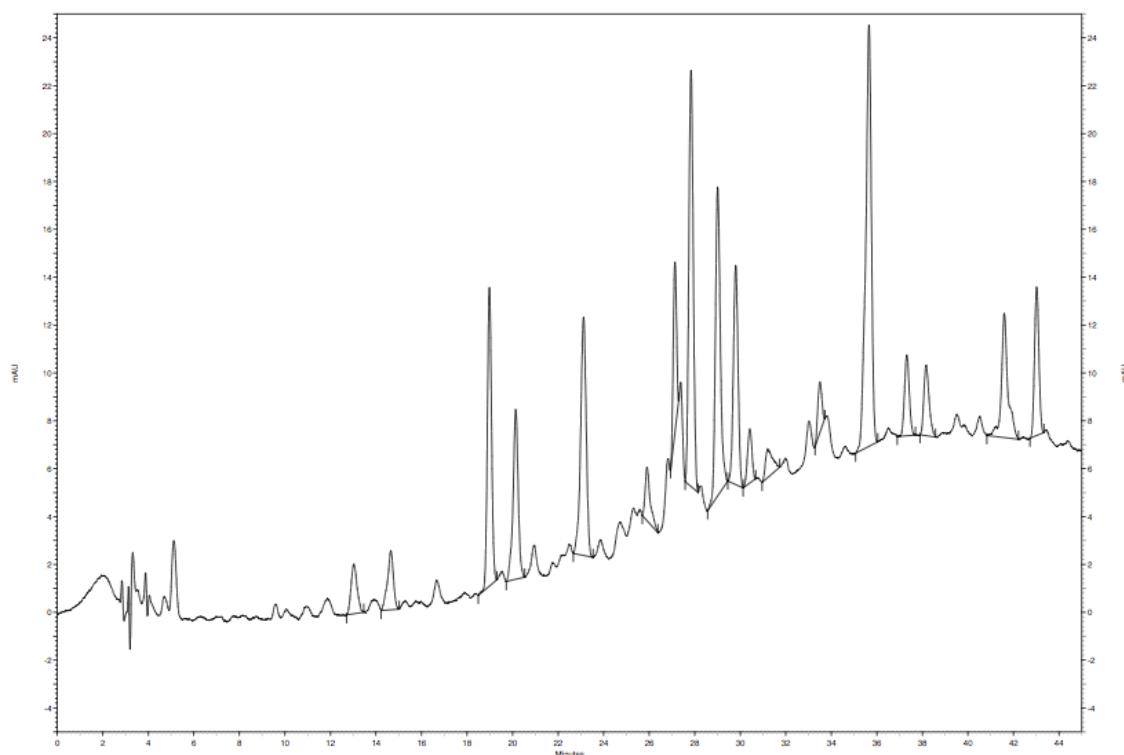


Figura 18. Perfil cromatográfico da subfração I 20 *E. dysenterica* por CLAE a 280 nm.

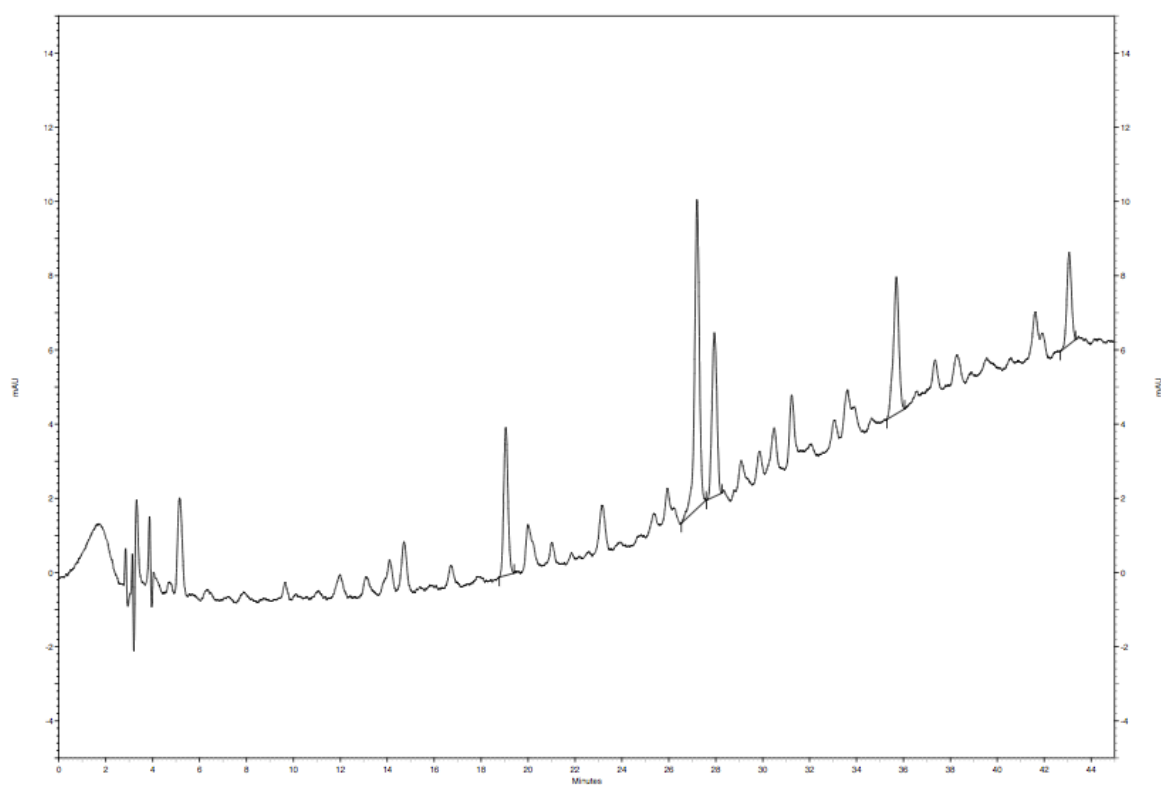


Figura 19. Perfil cromatográfico da subfração isopropanólica I21 *E. dysenterica* por CLAE a 280 nm.

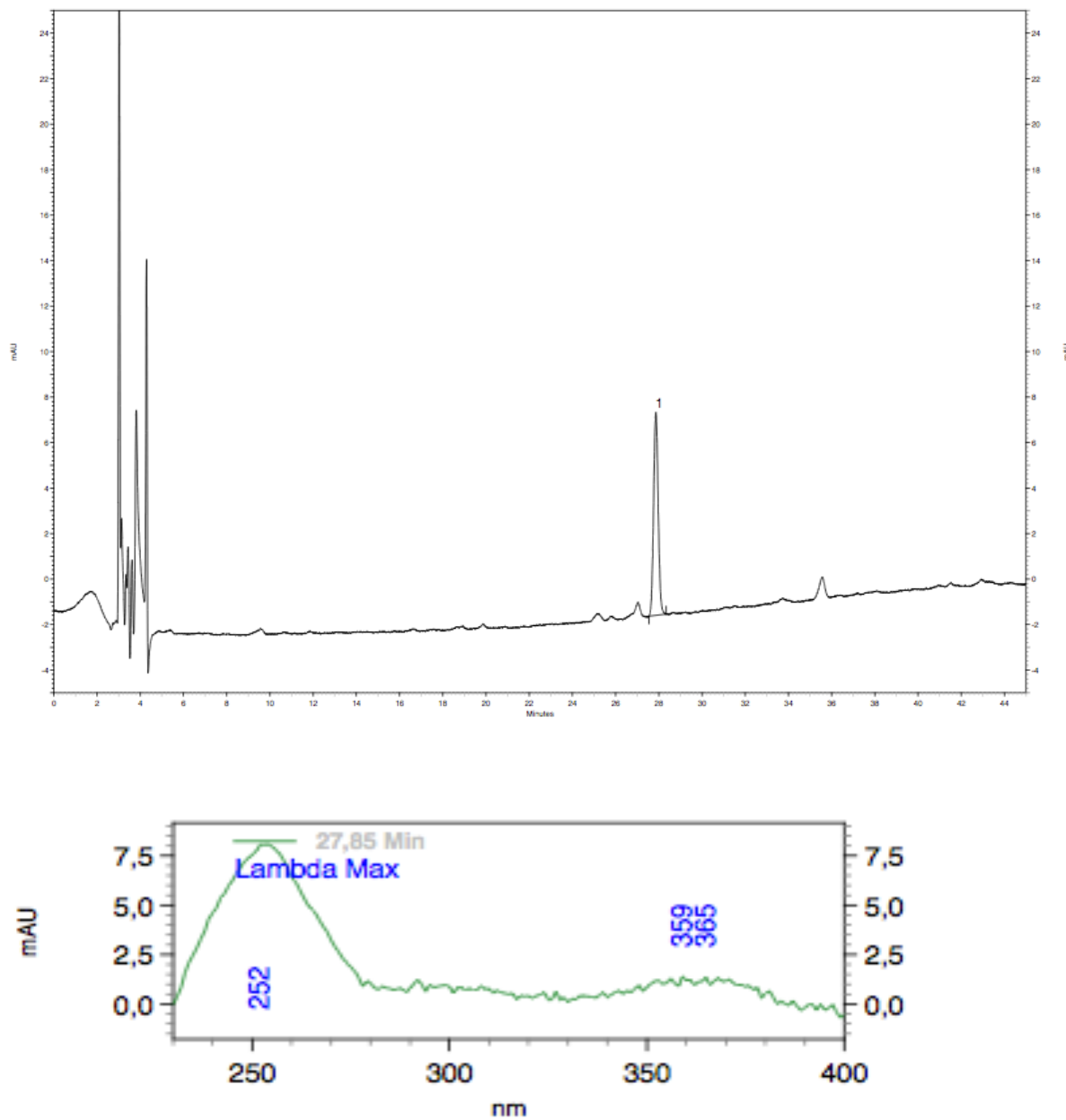
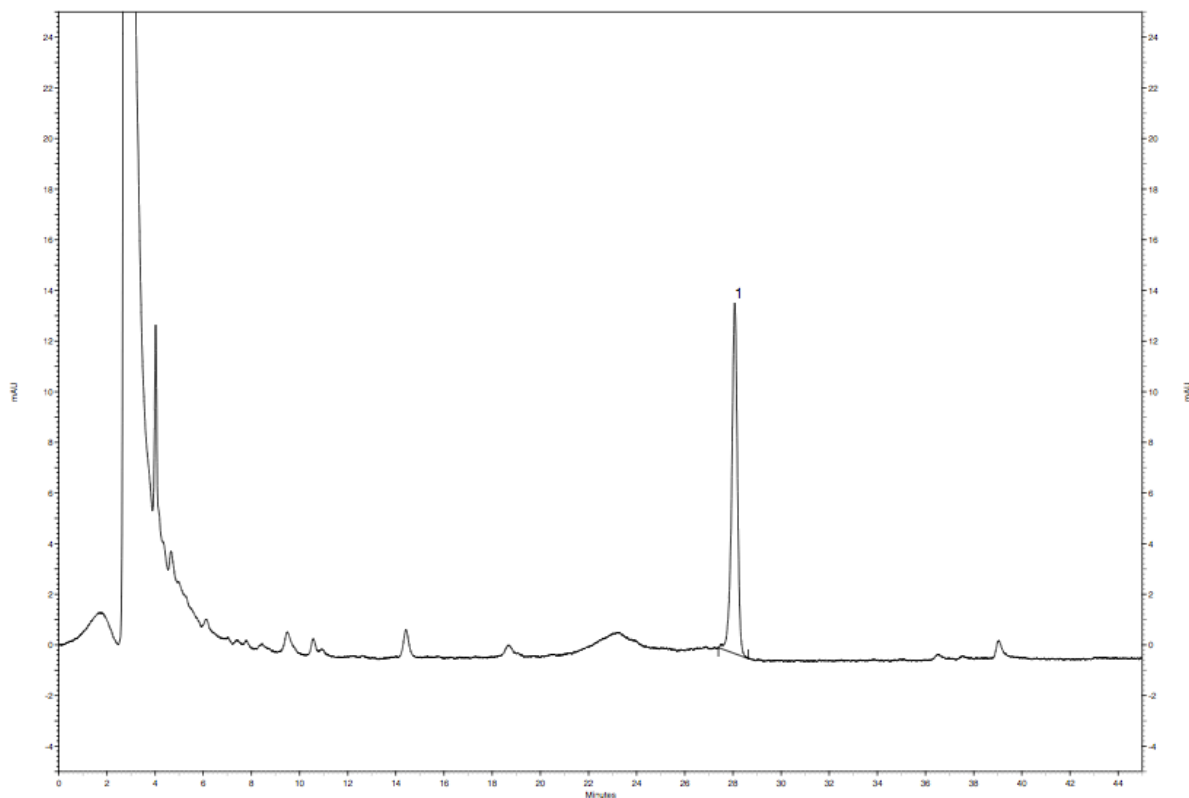


