



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA E FARMACOLOGIA

MÔNICA BORDIN PESSUTO

ANÁLISE FITOQUÍMICA DE EXTRATO DE FOLHAS DE
Maytenus ilicifolia MART. EX REISS. E AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL ANTIOXIDANTE

MARINGÁ

2006

MÔNICA BORDIN PESSUTO

ANÁLISE FITOQUÍMICA DE EXTRATO DE FOLHAS DE
Maytenus ilicifolia MART. EX REISS. E AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL ANTIOXIDANTE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

MARINGÁ

2006

MÔNICA BORDIN PESSUTO

ANÁLISE FITOQUÍMICA DE EXTRATO DE FOLHAS DE
Maytenus ilicifolia MART. EX REISS. E AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL ANTIOXIDANTE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em 24 de outubro de 2006.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello (orientador)
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Profa. Dr. Selma Lucy Franco
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Profa. Dr. Tomoe Nakashima
Universidade Federal do Paraná - UFPR

*Aos meus pais: Nelso e Sara, ao meu esposo Luiz
e aos meus queridos filhos, Lucas e Gabriela.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por mais esta oportunidade de aprendizado.

À professora. Selma Franco do Departamento de Farmácia e Farmacologia, por sua atenção e incentivo.

Ao professor João Carlos Palazzo de Mello pelo incentivo, confiança e amizade em todo este período de trabalho.

Às alunas Angelita Boldieri Souza e Isis Oliveira pela dedicação e auxílio prestados na elaboração deste trabalho.

Aos integrantes do laboratório e do DFF, em especial Gisely, Ana, Elza, Analice, Karina, Glauber, Flávia, Juliana, Ademir, Clemansur, Helena, Sônia, Nair e Cláudio.

Ao pessoal da biblioteca, por toda orientação e auxílio prestado.

Aos professores da Pós-Graduação, pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelos recursos, pela oportunidade de aprendizado e realização deste trabalho.

E a todos aqueles que amorosamente estiveram ao meu lado e contribuíram de alguma forma, para a elaboração dessa dissertação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

"Seja como as ondas do mar que mesmo quebrando
contra os obstáculos, encontram forças pra recomeçar" (S. Bombarèn).

RESUMO

Maytenus ilicifolia Mart. ex Reiss. (Celastraceae) é uma espécie vegetal amplamente utilizada na medicina popular devido às suas atividades antiulcerogênica, antitumoral, e antimicrobiana. Popularmente designada como “espinheira-santa”, é encontrada no sul do Brasil, Paraguai, Uruguai e Argentina. Este trabalho objetivou o isolamento químico de taninos condensados de extratos das folhas de *M. ilicifolia* e avaliação do potencial antioxidante dos extratos bruto, semipurificado e substâncias isoladas através dos métodos com o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH[•]), com o fosfomolibdato e com o ácido tiobarbitúrico. O controle de qualidade da matéria-prima vegetal foi realizado seguindo parâmetros farmacopéicos e não farmacopéicos, com os seguintes resultados: perda por secagem 40,39%±1,38 (CV%=3,42); perda por dessecação 10,92%±0,10 (CV%=0,91); teor de extrativos 31,60%±0,22 (CV%=0,72); teor de taninos totais 5,04%±0,07 (CV%=1,57). As substâncias químicas isoladas e identificadas foram: catequina, epicatequina, epigalocatequina, epicatequina-(4β→8)-epicatequina (PB₂), epicatequina-(4β→8)-catequina (PB₁). Os extratos bruto e semipurificado (frações aquosa e acetato de etila), e as substâncias isoladas foram submetidas à avaliação do potencial antioxidante pelo teste DPPH[•]. Os resultados obtidos utilizando a vitamina C como referência, foram expressos em termos de IC₅₀ (µg/ml), respectivamente: 35,34±0,35 (CV%=0,98); 47,31±0,19 (CV%=0,40); 25,39±1,04 (CV%=4,07); vitamina C 7,18±0,26 (CV%=3,56); catequina 2,89±0,16 (CV%=8,72); epicatequina 1,49±0,25 (CV%=16,79); epigalocatequina 2,62±0,85 (CV%=32,27); epicatequina-(4β→8)-epicatequina 2,24±0,29 (CV%=13); epicatequina-(4β→8)-catequina 1,90±0,72 (CV%=26,79). Para o teste do fosfomolibdato foram testados o extrato bruto e as frações aquosa e acetato de etila, obtendo-se os seguintes resultados, respectivamente: 0,30±0,087 %F (CV%=2,93); 0,15±0,0076 %F (CV%=4,95); 0,70±0,031 %F (CV%=4,40); vitamina C= 1. Para o teste do ácido tiobarbitúrico foi testada a fração acetato de etila nas concentrações 1; 0,8; 0,6; 0,3 e 0,1 mg/ml, sendo que as amostras apresentaram atividade inibitória da peroxidação lipídica máxima em concentrações iguais à 0,8 mg/ml. Na avaliação da atividade antioxidante por redução do DPPH[•], os extratos bruto, fração aquosa e fração acetato de etila apresentaram uma boa atividade antioxidante sendo que, a fração acetato de etila mostrou melhor atividade em relação aos demais extratos, porém inferior ao padrão vitamina C. As substâncias isoladas apresentaram atividade antioxidante significativa sendo que monômeros apresentaram atividade antioxidante superior aos dímeros, e notadamente superior ao padrão vitamina C. Os resultados obtidos nos testes do

fosfomolibdato e ácido tiobarbitúrico confirmaram a atividade antioxidante da fração acetato de etila devido, provavelmente, ao seu conteúdo em compostos fenólicos.

Palavras-chave: *Maytenus ilicifolia*. Taninos condensados. Atividade antioxidante. DPPH•.

Método do fosfomolibdato. Ácido tiobarbitúrico.

ABSTRACT

Maytenus ilicifolia Mart. ex Reiss.(Celastraceae) is a vegetable drug widely used in treatments by native population due to its antiulceration, antitumoural and antimicrobial activities. Popularly known as 'espinheira-santa', it is found in the South of Brazil, Paraguay, Uruguay and Argentina. The aim of this work was to carry out the chemical isolation and identification of condensed tannins of *M. ilicifolia* leaves and the evaluation of the antioxidant potential of crude, semipurified extracts and isolated substances, through tests using DPPH[•] as radical scavenger, with phosphomolybdenum and with thiobarbituric acid. The quality control of the vegetable raw material was accomplished following pharmacopeial and non-pharmacopeial assays, thus, presenting the following results, respectively: 40.39%±1.38 (CV%=3.42) determination of water; 10.92%±0.10 (CV%=0.91) loss on drying; 31.60%±0.22 (CV%=0.72) determination of extractives; 5.04%±0.07 (CV%=1.57) total tannins content. The following compounds were isolated and identified: catechin, epicatechin, epigallocatechin, epicatechin-(4β→8)-epicatechin, epicatechin-(4β→8)-catechin. The crude, semipurified extracts (aqueous and ethyl-acetate fractions) and the isolated substances were evaluated of the antioxidant potential by using the DPPH[•] method (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). The obtained results, by using ascorbic acid as reference, were expressed in terms of IC₅₀ (µg/ml), respectively, 35.34±0.35 (CV=0.98%); 47.31±0.19 (CV=0.40%); 25.39±1.04 (CV=4.07%); 7.18±0.26 ascorbic acid (CV=3.56%); catechin 2.89±0.16 (CV=8.72%); epicatechin 1.49±0.25 (CV=16.79%); epigallocatechin 2.62±0.85 (CV=32.27%); 3.05±0.09 (CV=3.01%); epicatechin-(4β→8)-epicatechin 2.24±0.29 (CV=13%); epicatechin-(4β→8)-catechin 1.90±0.72 (CV=26.79%). For the phosphomolybdenum test, the crude extract, the aqueous and ethyl-acetate fractions were tested, thus obtaining, respectively, the following results: 0.30±0.087 %F (CV=2.93%); 0.15±0.0076 %F (CV=4.95%); 0.70±0.031 %F (CV=4.40%). For the thiobarbituric acid assay the ethyl-acetate fraction, in 1; 0.8; 0.6; 0.3 and 0.1 mg/ml concentration was tested and the samples presented maximum inhibiting activity of the lipid peroxidation in concentrations even 0.8 mg/ml. In the evaluation of the antioxidant activity for reduction of DPPH[•], the crude extract, aqueous and ethyl-acetate fractions presented a good antioxidant activity and, the ethyl-acetate fraction has shown better activity than the other extracts, however, it was inferior to the ascorbic acid pattern. The isolated compounds presented significant antioxidant activity and flavan-3-ols monomers presented superior antioxidant activity than dimmers compounds, and the flavan-3-ols were better as ascorbic acid pattern. The results obtained in the tests of phosphomolybdenum and

thiobarbituric acid confirms the antioxidant activity of the ethyl-acetate fraction, probably due to its content in phenolic compounds.

Key-Words: *Maytenus ilicifolia*. Condensed tannins. Antioxidant activity. DPPH•. Phosphomolybdenum method. Thiobarbituric acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura

1	Aspecto dos galhos e flores de <i>Maytenus ilicifolia</i>	24
2	Estruturas químicas básicas de taninos hidrolisáveis	27
3	Monômeros básicos de taninos condensados de acordo com o quadro 1 ...	28
4	Diferença no tipo de acoplamento nos taninos condensados do tipo A: 1=robinetinidol-(4 β →8;2 β →O→7)-epicatequina e do tipo B: 2=epicatequina-(4 β →6)-catequina e 3=epicatequina-(4 β →8)-catequina...	30
5	Formação do radical livre hidroxila pela via de Fenton	34
6	Formação das espécies reativas de oxigênio (EROs)	34
7	Autoxidação de ácidos graxos poliinsaturados	35
8	Exemplos de antioxidantes sintéticos e naturais	37
9	Estrutura do DPPH [•] : radical livre (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) e reduzido (difenil picrilhidrazina)	40
10	Mecanismo de ação provável entre o radical DPPH e substâncias fenólicas (a=dimerização e b= estabilização de um radical DPPH).....	41
11	<i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. ex Reiss., Marialva, Paraná, Brasil	55
12	Frutos (a) e folhas (b e c) de <i>Maytenus ilicifolia</i>	56
13	Colunas (a) utilizadas na separação cromatográfica e coletor de frações Isco (b)	60
14	Cromatografia em camada delgada das 26 subfrações. Condições cromatográficas: gel de sílica F254; sistema eluente acetato de etila:ácido fórmico:água (90:5:5; v/v); revelação com FeCl ₃ a 1% em etanol	61
15	Estrutura da substância I, catequina	66
16	Espectro de RMN ¹ H de catequina peracetilada (300 MHz; CDCl ₃ ; relativo para TMS)	68
17	Estrutura da substância II, epicatequina	69
18	Espectro de RMN ¹ H de epicatequina peracetilada (300 MHz; CDCl ₃ ; relativo para TMS)	71
19	Estrutura da substância III, epigalocatequina	72

20	Espectro de RMN ¹ H de epigalocatequina peracetilada (300 MHz; CDCl ₃ ; relativo para TMS)	74
21	Estrutura da substância IV, epicatequina-(4β→8)-catequina	76
22	Espectro de RMN ¹ H de epicatequina-(4β→8)-catequina peracetilada (■) e epicatequina-(4β→8)-epicatequina peracetilada (*) (300 MHz; CDCl ₃ ; relativo para TMS)	79
23	Espectro de COSY ¹ H/ ¹ H de epicatequina-(4β→8)-catequina (300 MHz; CDCl ₃)	80
24	Estrutura da substância V, epicatequina-(4β→8)-epicatequina	81
25	Espectro de RMN ¹ H de epicatequina-(4β→8)-epicatequina peracetilada (PB2) (300 MHz; CDCl ₃ ; relativo para TMS)	84
26	Espectro de COSY ¹ H/ ¹ H de epicatequina-(4β→8)-epicatequina (300 MHz; CDCl ₃)	85
27	Inibição da peroxidação lipídica da fração acetato de etila pelo método do ácido tiobarbitúrico	90

LISTA DE QUADROS

Quadro

1	Classificação de taninos condensados de acordo com o grau de hidroxilação nos anéis A e B dos monômeros básicos, referidos na figura 3	28
---	--	----

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma

1	Obtenção das frações e subfrações e separação cromatográfica em coluna da fração acetato de etila	60
2	Fracionamento cromatográfico e isolamento de substâncias da F#16	65

LISTA DE TABELAS

Tabela

1	Gradiente de fase móvel utilizada para CC da FAE	49
2	Vinte e seis subfrações obtidas por cromatografia em coluna	62
3	Deslocamentos de catequina peracetilada (300 MHz; CDCl ₃ relativo para TMS)	67
4	Deslocamentos de epicatequina peracetilada (300 MHz; CDCl ₃ relativo para TMS)	70
5	Deslocamentos de epigalocatequina peracetilada (300 MHz; CDCl ₃ relativo para TMS)	73
6	Deslocamentos de epicatequina-(4 β →8)-catequina (300 MHz; CDCl ₃ relativo para TMS)	78
7	Deslocamentos de epicatequina-(4 β →8)-epicatequina (300 MHz; CDCl ₃ relativo para TMS)	83
8	Atividade antioxidante demonstrada pela redução do radical DPPH	87
9	Atividade antioxidante demonstrada pela redução do radical DPPH para substâncias isoladas em termos de IC ₅₀	87
10	Atividade antioxidante demonstrada pela redução do molibdênio - Mo(VI) com diferentes extratos de <i>M. ilicifolia</i>	88
11	Avaliação da atividade antioxidante da fração acetato de etila pelo ácido tiobarbitúrico	89

LISTA DE ABREVIATURAS

CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
COSY ¹ H/ ¹ H	Espectroscopia de correlação hidrogênio/hidrogênio
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo dubleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dubleto
DPPH	2,2–difetil-1-picrilhidrazila
EB	Extrato bruto
FAA	Extrato bruto aceto-aquoso liofilizado
FAE	Fração acetato de etila
FAQ	Fração aquosa
F#	Subfrações obtidas a partir da fração acetato de etila
<i>m</i>	Multiplete
MA	Malonaldeído
m/v	Massa/volume
∅	Diâmetro
P.A.	Pró-análise
PNA	Polifenóis não adsorventes
PT	Polifenóis totais
R _f	Relação de frente
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
SM	Solução mãe
<i>s</i>	Singleto
SA	Solução amostra
SM	Solução mãe
SDS	Sulfato dodecil de sódio
TBA	Ácido tiobarbitúrico
UV	Luz ultravioleta
UV/VIS	Luz ultravioleta/visível
v/v	Volume/volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 SISTEMÁTICA VEGETAL	19
2.1.1 Família Celastraceae R. Br. (Robert Brown – Botânico Inglês – 1773-1858)	19
2.1.2 Gênero <i>Maytenus</i>	20
2.1.3 Distribuição	21
2.1.4 Características do gênero <i>Maytenus</i>	21
2.1.5 Características da espécie <i>Maytenus ilicifolia</i>	22
2.2 ASPECTOS QUÍMICOS DO GÊNERO <i>Maytenus</i>	24
2.3 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS	24
2.3.1 Atividade farmacológica do gênero <i>Maytenus</i>	24
2.3.2 Toxicidade	25
2.3.3 Outros estudos	25
2.4 TANINOS	26
2.4.1 Propriedades biológicas dos taninos	30
2.4.1.1 Atividade antioxidante	32
2.4.1.2 Antioxidantes naturais	36
2.4.1.3 Substâncias fenólicas e atividade antioxidante	38
2.4.1.4 Métodos para avaliação da atividade antioxidante	39
3 OBJETIVOS	43
3.1 OBJETIVO GERAL	43
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4 MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 EQUIPAMENTOS	44
4.2 SOLUÇÕES, SOLVENTES E REAGENTES	45
4.3 COLETA DO MATERIAL VEGETAL	46
4.4 CONTROLE DE QUALIDADE DA MATÉRIA-PRIMA VEGETAL	46
4.4.1 Análises físico-químicas	46
4.4.1.1 Determinação da perda por secagem	46
4.4.1.2 Determinação da perda por dessecação	46
4.4.1.3 Determinação do teor de extrativos	46

4.4.1.4 Determinação do teor de taninos totais	47
4.5 PROCESSO DE DESENGORDURAMENTO	48
4.6 PREPARAÇÃO DE EXTRATOS	48
4.6.1 Extrato bruto (EB)	48
4.6.2 Fração acetato de etila (FAE) e fração aquosa (FAQ)	48
4.7 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	49
4.7.1 Cromatografia em coluna (CC) da fração acetato de etila	49
4.7.2 Cromatografia em coluna das subfrações	50
4.7.3 Cromatografia em camada delgada (CCD)	50
4.7.4 Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)	50
4.8 DERIVATIZAÇÃO	51
4.9 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL	51
4.10 ROTAÇÃO ÓTICA (POLARIMETRIA)	51
4.11 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	52
4.11.1 Método do radical DPPH	52
4.11.2 Determinação da atividade antioxidante pelo método do fosfomolibdato	53
4.11.3 Determinação da atividade antioxidante por TBARS	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1 MATERIAL VEGETAL	55
5.2 CONTROLE DE QUALIDADE	57
5.2.1 Perda por secagem	57
5.2.2 Perda por dessecação	58
5.2.3 Determinação do teor de extrativos	58
5.2.4 Determinação do teor de taninos totais	58
5.3 ANÁLISE QUÍMICA	59
5.3.1 Monômeros	66
5.3.1.1 Catequina – Substância I	66
5.3.1.2 Epicatequina – Substância II	69
5.3.1.3 Epigallocatequina – Substância III	72
5.3.2 Dímeros	75
5.3.2.1 Epicatequina-(4 β →8)-catequina (Procianidina B1)– Substância IV	76
5.3.2.2 Epicatequina-(4 β →8)-epicatequina (Procianidina B2)– Substância V ...	81

5.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	86
5.4.1 Atividade antioxidante demonstrada pela redução do DPPH[•]	86
5.4.2 Atividade antioxidante demonstrada pelo método fosfomolibdato	88
5.4.3 Determinação da atividade antioxidante por TBARS	89
6 CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS	93

1 INTRODUÇÃO

A maioria da população dos países em desenvolvimento utiliza as plantas medicinais para satisfazerem suas necessidades em saúde, sendo freqüentemente empregadas em serviços primários e atendimento básico em saúde. Em ambas as situações, para pessoas que moram em regiões de difícil acesso, caracterizado pelo único serviço em saúde disponível, e para pessoas que vivem em áreas pobres, os quais se mostram como únicos remédios disponíveis, as plantas medicinais têm tido ampla utilização. Mesmo em áreas onde os medicamentos modernos estão disponíveis, o interesse pela fitoterapia aumentou rapidamente nos últimos anos (WORLD, 1998a). O crescente interesse pelo uso, criou a necessidade de uma melhor precisão no preparo e na avaliação, e tem estimulado a pesquisa com plantas, como seus usos e aplicações (WORLD, 1993). Por outro lado, plantas medicinais constituem importantes fontes de novos medicamentos para a indústria farmacêutica (WORLD, 1998b).

A Organização Mundial da Saúde reconhece a importância e estimula o uso das plantas medicinais pela população de países pobres, embora recomende cuidados especiais no seu uso através da distribuição de manuais para orientar estudos científicos, que confirmem sua segurança e eficácia clínica (CALIXTO, 2001).

A não regulamentação do setor ou o uso inapropriado das chamadas medicinas e práticas tradicionais, podem ter efeitos negativos e perigosos. Como exemplos: 1) a erva “Ma Huang” (efedra) é tradicionalmente utilizada na China para congestão respiratória. Nos Estados Unidos, essa erva foi comercializada como um auxiliar dietético, cuja superdosagem conduziu a 12 mortes no mínimo por ataques cardíacos e acidentes vasculares cerebrais; 2) na Bélgica, no mínimo 70 pessoas necessitaram de transplante renal ou diálise devido à fibrose intersticial do rim, após tomar uma preparação feita com espécies erradas de plantas que eram utilizadas para o tratamento da obesidade (BAGOZZI, 2005). Segundo artigos publicados pelo EMEA (1997, 2000), a planta responsável por este problema renal é do gênero *Aristolochia*.

A legislação brasileira que trata dos fitoterápicos (RDC 48/2004) é prova do esforço coletivo em prol da otimização de recursos e procedimentos com intuito de garantir à população produtos eficazes, seguros e com qualidade (BRASIL, 2004).

Assim, a utilização atual de medicamentos derivados de plantas vem crescendo exponencialmente, não somente no Brasil. Em nosso país e, além dos aspectos relacionados à demanda comercial, a edição da lei de patentes nos anos 90 desencadeou enorme atenção, por

parte do setor industrial, às espécies da flora nativa com potencial efeito terapêutico, passível de proteção patentária e, por conseguinte de valor econômico substancial. Há muito que pesquisar, mas há também muito a se proteger. A preservação de espécies, extração sustentável, cultivo e formas de manejo são pontos fundamentais a se considerar na pesquisa e/ou na produção industrial, bem como a preservação dos dados com a proteção patentária.

No presente trabalho o objeto de estudo é a planta popularmente conhecida por “espinheira-santa”: *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. (Celastraceae).

Esta espécie é uma planta nativa do Sul do Brasil, Uruguai, Paraguai e Norte da Argentina (NASCIMENTO et al., 2005). Possui uso popular consagrado no tratamento de úlceras gástricas, também como cicatrizante em feridas e analgésico.

Dentre as atividades biológicas descritas na literatura estão a atividade antimicrobiana (LIMA et al., 1969) e a atividade antiulcerogênica comparável às drogas cimetidina e ranitidina, ambas de eficácia comprovada no tratamento de úlceras gástricas (SOUZA-FORMIGONI et al., 1991). Segundo Oliveira et al. (1991), testes avaliando o uso agudo e crônico do infuso das folhas de *M. ilicifolia* não induziram efeitos tóxicos e/ou teratogênicos atestando a segurança do uso desta espécie vegetal.

Devido ao alto custo dos medicamentos de origem sintética, comumente empregados no tratamento de úlceras gástricas, o uso desta planta pela população e pelos programas de fitoterapia vem se expandindo no Brasil. Apesar de sua importância, a espécie vegetal não constava nas edições anteriores à 4ª edição da Farmacopéia Brasileira, não existindo, portanto, um método oficial de análise para padronização da droga anteriormente (VILEGAS; LANÇAS, 1997).

Considerando o reconhecido efeito antiulcerogênico e segurança de *M. ilicifolia* no tratamento de lesões gástricas, o estudo dos taninos condensados presentes na espécie vegetal permanece ainda limitado, sendo, portanto, objeto deste trabalho.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SISTEMÁTICA VEGETAL

2.1.1 Família Celastraceae R. Br. (Robert Brown – Botânico Inglês – 1773-1858)

A família Celastraceae engloba cerca de 50 gêneros compreendendo entre 800 e 850 espécies distribuídas nos trópicos e subtropicais e apenas alguns gêneros alcançam regiões temperadas segundo Heywood (1978) e Cronquist (1981).

Para Lawrence (1971 apud OKANO, 1992) a importância econômica das Celastraceae é restrita, se restringindo ao cultivo de representantes dos gêneros *Elaeodendron* J.F. Jacq ex Jacq., *Catha* Forsk. ex Scop., *Maytenus* Mol., *Celastrus* L., *Evonymus* L., *Tripterygium* Hook. e *Pachystima* Rafin. para fins ornamentais.

Espécies pertencentes ao gênero *Maytenus* são comumente utilizadas na medicina popular, em países do terceiro mundo. Destacam-se entre estas *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss.(SOARES, 2004), *Maytenus undata* (Thunb.) Blakelock (KOKWARO, 1976 apud SEBSEBE, 1985), *Maytenus heterophylla* (Eckl. & Zeyh.) N. Robson (HEDBERG et al., 1982 apud SEBSEBE, 1985). Devido a este valor medicinal, algumas espécies do gênero têm sido analisadas quimicamente e submetidas a testes clínicos. Os resultados indicaram que estas contêm potenciais agentes anticancerígenos (SEBSEBE, 1985).

Kupchan et al. (1975 apud SEBSEBE, 1985) isolaram o princípio ativo maitasina a partir de *Maytenus ovata* (Wall. Ex Whight & Arn.) Loes., com importante atividade inibitória em células tumorais vivas. De acordo com Kupchan et al. (1975 apud SEBSEBE, 1985) uma rica fonte desta substância, está presente em *Putterlickia verrucosa* (E. Mey. ex Sond.) Szyszyl., também Celastraceae, sendo esta espécie selecionada para testes clínicos pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos da América do Norte.

No Brasil, espécies do gênero *Maytenus* vêm sendo estudadas, merecendo destaque *M. ilicifolia* (espinheira-santa) por sua comprovada propriedade no combate de úlceras gástricas (MACAUBAS et al., 1988; CARLINI; BRAZ, 1988).

Morfologicamente, as espécies da família Celastraceae são facilmente reconhecidas por suas folhas simples com estípulas inconspícuas; inflorescências cimosas; flores pequenas, esverdeadas, geralmente pentâmeras, isostêmones, com disco intra-estaminal e placentação axilar.

Em nível genérico e particularmente infragenérico, os limites taxonômicos são bastante complicados, devido ao conceito tipológico adotado por alguns botânicos, aumentando em muito o número de espécies.

O mais abrangente trabalho sobre a taxonomia das Celastraceae, englobando todos os gêneros, até então existentes, foi realizado por Loesener (1942 apud OKANO, 1992). Outros estudos envolvendo as Celastraceae foram desenvolvidos no Chile e Argentina (LOURTEIG; O'DONELL, 1955 apud OKANO, 1992) e Brasil (REISSEK, 1861 apud OKANO, 1992).

O gênero *Maytenus* é um dos maiores da família, e conta, segundo Willis (1981 apud OKANO, 1992), com 225 espécies tropicais. Após revisão bibliográfica, constatou-se que, deste total 77 espécies são citadas para a flora brasileira, sendo 15 referidas na região Amazônica. Assim, 62 espécies são referidas para o Brasil extra-amazônico, além de 8 binômios, mencionados por Loesener (1942 apud OKANO, 1992) ou citados simplesmente em exsicatas de herbário que constituem *nomen nudum* ou nome manuscrito

Estudos taxonômicos no gênero *Maytenus* foram desenvolvidos na África e Arábia tropical (SEBSEBE, 1985), Brasil (REISSEK, 1861 apud OKANO, 1992), Chile e Argentina (LOURTEIG; O'DONELL, 1955 apud OKANO, 1992).

2.1.2 Gênero *Maytenus*

O gênero *Maytenus* foi primeiramente descrito por Feuillee em 1725, sob o nome de *Mayten*. O autor forneceu uma descrição relativamente longa dos órgãos vegetativos de uma planta, acompanhada por uma prancha constituída de um ramo estéril e declarou não ter visto as flores e frutos do material.

Molina (1782 apud LOURTEIG; O'DONELL, 1955 apud OKANO, 1992) estabeleceu o gênero *Maytenus* baseado na espécie tipo, *Maytenus boaria* Molina, do Chile. Segundo o autor, o gênero se caracterizava por apresentar cálice monossépalo, corola monopétala, androceu com 2 estames e fruto monospermico. Estas características não correspondem ao gênero, e foram reconhecidas pelo autor em 1810 atribuindo as falhas em sua descrição ao tamanho pequeno das flores, associado à inexistência de melhores equipamentos.

Jussieu (1971 apud OKANO, 1992) reconheceu o gênero *Maytenus* estabelecido por Molina em 1782 e apresentou uma descrição muito semelhante à fornecida por aquele autor.

Martius (1841 apud OKANO, 1992) descreveu para a flora brasileira algumas espécies de *Maytenus*, a saber: *M. brasiliensis* Mart., *M. macrophylla* Mart., *M. nitida* Mart., *M. obtusifolia* Mart., *M. aquifolium* Mart., *M. rigida* Mart. e *M. gonoclada* Mart.

Reissek (1861 apud OKANO, 1992) forneceu um estudo global sobre a taxonomia do gênero *Maytenus* no Brasil. Além de manter os sinônimos já estabelecidos para o gênero, o autor forneceu descrições pormenorizadas sobre o gênero e 51 espécies.

Loesener (1892 apud OKANO, 1992) acrescentou ao gênero *Maytenus*, novas espécies brasileiras: *M. radlkoferiana* Loes., *M. glazioviana* Loes. e *M. urbaniana* Loes. Neste trabalho, o autor baseado na presença de espinhos nas folhas, consistência e tamanho das mesmas, estabeleceu 4 seções: *Oxyphylla*, *Pachyphylla*, *Leptophylla* e *Microphylla*, acomodando, dessa forma, todas as espécies brasileiras até então descritas.

Em verdade, o gênero foi originalmente proposto em 1782 por Molina. Entretanto, a descrição dos caracteres florais fornecidos pelo autor, não correspondeu ao material botânico (espécie-tipo). Este fato fez com que o nome genérico não fosse totalmente aceito, e em consequência, outros nomes foram propostos. Decorridos aproximadamente três décadas, em 1810, Molina reconheceu suas observações morfológicas errôneas e efetuou alterações na circunscrição do gênero *Maytenus*.

Portanto, a autoridade do gênero se deve a Molina. De acordo com o artigo 47 do Código Internacional de Nomenclatura Botânica a citação completa do nome genérico é *Maytenus* Mol. emend. Mol.