Figura 20. a) Perfil cromatográfico da subfração I8 *E. dysenterica* por CLAE a 254 nm. Pico: 1-ácido elágico. b) Espectro UV da subfração I8.

a



b

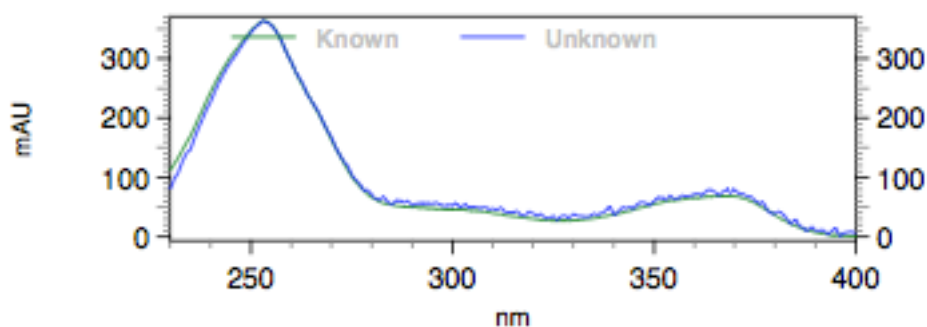
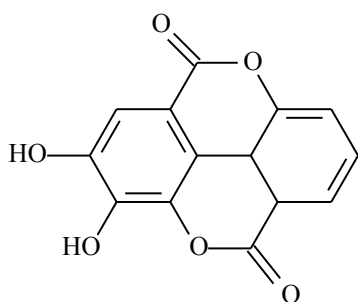


Figura 21. a) Perfil cromatográfico do padrão de ácido elágico por CLAE a 254 nm. Pico: 1-ácido elágico b) Espectro UV do padrão ácido elágico.

Estes resultados estão de acordo com Reynertson et. al. (2008) que avaliou a composição de *Eugenia aggregata*, *E. brasiliensis*, *E. luschnathiana*, *E. reinwardtiana*, *Myrciaria cauliflora*, *M. dubia*, *M. vexator*, *Syzygium cumini*, *S. curranii*, *S. jambos*, *S. javanicum*, *S. malaccense*, *S. samarangense*, e *S. samarangense* var. *Taiwan pink.*, todas espécies pertencentes a família Myrtaceae. Neste estudo, acima citado, não foi detectado ácido elágico, em apenas três espécies (*Eugenia aggregate*, *E. reinwardtiana* e *S. samarangense* var. *Taiwan pink.*), todas as outras espécies estudadas da família Myrtaceae por Reynertson et.

al. (2008) apresentaram concentrações de ácido elágico.(114). Outro estudo, realizado por Chirinos et. al. (2010), também identificou ácido elágico em frutos de *Myrciaria dubia* (outra espécie da família Myrtaceae) com tempo de retenção igual a 53.49 min e lambda máximo igual 254,7 nm por CLAE-PDA (115).

Neste sentido podemos sugerir que a presença de ácido elágico no extrato aquoso bruto, fração isopropanólica e na subfração I 8 de *E. dysenterica* é responsável pela inibição da enzima  $\alpha$ -amilase. Tendo em vista que estudos relatam que frações polifenólicas de plantas são capazes de alterar a utilização de glicose em mamíferos, provocando efeitos semelhantes a insulina. Os polifenóis são um grande grupo estruturalmente diverso que possuem um ou mais anéis aromáticos (porção fenólica) em sua estrutura com um ou mais grupos hidroxilo e são geralmente classificados como ácidos fenólicos, flavonoides, cumarinas e taninos (33, 116). Os taninos são um grupo de polifenóis heterogêneo amplamente distribuídos no reino vegetal, geralmente presente em frutos verdes. Em chás verde e preto os taninos são identificados como componentes ativos inibidores de amilase salivar (117, 118). Os taninos são classificados de acordo com sua estrutura química em dois grandes grupos: taninos hidrolisáveis e condensados. Os taninos hidrolisáveis são facilmente hidrolisado por ácidos (ou enzimas) em um açúcar ou em um poliol relacionado a um ácido carboxílico fenólico. Dependendo da natureza do ácido carboxílico fenólico, os taninos hidrolisáveis são geralmente subdivididos em galotaninos e elagitaninos. Hidrólise de galotaninos produz ácido gálico, enquanto que a de elagitaninos resulta em ácido elágico (Figura 22). O grupo de taninos condensados não contém um grupo açúcar na molécula (119).



ácido elágico

Figura 22. Estrutura molecular do ácido elágico

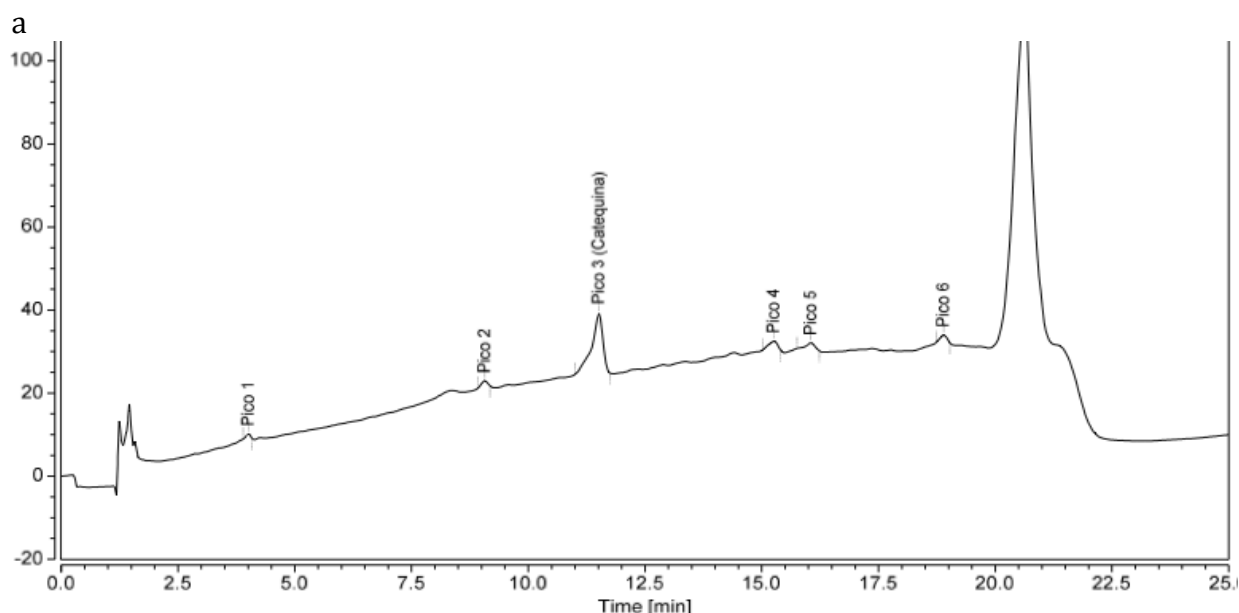
Estudos realizados em peras, cacau e lentilhas mostraram que os ácidos

tânicos e os taninos condensados foram os inibidores de enzimas digestivas como a amilase. Há também relatos de que taninos e derivados de ácido elágico em folhas de Banaba (*Lagerstroemia speciosa* L.) são inibidores potentes de  $\alpha$ -amilase (117). Taninos apresentam diversos efeitos sobre o sistema biológico por serem potenciais agentes quelantes de íons metálicos, agentes de precipitação de proteína, e oxidantes biológicos (119). Sendo assim, não é novidade que extratos contendo ácido elágico (como a subfração I8) seja um eficaz inibidor de  $\alpha$ -amilase. No entanto, ainda não havia sido descrito na literatura a presença de ácido elágico em folhas de *E. dysenterica*, este é o primeiro trabalho que relata a presença deste metabólito secundário nas folhas de *E. dysenterica*.