2.1.3 Distribuição

O gênero *Maytenus* é constituído por 225 espécies, distribuídas nos trópicos (WILLIS, 1981 apud OKANO, 1992). De acordo com Bornstein (1989 apud OKANO, 1992) o gênero é pantropical concentrando o maior número de espécies na América do Sul. Certamente 40 a 50% das espécies ocorrem em território brasileiro.

No Brasil a ocorrência do gênero é ampla, sendo encontrado da Amazônia ao sul do país, ocupando a grande maioria dos tipos vegetacionais: floresta amazônica, caatinga, floresta atlântica, floresta mesófila, floresta de araucária, floresta de altitude, restinga, campo rupestre e cerrado.

2.1.4 Características do gênero *Maytenus*

O gênero *Maytenus* inclui representantes arbóreos, arbustivos e subarbustivos, com porte variando entre 1,5-8,0 m e árvores de até 20 m.

Os ramos são geralmente eretos, simples ou bastante ramificados na porção apical com entrenós expostos na maioria das espécies. Quanto a forma dos ramos, estes podem ser

cilíndricos, achatados, retangulares ou carenados. A superfície dos ramos varia de glabra a pilosa e são inermes (sem espinhos).

Com relação ao indumento, os representantes do gênero *Maytenus* são geralmente glabros, apenas algumas espécies apresentam algum tipo de tricoma ou cera recobrimdo total ou parcialmente os ramos, pecíolos, limbos, brácteas, pedicelos e cálices ou presentes em pelo menos um destes. Os tricomas, quando presentes, são valiosos no reconhecimento taxonômico das espécies ou grupos de espécies. As folhas são extremamente variáveis no gênero e mesmo entre os indivíduos de uma mesma espécie. Segundo Loesener (1942 apud OKANO, 1992), a filotaxia no gênero *Maytenus* pode ser alterna ou oposta, sendo mais frequente a disposição alterna. A grande maioria das espécies apresenta o limbo e pecíolo bem diferenciados e estípulas inconspícuas e caducas.

A forma e as dimensões da lâmina foliar nas espécies do gênero são muito variáveis, incluindo formas desde suborbiculares até cordadas, ovais, obovais, elípticas, estreitamente elípticas e oblongas. A lâmina é basicamente plana na maioria das espécies. As inflorescências são axilares e cimosas. As flores são pequenas e inconspícuas, com aproximadamente 3 a 5 mm de comprimento e coloração branco-esverdeada.

Em relação aos frutos são coriáceos ou subcarnosos, deiscentes, capsulares, loculícdas, bivalvares, sendo que todas as espécies estudadas apresentam cápsulas bivalvares.

As sementes são eretas, suborbiculares, elipsóides ou obovais, às vezes angulosas, em número variável de 1 a 4 por fruto, sendo mais comumente 2 ou 3, envoltas inteiramente pelo arilo.

Após 1968, nenhuma nova espécie de *Maytenus* foi descrita para a flora brasileira. Além disso, os trabalhos posteriores fornecem apenas dados sobre anatomia, fitoquímica ou mesmo distribuição geográfica de espécies isoladas.

2.1.5 Características da espécie *Maytenus ilicifolia*

Subarbusto ou árvore, ramificado desde a base, medindo cerca de 5,0 m de altura. Ramos novos glabros angulosos, tetra ou multicarenados. Folhas congestas, coriáceas, glabras; pecíolo com 0,2-0,5 cm de comprimento; estípulas inconspícuas; limbo com 2,2-8,9 cm de comprimento e 1,1-3,0 cm de largura; nervuras proeminentes na face abaxial; forma elíptica ou estreitamente elíptica; base aguda a obtusa; ápice agudo a obtuso, mucronado ou aristado; margem inteira ou com espinhos em número de um a vários, distribuídos regular ou irregularmente no bordo, geralmente concentrados na metade apical de um ou de ambos os semilimbos.

Inflorescências em fascículos multifloros. Pedicelos florais com 0,2-0,5 cm de comprimento. Sépalas semicirculares, ciliadas, com cerca de 0,1 cm de comprimento. Pétalas ovais, inteiras, com cerca de 0,22 cm de comprimento e 0,2 cm de largura. Estames com filetes achatados na base. Estigma capitado, séssil ou com estilete distinto; ovário saliente ou totalmente imerso no disco carnoso. Fruto cápsula bivalvar, orbicular; pericarpo maduro de coloração vermelho-alaranjada.

Jacomassi e Machado (2003) descreveram características anatômicas importantes de *M. ilicifolia*, tanto para distinção entre esta espécie e *M. aquifolium* bem como de outras espécies que podem ser erroneamente identificadas como espinheira-santa. *M. ilicifolia* apresenta caule ovalado com três ou mais saliências, pecíolo em secção transversal dorsiventral com braquiesclereídeos na região cortical, limbo dorsiventral e hipostomático, a nervura principal é proeminente na face abaxial e o sistema vascular é representado por um feixe colateral, sendo que entre as características mais relevantes está a presença de saliências que ocorre apenas no caule de *M. ilicifolia*, diferenciando-a das demais espécies.

A ocorrência de *M. ilicifolia* nos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul é pouco abundante.

Várias espécies da flora nativa têm sido largamente empregadas pela população, cujo conhecimento acerca do uso medicinal destas plantas foi desenvolvido inicialmente por comunidades indígenas e caboclas do país. As espécies do gênero *Maytenus* são muito usadas por seus efeitos antiulcerogênico, antiácido e analgésico, na forma de infusões feitas com as folhas da planta.

A literatura cita vários nomes populares além espinheira-santa para as espécies *M. aquifolium* Mart. e *M. ilicifolia* Mart. ex Reiss. como “salva-vidas”, “cancerosa”, “cancerosa”, “sombra de touro” e “espinho de Deus” (CORDEIRO; VILEGAS; LANÇAS, 1999).

Espinheira-santa é um pequeno arbusto que pode atingir até cinco metros de altura com folhas e sementes que se assemelham a azevinho (OLIVEIRA et al., 2000).

Atualmente a Farmacopéia Brasileira (FARMACOPÉIA, 2003) apresenta a monografia incluindo aspectos morfo-anatômicos e o controle de qualidade da droga vegetal *M. ilicifolia* Mart. ex Reiss. (Figura 1).

M. aquifolium Mart. e *M. ilicifolia* Mart. ex Reiss. espécies da família Celastraceae, são plantas nativas da Mata Atlântica do Brasil. Segundo Nunes et al. (2003) as raízes da planta são conhecidas popularmente como “cancerosa” e as folhas como “espinheira-santa”.



Figura 1 - Aspecto dos galhos e flores de *Maytenus ilicifolia*

Fonte: Duarte e Debur (2005)

2.2 ASPECTOS QUÍMICOS DO GÊNERO *Maytenus*

Taninos foram isolados de *M. senegalensis* (Lam.) Exell a partir de extratos metanólicos da casca desta espécie (HUSSEIN et al., 1999) e também de *M. rigida* chamados ourotea-proantocianidinas A e B (DELLE MONACHE et al., 1996).

Corsino et al. (1998) isolaram dois alcalóides sesquiterpeno piridínicos da raiz de *M. aquifolium* como aquifoliunina E-III, aquifoliunina E-IV, além de siringaresinol e 4'-*O*-metil-epigalocatequina. Também foram isolados flavonóides de *M. ilicifolia* ditos ilicifoniosídeos segundo Zhu et al. (1998) e flavonóides glicosídicos como canferol-3-*O*-[2-glucopiranosil-(1-3)-ramnopiranosil-6-ramnopiranosil]- β -D-galactopiranosil (SANNOMIYA et al., 1998).

Mossi et al. (2004) extraíram e caracterizaram substâncias voláteis de *M. ilicifolia*: fitol, esqualeno, estigmasterol, vitamina E, fridelina-3-ol, fridelina, ácido dodecanóico e acetato de geranila, sob alta pressão de CO₂, mostrando que a temperatura e a densidade do solvente produzem acentuado efeito na produção e distribuição química desses compostos.

2.3 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS

2.3.1 Atividade Farmacológica do gênero *Maytenus*

Lima et al. (1969) atribuíram a presença de maitenina e pristimerina à significativa atividade antimicrobiana no extrato benzênico de *M. ilicifolia*.

São muitas as propriedades citadas na literatura para o gênero *Maytenus* tais como: anti-séptico, antiasmático, antitumoral (AHMED et al., 1981; ZHU; SHARAPIN; ZHANG, 1998), antileucêmica, (MELO et al., 2001), antigastrite e antiúlcera (QUEIROGA et al., 2000;

MOSSI et al., 2004) contraceptivo e abortivo (MONTANARI; BEVILACQUA, 2002), fitohormonal e alta citotoxicidade (CHÁVEZ et al., 1997; PULLEN et al., 2003).

A atividade antiulcerogênica de espinheira-santa foi demonstrada também utilizando o infuso de suas folhas administrado oral e intraperitonealmente e este extrato aumentou o volume do suco gástrico bem como o seu pH, comparativamente às drogas sintéticas cimetidina e ranitidina (SOUZA-FORMIGONI et al., 1991).

A atividade contra úlcera foi estudada juntamente com efeito analgésico por González et al. (2001), que mostraram significativa redução em lesões gástricas, induzidas por etanol/indometacina, quando houve pré-tratamento com 1000 mg/kg de extrato metanol:água das folhas de *M. aquifolium*. Os autores também demonstraram a não toxicidade deste extrato em diferentes doses chegando a 5248 mg/kg em ratos.

Outras atividades são atribuídas ao gênero *Maytenus*, tais como contra leucemia linfocítica *in vivo* e ação inibitória sobre proteínas quinases. Os metabólitos secundários responsáveis por tais ações são maitenosídeos, triterpenos, sesquiterpenos (SCHANEBERG; GREEN; SNEDEN, 2001).

Em estudo avaliando a eficácia dos extratos hexânico (triterpenos) e acetato de etila (compostos fenólicos), obtidos das folhas de *M. ilicifolia*, observou-se que ambos têm efeito citoprotetor e curativo (LEITE et al., 2004).

2.3.2 Toxicidade

Testes com o infuso de folhas de *M. aquifolium* e *M. ilicifolia* não demonstraram potencial tóxico e/ou teratogênico (OLIVEIRA et al., 1991).

Camparoto et al. (2002) testaram a ação mutagênica do extrato das folhas de *M. ilicifolia*, entretanto, não conseguiram obter significância estatística que comprovasse tal ação.

Montanari e Bevilacqua (2002) verificaram o potencial abortivo do extrato hidroalcoólico das folhas de *M. ilicifolia* em ratos e observaram que o extrato causa pré-implantação lenta, mas não afeta a implantação propriamente dita ou a organogênese. Não encontraram nenhum efeito embriotóxico.

2.3.3 Outros estudos

Pereira et al. (2002) realizaram cultivo de células das folhas de *M. ilicifolia* em meios suplementados nos quais se observaram o acúmulo de triterpenos quinonametídeos com comprovada atividade biológica *in vitro*. A produção foi até 100 vezes maior para 22b-hidroximaitenina e três vezes para maitenina quando comparada à produção *in natura*. Isso

demonstra que o sistema *in vitro* é uma excelente ferramenta na produção de metabólitos em grande escala.

Soares et al. (2004) desenvolveram e validaram o método de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa para quantificação de catequina e epicatequina no extrato aquoso das folhas de *M. ilicifolia*. O método apresentou boa repetibilidade e reprodutibilidade para ambas as substâncias.

2.4 TANINOS

As plantas sintetizam uma ampla variedade de metabólitos secundários como os alcalóides, terpenos, compostos fenólicos, e outros, envolvidos principalmente em mecanismos de defesa vegetal contra herbívoros, microorganismos, proteção contra raios UV e atração de polinizadores e/ou animais dispersores de sementes (WINK, 1990).

Os taninos são definidos como compostos fenólicos solúveis em água com massa molecular entre 500 e 3000 Daltons, as quais apresentam a habilidade de formar complexos insolúveis em água com alcalóides, gelatina e outras proteínas (BATE-SMITH; SWAIN, 1962). Segundo Hagerman (1992), esta propriedade os distingue dos demais compostos fenólicos, ou seja, a formação de complexos com proteínas, alcalóides e alguns polissacarídeos formando precipitados.

Historicamente, a importância das plantas ricas em taninos está ligada às suas propriedades de transformar a pele animal em couro (SANTOS; MELLO, 2003). O termo tanino foi o nome dado à infusão de cascas de árvores como o carvalho e a castanheira, na qual peles de animais eram tratadas para obtenção de couros maleáveis e de grande durabilidade (QUEIROZ; MORAIS; NASCIMENTO, 2002).

Os taninos encontram-se difundidos em plantas e alimentos de origem vegetal: frutas, legumes, sementes, grãos, cereais, bebidas (vinho, chá, cidra, cacau) (BUELGA; SCALBERT, 2000). Apresentam gosto amargo e adstringente e estão presentes nas plantas em raízes, cascas, folhas, flores, frutos e na madeira de diversas espécies vegetais. Sua importância nas plantas encontra-se relacionada à defesa da mesma, contra predadores animais ou microbianos. Segundo Bate-Smith (1973) os taninos causam diminuição da palatabilidade, dificuldades na digestão pela complexação com enzimas e/ou proteínas, impedindo, assim, a invasão dos vegetais por parasitas.

São classificados, segundo sua estrutura química em dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados (SANTOS; MELLO, 2003).

Taninos hidrolisáveis são caracterizados por um poliol central, geralmente β -D-glucose, cujas funções hidroxilas são esterificadas com o ácido gálico e, denominados galotaninos. Os elagitaninos possuem um ou dois resíduos de hexa-hidróxi-difenoil-D-glicose (HHDP), os quais são obtidos pelo acoplamento oxidativo C-C entre dois resíduos de ácido gálico espacialmente adjacentes (SANTOS; MELLO, 2003).

Galotaninos produzem ácido gálico após hidrólise e elagitaninos produzem ácido elágico após hidrólise, conforme demonstrado na figura 2.

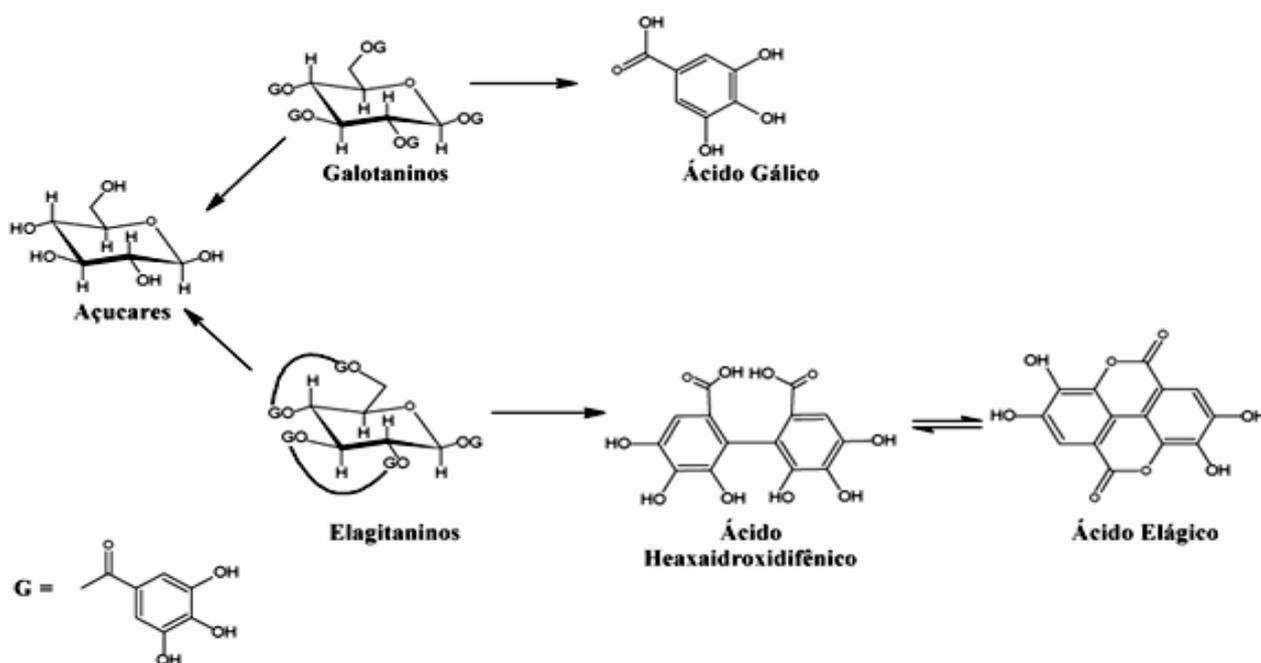


Figura 2– Estruturas químicas básicas de taninos hidrolisáveis.

Fonte: Queiroz, Morais e Nascimento (2002).

Os taninos condensados são flavonóides poliméricos, oligômeros e polímeros formados pela policondensação de duas ou mais unidades flavan-3-ol e flavan-3-4-diol. São, também, denominados proantocianidinas ou leucocianidinas (HASLAM et al., 1975). Esta denominação é devida às características dos taninos condensados (ou proantocianidinas) de formarem antocianidinas (cianidina, delphinidinas) após a degradação com ácido mineral diluído a quente (BUELGA; SCALBERT, 2000; SANTOS; MELLO, 2003).

Diferem estruturalmente entre si de acordo com o número de grupos hidroxila presentes nos anéis aromáticos e da estereoquímica do carbono assimétrico do núcleo

heterocíclico. A presença de *O*-metoxilação, *O*-glicosilação e *O*-galoilação aumentam a complexidade estrutural (DE BRUYNE et al., 1999).

Os taninos condensados podem ser divididos em tipo 1 e tipo 2, de acordo com a presença ou ausência de hidroxila na posição C-5 do anel A. Podem também, ser classificados de acordo com o grau de hidroxilação nos anéis A e B dos monômeros básicos, conforme Santos e Mello (2003) (Figura 3).

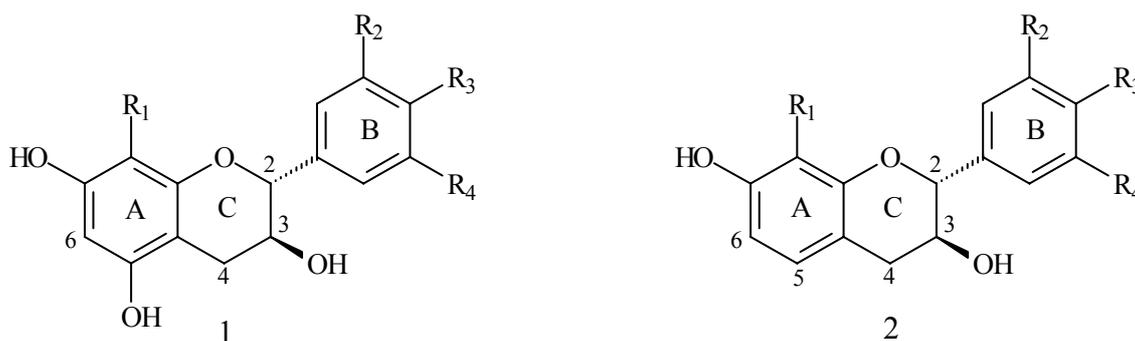


Figura 3 - Monômeros básicos de taninos condensados de acordo com o quadro 1.

Fonte: Santos e Mello (2003).

Tipo	Proantocianidina	Monômero	Substituinte			
		Nome trivial	R1	R2	R3	R4
1	Prodistenidina	Distenina	H	H	H	H
	Propelargonidina	Afzelequina	H	H	OH	H
	Procianidina	Catequina	H	OH	OH	H
	Prodelphinidina	Galocatequina	H	OH	OH	OH
2	Proguibourtinidina	Guibourtinidol	H	H	OH	H
	Profisetinidina	Fisetinidol	H	OH	OH	H
	Prorobinetinidina	Robinetinidol	H	OH	OH	OH
	Proteracacinidina	Oritina	OH	H	OH	H
	Promelacacinidina	Mesquitol	OH	OH	OH	H

Quadro 1 - Classificação de taninos condensados de acordo com o grau de hidroxilação nos anéis A e B dos monômeros básicos, referidos na figura 3.

Fonte: Santos e Mello (2003)

Os diferentes grupos possuem diferentes reatividades. Por exemplo, as procianidinas são diferentes das prodelfinidinas, porque as últimas possuem um grupamento OH a mais no anel B, o qual aumenta a habilidade dos taninos em se complexarem com proteínas (AERTS; BARRY; MCNABB, 1999).

Acoplamentos oxidativos entre monômeros de flavonóis (formando os dímeros) são comuns entre as posições 4 e 8, embora possa, também, ocorrer nas posições 4 e 6, entre as unidades, superior e inferior, respectivamente, formando o tipo B das proantocianidinas. Entretanto, no tipo A das proantocianidinas a forma de acoplamento é diferenciada, possuindo uma ligação do tipo éter, como pode ser observado na figura 4 (SCHOFIELD; MBUGUA; PELL, 2001).

A nomenclatura trivial de taninos condensados tem origem em Weinges et al. (1968a e 1968b) e em Thompson et al. (1972).

A nomenclatura trivial ou mesmo a IUPAC não se mostram práticas para estruturas complexas como os taninos condensados, desta maneira, utiliza-se a nomenclatura proposta por Hemingway, Foo e Porter (1982), na qual os nomes são formados a partir da estrutura básica dos flavan-3-óis. A estereoquímica usual dos flavan-3-óis no carbono 2 é *R*; enquanto que, nas estruturas com configuração *2S* aplica-se ao nome trivial o prefixo *enantio*, que se abrevia por *ent*. Assim, (+)-catequina é chamada de catequina e (-)-catequina, é denominada *ent*-catequina. Nos dímeros, trímeros e oligômeros superiores é utilizada nomenclatura semelhante à dos açúcares, em que a posição da ligação e a disposição espacial da ligação são escritas entre parênteses. As ligações entre os monômeros no C4 são indicadas, pela nomenclatura α ou β (SANTOS; MELLO, 2003).

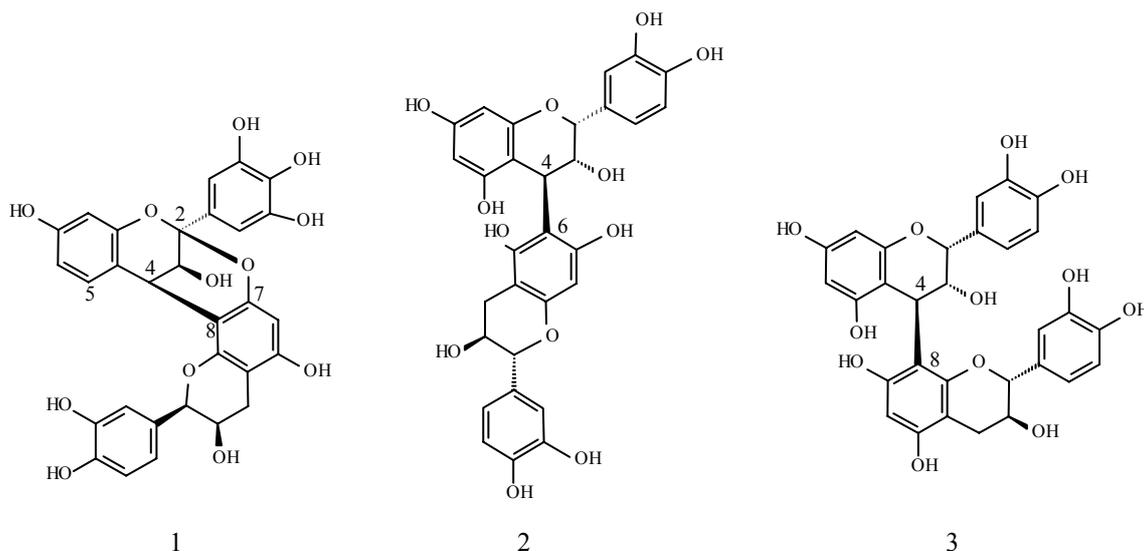


Figura 4 – Diferença no tipo de acoplamento nos taninos condensados do tipo A: 1=robinetinidol-(4β→8;2β→O→7)-epicatequina e do tipo B: 2=epicatequina-(4β→6)-catequina e 3=epicatequina-(4β→8)-catequina.

A característica fundamental que dá aos taninos suas propriedades biológicas parece ser a alta concentração de grupos orto-fenol-hidroxila (HASLAM, 1974).

A ocorrência de taninos condensados e hidrolisáveis no reino vegetal segue padrões significativamente diferentes. Enquanto taninos condensados ocorrem amplamente em gimnospermas e angiospermas, taninos hidrolisáveis estão quase restritos às Choripetalae das dicotiledôneas e não foram encontrados nas Sympetalae (MELLO; SANTOS, 2003)

2.4.1 Propriedades biológicas dos taninos

Acredita-se que as atividades farmacológicas dos taninos são devidas a três características gerais que são comuns em maior ou menor grau aos dois grupos de taninos, condensados e hidrolisáveis: 1) complexação com íons metálicos (ferro, manganês, vanádio, cobre, alumínio, cálcio, entre outros); 2) atividade antioxidante e seqüestradora de radicais livres; 3) habilidade de se complexar com outras moléculas, incluindo macromoléculas como proteínas e polissacarídeos. Foi sugerido que os possíveis modos de ação dos taninos no tratamento de doenças estão intimamente relacionados a estas três propriedades (HASLAM, 1996).

Significativa atenção tem sido dada à análise de taninos e outros compostos fenólicos nas plantas, devido a sua importância farmacológica e ecológica.

Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional para o tratamento de diversas moléstias orgânicas, como: diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas queimaduras, problemas estomacais (azia, náusea, gastrite e úlcera gástrica), problemas renais e do sistema urinário e processos inflamatórios em geral (HASLAM, 1996).

De Bruyne et al. (1999) e Buelga e Scalbert (2000) demonstraram algumas propriedades farmacológicas dos taninos como: antimicrobiana, antitumoral, antioxidante, antiinflamatória, inibição enzimática, inibição da agregação plaquetária e efeitos cardíacos, antiúlcera e antidiarréica.

As propriedades fisiológicas e farmacológicas dos taninos foram estudadas por Haslam et al. (1989), assim como o princípio da adstringência e da cicatrização como base terapêutica nos ferimentos da mucosa, pois os taninos ajudam no processo de cura de feridas, queimaduras e inflamações através da formação de uma camada protetora (complexo tanino-proteína e/ou tanino-polissacarídeo).

A habilidade de se ligar a proteínas, confere aos taninos a propriedade de inibir enzimas. Testes *in vitro* realizado por Hattori et al. (1990) e Ooshima et al. (1993) demonstraram que os taninos são capazes de inibir as glucosiltransferases de *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus*, encontradas na cavidade oral do homem. O efeito da inativação da glucosiltransferase pelos taninos bloqueia a formação da placa dental e de inflamações na região bucal e garganta (SCHOLZ, 1994).

A atividade antimicrobiana dos taninos condensados vem sendo estudada por diversos grupos na busca de novos agentes terapêuticos. Monômeros galoilados demonstraram atividade antibacteriana frente à *Streptococcus mutans*, agente etiológico da cárie (OTAKE et al., 1991; NAKAHARA et al., 1993).

Hatano et al. (1989) observaram que taninos condensados e hidrolisáveis possuem a propriedade de capturar radicais livres de oxigênio, que possuem um importante papel no processo inflamatório. Isto leva a acreditar em um possível efeito anticarcinogênico e antimutagênico, já que muitos genes mutantes e carcinógenos produzem radicais livres que interagem com macromoléculas celulares. Estas observações foram confirmadas por Buelga e Scalbert (2000) referente à atividade anticâncer; por Negro, Tommasi e Miceli (2003) referente à atividade antioxidante.

Erdelmeier et al. (1996) demonstraram que os taninos condensados presentes nas cascas e folhas de *Hamamelis virginiana* L., apresentam atividade antiviral e antiflogística, relacionando ainda, que as propriedades antivirais dos taninos, seriam dependentes do número

de unidades flavonoídicas. Anteriormente, hamamelitaninos foram apontados por Masaki, Atsumi e Sakurai (1994) como potentes agentes anti-radicaais livres.

Estudos epidemiológicos têm mostrado que o consumo de bebidas ricas em compostos fenólicos está associado com redução da mortalidade causada por doenças coronarianas. Alguns vegetais, frutas e vinhos tintos conferem efeito protetor com relação à doença coronariana e certos tipos de câncer, devido ao seu conteúdo de flavonóides (KATALINIÉ et al., 2004).

O chá verde *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, consumido mundialmente como bebida, tem sido utilizado face as benéficas atividades farmacológicas atribuídas à ele, sendo devida, provavelmente, aos taninos condensados. Ho et al. (1992) demonstraram sua atividade antioxidante, que foi mais tarde confirmada por Yokozawa et al. (1998).

2.4.1.1 Atividade antioxidante

A etiologia de doenças degenerativas, os radicais livres, e o interesse em substâncias com atividade antioxidante tem aumentado nos últimos anos devido a descoberta do envolvimento dos radicais livres na fisiopatologia das doenças crônicas (SANTOS; MELLO, 2003).

A autooxidação, reação complexa catalisada por fatores extrínsecos que se inicia com a formação de radicais livres, além de afetar profundamente as características sensoriais de alimentos e medicamentos pelo desenvolvimento de sabor e odor desagradáveis tornando-os inaceitáveis pelos consumidores, também reduzem o tempo de vida útil dos mesmos. Os produtos da oxidação lipídica podem, ainda, desencadear a peroxidação *in vivo*, resultando em vários problemas de saúde (HALLIWEL, 1996; HASLAM, 1996).

Desde o início da vida no planeta, a toxicidade do oxigênio atmosférico tem sido o principal desafio à sobrevivência dos organismos vivos. O oxigênio participa de reações de óxi-redução e é acceptor final de H^+ no metabolismo normal de mamíferos. As oxidações biológicas geram espécies reativas de oxigênio (EROs) e radicais livres que podem provocar lesões celulares, muitas vezes irreparáveis (CARVALHO, 2004).

A atividade metabólica normal do organismo humano produz constantemente radicais livres. Estes são moléculas ou fragmentos de moléculas que possuem elétrons livres, ou não pareados, em sua órbita externa. Os elétrons livres destas moléculas fazem com que as mesmas se tornem altamente reativas (CHEESEMAN; SLATER, 1996), atacando componentes celulares como DNA e RNA, membrana celular e outras substâncias oxidáveis,

acelerando o envelhecimento e, podendo assim, contribuir para a instalação de doenças degenerativas como Alzheimer, Parkinson e Hodgkin (KLEIN, 2002).

Alguns fatores aumentam o risco de estresse oxidativo na célula, como: fumo, bebidas alcoólicas, alimentos salgados, condimentados e contendo toxinas de fungos, radiação ionizante, reações metabólicas envolvendo metais de transição e compostos xenobióticos que entram em contato com o organismo. Os metabólitos vegetais produzidos pelo estresse, também chamados fitoalexinas, que contém grupos hidroxilas e quinonas, são as principais fontes dietária de agentes oxidantes para os animais (CARVALHO, 2004).

As camadas eletrônicas de um elemento químico são denominadas K, L, M e N, e seus subníveis, *s*, *p*, *d*, *f*. O radical livre refere-se a átomo ou molécula altamente reativa, que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica, ou seja, os elétrons da última camada encontram-se desemparelhados. É este não-emparelhamento de elétrons da última camada que confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas (RUSSEL, 1994; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A formação de um radical livre, o superóxido (O_2^{\bullet}), é derivado do oxigênio molecular (O_2). O O_2 é composto por dois átomos de oxigênio (O), cujo número atômico é 8, tendo a seguinte distribuição de elétrons: $1s^2$, $2s^2$, $2p^4$, faltando, portanto, dois elétrons em sua última camada para adquirir maior estabilidade. Para formar o oxigênio molecular (O_2), os dois elétrons solitários do subnível *p*, de um átomo de oxigênio, compartilham elétrons com os dois elétrons de outro átomo de oxigênio, formando uma molécula estável com 8 elétrons na última camada (*l*). Reações de redução implicam em ganho de elétrons, e as de oxidação em perda. Portanto, quando no metabolismo normal ocorrer uma redução do oxigênio molecular (O_2), este ganhará um elétron, formando o radical superóxido (O_2^{\bullet}), considerado instável por possuir número ímpar de elétrons na última camada *l*. Os radicais livres são formados em um cenário de reações de óxi-redução, portanto, os radicais livres provocam ou resultam esse tipo de reação na última camada (RUSSEL, 1994).

Na formação de radicais livres, a molécula de oxigênio é a grande vilã, por ser relativamente lábil e reagir mais facilmente para formar radicais livres. Acredita-se que o oxigênio, na presença de catalisadores como luz visível, radiação ionizante, radiação ultravioleta, temperatura e metais pesados, sejam os iniciadores desta etapa (MELO; GUERRA, 2002).

A maioria das reações dos radicais livres envolve a redução do oxigênio molecular levando à formação de EROs como o ânion superóxido (O_2^{\bullet}) e radical hidroxila (OH^{\bullet}).

Portanto, em geral, as espécies ativas de oxigênio são essenciais para muitas funções celulares. Assim, a proteção dos componentes celulares contra as modificações oxidativas pode ser estabelecida com o uso de antioxidantes (CARDOSO, 2002). A união O-O do peróxido de hidrogênio é relativamente lábil e pode ocorrer sua decomposição, formando o radical (OH^\bullet), sendo altamente reativo. Essa reação é conhecida como reação de Haber Weiss. Sua velocidade é grandemente favorecida, pela presença de íons ferro (Fe^{+3}) e cobre (Cu^{+2}). Por outro lado, o íon férrico pode ser reduzido a íon ferroso pelo radical superóxido e pela “via de Fenton”. Em presença de H_2O_2 é oxidado novamente a íon férrico, com a formação de um radical hidroxila (OH^\bullet) (GUERRA; FANAN, 1994) (Figura 5).

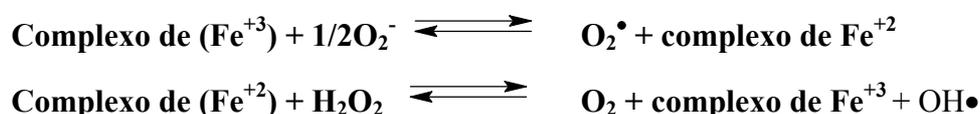


Figura 5 - Formação do radical livre hidroxila pela via de Fenton.

Fonte: Guerra e Fanan (1994).

A molécula de oxigênio pode também, absorver energia, passando para um estado excitado de maior energia, formando o oxigênio singlete, tendo um poder oxidante maior que o oxigênio triplete (LLESUY, 2002) (Figura 6).

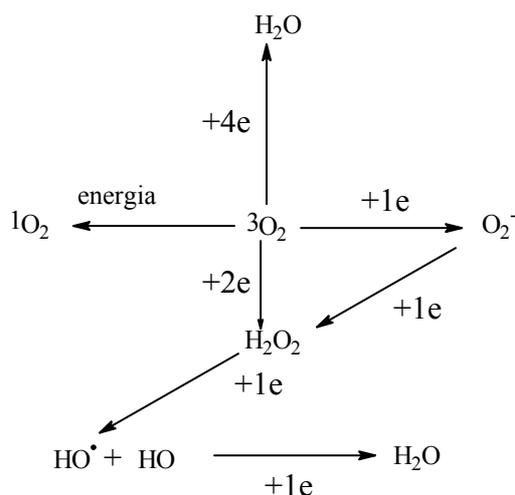


Figura 6 - Formação das espécies reativas de oxigênio (EROs).

Fonte: Llesuy (2002).

A formação das EROs ocorre pela mitocôndria, tratando-se de um processo fisiológico contínuo que ocorre em condições anaeróbicas e por enzimas envolvidas em reações de óxido-redução em outros compartimentos celulares. Tem sido estabelecido que cerca de 1-2% do oxigênio consumido pela mitocôndria sofre redução univalente, produzindo o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em nível da coenzima Q e do complexo NADH-CoQ redutase (CARDOSO, 2002).

Além das espécies reativas de oxigênio, outros radicais livres estão envolvidos nos processos biológicos, tais como: complexo de metais pesados de transição ($Fe^{+3}/(Fe^{+2})$ e $(Cu^{+2})/(Cu^{+})$), radicais de carbono (triclorometila), radicais de enxofre (tiol), radicais de nitrogênio (fenildiazina e óxido nítrico) (SOARES, 2002).

Muitas são as alterações causadas por estes radicais, a peroxidação lipídica, por exemplo, é uma reação de oxidação nos ácidos graxos da membrana lipoprotéica, afetando sua integridade estrutural e funcional, alterando sua fluidez e permeabilidade. Abrange três etapas: a iniciação, propagação e terminação. Na etapa da iniciação, o radical hidroxila (OH^{\bullet}) é capaz de retirar um átomo de hidrogênio de um grupo metileno. A formação deste radical dá início à etapa de propagação, por combinar-se com o O_2 , formando radicais peróxido. Este, por sua vez, é capaz de retirar um hidrogênio de outra molécula de lipídio, dando continuidade da reação em cadeia. O término da reação pode ocorrer por diferentes caminhos (MELO; GUERRA, 2002), conforme pode ser observado na figura 7.

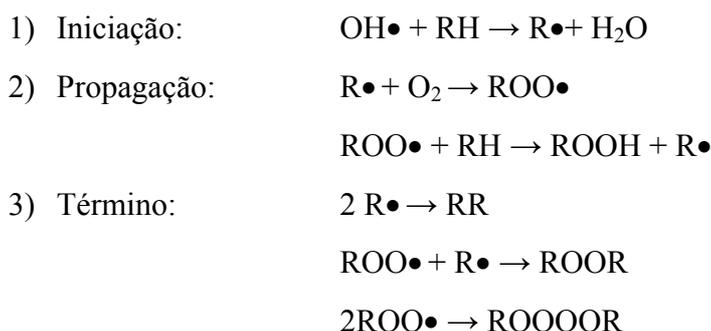


Figura 7 - Autoxidação de ácidos graxos poliinsaturados.

Fonte: Melo e Guerra (2002).

Os radicais livres podem, também, provocar modificações nas proteínas celulares, resultando em sua fragmentação, *cross linking*, agregação e, em certos casos, ativação ou inativação de certas enzimas. A reação de radicais livres com ácidos nucleicos também foi observada, gerando mudanças em moléculas de DNA e acarretando certas aberrações

cromossômicas (SOARES, 2002). Pode-se citar também, a ação tóxica resultante de altas concentrações de íon superóxido e peróxido de hidrogênio (HALLIWEL, 1996).

O organismo humano dispõe de um mecanismo de defesa formado por diferentes antioxidantes (superóxido dismutase, glutatona, catalase) e outros como vitamina E, ácido ascórbico, betacaroteno, que provêm da dieta alimentar (HASLAM, 1996).

Algumas vezes, estas substâncias não conseguem deter de maneira eficaz os radicais livres, dizendo-se, portanto, que o organismo encontra-se em estado de estresse oxidativo, o qual representa um aumento na concentração de radicais livres, por diminuição das defesas orgânicas, por elevação da produção de radicais livres ou a combinação das duas condições (LLESUY, 2002).

Todos estes problemas relacionados com os radicais livres têm levado a inúmeras pesquisas, na tentativa de se encontrar substâncias comprovadamente antioxidantes, que poderiam minimizar os efeitos relatados.

Os antioxidantes são classificados em primários e secundários, de acordo com seu tipo de ação. Podem ser sintéticos ou naturais, de acordo com a origem. Agem em pequenas concentrações, quando comparados com o substrato oxidável, prevenindo significativamente, a oxidação do mesmo (HALLIWELL, 1996).

Os antioxidantes verdadeiros (primários) agem interrompendo a cadeia da reação através de doação do elétron ou hidrogênio aos radicais livres, transformando-os em compostos estáveis. Vários antioxidantes agem desta maneira como: butil-hidroxianisol, butil-hidroxitolueno, ésteres do ácido gálico, *t*-butil-hidroquinona, tocoferol e flavonóides. Os antioxidantes secundários agem retardando a etapa da auto-oxidação por diferentes mecanismos que incluem: complexação com metais, seqüestro de oxigênio e decomposição de hidroperóxidos (GORDON, 1990).

2.4.1.2 Antioxidantes naturais

O interesse pela descoberta de novos e seguros antioxidantes de fontes naturais têm aumentado, principalmente, para prevenir a deterioração de alimentos e para minimizar o dano oxidativo às células vivas. O uso de antioxidantes sintéticos têm diminuído devido a suspeita de atividade como promotores de carcinogênese, bem como devido à rejeição de aditivos sintéticos em alimentos. O papel de antioxidantes dietários e seus benefícios para a saúde tem atraído grande atenção nos últimos anos, especialmente, os extraídos de plantas (CARVALHO, 2004).

O interesse pelos antioxidantes naturais intensificou-se a partir da década de 80, devido aos estudos que comprovaram os efeitos tóxicos de doses elevadas de antioxidantes sintéticos (butil-hidróxitolueno, butil-hidróxianisol e *t*-butil-hidroquinona). Efeitos sobre o peso do fígado e marcada proliferação do retículo endoplasmático foram observados (DURAN; PADILLA, 1993).

A maioria das substâncias naturais, com exceção do tocoferol, deve sua ação antioxidante à presença de hidroxilas fenólicas. A maioria dessas substâncias possui grupos funcionais ativos na posição *orto*, enquanto nos antioxidantes sintéticos, com exceção dos galatos, esses grupos encontram-se na posição *para*, mas, não possuindo por este motivo, mudança na ação dos mesmos (Figura 8).

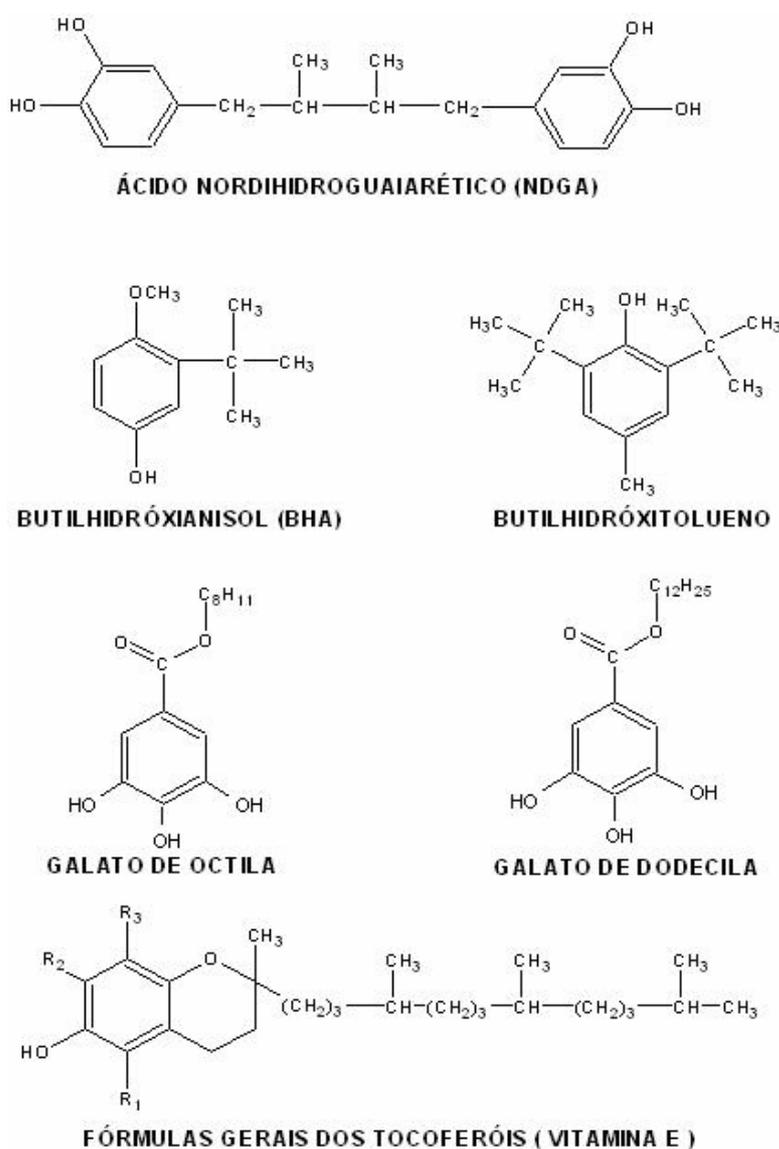


Figura 8 – Exemplos de antioxidantes sintéticos e naturais.

Estudos recentes tem demonstrado que vários extratos de plantas exercem ação antioxidante, sendo que, as substâncias fenólicas compreendem o principal grupo de antioxidantes de origem vegetal (CARVALHO, 2004).

Os antioxidantes fenólicos funcionam como seqüestradores de radicais e algumas vezes como quelantes de metais (SANTOS; MELLO, 2003), e a ação engloba tanto a etapa da iniciação quanto a de propagação (SOARES, 2002).

O uso terapêutico destes, requer que sejam determinados seus efeitos sobre diferentes moléculas biológicas. Por isso, muito embora extratos de plantas tenham sido consagrados pelo uso, é necessário que trabalhos científicos analisem tais propriedades aliando eficácia à baixa toxicidade dos mesmos. (CARVALHO, 2004).

2.4.1.3 Substâncias fenólicas e atividade antioxidante

Todos os taninos apresentam atividade antioxidante, principalmente a de inibição da oxidação de ácido ascórbico catalizada por cobre II. Já o ácido elágico, derivado obtido da condensação de duas unidades de ácido gálico, demonstra apresentar inibição da peroxidação lipídica nos microsomas de fígado de ratos numa concentração de 5×10^{-4} mol l⁻¹ além de apresentar atividades antimutagênica e anticarcinogênica (CARVALHO, 2004).

Estudos recentes mostram que vários taninos atuam como captadores de radicais, os quais interceptam o oxigênio ativo formando radicais estáveis. Por exemplo, nas seguintes situações: o bloqueio da peroxidação de lipídeos em mitocôndrias hepáticas; o bloqueio da lipoxigenase em leucócitos; o bloqueio da xantinoxidase e a repressão da formação de radicais de ânion superóxido assim como dos radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH). Dessa forma os taninos teriam uma possível importância na prevenção e tratamento de doenças causadas pela peroxidação de lipídeos (SCHOLZ, 1994).

A epicatequina, via oral, demonstrou promover aumento da atividade das defesas antioxidantes no plasma de ratos, comparados com o controle. Esse estudo faz parte da pesquisa sobre a atividade antioxidante de taninos de *Hamamelis virginiana* L. para determinação da atividade antioxidante realizada por Masaki, Atsumi e Sakurai (1994).

A microalga *Spirulina maxima*, muito usada na alimentação como suplemento alimentar por ser constituída por proteínas, minerais, vitaminas e compostos fenólicos apresentou atividade antioxidante, segundo Miranda et al. (1998).

Moreira et al. (2002) observaram atividade antioxidante *in vitro* de frações isoladas de *Pseudopiptadenia contortal* Rauschert, contendo ácido gálico, epicatequina e galatos de catequina.

Osakabe et al. (2000) e Hatano et al. (2002) estudaram o extrato de sementes de cacau (*Theobroma cacao* L.), apresentando efeito antioxidante devido as proantocianidinas presentes no extrato. Negro, Tommasi e Miceli (2003) obtiveram o mesmo resultado com as proantocianidinas isoladas do vinho.

No trabalho realizado por Oliveira et al. (2002) a atividade antioxidante da quercetina foi relatada como moduladora das espécies reativas de oxigênio (EROs), por células fagocitárias em lesões crônicas, coincidindo com as afirmações de Fernandez et al. (2002).

Fenglin et al. (2004) em seu trabalho com extrato metanólico das folhas frescas de 300 plantas medicinais chinesas, encontraram 56 espécies, ricas em taninos e flavonóides, com grande capacidade de seqüestro de radicais livres.

Os antioxidantes vegetais são de natureza muito variada, mas os compostos fenólicos têm sido apontados como responsáveis por maior capacidade antioxidante, sendo representados pelos flavonóides e isoflavonóides, taninos, lignanas, xantonas e outros.

Pietta (2000) em sua revisão sobre flavonóides como antioxidantes, faz referência ao trabalho de Bors et al. (1990) os quais afirmam que as propriedades antioxidantes destes compostos dependem da estrutura e dos substituintes nos anéis heterocíclico e B.

Antolovich et al. (2002) em uma revisão sobre os métodos para testar atividade antioxidante, afirmam que os diferentes ensaios podem ser realizados *in vivo* e *in vitro*, sendo necessário para o desenvolvimento dos mesmos estabelecer modelos de indução de oxidação, selecionar o agente indutor do dano oxidativo e o modo de se mensurar o efeito exercido pelo antioxidante ou sua extensão. Observam ainda que a maioria dos ensaios utiliza o envolvimento da oxidação acelerada, os quais envolvem a adição de um agente iniciador (temperatura, agitação, pressão parcial de O₂, metais de transição, exposição à luz) e uma fonte de radicais livres específica. Esses radicais são, então, oxidados sob condições padronizadas e o grau de oxidação ou sua extensão é medido.

Cada método possui uma forma de expressar o resultado de forma direta ou indireta, através da medida da razão ou extensão de: a) decréscimo do substrato ou pesquisa do consumo de oxigênio; b) formação de produtos de oxidação ou c) formação ou decréscimo de pesquisas de radicais livres.

2.4.1.4 Métodos para avaliação de atividade antioxidante

Existem diversas metodologias disponíveis para detectar a capacidade antioxidante.

O método de seqüestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) tem sido extremamente utilizado para avaliar a atividade de seqüestro de radicais livres de

antioxidantes naturais. Vários componentes fitoquímicos (flavonóides, fenilpropanóides, ácidos fenólicos) são conhecidos pela sua capacidade antioxidante em frutas e vegetais. O seqüestro de radicais livres é geralmente tido como o responsável por inibir a peroxidação lipídica (PELLATI et al., 2004).

Este ensaio é baseado na redução de uma solução alcoólica de DPPH, na presença de um doador de hidrogênio (antioxidante), devido a formação de uma forma não radical livre (DPPH-H) (Figura 9).

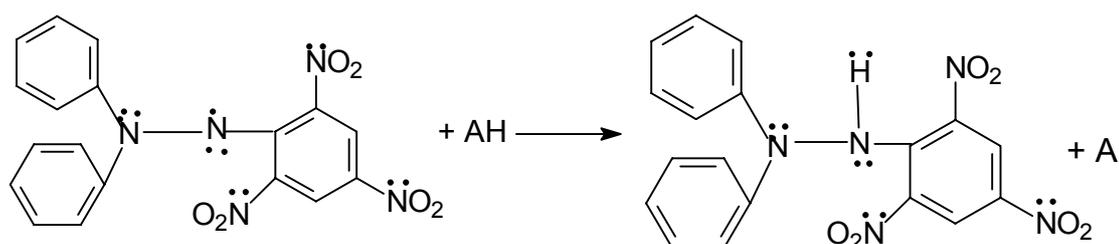


Figura 9 – Estrutura do DPPH[•]: radical livre (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) e reduzido (difenil picrilhidrazina).

Fonte: Brand-Willians, Cuvelier e Berset (1995).

O DPPH[•] remanescente é medido a 517 nm após 30 min. O decréscimo da absorvância corresponde inversamente à atividade de seqüestro do radical livre da amostra, acompanhada simultaneamente de mudança de coloração violeta escura original do radical para uma coloração amarela do produto oxidado (PELLATI et al., 2004).

O método é simples, rápido e sensível, utiliza reagentes de custo relativamente baixo, não faz uso de instrumentos sofisticados e não envolve condições drásticas de temperatura e oxigenação (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

Os mecanismos de reação entre os compostos fenólicos e o radical DPPH foram descritos por Brand-Willians, Cuvelier e Berset (1995). Estes parecem envolver, de forma isolada ou combinada, a dimerização por acoplamento oxidativo de dois radicais formados, seguida da regeneração de dois grupos hidroxila pela transferência do hidrogênio, podendo novamente reagir com DPPH e, por último, um radical de DPPH pode se estabilizar com um radical arila (Figura 10).

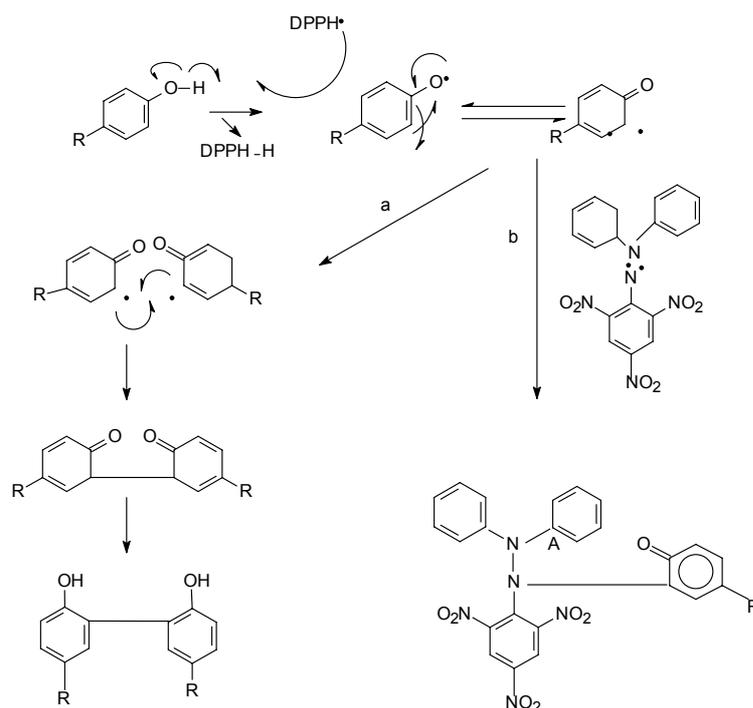


Figura 10 – Mecanismo de ação provável entre o radical DPPH e substâncias fenólicas (a=dimerização e b= estabilização de um radical DPPH).

Fonte: Brand-Willians, Cuvelier e Berset (1995).

A forma de expressar os resultados como a capacidade de sequestrar/reduzir o radical DPPH, pode ser apresentada de formas variadas, dificultando as comparações. Podem-se expressar os resultados em forma de porcentagem (HOLLEY; CHEESEMAN, 1993; LU; FOO, 2001; CHOI et al., 2002), pelo valor de IC_{50} , a qual mede a quantidade de substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH, e também, pelo poder antioxidante ou anti-radicalar, o qual expressa a relação inversa da IC_{50} (BRAND-WILLIANS; CUVELIER; BERSSET, 1995).

Outro teste freqüentemente usado para avaliar a capacidade antioxidante é o método do fosfomolibdato, o qual baseia-se na redução do Mo^{+6} para Mo^{+5} com subsequente formação de um complexo fosfato- Mo^{+5} de cor verde. Em contraste com o método do DPPH• acima descrito, esta reação se processa a temperaturas elevadas e por tempo prolongado (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999).

O teste do ácido tiobarbitúrico é igualmente bastante utilizado para avaliar a capacidade antioxidante de algumas substâncias. Segundo a técnica preconizada por Ruberto

et al. (2000) e Dasgupta e De (2004), emprega-se o ácido tiobarbitúrico (TBA) para detectar oxidação lipídica, usando gema de ovo homogeneizada como meio rico em lipídeo.

Lipídios de gema sofrem rápida peroxidação não-enzimática quando incubados na presença de sulfato ferroso. Um dos principais produtos formados no processo oxidativo é o malonaldeído (MA), um aldeído com 3 átomos de carbono. Neste ensaio uma molécula de MA reage com duas moléculas de TBA para formar um complexo de cor rosa, o qual absorve a 532 nm. A reação ocorre em meio ácido (pH 1-2) e em alta temperatura (95 °C), no sentido de aumentar a sua velocidade e sensibilidade. A adição do solvente orgânico *n*-butanol, diminui a interferência de aldeídos não oriundos da lipoperoxidação.

Neste teste, a presença de uma amostra com atividade antioxidante promove inibição da peroxidação, impedindo a formação do malonaldeído e conseqüente reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA).

O teste TBARs é considerado um teste sensível, preciso, porém pouco específico já que o ácido tiobarbitúrico pode reagir com outras substâncias presentes na amostra, sendo considerado um bom teste quando aliado à outros como o teste do DPPH e do fosfomolibdato.

Em função de todas as atividades relatadas na Revisão de Literatura, bem como do potencial químico ainda não totalmente elucidado de extratos das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., este trabalho justifica-se nos aspectos que se fundamentam nos objetivos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi realizar a análise fitoquímica de uma fração semipurificada obtida das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. (Celastraceae), com o fim de isolar e identificar taninos condensados e avaliar a capacidade antioxidante do extrato bruto, fração acetato de etila, fração aquosa e substâncias químicas isoladas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar taninos condensados de uma fração semipurificada obtida das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss.
- Caracterizar a matéria-prima vegetal, realizando análises para o controle de qualidade da espécie vegetal.
- Avaliar a capacidade antioxidante dos extratos bruto, semipurificado e das substâncias isoladas, através de teste do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila).
- Avaliar a capacidade antioxidante dos extratos bruto e semipurificado através do teste da redução do complexo fosfomolibdênio;
- Avaliar a capacidade antioxidante dos extratos bruto e semipurificado através do teste do ácido tiobarbitúrico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EQUIPAMENTOS

- Aparelho de espectroscopia de ressonância magnética nuclear Varian, mod. Mercury Plus, 300 MHz
- Balança analítica AND HR-200
- Balança analítica Gehaka 2000
- Balança Metler Toledo AT 201
- Balança semi-analítica Marte AL-500
- Banho-maria – Fanem Mod 120/3
- Banho-maria – Marte MB
- Bomba a vácuo Vaccubrand Labortechnik tipo MZ 2C
- Bomba de vácuo – IBAV BRD4
- Câmara de UV 365 nm – Germetec
- Câmera fotográfica digital Sony-Cybershot modelo DSCW1 5.1 Mega pixels
- Coletor de frações – ISCO Modelo 328
- Coletor de frações – Pharmacia Biotech FRAC-200
- Espectrofotômetro UV/VIS Cary 1E Varian
- Estufa de ar circulante Quimis® mod.Q-314D292
- Evaporadores rotatórios Buchi R-114, R-153 e R-3000V
- Liofilizadores Christh Alpha 1-2, Alpha 1-4, Alpha 1-4 LD e Beta 1-16
- Máquina de gelo – Everest refrigeração mod. EGC 50
- Moinho de facas Tecnal TE-048
- Ultra-som Unique-USC 1540, 25 KHz
- Ultra-turrax UTC 115 KT
- Vortex mod. AP-56

4.2 SOLUÇÕES, SOLVENTES E REAGENTES

Todos os solventes e reagentes empregados possuíam grau de pureza pró-análise (p.a.) das marcas Synth®, J. T. Baker®, Mallinckrodt®, exceto quando especificado.