## 5.2 PADRONIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE *E. dysenterica*

### 5.2.1 Avaliação do perfil cromatográfico e teor de catequina por CLAE

O perfil cromatográfico por CLAE do extrato aquoso bruto de *E. dysenterica* apresentou seis picos principais, o que revela uma ampla diversidade química (Figura 23a). Por comparação do tempo de retenção do padrão foi identificada a presença de catequina, dentre as substâncias presentes no extrato (Figura 23b). Ao analisar o pico 3 (catequina) observa-se um pequeno ombro no lado esquerdo, que não apareceu quando o extrato aquoso bruto foi diluído em água. Porém, a água não foi capaz de diluir completamente a amostra. O que foi decisivo na escolha pelo metanol como solvente para esta análise.



b

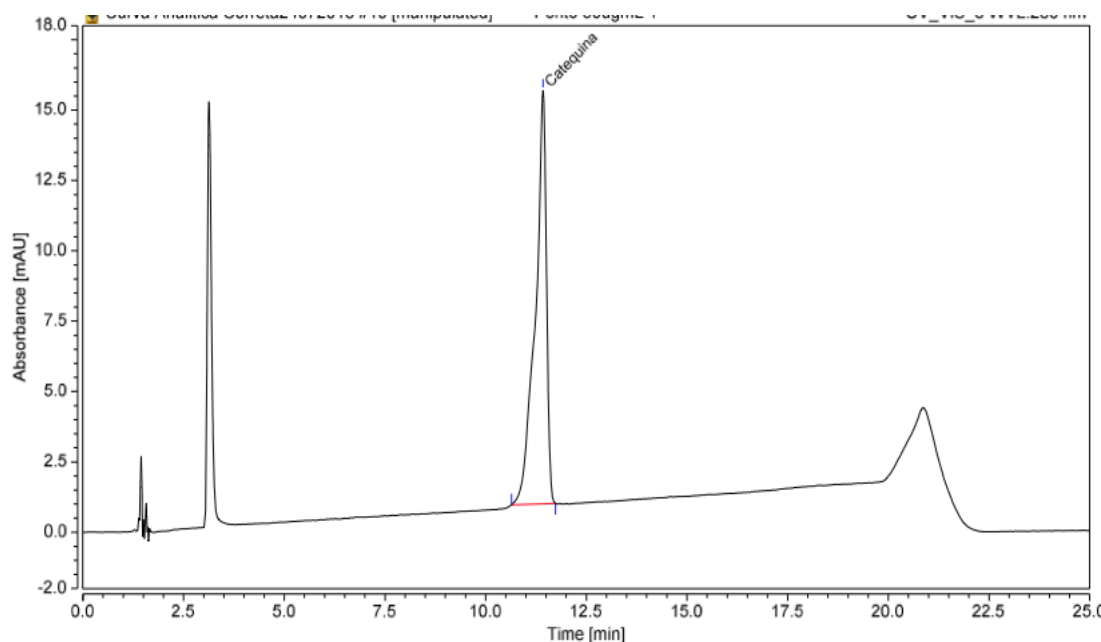


Figura 23. a) Perfil cromatográfico do extrato aquoso bruto de *E. dysenterica* diluído em metanol em CLAE a 280 nm. Onde, a = Extrato aquoso bruto (1 mg/mL), b) Perfil cromatográfico do padrão de catequina (50 µg/mL) em CLAE a 280 nm.

Foram utilizados os valores das áreas dos picos, correspondentes ao tempo de retenção na eluição da catequina para a quantificação deste composto no extrato bruto aquoso de *E. dysenterica*. Para o cálculo foi empregado a equação da reta  $y = 0,011109x - 0,2187$  ( $r = 0,9996$ ), obtida pela relação entre a área do pico *versus* a concentração do padrão de catequina. O conteúdo encontrado de catequina no extrato foi de 47,51 mg/g de extrato  $\pm$  3,36 (desvio padrão).

A concentração de catequina encontrada no extrato foi aproximadamente cinco vezes maior que o teor encontrado em estudo realizado por Aumjaud et. al. (2011). Onde os autores estudaram o extrato metanólico de *Eugenia pollicina*, outra espécie da família Myrtaceae. Os teores de catequina encontrados neste estudo foram 9,7 mg/g de extrato (120).

Neergheen et. al. (2006) avaliaram o teor de catequina em oito espécies da família Myrtaceae, obtidos por extração por maceração empregando acetona/água (70/30 v/v) como solvente. Estes autores encontraram teores de catequina inferiores aos encontrados em *E. dysenterica*, variando entre 6,15 mg/g a 16,98 mg/g. Sendo a *Syzygium mauritianum* a espécie com maior teor de catequina (121).

### 5.2.2 Validação do método de determinação do teor de catequina no extrato aquoso bruto de *E. dysenterica* por CLAE

A validação deve garantir que o método atenda as exigências das aplicações analíticas, assegurando confiabilidade dos resultados. Sendo assim, o método analítico foi avaliado em relação aos parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez (122).

Com a análise do extrato aquoso bruto de *E. dysenterica* pelo método descrito foi observada a presença de seis picos principais de substâncias, sendo possível identificar um deles como catequina Figura 24.

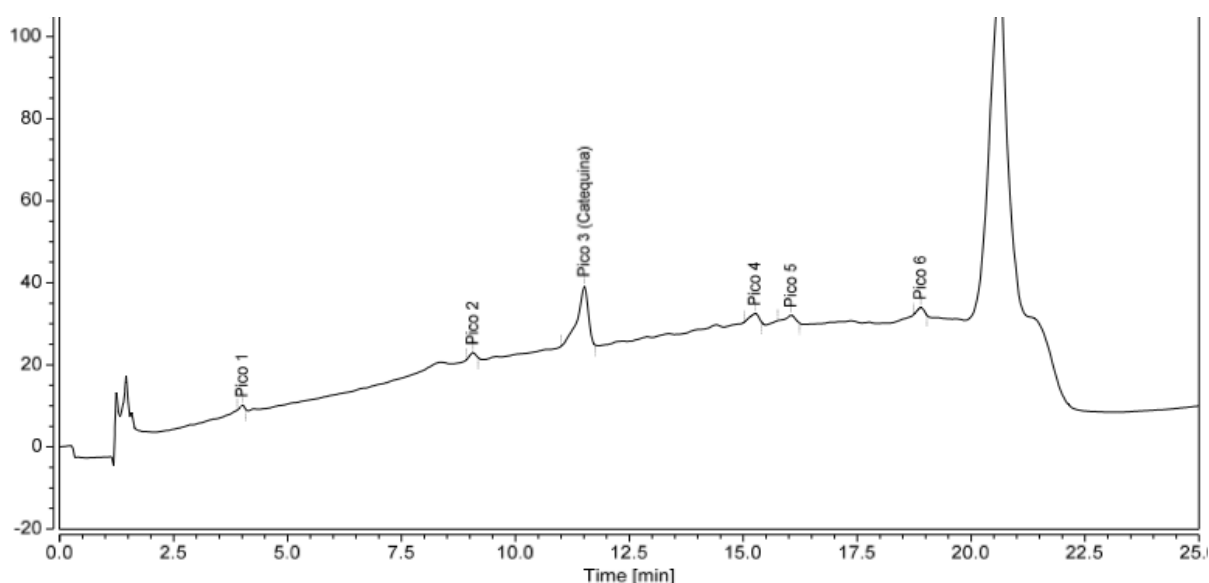


Figura 24. Perfil cromatográfico de extrato aquoso bruto de *E. dysenterica* por CLAE a 280 nm.

#### 5.2.2.3 Seletividade

Para analisar se o método proposto é capaz de separar impurezas e produtos de degradação da catequina, o extrato foi exposto à hidrólise ácida e básica. A partir da comparação da média das alterações do tempo de retenção e área do pico referente à catequina foi comprovada a seletividade do método. Os tempos de retenção, área e lambda máximo dos picos nas amostras sobre estresse ácido/básico e amostras não submetidas ao estresse estão demonstrados na Tabela 6.



Com a hidrólise ácida pode-se observar uma redução de 42% no teor de catequina da amostra, bem como a degradação do pico número 5. Haja vista que, o extrato sem hidrólise apresentou seis picos principais e após hidrólise ácida 5 picos (Figura 25). Não foi observada mudança significativa no tempo de retenção no método sob estresse ácido quando comparado com o extrato sem processo de hidrólise, o que demonstra que o método se manteve seletivo frente aos produtos de degradação da hidrólise ácida.

Porém, o método não foi totalmente seletivo pois quando submetida à hidrólise básica a catequina da amostra foi completamente degradada e novos picos apareceram como produtos de degradação (Figura 26), o que já era esperado devido às características da molécula catequina.

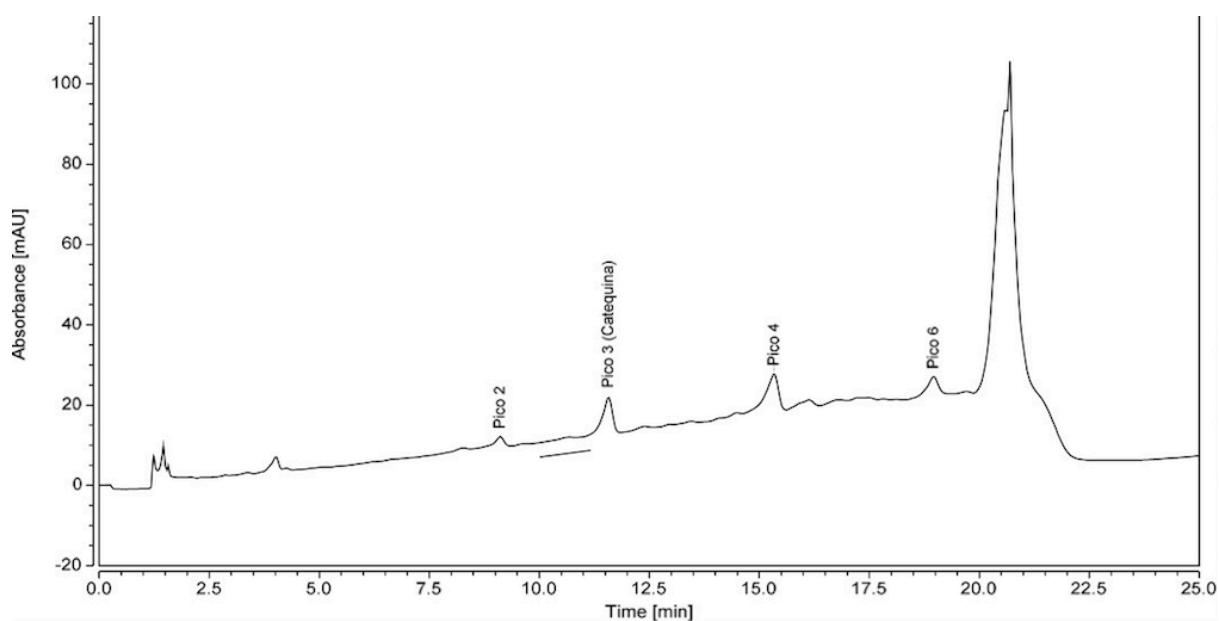


Figura 25. Perfil cromatográfico do extrato aquoso após hidrólise ácida a 280 nm.

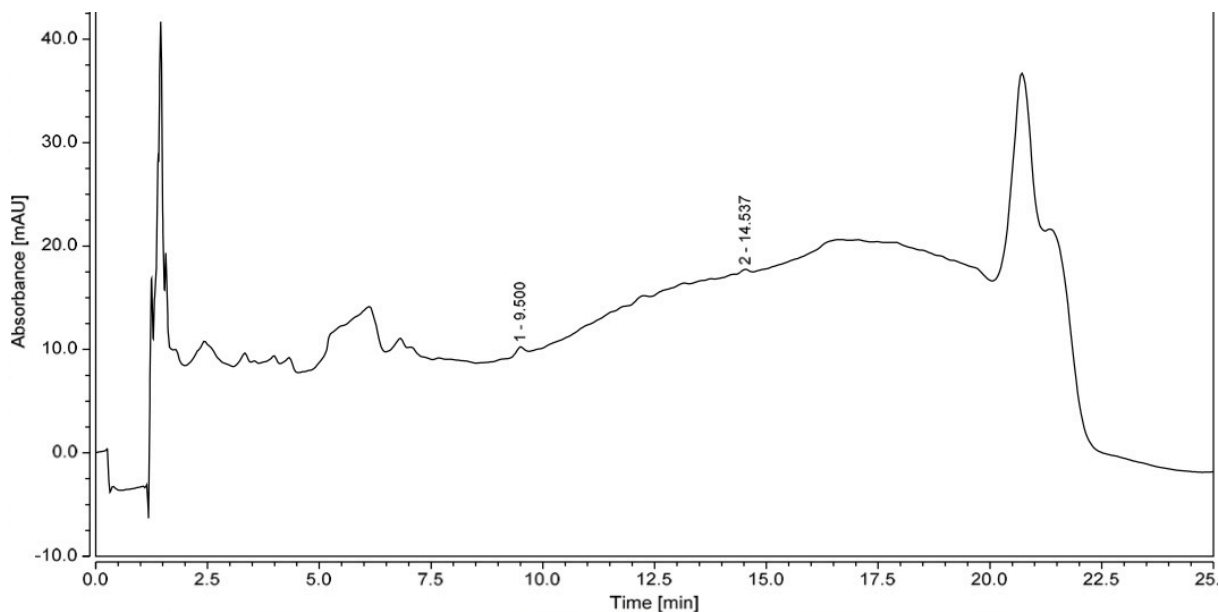


Figura 26. Perfil cromatográfico do extrato aquoso após hidrólise básica a 280 nm.