- Acetato de etila
- Acetona
- Acetona:água (7:3; v/v)
- Ácido acético glacial
- Ácido clorídrico
- Ácido fórmico
- Ácido tiobarbitúrico (Acrós)
- Anidrido acético
- *n*-Butanol
- Cromatofolhas contendo gel de sílica F₂₅₄ (Merck)
- DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) Fluka
- Etanol
- Etanol 95 °GL Ilha
- Gel de sílica PF₂₅₄ (Merck)
- Gema de ovo como fonte de lipídeos
- Metanol
- Nitrogênio líquido
- Piridina
- Pó de pele levemente cromado Freiberg®
- Reagente de Folin-Ciocalteu 2 mol l⁻¹ Laborclin®
- Sephadex® LH-20 Fluka
- Solução de ácido sulfúrico 0,6 M
- Solução aquosa de carbonato de sódio a 14,06%
- Solução etanólica de cloreto férrico a 1%
- Solução fosfato de sódio 28 mM
- Solução molibdato amônio 4 mM
- Solução sulfato ferroso 0,07 M
- Tolueno

4.3 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

A coleta do material vegetal foi realizada no município de Marialva, PR (S23°28'46,7"; W51°77'41,5"; altitude: 621 m), no mês de novembro de 2004, deixando secar à temperatura ambiente por 12 dias. Após a secagem, as folhas foram pulverizadas em moinho de facas. Um exemplar foi encaminhado ao herbário HUEM (Herbário da Universidade Estadual de Maringá).

4.4 CONTROLE DE QUALIDADE DA MATÉRIA-PRIMA VEGETAL

As técnicas utilizadas para a avaliação da qualidade da droga vegetal foram realizadas segundo normas farmacopéicas existentes na Farmacopéia Brasileira (2000) e em outras Farmacopéias, assim como outras técnicas não farmacopéicas.

4.4.1 Análises físico-químicas

4.4.1.1 Determinação da perda por secagem

Cerca de 2,0 g exatamente pesados da droga vegetal foram colocados a secar à temperatura ambiente, com ausência de luminosidade. Foram pesados diariamente até peso constante. Os resultados foram expressos em perda de substâncias voláteis e/ou água percentual, através da média de cinco determinações (MELLO; PETROVICK, 2000).

4.4.1.2 Determinação da perda por dessecação

Aproximadamente 2 g da droga vegetal, exatamente pesados, foram colocadas em, pesa-filtros previamente tarados, sendo desseccadas em estufa a 105 °C, até peso constante. Os valores representam a média de 3 determinações e são expressos em porcentagem (%; p/p) (FARMACOPÉIA, 1988).

4.4.1.3 Determinação do teor de extrativos

Foram pesados exatamente cerca de 1,0 g da droga vegetal, que foi submetida à decocção com 100,0 ml de água, durante 10 min. Após o resfriamento, a solução foi transferida para balão volumétrico e o volume completado a 100,0 ml. Após filtração em papel filtro, os primeiros 20,0 ml foram desprezados. Foi pesada uma alíquota equivalente a 20,0 g, em pesa-filtro previamente tarado, e levado à evaporação até secura em banho-maria, sob agitação. O pesa-filtro contendo o resíduo foi colocado em estufa, à temperatura de 105 °C por 2 h, resfriado em dessecador e pesado (MELLO; PETROVICK, 2000).

O teor de extrativos foi calculado em massa percentual, pela média de três determinações segundo a equação:

$$TE = \frac{g.FD.100}{m}$$

Onde : TE= teor de extrativos (%; m/m)
 g= massa de resíduo seco
 m= massa da amostra (g)
 FD= fator de diluição (5)

4.4.1.4 Determinação do teor de taninos totais

Uma amostra de 0,750 g de droga pulverizada, exatamente pesada, foi transferida para erlenmeyer com 150 ml de água, deixando-se durante 30 min em banho-maria à temperatura de 80-90 °C. Após, resfriou-se o erlenmeyer em água corrente sendo transferido, seu conteúdo, para balão volumétrico de 250,0 ml, lavando-se e completando-se o volume com água. Tomou-se cerca de 80 ml do extrato e filtrou-se através de papel-filtro, desprezando-se os primeiros 50 ml. O filtrado foi denominado de solução-mãe (SM).

Para a determinação de polifenóis totais (PT), 5 ml da solução-mãe foram diluídos com água em balão volumétrico de 25,0 ml. Dois mililitros dessa solução foram transferidos com 1 ml de solução de ácido fosfotúngstico R (Reagente Fenólico de Folin-Ciocalteu) e 10 ml de água para balão volumétrico de 25,0 ml, completando-se o volume com solução de carbonato de sódio a 14,06%. Após 15 min da adição da última solução mediu-se a absorvância a 691 nm, empregando-se a água como branco. Para determinação de polifenóis não adsorventes (PNA), 10 ml da SM foram transferidos com 0,100 g de pó-de-pele R para béquer e agitados durante 60 min. Após filtrou-se a solução. Cinco mililitros do filtrado foi diluído com água para 25,0 ml em balão volumétrico. Dois mililitros dessa solução foram transferidos com 1 ml de solução de ácido fosfotúngstico R (Reagente Fenólico de Folin-Ciocateau) e 10 ml de água para balão volumétrico de 25 ml completando-se o volume com solução de carbonato de sódio a 14,06%. Após 15 min da adição da última solução mediu-se a absorvância a 691 nm, empregando-se a água como branco. O conjunto de operações (extração e diluições) foi realizado sob proteção da ação da luz direta (GLASL, 1983)

A porcentagem de taninos totais foi calculada segundo as fórmulas:

$$PT = \frac{15625 \cdot Abs}{1000 \cdot m} \qquad PNA = \frac{15625 \cdot Abs}{1000 \cdot m} \qquad TT = PT - PNA$$

Onde: PT = Polifenóis totais (%)
 PNA = Polifenóis não adsorventes
 Abs = Absorvância medida
 m = massa da droga em g
 TT = teor de taninos totais (%)

4.5 PROCESSO DE DESENGORDURAMENTO

As folhas moídas foram submetidas ao processo de maceração dinâmica com *n*-hexano em frasco âmbar, na concentração de 10% (p/v) por 10 dias. Durante este período o solvente foi renovado a fim de aumentar a eficiência do processo. A planta foi retirada do frasco e seca em capela.

4.6 PREPARAÇÃO DE EXTRATOS

4.6.1 Extrato bruto (EB)

O extrato foi preparado na proporção 10% (m/v) utilizando acetona:água 7:3 (v/v) como líquido extrator, em Ultra-turrax® durante 20 min, com controle de temperatura (≤ 40 °C) (MELLO et al., 1996a). Após, o extrato foi filtrado em pano filtro de nylon com diâmetro de poros de 10 μ m e algodão, com auxílio de uma bomba a vácuo. Após, foi concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida, com temperatura abaixo de 40 °C para eliminação do solvente orgânico. O extrato concentrado permaneceu em freezer durante 10 dias para decantação da clorofila restante, após foi descongelado à temperatura ambiente e filtrado para separação da clorofila. O extrato concentrado foi congelado em nitrogênio líquido e liofilizado obtendo-se o extrato bruto de *Maytenus ilicifolia*.

4.6.2 Fração acetato de etila (FAE) e fração aquosa (FAQ)

Cinqüenta gramas de extrato bruto de *Maytenus ilicifolia* foram resuspensos em 500 ml de água e particionado com 500 ml de acetato de etila (5 vezes). A fase aquosa (FAQ) e a acetato de etila (FAE) foram separadas, concentradas em evaporador rotatório, sob pressão

reduzida, até eliminação completa do solvente orgânico, congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas.

4.7 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Na obtenção de frações semipurificadas, auxiliando o isolamento de substâncias químicas, foram empregados alguns métodos cromatográficos.

4.7.1 Cromatografia em coluna (CC) da fração acetato de etila

A cromatografia em coluna (CC) foi utilizada na separação da fase acetato de etila. Empregou-se uma coluna de vidro (h: 750 mm, Ø : 55 mm) contendo Sephadex® LH-20 como fase estacionária. A coluna após limpeza apropriada com acetona:água (7:3 v/v) para eliminação de prováveis resíduos anteriores e estabilização em ácido acético a 2%, foi novamente estabilizada com o primeiro solvente da fase móvel a ser utilizado, álcool 20%. Aplicaram-se 16,19 g da fase acetato de etila, que foram previamente ressuspensos em etanol 20%, no topo da coluna com auxílio de pipeta Pasteur. Todos os solventes foram eluídos de forma ininterrupta em proporção volumétrica (tabela 1).

Tabela 1 – Gradiente de fase móvel utilizada para CC da FAE.

Fase móvel	Volume (ml)
Etanol 20%	2570
Etanol 30%	6500
Etanol 40%	2330
Etanol 50%	1380
Metanol:água (1:1)	2100
Acetona:água (7:3)	3000

Foram recolhidos 10 ml em cada tubo de ensaio com fluxo de 1 ml/min. O monitoramento das frações foi realizado através de cromatografia em camada delgada (CCD) (seção 4.7.3) a cada 10 tubos. Obtiveram-se 26 frações, que foram reunidas por semelhança conforme perfil da CCD. Cada fração foi concentrada em evaporador rotatório sob pressão reduzida até total eliminação do solvente orgânico, congelada em nitrogênio líquido e liofilizada (MELLO et al., 1996b).

4.7.2 Cromatografia em coluna das subfrações

Algumas das 26 frações obtidas a partir da fração acetato de etila foram submetidas a sucessivas cromatografias em colunas (CC) (h: 320 mm, Ø 30 mm; h: 400 mm, Ø 25 mm; h: 600 mm, Ø 15 mm) contendo Sephadex® LH-20, com fluxo de 1 ml/min e uma seqüência de fase móvel variável: etanol 3%, etanol 6%, etanol 9% e assim sucessivamente até etanol 40%. O monitoramento das frações foi realizado por cromatografia em camada delgada (seção 4.7.3) sendo as frações reunidas por similaridade, concentradas em evaporador rotatório e liofilizadas.

4.7.3 Cromatografia em camada delgada (CCD)

O acompanhamento das cromatografias em coluna (CC) foi realizado através da cromatografia em camada delgada (CCD). Para isso foram utilizadas cromatofolhas de alumínio contendo gel de sílica 60 F₂₅₄ (Merck®), com 0,200 mm de espessura. Utilizou-se como fase móvel acetato de etila: ácido fórmico: água (90:5:5; v/v). Após a eluição e secagem em capela da placa, observou-se sob lâmpada de ultravioleta à 254 nm e, em seguida, utilizou-se como revelador solução de cloreto férrico a 1% em etanol.

4.7.4 Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)

As substâncias isoladas passaram por um processo de derivatização química por acetilação (seção 4.8). As amostras acetiladas foram aplicadas em placas de CCDP (no máximo 30 mg substância/placa), na forma de linha com auxílio de uma pipeta Pasteur e algodão.

As placas para CCDP constituem-se de placas de vidro de 20x20 cm preparadas no laboratório. As placas foram limpas com acetona e recobertas com uma suspensão de gel de sílica PF₂₅₄ contendo gesso (Merck®) na proporção de 72 g sílica para 240 ml de água, com espessura de 0,75 mm. A fase móvel empregada foi tolueno:acetona (7:3; v/v). Antes do uso, as placas foram ativadas, colocando-se durante 10 min em estufa a 100 °C.

As bandas correspondentes às substâncias foram demarcadas sob luz UV à 254 nm, medindo-se o valor de R_f para cada substância. Em seguida raspou-se a área e filtrou-se sob pressão reduzida com acetona e com auxílio de um funil de vidro sinterizado G4. Após a filtração, o solvente orgânico foi concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida e a amostra deixada em capela à temperatura ambiente para completa eliminação do solvente, sendo posteriormente congelada e liofilizada.

4.8 DERIVATIZAÇÃO

Em balão de fundo redondo de 100 ml, para até 100 mg da fração desejada, adicionaram-se 1 ml de anidrido acético e 1 ml de piridina, seguindo esta ordem de adição. Agitou-se levemente, fechou-se com tampa e cobriu-se o balão com papel alumínio, deixando-se em repouso, à temperatura ambiente, por 24 h. Após esse período foi colocado dentro do balão gelo picado e o balão foi imerso em gelo para auxiliar no resfriamento, por um período de 2 h. Após esse tempo, filtrou-se sob vácuo em filtro sinterizado G4, lavando-se com água destilada fria em abundância para eliminação da piridina. O precipitado obtido no filtro sinterizado G4 foi solubilizado em acetona, e o solvente orgânico eliminado por concentração em evaporador rotatório sob pressão reduzida. A substância acetilada foi congelada e liofilizada (MELLO et al., 1996a).

4.9 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

A análise estrutural das substâncias puras foi realizada através de métodos espectroscópicos de ressonância magnética nuclear (RMN) 1D (^1H , ^{13}C), 2D ($^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY, HSQC, HMBC), empregando-se solventes deuterados (CD_3OD e CDCl_3), ópticos ($[\alpha]_D^{20^\circ}$) e espectrometria de massas (EM). Os espectros das substâncias foram obtidos no Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá e foram analisados e comparados com dados da literatura. Os espectros de massas foram obtidos junto ao Instituto de Química Orgânica da Universidade de Münster, Alemanha.

4.10 ROTAÇÃO ÓTICA (POLARIMETRIA)

A determinação da rotação ótica ($[\alpha]_D^{20^\circ}$) das substâncias isoladas e acetiladas sucedeu-se empregando acetona (grau espectroscópico) a 20°C . Para a determinação do valor, empregou-se a equação 1.

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = \frac{100 \cdot \alpha}{l \cdot c}$$

α = rotação ótica obtida em graus a $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$

l = comprimento da cubeta do polarímetro em dm

c = concentração da substância em porcentagem (m/v)

4.11 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

4.11.1 Método do radical DPPH

A capacidade do extrato bruto, fração semipurificada e substâncias isoladas atuarem como agente redutor em estabilizar o radical livre 2,2-difenil-1-picrihidrazila (DPPH[•]) foi avaliada de acordo com o método de Amarowicz et al. (2004) que cita Hatano et al. (1989), com algumas modificações. O extrato (5 mg) foi dissolvido em 10 ml de metanol, e sucessivas dissoluções foram feitas para se obter as concentrações desejadas.

Utilizaram-se para as frações extrato bruto, fração aquosa e fração acetato de etila: 0,1 mg/ml; 0,02 mg/ml; 0,01 mg/ml; 0,005 mg/ml; 0,0025 mg/ml, e para substâncias isoladas as concentrações foram determinadas de acordo com o peso molecular, portanto, para **epicatequina**: 14,5 µg/ml (50 µM); 11,6 µg/ml (40 µM); 8,7 µg/ml (30 µM); 5,8 µg/ml (20 µM); 2,9 µg/ml (10 µM); 1,45 µg/ml (5 µM); 0,725 µg/ml (2,5 µM); 0,3625 µg/ml (1,25 µM); 0,18125 µg/ml (0,625 µM); para **catequina**: 5,8 µg/ml (20 µM); 2,9 µg/ml (10 µM); 1,45 µg/ml (5 µM); 0,725 µg/ml (2,5 µM); 0,3625 µg/ml (1,25 µM); 0,18125 µg/ml (0,625 µM); para **epigalocatequina** e **galocatequina** (a amostra utilizada foi o padrão de galocatequina): 4,59 µg/ml (15 µM); 3,06 µg/ml (10 µM); 1,53 µg/ml (5 µM); 0,765 µg/ml (2,5 µM); 0,3825 µg/ml (1,25 µM); 0,19125 µg/ml (0,625 µM); para **epicatequina-(4β→8)-catequina**: 5,78 µg/ml (10 µM); 2,89 µg/ml (5µM); 1,445 µg/ml (2,5 µM); 0,7225 µg/ml (1,25 µM); 0,36125 µg/ml (0,625 µM); para **epicatequina-(4β→8)-epicatequina**: 5,78 µg/ml (10 µM); 2,89 µg/ml (5 µM); 1,445 µg/ml (2,5 µM); 0,7225 µg/ml (1,25 µM); 0,36125 µg/ml (0,625 µM). Todas as amostras foram diluídas em metanol.

Após, adicionou-se à solução metanólica de DPPH[•] (1 mmol l⁻¹: 0,125 µl para cada 1 ml da amostra a ser testada). A mistura foi agitada por 15 s e deixada em repouso por 30 min em temperatura ambiente. A absorvância da solução resultante foi lida no espectrofotômetro em 517 nm. Como branco utilizou-se 2 mg de BHT (butil-hidróxi-tolueno) dissolvido em 4 ml de metanol com 0,5 ml de solução de DPPH[•] (1 mmol l⁻¹), e como controle negativo 375 µl de solução de DPPH[•] (1 mmol l⁻¹) em 3 ml de metanol, sendo o controle negativo o primeiro a ser lido da bateria. A leitura é baseada na capacidade que o extrato tem de descolorir a solução de DPPH[•], ocorrendo decaimento da absorvância. A atividade sequestradora de radicais (ASR) foi calculada como uma percentagem de DPPH[•] descolorido usando a equação:

$$\% \text{ ASR} = (\text{Abs. cont} - \text{Abs. amostra} / \text{Abs. cont}) \times 100$$

Onde: Abs. cont: absorvância do controle negativo

Abs. amostra: absorvância da amostra.

Os resultados foram expressos em termos de IC₅₀ (concentração de amostra necessária para inibir 50% dos radicais livres presentes na solução de DPPH[•]).

4.11.2 Determinação da atividade antioxidante pelo método do fosfomolibdato

Os testes foram baseados na técnica de Prieto, Pineda e Aguilar (1999) e Hirata (2004), onde foram feitas soluções teste com as diferentes amostras, tendo estas uma concentração de 200 µg/ml. Utilizou-se 0,3 ml destas soluções teste com 3 ml de reagente (solução de ácido sulfúrico 0,6 mol l⁻¹, fosfato de sódio 28 mmol l⁻¹; molibdato amônio 4 mmol l⁻¹ em água destilada), que foram incubados em banho-maria a 95 °C/90 min. Como branco usou-se 0,3 ml de metanol com 3 ml de reagente. Após resfriamento a temperatura ambiente, as amostras e o branco foram lidas em espectrofotômetro a 695 nm, utilizou-se metanol para zerar o espectrofotômetro. A atividade antioxidante foi calculada com base na taxa de formação do complexo de fosfomolibdênio em relação ao padrão (vitamina C) de valor de referência 1,00 (equivalente a 100%):

$$\% \text{ F} = (\text{Abs. A} - \text{Abs. B} / \text{Abs. Vit.} - \text{Abs. B}) \times 100$$

Onde: % F: taxa de formação do complexo de fosfomolibdênio em relação a vitamina C

Abs. A: absorção da amostra

Abs. B: absorção do branco

Abs. Vit.: absorção da vitamina C

4.11.3 Determinação da atividade antioxidante por TBARS

Este método foi realizado conforme as técnicas de Ruberto, Baratta e Dorman (2000) e Dasgupta e De (2004), as quais empregam o ácido tiobarbitúrico (TBA) para detectar oxidação lipídica. Utilizou-se 0,5 ml a 10% (p/v) de gema de ovo (rico em lipídios) com 0,1 ml da amostra solubilizados em metanol (1; 0,8; 0,6; 0,3 e 0,1 mg/ml) e completando um volume de 1 ml com água destilada, após homogenização acrescenta-se 0,05 ml FeSO₄ (0,07

mol l⁻¹) incubando por 30 min, a seguir acrescenta-se 1,5 ml de ácido acético 20% e 1,5 ml TBA 0,8% (p/v) em 1,1% SDS (sulfato dodecil de sódio) (p/v) agita-se em vortex e incuba-se em banho-maria a 95 °C/60 min. Deixar esfriar, só então acrescentar 5 ml de *n*-butanol e centrifugar à 3000 rpm/10 min, retirar o sobrenadante e ler em espectrofotômetro a 532 nm. Os cálculos são expressos em porcentagem de ação inibitória (AI%) na formação do malonaldeído:

$$AI \% = (1 - AT/AC) \times 100$$

Onde: AC: absorvância do controle totalmente oxidado
AT: absorvância da amostra teste.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 MATERIAL VEGETAL

As exsicatas da coleta de exemplares de *M. ilicifolia* realizadas no município de Marialva no mês de novembro de 2004 estão depositadas no Herbário da Universidade Estadual de Maringá com n. HUEM 10623, e foram identificadas pela Profa. Dra. Ezilda Jacomassi

A correta identificação do vegetal é fator importante em qualquer área, cujo resultado reflita na saúde da população, seja na certificação dos estudos e trabalhos realizados com plantas, seja previamente ao desenvolvimento de um produto fitoterápico, para o cultivo ou coleta sustentável e para os fornecedores de matéria-prima das farmácias de manipulação e/ou indústrias. A identificação botânica é a primeira etapa na certificação da matéria-prima, fator importante para evitar equívocos e adulterações.



Figura 11 - *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., Marialva, Paraná, Brasil.

Fonte: autora.



a)



b)



c)

Figura 12 – Frutos (a) e folhas (b e c) de *Maytenus ilicifolia*.

Fonte: autora.

5.2 CONTROLE DE QUALIDADE

A avaliação botânica não assegura por si só a constância do efeito terapêutico, a eficácia do vegetal está ligada à sua composição química. As plantas sofrem influências do meio e estas podem traduzir-se em alterações qualitativas e quantitativas dos seus constituintes químicos, sendo imprescindível considerar fatores de clima, solo, estágio vegetativo, para o controle de qualidade da matéria-prima vegetal (MELLO, 1989). Deste modo, a qualidade e disponibilidade dos medicamentos fitoterápicos são fatores problemáticos, fato que não é observado em relação aos medicamentos sintéticos. Alguns parâmetros essenciais para a qualidade das matérias-primas vegetais podem variar, dependendo da procedência do material. As variações, principalmente na composição química e, em alguns casos na pureza e mesmo nas características fenotípicas ressaltam a importância dos estudos de caracterização farmacognóstica, correlacionados com atividade farmacológica. Por isso a origem geográfica exata e as condições de cultivo, estágio de desenvolvimento e estação do ano, coleta, secagem e armazenamento, bem como de tratamentos com agrotóxicos, descontaminantes e conservantes devem ser conhecidos (BRITISH, 1996).

A caracterização da droga vegetal passa por inúmeras determinações para se estabelecer valores ou faixas que permitam a quantificação da droga antes do preparo do medicamento. Diversos métodos químicos, físicos e físico-químicos como cromatografia em camada delgada, determinação da perda por dessecação, determinação do teor de extrativos e a quantificação do teor de substâncias ativas e mesmo as substâncias marcadoras, também são utilizadas a fim de caracterizar e padronizar o material vegetal ou mesmo seus extratos.

Nas análises de matérias-primas é recomendada a realização em triplicata, calculando-se a média e o coeficiente de variação (FARIAS, 2003).

5.2.1 Perda por secagem

A presença de água em excesso em drogas vegetais, promove o crescimento de bactérias, fungos ou insetos e hidrólise com conseqüente degradação de constituintes químicos. Por essa razão, limites de água são descritos para drogas vegetais, especialmente para aquelas que facilmente absorvem água ou aquelas no qual a deterioração é promovida pela presença de água em excesso, visto que este fato impede o armazenamento por tempo prolongado (CARDOSO, 2002). O material vegetal coletado foi seco à sombra, em temperatura ambiente (25 ± 3 °C) e local arejado por 12 dias. O valor médio da perda por secagem para as determinações foi de $40,39\% \pm 1,38$ ($CV\% = 3,42$) para as folhas de *Maytenus ilicifolia*.

5.2.2 Perda por dessecação

A perda por dessecação foi realizada com a droga seca e moída, determinando-se o teor de umidade residual. Este parâmetro é fundamental para se determinar a estabilidade da droga frente ao período de armazenamento. A monografia existente na Farmacopéia Brasileira (2003), preconiza umidade máxima de 6% para as folhas de *Maytenus ilicifolia*.

O resultado da perda por dessecação foi de $10,92\% \pm 0,10$ ($CV\%=0,91$).

Os resultados obtidos estão acima dos valores preconizados pela Farmacopéia Brasileira (2003). Novas análises devem ser feitas a fim de dirimir dúvidas com relação aos resultados obtidos considerando a questão da sazonalidade, secagem e armazenamento da droga vegetal que notadamente interfere nos parâmetros analisados.

As plantas sofrem influências do meio e estas podem traduzir-se em alterações qualitativas e quantitativas dos seus constituintes químicos, sendo imprescindível considerar fatores de clima, solo, estágio vegetativo, para o controle de qualidade da matéria-prima vegetal (MELLO, 1989).

5.2.3 Determinação do teor de extrativos

A determinação do teor de extrativos é realizada para se conhecer a quantidade de substâncias extraíveis em um determinado solvente a partir de uma determinada quantidade do material vegetal (WORLD, 1998b; CARDOSO, 2002). A técnica do teor de extrativos, preconizada pela OMS (WORLD, 1998b), emprega água como líquido extrator. O resultado obtido na determinação do teor de extrativos com as folhas secas foi de $31,60\% \pm 0,22$ ($CV\%=0,72$).

5.2.4 Determinação do teor de taninos totais

O método utilizado para doseamento de taninos totais foi o de Folin-Ciocalteu. Vários outros métodos, baseados nas propriedades redutoras, tem sido propostos, tais como os métodos baseados na precipitação de taninos com sais metálicos e alcalóides, que são de fácil e rápida execução, porém são inespecíficos, sendo os resultados influenciados por outros constituintes da droga vegetal (ANDRADE, 1996).

O método de Folin-Ciocalteu baseia-se na associação dos taninos às proteínas, o que o torna mais específico, pois trata-se de um método espectrofotométrico que determina a intensidade da coloração azul formada pela redução do ácido fosfotúngstico com compostos fenólicos. Essa reação por não ser específica, necessita da adição do pó-de-pele em etapa

posterior, para que ocorra a complexação tanino-proteína. O resultado obtido na determinação dos taninos totais foi de $5,04\% \pm 0,07$ ($CV\%=1,57$).

A presença de taninos na espécie vegetal pode explicar seu uso popular como antimicrobiano, antiinflamatório, cicatrizante, antiulcerogênico (SANTOS; MELLO, 2003).

5.3 ANÁLISE QUÍMICA

A pesquisa química tem por objetivo conhecer as substâncias presentes nas espécies vegetais. Os dados de literatura apontam para a presença de compostos fenólicos nas folhas de *Maytenus ilicifolia*. Deste modo, a análise fitoquímica foi direcionada para o isolamento, purificação e elucidação estrutural de taninos, que estão possivelmente relacionados com as propriedades biológicas da espécie vegetal em questão.

As folhas de *M. ilicifolia* (521,56 g) foram coletadas e após secagem foram moídas em moinho de facas, fornecendo um rendimento de 96% (500,7 g). A moagem teve por finalidade reduzir mecanicamente, o vegetal a pó, de modo a facilitar o processo de extração.

Com 500,7 g de planta moída, preparou-se o extrato bruto a 10% (p/v) com acetona:água (7:3; v/v), apresentando um rendimento de 25,27% obtendo-se, assim, 126,55 g de extrato bruto aceto-aquoso liofilizado.

O método de extração escolhido foi o Ultra-turrax® devido à eficiência da técnica somada à simplicidade, rapidez e versatilidade, permitindo a fácil utilização dessa técnica em processamentos de pequena e média escala. Trata-se de um método de extração turbulento com rompimento das estruturas celulares em diminutos fragmentos.

Entre os inconvenientes causados pelo Ultra-turrax® encontram-se a geração de calor durante o processo e a dificuldade de filtração, devido à fragmentação excessiva do material. Para controlar o problema da elevação de temperatura, a técnica foi realizada com duração total de 40 min em quatro etapas de 5 min, com intervalo de 5 min em cada etapa para resfriamento do sistema (MELLO; PETROVICK, 2000). A filtração foi realizada com sucessivas trocas do material filtrante e auxílio de bomba de vácuo.

A escolha do líquido extrator baseou-se em dados de literatura, considerando-se que, a mistura acetona:água é a que apresenta melhor rendimento. A presença de água junto a solventes orgânicos aumenta o rendimento da extração de compostos fenólicos e a acetona promove o bloqueio da associação tanino:proteína, tornando assim a extração quantitativamente maior (SANTOS; MELLO, 2003).

Com 124,55 g do extrato bruto liofilizado (FAA) produziu-se por particionamento com acetato de etila, 88,7 g da fração aquosa (FA) e 22,55 g da fração acetato de etila (FAE),

sendo reservado para testes posteriores 2 g de FAA. O rendimento da fração aquosa foi de 71,20% e da fração acetato de etila foi de 18,10%, havendo perdas durante o processo de produção. A obtenção de extratos, frações e subfrações encontram-se no fluxograma 1.