#### 5.2.2.4. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Limite de detecção é a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. Enquanto que o limite de quantificação é definido como a menor concentração do analito, que pode ser quantificada na amostra, com exatidão e precisão aceitáveis, sob as condições experimentais adotadas (122).

O limite de detecção e limite de quantificação encontrados para catequina frente ao método proposto foi 0,57 e 1,74  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. Os parâmetros de cálculos estão apresentados na Tabela 7.

#### 5.2.2.5 Linearidade

A equação da reta foi calculada a partir da média das absorbâncias obtidas na faixa de concentração estudada (1,0 – 50  $\mu\text{g/mL}$ ) e o coeficiente de correlação ( $r$ ) foi determinado utilizando o programa GraphPadPrism.

A curva de área do pico versus a concentração de catequina apresentou resposta linear em uma ampla faixa de concentração apresentando o coeficiente de correlação linear ( $r$ ), o intercepta, a inclinação e o desvio padrão relativo demonstrados na Tabela 8. No experimento foi obtido um valor médio do coeficiente de correlação igual a 0,9956 (Tabela 7), o qual se apresenta em acordo com a

Tabela 6 - Degradação por hidrólise ácida (HCl 1M) e básica (NaOH 1M) do extrato aquoso de *E. dysenterica*

Hidrólise	$\lambda$ máx.	Tempo de retenção (min.)	Área (mAU)
Extrato			
<b>Pico 1</b>	216; 270	4,006 $\pm$ 0,003	0,189 $\pm$ 0,05
<b>Pico 2</b>	200; 279	9,071 $\pm$ 0,009	0,295 $\pm$ 0,07
<b>Pico 3 (catequina)</b>	202,8; 279,3	11,516 $\pm$ 0,010	3,886 $\pm$ 0,26
<b>Pico 4</b>	201; 278	15,259 $\pm$ 0,010	0,525 $\pm$ 0,09
<b>Pico 5</b>	200; 277	16,053 $\pm$ 0,007	0,511 $\pm$ 0,18
<b>Pico 6</b>	201; 277	18,887 $\pm$ 0,015	0,581 $\pm$ 0,21
Ácida			
<b>Pico 1</b>	216; 270	3,997 $\pm$ 0,023	0,570 $\pm$ 0,01
<b>Pico 2</b>	200; 279	9,053 $\pm$ 0,051	0,357 $\pm$ 0,02
<b>Pico 3 (catequina)</b>	202,8; 279	11,502 $\pm$ 0,064	2,266 $\pm$ 0,16
<b>Pico 4</b>	201; 278	15,261 $\pm$ 0,06	2,67 $\pm$ 0,05
<b>Pico 6</b>	202; 277	18,882 $\pm$ 0,074	0,970 $\pm$ 0,08
Básica			
<b>Pico 7</b>	206; 230	9,52 $\pm$ 0,029	0,179 $\pm$ 0,15
<b>Pico 8</b>	195; 272	14,12 $\pm$ 0,59	1,547 $\pm$ 1,21

Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos.

a RE n° 899, de 29 de maio de 2003, que determina que o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação deve ser de (0,99). A figura 27 representa a curva de regressão linear obtida, que demonstrou que os resultados da metodologia analítica são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra.

Tabela 7 - Linearidade de catequina, limite de detecção e limite de quantificação de catequina na análise do método por CLAE.

	<b>Catequina</b> <b>(µg/mL)</b>	<b>Inclinação</b> <b>(slope)</b>	<b>Intercepta</b> <b>r</b>	<b>LD</b> <sup>a</sup>	<b>LQ</b> <sup>b</sup>	
				<b>(µg/mL)</b>	<b>(µg/mL)</b>	
Catequina	1,00-50,00	0,08±0,01	0,05±0,01	0,9956	0,57	1,74

Os resultados representam a média ± desvio padrão de três experimentos.

*r* – coeficiente de correlação

<sup>a</sup>LD -Limite de Detecção

<sup>b</sup>LQ -Limite de Quantificação

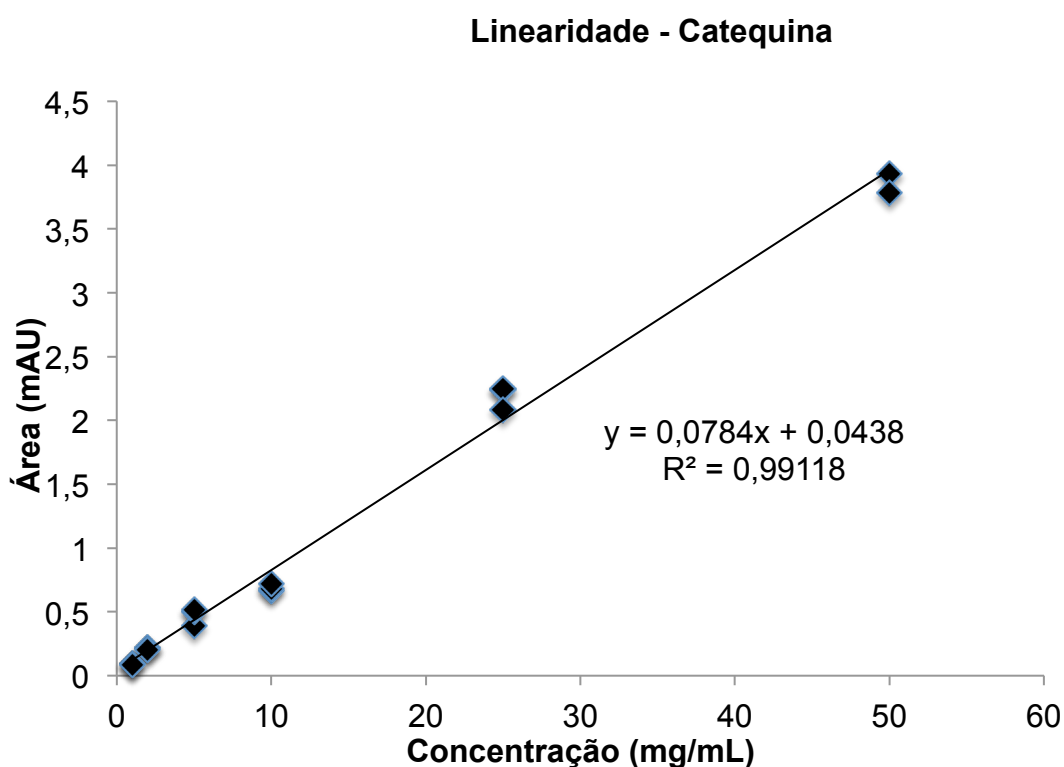


Figura 27. Curva de regressão linear de catequina.

A linearidade do método proposto foi muito boa pois conseguiu ultrapassar o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação de 0,99 proposto pela RE n°

899, de 29 de maio de 2003.

#### 5.2.2.6 Precisão

A precisão avalia a proximidade dos resultados obtidos de várias medidas efetuadas em uma mesma amostra. A partir da análise de 6 determinações de igual concentração (1 mg/mL) foi avaliada a repetibilidade, obtendo como desvio padrão relativo médio (RSD) o valor de 3,52%. Na análise inter-dia foi encontrada uma variação de 3,07% (Tabela 8), o que indica boa precisão visto que a literatura não admite valores superiores a 5%.

Tabela 8 - Precisão do método para quantificação de catequina em *E. dysenterica*

	Área do pico (mAU*min)	RSD (%)
<b>Repetibilidade<sup>a</sup></b>	4,13± 0,15	3,52
<b>Precisão inter-dia<sup>b</sup></b>	4,00 ± 0,12	3,07

Resultados representam a média ± desvio padrão.

<sup>a</sup> Seis replicatas analisadas no mesmo dia.

<sup>b</sup> Três triplicatas foram analisadas em três dias diferentes.

A obtenção de valores bem inferiores a 5% que são estabelecidos pela RE nº 899, de 29 de maio de 2003, demonstra que a precisão do método foi excelente pela proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla em CLAE, de uma mesma amostra.

#### 5.2.2.7 Exatidão

A exatidão representa a concordância entre o valor real do analito e o estimado pelo processo analítico. Neste estudo, a exatidão do método proposto foi calculada a partir do método de adição de padrão a amostra e está apresentada na Tabela 9. Os valores em porcentagem para a concentração teórica de catequina de 13,6; 17 e 20,4 µg/mL e foram 90,7, 98 e 99,1 respectivamente.

Tabela 9 - Exatidão do método por CLAE

	<b>Catequina adicionada(<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Catequina encontrada(<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Recuperação (%)</b>
<b>A</b>	13,6	12,3 $\pm$ 0,4	90,4 $\pm$ 2,9
<b>B</b>	17,0	16,6 $\pm$ 0,4	98,0 $\pm$ 2,4
<b>C</b>	20,4	20,2 $\pm$ 0,4	99,1 $\pm$ 2,1

A- Concentração baixa (80%), B- Concentração intermediária (100%), C- Alta concentração (120%). Os resultados são a média e desvio padrão.

#### 5.2.2.8 Robustez

A robustez é tida como a capacidade do método permanecer inalterado sob pequenas variações em seus parâmetros. Desta forma, foi observado que a variação dos parâmetros comprimento de onda e temperatura (Tabelas 10 e 11) não alterou significativamente os valores de área e tempo de retenção de uma solução de extrato aquoso de *E. dysenterica* preparada de forma normal. O que demonstra que o método é robusto.

Tabela 10 - Resultados da variação de comprimento de onda no ensaio robustez

<b>Comprimento de onda</b>	<b>Área (mAU*min)</b>	<b>Tempo de retenção (min)</b>
<b>270 nm</b>	0,8298	11,573
<b>280 nm</b>	0,891	11,457
<b>300 nm</b>	ND	ND

ND: Não detectado neste comprimento de onda.

Tabela 11 - Resultados da variação de temperatura no ensaio de robustez

Temperatura °C	Área (mAU*min)	Tempo de retenção (min)
<b>20</b>	0,895	12,573
<b>25</b>	0,891	11,457
<b>30</b>	0,732	10,683

Quanto a variação do parâmetro fluxo (Tabela 12) observou-se importantes alterações da área do pico e tempo de retenção. Os resultados determinam que a velocidade de fluxo é um parâmetro importante a ser bem acompanhado, pois o mesmo tem grande influência na separação das substâncias e pureza dos picos.

Tabela 12 - Resultados da variação de fluxo no ensaio robustez

Fluxo (mL/min)	Área (mAU*min)	Tempo de retenção (min)
<b>1,0</b>	0,963	13,647
<b>1,3</b>	0,899	11,457
<b>1,5</b>	0,688	10,647

### 5.3 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE *E. dysenterica*

#### 5.3.1 Determinação de Fenólicos Totais

A quantificação dos compostos fenólicos no extrato foi realizada com o método que utiliza o reagente Folin-Ciocalteu e o resultado foi expresso em equivalentes de ácido gálico, utilizando a equação  $y = 0,0905x - 0,0928$ .

O extrato aquoso bruto apresentou 9,70 mgGAE/g de extrato. O teor de polifenóis encontrado neste estudo é menor que o encontrado em pó de folhas de cagaita (177mg/g) e em extrato etanólico (18,38 mgGAE/g) e aquoso (16,23 mgGAE/g) de polpa de cagaita no estudo realizado por Couto et. al. (2009) e Roesler et. al. (2007), respectivamente (62, 69). Baixas concentrações de compostos fenólicos em extrato aquoso é esperado, haja visto que estes compostos

são melhor extraídos com solventes menos polares (69, 123). No entanto, foi maior que outro estudo com extrato de polpa de cagaita sem casca que apresentou 9,01 mgGAE/g em estudo realizado por Ribeiro et. al. (2011) (87).

### 5.3.2 Determinação de Flavonoides

O teor de flavonoides foi determinado pela equação  $y = 0,0296x - 0,0297$  ( $r^2=0,9991$ ) obtida com padrão de quercetina. Quercetina é considerado o flavonoide melhor descrito e mais estudado (124). Estudos anteriores demonstram que compostos tais como os flavonoides quercetina apresentam atividade anticancerígena e foram capazes de inibir a proliferação de células cancerígenas (125). O conteúdo de flavonoides totais encontrado para o extrato aquoso bruto de folhas de *Eugenia* foi de 14,3 mg de quercetina/g de extrato, sendo assim, maior que o encontrado no estudo realizado por Couto et. al. (2009) que demonstrou que as folhas de cagaita apresentava 6,10 mg/g (62). Os teores de flavonoides foram maiores também que os encontrados nos frutos de cagaita em estudo realizado por Genovese et. al. (2008) que demonstrou que o fruto da cagaita apresentava 2,96 mg/100 do flavonoide campferol e 0,19 mg/100g do flavonoide quercetina (124). O teor de flavonoides totais no extrato aquoso bruto de folhas de cagaita foram maiores também que nas folhas, rizoma e hastes da variedade Halia Bentog de *Zingiber officinale* (5,54), (1,36) e (3,66) e na variedade Halia Bara (7,05), (1,77) e (4,21) valores expressos como mg de quercetina por grama de extrato (125). O presente estudo também corrobora com Sreelatha e Padma (2009) em estudo com folhas maduras e tenras de *Moringa oleifera* no qual o teor de flavonoides foi 27 mg e 15 mg de quercetina por grama de extrato aquoso respectivamente (98).

### 5.3.4 Atividade Antioxidante

#### 5.3.4.1 Ensaio da redução do complexo de fosfomolibdênio

Existem alguns métodos para avaliar a capacidade antioxidante de uma amostra. Assim, o extrato aquoso bruto de *E. dysenterica* foi analisado quanto a sua capacidade antioxidante segundo o método de redução do complexo



fosfomolibdênio que baseia-se na redução do  $\text{Mo}^{+6}$  a  $\text{Mo}^{+5}$  pelo composto testado, seguido pela formação de um complexo fosfato /  $\text{Mo}^{+5}$  de cor verde em pH ácido (126). A atividade antioxidante do extrato foi mensurada pela comparação dos valores de absorvância da amostra em comparação com os padrões quercetina e BHT, e expressa em mg de equivalentes de quercetina (EQ)/mg de extrato (Tabela 13).

O extrato apresentou 0,56 mg/mL em relação ao BHT e 80,92 mg/mL em relação a quercetina.

O extrato aquoso de *E. dysenterica* foi capaz de reduzir o complexo fosfomolibdênio, porém a natureza redutora da amostra foi mais intensa quando comparada ao padrão quercetina.

Tabela 13 - Equivalência do extrato bruto de *E. dysenterica* em relação a quercetina e BHT

	Absorbância	Padrão Equivalentes em mg/mL	
		Quercetina	BHT
Ext. <i>E. dysenterica</i> (1 mg/mL)	0,693	80,92	0,56

#### 5.3.5 Ensaio de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)

Os átomos de hidrogênio ou a capacidade de doação de elétrons do extrato da planta foi medido a partir do branqueamento da solução de metanol a cor púrpura de DPPH. Este ensaio espectrofotométrico utiliza o radical DPPH estável como um reagente (127).

O extrato aquoso de *E. dysenterica* demonstrou atividade antioxidante de modo dose dependente, o valor de  $\text{IC}_{50}$  (concentração inibitória 50%) foi 1,115  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 28).

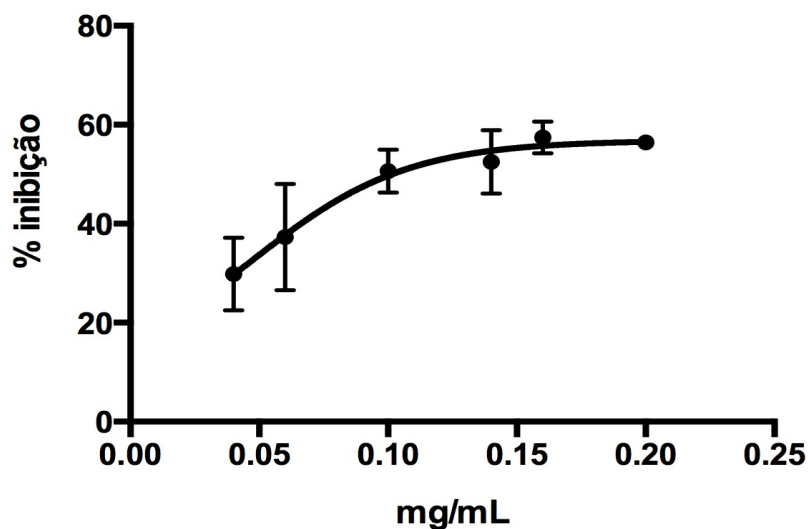


Figura 28. Curva da medida da atividade doadora de  $H^{\bullet}$  ao radical  $DPPH^{\bullet}$  para o extrato de *E. dysenterica*. Os resultados representam a média de três determinações  $\pm$  EPM.

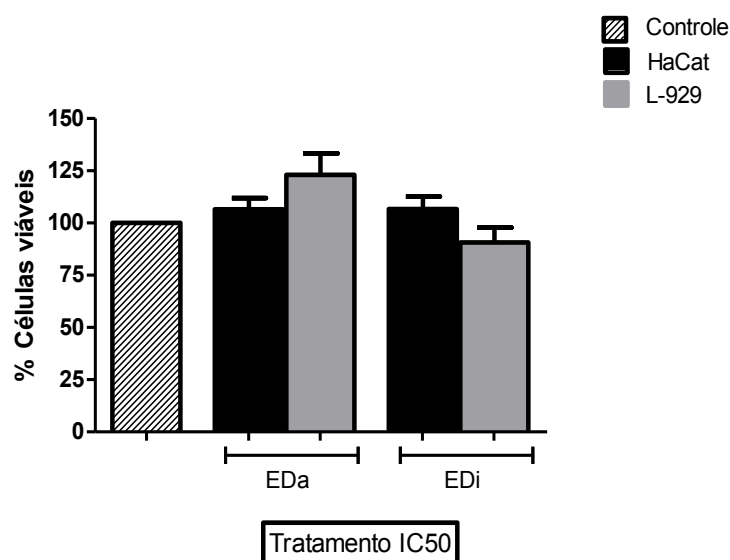
Em geral, entre as sub-classes de compostos fenólicos, os flavonoides glicosídicos apresentam maior atividade antioxidante. As catequinas fenilpropanóide-substituídas também mostraram atividades antioxidante superior em comparação com os controles positivos no estudo realizado por Wan et. al. (2012) (128). O baixo valor de  $IC_{50}$  do extrato aquoso de *E. dysenterica* pode estar relacionado com a presença de compostos fenólicos, estudos realizados por Lima et. al., (2010) mostraram que frações de extrato etanólico de *Annona cornifolia* que continham compostos fenólicos apresentaram valores melhores de  $IC_{50}$  em comparação com frações que não apresentavam compostos fenólicos (129). Ranilla et. al (2010) também apresentou em seus estudos que a quantidade de compostos fenólicos está diretamente relacionada com o potencial antioxidante de ervas medicinais e especiarias (130).

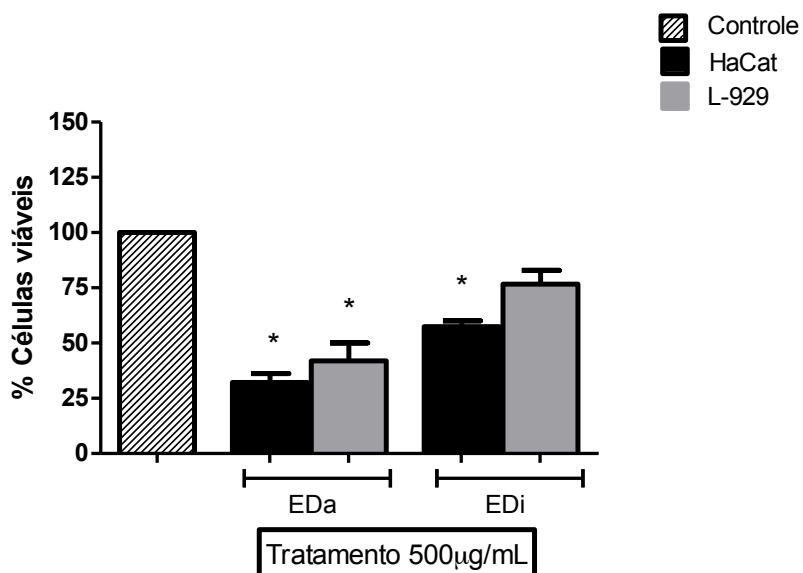
#### 5.4 Citotoxicidade celular (MTT)

O efeito citotóxico do extrato aquoso bruto e da fração isopropanólica das folhas de *E. dysenterica* foram avaliados em duas linhas de células, queratinócitos e fibroblastos normais, nas concentrações de 11,88  $\mu$ g/mL, 66,83  $\mu$ g/mL e 500  $\mu$ g/mL.