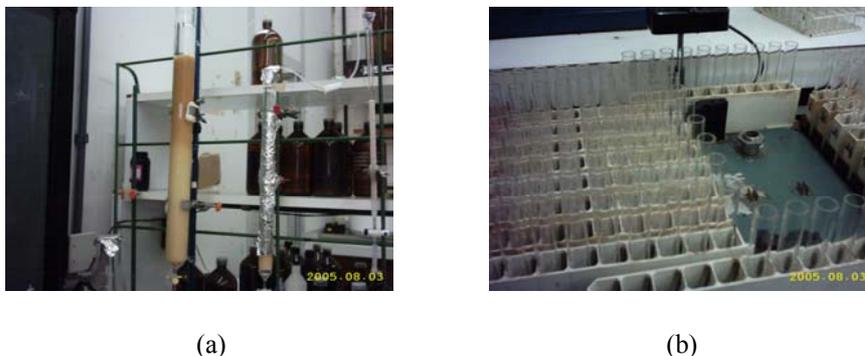
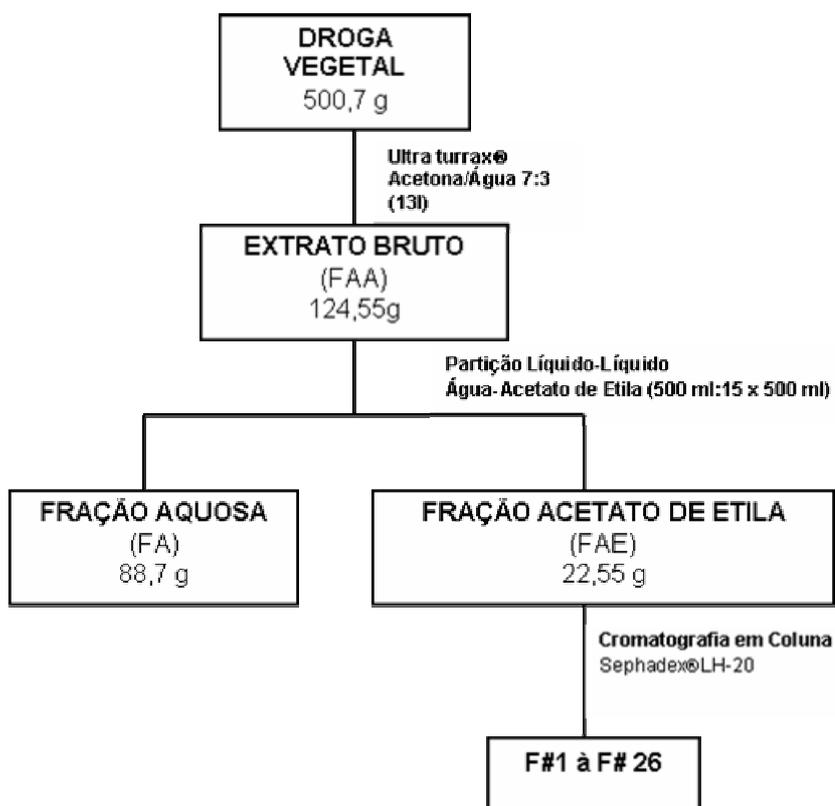


Figura 13 -Colunas (a) utilizadas na separação cromatográfica e coletor de frações Isco (b).



Fluxograma 1 – Obtenção das frações e subfrações e separação cromatográfica em coluna da fração acetato de etila.

Realizou-se cromatografia em coluna contendo Sephadex® LH-20 com 15,40 g da fração acetato de etila (FAE). O monitoramento foi realizado por CCD, obtendo-se 26 subfrações (Tabela 2) que foram reunidas por similaridade de manchas com coloração entre o azul e o marrom, de acordo com a figura 14.

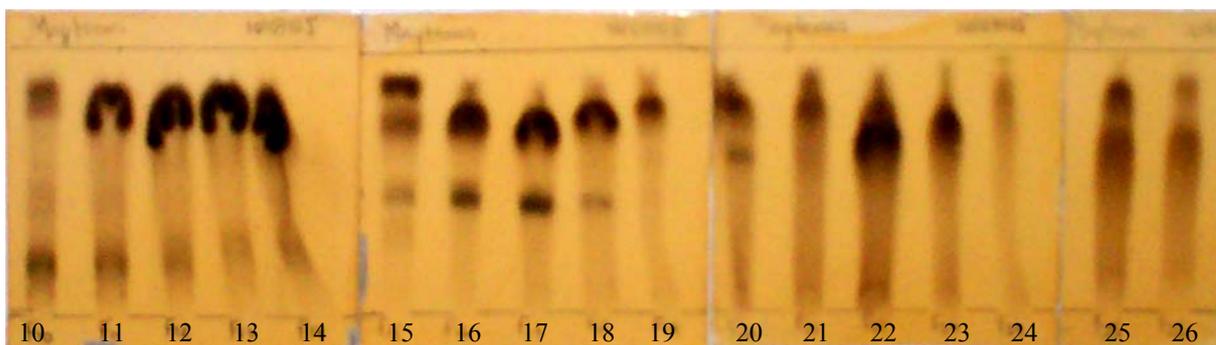
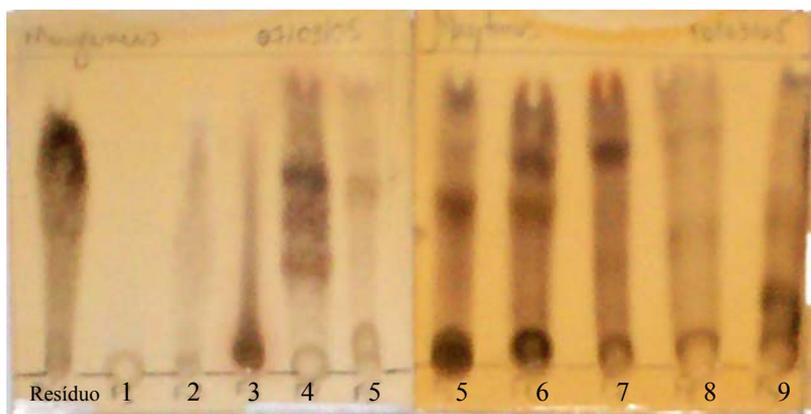


Figura 14 – Cromatografia em camada delgada das 26 subfrações. Condições cromatográficas: gel de sílica F254; sistema eluente acetato de etila:ácido fórmico:água (90:5:5; v/v); revelação com FeCl_3 a 1% em etanol.

Tabela 2 – Vinte e seis subfrações obtidas por cromatografia em coluna.

FRAÇÃO	ELUENTE (v/v)	QUANTIDADE (mg)	RENDIMENTO (%)
F#1	Etanol:água (2:8)	245,8	1,59
F#2	Etanol:água (2:8)	288,3	1,87
F#3	Etanol:água (2:8)	198,5	1,29
F#4	Etanol:água (2:8)	180,1	1,16
F#5	Etanol:água (2:8)	195,3	1,27
F#6	Etanol:água (3:7)	52,1	0,34
F#7	Etanol:água (3:7)	38,6	0,25
F#8	Etanol:água (3:7)	42	0,27
F#9	Etanol:água (3:7)	38,6	0,25
F#10	Etanol:água (3:7)	100,4	0,65
F#11	Etanol:água (3:7)	488,5	3,17
F#12	Etanol:água (3:7)	322	2,1
F#13	Etanol:água (3:7)	1546,8	10,04
F#14	Etanol:água (3:7)	154,6	1
F#15	Etanol:água (3:7)	1353,3	8,78
F#16	Etanol:água (3:7)	679,6	4,41
F#17	Etanol:água (3:7)	751,8	4,88
F#18	Etanol:água (4:6)	253,1	1,64
F#19	Etanol:água (4:6)	84,3	0,55
F#20	Etanol:água (4:6)	344	2,23
F#21	Etanol:água (4:6)	117,1	0,76
F#22	Etanol:água (1:1)	233,4	1,51
F#23	Etanol:água (1:1)	1324,5	8,59
F#24	Etanol:água (1:1)	435,4	2,83
F#25	Etanol:água (1:1)	737,5	4,79
F#26	Etanol:água (1:1)	268,8	1,74
F# A	Metanol:água (1:1)	301,4	1,96
F# B	Acetona:água (7:3)	4626,4	30,03
TOTAL	–	15402,2	100,0

No fracionamento realizado em Sephadex® LH-20, espera-se que as substâncias com maiores pesos moleculares apareçam nas frações iniciais. Porém o observado para taninos é a predominância de substâncias de peso molecular menor nas primeiras frações (THOMPSON et al., 1972). Os autores sugerem ainda, que isso provavelmente se deva a interação entre monômeros de taninos e o sistema eluente, ocorrendo a eluição seqüencial de: monômeros > dímeros > trímeros > tetrâmeros > oligômeros > polímeros. A configuração dos dímeros influencia o fracionamento, sendo observados que as ligações $4\beta \rightarrow 8$ e $4\beta \rightarrow 6$ interagem antes com o sistema eluente (etanol) que as ligações $4\alpha \rightarrow 8$ ou $4\alpha \rightarrow 6$ (THOMPSON et al., 1972).

Na tentativa de se conseguir o isolamento e identificação de taninos condensados, iniciou-se o fracionamento com as subfrações F#3, F#4, F#5, F#6, F#7, F#8, F#9 em cromatografia em coluna (CC) em Sephadex® LH-20, sendo desprezadas as subfrações F#1 e F#2 por não apresentarem o perfil cromatográfico desejado em cromatografia em camada delgada (CCD).

O isolamento desses compostos foi realizado empregando-se a metodologia proposta por Mello et al. (1996 a). O esquema de eluição e o acompanhamento das frações por CCD encontra-se descrito nas seções (4.7.2) e (4.7.3) respectivamente.

A CC das frações F#3, F#4, F#5, F#6, F#7, F#8 e F#9 foi realizada sem êxito, pois que nenhuma das substâncias obtidas apresentaram condições de interpretação, pela análise dos espectros de ressonância magnética nuclear (RMN).

O fracionamento de F#10 resultou em cinco novas subfrações semipurificadas que foram avaliadas por CCD. A subfração F#10-4 foi submetida à acetilação (seção 4.8) e à CCDDP (seção 4.7.4) resultando no isolamento da substância II.

O fracionamento de F#11 resultou em doze novas subfrações semipurificadas que foram avaliadas por CCD. A subfração F#11-10 foi submetida à acetilação (seção 4.8) e à CCDDP (seção 4.7.4) resultando no isolamento das substâncias II e III.

O fracionamento de F#12, F#13, F#14 resultou em várias novas subfrações semipurificadas que foram avaliadas por CCD. As subfrações F#12-4, F#13-2, F#13-3, F#13-4 e F#14-2 foram submetidas à acetilação (seção 4.8) e à CCDDP (seção 4.7.4) resultou novamente no isolamento da substância II, e no isolamento da substância I.

O fracionamento de F#15 resultou em quatro novas subfrações semipurificadas que foram avaliadas por CCD. A subfração F#15-2 foi submetida à acetilação (seção 4.8) e à CCDDP (seção 4.7.4) resultando novamente no isolamento da substância II.

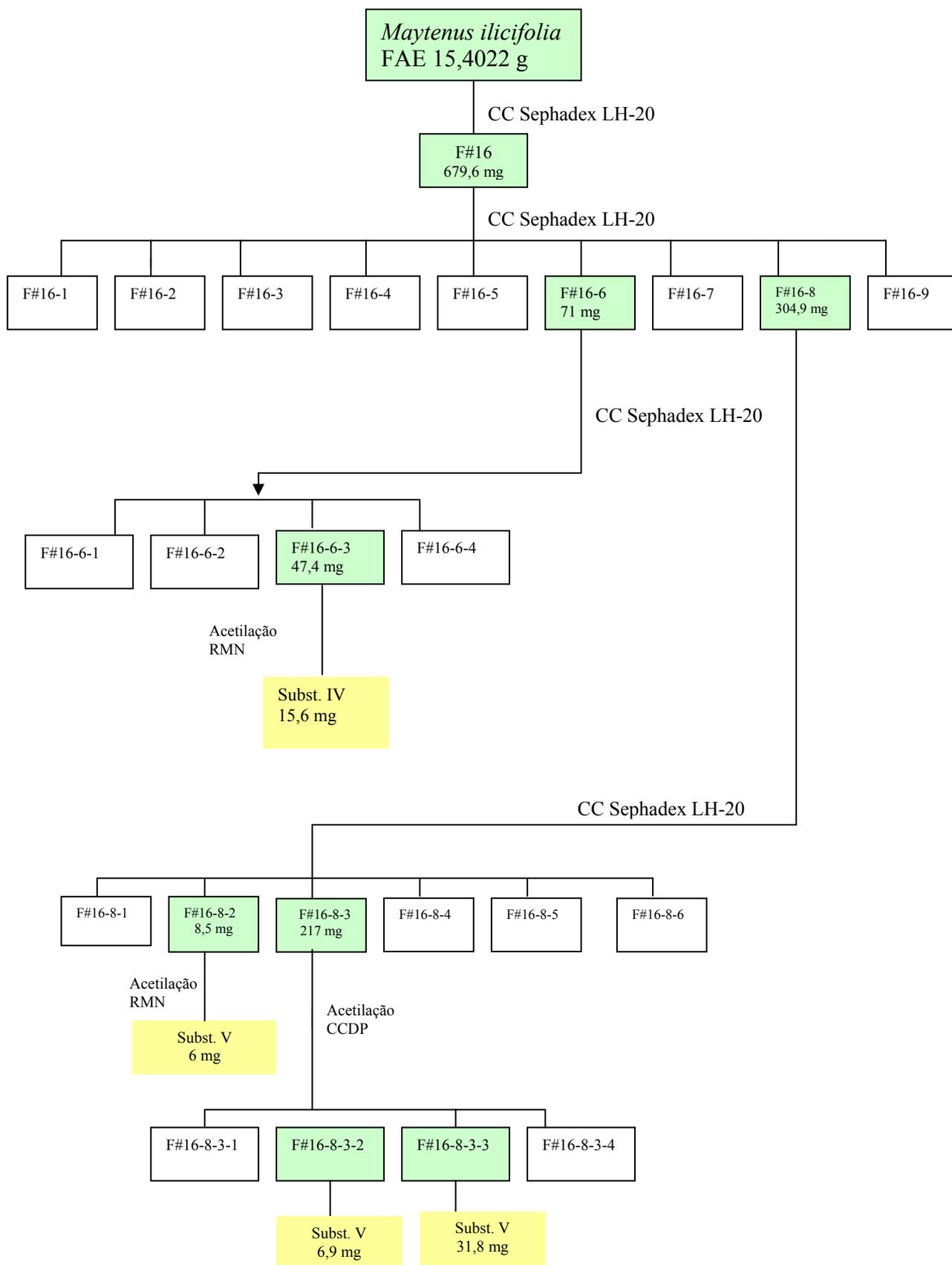
O fracionamento de F#16 resultou em nove novas subfrações semipurificadas que foram avaliadas por CCD.

A subfração F#16-6 foi refractionada em CC fornecendo quatro novas subfrações semipurificadas, sendo que, a subfração F#16-6-3 foi selecionada através de CCD, submetida à acetilação (seção 4.8), resultando no isolamento da substância IV.

A subfração F#16-8 foi refractionada em CC fornecendo seis novas subfrações semipurificadas que foram avaliadas por CCD.

A subfração F#16-8-2 foi submetida à acetilação (seção 4.8), resultando no isolamento da substância V.

A subfração F#16-8-3 foi submetida à acetilação (seção 4.8) e à CCDP (seção 4.7.4), resultando igualmente no isolamento da substância V.



Fluxograma 2 – Fracionamento cromatográfico e isolamento de substâncias da F#16.

5.3.1 Monômeros

5.3.1.1 Catequina - Substância I

A substância I encontrada na fração F#13-4-3, apresentou em CCD uma mancha de coloração azul intenso após revelação com FeCl_3 com $R_f = 0,8$. Isso forneceu indício característico de taninos condensados, de acordo com o sistema eluente empregado (seção 4.7.3). Em CCDP, a substância I forneceu valor de $R_f = 0,40$ (seção 4.7.4). No espectro de massas obteve-se o íon pseudo-molecular $[\text{M} + \text{Na}^+] = 523$ encontrando-se em concordância com substância tipo catequina/epicatequina ($m/z = 290$) derivatizada quimicamente.

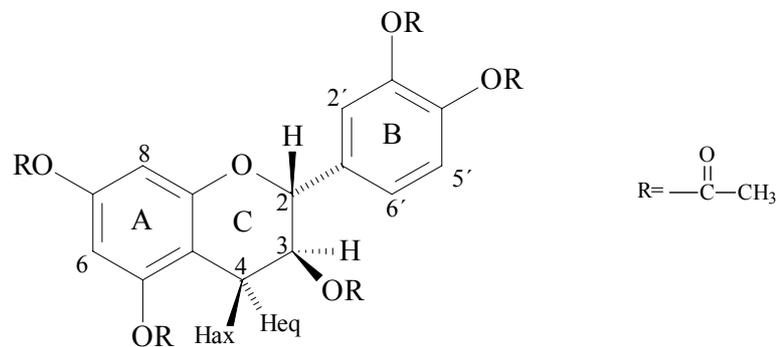


Figura 15 – Estrutura da substância I, catequina.

O espectro de RMN ^1H (Figura 16), da substância I derivatizada, mostra os hidrogênios alifáticos H-3 e H-2 com uma constante de acoplamento $J_{\text{H-2-H-3}}$ de 6,6 Hz, comprovando uma configuração relativa do tipo *2,3-trans* (WEINGES et al., 1969). O hidrogênio alifático H-3 apresenta uma constante de acoplamento com o hidrogênio H-4_{ax} no valor de 6,3 Hz, enquanto que o mesmo hidrogênio possui uma constante de acoplamento H-4_{eq} de 5,1 Hz. Portanto, pode-se afirmar que existe uma configuração relativa para a substância I do tipo *2,3-trans*, *3,4_{ax}-trans* e *3,4_{eq}-cis*. Entre δ 6,77 e 6,91 ppm aparecem sinais característicos de um sistema AMX correspondendo aos hidrogênios do anel B (H-2', H-5' e H-6'), comprovando, assim, a diidroxilação no anel. Nesse espectro observa-se, ainda, os hidrogênios H-6 e H-8 na região aromática em δ 5,88 e δ 6,03 ppm respectivamente. Os dados de deslocamento podem ser visualizados na tabela 3.

Tabela 3 – Deslocamento da substância I acetilada (300 MHz; CDCl₃ relativo para TMS).

CATEQUINA				
Hidrogênio	δ (ppm)	* δ Literatura (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
H-4ax (C)	2,66	2,66	<i>dd</i>	$J_{H-4ax-H-4eq} = 16,5$ $J_{H-4ax-H-3} = 6,3$
H-4eq (C)	2,86	2,87	<i>dd</i>	$J_{H-4ax-H-4eq} = 16,5$ $J_{H-4eq-H-3} = 5,1$
H-2 (C)	5,14	5,15	<i>d</i>	$J_{H-2-H-3} = 6,6$
H-3 (C)	5,25	5,26	<i>ddd</i>	$J_{H-3-H-2} = 6,6$ $J_{H-3-H-4eq} = 5,1$ $J_{H-3-H-4ax} = 6,3$
H-6 (A)	6,59	6,60	<i>d</i>	$J_{H-6-H-8} = 2,4$
H-8 (A)	6,65	6,66	<i>d</i>	$J_{H-8-H-6} = 2,4$
H-6' (B)	7,26	7,17 - 7,29	<i>dd**</i>	$J_{H-6'-H-5'} = 8,4$ $J_{H-6'-H-2'} = 1,8$
H-5' (B)	7,19		<i>d</i>	$J_{H-5'-H-6'} = 8,4$
H-2' (B)	7,17		<i>d</i>	$J_{H-2'-H-6'} = 1,8$

s = singlete; *m* = multiplete; *d* = duplete, *dd* = duplo-duplete; *ddd* = duplo duplo dublete; *dd*** = parcialmente encoberto pelo CDCl₃

* Danne (1994) substância não derivatizada

A estereoquímica absoluta foi realizada com auxílio da rotação ótica específica obtendo-se o valor de $[\alpha]_D^{20} = +3,0^\circ$ (acetona; *c* = 0,001). De acordo com Danne (1994), o valor obtido para a catequina foi de $[\alpha]_D^{20} = +18,9^\circ$ (acetona com a substância acetilada; *c* = 0,09). Pode-se concluir, assim, que a substância I, possui a configuração absoluta 2*R*,3*S*.

A partir das análises realizadas de CCD, espectro de massas, e dos dados espectroscópicos (Tabela 3 e Figura 16) e, quando comparados com os dados de literatura, pode-se afirmar que a substância I trata-se de **catequina**.

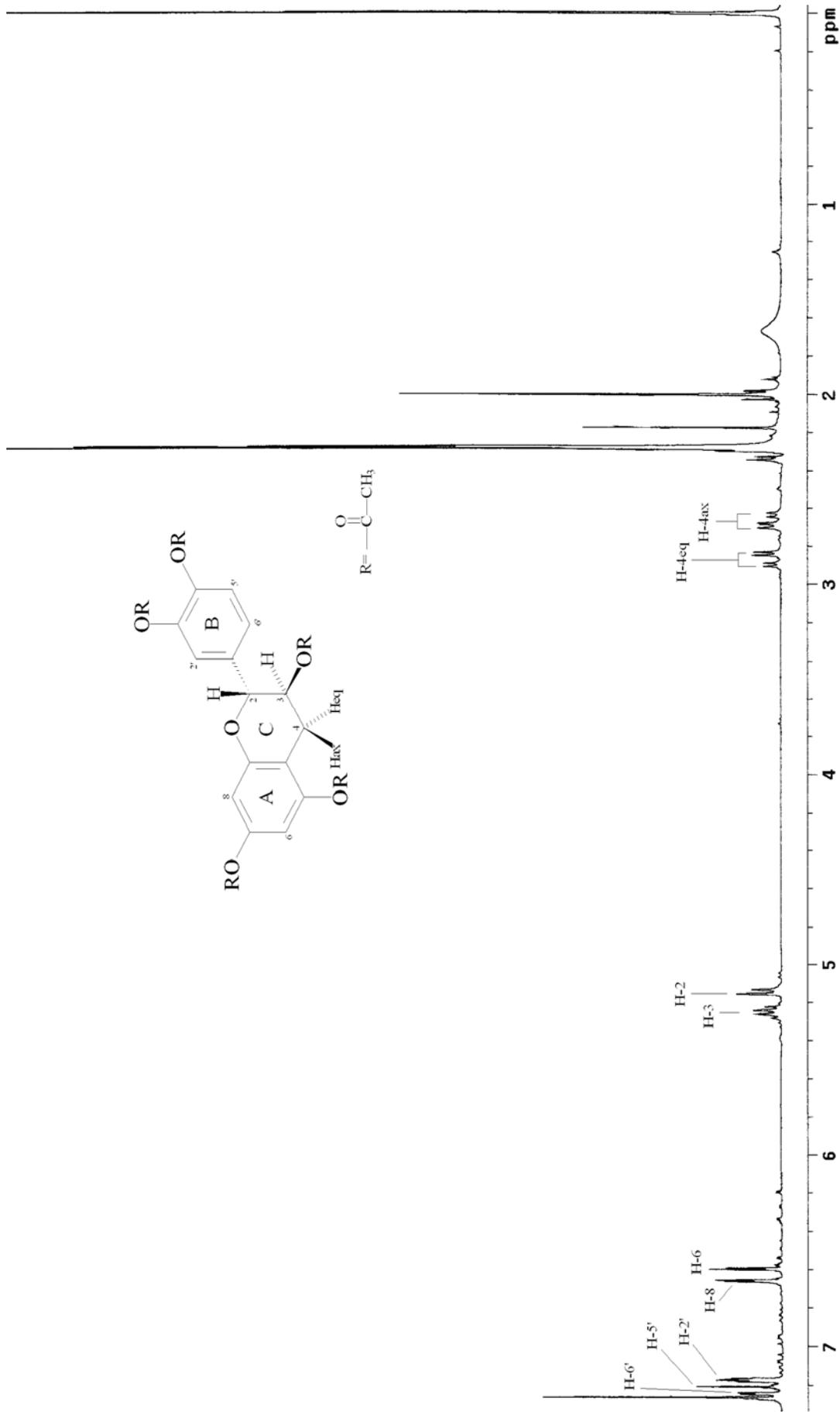


Figura 16 – Espectro de RMN ¹H de catequina peracetilada. (300 MHz; CDCl₃; relativo para TMS).

5.3.1.2 Epicatequina – Substância II

As frações F#10-4-4, F#10-4-5, F#11-10-4, F#12-4-1, F#13-2-2, F#13-3-1, F#14-2-1, F#15-2-1, considerando os espectros obtidos, resultaram todas na substância II. Optou-se por apresentar os dados da amostra F#13-3-1.

Em CCD, a substância apresentou uma mancha de coloração azul intenso após revelação com FeCl_3 com $R_f=0,62$. Isso forneceu indício característico de taninos condensados, de acordo com o sistema eluente empregado (seção 4.7.3). Em CCDF, a substância II forneceu valor de $R_f=0,26$ (seção 4.7.4).

O espectro de massas forneceu o íon pseudo-molecular $[M+\text{Na}^+]=523$ encontrando-se em concordância com substância tipo catequina/epicatequina ($m/z=500$) derivatizada quimicamente.

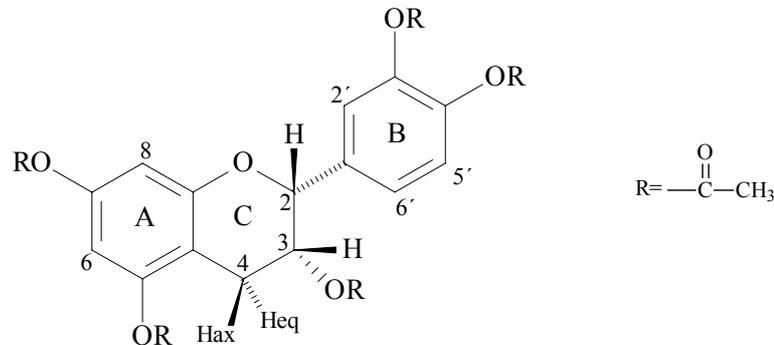


Figura 17 – Estrutura da substância II, epicatequina.

O espectro de RMN ^1H (Figura 18), da substância II derivatizada, mostra para os hidrogênios alifáticos H-3 e H-2 uma constante de acoplamento $J_{\text{H-2-H-3}}$ menor que 1 Hz comprovando uma configuração relativa do tipo 2,3-*cis* (WEINGES et al., 1969). O hidrogênio alifático H-3 apresenta uma constante de acoplamento pequena com o hidrogênio H-4_{ax} no valor de 2,1 Hz, enquanto que o mesmo hidrogênio possui uma constante de acoplamento com H-4_{eq} de 4,5 Hz. Portanto, observa-se uma configuração relativa para a substância II do tipo 2,3-*cis*, 3,4_{ax}-*cis* e 3,4_{eq}-*trans*. Para Weinges et al. (1969) a constante de acoplamento dos hidrogênios H-2 e H-3, com aproximadamente 8,0 Hz demonstra uma configuração relativa *trans*, e uma constante de acoplamento igual ou inferior a 1,0 Hz, a ordem *cis*. Entre δ 7,10 e 7,40 ppm aparecem sinais característicos de um sistema AMX correspondendo aos hidrogênios H-2', H-5' e H-6', comprovando a diidroxilação no anel B, como pode ser observado na tabela 4. Nesse espectro observa-se, ainda, os hidrogênios H-6 e H-8 na região aromática em δ 6,56 e δ 6,67 ppm, respectivamente.

Os dados de deslocamento estão demonstrados na tabela 4.

Tabela 4 – Deslocamentos da substância II (300 MHz; CD₃OD relativo para TMS).

EPICATEQUINA				
Hidrogênio	δ (ppm)	δ Literatura (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
H-4ax (C)	2,87	2,88	<i>dd</i>	$J_{H-4ax-H-4eq} = 17,7$ $J_{H-4ax-H-3} = 2,1$
H-4eq (C)	2,98	3,01	<i>dd</i>	$J_{H-4eq-H-4ax} = 17,7$ $J_{H-4eq-H-3} = 4,5$
H-2 (C)	5,10	5,12	<i>s</i>	$J_{H-2-H-3} < 1$ s
H-3 (C)	5,38	5,39	<i>m</i>	
H-6 (A)	6,56	6,57	<i>d</i>	$J_{H-6-H-8} = 2,1$
H-8 (A)	6,67	6,68	<i>d</i>	$J_{H-8-H-6} = 2,1$
H-5' (B)	7,20	7,22	<i>d</i>	$J_{H-5'-H-6'} = 8,4$
H-6' (B)	7,26	7,28	<i>dd</i>	$J_{H-6'-H-5'} = 8,4$ $J_{H-6'-H-2'} = 1,8$
H-2' (B)	7,35	7,36	<i>d</i>	$J_{H-2'-H-6'} = 1,8$

s = singleto; *m* = multipleteo; *d* = dupleteo, *dd* = duplo-dupleteo

* Danne (1994) substância não derivatizada

A estereoquímica absoluta da substância não derivatizada foi realizada com auxílio da rotação ótica específica obtendo-se o valor de $[\alpha]_D^{20} = -1,0^\circ$ (acetona; $c = 0,001$). De acordo com Danne (1994), o valor obtido para a epicatequina foi de $[\alpha]_D^{20} = -20,1^\circ$ (acetona com a substância acetilada; $c = 0,04$). Pode-se concluir, assim, que a substância II, possui a configuração absoluta *2R,3R*.