Nas menores concentrações testadas, próximas aos valores de  $IC_{50}$  os resultados não apresentaram morte celular em ambas as linhas celulares, em comparação com o controle, após 24 horas de tratamento Figura 29A. Porém, quando testadas na concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$  resultaram em citotoxicidade em ambas as linhagens testadas, o extrato aquoso bruto mostrou-se estatisticamente diferente do controle para ambas as células, enquanto a fração isopropanólica não apresentou diferença significativa em relação ao controle em relação à linhagem L-929 (apesar de ser citotóxico aparece estatisticamente igual ao controle) Figura 29B.

A)





B

Figura 29. Ensaio de citotoxicidade em linhagens de células queratinócitos (HaCat) e fibroblastos (L-929). Células tratadas com extratos na concentração de 500 µg/mL (a) e valores de IC<sub>50</sub> (b). Os resultados representam a média de três experimentos independentes, cada um em triplicada. O tratamento foi realizado durante 24h. Controle normalizado para 100%. \*p 0,05 vs controle. Onde: EDa = *E. dysenterica* extrato aquoso bruto; EDI = *E. dysenterica* fração isopropanólica.

## 6 CONCLUSÕES

---

Com este trabalho pode-se concluir que:

O processo de obtenção do extrato aquoso bruto de *E. dysenterica* foi padronizado e a reprodutibilidade do processo de extração em relação ao teor de sólidos totais, umidade e concentração de catequina, foi considerada adequada.

No ensaio de atividade enzimática da  $\alpha$ -amilase do extrato aquoso bruto de *E. dysenterica* e frações observou-se que o extrato aquoso bruto e a fração isopropanólica apresentaram inibição enzimática maior que 80% e seus valores de IC<sub>50</sub> foram próximos aos valores do controle acarbose. Porém, a avaliação do perfil de inibição enzimática das frações obtidas a partir da análise dos valores de IC<sub>50</sub>, mostrou que as frações I8, I16, I17, I20 e I21 possuem potencial de inibição menor que o extrato bruto, o que sugere a redução da atividade quando a amostra foi fracionada.

Ao analisar o perfil cromatográfico do extrato aquoso bruto e da fração isopropanólica por CLAE não foi observada diferença significativa no perfil dos picos identificados. Porém, ao observar os cromatogramas obtidos por CCD verifica-se diferenças nos perfis mesmo que sutis, o que pode explicar o aumento dos valores de IC<sub>50</sub> nas subfrações e conseqüentemente a diminuição do potencial inibitório em relação ao extrato aquoso bruto. Ao eluir a fração I8 em CLAE observou-se um pico que a partir do tempo de retenção e comparação do espectro UV sugere a presença de ácido elágico. Estudos mostram que o ácido elágico é um potente inibidor da  $\alpha$ -amilase e pela primeira vez foi identificado em folhas de *E. dysenterica*.

Foi desenvolvido um método cromatográfico rápido e confiável para determinação do flavonoide catequina no extrato bruto. Quando avaliado por CLAE o perfil do extrato bruto demonstrou ampla diversidade química e o teor de catequina obtido foi de 47,5 mg/g de extrato.

Em relação ao estudo da atividade antioxidante do referido extrato, este demonstrou

atividade doadora de H ao radical DPPH de modo dose dependente, o que pode ser justificado pelos baixos valores de  $IC_{50}$  do extrato aquoso de *E. dysenterica*. Pois outros estudos relacionam valores de  $IC_{50}$  com a presença de compostos fenólicos. Observou-se ainda que no ensaio da redução do complexo fosfomolibdênio o referido extrato apresentou natureza redutora mais intensa que o padrão utilizado (quercetina).

No ensaio de citotoxicidade do extrato aquoso bruto e da fração isopropanólica não foi observada citotoxicidade em concentrações próximas ou maiores que os valores de  $IC_{50}$  para amilase. Porém, em concentrações mais elevadas (500  $\mu\text{g/mL}$ ) os extratos foram tóxicos para as duas linhagens de células. No entanto, são necessários testes citotóxicos que envolvam células do sistema digestivo para garantir o uso de um provável fitomedicamento no controle da diabetes.

Com a realização deste trabalho foi observado que o extrato aquoso de *Eugenia dysenterica*, com sua ampla diversidade química, apresentou potente inibição sobre a  $\alpha$ -amilase. Podendo ser eficaz no controle glicêmico de pacientes diabéticos.

Contudo, apesar das fortes evidências, faz-se necessário estudos adicionais para melhor esclarecer a natureza deste efeito. Bem como, o emprego de outros modelos de atividade biológica que visem assegurar a eficácia e segurança do extrato bruto padronizado com o objetivo de desenvolver uma possível formulação fitoterápica.

---

## REFERÊNCIAS

---

1. WHO traditional medicine strategy 2002-2005. Geneva: World Health Organization 61 p. 2002c.
2. Galdino PM, Nascimento MVM, Sousa FBD, et al. Central activities of hydroalcoholic extract from *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. stem bark. Braz J Pharm Sci. 2010;46(3):455-62.
3. Bittencourt NLR, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Nakamura CV. Antitrypanosomal Activity of a Semi-Purified Subfraction Rich in Labdane Sesquiterpenes, Obtained from Flowers of *Anthemis tinctoria*, against *Trypanosoma cruzi*. Pharmacology & Pharmacy. 2011;2:47-55.
4. Patel DK, Patel K, Duraiswamy B, Dhanabal SP. Phytochemical analysis and standardization of *Strychnos nux-vomica* extract through HPTLC techniques. Asian Pacific Journal of Tropical Disease. 2012;2, Supplement 1(0):S56-S60.
5. Vieira PM, Veronezi E, Silva CR, Chen-Chen L. Detection of Genotoxic, Cytotoxic, and Protective Activities of *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae) in Mice. Journal of Medicinal Food. 2012. p. 563–7.
6. Galhiane MS, Rissato SR, Chierice GO, Almeida MV, Silva LC. Influence of different extraction methods on the yield and linalool content of the extracts of *Eugenia uniflora* L. Talanta. 2006;70(2):286-92.
7. Lima TB, Silva ON, Oliveira JTA, Vasconcelos IM, Scalabrin FB, Rocha TL, et al. Identification of *E. dysenterica* laxative peptide: A novel strategy in the treatment of chronic constipation and irritable bowel syndrome. Peptides. 2010;31(8):1426-33.
8. Lima TB, Silva ON, Silva LP, Rocha TL, Grossi-de-Sa MF, Franco OL, et al. In Vivo Effects of Cagaita (*Eugenia dysenterica*, DC.) Leaf Extracts on Diarrhea Treatment. Evid Based Complement Alternat Med. 2011;2011:1-10.
9. Souza PM, Sales PM, Simeoni LA, Silva EC, Silveira D, Magalhaes PO. Inhibitory Activity of  $\alpha$ -Amylase and  $\alpha$ -Glucosidase by Plant Extracts from the Brazilian Cerrado. Planta Medica. 2011;78(4):393-9.
10. Krithika R, Verma RJ, Shrivastav PS, Suguna L. Phyllanthin of Standardized *Phyllanthus amarus* Extract Attenuates Liver Oxidative Stress in Mice and Exerts

Cytoprotective Activity on Human Hepatoma Cell Line. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. 2011;1(2):57-67.

11. Oboh G, Ademiluyi AO, Faloye YM. Effect of Combination on the Antioxidant and Inhibitory Properties of Tropical Pepper Varieties Against  $\alpha$ -Amylase and  $\alpha$ -Glucosidase Activities In Vitro. *Journal of Medicinal Food*. 2011. p. 1152–8.

12. Sales PM, Souza PM, Simeoni LA, Silveira D.  $\alpha$ -Amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 2012;15(1):141-83.

13. Gonçalves R, Mateus N, de Freitas V. Inhibition of  $\alpha$ -amylase activity by condensed tannins. *Food Chemistry*. 2011;125(2):665-72.

14. Pinto MdS, Ghaedian R, Shi R. Potential of Cranberry Powder for Management of Hyperglycemia Using In Vitro Models. *Journal of Medicinal Food*. 2010. p. 1036–44.

15. Adisakwattana S, Lerdsuwankij O, Poputtachai U, Minipun A, Suparpro C. Inhibitory Activity of Cinnamon Bark Species and their Combination Effect with Acarbose against Intestinal  $\alpha$ -glucosidase and Pancreatic  $\alpha$ -amylase. *Plant Foods Hum Nutr*. 2011. p. 143-8.

16. Gulati VH, Ian H., Palombo EA. Enzyme inhibitory and antioxidant activities of traditional medicinal plants: potential application in the management of hyperglycemia. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2012. p. 77.

17. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract*. 2010. p. 4-14.

18. Goncalves AEDSS, Lajolo FM, Genovese MIS. Chemical Composition and Antioxidant/Antidiabetic Potential of Brazilian Native Fruits and Commercial Frozen Pulps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010. p. 4666–74.

19. Aznar Rodríguez S, Lomas Meneses A, Quílez Toboso RP, Huguete Moreno I. Diabetes mellitus. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. 2012;11(17):995-1002.

20. Arkkila PE, Gautier JF. Musculoskeletal disorders in diabetes mellitus: an update. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2003. p. 945-70.

21. Wu T, Zhou X, Deng Y, Jing Q, Li M, Yuan L. In vitro studies of *Gynura divaricata* (L.) DC extracts as inhibitors of key enzymes relevant for type 2 diabetes and hypertension. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011;136(2):305-8.



22. Garg V. Comparison of the Quality of Life of Type 2 Diabetes Mellitus Patients Treated with Biguanides, Thiazolidinediones and Sulphonyl ureas. *Indian Journal of Pharmacy Practice*. 2012;5(1):61-6.
23. Lapane KL, Yang S, Brown MJ, Jawahar R, Pagliasotti C, Raipathak S. Sulfonylureas and Risk of Falls and Fractures: A Systematic Review. *Drugs & Aging*. 2013;30(7):527-47.
24. Pereira LSR. Diabetes Mellitus Tipo 2: Influência da Farmacogenômica na terapêutica oral: Universidade do Algarve; 2011.
25. Gyemant G, Kandra L, Nagy V, Somsak L. Inhibition of human salivary alpha-amylase by glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003;312(2):334-9.
26. Narita T, Yokoyama H, Yamashita R, Sato T, Hosoba M, Morii T, et al. Comparisons of the effects of 12-week administration of miglitol and voglibose on the responses of plasma incretins after a mixed meal in Japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2012;14(3):283-7.
27. Nomura S, Omoto S, Yokoi T, Fujita S, Ozasa R, Eguchi N, et al. Effects of miglitol in platelet-derived microparticle, adiponectin, and selectin level in patients with type 2 diabetes mellitus. *International Journal of General Medicine*. 2011;4:539-45.
28. Hsieh S-H, Shih K-C, Chou C-W, Chu C-H. Evaluation of the efficacy and tolerability of miglitol in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus inadequately controlled by diet and sulfonylureas. *Acta Diabetologica*. 2011;48(1):71-7.
29. Salomon BMD. Glucose Control and Vascular Complications in Type 2 Diabetes. *The New England Journal of Medicine*. 2009;360(19):2031-2.
30. FDA - Muraglitazar Briefing Document, Safety Endocrine and Metabolic Drugs Advisory Committee Meeting [http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/05/briefing/2005-4169B2\\_02\\_03-FDA-MedOff-Safety.pdf2005](http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/05/briefing/2005-4169B2_02_03-FDA-MedOff-Safety.pdf2005) acesso em: 27 nov. de 2013.
31. BRASIL. RE n. 1466 de 29 de setembro de 2010. Cancela o registro do medicamento Avandia fabricado pelo laboratório Glaxo-Smith Kline, que tem como princípio-ativo a substância rosiglitazona. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/legislacao>. Acesso em: 27 nov. 2013.