De acordo com as análises realizadas em CCD, espectro de massas, e dos dados espectroscópicos (Tabela 4 e Figura 18) e, quando comparados com os dados de literatura, confirma-se a substância II como sendo **epicatequina**.

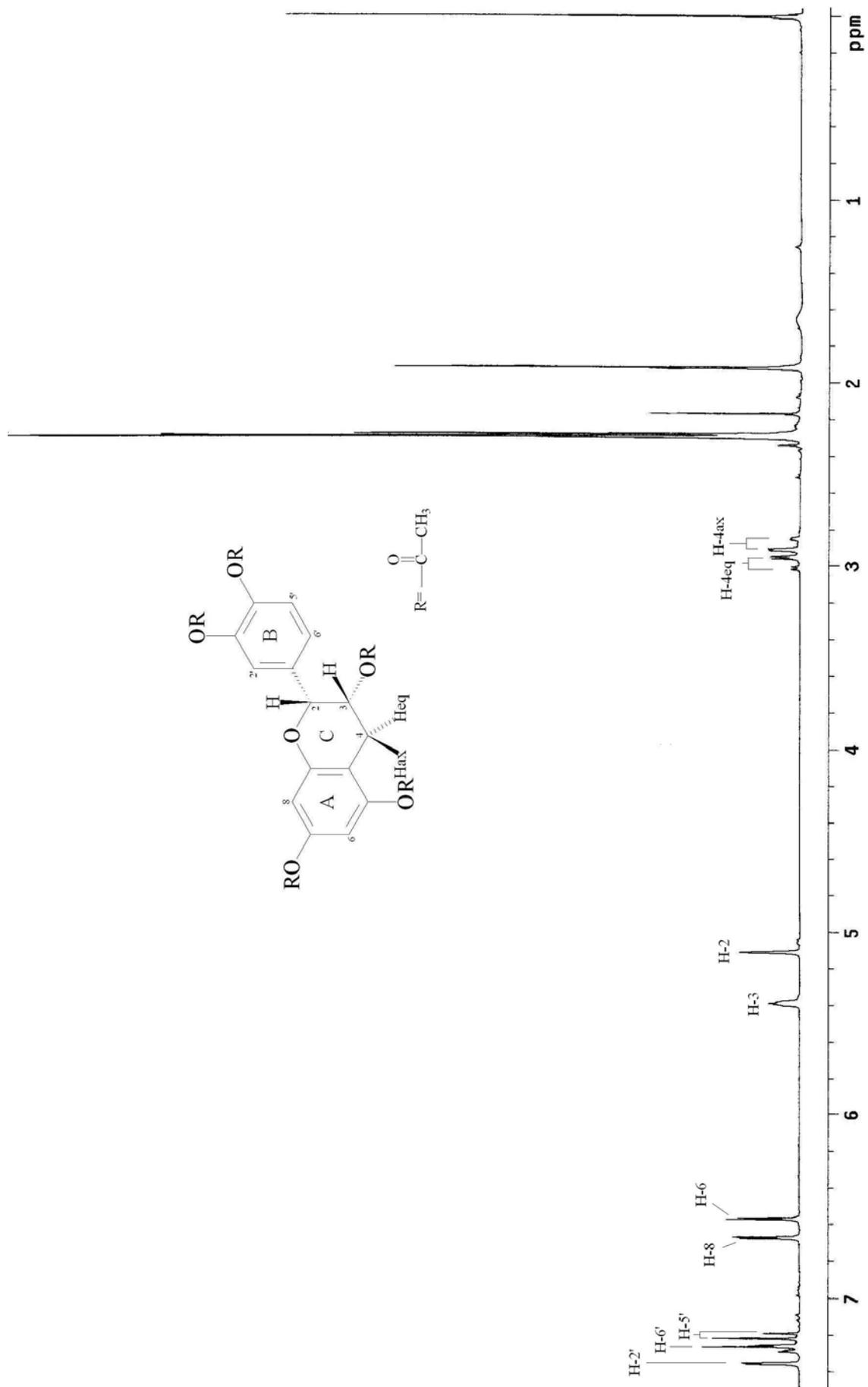


Figura 18 - Espectro de RMN ^1H de epicatequina peracetilada (300 MHz; CDCl_3 ; relativo para TMS).

5.3.1.3 Epigalocatequina – Substância III

A substância III encontrada na fração F#11-10-3, apresentou em CCD uma mancha de coloração azul intenso após revelação com FeCl_3 com $R_f=0,8$. Isso forneceu indício característico de taninos condensados, de acordo com o sistema eluente empregado (seção 4.7.3). Em CCDP, a substância III forneceu valor de $R_f = 0,40$ (seção 4.7.4).

O espectro de massas forneceu íon pseudo-molecular $[M+\text{Na}^+]=581$ em concordância com substância do tipo galocatequina/epigalocatequina peracetilada.

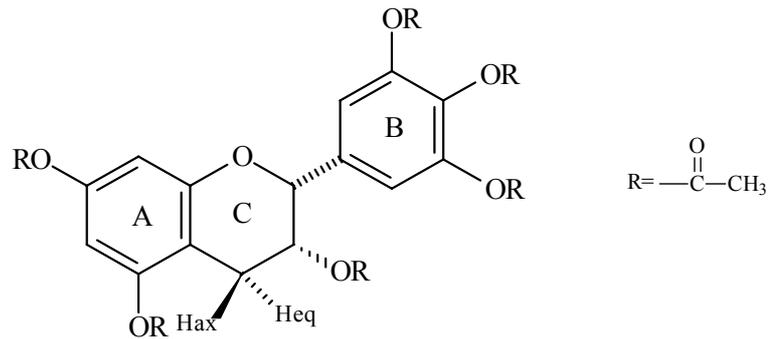


Figura 19 – Estrutura da substância III, epigalocatequina.

Os dados de deslocamentos encontram-se na tabela 5 e, na figura 20, o espectro de RMN ^1H , realizado em CDCl_3 . Não foi possível observar a diferenciação entre H-4_{ax} e H-4_{eq} , apresentando-se como multipletto entre $\delta 2,82 - 3,04$. A constante de acoplamento H-2 e H-3 foi pequena, não sendo possível calculá-la ($J \leq 1,0$ Hz). O pico referente a H-2(C) apresenta-se como um singletto largo e H-3(C) como um multipletto resultante do acoplamento com H-2 e H-4 (equatorial e axial). Segundo Weinges et al. (1969), a pequena constante de acoplamento entre H-2(C) e H-3(C), caracteriza a substância com uma configuração relativa do tipo 2,3-*cis*. A presença de um singletto em 7,22 ppm referente aos sinais de H-2'/H-6'(B), confirmam a triidroxilação do anel B.

Tabela 5 - Deslocamentos da substância III (300 MHz; CD₃OD relativo para TMS).

EPIGALOCATEQUINA				
Hidrogênio	δ(ppm)	δ^* Literatura (ppm)	Multiplicidade	<i>J</i> (Hz)
H-4ax/H-4eq	2,82-3,04	2,91 –2,93	<i>m</i>	-
H-3 (C)	5,38	5,37	<i>m</i>	-
H-2 (C)	5,08	5,06	<i>brs</i>	-
H-6 (A)*	6,57	6,55	<i>d</i>	$J_{H-6-H-8} = 2,1$
H-8 (A)*	6,67	6,65	<i>d</i>	$J_{H-8-H-6} = 2,1$
H-2'/H-6' (B)	7,22	7,21	<i>s</i>	-

s = singleto; *m* = multipleteo; *d* = dupleteo; *brs* = singleto largo

* Danne (1994) substância não derivatizada

A estereoquímica absoluta foi realizada com auxílio da rotação ótica específica observando-se valores de $[\alpha]_D^{20} = -1,0^\circ$ (acetona; *c* = 0,001). De acordo com Danne (1994), o valor obtido para a epigalocatequina foi de $[\alpha]_D^{20} = -16,6$ (acetona com a substância acetilada; *c* = 0,04). Pode-se concluir, assim, que a substância III, possui a configuração absoluta *2R,3R*.

De acordo com as análises realizadas em CCD, espectro de massas, e dos dados espectroscópicos (Tabela 5 e Figura 20) e, quando comparados com os dados de literatura, confirma-se a substância III como sendo **epigalocatequina**.

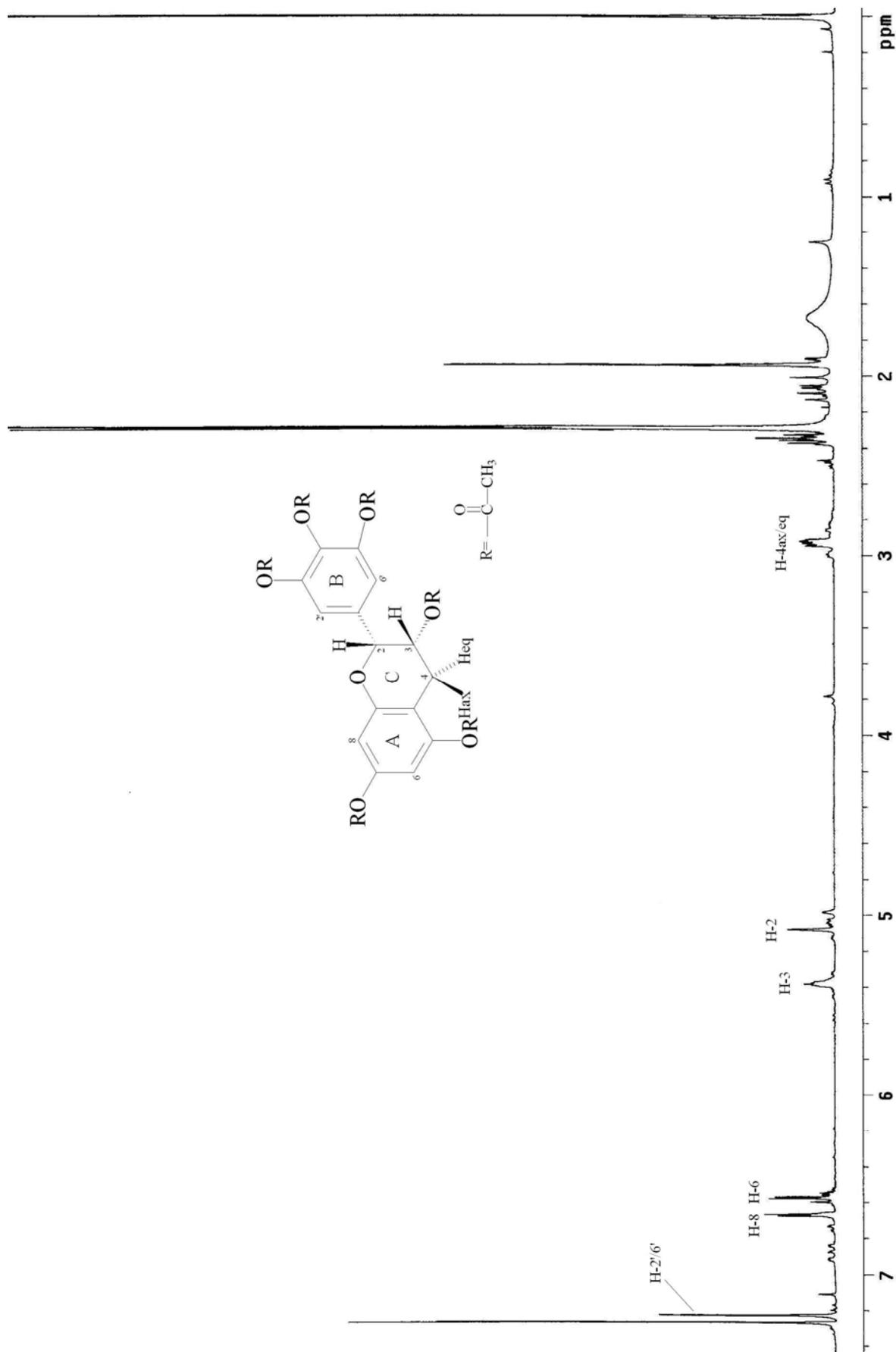


Figura 20 – Espectro de RMN ^1H de epigallocatequina peracetilada (300 MHz; CDCl_3 ; relativo para TMS).

5.3.2 Dímeros

Fletcher e colaboradores (1977) mostraram através de estudos de RMN de procianidinas peracetiladas que as ligações 4→6 e 4→8 encontram-se em duas conformações energéticas protegidas. Como critério de diferenciação para o tipo de ligação, os autores utilizaram a relação dos sinais dos rotâmeros. A ordem de grandeza das substâncias com ligações 4→6 é na proporção de 1:1, enquanto que das substâncias com ligações do tipo 4→8 existe uma conformação de rotâmeros dominante. A duplicidade dos sinais depende da rigorosidade da temperatura de medida e do tipo de solvente empregado (OUTTRUP; SHAUMBURG, 1981).

Outra forma de avaliar o tipo de ligação entre as unidades superior e inferior, foi relacionada por Hemingway, Foo e Porter (1982). Os autores correlacionaram os pares de procianidinas peracetiladas (B_1/B_7 e B_2/B_5) do sistema de spins AB dos hidrogênios do anel A das substâncias com ligações (4→6) como estando em campos mais baixos (desprotegido) (δ 6,7 ppm), enquanto os sinais da ligação análoga (4→8) em campos mais altos (δ 6,1 ppm). Entretanto esse critério de diferenciação, somente é válido para substâncias com uma configuração 4*R* (KOŁODZIEJ, 1992). Adicionalmente o hidrogênio H-2 de substâncias com ligação 4→8 apresentam-se com deslocamentos entre δ 4,37 e 5,01 ppm, enquanto substâncias ligadas 4→6, entre δ 5,04 e 5,35 ppm (HÖR; RIMPLER; HEINRICH, 1995)

Apesar de todos os indícios fornecidos pela interpretação do espectro de RMN ^1H , até a configuração absoluta deixa-se “transparecer” através do C-4(C) da ligação entre as unidades de interflavanóis, quando a unidade superior for do tipo catequina (2*R*,2*S*). Isso é devido a essa substância ter uma constante de acoplamento grande, pois fornece uma ordem pseudoequatorial. No entanto, quando a unidade superior for epicatequina, o C-4(C) apresentará sempre uma constante de acoplamento pequena e não poderá, nesse caso se afirmar a configuração absoluta, pois esse composto possibilita tanto uma configuração 4*R* (posição diequatorial do hidrogênio) como 4*S* (acoplamento axial-equatorial) (PETEREIT, 1992).

5.3.2.1 Epicatequina-(4 β →8)-catequina (Procianidina B₁) – Substância IV

A substância IV foi isolada da fração F#16-6-3, conforme mostrado na seção (5.3). Em CCD apresentou uma mancha de coloração azul intenso após revelação com FeCl₃ com R_f=0,79. Isso forneceu indicio característico de taninos condensados, de acordo com o sistema eluente empregado (seção 4.7.3).

O espectro de RMN ¹H em CDCl₃ (Figura 18) da amostra derivatizada mostra a presença de duas substâncias: epicatequina-(4 β →8)-epicatequina (*) e epicatequina-(4 β →8)-catequina (■). Apresentam-se na tabela 6 os dados de deslocamento químico de epicatequina-(4 β →8)-catequina.

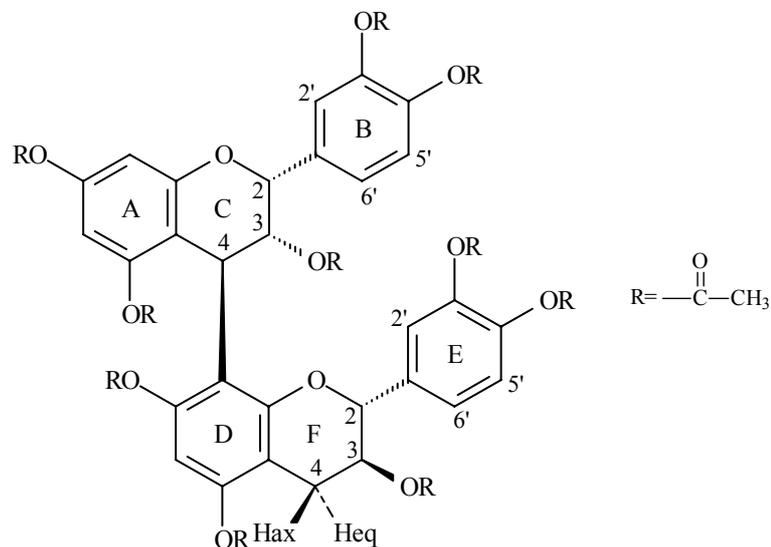


Figura 21 – Estrutura da substância IV, epicatequina-(4 β →8)-catequina.

O espectro de RMN ¹H da substância IV mostra dois sistemas AMX (anéis B e E) e sinais na região heterocíclica atribuídos aos anéis C e F, respectivamente. Os dois sistemas AMX mostraram sinais entre δ 6,85 e 7,43 ppm, sendo que, os sinais referem-se aos hidrogênios dos anéis B e E. O sistema ABMX do anel F compreende um duplo duplo em δ 5,04 ppm para H-3 e um duplete em δ 4,34 ppm para H-2.

A configuração 2,3-*trans* é confirmada pela constante de acoplamento entre estes dois hidrogênios com valor de 9,6 Hz. Dois duplos dubletos distintos podem ser verificados em δ 2,56 e 3,20 ppm com constantes de acoplamento de 16,5 e 9,3 Hz típico para H-4_{ax} e H-4_{eq}, respectivamente, justificando o restante do sistema do anel heterocíclico F. Assim, pode-se determinar a configuração relativa do tipo 3,4-*trans* para a unidade inferior. No anel C (unidade superior), observam-se dois sinais em δ 5,46 e 5,16 ppm referentes aos hidrogênios

H-2 e H-3. O sinal referente ao H-4(C) apresenta-se como um duplete em δ 4,41 ppm. O espectro de RMN ^1H mostra na região aromática a posição dos hidrogênios H-6(A), H-8(A) e H-6(D) em δ 5,99, δ 6,29 e δ 6,67 ppm, respectivamente, indicando, provavelmente, uma ligação (4 β →8) conforme as observações de Hemingway, Foo e Porter (1982), Danne (1994) e Mello (1995). De outra forma, a posição de ressonância do hidrogênio H-2(F) em δ 4,34 ppm sugere uma ligação (4 β →8) (KOLODZIEJ, 1992). Além destes dados, observa-se em todo o espectro de RMN ^1H uma dominância de rotâmeros, notadamente em δ 5,26 e 5,41 ppm referente aos sinais dos hidrogênios dos anéis heterocíclicos, entre outros, característico de ligação do tipo (4→8) (OUTTRUP; SCHAUMBURG, 1981). As correlações dos hidrogênios foram observadas no espectro de $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY em CDCl_3 (Figura 23).

A estereoquímica absoluta foi realizada com auxílio da rotação óptica específica obtendo-se valores de $[\alpha]_D^{20} = +8,0^\circ$ (acetona; $c = 0,001$).

Assim, de acordo com os dados obtidos e em comparação com a literatura, confirma-se a substância IV como sendo **epicatequina-(4 β →8)-catequina** ou também denominada de **procianidina B₁ (PB₁)**.

Tabela 6 – Deslocamentos da substância IV (300 MHz; CDCl₃ relativo para TMS).

EPICATEQUINA-(4β→8)-CATEQUINA				
Hidrogênio	δ (ppm)	* δ Literatura (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
H-4ax (F)	2,56	2,55	<i>dd</i>	$J_{H4ax-H4eq} = 16,5$ $J_{H4ax-H3} = 9,3$
H-4eq (F)	3,20	3,17	<i>dd</i>	$J_{H4eq-H4ax} = 16,5$ $J_{H4eq-H3} = 6,6$
H-4 (C)	4,41	4,43	<i>d</i>	$J_{H4-H3} = 1,8$
H-2 (F)	4,34	4,33	<i>d</i>	$J_{H2-H3} = 9,6$
H-3 (F)	5,04	5,04	<i>ddd</i>	$J_{H3-H2} = 9,6$ $J_{H3-H4ax} = 9,3$ $J_{H3-H4eq} = 6,6$
H-3 (C)	5,16	5,12	<i>m</i>	
H-2 (C)	5,46	5,46	<i>s</i>	$J_{H2-H3} < 1,0$
H-6 (A)	5,99	5,99	<i>d</i>	$J_{H6-H8} = 2,1$
H-8 (A)	6,29	6,27	<i>d</i>	$J_{H8-H6} = 2,1$
H-6 (D)	6,67	6,68	<i>s</i>	
H-2'/H-5/H-6' (B)	6,85 – 7,43	6,80 – 7,30	<i>m</i>	
H-2'/H-5'/H-6 (E)	6,85 – 7,43	6,80 – 7,30	<i>m</i>	

d = dupletto; *dd* = duplo dubleto; *ddd* = duplo duplo dubleto; *s* = singletto; *m* = multipletto

* Ueffing (1988).

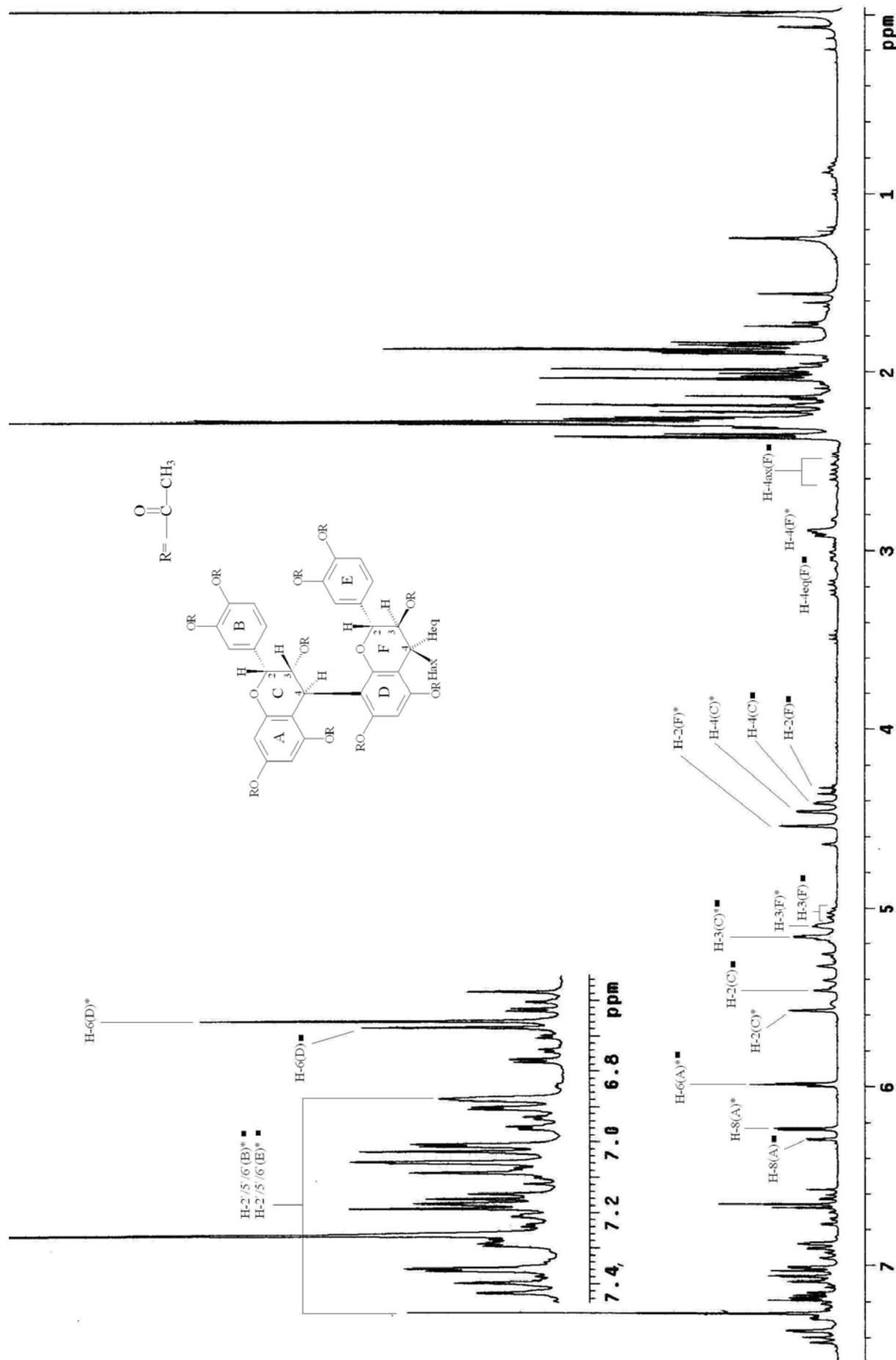


Figura 22- Espectro de RMN ^1H de epicatequina-(4 β →8)-catequina peracetilada (■) e epicatequina-(4 β →8)-epicatequina peracetilada (*). (300 MHz; CDCl_3 ; relativo para TMS).

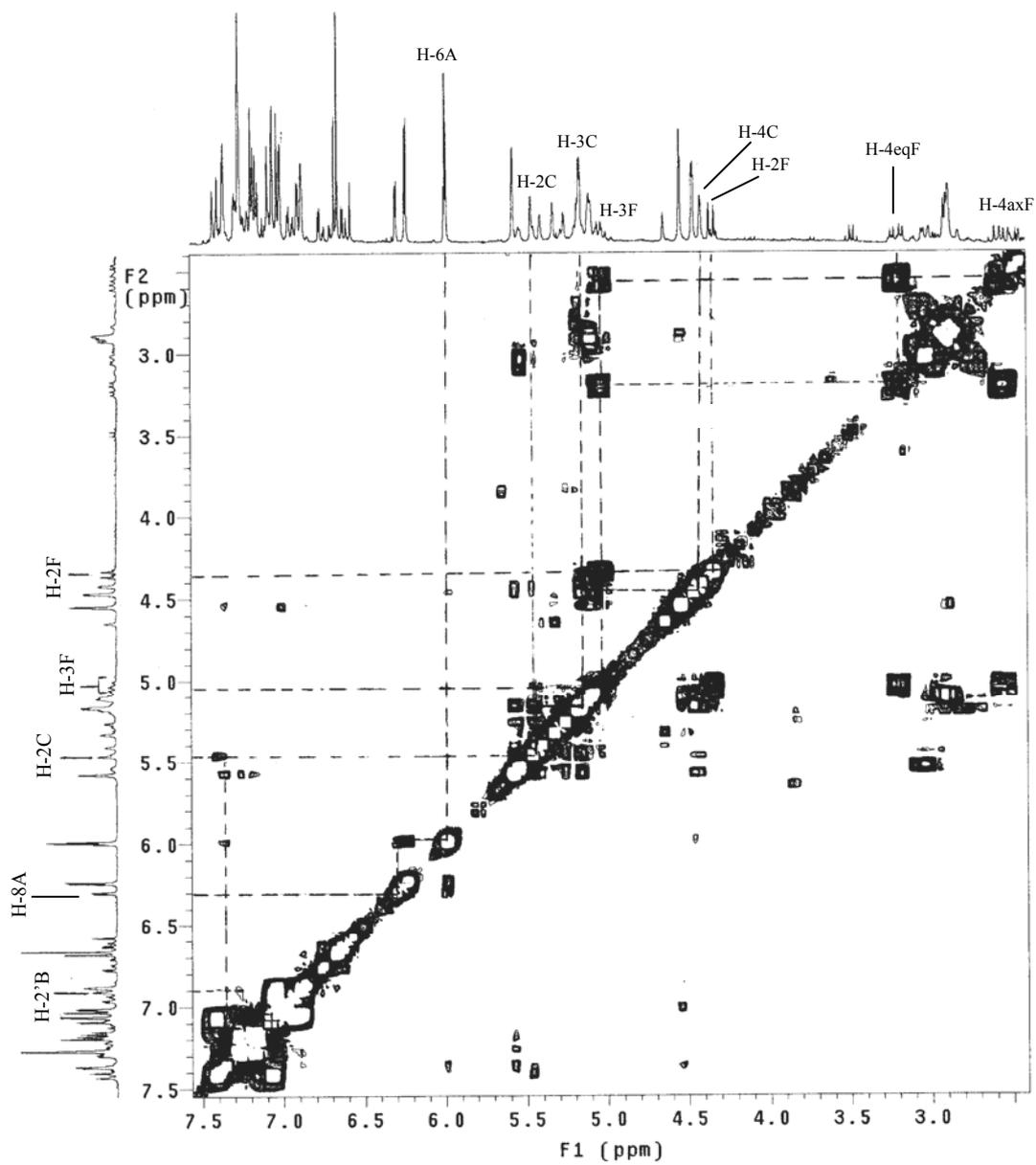


Figura 23 - Espectro de COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ de epicatequina-(4 β →8)-catequina (300 MHz; CDCl_3).