32. Yang X-W, Huang M-Z, Jin Y-S, Sun L-N, Song Y, Chen H-S. Phenolics from *Bidens bipinnata* and their amylase inhibitory properties. *Fitoterapia*. 2012;83(7):1169-75.
33. Sales PMd, Souza PMd, Simeoni LA, Magalhães PO, Silveir D.  $\alpha$ -Amylase Inhibitors: A Review of Raw Material and Isolated Compounds from Plant Source. *Journal Pharm Pharmaceutical Science* 2012. p. 141-83.
34. Bhargava SY, Kumar AR, P S, Zinjarde SS. Potent [alpha]-amylase inhibitory activity of Indian Ayurvedic medicinal plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2011;11:5.
35. Whitcomb DC, Lowe ME. Human Pancreatic Digestive Enzymes. *Digestive Diseases and Sciences*. 2013;52(1):1-17.
36. Zhang J, Cui J-H, Yin T, Sun L, Li G. Activated effect of lignin on  $\alpha$ -amylase. *Food Chemistry*. 2013;141(3):2229-37.
37. Meltem Y-M, Griffith AM, Michels AJ, Schneider E, Frei B. Grape Seed and Tea Extracts and Catechin 3-Gallates Are Potent Inhibitors of  $\alpha$ -Amylase and  $\alpha$ -Glucosidase Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012;60(36):6.
38. Buisson G, Duee E, Haser R, Payan F. Three dimensional structure of porcine pancreatic alpha-amylase at 2.9 A resolution. Role of calcium in structure and activity. *EMBO J*. 1987;6(13):3909-16.
39. Yan J, Zhao Y, Suo S, Liu Y, Zhao B. Green tea catechins ameliorate adipose insulin resistance by improving oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. 2012;52(9):1648-57.
40. Park JH, Jin JY, Baek WK, Park SH, Sung HY, Kim YK, et al. Ambivalent Role of Gallated Catechins in Glucose Tolerance in Humans: A Novel Insight non-absorbable Gallated Catechin-Derived Inhibitors of Glucose Absorption. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2009;60(4):101-9.
41. Mahomoodally MF, Subratty AH, Gurib-Fakim A, Choudhary MI, Nahar Khan S. Traditional medicinal herbs and food plants have the potential to inhibit key carbohydrate hydrolyzing enzymes in vitro and reduce postprandial blood glucose peaks in vivo. *Scientific World Journal*. 2012;2012:285284.
42. Rubilar M, Jara C, Poo Y, Acevedo F, Gutierrez C, Sineiro J, et al. Extracts of Maqui (*Aristotelia chilensis*) and Murta (*Ugni molinae Turcz*): Sources of Antioxidant Compounds and  $\alpha$ -Glucosidase/ $\alpha$ -Amylase Inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011;59(5):1630-7.

43. Souza PM, Elias ST, Simeoni LA, de Paula JE, Gomes SM, Guerra ENS, et al. Plants from Brazilian Cerrado with potent tyrosinase inhibitory activity. *Plos One*. 2012;7(11):e48589-e.
44. Galeno D, Carvalho R, Araújo Boleti A, Lima A, Almeida P, Pacheco C, et al. Extract from *Eugenia punicifolia* is an Antioxidant and Inhibits Enzymes Related to Metabolic Syndrome. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2013:1-14.
45. Oliveira VB, Yamada LT, Fagg CW, Brandão MGL. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. *Food Research International*. 2012;48(1):170-9.
46. Akinnifesi FK, Sileshi GW. *Urban Ecosystems*. 2013;13(1):129-46.
47. de Melo JG, Santos AG, de Amorim ELC, Nascimento SCd, de Albuquerque UP. Medicinal Plants Used as Antitumor Agents in Brazil: An Ethnobotanical Approach. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2011;2011.
48. Costa MA, Ishida K, Kaplum V, Koslyk ÉDA, de Mello JCP, Ueda-Nakamura T, et al. Safety evaluation of proanthocyanidin polymer-rich fraction obtained from stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão) for use as a pharmacological agent. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2010;58(2):330-5.
49. Ribeiro SC, Fehrmann L, Soares CPB, Jacovine LAG, Kleinn C, de Oliveira Gaspar R. Above- and belowground biomass in a Brazilian Cerrado. *Forest Ecology and Management*. 2011;262(3):491-9.
50. Vynne C, Keim JL, Machado RB, Marinho-Filho J, Silveira L, Groom MJ, et al. Resource selection and its implications for wide-ranging mammals of the Brazilian cerrado. *Plos One*. 2011;6(12):e28939-e.
51. Jacobson TKB, Bustamante MMdC, Kozovits AR. Diversity of shrub tree layer, leaf litter decomposition and N release in a Brazilian Cerrado under N, P and N plus P additions. *Environmental Pollution*. 2011;159(10):2236-42.
52. Rocha WS, Lopes RM, Silva DBD, Vieira RF, Silva JPD, Agostini-Costa TDS. Total phenolics and condensed tannins in native fruits from Brazilian savanna. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 2011;33(4):1215-21.
53. Perumal SR, Gopalakrishnakone P. Therapeutic potential of plants as anti-microbials for drug discovery. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2010;7(3):283-94.
54. Haraguchi LMM, Carvalho OBd. *Plantas Medicinais*. 1ª ed. São Paulo 2010.

55. Bresolin TMB, Cechinel Filho V. *Fármacos e medicamentos: uma abordagem multidisciplinar*. São Paulo -Santos. 2010.
56. Jirschitzka J, Schmidt GW, Reichelt M, Schneider B, Gershenzon J, D'Auria JC. Plant tropane alkaloid biosynthesis evolved independently in the Solanaceae and Erythroxylaceae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(26):103-04, .
57. Jyothi K, Seshagiri M. In-Vitro Activity of Saponins of *Bauhinia purpurea*, *Madhuca longifolia*, *Celastrus paniculatus* and *Semecarpus anacardium* on Selected Oral Pathogens. *Journal of Dentistry*. 2012; 9(4):216.
58. Bag A, Bhattacharyya SK, Pal NK, Chattopadhyay RR. In vitro antibacterial potential of *Eugenia jambolana* seed extracts against multidrug-resistant human bacterial pathogens. *Microbiological Research*. 2012;167(6):352-7.
59. Routray W, Orsat V. Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids: A Review. *Food and Bioprocess Technology*. 2013;5(2):409-24.
60. de Toledo CEM, Britta EA, Ceole LF, Silva ER, de Mello JCP, Dias Filho BP, et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of medicinal plants of the Brazilian cerrado, using Brazilian cachaça as extractor liquid. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011;133(2):420-5.
61. Souza LCKH, Oliveira CIMA, Ferri PH, Santos SC, Oliveira Junior JSG, Miranda ATB, et al. Antifungal Properties of Brazilian Cerrado Plants. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2002. p. 247-9.
62. Couto ROD, Valgas AB, Bara MTF, Paula JRD. Caracterização Físico-Química do Pó Das Folhas de *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae). *Revista Eletronica de Farmácia*. 2009. p. 59 - 69.
63. Brandão MDGL. *Auguste de Saint-Hilaire Quadro Geográfico da Vegetação Primitiva na Província de Minas Gerais*. Belo Horizonte - MG, Brasil. 2011:56.
64. Cole RA, Haber WA, Setzer WN. Chemical composition of essential oils of seven species of *Eugenia* from Monteverde, Costa Rica. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2007;35(12):877-86.
65. Jadeja R, Thouaojam M, Sankhari J, Jain M, Devkar R, Ramachandran AV. Standardized Flavonoid-Rich *Eugenia jambolana* Seed Extract Retards In Vitro and In Vivo LDL Oxidation and Expression of VCAM-1 and P-Selectin in Atherogenic Rats. *Cardiovascular Toxicology*. 2012;12(1):73-82.

66. Sharma SB, Tanwar RS, Nasir A, Prabh KM. Antihyperlipidemic Effect of Active Principle Isolated from Seed of *Eugenia jambolana* on Alloxan-Induced Diabetic Rabbits. *Journal of Medicinal Food*. 2011;14 (4) 2011, 353–359(4):7.
67. Oliveira AM, Humberto MMS, Silva JM, Rocha RFA, SAAE G. Estudo fitoquímico e avaliação das atividades moluscicida e larvicida dos extratos da casca do caule e folha de *Eugenia malaccensis* L. (Myrtaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2006;16:618-24.
68. Costa TR, Fernandes OFL, Santos SC, Oliveira CIMA, Lião LM, Ferri PH, et al. Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000;72(1–2):111-7.
69. Roesler R, Malta LG, Carrasco LC, Holanda RB, Souza CAS, Pastore GM. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Ciencias e Tecnologia Alimentos*. 2007;27(1):53-60.
70. Cardoso LdM, Martino HSD, Moreira AVB, Ribeiro SMR, Pinheiro-Sant'Ana HM. Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) of the Cerrado of Minas Gerais, Brazil: Physical and chemical characterization, carotenoids and vitamins. *Food Research International*. 2011;44(7):2151-4.
71. Rachid CTCC, Santos AL, Piccolo MC, Balieiro FC, Coutinho HLC, Peixoto RS, et al. Effect of sugarcane burning or green harvest methods on the Brazilian Cerrado soil bacterial community structure. *Plos One*. 2013;8(3):e59342-e.
72. Kunle OF, Egharevba, H., Ahmadu, P.O. Standardization of herbal medicines - A review. *International Journal of Biodiversity and Conservation*. 2012;4(3):101-12.
73. Brasil. Resolução da Diretoria Colegiada -RDC 17, 24 de fevereiro de 2000. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/legislacao>. Acesso em: 12 jul. 2013.
74. Syamsudin. Standardization of extract of *Leucaena leucocephala* (Imk) De Wit seeds by alpha-glucosidase inhibitor. *International Journal of Phytomedicine* 2010. p. 430-5.
75. Sonaglio D, Petrovick PR, Bassan VL. Padronização De Extratos Vegetais: Extrato hidroalcoólico de *Achirocline satureioides* (LAM) DC. *Compositae* (Marcela): comparação entre cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia em papel/ultravioleta. *Caderno de Farmácia URGS*. 1986;2(1):55-74.

76. Teh C-H, Murugaiyah V, Chan K-L. Developing a validated liquid chromatography–mass spectrometric method for the simultaneous analysis of five bioactive quassinoid markers for the standardization of manufactured batches of *Eurycoma longifolia* Jack extract as antimalarial medicaments. *Journal of Chromatography A*. 2011;1218(14):1861-77.
77. Patel DK, Patel K, Dhanabal SP. Standardization of *Berberis aristata* extract through conventional and modern HPTLC techniques. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 2012;2, Supplement 1(0):S136-S40.
78. Ravi A, Mallika A, Sama V, Begum AS, Khan RS, Reddy BM. Antiproliferative activity and standardization of *Tecomella undulata* bark extract on K562 cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011;137(3):1353-9.
79. Couto RO, Martins FS, Chaul LT, Conceição EC, Freitas LAP, Bara MTF, et al. Spray drying of *Eugenia dysenterica* extract: effects of in-process parameters on product quality. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2013;23(1):115-23.
80. Van der Maarel MJ, Van der Veen B, Uitdehaag JC, Leemhuis H, Dijkhuizen L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family. *Journal Biotechnology*. 2002;94(2):137-55.
81. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 1959;31(3):426-8.
82. Silva RN, Monteiro VN, Alcanfor JD. Comparação de métodos para determinação de açúcares redutores e totais em mel. *Ciência Tecnologia Alimentos*. 2003;23(3): 337-41.
83. Bernfeld. Amylases,  $\alpha$  and  $\beta$ . *Methods in Enzymology*. 1955. p. 149-58.
84. Brasil. RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/2003> . Acesso em: 18 jul 2013.
85. International Conference on Harmonization (ICH) ICHg, Topic Q2B. Note for guidelines on Validation of Analytical Procedures: Methodology. 1996.
86. Sousa JPBD, Silva Filho AAD, Bueno PCP, Gregório LE, Niede AJC, Furtado, JRF, et al. A Validated Reverse-phase HPLC Analytical Method for the Quantification of Phenolic Compounds in *Baccharis dracunculifolia* Q. *Phytochemical Analysis*. 2009;20:24-32.
87. Ribeiro EMG, Ortiz GMD, Cardoso FSN, Viana DS, Carvalho JLV, Patricia PB and Tebaldi NM. An Overview on Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) Macro and

Micro Components and a Technological Approach. Agricultural and Biological Sciences "Food Industry". 2013.

88. Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. Food chemistry. 2004. p. 329-39.

89. Nhiem NX, Van Kiem P, Van Minh C, Ban NK, Cuong NX, Tai BH, et al. Phenylpropanoid glycosides from *Heterosmilax erythrantha* and their antioxidant activity. Archives of pharmacal research. 2009. p. 1373-7.

90. Lee JH, Lee SJ, Park S, Jeong SW, Kim CY, Jin JS, et al. Determination of flavonoid level variation in onion (*Allium cepa* L.) infected by *Fusarium oxysporum* using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Food Chemistry. 2012;133(4):1653-7.

91. Woisky RG, Salatino A. Analysis of Propolis: Some Parameters and Procedures for Chemical Quality Control. Journal of Apicultural Research. 1998;37(2):99-105.

92. Buriol L, Finger D, Schmidt EM, Santos JMT, Rosa MR, Quinária SP, et al. Chemical composition and biological activity of oil propolis extract: an alternative to ethanolic extract. Química nova. 2009:296.

93. Zarina Z, Y. TS. Determination of flavonoids in *Citrus grandis* (Pomelo) peels and their inhibition activity on lipid peroxidation in fish tissue. International Food Research Journal. 2013;20(1):313-7.

94. Cornard JP, Merlin JC. Complexes of aluminium(III) with isoquercitrin: spectroscopic characterization and quantum chemical calculations. Polyhedron. 2002;21:2801-10.

95. Sone Y, Moon J-K, Mai TT, Thu NN, Asano E, Yamaguchi K, et al. Antioxidant/anti-inflammatory activities and total phenolic content of extracts obtained from plants grown in Vietnam. 2011; 91(12):2259-64.

96. Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. Analytical Biochemistry 1999. p. 337-41.

97. BLOIS MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. . Nature. 1958;26(4617):1199-200.

98. Sreelatha S, Padma PR. Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of *Moringa oleifera* Leaves in Two Stages of Maturity. *Plant Foods for Human Nutrition* 2009;64:303-11.

99. Simões CMO, Schenkel EP, Gosman G, De Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis. 2002.
100. Springfield E, Eagles P, Scott G. Quality assessment of South African herbal medicines by means of HPLC fingerprinting. Journal of ethnopharmacology. 2005;101(1-3):75.
101. Tadera K, Minami Y, Takamatsu K, Matsuoka T. Inhibition of  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -Amylase by Flavonoids. Journal of Nutritional Science and Vitaminology. 2006;52(2):149-53.
102. Hargrove JL, Greenspan P, Hartle DK, Dowd C. Inhibition of Aromatase and  $\alpha$ -Amylase by Flavonoids and Proanthocyanidins from Sorghum bicolor Bran Extracts. Journal of Medicinal Food. 2011;14(7-8):799-807.
103. Kobayashi K, Ishihara T, Khono E, Miyase T, Yoshizaki F. Constituents of Stem Bark of Callistemon rigidus Showing Inhibitory Effects on Mouse  $\alpha$ -Amylase Activity. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 2006;29(6):1275-7.
104. Ponnusamy S, Zinjarde S, Bhargava S, Rajamohanan PR, RaviKumar A. Discovering Bisdemethoxycurcumin from *Curcuma longa* rhizome as a potent small molecule inhibitor of human pancreatic  $\alpha$ -amylase, a target for type-2 diabetes. Food Chemistry. 2012;135(4):2638-42.
105. Kim J-S, Hyun TK, Kim M-J. The inhibitory effects of ethanol extracts from sorghum, foxtail millet and proso millet on  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase activities. Food Chemistry. 2011;124(4):1647-51.
106. Sreerama YN, Sashikala VB, Pratape VM. Phenolic compounds in cowpea and horse gram flours in comparison to chickpea flour: Evaluation of their antioxidant and enzyme inhibitory properties associated with hyperglycemia and hypertension. Food Chemistry. 2012;133(1):156-62.
107. Kumar AS, Venkatarathanamma V, Suneeta K, Kumari BS. Comparative *in vitro* Screening of alpha amylase and alpha-glicosidase enzyme Inhibitory Studies in Leaves of *Annona species*. Journal of Pharmacy Research. 2011;4(12):4431-4.
108. Kim J-S, Kwon C-S, Son KH. Inhibition of Alpha-glucosidase and Amylase by Luteolin, a Flavonoid. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2000;64(11):2458-61.
109. Williamson EM. Synergy and other interactions in phytomedicines. Phytomedicine. 2001;8(5):401-9.



110. Thoo YY, Abas F, Lai O-M, Ho CW, Yin J, Hedegaard RV, et al. Antioxidant synergism between ethanolic *Centella asiatica* extracts and  $\alpha$ -tocopherol in model systems. *Food Chemistry*. 2013;138(2–3):1215-9.
111. Ackland ML, Waarsenburg SV, Jones R. Synergistic Antiproliferative Action of the Flavonols Quercetin and Kaempferol in Cultured Human Cancer Cell Lines. In *Vivo International Journal of Experimental and Clinical Pathophysiology and Drug Research*. 2005;19(1):69-76.
112. Bellostaa S, Dell'Agliia M, Canavesia M, Mitroa N, Monettia M, Crestania M, et al. Inhibition of metalloproteinase-9 activity and gene expression by polyphenolic compounds isolated from the bark of *Tristaniopsis calobuxus* (Myrtaceae). *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences*. 2003;60(2003):1440-8.
113. Barboni T, Cannac M, Massi L, Perez-Ramirez Y, Chiaramonti N. Variability of Polyphenol Compounds in *Myrtus Communis* L. (Myrtaceae) Berries from Corsica. *Molecules*. 2010;15:7849-60.
114. Reynertson KA, Yang H, Jiang B, Basile MJ, Kennelly EJ. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. *Food Chemistry*. 2008;109(4):883-90.
115. Chirinos R, Galarza J, Betalleluz-Pallardel I, Pedreschi R, Campos D. Antioxidant compounds and antioxidant capacity of *Peruvian camu camu* (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) fruit at different maturity stages. *Food Chemistry*. 2010;120(4):1019-24.
116. Liu RH. Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action. *The Journal of Nutrition*. 2004;134(12):3479-85.
117. Gordon J, McDougall, Faina Shpiro, Patricia Dobson, Pauline Smith, Alison Blake a, Stewart D. Different Polyphenolic Components of Soft Fruits Inhibit  $\alpha$ -Amylase and  $\alpha$ -Glucosidase. 2005.
118. Brandão TSO, Sena AR, Teshima E, David JM, Assis SA. Changes in enzymes, phenolic compounds, tannins, and vitamin C in various stages of jambolan (*Syzygium cumini* Lamark) development. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2011;31(4):849-55.
119. Kandra L, Gyémánt G, Zajác Á, Batta G. Inhibitory effects of tannin on human salivary  $\alpha$ -amylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004;319(4):1265-71.

120. Ramful D, Aumjaud B, Neergheen VS, Soobrattee MA, Googoolye K, Aruoma OI, et al. Polyphenolic content and antioxidant activity of *Eugenia pollicina* leaf extract in vitro and in model emulsion systems. *Food Research International*. 2011;44(5):1190-6.
121. Neergheen VS, Soobrattee MA, Bahorun T, Aruoma OI. Characterization of the phenolic constituents in Mauritian endemic plants as determinants of their antioxidant activities in vitro. *Journal of Plant Physiology*. 2006;163(8):787-99.
122. Brasil. Resolução n. 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br2003> Acesso em: 07 maio 2013.
123. Manaharan T, Teng LL, Appleton D, Ming CH, Masilamani T, Palanisamy UD. Antioxidant and antiglycemic potential of *Peltophorum pterocarpum* plant parts. *Food Chemistry*. 2011;129(4):1355-61.
124. Genovese MI, Pinto MDS, Gonçalves AEDSS, Lajolo FM. Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity of Exotic Fruits and Commercial Frozen Pulp from Brazil. 2008;14(3):207-14.
125. Ghasemzadeh A, Jaafar HZE, Rahmat A. Antioxidant Activities, Total Phenolics and Flavonoids Content in Two Varieties of Malaysia Young Ginger (*Zingiber officinale Roscoe*). *Journal Molecules*. 2010;2010(15):4324-33.
126. Parasca OM, Lupasco F, Vasile C, Mares M, Nastasa V, Profire L. NEW Hydrazines with Sulphonamidic Structure: Synthesis, Characterization and Biological Activity. *Rev Med Chir Soc Med Nat*. 2013;117(1):238-43.
127. Albayrak S. The Volatile Compounds and Bioactivity of *Achillea sieheana Stapf*. (Asteraceae). *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2013;12(1):37-45.
128. Wan C, Yuan T, Cirello AL, Seeram NP. Antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory phenolics isolated from highbush blueberry flowers. *Food Chemistry*. 2012;135(3):1929-37.
129. Lima LARS, Pimenta LPS, Boaventura MAD. Acetogenins from *Annona cornifolia* and their antioxidant capacity. *Food Chemistry*. 2010;122(4):1129-38.
130. Ranilla LG, Kwon YI, Apostolidis E, Shetty K. Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. *Bioresour Technol*. 2010;101(12):4676-89.