5.3.2.2 Epicatequina-(4 β →8)-epicatequina (Procianidina B₂) – Substância V

A substância V foi isolada da fração F#16-8-2 e F#16-8-3, conforme mostrado na seção (5.3). Optou-se por apresentar os dados de F#16-8-2. Em CCD a substância apresentou uma mancha de coloração azul intenso após revelação com FeCl₃ com R_f=0,82. Isso forneceu indício característico de taninos condensados, de acordo com o sistema eluente empregado (seção 4.7.3)

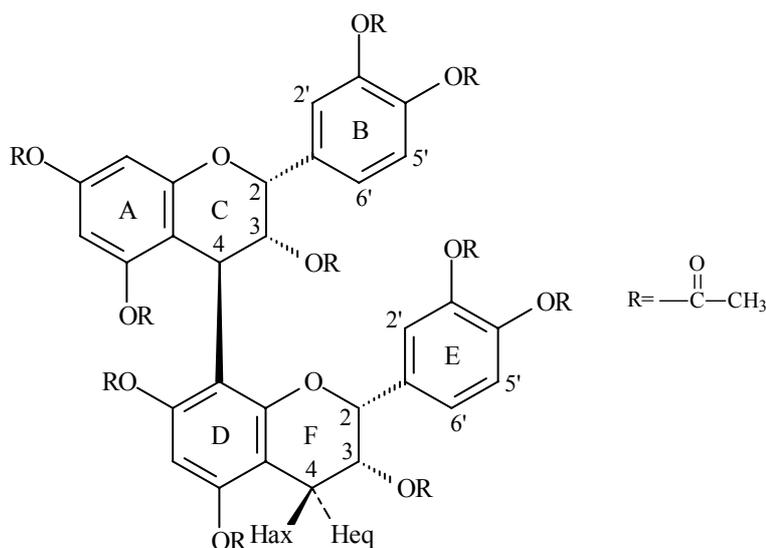


Figura 24 – Estrutura da substância V, epicatequina-(4 β →8)-epicatequina.

O espectro de RMN ¹H em CDCl₃ da substância V (Figura 25) mostra dois sistemas AMX (anéis B e E) e sinais na região heterocíclica atribuídos aos anéis C e F, respectivamente. Os dois sistemas AMX mostraram sinais entre δ 6,60 e 7,44 ppm com diferentes constantes de acoplamento e os sinais referem-se aos hidrogênios dos anéis B e E (H-2', H-5' e H-6'). O sistema ABMX no anel F compreende um multipeto em δ 5,10 ppm para H-3 e um singlete largo em δ 4,54 ppm para H-2. A configuração 2,3-*cis* é confirmada pela constante de acoplamento entre estes dois hidrogênios com valor inferior a 1,0 Hz. Não foi possível a diferenciação entre H-4ax e H-4eq do anel F, apresentando-se com um multipeto entre δ 2,90 – 2,94 ppm. Assim, pode-se determinar a configuração relativa do tipo 3,4-*cis* para a unidade inferior. O sistema relativo ao anel C (unidade superior), demonstrou dois sinais em δ 5,57 e 5,16 ppm referentes aos hidrogênios H-2(C) e H-3(C) como singlete e multipeto, respectivamente. O sinal referente ao H-4 (C) apresenta-se como um dubleto em δ 4,46 ppm com uma constante de acoplamento entre H-4 e H-3 no anel C igual a 1,8 Hz. Desta

forma é possível estabelecer a configuração relativa do anel heterocíclico C como sendo do tipo 2,3-*cis*-3,4-*cis*. O espectro de RMN ^1H mostra na região aromática a posição dos hidrogênios H-6(A), H-8(A) e H-6(D) em δ 5,98, 6,23 e 6,65 ppm, respectivamente, indicando, provavelmente, uma ligação (4 β →8) conforme as observações de Hemingway, Foo e Porter (1982), Danne (1994) e Mello (1995). Somando-se a isto, a posição de ressonância do hidrogênio H-2 (F) em δ 4,64 ppm sugere uma ligação (4 β →8) (KOLODZIEJ, 1992). Além destes dados, observa-se em todo o espectro de RMN ^1H uma dominância de rotâmeros, notadamente em δ 5,26 e 5,47 ppm referente aos sinais dos hidrogênios dos anéis heterocíclicos, entre outros, característico de ligação do tipo (4→8) (OUTTRUP; SCHAUMBURG, 1981). As correlações dos hidrogênios foram observadas no espectro de $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY em CDCl_3 (Figura 26).

A estereoquímica absoluta foi realizada com auxílio da rotação ótica específica observando-se valores de $[\alpha]_D^{20} = +6,0^\circ$ (acetona; $c = 0,001$).

Assim, de acordo com os dados obtidos e em comparação com a literatura, confirma-se a substância V como sendo **epicatequina-(4 β →8)-epicatequina**, ou também denominada de **procianidina B₂ (PB₂)**.

Tabela 7 – Deslocamentos da substância V (300 MHz; CDCl₃ relativo para TMS).

EPICATEQUINA-(4β→8)-EPICATEQUINA				
Hidrogênio	δ (ppm)	* δ Literatura (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
H-4 (F)	2X 2,90 -2,94	2 X 2,90- 2,95	<i>m</i>	
H-4 (C)	4,46	4,47	<i>d</i>	$J_{H4(C)-H3(C)} = 1,8$
H-2 (F)	4,54	4,54	<i>s</i>	
H-3 (F)	5,10	5,09	<i>m</i>	
H-3 (C)	5,16	5,15	<i>m</i>	
H-2 (C)	5,57	5,56	<i>s</i>	
H-6 (A)	5,98	5,99	<i>d</i>	$J_{H6-H8} = 2,4$
H-8 (A)	6,23	6,19	<i>d</i>	$J_{H8-H6} = 2,4$
H-6 (D)	6,65	6,63	<i>s</i>	
H-6' (E)	6,89	6,80-7,30	<i>dd</i>	$J_{H6'-H2'} = 1,8$ $J_{H6'-H5'} = 8,4$
H-2' (E)	7,01	6,90-7,41	<i>d</i>	$J_{H2'-H6'} = 1,8$
H-5' (E)	7,04	6,90-7,41	<i>d</i>	$J_{H5'-H6'} = 8,4$
H-5' (B)	7,17	6,90-7,41	<i>d</i>	$J_{H5'-H6'} = 8,4$
H-6' (B)	7,28	6,90-7,41	<i>dd</i>	$J_{H6'-H5'} = 8,4$ $J_{H6'-H2'} = 1,8$
H-2' (B)	7,36	6,90-7,41	<i>d</i>	$J_{H2'-H6'} = 1,8$

* Ueffing (1988)

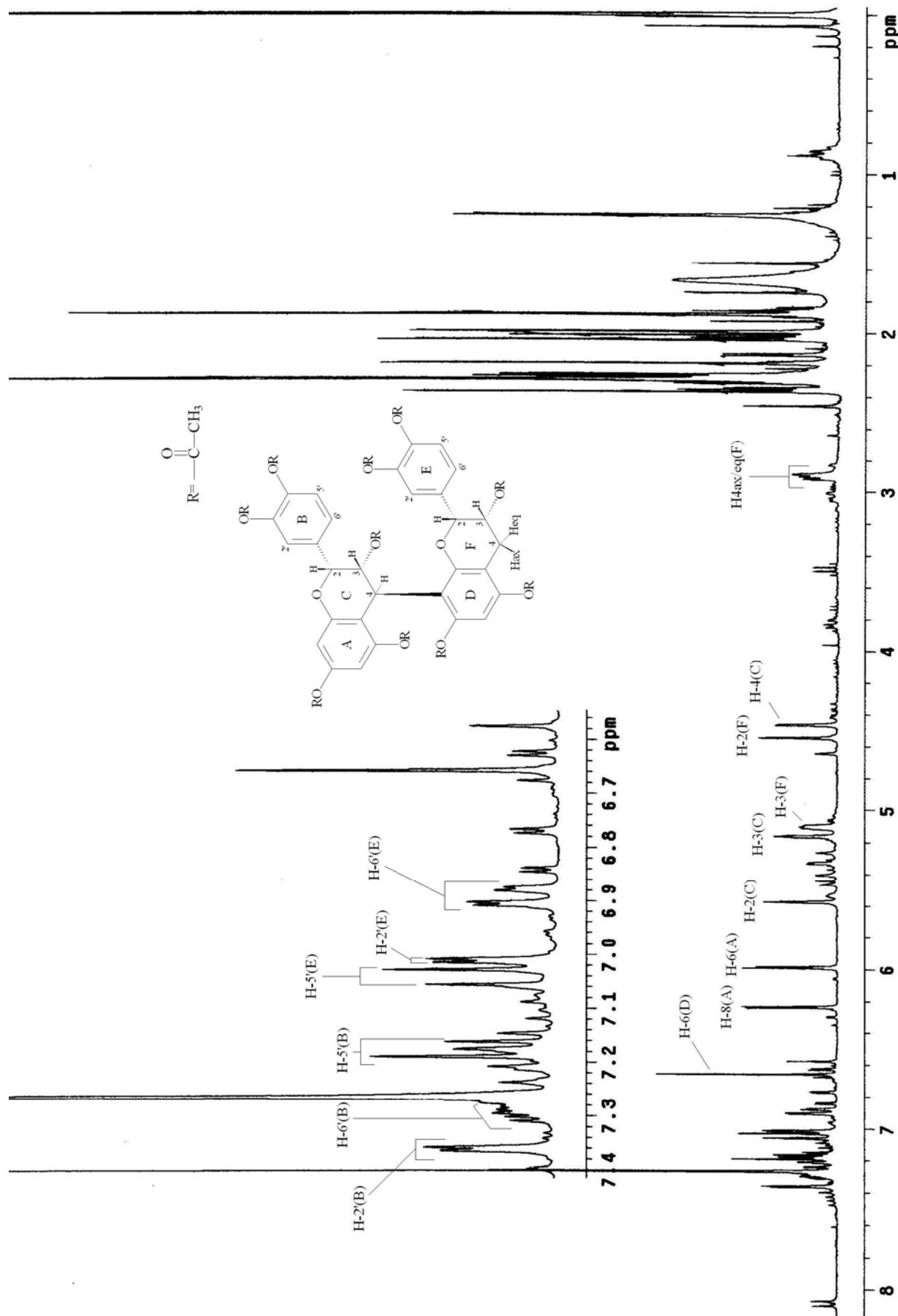


Figura 25 – Espectro de RMN ^1H de epicatequina-(4 β →8)-epicatequina peracetilada (300 MHz; CDCl_3 ; relativo para TMS).

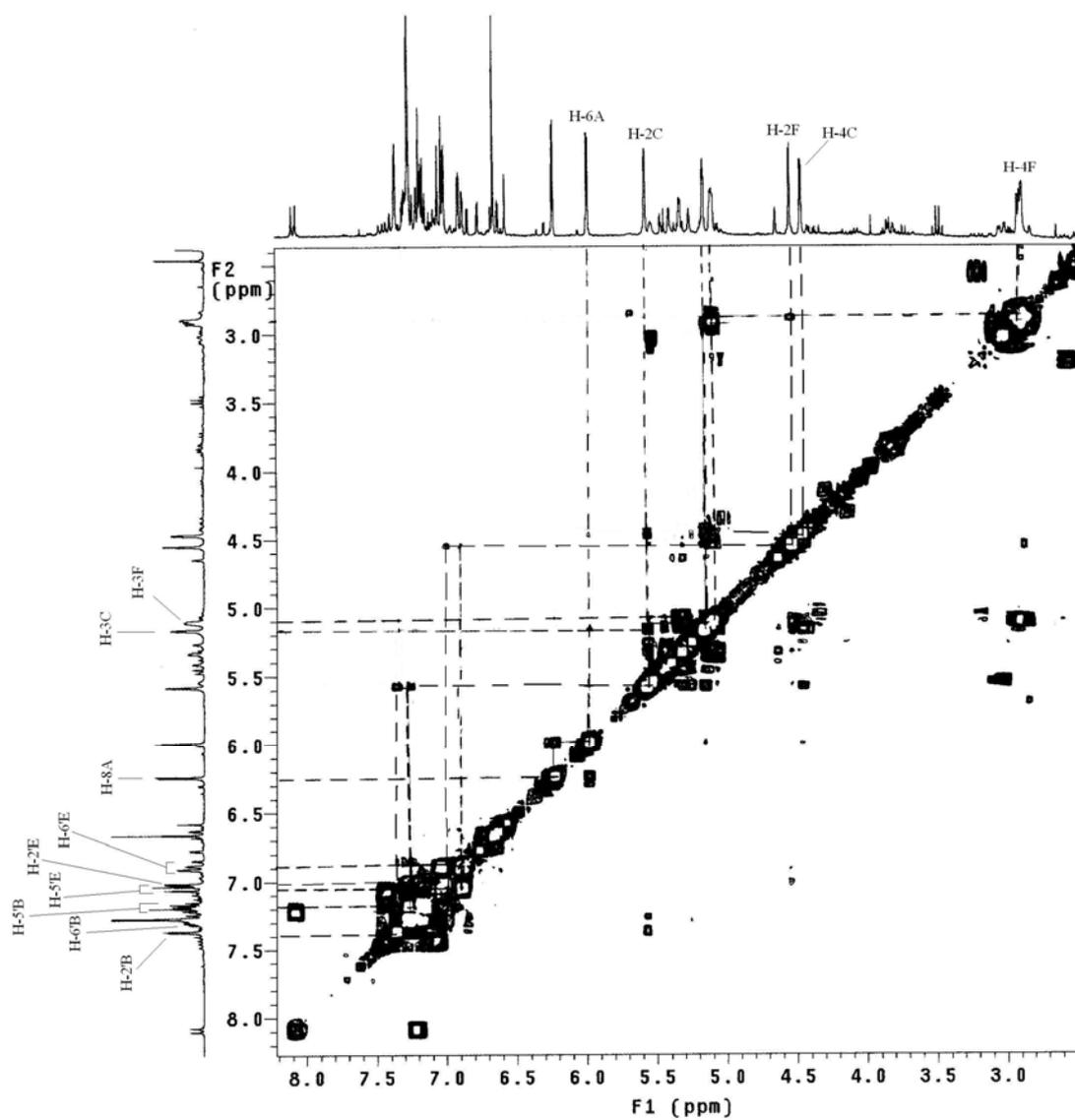


Figura 26 - Espectro de COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ de epicatequina-(4 β →8)-epicatequina (300 MHz; CDCl_3).

5.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Devido ao grande interesse voltado ao papel das espécies reativas de oxigênio (EROs) na etiologia de várias doenças tais como: câncer, inflamação, aterosclerose, esclerose múltipla entre outras, intensificou-se a busca por substâncias antioxidantes, ou seja, capazes de interferir tanto na etapa de iniciação como na de propagação do processo oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1986).

Os processos oxidativos podem ser evitados através da modificação das condições ambientais ou pela utilização de substâncias antioxidantes com a propriedade de impedir ou diminuir o desencadeamento das reações oxidativas (ALLEN; HAMILTON, 1983)

O processo de envelhecimento humano parece estar relacionado com acúmulo de radicais livres unido a uma diminuição gradual da capacidade de reparação celular. (HARMAN, 1983; PRYOR, 1987; SHIGENAGA; HAGEN; AMES, 1994 apud JESUS TUÑÓN; JIMÉNEZ, 2002). Esta idéia deu origem a “teoria dos radicais livres do envelhecimento” que propõe que o acúmulo dos efeitos prejudiciais de EROs em diversos tecidos conduzem às alterações associadas com a idade, tanto em nível celular como orgânico (HARMAN, 1956 apud JESUS TUÑÓN; JIMÉNEZ, 2002), sendo esta a hipótese mais aceita na atualidade.

O uso de antioxidantes parece retardar e/ou diminuir este processo assim como, há evidências experimentais que reforçam a idéia de que o uso de antioxidantes teriam eficácia terapêutica em enfermidades neurodegenerativas, câncer, transtornos cardiovasculares, doenças que apresentam uma maior incidência na senilidade (JESUS TUÑÓN; JIMÉNEZ, 2002).

Neste contexto, grande importância tem sido dada aos antioxidantes naturais, principalmente aos compostos fenólicos que, segundo Shahidi, Janitha e Wanasundara (1992), funcionam como seqüestradores de radicais livres e algumas vezes como quelantes de metais. De acordo com Oliveira et al. (2002) os compostos fenólicos atuam como inibidores de enzimas relacionadas ao processo de produção das EROs. Sendo assim, é de especial interesse a averiguação dessa propriedade dos compostos fenólicos e a confirmação destes como moduladores do processo oxidativo.

5.4.1 Atividade antioxidante demonstrada pela redução do DPPH•

A atividade antioxidante das amostras de *Maytenus ilicifolia* foram medidas em termos de doação de hidrogênio ou habilidade seqüestradora de radicais livres, usando um radical estável livre de coloração roxa que é reduzido a difenil-picrilhidrazina de coloração

amarela (BRACA et al., 2002). O método é baseado na redução da solução alcoólica do radical DPPH na presença de um antioxidante doador de hidrogênio. A solução do radical DPPH mostra uma forte absorção na banda 517 nm apresentando uma cor violeta profunda (AMAROWICZ et al., 2004).

Foram testados o extrato bruto (EB), fração aquosa (FA), fração acetato de etila (FAE) e substâncias isoladas de acordo com Amarowicz et al. (2004). Para as substâncias isoladas utilizaram-se de concentrações mais baixas, considerando as pequenas concentrações obtidas destas substâncias ao final da análise química e de acordo com a técnica proposta por Lee et al. (2005). Os resultados foram expressos como valores de IC₅₀, e que representam a quantidade de antioxidante necessária (Tabelas 8 e 9, respectivamente) para diminuir em 50% a concentração inicial do radical DPPH. A vitamina C foi utilizada como padrão e a substância galocatequina utilizada para os testes, não foi isolada de *M. ilicifolia*; foi utilizada uma amostra padrão pertencente ao laboratório.

Tabela 8 - Atividade antioxidante demonstrada pela redução do radical DPPH.

Amostra	IC ₅₀ (µg/ml) $\bar{x} \pm dp$	CV%
Extrato Bruto (EB)	35,34 ± 0,35	0,98
Fase aquosa (FA)	47,314 ± 0,19	0,40
Fase acetato (FAE)	25,395 ± 1,04	4,07
Vitamina C	7,18 ± 0,26	3,56

*ANOVA, estatisticamente significativa p < 0,01

Tabela 9 - Atividade antioxidante demonstrada pela redução do radical DPPH para substâncias isoladas em termos de IC₅₀.

Substância	Amostra	IC ₅₀ (µg/ml) $\bar{x} \pm dp$	CV%
1	catequina	2,885 ± 0,16	8,72
2	epicatequina	1,490 ± 0,25	16,79
3	epigalocatequina	2,624 ± 0,85	32,27
4	galocatequina	4,673 ± 0,85	18,12
5	epicatequina-(4β→8)-catequina	1,90 ± 0,72	26,79
6	epicatequina-(4β→8)-epicatequina	2,24 ± 0,29	13

*ANOVA, estatisticamente significativa p < 0,01

Os resultados demonstraram que EB, FA, FAE e substâncias isoladas possuem atividade antioxidante significativa, sendo que, as substâncias isoladas apresentaram resultados superiores quando comparados ao padrão vitamina C.

A atividade antioxidante de taninos tem sido reportada nos trabalhos de Soares (2002), Hatano et al. (2002), Nakagawa e Yokozawa (2002) e Negro, Tommasi e Miceli (2003).

Os resultados obtidos demonstraram o perfil antioxidante dos taninos condensados presentes na fração acetato de etila de *M. ilicifolia*, sendo necessário estudos complementares para definição da relação existente entre estrutura química e atividade antioxidante de taninos.

5.4.2 Atividade antioxidante demonstrada pelo método do fosfomolibdato

A atividade antioxidante foi avaliada pelo método de redução do Mo(VI) para Mo(V) pela ação do agente antioxidante pesquisado, o qual resulta na formação de um complexo verde fosfato/Mo (V) em pH ácido.

Embora a formação do complexo verde ocorra à temperatura ambiente, esta reação demonstra uma dependência positiva da temperatura, ou seja, possui uma produção significativa em altas temperaturas (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999).

Quanto mais redutor for o agente testado, maior a absorvância da amostra e mais evidente é a coloração verde do complexo formado (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999).

Os resultados obtidos para as frações estão presentes na tabela 10.

Tabela 10 - Atividade antioxidante demonstrada pela redução do molibdênio - Mo(VI) com diferentes extratos de *M. ilicifolia*.

Amostra	%F	
	$\bar{x} \pm dp$	CV%
EB	0,30 ± 0,09	2,93
FA	0,15 ± 0,01	4,95
FAE	0,70 ± 0,03*	4,40
Vitamina C	1*	—

*ANOVA, estatisticamente significante $p < 0,01$

Nota-se que a fração acetato de etila apresentou maior atividade, com valor próximo ao valor de referência (vitamina C).

A avaliação de redução do complexo fosfomolibdênio é considerada simples, de baixo custo e muito utilizada para comparar a capacidade antioxidante de uma série de extratos (HIRATA, 2004).

As substâncias isoladas não foram submetidas a este teste por não constar na literatura pesquisada uma concentração adequada. Houve uma tentativa de fixar a concentração máxima, usada na técnica de redução do radical DPPH, de 14,5 µg/ml (50 µM) porém não teve efeito algum quando aplicada às substâncias isoladas.

5.4.3 Determinação da atividade antioxidante por TBARS

O estudo da oxidação dos fosfolipídios dos sistemas biológicos e da ação antioxidante de determinados compostos são ordinariamente realizados através do teste TBARS ou da avaliação do consumo de oxigênio (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

Este método baseia-se na reação de formação de um complexo rosa resultante da interação do malonaldeído, um dos principais metabólitos das reações oxidativas, com o ácido tiobarbitúrico, procedendo-se a medida da absorvância em espectrofotômetro.

Lipídios de gema de ovo sofrem rápida peroxidação não-enzimática quando incubado na presença de sulfato ferroso, entretanto na presença de uma amostra com atividade antioxidante ocorre inibição da peroxidação impedindo, assim, a formação do metabólito malonaldeído e conseqüente formação do complexo malonaldeído-TBA.

Este teste foi aplicado apenas à fase acetato de etila de *M. ilicifolia*, devido às dificuldades na padronização da técnica e obtenção de resultados para EB e FA incompatíveis com o esperado.

Os resultados obtidos em relação à inibição da peroxidação lipídica pela fração acetato de etila de *M. ilicifolia* estão apresentados na tabela 11 e figura 27.

Tabela 11 - Avaliação da atividade antioxidante da fração acetato de etila pelo ácido tiobarbitúrico.

Concentração (mg/ml)	% AI $\bar{x} \pm dp$	CV%
1	80,44 ± 0,17	0,22
0,8	81,21 ± 2,10	2,59
0,6	76,37 ± 2,45	3,23
0,3	73,05 ± 2,55	3,48
0,1	50,83 ± 4,90	9,65

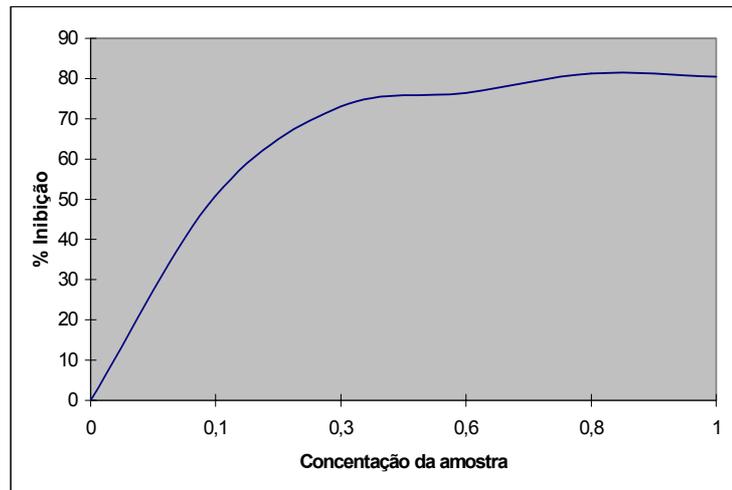


Figura 27 - Inibição da peroxidação lipídica da fração acetato de etila pelo método do ácido tiobarbitúrico

Os resultados obtidos atestam que, a fração acetato de etila apresenta atividade inibitória da peroxidação lipídica significativa em concentrações iguais a 0,3 mg/ml e máxima em concentração igual à 0,8 mg/ml,

Existem muitas variáveis no que concerne à reação de lipoperoxidação lipídica, de forma que é possível afirmar que o emprego de antioxidantes em formulações é muitas vezes empírico (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999). A associação de várias técnicas na avaliação de determinado composto com possível capacidade antioxidante oferece maior segurança em relação aos resultados obtidos do que por uma única análise.

Os métodos utilizados neste trabalho para avaliação do potencial antioxidante de extrato de folhas de *M. ilicifolia*, sendo eles DPPH•, fosfomolibdato e TBARS apontaram resultados concordantes entre si, sendo possível afirmar que FAE apresenta significativa capacidade antioxidante em comparação aos extratos EB e FA, devido possivelmente ao seu conteúdo em compostos fenólicos, ou seja, à significativa quantidade de epicatequina e demais taninos condensados isolados.

Considerando a complexidade das reações envolvendo a lipoperoxidação em sistemas biológicos e a atuação de antioxidantes nestes sistemas (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999), processo este ainda pouco esclarecido, sugere-se novos estudos a fim de comprovar a eficácia de FAE de *M. ilicifolia* como potencial antioxidante na produção de medicamentos.

6 CONCLUSÕES

- O controle de qualidade permitiu traçar um perfil da droga vegetal, visando manter um padrão de reprodutibilidade, sendo compatível com a literatura.
- O estudo fitoquímico do extrato semipurificado das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss.(Celastraceae) demonstrou que as formas de extração e fracionamento utilizadas foram adequadas ao isolamento de taninos condensados.
- Foram isoladas e identificadas 5 substâncias, contribuindo ao estudo fitoquímico da espécie: catequina, epicatequina, epigalocatequina, epicatequina-(4 β →8)-catequina (procianidina B₁) e epicatequina-(4 β →8)-epicatequina (procianidina B₂), sendo as três últimas inéditas nesta espécie vegetal.
- Na avaliação da capacidade antioxidante por redução do DPPH•, os extratos bruto, fração aquosa e fração acetato de etila apresentaram capacidade antioxidante sendo que, a fração acetato de etila se mostrou com melhor capacidade em relação aos demais extratos, porém inferior ao padrão vitamina C.
- As substâncias isoladas apresentaram atividade antioxidante significativa no método do seqüestro do radical DPPH, sendo que monômeros apresentaram atividade antioxidante superior aos dímeros, e notadamente superiores ao padrão vitamina C.
- Os resultados obtidos nos testes do fosfomolibdato e ácido tiobarbitúrico confirmam a capacidade antioxidante da fração acetato de etila. Os diferentes testes realizados para avaliação da capacidade antioxidante dos EB, FA e FAE apresentaram resultados coerentes entre si, atestando uma maior capacidade antioxidante frente aos testes realizados para a FAE, devido possivelmente ao seu conteúdo em compostos fenólicos, haja vista a quantidade significativa de epicatequina isolada das frações estudadas, além dos demais taninos condensados isolados.

- Os resultados corroboram para a utilização das substâncias polifenólicas provenientes de *Maytenus ilicifolia* como potenciais substâncias antioxidantes.

REFERÊNCIAS

- AERTS, R. J.; BARRY, T. N.; MCNABB, W. C. Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. **Agric. Ecosyst. Environ.**, Amsterdam, v. 75, p. 1-12, 1999.
- AHMED, M. S.; FONG, H. H. .; SOEJARTO, D. D.; DOBBERSTEIN, R. H.; WALLER, D. P. High-performance liquid chromatographic separation and quantitation of maytansinoids in *Maytenus ilicifolia*. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 213, p. 340-344, 1981.
- ALLEN, J. C.; HAMILTON, R. J. **Rancidity in foods**. London: Applied Science, 1983. p.199.
- AMAROWICZ, R.; PEGG, R. B.; RAHIMI-MORGHADDAM, P.; BARL, B.; WEIL, J. A.; Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. **Food Chem.**, Amsterdam, v. 84, p. 551-562, 2004.
- ANDRADE, L. **Estudo da metodologia de análise da droga vegetal guaraná**. 1996. 106 f. Dissertação (Mestrado)–Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1996.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; MACDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst.**, Cambridge, v. 127, p. 183-198, 2002.
- BAGOZZI, D. Traditional medicine. **World Health Organization Fact sheet**, Genebra, no. 134. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>>. Acesso em: 14 mar. 2005.
- BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L.; COSTA, C. G.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, H. C. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: Imprensa Universitária, 1984. v. 2.
- BATE-SMITH, E. C. Haemanalysis of tannins: the concept of relative astringency. **Phytochemistry**, Oxford, v. 12, p. 907-12, 1973.
- BATE-SMITH, E. C.; SWAIN, T. **Comparative biochemistry**. New York: Academic Press, 1962. v. 3, p. 764.
- BENNIE, L.; COETZEE, J.; MALAN, E.; FERREIRA, D. Structure and stereochemistry of dimeric proteracacinidins possessing the rare C-4(C) → C5(D) interflavanyl linkage. **Phytochemistry**, Oxford, v. 59, p. 673-8, 2002.
- BORS, W.; HELLER, W.; MICHEL, C.; SARAN, M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. **Meth. Enzymol.**, New York, v. 186, p. 343-355, 1990.
- BRACA, A.; SORTINO, C.; POLITI, M.; MORELLI, I.; MENDEZ, J. Antioxidant activity of flavonoids of *Licania licaniaeflora*. **J. Ethnopharmacol.**, Shannon, v. 79, p. 379-381, 2002.

- BRAND WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm. Wiss. Technol.**, London, v. 28, p. 25-30, 1995.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) n. 48 de 16.3.2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 mar. 2004.
- BRITISH Herbal Pharmacopeia. 4th ed. Bournemouth: British Herbal Medicine Association, 1996.
- BUELGA, C. S.; SCALBERT, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds-nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. **J. Sci. Food. Agr.**, Sussex, v. 80, p. 28-32, 2000.
- CALIXTO, J. B. Medicamentos Fitoterápicos. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Org.). **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p. 297-315.
- CAMPAROTO, M. L.; TEIXEIRA, R. O.; MANTOVANI, M. S.; VICENTINI, V. E. P. Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. and *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion root-tip and rat bone-marrow cells. **Genet. Mol. Biol.**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 1, p. 85-89, 2002.
- CARDOSO, M. L. C. **Desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas na obtenção de extratos secos nebulizados de *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach.** 2002. 114 f. Tese (Doutorado)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2002.
- CARLINI, E. A.; BRAZ, S. Efeito protetor do liofilizado obtido do abafado de *Maytenus* sp. (espinheira-santa) contra a úlcera gástrica experimental em ratos. In: CARLINI, E. L. A. (Ed.). **Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras: *Maytenus ilicifolia*, "espinheira-santa" e outras**. Brasília, DF: CEME/AFIP, 1988.
- CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004.
- CHÁVEZ, H.; BRAUN, A. E.; RAVELO, A. G.; GONZÁLEZ, A. G. First examples of dammarane triterpens isolated from Celastraceae. **Tetrahedron**, Oxford, v. 53, n. 18, p. 6465-6472, 1997.
- CHEESEMAN, K. H.; SLATER, T. F. Uma introdução à química de radicais livres. In: _____. (Ed.). **Radicais livres em medicina**. Rio de Janeiro: Interativos, 1996. p. 1-13.
- CHOI, C. W.; KIM, S. C.; HWANG, S. S.; CHOI, B. K.; AHN, H. J.; LEE, M. Y.; PARK, S. H.; KIM, S. K. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Sci.**, Bethesda, v. 163, p.1161-1168, 2002.

- CORDEIRO P. J. M.; VILEGAS J. H. Y.; LANÇAS, F. M. HRGC-MS Analysis of terpenoids from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium* (espinheira santa). **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo, v.10, no.6, p.523-526, 1999.
- CORSINO J.; BOLZANI, V. S.; PEREIRA, A. M. S.; FRANÇA, S. C.; FURLAN, M. Bioactive sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus aquifolium*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 48, no. 1, p.137-140, 1998.
- CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981.
- DANNE, A. **Polyphenole aus den traditionellen arzneipflanzen *Cistus encanus* L. und *Cistus salvifolius* L. (Cistaceae)**. 1994. 260f. Tese (Doutorado)–Universidade de Münster, Alemanha, 1994.
- DASGUPTA, N.; DE, B. Antioxidant activity of *Piper betle* L. leaf extract in vitro. **J. Food Chem.**, Amsterdam, v. 88, p. 219-224, 2004.
- DE BRUYNE, T.; PIETERS, L.; DEELSTRA, H.; VLIETINCK, A. Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. **Biochem. Syst. Ecol.**, Oxford, v. 27, p. 445-459, 1999.
- DELLE MONACHE, F.; POMPONI, M.; MARINI-BETTOLO, G. B.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; LIMA, O. G. A methylated catechin and proanthocyanidins from Celastraceae. **Phytochemistry**, Oxford, v. 15, p. 574-575, 1996.
- DUARTE, M. R.; DEBUR, M. C. Steam and leaf morphoanatomy of *Maytenus ilicifolia*. **Fitoterapia**, Milano, v. 76, p. 41-49, 2005.
- DURAN, R. M.; PADILLA, R. B. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. **Grasas Aceites**, Sevilla, v. 44, no. 2, p. 101-106, 1993.
- EMEA. Position paper on the risks associated with the use of herbal products containing *Aristolochi species*. **The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products – Working Party on Herbal Medicinal Products**. 2000. Disponível em: <<http://www.emea.eu.int/pdfs/human/hmpc/002300en.pdf>>. Acesso em: 8 ago. 2004.
- EMEA. Summary Report – *Aristolochi*. **The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products – Committee for veterinary medical products**. 1997. Disponível em: <<http://www.eu.int/pdfs/vet/mrls/027197en.pdf>>. Acesso em: 14 ago. 2004.
- ERDELMEIER, C. A. J.; CINATL, J. JR.; RABENAU, H.; DOERR, H. W.; BIBER, A.; KOCH, E. Antiviral and antiphlogistic activities of *Hamamelis virginiana* bark. **Planta Med.**, Stuttgart, v. 62, no. 3, p. 241-145, 1996.
- FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. rev. ampl. Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2003. p. 263-288.
- FARMACOPÉIA Brasileira. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

- FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2000.
- FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. Parte II, p. 194.
- FENGLIN, H.; RUILI, L.; BAO, H.; LIANG, M. Free radical scavenging activity of extracts prepared from fresh leaves of selected Chinese medicinal plants. **Fitoterapia**, Milano, v. 74, p. 14-23, 2004.
- FERNANDEZ, O.; CAPDEVILA, J. Z.; DALLA, G. MELCHOR, G. Efficacy of *Rhizophora mangle* aqueous bark extract in the open surgical wounds. **Fitoterapia**, Milano, v. 73, p. 564-568, 2002.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Méd. Bras.**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.
- FLETCHER, A. C.; PORTER, L. J.; HASLAM, E.; GUPTA, R. K. Plant proanthocyanidins. Part 3. Conformational and configurational studies of natural procyanidins. **J. Chem. Soc., Perkin Trans. I**, Cambridge, p. 1628-1637, 1977.
- FOO, L. Y.; LU, Y.; HOWELL, A. B.; VORSA, N. The structure of cranberry proanthocyanidins which inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated *Escherichia coli* in vitro. **Phytochemistry**, Oxford, v. 54, p. 173-181, 2000.
- FURLAN, M. **Estudo químico de *Maytenus evonymoidis* Reiss**. 1985 f. Dissertação (Mestrado)-Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1985.
- GLASL, H. Zur Photometrie in der Drogenstandardisierung – 3. Gehaltsbestimmung von Gerbstoffdrogen. **Deutsch. Apoth. Ztg.**, Stuttgart, v. 123, p. 1979-1987, 1983.
- GONZALES, J. G.; DELLE MONACHE, G.; DELLE MONACHE, F.; MARINI-BETTOLO, G. B. Chuchuhuasha: a drug used in folk medicine in the Amazonian and Andean areas: a chemical study of *Maytenus* leaves. **J. Ethnopharmacol**, Shannon, v. 5, p. 73-77, 1982.
- GONZÁLEZ, A. G.; KENNEDY, M. L.; RODRÍGUEZ, F. M.; BAZZOCCHI, I. L.; JIMÉNEZ, I. A.; RAVELO, A. G.; MOUJIR, L. Absolute configuration of triterpene dimmers from *Maytenus* species (Celastraceae). **Tetrahedron**, Oxford, v. 57, no. 7, p. 1283-1287, 2001.
- GORDON, M. H. The mechanism of antioxidant action in vitro. In: HUDSON, B. J. F. (Ed.). **Food antioxidants**. London: Elsevier Applied Science, 1990. p. 1-18.
- GUERRA, S. S. F.; FANAN, S. Visão cosmética dos radicais livres. **Cosmetics e Toiletries**, São Paulo, v. 6, p. 51-54, 1994.
- HAGERMAN, A. E. Tannin-protein interaction. In: HO, C. T.; LEE, C. Y.; HUANG, M. T. (Ed.). **Phenolic compounds in food and their effects on health. 1: analysis, occurrence and Chemistry**. Washington, DC: American Chemical Society, 1992. cap. 19, p. 236-47.

- HALLIWEL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annu. Rev. Nutr.**, Palo Alto, v. 16, p. 33-50, 1996.
- HALLIWEL, B; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Arch. Biochem. Biophys**, New York, v. 246, p. 501-514, 1986.
- HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs possible modes of action. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v. 59, p. 205-215, 1996.
- HASLAM, E. Polyphenol-protein interactions. **Biochem. J.**, London, v. 139, p. 285-288, 1974.
- HASLAM, E.; HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J.; MABRY, H. **The flavonoids**. London: Chapman Hall, 1975. v. 9, p. 505-560.
- HASLAM, E.; LILLEY, T. H.; YA, C.; GAFFNEY, S. H.; SPENCER, C. M.; MARTIN, R.; MAGNOLATO, D. Some observations on the role of plant polyphenols in traditional herbal medicines. **Farmaceutisch Tijdschr. voor Belgie**, Brussel, v. 66, p. 21, 1989.
- HATANO, T.; EDAMATSU, M.; MORI, A.; FUJITA, Y.; YASUHARA, et al. Effects of interaction of tanins with co-existing substances. VI Effects of tanins and related polyphenols on superoxide anion radical and on DPPH radical. **Chem. Pharm. Bull**, Tokyo, v. 37, p. 2016-2021, 1989.
- HATANO, T.; MIYATAKE, H.; NATSUME, M.; OSAKABE, N.; TAKIZAWA, T.; ITO, H.; YOSHIDA, T. Proanthocyanidin glycosides and related polyphenols from cacao liquor and their antioxidant effects. **Phytochemistry**, Oxford, v. 59, p. 749-758, 2002.
- HATTORI, M.; KUSUMOTO, Y.; NAMBA, T.; ISHIGAMI, T.; HARA, Y. Effect of tea polyphenols on glucan synthesis by glucosyl-transferases from *Streptococcus mutans*. **Chem. Pharm. Bull**, Tokio, v. 38, p. 717-720, 1990.
- HEMINGWAY, R. W.; FOO, L.Y.; PORTER, L. J. Linkage isomerism in trimeric and polymeric 2,3-*cis*-procyanidins. **J. Chem. Soc., Perkin Trans. I**, Cambridge, p. 1209-1216, 1982.
- HEYWOOD, V. H. **Flowering plants of the world**. Oxford: Oxford University Press; London: Melboulne, 1978.
- HIRATA, L. L. **Avaliação da capacidade antioxidante de extratos de *Bauhinia microstachya* Macbride, Cesalpiniaceae, em serum**. 2004. f. Dissertação (Mestrado)-Departamento, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.
- HO, C. T.; CHEN, Q.; SHI, H.; ZHANG, K. Q.; ROSEN, R. T. Antioxidative effect of polyphenol extract prepared from various Chinese teas. **Prev. Med.**, San Diego, v. 21, p. 520-525, 1992.
- HOLLEY, A. E.; CHEESEMAN, K. Measuring free radical reactions in vivo. **Br. Med. Bull.**, Oxford, v. 49, p. 494-505, 1993.

- HÖR, M.; RIMPLER, H.; HEINRICH, M. Inhibition of intestinal chloride secretion by proanthocyanidin oligomers from *Gazuma ulmifolia*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 61, no. 3, p. 208-212, 1995.
- HUSSEIN, G.; MIYASHIRO, H.; NAKAMURA, N.; HATTORI, M.; KAWAHATA, T.; OTAKE, T.; KAKIUCHI, N.; SHIMOTOHNO, K. Inhibitory effects of Sudanese plant extracts on HIV-1 replication and HIV-1 protease. **Phytother. Res.**, London, v. 13, no. 1, p. 31-36, 1999.
- JACOMASSI, E.; MACHADO, R. S. Características antômicas de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek e *Maytenus aquifolia* Mart.) e mata-olho (*Sorocea bonplandii* (Baill.) Burg. Lanj. & Boer) para o controle de qualidade de matéria prima. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v. 6, n. 1, p. 84-96, 2003.
- JESUS TUÑÓN, M.; JIMÉNEZ, R. Envejecimiento y estrés oxidativo: papel de los antioxidantes. In: MARRONI, N. P. (Org.). **Estresse oxidativo e antioxidantes**. Canoas: Ed. da Ulbra, 2002. p. 131-152.
- KATALINIÉ, V.; MILOS, M.; MODUN, D.; MUSIÉ, I.; BOBAN, M. Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catequin. **Food Chem**, Amsterdam, v. 86, no. 4, p. 593-600, 2004.
- KLEIN, A. B. Dano oxidativo e regulação biológica pelos radicais livres. In: MARRONI, N. P. (Org.). **Estresse oxidativo e antioxidantes**. Canoas: Ed da Ulbra, 2002. p. 15-19.
- KOŁODZIEJ, H. ¹H RMN spectral studies of procyanidin derivatives: derivation of diagnostic ¹H RMN parameters applicable to the structural elucidation of oligomeric procyanidins. In: HEMINGWAY, R. W.; LAKS, P. E. (Eds.). **Plant polyphenols: synthesis, properties, significance**. New York: Plenum, 1992. v. 59, p. 295-320.
- LEE, B. W.; LEE, J. H.; LEE, S. T.; LEE, H. S.; LEE, W. S.; JEONG, T. S.; PARK, K. H. Antioxidant and cytotoxic activities of xanthenes from *Cudrania tricuspidata*. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, Oxford, v. 15, p. 5548-5552, 2005.
- LEITE, J. P. V.; JORGE, R. M.; OLIVEIRA, A. B.; TAGLIATI, C. A. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. **J. Ethnopharmacol.**, Shannon, v. 94, no. 1, p. 93-100, 2004.
- LIMA, O. G.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; COELHO, J. S. B.; MARTINS, D.G.; LACERDA, A.L.; MACIEL, G.M. Substâncias antimicrobianas de plantas superiores: Comunicação XXXI. Maitenina, novo antimicrobiano con ação antineoplástica, isolada de Celastraceae de Pernambuco. **Rev. Inst. Antibiot.**, Recife, v. 9, n. 1/2, p.17-25, 1969.
- LLESUY, S. F. Introducción y especies activas de oxígeno. In: MARRONI, N. P. (Org.). **Estresse oxidativo e antioxidantes**. Canoas: Ed. da Ulbra, 2002. p. 22-31.
- LU, Y.; FOO, L. Y. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). **Food Chem.**, Amsterdam, v. 5, p. 197-202, 2001.

- MACAUBAS, C. I. P.; OLIVEIRA, M. G. M.; FORMIGONI, M. L. O. S. et al. Estudo da eventual ação antiúlcera gástrica do bálsamo (*Sedum* sp.), folha da fortuna (*Briophyllum calycinum*) e da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) em ratos. In: CARLINE, E. L. A. (Ed.). **Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras: *Maytenus ilicifolia*, “espinheira-santa” e outras.** Brasília, DF: CEME/AFIP, 1988.
- MASAKI, H.; ATSUMI, T.; SAKURAI, H. Hammamelitannins as a new potent active oxygen scavenger. **Phytochemistry**, New York, v. 37, no. 2, p. 337-343, 1994.
- MELLO, J. C. P. **Desenvolvimento galênico de macerados de *Baccharis trimera* (Less) DC.:** Compositae: (Carqueja). 1989. 135 f. Dissertação (Mestrado)–Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 1989.
- MELLO, J. C. P.; PETEREIT F.; NAHRSTEDT, A. Flavan-3-ols and prodelphinidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, New York, v. 41, no. 3, p. 807-813, 1996a.
- MELLO, J. C. P. et al. Prorobinetinidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, New York, v. 42, p. 857-862, 1996b.
- MELLO, J. C. P.; PETROVICK, P. R. Quality control of *Baccharis trimera* (Less) DC (Asteraceae) hydroalcoholic extracts. **Acta Farm. Bonaer.**, San Martin, v. 19, n. 3, p. 211-215, 2000.
- MELLO, J. C. P.; SANTOS, S. C. Taninos. In.: SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5. ed. Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2003. p. 615.
- MELLO, J. C. P. **Untersuchung zur struktur der flavan-3-ole und proanthocyanidine aus der *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville (Mimosaceae).** 1995. Tese (Doutorado) – Universidade de Münster, Münster, 1995.
- MELO, E. A.; GUERRA, N. B. Ação antioxidantes de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Bol. SBCTA**, Campinas, SP, v. 36, n. 1, p. 1-11, jan./jun., 2002.
- MELO, S. F.; SOARES, S. F.; COSTA, R. F.; SILVA, C. R.; OLIVEIRA, M. B. N.; BEZERRA, R. J. A. C.; ARAÚJO, A. C.; FILHO, N. B. Effect of the *Cymbopogon citratus*, *Maytenus ilicifolia* and *Baccharis genistelloides* extracts against the stannous chloride oxidative damage in *Escherichia coli*. **Mut. Res.**, Amsterdam, v. 496, p. 33-38, 2001.
- MIRANDA, M. S.; CINTRA, R. G.; BARROS, S. B. M.; MANCINI-FILHO, J. Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. **Braz. J. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 31, no. 8, p. 1075-1079, 1998.
- MONTANARI, T.; BEVILACQUA, E. Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. on pregnant mice. **Contraception**, New York, v. 65, p. 171-175, 2002.

- MOREIRA, D. L.; ENGELHARDT, R.; REIS, A. S.; SANCHES, E. M.; LEITÃO, S. G.; LEITÃO, G. G. Substâncias fenólicas com atividade antioxidante de *Pseuptionia contola* (Leguminosae-Mimosidae). **Rev. Bras. Farmacogn.**, São Paulo, v. 12, p. 124-125, 2002.
- MOSSI, A. J.; CANSIAN, R. L.; CARVALHO A. Z.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, V.; MAZUTTI, M.; FILHO, I. N.; ECHEVERRIGARAY, S. Extraction and characterization of volatile compounds in *Maytenus ilicifolia*, using high-pressure CO₂. **Fitoterapia**, Milano, v. 75, p. 168-178, 2004.
- NAKAGAWA, T.; YOKOZAWA, T. Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v. 40, no. 12, p. 1745-1750, 2002.
- NAKAHARA, K.; KAWABATA, S.; ONO, H.; OGURA, K.; TANAKA, T.; OOSHIMA, T.; HAMADA, S. Inhibitory effect of oolong tea polyphenols on glucosyltransferases of *Streptococcus mutans*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Moscow, v. 59, p. 968-973, 1993
- NASCIMENTO, V. T.; LACERDA, E. U.; MELO, J. G.; LIMA, C. S. A.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. Controle de qualidade de produtos à base de plantas medicinais comercializados na cidade do Recife-PE: erva-doce (*Pimpinella anisum* L.), quebra-pedra (*Phyllanthus spp.*), espinheira santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.) e camomila (*Matricaria recutita* L.). **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v. 7, n. 3, p. 56-64, 2005.
- NEGRO, C.; TOMMASI, L.; MICELI, A. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. **Bioresour. Technol.**, Oxford, v. 87, p. 41-44, 2003.
- NUNES, G. P.; SILVA, M. F.; RESENDE, U. M.; SIQUEIRA, J. M. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no centro de Campo Grande, MS. **Rev. Bras. Farmacogn.**, São Paulo, v. 13, n. 2, p. 83-91, 2003.
- OKANO, R. M. C. **Estudos taxonômicos do gênero *Maytenus* Mol. emend. Mol. (Celastraceae) do Brasil extra-amazônico.** 1992. 241f. Tese (Doutorado)-Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 1992.
- OLIVEIRA, C. A.; AZZOLINI, A. E. C. S.; SILVA, S. C.; KANASHIRO, A.; KABEYA, L. M.; AZEVEDO, A. P. G. B.; GONÇALVES, C. F. F.; COREDIRO, D. S.; LEITÃO, D. P. S.; GASPAR, L. R.; SOUZA, P. L. V.; VALIM, Y. M. L.; MANTOVANI, B. Avaliação bioquímica e ultraestrutural da interação de imunocomplexos de IgG com leucócitos polimorfonucleares: efeito de antioxidantes naturais. **Eclét. Quím.**, Araraquara, v. 27, n. especial, 2002. Disponível em: < <http://www.scielo.br/> >. Acesso em: 8 ago. 2004.
- OLIVEIRA, J. F.; BRAGA, A. C. S.; OLIVEIRA, M. B. N.; ÁVILA, A. S.; ARAÚJO, A. C.; CARDOSO, V. N.; BEZERRA, R. J. A. C.; BERNARDO FILHO, M. Assessment of the effect of *Maytenus ilicifolia* (espinheira santa) extract on the labeling of red blood cell and plasma proteins with technetium-99m. **J. Ethnopharmacol.**, Shannon, v. 72, p. 179-184, 2000.
- OLIVEIRA, M. G. M.; MONTEIRO, M. G.; MACAÚBAS, C.; BARBOSA, V. P.; CARLINI, E. A. Pharmacologic and toxicologic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **J. Ethnopharmacol.**, Shannon, v. 34, p. 29-41, 1991.

- OLIVEIRA, S. S.; MOTA, V. C.; BARROS, W. M.; BARROS, M. M. Efeitos do extrato metanólico de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Barbatimão) sobre o ciclo estral de ratas e parâmetros bioquímicos. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 16., 2002. Cuiabá. **Resumos...** Cuiabá: UFMT, 2002.
- OOSHIMA, T.; MINAMI, T.; AONO, W.; IZUMATANI, A.; SOBUE, S.; FIJIWARA, T.; KAWABATA, S.; HAMADA, S. Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries in SPF ratas infected with *Streptococcus mutans*. **Caries Res.**, Basel, v. 27, p. 124-129, 1993.
- OSAKABE, M.; NATSUME, M.; ADACHI, T.; YAMAGISSHI, M.; HIRANO, R.; TARIZAWA, T.; ITAKURA, M.; KONDO, K. Effects of cacao liquor polyphenols on the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidation in hypercholesterolemic rabbits. **J. Atheroscler. Thromb.**, Limerick, v. 7, p. 164-168, 2000.
- OTAKE, S.; MAKIMURA, M.; KUROKI, T.; NISHIHARA, Y.; HIRASAWA, M. Anticaries effects of polyphenolic compounds from Japanese green tea. **Caries Res.**, Basel, v. 25, p. 438-443, 1991.
- OUTTRUP, H.; SCHAUMBURG, K. Structure elucidation of some proanthocyanidins in barley by ¹H 270 MHz NMR spectroscopy. **Carlsberg Res. Commun.**, Copenhagen, v. 46, p. 3-52, 1981.
- PELLATI, F.; BENVENUTI, S.; MAGRO, L.; MELEGARI, M.; SORAGNI, F. Analysis of phenolic compounds and radical scavenging activity of *Echinacea* spp. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Amsterdam, v. 16, no. 2, p. 289-301, 2004.
- PEREIRA, A. M. S.; FILHO, W. B.; FRANÇA, S. C.; FURLAN, M. Indução de metabólitos bioativos em culturas de células de *Maytenus ilicifolia*. **Eclét. Quim**, Araraquara, v. 27, n. especial, 2002. Disponível em: < <http://www.scielo.br/> >. Acesso em: 8 ago. 2004.
- PETEREIT, F. **Polyphenolische Inhaltsstoffe und Untersuchungen zur Entzündungshemmenden Aktivität der traditionellen Arzneipflanze *Cistus incanus* L. (Cistaceae)**. 1992. 234f. Tese (Doutorado em Ciências Naturais)-Universidade de Münster, Münster, 1992.
- PIETTA, P. G. Flavonoids as Antioxidants. **J. Nat. Prod.**, Washington, DC, v. 63, p. 1035-1042, 2000.
- 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 1. **Anal. Biochem.**, San Diego, v. 269, p. 337-341, 1999.
- PULLEN, C. B.; SCHMITZ, P.; HOFFMANN, D.; MEURER, K.; BOETTCHER, T.; BAMBERG, D.; PEREIRA, A. M.; FRANÇA, S. de C.; HAUSER, M.; GEERTSEMA, H.; WYK, A.; MAHMUD, T.; FLOSS, H. G.; LEISTNER, E. Occurrence and non-detectability of maytansinoids in individual plants of the genera *Maytenus* and *Putterlickia*. **Phytochemistry**, New York, v. 62, p. 377-387, 2003.

- QUEIROGA, C. L.; SILVA, G. F.; DIAS, P. C.; POSSENTI, A.; CARVALHO, J. E.
Evaluation of the antiulcerogenic activity of friedelin-3 β -ol and friedelin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). **J. Ethnopharmacol.**, Shannon, v. 72, no. 3, p. 465-468, 2000.
- QUEIROZ, C. R. A. A.; MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). **Rev. Árvore**, Viçosa, v. 26, n. 4, p. 493-497, 2002.
- RUBERTO, G.; BARATTA, M. T.; DEANS, S. G.; DORMAN, H. J. D. Antioxidant and antimicrobial activity of *Foeniculum vulgare* and *Crithmum maritimum* essential oils. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 66, p. 687-693, 2000.
- RUSSEL, J. B. Os elétrons. _____. **Química geral**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1994. v. 1, p. 242-294.
- SANNOMIYA, M.; VILLEGAS, W.; RASTRELLI, L.; PIZZA, C. A flavonoid glycoside from *Maytenus aquifolium*. **Phytochemistry**, New York, v. 49, no. 1, p. 237-239, 1998.
- SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. de. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2003. cap. 24, p. 615-56.
- SCHANEBERG, B. T.; GREEN, D. K.; SNEDEN, A. T. Dihydroagarofuran Sesquiterpen Alkaloids from *Maytenus putterlickoide*. **J. Nat. Prod.**, Washington, DC, v. 64, no. 5, p. 624-625, 2001.
- SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. Analysys of condensed tannins: a reiew. **Animal Feed Sci. Technol.**, Amsterdan, v. 91, p. 21-40, 2001.
- SCHOLZ, E. Pflanzliche Gerbstoffe: Pharmakologie und Toxikologie. **Dtsch. Apoth. Ztg.**, v. 134, n. 34, p. 3167-3179, 1994.
- SEBSEBE, The genus *Maytenus* (Celastraceae) in NE tropical Africa and tropical Arabia. **Symb. Bot. Ups.**, Uppsala, v. 25, p. 1-101, 1985.
- SHAHIDI, F., JANITHA, P. K., WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. **CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, Boca Raton, v. 32, no. 1, p. 67-103, 1992.
- SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 22, n. 1, p.94-103, 1999.
- SOARES, L. A. L.; OLIVEIRA, A. L.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R. Development and validation of LC-method for determination of catechin and epicatechin in aqueous extracts from leaves of *Maytenus ilicifolia*. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Amsterdan, v. 36, no. 4, p. 787-790, 2004.

- SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev. Nutr.**, Campinas, SP, v. 15, n. 1, p.71-81, 2002.
- SOUZA-FORMIGONI, M. L. O.; OLIVEIRA, M. G. M.; MONTEIRO, M. G.; SILVEIRA-FILHO, N. G.; BRAZ, S.; CARLINI, E. A. Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **J. Ethnopharmacol**, Shannon, v. 34, p. 21-27, 1991.
- THOMPSON, R. S.; JACQUES, D.; HASLAM, E.; TANNER, R. J. N. Plant proanthocyanidins. Part 1. Introduction; the isolation, structure, and distribution in nature of plant procyanidins. **J. Chem. Soc., Perkin Trans. I**, Cambridge, p. 1387-1399, 1972.
- TOLEDO, C. E. M. de **Estudo anatômico, químico e biológico de cascas e extratos obtidos de barbatimão** □*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, Leguminosae□. 2002. 116 f. Dissertação (Mestrado)—Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.
- UEFFING, I. **Untersuchung von Procyanidinen in *Tilia spec.*—ein Beitrag zur qualitativen und quantitativen HPLC-Analytik von Flavanolen**. 1988. 164f. Tese (Doutorado em Ciências Naturais)-Universidade de Münster, Münster, 1988.
- VILEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F. M. Detecção de adulterações em amostras comerciais de “espinheira-santa” por cromatografia gasosa de alta resolução (HRGC). **Rev. Ciênc. Farm.**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 241-248, 1997.
- WEINGES, K.; BÄHR, W.; EBERT, W.; GÖRITZ, K.; MARX, H. D. Konstitution, Entstehung und Bedeutung der Flavonoid-Gerbstoffe. **Fortschr. Chem. Org. Naturst.**, Wien, v. 27, p. 157-260, 1969.
- WEINGES, K.; KALTEENHAUSER, W.; MARX, H. D.; NADER, E.; NADER, F.; PERNER, J.; SEILER D. Procyanidine aus Früchten. **Liebigs Ann. Chem.**, Weinheim, v. 711, p. 184-204, 1968a.
- WEINGES, K.; GORITZ, K.; NADER, F. Zur Kenntnis der Proanthocyanidine, XI Konfigurationsbestimmung von C₃₀H₂₆O₁₂ –Procyanidinen und Strukturaufklärung eines neuen procyanidins. **Liebigs Ann. Chem.**, Weinheim, v. 715, p. 164-171, 1968b.
- WINK, M. Physiology of secondary product formation in plants. In: CHARLWOOD, B. V.; RHODES, M. J. C. (Ed.). **Secondary products from plant tissue culture**. Oxford: Clarendon, 1990.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for the appropriate use of herbal medicines. Manila, 1998a.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Quality control methods for medicinal plant materials. Geneva, 1998b.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines. Manila, 1993.

YOKOZAWA, T.; DONG, E.; NAKAGAWA, T.; KASHIWAGI, H.; NAKAGAWA, H.; TAKEUCHI, S.; CHUNG, H. Y. *In vitro* and *in vivo* studies on the radical-scavenging activity of tea. **J. Agr. Food. Chem.**, Easton, v. 46, p. 2143-2150, 1998.

ZHU, N.; SHARAPIN, N.; ZHANG, J. Three glycosides from *Maytenus ilicifolia*. **Phytochemistry**, New York, v. 47, no. 2, p. 265-268, 1998.